



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

ΔΠΜΣ «Αμπελουργία – Οινολογία»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΘΕΜΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ, ΣΕ ΓΛΕΥΚΗ ΚΑΙ ΟΙΝΟΥΣ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ
ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ, ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ
ΥΠΟΖΩΝΕΣ, ΠΟΠ ΝΕΜΕΑ**

ΚΟΛΟΚΟΤΣΑΣ ΦΩΤΙΟΣ - ΠΑΣΧΑΛΙΝΟΣ



Επιβλέπουσα: Επίκουρος Καθηγήτρια Σ. Καλλίθρακα

ΑΘΗΝΑ 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΔΠΜΣ «Αμπελουργία – Οινολογία»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Εργαστήριο Οινολογίας

ΘΕΜΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ, ΣΕ ΓΛΕΥΚΗ ΚΑΙ ΟΙΝΟΥΣ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ
ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ, ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ
ΥΠΟΖΩΝΕΣ, ΠΟΠ ΝΕΜΕΑ**

ΚΟΛΟΚΟΤΣΑΣ ΦΩΤΙΟΣ - ΠΑΣΧΑΛΙΝΟΣ

Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής:

Επ. Καθ. Στ. Καλλίθρακα, Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας
Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Καθ. Γ. Κοτσερίδης Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Επ. Καθ. Αικ. Μπινιάρη Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΑ.....	8
1.1.2 Η αμπελουργική ζώνη παραγωγής οίνων Ο.Π.Α.Π. Νεμέα	9
1.1.3 Αμπελογραφικοί χαρακτήρες και φαινολογικά στάδια	13
1.1.4 Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά	15
1.2 Αφομοιώσιμο άζωτο	16
1.2.1 Πώς η προσθήκη αζώτου στον αμπελώνα επιδρά στη συγκέντρωση των αμινοξέων.....	17
1.2.2 Προφίλ συσσώρευσης αμινοξέων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.....	22
1.2.3 Γευστικά συστατικά της ζύμωσης του μύκητα.....	22
1.2.4 Επίδραση των αμινοξέων στην παραγωγή υδρόθειου.....	24
1.2.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συσσώρευση του αζώτου	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
2.1 Οίνος – Γλεύκος Αγιωργίτικου.....	29
2.2 Πρωτόκολλο οινοποίησης.....	31
2.3 Χαρακτηριστικά του γλεύκους και του οίνου που χρησιμοποιήθηκαν.....	33
2.4 Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου	40
2.5 Προσδιορισμός αζώτου βασικών αμινοξέων.....	42
2.6 Πρότυπες καμπύλες.....	45
2.7 Προσδιορισμός των αμινοξέων σε γλεύκη και οίνους με τη χρήση της HPLC.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	51

3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων υπολογισμού αμμωνιακού αζώτου.....	51
3.2 Αποτελέσματα μετρήσεων υπολογισμού των αμινοξέων σε οίνους των ζωνών της Νεμέας.....	51
3.3 Αποτελέσματα μετρήσεων υπολογισμού των αμινοξέων σε γλεύκη των ζωνών της Νεμέας.....	64
3.4 Αποτελέσματα μετρήσεων υπολογισμού αζώτου βασικών αμινοξέων.....	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	84

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας είναι ο προσδιορισμός των αμινοξέων και των αζωτούχων συστατικών, σε γλεύκη και οίνους της ποικιλίας Αγιωργίτικο, προερχόμενα από διαφορετικές υποζώνες, ΠΟΠ Νεμέα. Πιο συγκεκριμένα, χωρίστηκε η ζώνη ΠΟΠ Νεμέα σε τέσσερις υποζώνες, το Κούτσι, τον Ασπρόκαμπο, την Αρχαία Νεμέα και τον Κάμπο Νεμέας όπου σε κάθε υποζώνη ορίστηκαν αντιπροσωπευτικές περιοχές από τις οποίες έγιναν δειγματοληψίες από τρεις χρονιές 2012, 2013, 2014 ούτως ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Τα αμινοξέα και τα αζωτούχα συστατικά του γλεύκους είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης ομαλά. Επιπλέον μπορεί να επηρεάσουν τη σύσταση και το άρωμα του κρασιού. Στόχος, λοιπόν, είναι ο προσδιορισμός της υποζώνης, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αμινοξέων και αζωτούχων συστατικών στα γλεύκη που προέρχονται από αυτή. Με αυτό τον τρόπο θα μπορέσει να γίνει καλύτερη αξιοποίηση των γλευκών κατά την οινοποίησή τους, καθώς και να χωριστεί η ΠΟΠ Νεμέα με πιο αυστηρά κριτήρια συνυπολογίζοντας κι άλλους παράγοντες ποιότητας του γλεύκους.

Λέξεις κλειδιά: Νεμέα, Αγιωργίτικο, αμινοξέα, αφομοιώσιμο άζωτο, γλεύκος, αμμωνιακό άζωτο, ζύμωση του γλεύκους.

ABSTRACT

The aim of this thesis is to determine the amino acids and the nitrogenous compounds, in must and wine of the “Agiorgitiko“ variety, coming from different sub-zones of PDO Nemea. The PDO zone Nemea was divided into four subzones; Koutsi, Asprokampos, Ancient Nemea and Kampos Nemeas. Subsequently, the samplings were extracted from representative areas of the above subzones, for three continuous years, 2012, 2013, 2014, in order to draw safe conclusions. The amino acids and the nitrogenous compounds of must are necessary for the development of the yeasts and the plain completion of alcoholic fermentation. Moreover, they can affect the composition and the aroma of the wine. Thus, our goal is to determine which subzone has the highest concentrations of amino acids and nitrogenous compounds in order for a better use of musts when vinification occurs, and also a split of the PDO Nemea with more stringent criteria, taking into consideration other factors of must quality.

Key words: Nemea, Agiorgitiko, amino acids, yeasts assimilable nitrogen, grape must, ammonia nitrogen, fermentation.

Ευχαριστίες

Για την παρούσα διπλωματική εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ανάθεση του θέματος τον Καθηγητή κ. Γ. Κοτσερίδη και την Επίκουρο Καθηγήτρια κα.Σ. Καλίθρακα. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Γ. Κοτσερίδη, την κα.Σ.Καλίθρακα και τη κα. Α Μπινιάρη , οι οποίοι, πέραν των πανεπιστημιακών γνώσεων, συνέβαλλαν στην διαμόρφωση του οινολογικού μου και αμπελουργικού μου χαρακτήρα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Σ. Καλίθρακα για την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου εργασίας και την πολύτιμη καθοδήγησή της για την εκπόνησή της. Θερμά ευχαριστώ την κα. Μετάφα Μαρία ερευνήτρια του Ινστιτούτου Οίνου για την πολύτιμη καθοδήγηση και ουσιαστική βοήθειά της στα πειράματα που διεξήχθησαν στο Ινστιτούτο Οίνου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ν.Προξενιά ερευνήτρια του εργαστηρίου οινολογίας στο Γ.Π.Α και τον κ.Σ.Πετρόπουλο υποψήφιο διδάκτωρ του τμήματος Οινολογίας για την ουσιαστική βοήθεια στην εκπόνηση της εργασίας μου. Τέλος ευχαριστώ τον πατέρα μου και την μητέρα μου για τη στήριξή τους και τη δύναμη που μου δίνουν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ

1.1 Γενικά

Το Αγιωργίτικο είναι από τις ευγενέστερες ερυθρές ελληνικές ποικιλίες και καλλιεργείται εδώ και πολλά χρόνια στην περιοχή της Νεμέας. Η καλλιέργειά της συνιστάται και για το αμπελουργικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου, για της Ν.Α. Αττικής, Πειραιώς, τους νομούς Αιτωλοακαρνανίας, Βοιωτίας και Εύβοιας και επιτρέπεται στους νομούς Δράμας, Πέλλας, Πιερίας και Φλώρινας (Σταυρακάκης, 2010).

Από τους αρχαίους χρόνους η περιοχή της Νεμέας παράγει οίνους υψηλής ποιότητας. Σύμφωνα με ιστορικές μαρτυρίες η παραγωγή οίνων κατά την αρχαιότητα ήταν εντοπισμένη γύρω από την αρχαία πόλη Φλιούς, που είχε ιδρυθεί από τους Δωριείς του γειτονικού Άργους. Η πόλη αυτή πήρε το όνομά της από τον Φλίαντα ένα γιο του Διονύσου που ζούσε στις πηγές του ποταμιού Ασωπού, ο οποίος διασχίζει τον κάμπο της Νεμέας. Οι οίνοι της περιοχής ήταν φημισμένοι κατά την αρχαιότητα ακόμα και στην Αθήνα. Αναφορές και μνείες για τον Φλιάσιο οίνο συναντάμε σε αρχαία κείμενα (Κουράκου, (2000), ΝΕΜΕΑ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΟΙΝΟΠΕΔΙΟ, Αθήνα: Φοίνικα).

Σταδιακά η πόλη εγκαταλείφθηκε και ότι απέμεινε καταστράφηκε από τους Τούρκους κατακτητές το 1460. Κέντρο της καλλιέργειας έγινε στη συνέχεια το χωριό Άγιος Γεώργιος, το οποίο βρίσκεται 5 χιλιόμετρα ανατολικά από την αρχαία τοποθεσία της αρχαίας πόλης Φλιούς. Από την αρχή του αιώνα μας, το όνομα του χωριού αυτού έγινε Νεμέα (που σημαίνει νομή, βοσκοτόπι) και σήμερα είναι το κέντρο παραγωγής της αμπελουργικής ζώνης Νεμέας. Από το 1971 η ευρύτερη περιοχή της Νεμέας έχει χαρακτηριστεί ως ζώνη ονομασίας προέλευσης ανωτέρας ποιότητας.

Η ζώνη της Νεμέας, θεωρείται μια από τις πιο σημαντικές οινικές περιοχές της χώρας. Σε αυτό συνετέλεσαν τα πολύ καλά ποιοτικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας, καθώς και το γεγονός ότι βρίσκεται κοντά στην Αθήνα με αποτέλεσμα πολλές οινοποιητικές επιχειρήσεις να εγκατασταθούν στην ευρύτερη περιοχή.

1.1.2 Η αμπελουργική ζώνη παραγωγής οίνων Ο.Π.Α.Π. Νεμέα

Η αμπελουργική ζώνη παραγωγής οίνων Ο.Π.Α.Π. NEMEA οροθετήθηκε το 1971 με το Β.Δ. 539/71, με το οποίο αναγνωρίσθηκε η ονομασία προέλευσης NEMEA για δύο τύπους ερυθρών οίνων: ξηρό και γλυκό.

Αρχικά η ζώνη περιελάμβανε 14 κοινότητες, στη συνέχεια όμως επεκτάθηκε (Π.Δ.457/88) και σε άλλες τρεις κοινότητες πιν.1.1.

Πίνακας 1.1 Κοινότητες της αμπελουργικής ζώνης παραγωγής οίνων Ο.Π.Α.Π.

NEMEA

Αρχική ζώνη (Β.Δ. 539/71)

Επέκταση ζώνης (Π.Δ. 457/88)

Κοινότητες

Κοινότητες

1. Αηδόνια

15. Γυμνό

2. Αρχαίες Κλεωνές

16. Κεφαλάρι

3. Αρχαία Νεμέα

17. Μαλανδρένι

4. Ασπρόκαμπος

5. Γαλατάς

6. Δάφνη

7. Καστράκι

8. Κούτσι

9. Λεόντιο

10. Μποζικά

11. Νεμέα

12. πετρί

13. Τιτάνι

14. Ψάρι



Εικόνα 1, ‘Δήμος Νεμέας’

Για την παραγωγή των θεσμοθετημένων οίνων Ο.Π.Α.Π. ΝΕΜΕΑ πρέπει να πληρούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις. Η ποικιλία να είναι το Αγιωργίτικο. Η μόρφωση των πρέμων πρέπει να γίνεται σε γραμμικό ή κυπελλοειδές σχήμα. Το κλάδεμα πρέπει να είναι βραχύ. Η ανώτερη στρεμματική απόδοση είναι τα 1200kg/στρ. Τέλος η ελάχιστη περιεκτικότητα των σταφυλιών σε σάκχαρα είναι 188g/l για το ξηρό και 221(g/l) για το γλυκό (Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007 Άρθρο 118 γ, Παρ/φος 2).

Η αμπελουργική ζώνη της Νεμέας έχει έκταση 23.000στρ. και θεωρείται από τις καλύτερες αμπελουργικές περιοχές της χώρας. Αρχίζει από υψόμετρο 200μ. και φτάνει τα 850μ. . Οι μεγάλες διαφορές του υψόμετρου διαφοροποιούν την πορεία ωρίμασης των σταφυλιών καθώς και τον δυναμικό αλκοολικό τίτλο τους (Δ.Α.Τ.). Το κλίμα της χαρακτηρίζεται ως ημίξηρο – ύφυγρο, με μέση ετήσια θερμοκρασία 17°C και μέση ετήσια βροχόπτωση 750 mm. Στην ίδια περιοχή, καλλιεργούνται και οι

οινοποιήσιμες ποικιλίες Ροδίτης και Σαββατιανό, καθώς και ποικιλίες που προορίζονται για την παραγωγή σταφίδας. Οι οίνοι Ο.Π.Α.Π. 'NEMEA' παρασκευάζονται μόνο από την ποικιλία Αγιωργίτικο. Πρόκειται για οίνους ξηρούς ή γλυκούς, πλούσιους σε σώμα με χρώμα βαθυκόκκινο, που αποκτούν το μέγιστο των γευστικών τους χαρακτήρων ύστερα από παλαίωση σε δρύινα βαρέλια. (Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007 Άρθρο 118 γ, Παρ/φος 2).

Οι μεγάλες υψομετρικές διαφορές της αμπελουργικής ζώνης παραγωγής οίνων Ο.Π.Α.Π. 'NEMEA', όπως επίσης και οι διαφορές στο ανάγλυφο και τη σύσταση του εδάφους εντός της ζώνης, οδηγούν στην παραγωγή οίνων με διαφορετικά χαρακτηριστικά.

Η ζώνη παραγωγής οίνων Ο.Π.Α.Π. της Νεμέας, είναι μια από τις λίγες ζώνες Ο.Π.Α.Π. που έχουν μελετηθεί στη χώρα μας. Η μελέτη της ζώνης έγινε από το Ινστιτούτο οίνου κατά τα έτη 1991, 1992 και 1993.

Οι αμπελώνες της Νεμέας μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες (Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007 Άρθρο 118 γ, Παρ/φος 2).

Στην πρώτη ομάδα κατατάσσονται οι περιοχές που βρίσκονται σε υψόμετρο από 550μ. έως 850μ.. Στις περιοχές αυτές λόγω του μεγάλου υψομέτρου παρατηρείται καθυστέρηση στην ωρίμανση των σταφυλιών σε σχέση με τους αμπελώνες που βρίσκονται σε χαμηλότερο υψόμετρο. Έτσι η σταφυλική παραγωγή αυτής της περιοχής δεν φθάνει το βαθμό τεχνολογικής ωριμότητας που απαιτείται για την παραγωγή ερυθρών οίνων Ο.Π.Α.Π. 'NEMEA'. Από τα σταφύλια αυτής της περιοχής θα μπορούσε να παραχθεί ένας εκλεκτός ροζέ οίνος με χαμηλότερο αλκοολικό τίτλο, (γύρω στους 11.5 vol), υψηλότερη περιεκτικότητα σε μηλικό οξύ και δροσερότερη γεύση και με το χαρακτηριστικό φρουτώδες άρωμα του Αγιωργίτικου. Έτσι θα μπορούσαμε να έχουμε ένα τρίτο τύπου οίνου με το τοπωνύμιο 'Νεμέα'. Η περιοχή αυτή αποτελεί το 15% της αμπελουργικής ζώνης (Κουράκου, 1991).

Στη δεύτερη ομάδα περιλαμβάνονται οι αμπελώνες που βρίσκονται σε υψόμετρο 320-550μ . Οι περιοχές αυτές δίνουν σταφυλική παραγωγή η οποία ωριμάζει κανονικά και είναι η κατάλληλη πρώτη ύλη για την παραγωγή υψηλής ποιότητας ερυθρών οίνων. Ο αλκοολικός τίτλος του παραγόμενου οίνου, κυμαίνεται από 12 – 13 vol, και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά είναι τυπικά ενός οίνου Νεμέα. Η έκταση αυτής της περιοχής αντιπροσωπεύει το 30% της συνολικής έκτασης της ζώνης.

Στην τρίτη ομάδα περιλαμβάνονται οι αμπελώνες με υψόμετρο 200 – 320μ. Η σταφυλική παραγωγή αυτής της περιοχής ωριμάζει ταχύτατα και ο αλκοολικός βαθμός (14-15vol) επιτρέπει την παραγωγή ημίγλυκων οίνων. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει το 55% της αμπελουργικής ζώνης της Νεμέας.



Εικόνα 2 ‘Πόλη της Νεμέας’

1.1.3 Αμπελογραφικοί χαρακτήρες και φαινολογικά στάδια

Όπως αναφέρει ο κ. Σταυρακάκης (2010), το Αγιωργίτικο έχει κορυφή νεαρής βλάστησης μετρίως ανοιχτή έως ανοιχτή, κιτρινοπράσινη, χνοώδης, κατά τόπους βαμβακώδης, με ρόδινη παρυφή. Τα νεαρά φύλλα είναι πράσινα, χνοώδη-βαμβακώδη στην κάτω επιφάνεια, στιλπνά, με μικρές ροδόχροες και ορειχάλκινες περιοχές, μεταξωτή στην άνω επιφάνεια του ελάσματος, ενώ τα ανεπτυγμένα φύλλα είναι μέτρια έως μεγάλα, σφηνοειδή και πεντάκολπα.

Ο ποδίσκος είναι βραχύς έως μέτριος που κατά κανόνα ξυλοποιείται πλήρως και αποκόπτεται δυσχερώς. Ο ποώδης βλαστός είναι οριζόντιος, αραχνοϋφής, πράσινος έως κιτρινοπράσινος στην κοιλιακή πλευρά, πράσινος με ερυθρές ραβδώσεις στη νωτιαία πλευρά. Οι κόμβοι είναι αραχνοϋφείς και ερυθροί με πράσινα στίγματα. Οι 32 οφθαλμοί είναι πράσινοι με ερυθρές περιοχές. Η κληματίδα είναι ερυθροκαστανή έως ερυθροϊώδης με φακίδια, κυκλικής έως ελλειψοειδούς τομής, γωνιώδης και λεία. Το έλασμα είναι κυματώδες, ελαφρώς πομοφυλώδες, παχύ, με αναδιπλώσεις κατά μήκος των κύριων νευρώσεων, βαθυπράσινο και λείο στην άνω επιφάνεια, φαιοπράσινο και χνοώδες στην κάτω επιφάνεια. Ο μισχικός κόλπος είναι κλειστός, σχήματος V και έχει επικαλυπτόμενους λοβούς. Οι κατώτεροι κόλποι είναι βαθείς, με συγκλίνοντα χείλη, σχήματος U ή V. Οι νευρώσεις είναι κιτρινοπράσινες και χνοώδεις στην κάτω επιφάνεια του ελάσματος, ενώ οι οδόντες θεωρούνται μέτριοι έως μεγάλοι, με τις πλευρές σχεδόν ευθείες. Ο μίσχος είναι μέτριου μήκους και πάχους, πράσινος με ερυθροϊώδεις ραβδώσεις, χνοώδης και διαθέτει αραιά όρθια τριχίδια. Οι έλικες είναι διαλείπουσες, λείες, πράσινες, δισχιδείς και πολυσχιδείς, μέτριου έως μεγάλου μήκους (Σταυρακάκης, 2010).

Η σταφυλή είναι μέτρια, κωνική ή κυλινδροκωνική, συχνά διπλή, πυκνή έως πολύ πυκνή. Η ράγα θεωρείται μικρή έως μέτρια, σφαιρική και ενίοτε ωοειδής. Ο φλοιός είναι μετρίως παχύς έως παχύς, μετρίως ανθεκτικός, κυανομέλας, πλούσιος σε ανθοκυάνες και καλυμμένος με άφθονη ανθηρότητα. Η σάρκα είναι χυμώδης, γλυκιά έως ελαφρώς υπόξινη και μετρίως μαλακή. Τα γίγαρτα είναι συνήθως δύο ανά ράγα (2-3), μέτρια, απιοειδή και με παχύ ράμφος (Σταυρακάκης, 2010)

Η έναρξη βλάστησης συντελείται στα του 3ου δεκαήμερου του Μαρτίου και η πλήρης βλάστηση στις αρχές του 3ου δεκαήμερου του Απριλίου. Η έναρξη της άνθησης μέχρι την πλήρη άνθηση λαμβάνει χώρα το 2ο δεκαήμερο του Μαΐου, η

έναρξη ωρίμανσης στα τέλη του 3ου δεκαήμερου του Ιουλίου και η πλήρης ωρίμανση το 3ο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου (μερικές φορές και νωρίτερα) (Σταυρακάκης, 2010).



Εικόνα 3: Η ποικιλία *Vitis vinifera* «Αγιοργίτικο»

(Πηγή: <http://www.antemisarīs.gr/product.aspx?iid=11515>)

1.1.4 Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά

Πρόκειται για μία ποικιλία μετρίως ζωηρή έως ζωηρή, εύρωστη, όψιμης ωρίμανσης και πολύ παραγωγική. Στο Αγιωργίτικο ο τυφλός οφθαλμός είναι γόνιμος και ο καρποφόρος βλαστός φέρει δύο σταφυλές-συνήθως στον 4ο και 5ο κόμβο, συχνά όμως εμφανίζονται 3-4 σταφυλές από τον 2ο έως τον 6ο κόμβο (Σταυρακάκης, 2010). Στους παλαιούς αμπελώνες η ποικιλία μορφώνεται σε κύπελλο, με 3-5 βραχίονες και δέχεται κλάδεμα βραχύ (παραγωγική μονάδα με δύο οφθαλμούς), ενώ στους νέους αμπελώνες τα πρέμνα μορφώνονται σε γραμμικά σχήματα (συνήθως σε αμφίπλευρο Royat με 6-8 βραχίονες) και το κλάδεμα καρποφορίας είναι βραχύ (μία κεφαλή με 1-2 οφθαλμούς ανά βραχίονα) (Σταυρακάκης, 2010)

Η ποικιλία Αγιωργίτικο καλλιεργείται σε διαφόρων ειδών εδάφη, αργιλώδη, αργιλοπηλώδη, αμμοαργιλώδη, μαργώδη, σχιστολιθικά, όπως είναι τα περισσότερα εδάφη της αμπελοαγροτικής ζώνης της Νεμέας. Υψηλής ποιότητας αμπελοοινικά προϊόντα δίνει σε λοφώδεις περιοχές (υψόμετρο άνω των 300μ.), σε χαλκώδη, μέσης σύστασης, γόνιμα εδάφη, στις οποίες η ευρωστία των πρέμνων είναι κανονική και η πορεία της θερμοκρασίας συμβάλλει στην ωρίμανση του φορτίου με βραδύ ρυθμό, συνθήκες που ευνοούν την απόκτηση βαθμού τεχνολογικής ωριμότητας ανάλογα με τον τύπο του οίνου (Σταυρακάκης, 2010).

Παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στο οίδιο και τις ιώσεις, κυρίως στον μολυσματικό εκφυλισμό και μέτρια ευαισθησία στον περονόσπορο. Είναι επίσης ευαίσθητη στην ξηρασία και στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα και τον ανοιξιάτικο παγετό. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στην άρδευση, ώστε να αποφευχθεί η έντονη υδατική καταπόνηση αλλά να διατηρηθούν τα πρέμνα σε κατάσταση πολύ ήπιας καταπόνησης, η οποία συμβάλλει στη βελτίωση των φυσιολογικών λειτουργιών. Ανάλογη προσοχή απαιτείται σε αμπελώνες με βαριά, αργιλώδη, συνεκτικά εδάφη, ώστε με τους κατάλληλους χειρισμούς να αμβλυνθούν οι αρνητικές επιπτώσεις από την υπερβολική υγρασία. Την άνοιξη, σε πρέμνα υψηλής ζωηρότητας, παρατηρούνται προβλήματα στην άνθηση, τη γονιμοποίηση και την καρπόδεση, με αποτέλεσμα τη μικρορραγία και την παρουσία μικρών, πράσινων, αγίγαρτων ραγών. Τα προβλήματα αυτά εντείνονται όταν παρατηρείται σημαντική αυξομείωση της θερμοκρασίας, αλλά πιθανόν να συνδέονται με την τροφοπενία μολυβδαίνιου (Σταυρακάκης, 2010)

1.2 Αφομοιώσιμο άζωτο

Διαβάζοντας τα προηγούμενα κεφάλαια, αντιλαμβανόμαστε την έντονη διαφοροποίηση που υπάρχει σε γλεύκη και οίνους προερχόμενους από διαφορετικές υποζώνες της Νεμέας. Υψηλής σημασίας παράγοντας για την παραγωγή ενός ποιοτικού οίνου είναι το αφομοιώσιμο άζωτο. Στα κεφάλαια που ακολουθούν θα αναλύουμε το ρόλο του και τους παράγοντες που το επηρεάζουν.

Ο μούστος τροφοδοτεί τους ζυμομύκητες με το απαραίτητο άζωτο για την ανάπτυξη τους και την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, το οποίο μπορεί να επηρεάσει τη σύσταση και το άρωμα του κρασιού (Rantz 1991; Henschke and Jiranek 1993). Το άζωτο είναι παρόν σε αμινοξέα, αμονιακά ιόντα, αμίνες, πουρίνες, πυραμιδίνες, πεπτίδια και πρωτεΐνες, (Σουφλερός 2000). Οι κύριες πηγές αζώτου για τους ζυμομύκητες είναι τα πρωτοταγή αμινοξέα, στα οποία το άζωτο παράγεται στα κύτταρα του σταφυλιού για να επιτρέψει την ανάπτυξη και λειτουργία τους και τα αμμωνιακά ιόντα, τα οποία προέρχονται από την αυτόλυση κυττάρων των ζυμομυκήτων (Jiranek et al. 1995), γνωστές ως YAN, αφομοιώσιμο από τους ζυμομύκητες άζωτο, κάτω από τις συνθήκες οινοποίησης η προλίνη η υδρόξυπρολίνη και τα δευτεροταγή αμινοξέα δεν μεταβολίζονται. Έρευνες της συγκέντρωσης αμινοξέων σε γλεύκη, προερχόμενα από αμπελοκαλλιέργειες διαφορετικών περιοχών, διαφορετικής καλλιεργητικής περιόδου, διαφορετικού συνδιασμού ποικιλίας και υποκειμένου και διαφορετικής διαχείρισης των θρεπτικών συστατικών, έχουν δείξει μεγάλη διακύμανση τόσο στα αμινοξέα όσο και στη συγκέντρωσή τους. (Bell & Henschke, 2005, Rodriguez-Lovelle & Gaudillere, 2002).

Ως τόπος καλλιέργειας ενός αμπελώνα, περιγράφεται το σύνολο των γεωγραφικών εδαφικών, κλιματικών, τεχνικών και ανθρωπίνων παραγόντων μιας οινικής περιοχής. Ο τόπος αποτελεί παράμετρο της ταυτότητας ενός κρασιού.

Η διαμόρφωση του τόπου ενός αμπελώνα επηρεάζεται από την τοπογραφική διαμόρφωση (προσανατολισμός, υγρασία υπεδάφους, τη μηχανική και τη σύσταση του εδάφους) το μακρο – μεσοκλίμα που επικρατεί στην περιοχή (ημέρες ηλιοφάνειας, υγρασία εδάφους και ατμόσφαιρας, βροχοπτώσεις), την πορεία της εξέλιξης του, την ποικιλία των αμπελιών της περιοχής, τις καλλιεργητικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται, την αμπελουργική και οινοποιητική παράδοση της περιοχής,

τους ανθρώπους που καλλιεργούν τον αμπελώνα και τους ανθρώπους που φροντίζουν για να καλλιεργηθεί επιμελώς ο αμπελώνας και να αξιοποιήσει τη συγκομιδή των σταφυλιών (Σταυρακάκης 2010).

Χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου οδηγούν σε προβληματικές ζυμώσεις και ανάπτυξη σουλφιδίων (Agenbach 1977; Vos and Gray 1979). Προκειμένου να αποφευχθούν αυτά τα προβλήματα, είναι απαραίτητο να μετρηθεί η αρχική συγκέντρωση YAN στο γλεύκος. Η συγκέντρωση του αζώτου των αμινοξέων σε ελληνικές ερυθρές ποικιλίες, κυμαίνεται από 62.5 mg·l⁻¹ έως 756 mg·l⁻¹, ενώ η μέση συγκέντρωση είναι 279 mg·l⁻¹ (E. BOULOUMPASI, E. H. SOUFLEROS, C. TSARCHOPOULOS and C. G. BILIADERIS). Συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 150 mg N/L μπορεί να οδηγήσουν σε προβληματική ζύμωση (Henschke and Jiranek 1993). Για να τροφοδοτηθούν σωστά οι ζυμομύκητες συνίσταται η προσθήκη διαμμονιακού φωσφόρου (DAP) στην αρχή της ζύμωσης (Salmon 1989; Bely et al. 1990). Έρευνες έχουν δείξει ότι τουλάχιστον το 30% των αμινοξέων των σταφυλιών προέρχεται από το φλοιό, στα κόκκινα σταφύλια η απελευθέρωσή τους οφείλεται στη διαβροχή των φλοιών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Grubb 1997). Έχει αποδειχθεί, ότι και στο στάσιμο στάδιο της ζύμωσης, είναι απαραίτητο το αφομοιώσιμο άζωτο καθώς δρα τονωτικά (Bely et al. 1990; Sablayrolles et al. 1996).

1.2.1 Πώς η προσθήκη αζώτου στον αμπελώνα επιδρά στη συγκέντρωση των αμινοξέων.

Η συνολική συγκέντρωση των αμινοξέων, σε αντίθεση με αυτή των αμμωνιακών ιόντων, καθορίζεται στον αμπελώνα, καθώς δεν αποτελεί κοινή πρακτική η προσθήκη αμινοξέων σε ζυμούμενα γλεύκη αν και κάποια εμπορικά προϊόντα, όπως τα κελύφη ζυμών παρέχουν μια μικρή ποσότητα σύνθετου αζώτου (Munoz and Ingledew 1990).

Η συγκέντρωση για κάθε αμινοξύ ποικίλει σημαντικά. Το περιεχόμενο και η συγκέντρωση των αμινοξέων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία, το υποκείμενο, την τοποθεσία και τις επικρατούσες συνθήκες και το βαθμό ωρίμανσης (Treeby et al. 1998, Hernandez-Orte et al. 1999, Stines et al. 2000).

Καλλιεργητικές πρακτικές όπως η ποσότητα και ο χρόνος εφαρμογής του αζώτου, το σύστημα υποστύλωσης, οι τεχνικές διαχείρισης του εδάφους ακόμα και η προσβολή

από βοτρώτη αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες της σύνθεσης και της συγκέντρωσης των αμινοξέων στη ράγα (Miele et al. 2000, Conradie 2001, Rodriguez-Lovelle and Gaudillere 2002).

Η συνολική ποσότητα των αμινοξέων είναι σημαντική για τον μεταβολισμό του φυτού , το αφομοιώσιμο όμως (το σύνολο των αμινοξέων χωρίς τα δευτερεύοντα αμινοξέα , προλίνη και ύδροξυπρολίνη) κομμάτι της συνολικής ποσότητας των αμινοξέων είναι αυτό που παρουσιάζει οινολογικό ενδιαφέρον.

Η προσθήκη αζώτου στον αμπελώνα αυξάνει τη συνολική και την αφομοιώσιμη συγκέντρωση των αμινοξέων στο γλεύκος συγκριτικά με αμπελώνες που δε δέχτηκαν καθόλου αζωτούχο λίπανση (Sprayd et al. 1994, Conradie 2001).

Το ποσοστό του αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου που αντιστοιχεί στα αμινοξέα αυξάνεται κατά την εξέλιξη της ωρίμανσης , όμως αυτή η τάση είναι ανεπιβεβαιωμένη από την προσθήκη αζώτου στον αμπελώνα (Bell 1994). Το αφομοιώσιμο περιεχόμενο του γλεύκους σε αμινοξέα κατά τη συγκομιδή υπολογίζεται ότι κυμαίνεται μεταξύ του 51-92% του αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου (Bell 1994, Conradie 2001).

Πάντως η επίδραση της προσθήκης αζώτου στον αμπελώνα , στη συγκέντρωση των αμινοξέων ως ποσοστό επί του αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου κατά τη συγκομιδή παρουσιάζει παραλλακτικότητα. Ο Conradie (2001) έδειξε ότι η προσθήκη αζώτου είχε πολύ μικρή επίδραση στη συγκέντρωση των αφομοιώσιμων αμινοξέων ως ποσοστό επί του αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου. Σε αντίθεση , ο Bell (1994) βρήκε ότι η συγκέντρωση των αφομοιώσιμων αμινοξέων ως ποσοστό επί του αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου γενικά αυξήθηκε με την προσθήκη αζώτου σε δύο από τους τρεις αγρούς που εφαρμόστηκε , όμως η αύξηση αυτή δεν ήταν σημαντική. Σε μια διαφορετική έρευνα όμως η συγκέντρωση των αφομοιώσιμων αμινοξέων ως ποσοστό επί του αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου σε γλεύκη από αμπελώνα στον οποίο προστέθηκε ποσότητα αζώτου μειώθηκε κατά 10% συγκριτικά με γλεύκη από αμπελώνα στον οποίο δεν εφαρμόστηκε αζωτούχος λίπανση (Sprayd et al. 1994).

Η L-Αργινίνη και η L-Προλίνη , γενικά αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό της συγκέντρωσης των συνολικών αμινοξέων που υπάρχουν στη ράγα (Bell 1994, Stines et al. 2000). Η αργινίνη αποτελεί σημαντική πηγή αζώτου για τις ζύμες , όμως η αφομοίωση της ρυθμίζεται από την παρουσία άλλων , περισσότερο επιθυμητών πηγών αζώτου , όπως τα αμμωνιακά ιόντα (Jiranek et al. 1995a, Salmon et al. 1998).

Έτσι , η προσθήκη φωσφορικού διαμμώνιου , εμποδίζει τη χρήση της αργινίνης μέχρι να ολοκληρωθεί ο μεταβολισμός των αμμωνιακών ιόντων. Η αργινίνη λειτουργεί ως πηγή αζώτου για τις ζύμες γιατί ο μεταβολισμός της υπό την επίδραση του ενζύμου αργινάση σχηματίζει L-Ορνιθίνη και ουρία , τα οποία κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες τελικά σχηματίζουν γλουταμικό οξύ και αμμώνιο , αντίστοιχα. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση γενικά , των αμινοξέων στις ζύμες (Large 1986).

Η παραγωγή ουρίας , η οποία αποτελεί προϊόν του μεταβολισμού της αργινίνης , σε κάποια στελέχη ζυμών σχετίζεται με το σχηματισμό εστέρων του καρβαμιδικού οξέος στον οίνο (Henschke and Ough 1991, Monteiro and Bisson 1991b). Η αργινίνη μπορεί επίσης , να ενσωματωθεί άμεσα στις πρωτεΐνες , ενώ ένα μεγάλο μέρος της αργινίνης μετατοπίζεται στο χυμοτόπιο των ζυμών ως απόθεμα αζώτου (Watson 1976).

Η L-Προλίνη χρησιμοποιείται σε περιορισμένο βαθμό από τις ζύμες υπό το σύνηθες αναερόβιο περιβάλλον της αλκοολικής ζύμωσης λόγω των αναγκών σε οξυγόνο της οξειδάσης της προλίνης , η οποία καταλύει το πρώτο βήμα του μεταβολισμού της (Duteurtre et al. 1971).

Πίνακας 1.2 Τα βασικά αμινοξέα του γλεύκους

Lysine	Lys
Tryptophan	Trp
Arginine	Arg
Serine	Ser
Asparagine	Asn
Glycine	Gly
Threonine	Thr
Alanine	Ala
Tyrosine	Tyr
Valine	Val
Methionine	Met
Cysteine	Cys
Isoleucine	Iso
Phenylalanine	Phe
Proline	Pro
Leucine	Leu
Aspartic acid	Asp
Glutamic acid	Glu
Glutamine	Gln

1.2.2 Προφίλ συσσώρευσης αμινοξέων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Η συσσώρευση και η εκροή του αζώτου είναι μια δυναμική διαδικασία που εξελίσσεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Αυτό το γεγονός μελέτησαν σε πειράματα που διεξήγαγαν οι Dittrich και Sponholz (1975). Σε μούστο πρόσθεσαν ένα μείγμα από όλα τα αμινοξέα και παρατήρησαν ότι η πιο σημαντική πηγή αζώτου για τις ζύμες αποδείχτηκε η αργινίνη, η οποία παρείχε το 30- 50% του συνολικού αζώτου που χρησιμοποιήθηκε. Τα αμέσως επόμενα χρησιμοποιηθέντα αμινοξέα ήταν η λυσίνη, η σερίνη, η θρεονίνη, η λευκίνη, το ασπαρτικό οξύ και η γλουταμίνη, ενώ τα λιγότερο χρησιμοποιημένα ήταν η γλυκίνη, η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη και η αλανίνη. Αυτό το μοτίβο της χρήσης του αζώτου ήταν ποιοτικά παρόμοιο σε όλα τα στελέχη ζυμών που χρησιμοποίησαν,

Σε πειράματα των Grenson, Hou και Crabeel (1970) παρατηρήθηκε ατελής χρησιμοποίηση της αργινίνης, η οποία οφειλόταν στην αναχαίτιση της πρόσληψης της από αμμωνιακά ιόντα. Η συγκέντρωση της λυσίνης ήταν χαμηλή σε χυμούς σταφυλιών που μελετήθηκαν και δεν έφτασε τις απαιτήσεις της ζύμης. Οι προτιμότερες πηγές αζώτου μετά την αργινίνη ήταν η αμμωνία, η σερίνη, η θρεονίνη, η λευκίνη και η ιστιδίνη. Σε αντίστοιχη έρευνα με μούστο από την Καλιφόρνια, ο Ough et al. (1991) επισήμανε την ανικανότητα της ζύμης να χρησιμοποιήσει τις υψηλές συγκεντρώσεις αργινίνης που βρισκόταν σε πολλούς υψηλής περιεκτικότητας σε άζωτο μούστους.

Χαρακτηριστικό ορισμένων ποικιλιών σταφυλιών, είναι η συγκέντρωση της Αργινίνης και της προλίνης. Η προλίνη κατέχει δεσπόζουσα θέση σε Chardonnay, Cabernet Sauvignon, και Merlot, ενώ η αργινίνη κυριαρχεί σε Pinot Noir και Aligote. Η αργινίνη σε αντίθεση με την προλίνη, χρησιμοποιείται από ζύμες και γαλακτικά βακτήρια. Επίσης η συγκέντρωση της προλίνης αυξάνεται σημαντικά έως δυο εβδομάδες πριν τη συγκομιδή, ενώ μετά μειώνεται. Για το λόγο αυτό θα μπορούσε να λειτουργήσει σα δείκτης ωρίμανσης των σταφυλιών.

1.2.3 Γευστικά συστατικά της ζύμωσης του μύκητα.

Η ζύμωση του γλεύκους προσδίδει στο κρασί τα λεγόμενα δευτερογενή αρώματα (Bell and Henschke 2005), τα οποία μαζί με τα πρωτογενή αρώματα, τα οποία προέρχονται από το σταφύλι, σχηματίζουν το άρωμα του οίνου. Η ζύμωση αυξάνει την αρωματική και γευστική πολυπλοκότητα του κρασιού, καθώς βοηθάει την εκχύλιση συστατικών από στερεά συστατικά που βρίσκονται στο γλεύκος. Η παραγωγή, η απελευθέρωση και η τροποποίηση των πτητικών αρωματικών ενώσεων που προέρχονται από τη σταφυλή, οι επεξεργασίες κατά την παραγωγή, η διάσπαση και η τροποποίηση μη πτητικών ενώσεων από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης έχουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του αρωματικού και γευστικού προφίλ του οίνου (Lambrechts and Pretorius 2000, Cole and Noble 2003, Smyth et al. 2005).

Έτσι, κάθε παράγοντας που επηρεάζει την αύξηση και το μεταβολισμό των ζυμών, όπως το άζωτο, μπορεί να ασκεί επίδραση στη σύσταση του οίνου και των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών. Η πηγή και η συσσώρευση του αζώτου, επηρεάζουν το σχηματισμό των μη πτητικών ενώσεων όπως είναι η γλυκερόλη, τα καρβοξυλικά οξέα, το μηλικό οξύ, το α-κετογλουταρικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ. (Albers et al. 1998; Bell and Henschke 2005).

Οι κύριες κατηγορίες των χημικών ενώσεων που σχηματίζουν το «μπουκέτο» της ζύμωσης και στο σχηματισμό των οποίων συνεισφέρουν οι αζωτούχες ουσίες, είναι τα οργανικά οξέα, οι ανώτερες αλκοόλες, οι εστέρες και σε μικρότερη έκταση αλδεΐδες (RAPP and VERSINI, 1991) (πιν 1.4). Εκτός από τις πτητικές ενώσεις που προσδίδουν ευχάριστα αρώματα στον οίνο, σχηματίζονται και δυσάρεστες αρωματικές ενώσεις του θείου, το υδρόθειο, τα οργανικά σουλφίδια και οι θειόλες οι οποίες θα αναπτυχθούν σε επόμενο κεφάλαιο (Albers et al. 1998). Ανάλογα με την συγκέντρωσή τους κυμαίνονται και οι δυσάρεστες επιπτώσεις τους. Ο σχηματισμός του υδρόθειου ρυθμίζεται από την διαθεσιμότητα αζώτου (MONK, 1982; HENSCHKE and JIRANEK, 1991). Επιπλέον οι ενώσεις του «μπουκέτου» της ζύμωσης που μπορεί να είναι ανεπιθύμητες όταν είναι παρόν σε μεγάλη συγκέντρωση είναι οι: ακεταλδεΐδες, οξικό οξύ, οξικός αιθυλεστέρας, οι ανώτερες αλκοόλες και το διακετύλιο. (M. Vilanova & M. Ugliano & C. Varela & T. Siebert & I. S. Pretorius & P. A. Henschke). Γίνεται επομένως αντιληπτή η επίδραση των αμινοξέων στη διαμόρφωση του αρωματικού και γευστικού χαρακτήρα ενός οίνου.

Πίνακας 1.3 Μεταβολίτες των αμινοξέων και σχετιζόμενα συστατικά

Αμινοξέα	Κετονοξέα	Αλδεύδες	Αλκοόλες
Αλανίνη	2-κετοπροπιοικό οξύ	Ακεταλδεύδη	Αιθανόλη
Σερίνη	3-υδροξυ-2κετο-προπιοικό οξύ	Γλυοξάλη	Γλυκόλη
Βαλίνη	2-κετο-ισοβαλερικό οξύ	Ισο-βουτυρ-αλδεύδη	2-Μεθυλο-1-βουτανόλη
ισολευκίνη	2-κετο-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ	2-μεθυλ-βουτυρ-αλδεύδη	2-Μεθυλο-1-βουτανόλη
Λευκίνη	2-κετο-ισοκαπρικό οξύ	ισο-βαλερ-αλδεύδη	3-Μεθυλο-1-βουτανόλη
Φαινυλανανίνη	3-φαινυλο-2-κετο-προπιοικό οξύ	-	Φεν-εθυλ-αλκοόλη
Τυροσίνη	3-4(υδροξυ-φαινυλ)-2-κετοπροπιοικό οξύ	-	Τυροσόλη
Τρυπτοφάνη	-	-	Τρυπτοφόλη

1.2.4 Επίδραση των αμινοξέων στην παραγωγή υδρόθειου

Το υδρόθειο (H_2S) είναι μια θειόλη πολύ υψηλής πτητικότητας. Η οσμή της γίνεται αντιληπτή σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και θυμίζει αυτή του χαλασμένου αυγού. Η παρουσία υδρόθειου στο γλεύκος και στον οίνο μπορεί να οφείλεται σε πολλές αιτίες (Monk 1986). Αυτές που σχετίζονται με τις ζύμες και το άζωτο σχολιάζονται παρακάτω.

Έχει επαρκώς τεκμηριωθεί ότι το υδρόθειο σχηματίζεται μεταβολικά από τις ζύμες είτε από ανόργανες ενώσεις θείου, όπως τα θειώδη και τα θειικά, είτε από οργανικές ενώσεις του θείου όπως η κυστεΐνη και η γλουταθειόνη και αυξάνεται ο σχηματισμός του όταν το αφομοιώσιμο άζωτο ή οι βιταμίνες παντοθενικό ή η πυριδοξίνη βρίσκονται σε έλλειψη. (Hallinan et al. 1999, Spiropoulis et al. 2000).

Κατά τη φάση αύξησής τους οι ζύμες συνήθως εμφανίζουν αυξημένες μεταβολικές ανάγκες σε οργανικές ενώσεις του θείου. Για το λόγο αυτό συνθέτουν το υδρόθειο. Κάποια στελέχη όμως, φαίνεται να σχηματίζουν ακανόνιστες ποσότητες υδρόθειου, οι οποίες θεωρούνται σφάλματα για το περιβάλλον που χαρακτηρίζει τον οίνο (Jiranek et al. 1995b, Spiropoulis et al. 2000).

Το γλεύκος είναι συνήθως ανεπαρκές σε ενώσεις οργανικού θείου (λιγότερο από 10 mg/l κυστεΐνης και μεθειονίνης). Η έλλειψη των ενώσεων οργανικού θείου στο γλεύκος διεγείρει τη σύνθεση ενώσεων οργανικού θείου στις ζύμες, από ανόργανες πηγές οι οποίες συνήθως βρίσκονται σε πλεόνασμα στο γλεύκος (Hallinan et al. 1999). Έτσι το υδρόθειο είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν μεταβολισμού κατά την αναγωγή των θεικών ή των θειωδών που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των οργανικών ενώσεων του θείου (Rauhut 1993).

Όταν αυτές οι αντιδράσεις εξελίσσονται με την παρουσία της κατάλληλης ποσότητας αζώτου, το υδρόθειο απομακρύνεται, με το σχηματισμό των ενώσεων οργανικού θείου (Ono et al. 1999). Όμως υπό το καθεστώς κάποιων συνθηκών, όταν ανεπαρκής ή μη κατάλληλες πηγές αζώτου είναι διαθέσιμες, ελεύθερο υδρόθειο μπορεί να συσσωρευτεί μέσα στο κύτταρο και να διαχυθεί στο ζυμούμενο γλεύκος (Henschke and Jiranek 1991).

Το υδρόθειο που σχηματίζεται από την αρχή και μέχρι τη μέση της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους σχετίζεται με την αύξηση των ζυμών, και ο σχηματισμός του συνήθως ανταποκρίνεται στην προσθήκη θρεπτικών, ειδικότερα του φωσφορικού διαμμωνίου (Henschke and Jiranek 1991, Jiranek et al. 1995b).

Το χρησιμοποιούμενο στέλεχος της ζύμης , η πηγή του θείου , η σύσταση και συγκέντρωση του αζώτου στο ζυμούμενο μέσο , συγκαταλέγονται στους παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή υδρόθειου (Spiropoulis et al. 2000). Έτσι αρκετοί παραγωγοί ρυθμίζουν τη θρέψη του αμπελώνα με τέτοιες ποσότητες αζωτούχου λίπανσης, έτσι ώστε να παράγουν υψηλής ποιότητας σταφύλι και ταυτόχρονα να αποφευχθεί η παραγωγή υδρόθειου και πρωτεϊνικών θολωμάτων κατά τη διαδικασία της οινοποίησης (Bell & Henschke, 2005; Beltran, Esteve-Zaraoso, Rozes, Mas, & Guillamon, 2005; Gardner et al., 2002; Vilanova et al., 2007). Έρευνες που διεξάγονται με διαφορετικές μεθόδους δείχνουν ότι τα στελέχη των ζυμών παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα στην ικανότητα τους να παράγουν υδρόθειο , καθιστώντας έτσι το στέλεχος των ζυμών ως το σημαντικότερο παράγοντα που καθορίζει την παραγωγή υδρόθειου (Jiranek et al. 1995c, Spiropoulis et al. 2000, Mendes-Ferreira et al. 2002).

Εργαστηριακές μελέτες έδειξαν ότι για ένα στέλεχος το οποίο ανταποκρίνεται στην προσθήκη αζώτου κατά την αλκοολική ζύμωση , η ικανότητα ενός αμινοξέος να ρυθμίσει την παραγωγή υδρόθειου σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα του ως πηγή αζώτου , αν και υπάρχουν αρκετές αξιοσημείωτες εξαιρέσεις (Jiranek et al. 1995b).

Καθώς τα αμμωνιακά περιορίζουν την έκφραση του γονιδίου Met10 , το οποίο είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της α-υποομάδας της ρεδουκτάσης των θειωδών (Hansen et al. 1994), δεν αποτελεί έκπληξη ότι το φωσφορικό διαμμώνιο χρησιμοποιείται ευρέως στην πράξη για τον έλεγχο της παραγωγής υδρόθειου , όμως δεν είναι πάντοτε αποτελεσματικό.

Οι Henschke and Jiranek (1991) εντόπισαν μια δεύτερη φάση παραγωγής υδρόθειου που σχετιζόταν με τα τελικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Στη φάση αυτή ουσιαστικά δεν υπήρχε ανταπόκριση στην προσθήκη φωσφορικού διαμμωνίου , αν και σε κάποιες περιπτώσεις το φωσφορικό διαμμώνιο φαίνεται να υποκινεί την παραγωγή υδρόθειου όταν σε αυτή τη φάση συνδυάζεται με αερισμό (Thomas et al. 1993, Henschke and de Kluis 1995).

Γίνεται αντιληπτό ότι η παραγωγή υδρόθειου κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους έχει πολλές αιτίες. Παρ' όλ' αυτά η επιλογή κατάλληλων στελεχών ζυμών και η μέτρηση του αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου στο γλεύκος και οι προσθήκες αζώτου (πχ φωσφορικό διαμμώνιο) συνεχίζουν

να αποτελούν την καλύτερη προσέγγιση στον έλεγχο κατά την πράξη της παραγωγής υδρόθειου στην αρχή και μέχρι τη μέση της αλκοολικής ζύμωσης.

1.2.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συσσώρευση του αζώτου

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τη συσσώρευση αζωτούχων ενώσεων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι συνθήκες καλλιέργειας, η σύσταση του εδάφους και το στέλεχος της ζύμης.

pH

Είναι γεγονός ότι τα ενεργά συστήματα μεταφοράς επηρεάζονται από το χαμηλό pH, πράγμα που έχει πιστοποιηθεί σε εκθέσεις οι οποίες αναφέρουν ότι το βέλτιστο pH πολλών περιμεσών είναι μεγαλύτερο από το pH του γλεύκους (DUBOIS and GRENSON, 1979). Το βέλτιστο pH για τη μεταφορά αμμωνίας (pH 6 – 6,5) (DUBOIS and GRENSON, 1979) έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξ αιτίας του χαμηλού pH του γλεύκους και της χρήσης διαμμωνιακού φωσφόρου ως συμπλήρωμα αζώτου. Οι Monteiro and Bisson σημείωσαν ότι η βιομάζα του ζυμομύκητα ήταν συνάρτηση του pH για μύκητες που αναπτύχθηκαν σε αμμωνία, 50% μείωση σε pH 3,25 παρατηρήθηκε όταν συγκρίθηκε για ανάπτυξη σε pH 4,0. Η μάζα του ζυμομύκητα όταν ως μόνη πηγή αζώτου είναι τα αμινοξέα: αλανίνη, ασπαραγίνη, αργινίνη, γλουταμίνη και γλουταμινικό οξύ επηρεάζεται λίγο πάνω στο ίδιο εύρος pH αλλά μειώνεται σε pH 2,75.

Τοξικότητα αλκοόλης

Η ανοχή του ζυμομύκητα στην αλκοόλη είναι ένα σύνθετο φαινόμενο. Η αναποτελεσματική πρόσληψη αμινοξέων επιδεινώνεται από τη διαρροή αφομοιωμένων αζωτούχων ενώσεων εξαιτίας της τροποποιημένης από την αιθανόλη διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών. Μελέτες πάνω στο βαθμό αφομοίωσης αμινοξέων και σακχάρων έχουν δείξει μια διαφοροποιημένη, μη ανταγωνιστική αναστολή αφομοίωσης από την αλκοόλη (Cartwright et al, 1989 Van Uden). Έχει επιβεβαιωθεί ότι κατά τη διάρκεια συσσώρευσης της αιθανόλης υπάρχει μία προοδευτική μείωση στην διαδικασία μεταφοράς της γενικής περιμεάσης (Iglesias et al, 1990). Υποστηρίζεται ότι η αιθανόλη απενεργοποιεί τη γενική περιμεάση των αμινοξέων μέσω της επιλεκτικής αναστολής των μερών των πρωτεϊνών μεταφοράς. Αυτές οι παρατηρήσεις βοηθούν να εξηγηθεί η σχετικά μεγαλύτερη ευαισθησία της

ανάπτυξης των ζυμών σε μεγάλο ποσοστό αιθανόλης σε σχέση με τη διαδικασία της ζύμωσης.

Θερμοκρασία

Ο βαθμός της συσσώρευσης των αμινοξέων μειώνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον διαφορετικά επίπεδα ενέργειας για την ενεργοποίηση του βέλτιστου βαθμού μεταβίβασης για διαφορετικά αμινοξέα είναι ενδεικτικά της αλληλεπίδρασης μεταξύ του συμπλέγματος μεταφοράς και της φυσιολογικής κατάστασης της περιβάλλουσας μεμβράνης (Horak and Kotyk, 1977). Η ποσοτική απαίτηση για αμινοξέα επηρεάζεται από τη μεταφορική λειτουργία. Τα δεδομένα για την επίδραση της θερμοκρασίας στην σειρά της συσσώρευσης των αμινοξέων είναι αντικρουόμενα (Castor and Archer, 1959; Ough et al., 1991), όμως αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Για παράδειγμα τα αποτελέσματα των Ough et al (1991) δείχνουν διαφορετικό βαθμό και έκταση της πρόσληψης σε θερμοκρασίες ζύμωσης 15°C σε σύγκριση με τη ζύμωση στους 20 °C. Αυτό οφείλεται σε πολύ μεγάλο βαθμό σε μικρότερη συσσώρευση αργινίνης, αλανίνης και γλουταμίνης, παρότι η συσσώρευση της αμμωνίας δε φαίνεται να επηρεάζεται από τη θερμοκρασία.

Πίεση Co₂

Η πίεση του Co₂ μειώνει το βαθμό και την έκταση της απορρόφησης των αμινοξέων από το χυμό των σταφυλιών (Pekur et al., 1981), μέχρι και 50 %. Συγκεκριμένα, ο βαθμός της απορρόφησης της βαλίνης, της λευκίνης και της ισολευκίνη από το γλεύκος πριν τη διαδικασία του βρασμού, μειώθηκε σταδιακά όταν αυξήθηκε η πίεση του Co₂ (Knatchbull and Slaughter, 1987). Είναι αξιοσημείωτο ότι τα παράγωγα της α-κετόνης από αυτά τα αμινοξέα εξάγονται από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, το οποίο είναι ενδεικτικό του γεγονότος ότι βρίσκονται σε πλεόνασμα. Η ικανότητα της ζύμης να δημιουργήσει Co₂ παρέχει τη δίοδο μέσω της οποίας το εξωγενές Co₂ μπορεί να εισέλθει στο μεταβολισμό του άνθρακα (Slaughter, 1989) πιθανότατα προσκρούοντας στο σχηματισμό της α-κετόνης. Κατά τον τρόπο αυτό σε υψηλότερη πίεση Co₂, η αποθηκευμένη σε μοριακό επίπεδο α-κετόνη και κατ'έκταση τα αντίστοιχα αμινοξέα μπορεί να αυξηθούν με αποτέλεσμα την αναστολή των αντίστοιχων μηχανισμών μεταβίβασης.

Βαθμός αερισμού

Η έμμεση επίδραση του οξυγόνου στη λειτουργία μεταβίβασης των αμινοξέων μέσω της τροποποίησης της σύνθεσης της μεμβράνης φαίνεται εδώ. Η χρησιμοποίηση της προλίνης επηρεάζεται από το βαθμό του αερισμού του χυμού (Pekur et al., 1981; Ingledew et al., 1987). Επιπρόσθετα υπό αναερόβιες συνθήκες η προλίνη και η ουρία απελευθερώνονται στο χυμό (Henschke and Ough, 1991; Ough et al., 1991), πιθανώς σαν αποτέλεσμα του καταβολισμού της αργινίνης (Brandriss and Magasanik, 1980; Monteiro and Baisson, 1991). Ο αερισμός του μούστου παρέχει ένα τρόπο για τη χρήση αυτής της μεγάλης σε πυκνότητα πηγής αζώτου στο μούστο, όμως τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα του αερισμού στη γεύση του οίνου είναι αποτρεπτικά για την άσκηση αυτής της πρακτικής (Houtman and du Plessis, 1986b).

Στελέχη ζυμομύκητα

Οι Jiranek, Langridge και Henschke (1991) παρατήρησαν μεγάλες διαφορές μεταξύ στελεχών του *S. Cerevisiae* με βάση τα αμινοξέα που χρησιμοποιούνται και τη συνολική απαίτηση αζώτου κατά την αλκοολική ζύμωση και την αποτελεσματικότητά τους κάτω από περιορισμένη παροχή αζώτου σε χημικά προσδιορισμένο διάλυμα χυμού σταφυλιού.

Ανάπτυξη των άγριων ζυμών

Οι άγριες ζύμες ανταγωνίζονται τις επιθυμητές για τη ζύμωση ζύμες στην κατανάλωση αζωτούχων συστατικών κατά τα πρώτα στάδια της ζύμωσης. Τα πρώτα στάδια της αυτόλυσης αυτών των ζυμών θα μπορούσε να οδηγήσει στην απελευθέρωση αμινοξέων και άλλων αζωτούχων χημικών ενώσεων πίσω στον οίνο, παρόμοιο με αυτόν που παρατηρείται στη λάσπη που καθιζάνει στον οίνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Υλικά και μέθοδοι

Η διεξαγωγή του πειράματος έγινε στους εργαστηριακούς χώρους του εργαστηρίου οινολογίας της Γεωπονικής Σχολής Αθηνών, καθώς και στο Ινστιτούτο Οίνου στη Λυκόβρυση. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε οίνος και γλεύκος, της ποικιλίας Αγιωργίτικο.

2.1 Οίνος – Γλεύκος Αγιωργίτικου

Τα σταφύλια είχαν συλεγχθεί από 13 (+1) αμπελώνες από 4 διαφορετικές υποζώνες της Νεμέας σε τρεις χρονιές το 2012, 2013 και 2014. Τις δυο πρώτες χρονιές τα σταφύλια είχαν αποθηκευτεί στην κατάψυξη, ενώ την τρίτη γλευκοποιήθηκαν λίγο μετά την συλλογή. Οι οίνοι αντίστοιχα ήταν αποθηκευμένοι σε φιάλες των 750 ml σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε κελάρι. Το πρωτόκολλο οινοποίησης θα αναφερθεί στη συνέχεια.

Τα σταφύλια αποψύχθηκαν ελεγχόμενα, ζυγίστηκαν και 200 g από την κάθε περιοχή και χρονιά γλευκοποιήθηκαν. Στη συνέχεια το γλεύκος μοιράστηκε σε φιαλίδια των 2 ml και αποθηκεύθηκε στην κατάψυξη όσο διεξάγονταν τα πειράματα.

Στη συνέχεια αναγράφονται οι υποζώνες και οι περιοχές όπου βρίσκονται οι αμπελώνες από τους οποίους έγινε η δειγματοληψία.

Στον πίνακα που ακολουθεί (1.4), είναι σκόπιμο να αναφερθούν στοιχεία για τους αμπελώνες στους οποίους έγινε η καλλιέργεια των σταφυλιών, από τα οποία προήλθε το γλεύκος και ο οίνος προς ανάλυση. Ειδικότερα αναφέρεται η υποζώνη και το υψόμετρο στο οποίο βρίσκονται οι αμπελώνες, το σύστημα διαμόρφωσης των πρέμνων καθώς και το κλάδεμα μόρφωσής τους και τέλος η εφαρμογή ή όχι άρδευσης.

Πίνακας 1.4 Στοιχεία αμπελώνων

	Υποζώνη	Υψόμετρο	Διαμόρφωση	Κλάδεμα	Αρδευση
Παλαιό	Κούτσι	490	Γραμμικό	Royat	ΝΑΙ
Τύμπανο	Κούτσι	485	Γραμμικό	Royat	ΝΑΙ
Πλάστιγγα	Κούτσι	550	Γραμμικό	Royat	ΝΑΙ
Ρουμελιώτη	Κούτσι	510	Γραμμικό	Royat	ΝΑΙ
Μπουρμπούλη	Κούτσι	490	Γραμμικό	Royat	ΝΑΙ
Τσηντάρια	Κάμπος / Κούτσι	390	Γραμμικό	Royat	ΝΑΙ
Λάμπης	Κάμπος Νεμέας	380	Γραμμικό	Royat	ΝΑΙ
Αντωνίου	Κάμπος Νεμέας	275	Γραμμικό	Royat	ΝΑΙ
Βαρελά	Κάμπος Νεμέας	270	Γραμμικό	Royat	ΝΑΙ
Τελευταίο	Ασπρόκαμπος	730	Γραμμικό	Royat	ΝΑΙ
Δαίμονας	Ασπρόκαμπος	720	Γραμμικό	Royat	ΝΑΙ
Τελευταίο	Ασπρόκαμπος	710	Γραμμικό	Lyra	ΝΑΙ
Αρχ. Νεμέα	Αρχαία Νεμέα	350	Γραμμικό	Lyra	ΝΑΙ
Λύρα τελευταίο					
Δούρου (μόνο το 2012 και 2014).					

2.2 Πρωτόκολλο οινοποίησης

Όπως αναφέραμε σε προηγούμενο κεφάλαιο, η διαδικασία οινοποίησης είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των αμινοξέων. Για το λόγο αυτό θα αναλυθεί στη συνέχεια η διαδικασία.

1) Παραλαβή.

- Δειγματοληψία 2-3 τυχαιών ραγών από κάθε τσαμπί για προσδιορισμό βάρους και όγκου 100 ραγών.

Μέθοδος προσδιορισμού του βάρους (g) και όγκου (Vml) των ραγών του δείγματος:

- Ζυγός με ακρίβεια ενός δέκατου του g.
- Ένας ογκομετρικός κύλινδρος των 1.000 ml
- Από τις ράγες του δείγματος διαλέγουμε ΤΥΧΑΙΑ 100 ράγες.
- Ζυγίζουμε τις 100 τυχαιές ράγες και σημειώνουμε το βάρος τους.
- Παίρνουμε έναν ογκομετρικό κύλινδρο των 1.000 ml και βάζουμε με μεγάλη ακρίβεια 500 ml νερού.
- Προσθέτουμε τις 100 τυχαιές ράγες στον ογκομετρικό κύλινδρο.
- Σημειώνουμε τον «νέο» όγκο που προκύπτει από την άνοδο της στάθμης του νερού.

Ο προσδιορισμός αυτός πρέπει να γίνει το συντομότερο δυνατόν μετά την δειγματοληψία, προσέχοντας ώστε οι ράγες να είναι όσο το δυνατόν πιο άθικτες. Μετά τον προσδιορισμό πετάτε οι 100 ράγες πετάγονται, δεν ενσωματώνονται πάλι στο δείγμα. Για καλύτερα αποτελέσματα, η επανάληψη αυτή θα γίνει 3 φορές.

2) Οινοποίηση.

- Απόλυτος εκραγισμός και σπάσιμο των σταφυλιών.
- Μεταφορά του σταφυλοπολτού στο αντίστοιχο δεξαμενάκι INOX των 50 lit., που έχει προηγουμένως μαρκαριστεί με τον κωδικό του αμπελοτεμάχου (πχ. ΑΓ 3).
- Προσδιορισμός με μεγάλη ακρίβεια του όγκου του σταφυλοπολτού (σε lit.).
- Ομογενοποίηση και μέτρηση Baume, Ph και οξύτητας.
- Θείωση του σταφυλοπολτού με metabisulfite.

Η θείωση θα γίνει στα **60 mg/l** Ολικού θειώδους αμέσως μετά την πλήρωση της δεξαμενής

- Εμβολιασμός του σταφυλοπολλτού με στέλεχος επιλεγμένης ζύμης στα **20 g/hl**.
- Προσθήκη θρεπτικών ζύμωσης. Συνολικά θα προστεθούν **20 g/hl** φωσφορικό διαμμώνιο (DAP). Η προσθήκη θα γίνει σε δύο δόσεις.

3) Ζύμωση / εκγύλιση / αποζύμωση.

- Σκεπάζουμε το δεξαμενάκι με το καπάκι σκόνης.
 - Τοποθετούμε το δεξαμενάκι σε ένα κρύο μέρος του οινοποιείου (υπόγεια κάβα με θερμοκρασία 20-22 C).
 - Περίπου 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό, ξεκινάμε την διαδικασία της εμβάπτισης των στέμφυλων. Η εμβάπτιση των στέμφυλων θα είναι πλήρης και θα γίνεται μια (1) φορά / 12 h τις πρώτες 5 ημέρες & στην συνέχεια μια (1) φορά / 24 h.
 - Οι εμβαπτίσεις θα συνεχιστούν μέχρι και την 8^η ημέρα μετά την ημέρα του εμβολιασμού.
 - Κάθε ημέρα, μετά την πρωινή εμβάπτιση των στεμφύλων, καταγράφετε η θερμοκρασία και το ειδικό βάρος του γλεύκους.
 - Διαχωρισμός των στέμφυλων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, ο διαχωρισμός των στέμφυλων θα γίνει την 9^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των ζυμών
- Ο διαχωρισμός γίνεται χωρίς καμία πίεση στέμφυλων. Παίρνουμε μόνο πρόρωγο.

- Αποζύμωση. Μετά τον διαχωρισμό των στέμφυλων επιστρέφουμε τον νέο οίνο (που πιθανόν είναι ακόμα υπό ζύμωση) στην δεξαμενή των 50 lit. Περιμένουμε την αποζύμωση του γλεύκους / οίνου.

- Αποθήκευση Νέου Οίνου. Αμέσως μετά την αποζύμωση μεταφέρουμε τον οίνο με ταυτόχρονη απολάσπωση φροντίζοντας ώστε να παίρνουμε όσο πιο διαυγή οίνο είναι δυνατόν. Προσθέτουμε metabisulfite 20 mg/lit ελεύθερο SO₂.

- Αποθήκευση οίνου στους 20°C.

2.3 Χαρακτηριστικά του γλεύκους και του οίνου που χρησιμοποιήθηκαν

Στο κεφάλαιο αυτό, θα παρατεθούν πίνακες με τα βασικά χαρακτηριστικά των γλευκών και των οίνων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Η γνώση αυτών θα βοηθήσει σε μελλοντικά πειράματα, την κατανόηση και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με βάση τα χαρακτηριστικά του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 4: Οινοποίηση γλεύκους

(Πηγή: <http://www.sestosensosapori.it/en/produzione/>)

Πίνακας 1.5 Χαρακτηριστικά γλευκών του 2012

Region	Grape					
		W 100	V 100	Baume	OO	pH
Κούτσι	Παλαιό	204,55	188,33	14,1	5,1	3,74
Κούτσι	Τύμπανο	201,00	183,33	14,4	4,95	3,86
Κούτσι	Πλαστιγγα	238,58	221,67	13	6,75	3,73
Κούτσι	Ρουμελιώτη	249,06	228,33	13,9	5,925	3,52
Κούτσι	Μπουρμπούλη	230,25	221,67	13,1	6,15	3,7
Κάμπος / Κούτσι	Τσηντάρια	246,48	230,00	13	4,65	3,84
Κάμπος Νεμέας	Λάμπης	195,98	181,67	12,8	5,325	3,77
Κάμπος Νεμέας	Αντωνίου	204,09	190,00	12,6	3,675	3,89
Κάμπος Νεμέας	Βαρελά	206,88	195,00	12,7	3,675	4,18
Ασπρόκαμπος	Ασπροκ. Γαία	246,78	225,00	12,8	7,6	3,24
Ασπρόκαμπος	Ασπρ. Λύρα	160,07	148,33	12	7,2	3,41
Ασπρόκαμπος	Δαίμονας	256,41	238,33	11,9	6,225	3,31
Αρχαία Νεμέα	Αρχ. Νεμέα	159,20	140,00	12,9	5,1	3,67

Πίνακας 1.6 Χαρακτηριστικά γλευκών του 2013

Region	Grape					
Κούτσι	Μπουρμπούλη	188,23	177,50	13,1	6,3	3,56
Κούτσι	Παλαιό	216,80	202,50	14,1	6,2	3,67
Κούτσι	Τύμπανο	155,50	142,50	13,4	5,52	3,67
Κούτσι	Πλάστιγγα	174,07	160,00	14,1	5,625	3,53
Κούτσι	Ρουμελιώτη	165,91	155,00	13,4	6,375	3,67
Κάμπος / Κούτσι	Τσηντάρια	181,95	172,50	12,5	4,8	3,63
Κάμπος Νεμέας	Λάμπης	233,85	230,00	13,6	5,325	3,74
Κάμπος Νεμέας	Αντωνίου	178,88	165,00	12,1	4,95	3,56
Κάμπος Νεμέας	Βαρελά	203,82	190,00	13,1	5,175	3,89
Ασπρόκαμπος	Γαία Τελευταίο	223,14	205,00	14,1	7,125	3,54
Ασπρόκαμπος	Τελευταίο	230,61	217,50	12,6	7,3	3,4
Ασπρόκαμπος	Δαίμονας	220,17	200,00	12,3	7,05	3,21
Αρχαία Νεμέα	Αρχ. Νεμέα	198,93	190,00	14,2	4,575	3,87

Πίνακας 1.7 Χαρακτηριστικά γλευκών του 2014

Region	Grape					
Κούτσι	Ρουμελιώτη	194,15	180,00	13,0	6,15	3,43
Κούτσι	Παλαιό	223,09	197,50	14,5	5,03	3,65
Κούτσι	Τύμπανο	173,19	157,50	12,9	5,06	3,49
Κούτσι	Μπουρμπούλη	195,04	182,50	12,8	6,45	3,4
Κούτσι	Πλάστιγγα	170,11	170,00	13,1	7,65	3,43
Κάμπος / Κούτσι	Τσηντάρια	195,91	177,50	13,3	4,50	3,64
Κάμπος Νεμέας	Λάμπης					
Κάμπος Νεμέας	Αντωνίου	182,62	167,50	13,1	5,85	3,52
Κάμπος Νεμέας	Βαρελά	177,34	155,00	12,2	5,70	3,42
Ασπρόκαμπος	Γαία Τελευταίο	252,90	237,50	11,0	8,63	3,17
Ασπρόκαμπος	Τελευταίο	211,44	197,50	13,8	7,28	3,39
Ασπρόκαμπος	Δαίμονας	223,88	202,50	12,0	7,80	3,28
Αρχαία Νεμέα	Αρχ. Νεμέα	224,12	210,00	14,0	5,03	3,69

Πίνακας 1.8 Χαρακτηριστικά οίνων του 2012

Wine											
	420	520	620	Ενταση	Απόχρωση	ΔΦΟ	% vol	Πυκνότητα	ΟΟ	pH	Dry extr.
Παλαιό	0,249	0,3891	0,081	7,19	0,64	68,3	14,5	0,9916	5,475	3,61	40,88
Τύμπανο	0,292	0,419	0,110	8,21	0,70	66,5	15	0,9877	3,975	3,94	32,56
Τσηντάρια	0,139	0,172	0,042	3,53	0,81	53,3	13,4	0,9900	3,975	3,9	33,08
Λάμπης	0,179	0,212	0,058	4,49	0,84	61,3	13,1	0,9924	4,35	4,07	38,28
Τελευταίο	0,258	0,499	0,082	8,39	0,52	52,6	13,2	0,9904	6,675	3,38	33,34
Πλάστιγγα	0,220	0,288	0,079	5,87	0,76	57,9	12,7	0,9928	4,2	3,98	38,02
Ρουμελιώτη	0,361	0,702	0,128	11,91	0,51	76,1	14,6	0,9926	6	3,5	43,9
Αντωνίου	0,180	0,299	0,054	5,33	0,60	53,5	12,3	0,9918	5,175	3,59	33,86
Βαρελά	0,201	0,214	0,062	4,77	0,94	52,8	12,8	0,9938	3,975	4,24	40,88
Μπουρμπούλη	0,286	0,405	0,112	8,03	0,71	72,5	13	0,9932	4,275	3,9	40,1
Αρχ. Νεμέα	0,304	0,44	0,132	8,76	0,69	76,1	13	0,9917	3,825	3,96	36,2
Δαίμονας	0,262	0,554	0,082	8,98	0,47	61,0	12,1	0,9917	6,15	3,34	32,82
Τελευταίο	0,268	0,424	0,091	7,83	0,63	67,6	12	0,9922	5,325	3,63	33,86

Πίνακας 1.9 Χαρακτηριστικά οίνων του 2013

Wine	420	520	620	Ενταση	Απόχρωση	ΔΦΟ	% vol	Ποκνότητα	ΟΟ	ρΗ	Dry extr.
Παλαιό	0,346	0,4908	0,1198	9,56	0,70	55,0	14,4	0,9860	5,475	3,74	26,06
Τύμπανο	0,289	0,4291	0,091	8,09	0,67	48,2	13,9	0,9876	4,5	3,53	28,4
Τσηνάρια	0,268	0,3998	0,0869	7,54	0,67	43,5	12,3	0,9901	4,5	3,48	29,44
Λάμπης	0,228	0,3001	0,0706	5,99	0,76	42,4	13,7	0,9884	4,5	3,71	29,96
Τελευταίο	0,299	0,4438	0,0909	8,34	0,67	42,8	14,7	0,9879	5,4	3,45	32,04
Πλάστιγγα	0,368	0,6129	0,1425	11,24	0,60	44,4	13,7	0,9898	6,975	3,32	33,6
Ρουμελιώτη	0,286	0,433	0,0936	8,12	0,66	46,1	13,2	0,9892	4,875	3,49	30,22
Αντωνίου	0,208	0,3631	0,0655	6,37	0,57	40,5	12	0,9903	5,55	3,18	28,92
Βαρελά	0,199	0,2418	0,0629	5,04	0,82	37,7	12,8	0,9898	5,775	3,76	30,48
Μπουρμπούλη	0,271	0,4204	0,0841	7,75	0,64	46,4	12	0,9908	5,1	3,36	30,22
Αρχ. Νεμέα	0,346	0,4383	0,1094	8,94	0,79	51,8	15	0,9881	4,725	3,82	33,6
Δαίμονας	0,237	0,4268	0,0696	7,34	0,56	38,9	12,8	0,9896	6,3	3,12	29,96
Τελευταίο	0,200	0,2626	0,0581	5,20	0,76	39,3	12,6	0,9907	6	3,55	32,04

Πίνακας 1.10 Χαρακτηριστικά οίνων του 2014

Wine	420	520	620	Ενταση	Απόχρωση	ΔΦΟ	% vol	Ποικνότητα	ΟΟ	ρΗ	Dry extr.
Παλαιό	0,414	0,5525	0,1127	10,79	0,75	57,6	14,9	0,9909	5,78	3,42	40,36
Τύμπανο	0,369	0,5459	0,079	9,93	0,68	46,6	12,9	0,9925	5,55	3,62	37,76
Τσηνάρια	0,238	0,3618	0,057	6,57	0,66	38,8	13,3	0,9911	4,60	3,80	35,68
Λάμπης	0,000	0	0	0,00	0,00	0,0					
Τελευταίο	0,204	0,3451	0,0335	5,83	0,59	32,6	10,7	0,9937	7,90	3,28	33,08
Πλάστιγγα	0,330	0,4556	0,1227	9,08	0,72	42,6	13,4	0,9947	5,20	3,95	45,2
Ρουμελιώτη	0,388	0,6427	0,1271	11,58	0,60	46,1	12,9	0,9925	5,10	3,88	37,76
Αντωνίου	0,281	0,4331	0,1047	8,19	0,65	39,8	12,9	0,9915	5,40	3,63	35,16
Βαρελά	0,314	0,4716	0,1002	8,86	0,67	33,5	12,2	0,9911	5,55	3,45	31,78
Μπουρμπούλη	0,443	0,7097	0,1311	12,83	0,62	56,9	13	0,9928	6,10	3,60	39,06
Αρχ. Νεμέα	0,407	0,5032	0,128	10,39	0,81	52,3	14	0,9925	5,00	3,89	41,56
Δαίμονας	0,248	0,3321	0,0616	6,42	0,75	38,4	11,7	0,9925	7,65	3,38	33,6
Τελευταίο	0,489	0,7306	0,1459	13,65	0,67	57,4	14	0,9907	7,10	3,53	36,98

2.4 Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου

Παρακάτω θα περιγραφεί η διαδικασία μέτρησης του αμμωνιακού αζώτου.

Αντιδραστήρια

Αρχικά γίνεται η Παρασκευή των αντιδραστηρίων όπως παρακάτω.

- Ρυθμιστικό διάλυμα: Για 100 mL διαλύματος ζυγίζονται 1.3 g Na_3PO_4 (φωσφορικό νάτριο)

3 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (τριβασικό κιτρικό νάτριο)

0.3 g EDTA και διαλύονται σε 80 περίπου mL νερού. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 mL (pH = περίπου 12).

- Φαινολικό διάλυμα καταλύτη: Για 100 mL διαλύματος ζυγίζονται 6 g φαινόλης και διαλύονται σε 80 περίπου mL ρυθμιστικού διαλύματος. Μετά προστίθενται 20 mg sodium nitroprusside . Ο όγκος συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα (pH = περίπου 9). Αποθηκεύεται σε σκούρο μπουκάλι, στο ψυγείο, για 3 εβδομάδες.

- Αλκαλικό διάλυμα υποχλωριώδους: Για 200 mL αντιδραστηρίου διαλύονται 2 mL υποχλωριώδους νατρίου (διαθέσιμο υποχλωριώδες 6-14 %) σε 80 mL 1 N NaOH. Ο όγκος συμπληρώνεται με νερό. Αποθηκεύεται σε σκούρο μπουκάλι, στο ψυγείο, για 1 μήνα.

- Πρότυπο διάλυμα θειϊκού αμμωνίου 4 mM: Για 100 mL πρότυπου διαλύματος ζυγίζονται 0.052 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και διαλύονται σε 80 περίπου mL νερού. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη και συμπληρώνεται ο όγκος. Διατηρείται στο ψυγείο.

Διαδικασία ανάλυσης

Ακολουθεί η διαδικασία της ανάλυσης. Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται με τη σειρά που αναφέρονται

- Δείγμα ή πρότυπη συγκέντρωση σε τελικό όγκο 100 μL . (Στην περίπτωση του δείγματος έχει προηγηθεί φυγοκέντρωση για 5 min σε μικροφυγόκεντρο)
- 4 mL νερό
- 2 mL φαινολικό διάλυμα καταλύτη
- 3 mL αλκαλικό διάλυμα υποχλωριώδους

Μετά από κάθε προσθήκη αναδεύουμε επαρκώς. Οι σωλήνες μένουν για 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τον σχηματισμό του χρωμοφόρου (ινδοφαινόλη) και

κατόπιν γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 635 nm. Οι μετρήσεις μεταφράζονται σε mgN/L με χρήση πρότυπης καμπύλης.

Πρότυπη καμπύλη

Για την Παρασκευή της πρότυπης καμπύλης ακολουθήθηκαν τα παρακάτω.

Από το πρότυπο διάλυμα του θειϊκού αμμωνίου 4 mM δημιουργούνται οι παρακάτω αραιώσεις σε τελικό όγκο 1 mL και ακολουθεί η διαδικασία ανάλυσης.

Θειϊκό αμμώνιο (mM)	Πρότυπο διάλυμα 4 mM (μL)	ddH ₂ O (μL)	Αμμωνιακό άζωτο (mgN/L)
0	0	1000	0
0.1	25	975	2.8
0.2	50	950	5.6
0.5	125	875	14
1	250	750	28
2	500	500	56

Από το θειϊκό αμμώνιο υπολογίζεται κατευθείαν η συγκέντρωση του αζώτου σε mgN/L.

Η παραπάνω μέθοδος αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου Scheiner (Scheiner, 1976, Water Research, 10: 31-36).

2.5 Προσδιορισμός αζώτου βασικών αμινοξέων

Παρακάτω θα περιγραφεί η διαδικασία μέτρησης του αζώτου των βασικών αμινοξέων..

Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή των αντιδραστηρίων ακολουθήθηκαν τα παρακάτω.

- Διάλυμα OPA (o-phthaldialdehyde): Για 25 mL διαλύματος ζυγίζονται 0.168 g OPA και διαλύονται σε 20 περίπου mL 95 % αιθανόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 25 mL.

- Διάλυμα OPA-NAC: Για 250 mL διαλύματος ζυγίζονται
0.959 g NaOH
2.117 g βορικό οξύ
0.204 g NAC (N-acetyl-L-cysteine)

και διαλύονται σε 180 περίπου mL νερού. Προστίθεται το παραπάνω διάλυμα OPA (25 mL) και συμπληρώνεται ο όγκος με απιονισμένο νερό (pH = περίπου 9.5). Αποθηκεύεται στο ψυγείο για 3 εβδομάδες.

- Διάλυμα NAC για τον μάρτυρα: Για 250 mL διαλύματος ζυγίζονται
0.959 g NaOH
2.117 g βορικό οξύ
0.204 g NAC (N-acetyl-L-cysteine)

και διαλύονται σε 160 περίπου mL απιονισμένου νερού. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 250 mL.

- Πρότυπο διάλυμα ισολευκίνης 10 mM: Για 50 mL πρότυπου διαλύματος ζυγίζονται 0.065 g ισολευκίνης και διαλύονται σε 40 περίπου mL νερού. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη και συμπληρώνεται ο όγκος. Διατηρείται στο ψυγείο.

Διαδικασία ανάλυσης

Σε μικρούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται με τη σειρά που αναφέρονται

- 50 μ L δείγμα ή πρότυπη συγκέντρωση (Στην περίπτωση του δείγματος έχει προηγηθεί φυγοκέντρωση για 5 min σε μικροφυγόκεντρο)
- 3 mL διάλυμα OPA-NAC

Στον μάρτυρα τοποθετείται το δείγμα και 3 mL διάλυμα NAC.

Όλοι οι σωλήνες αφήνονται σε ηρεμία για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν μετριέται η απορρόφηση στα 335 nm. Οι μετρήσεις εκφράζονται σε mgN/L από την πρότυπη καμπύλη.

Πρότυπη καμπύλη

Από το πρότυπο διάλυμα ισολευκίνης 10 mM δημιουργούνται οι παρακάτω αραιώσεις σε τελικό όγκο 500 μ L και ακολουθεί η διαδικασία ανάλυσης.

Ισολευκίνη (mM)	Πρότυπο διάλυμα 10 mM (μ L)	ddH ₂ O (μ L)	Άζωτο βασικών αμινοξέων (mgN/L)
0	0	500	0
2	100	400	28
4	200	300	56
6	300	200	84
8	400	100	112
10	500	0	140

Από την ισολευκίνη υπολογίζεται κατευθείαν η συγκέντρωση του αζώτου σε mgN/L.

Dukes, BC and Butzke, CE (1998) Am. J. Enol. Vitic. 49:125-134.



Εικόνα 6: Οργάνωση εξοπλισμού για τον Προσδιορισμός αζώτου βασικών αμινοξέων

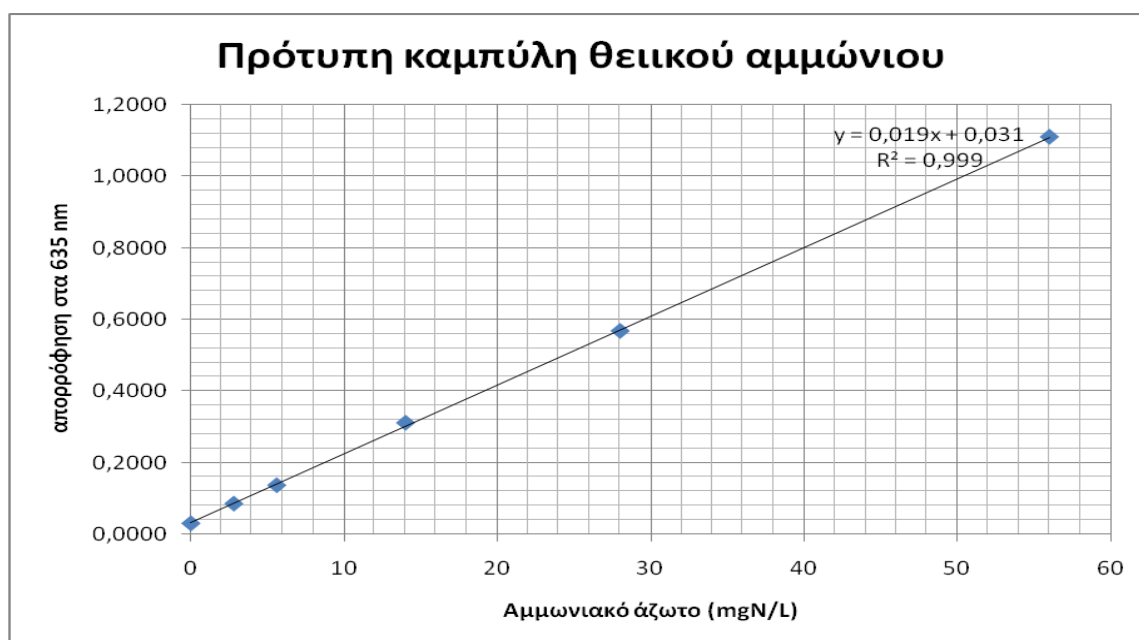
(Πηγή: Κολοκοτσάς 2015)

2.6 Πρότυπες καμπύλες

Χρήσιμο είναι να παρουσιαστούν παρακάτω, οι πρότυπες καμπύλες των πρότυπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των αποτελεσμάτων των φασματοφωτοματρικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του αμμωνιακού αζώτου και του αζώτου των βασικών αμινοξέων.

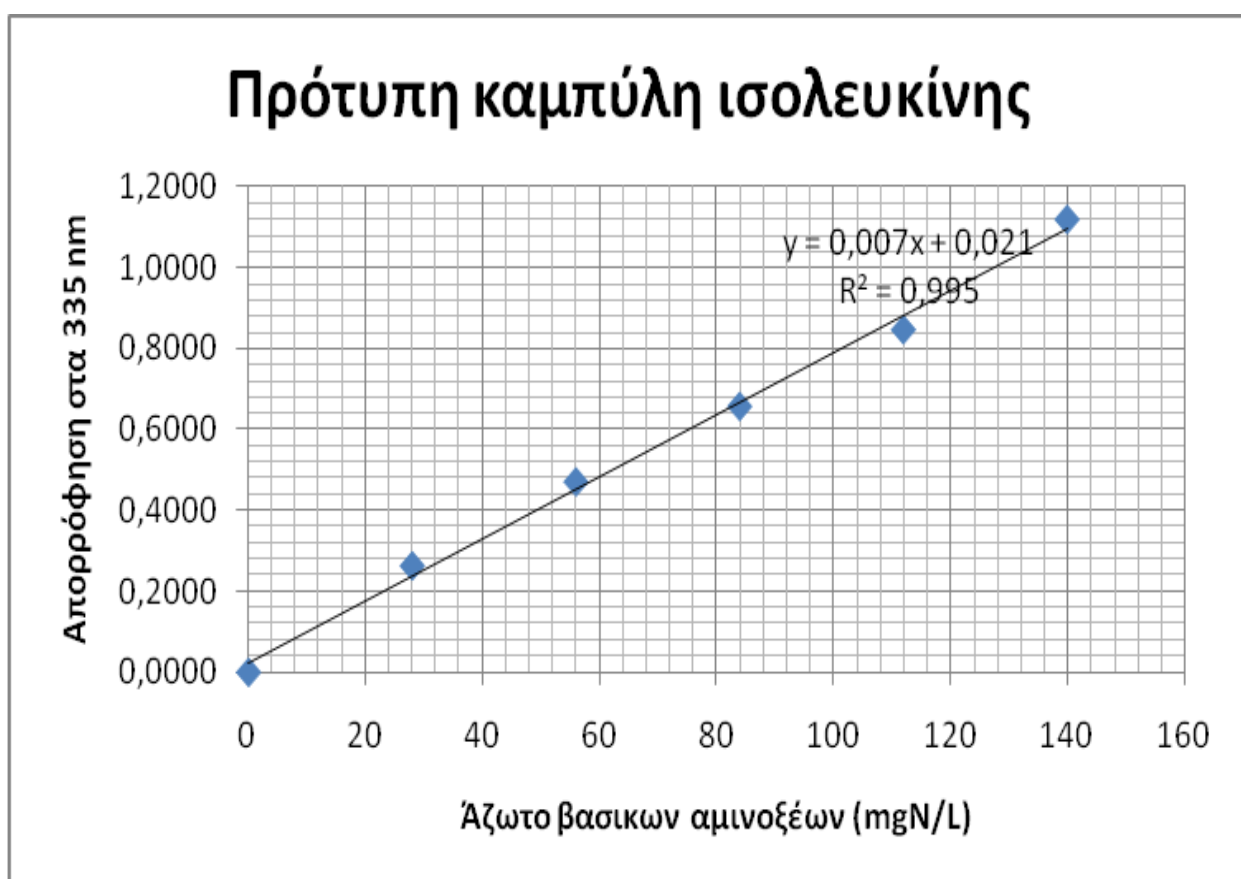
Από πρότυπο διάλυμα θειικού αμμωνίου 4 mM με αραιώσεις έχουμε :

Πρότυπη καμπύλη θειικού αμμωνίου					M.O
θειικό αμμώνιο (mM)	Αμμωνιακό άζωτο (mgN/L)	1	2	3	123
0	0	0,0307	0,0302	0,0273	0,0294
0,1	2,8	0,0867	0,0881	0,0789	0,0846
0,2	5,6	0,1360	0,1330	0,1389	0,1360
0,5	14	0,3114	0,3101	0,3099	0,3105
1	28	0,5603	0,5763	0,5645	0,5670
2	56	1,1076	1,1087	1,1115	1,1093



Από πρότυπο διάλυμα ισολευκίνης 10 mM με αραιώσεις έχουμε :

Πρότυπη καμπύλη ισολευκίνης						
Ισολευκίνη (mM)	Άζωτο βασικών αμινοξέων (mgN/L)	1	2	3	M.O 12	
0	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
2	28	0,2709	0,2645	0,2537	0,2630	
4	56	0,5028	0,4620	0,4476	0,4708	
6	84	0,6653	0,6691	0,6374	0,6573	
8	112	0,8578	0,8710	0,8111	0,8466	
10	140	1,1313	1,1202	1,1059	1,1191	



2.7 Προσδιορισμός των αμινοξέων σε γλεύκη και οίνους με τη χρήση της HPLC

Τα δείγματα κατεργάστηκαν ως εξής:

- Φυγοκέντρηση του γλεύκους και οίνου στα 15000 g για 10 min.
- Από το υπερκείμενο παίρνουμε κατάλληλη ποσότητα.
- Φιλτράρισμα από μεμβράνη 0,2 μ.
- Αραίωση 1/10, 1/20, 1,50 με HCl
- Στο 1Ml αραιωμένο δείγμα προσθήκη 100 Ml IS (εσωτερικό πρότυπο norvaline) σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη.

Όργανο : HPLC Hewlett-Packard 1050

Στήλη : Amino – Quant (C18), 20 cm, 5 μ, Hewlett-Packard.

Προ – στήλη : ίδιου τύπου 20 mm.

Αντιδραστήρια παραγωγοποίησης : OPA, FMOC

Δειγματολήπτης :

- Όγκος Borate : 5 μL
- Όγκος OPA : 1μL
- Όγκος δείγματος : 1 μL
- Όγκος FMOC : 1 Ml

Πρόγραμμα έκλουσης :

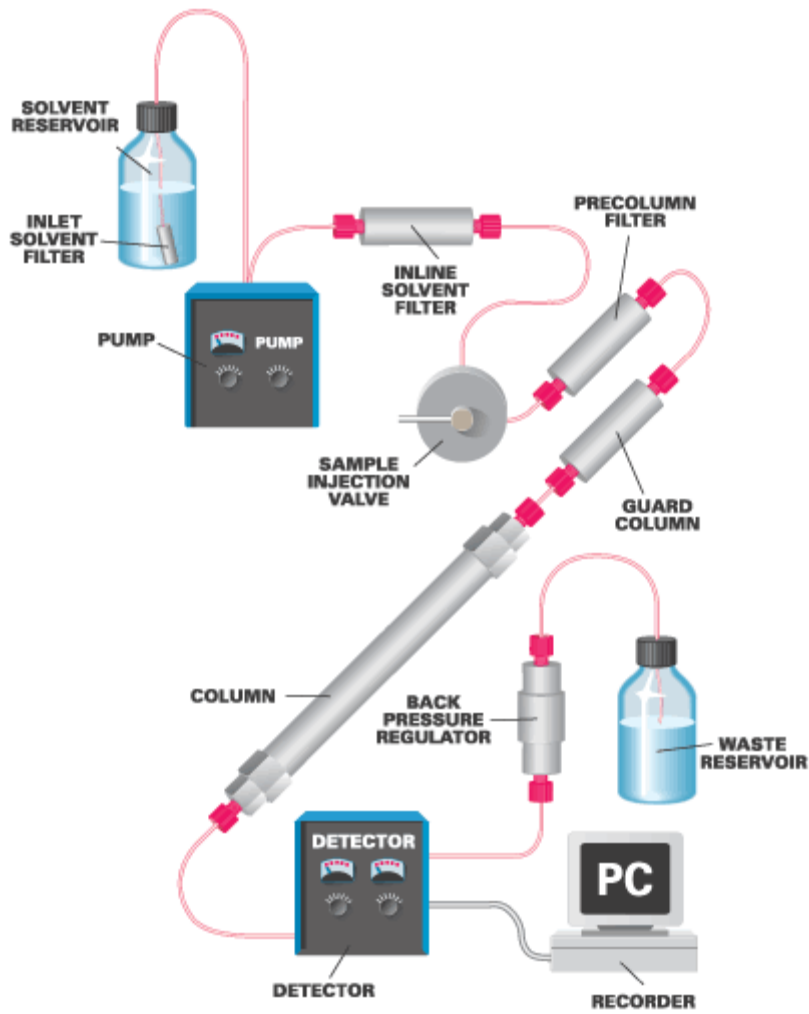
Χρόνος (min)	A%	B%
0	100	0
17	40	60
29	0	100
30	100	0

Ανιχνευτής :Fluorecense

Μήκος κύματος διέγερσης : 340 nm

Μήκος κύματος απορρόφησης : 450 nm

Ακολουθεί διαγραμματική απεικόνιση, του τρόπου λειτουργίας της HPLC.



Εικόνα 7: Διάγραμμα λειτουργίας HPLC

(Πηγή: <http://www.sepscience.com/Techniques/LC/Articles/159-/Things-to-Consider-When-Selecting-HPLC-System-Tubing>)

Στη συνέχεια, θα αναλυθεί το πρωτόκολλο ανάλυσης γλευκών και οίνου, που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των αμινοξέων με τη χρήση της HPLC.

Αρχικά θα αναφερθούν τα γυαλικά, τα χημικά και οι διαλύτες που χρειάστηκαν.

- Ογκομετρική φιάλη 1 L
- Ποτήρι ζέσεως 1L
- Ογκομετρική φιάλη 200 ml
- Ποτήρι ζέσεως 250 ml
- Δις-απιονισμένο νερό
- Μεθανόλη
- Ακετονιτρίλιο
- Διάλυμα 1-2% CH₃COOH
- Άνυδρο CH₃COONa
- THF
- TEA
- Borate Buffer
- OPA
- FMOC
- Διάλυμα HCL 0.1 N

A) Παρασκευή πυκνού διαλύματος 100 mM CH₃COONa (μια φορά την εβδομάδα) :

- Ζυγίζονται 8,203 gr άνυδρου CH₃COONa
- Μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως των 800 ml που περιέχει ~800 ml δις – απιονισμένο νερό και μαγνητάκι.
- Ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα.
- Ποσοτική μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 1000 ml.
- Συμπλήρωση έως τη χαραγή με δις – απιονισμένο νερό.
- Φιλτράρισμα.

B) Παρασκευή κινητής φάσης A υδατικό διάλυμα 20 mM CH₃COONa, 0,018 v/v τριαιθυλαμίνη (TEA), Ph 7,2 (ρύθμιση με 0,3 %v/v THF) : (σταθερό για δύο μέρες)

- Μεταφέρονται ακριβώς 200 ml πυκνού διαλύματος 100 mM CH₃COONa (μετρημένα σε ογκομετρική φιάλη των 300 ml) σε

ογκομετρική φιάλη 1L. Ξεβγάζουμε τη φιάλη και συμπληρώνουμε με δις-απιονισμένο νερό (αραιό διάλυμα CH₃COONa).

- Μεταφέρουμε το αραιό διάλυμα CH₃COONa σε ποτήρι ζέσεως 1L με μαγνητάκι και το τοποθετώ σε μαγνητικό αναδευτήρα.
- Προσθέτουμε υπό ανάδευση, με ρυθμιζόμενη πιπέτα ή γυάλινη σύριγγα, 180 μL TEA.
- Μεταφέρουμε το ποτήρι στο pHάμετρο και ρυθμίζουμε το pH σε 7,20 ±0,05 με λίγες σταγόνες (πιπέτα Pasteur) διαλύματος 1-2% CH₃COOH. Προσοχή : στο pH 8,0 θέλει αραιωμένο οξύ.
- Βγάζουμε το ηλεκτρόδιο και προσθέτουμε (με σιρόνι) 3 ml THF.
- Ανάδευση
- Μεταφέρουμε στο reservoir A

Γ) Παρασκευή κινητής φάσης B : 20% υδατικό διάλυμα CH₃COONa 100 mM, pH 7,2, 40% CH₃OH (σταθερό για δυο ημέρες)

- Μεταφέρουμε σε ποτήρι ζέσεως ~250 mL από το πυκνό διάλυμα 100 mM CHECOONa και ρυθμίζουμε το pH σε 7,20 ± 0,05 με λίγες σταγόνες (πιπέτα Pasteur) διαλύματος 1-2 % CH₃COOH.
- Μεταφέρουμε ακριβώς 200 mL (μετρημένα σε ογκομετρική φιάλη) από το παραπάνω διάλυμα στο reservoir B.
- Μεταφέρουμε στο reservoir B 400 mL AcCN.
- Μεταφέρουμε στο reservoir B 400 mL MeOH
- Ανάδευση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

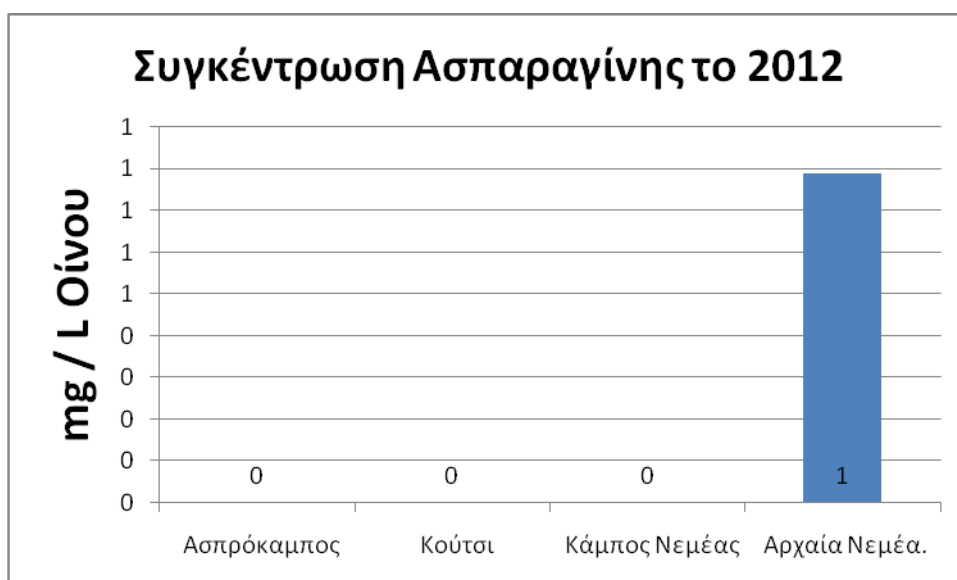
Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων υπολογισμού αμμωνιακού αζώτου

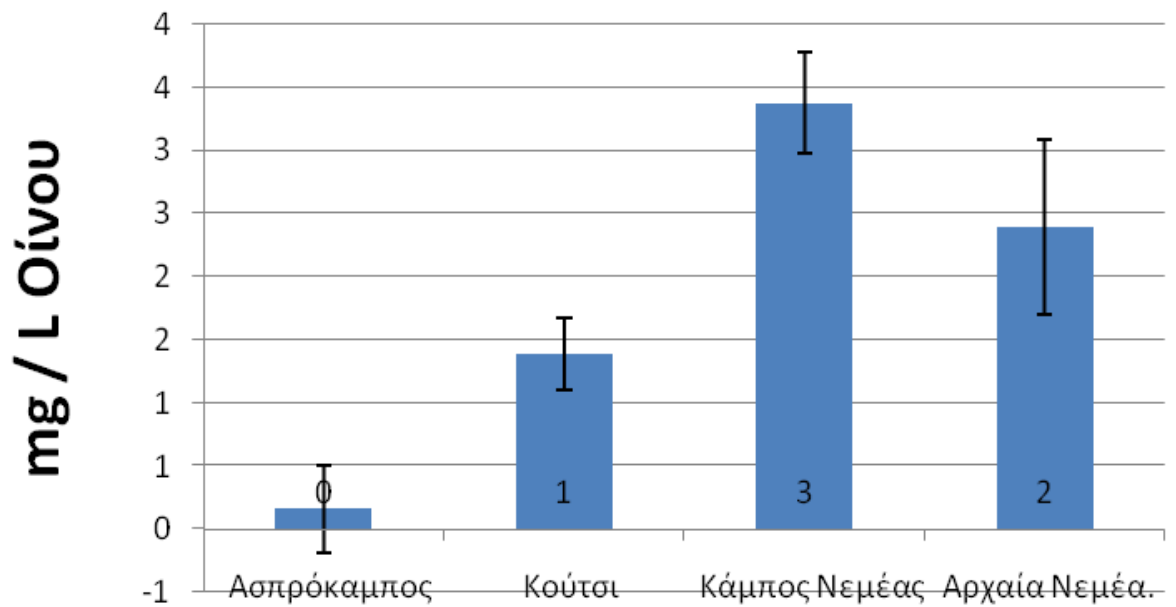
Ύστερα από τη διεξαγωγή των πειραμάτων για τον υπολογισμό του αμμωνιακού αζώτου, στα γλεύκη των περιοχών της Νεμέας, βρέθηκε ότι η περιεκτικότητά τους ήταν μηδενική.

3.2 Αποτελέσματα μετρήσεων υπολογισμού των αμινοξέων σε οίνους των ζωνών της Νεμέας

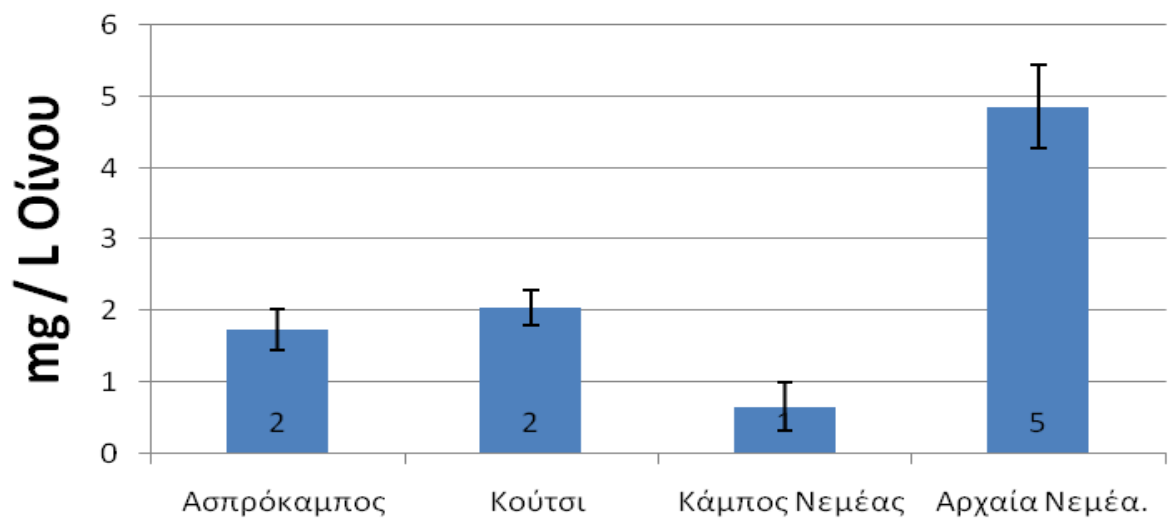
Σε αυτό το κεφάλαιο, θα παρουσιαστεί η συγκέντρωση του κάθε αμινοξέως, αλλά και του συνόλου των αμινοξέων στους οίνους για την κάθε υποζώνη που έχουμε ορίσει, για την κάθε χρονολογία 2012, 2013, 2014, χωριστά. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της συγκέντρωσης των αμινοξέων, εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Count είναι ο αριθμός επαναλήψεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι.

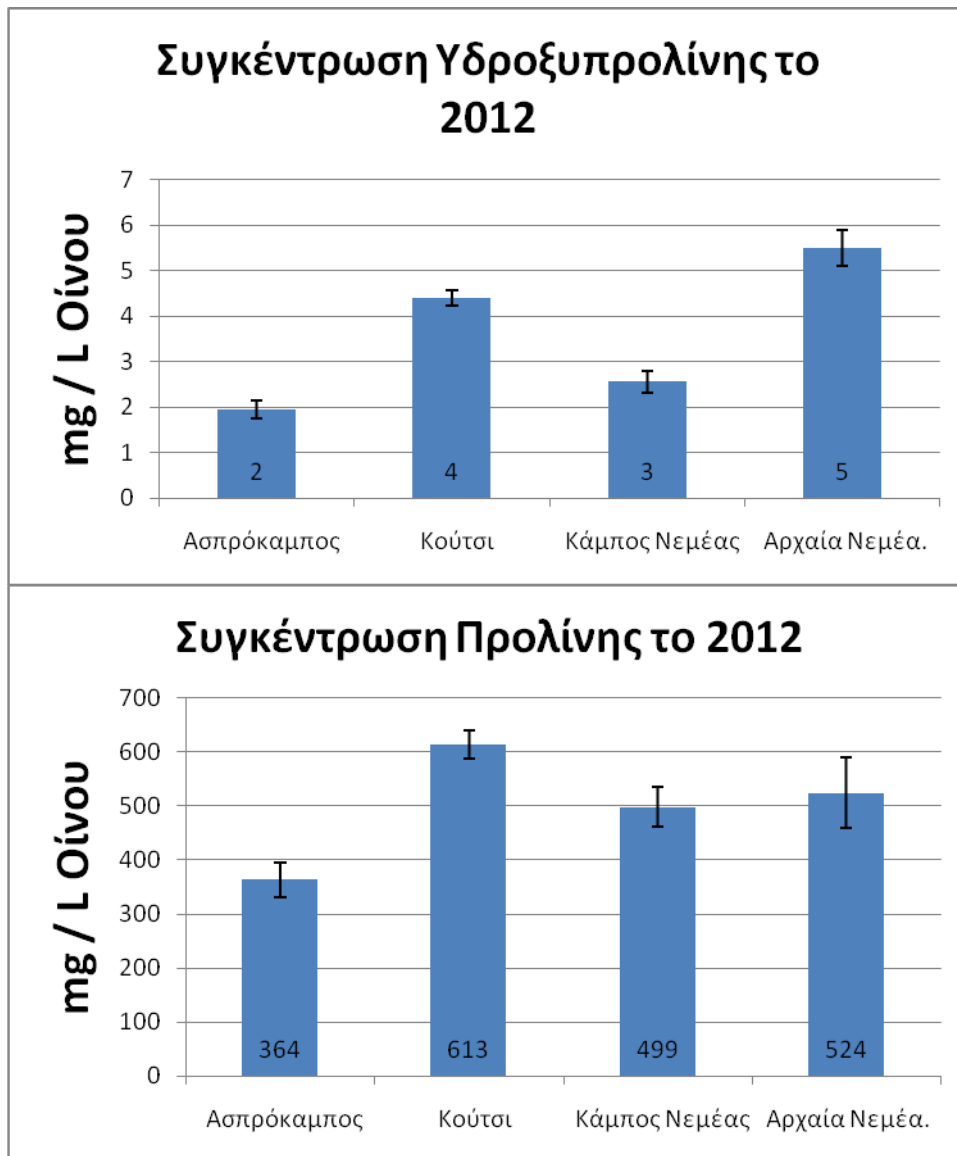


Συγκέντρωση Γλουταμίνης το 2012



Συγκέντρωση Τυροσίνης το 2012





Διάγραμμα 1.1

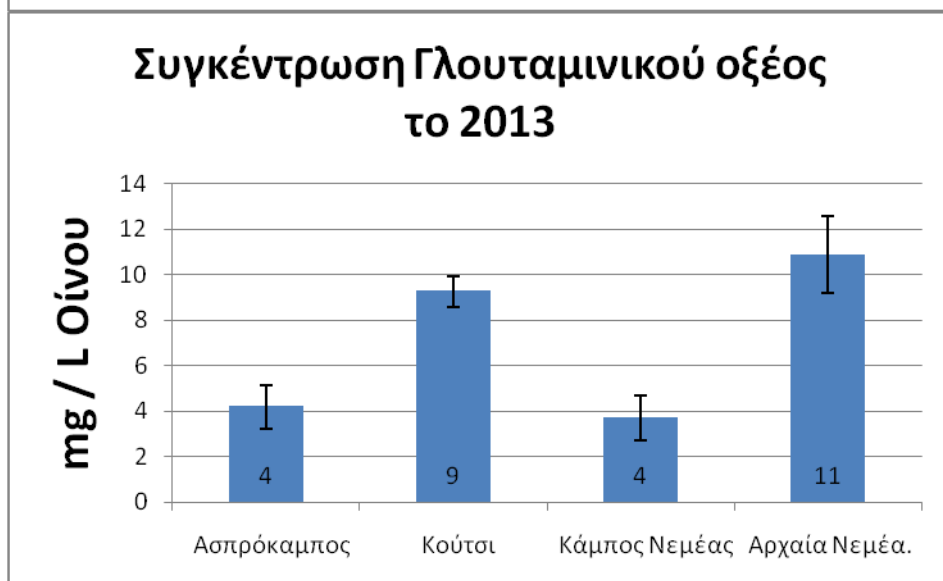
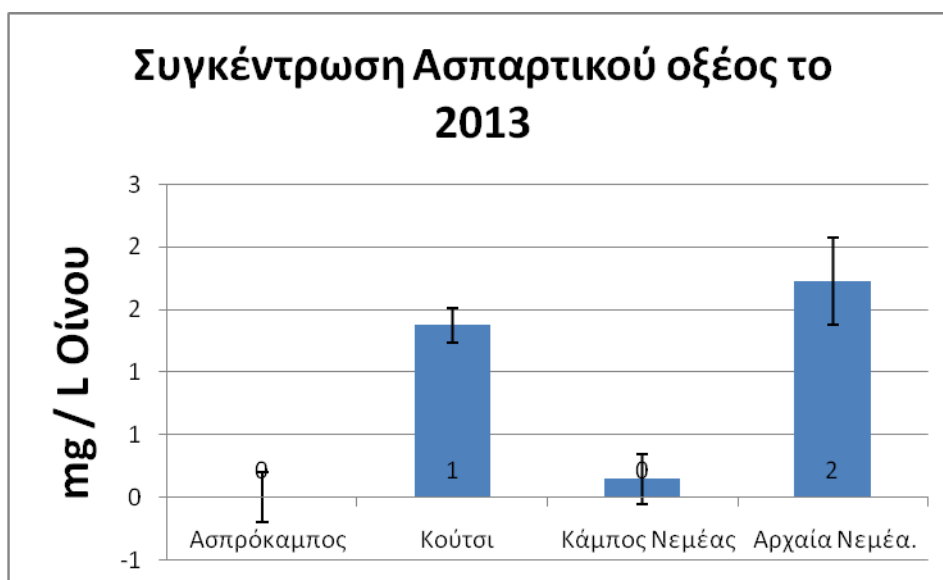
Συγκέντρωση των αμινοξέων asn, gln, tyr, hyc και pro στο κρασί, το 2012 στις υποζώνες Ασπρόκαμπος (1), Κούτσι (2), Κάμπος Νεμαίας (3), Αρχαία Νεμαία (4).

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1, 2 και 3 με την 4 για τη συγκέντρωση της ασπαραγίνης και της τυροσίνης. Όπου η υποζώνη Αρχαία Νεμαία (4) παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

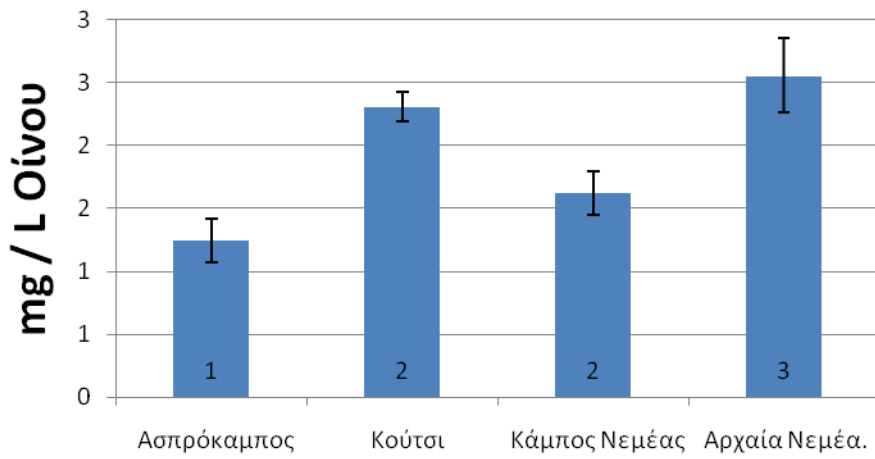
Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 και 3 για τη συγκέντρωση της γλουταμίνης. Όπου η υποζώνη 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 και 2, 1 και 4, 2 και 3, 3 και 4 για τη συγκέντρωση της υδροξυπρολίνης. Όπου οι υποζώνες Κούτσι και Αρχαία Νεμαία παρουσιάζουν τη μέγιστη συγκέντρωση.

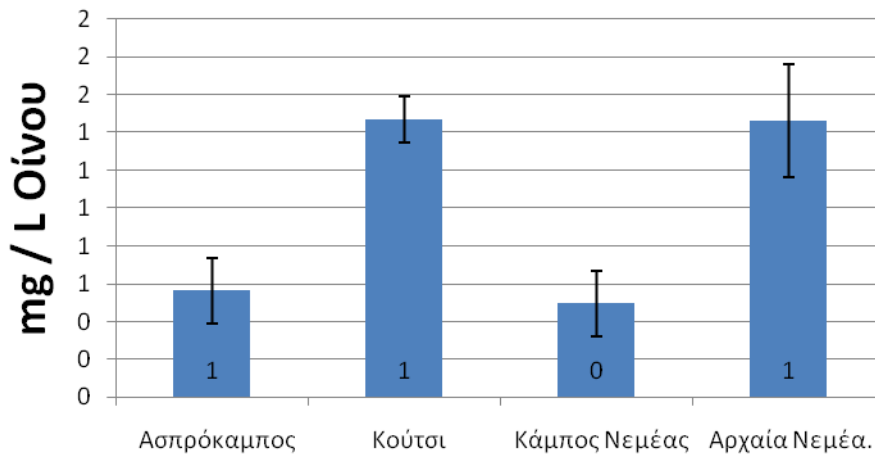
Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 και 2 για τη συγκέντρωση της προλίνης, όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει τη μικρότερη συγκέντρωση.



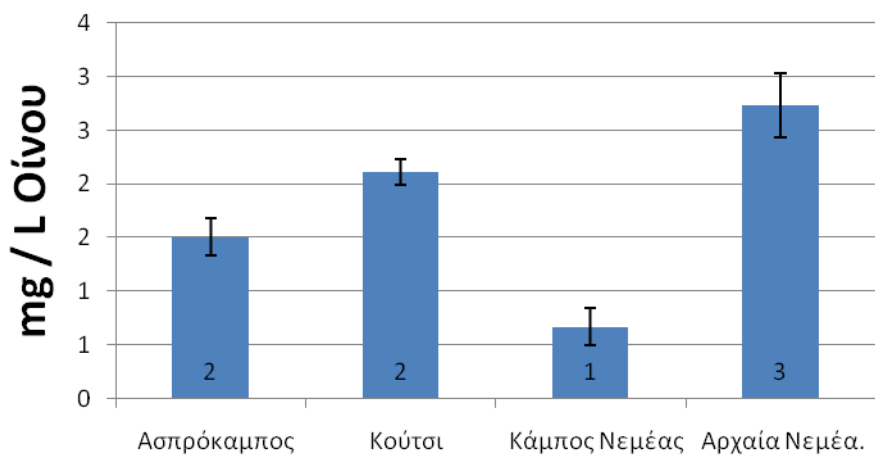
Συγκέντρωση Σερίνης το 2013



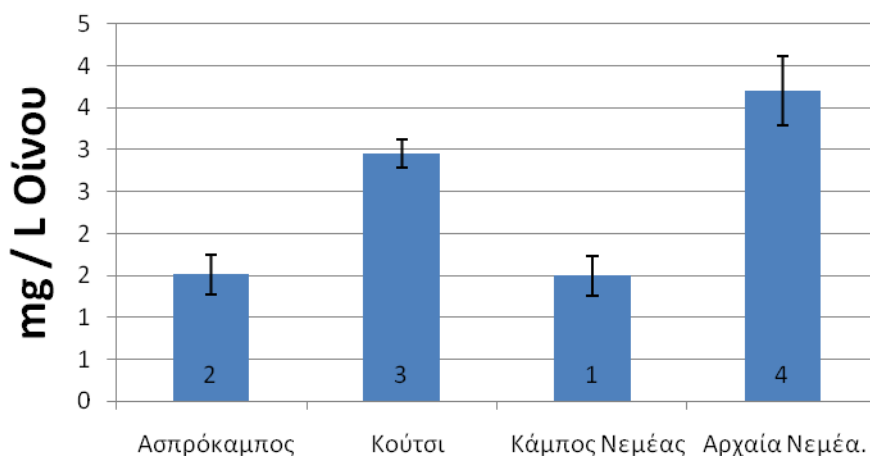
Συγκέντρωση Γλουταμίνης το 2013



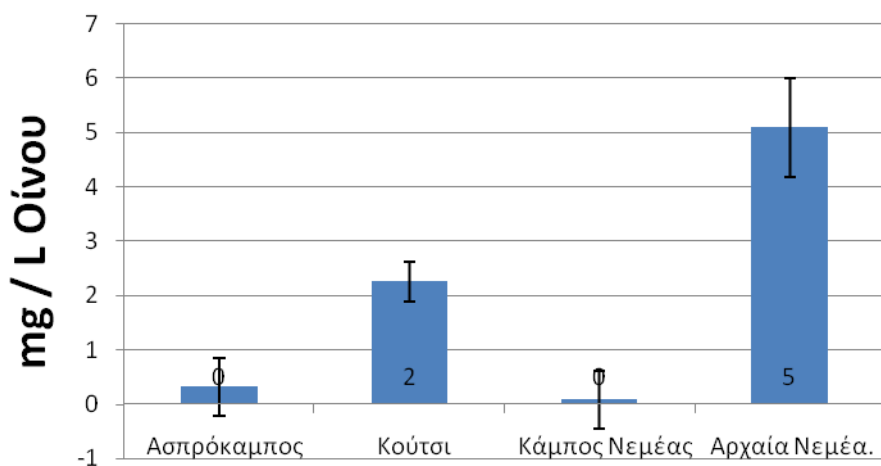
Συγκέντρωση Τυροσίνης το 2013



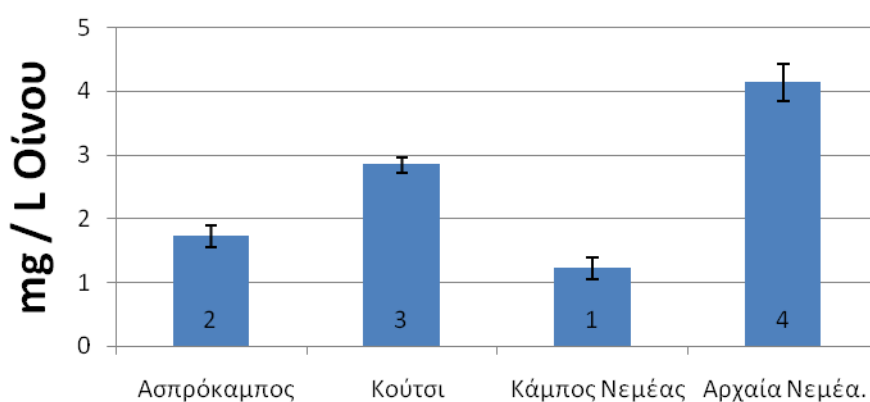
Συγκέντρωση Βαλίνης το 2013

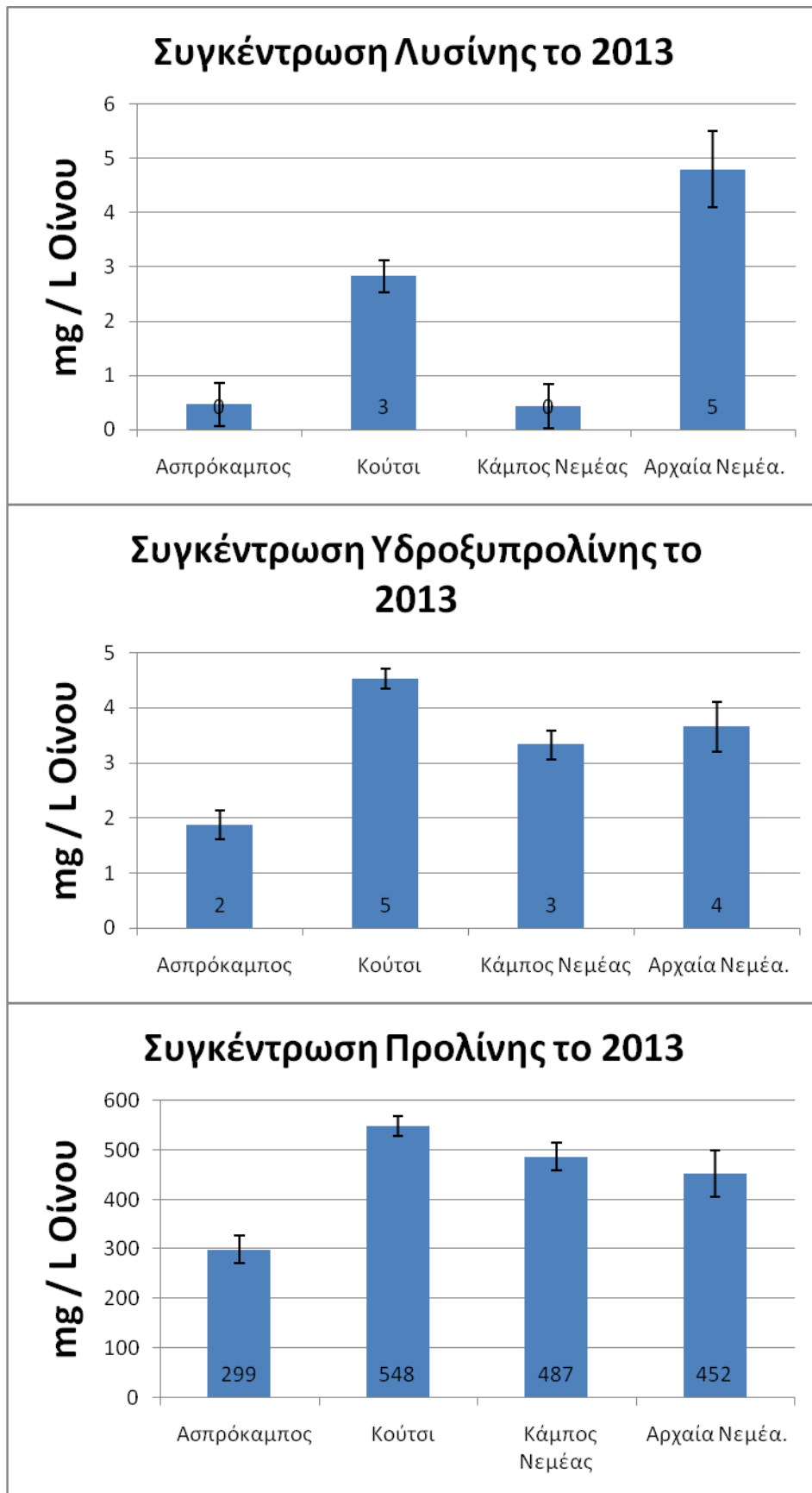


Συγκέντρωση Τρυπτοφάνης το 2013



Συγκέντρωση Φενυλαλανίνης το 2013





Διάγραμμα 1.2

Συγκέντρωση των αμινοξέων asp, glu, ser, gln, tyr, val, trp, phe, lys, hys και pro στο κρασί, το 2013 στις υποζώνες Ασπρόκαμπος (1), Κούτσι (2), Κάμπος Νεμαίας (3), Αρχαία Νεμαία (4).

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1, 2 και 2, 3 για τη συγκέντρωση του ασπαραγινικού οξέος. Η υποζώνη 2 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 2 και 3 για τη συγκέντρωση του γλουταμινικού οξέος και της γλουταμίνης. Όπου η υποζώνη 2 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 και 2 για τη συγκέντρωση της σερίνης. Όπου η υποζώνη Αρχαία 2 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 2 – 3 και 3 - 4 για τη συγκέντρωση της τυροσίνης. Όπου η υποζώνη Αρχαία 3 παρουσιάζει μικρότερη συγκέντρωση.

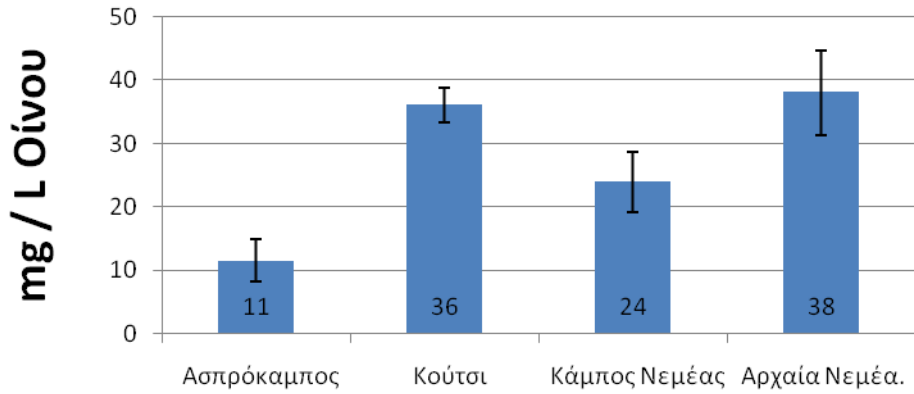
Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1 – 4, 2 – 3, 3 – 4, για τη συγκέντρωση της βαλίνης, της φενυλαλανίνης και της λυσίνης. Όπου οι υποζώνες 2 και 4 παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 4 και 3 - 4 για τη συγκέντρωση της τρυπτοφάνης. Όπου η υποζώνη 4 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

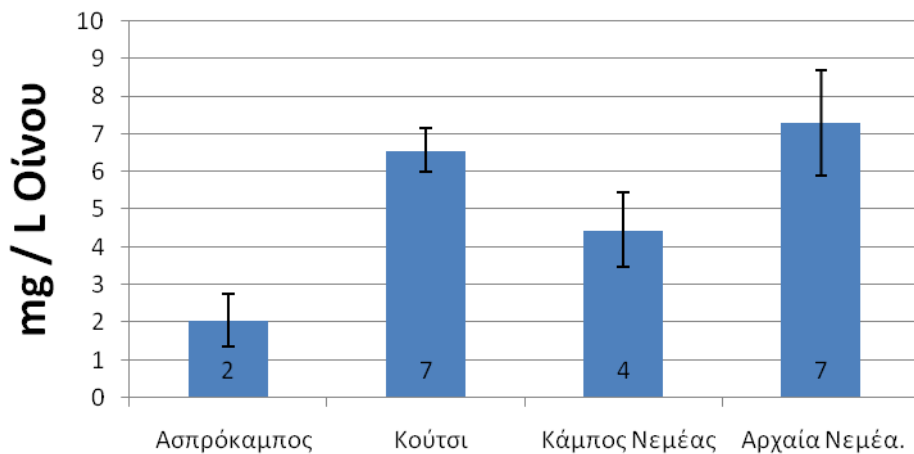
Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2 για τη συγκέντρωση της υδροξυπρολίνης. Όπου η 2 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2 και 1 - 3 για τη συγκέντρωση της προλίνης. Όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει τη μικρότερη συγκέντρωση.

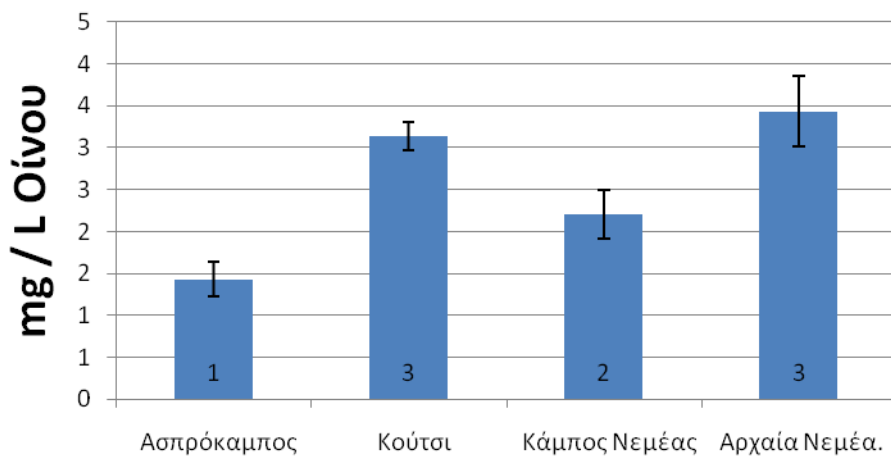
Συγκέντρωση Γλουταμινικού οξέος το 2014



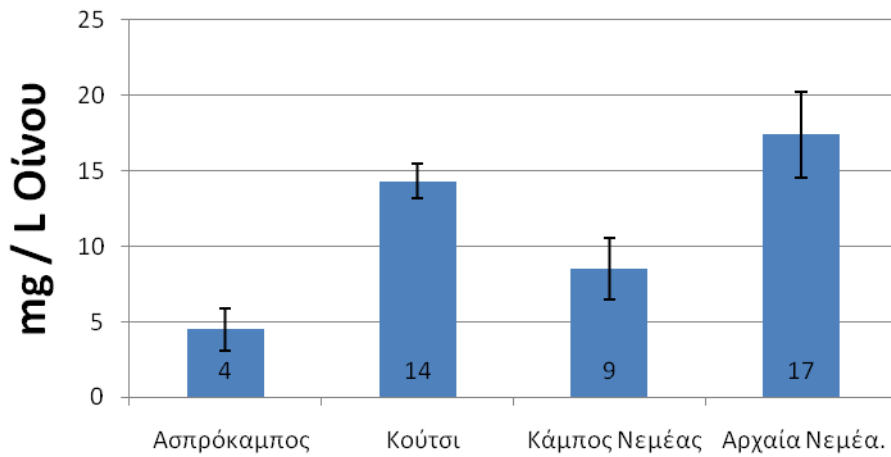
Συγκέντρωση Σερίνης το 2014



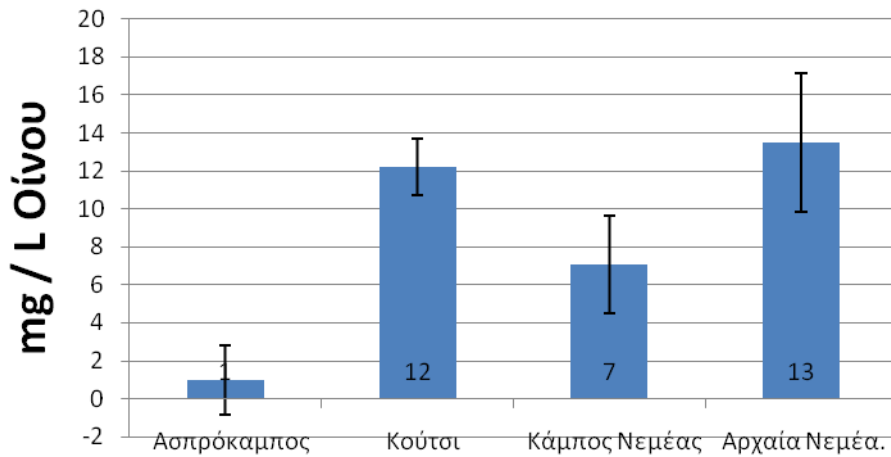
Συγκέντρωση Γλουταμίνης το 2014



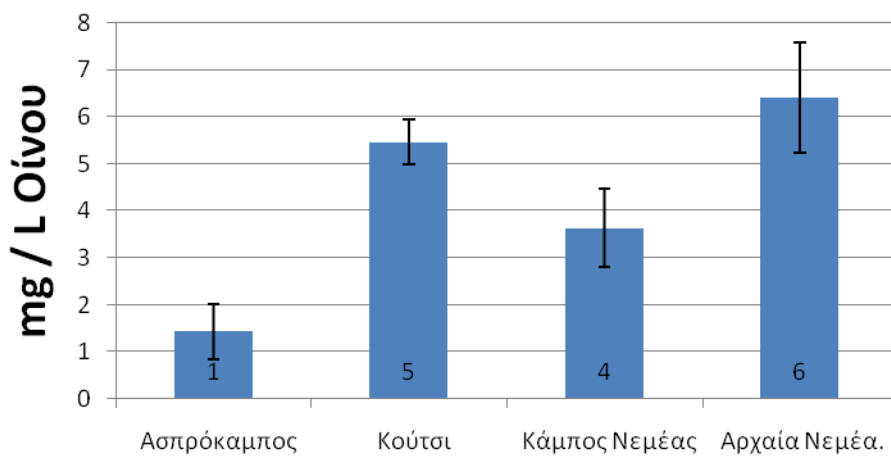
Συγκέντρωση ιστιδίνης το 2014



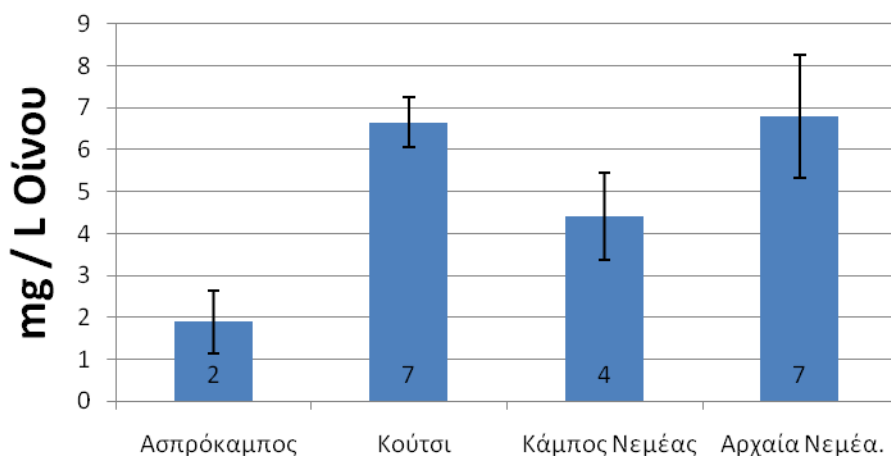
Συγκέντρωση Γλυσίνης το 2014



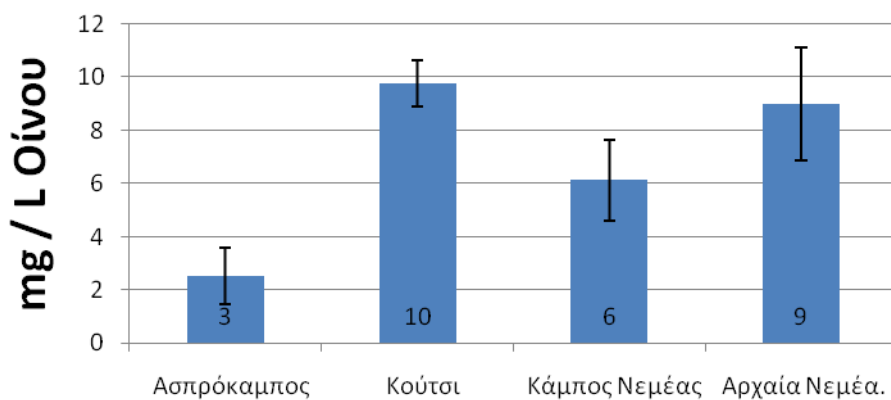
Συγκέντρωση Θρεονίνης το 2014



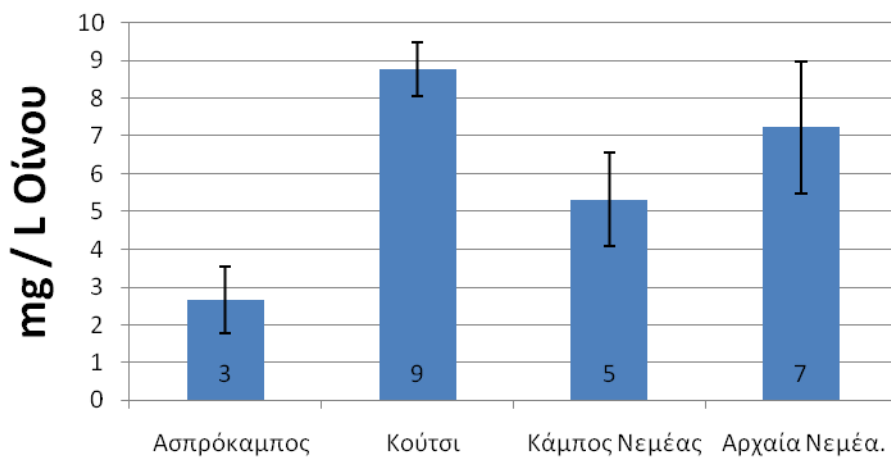
Συγκέντρωση τυροσίνης το 2014



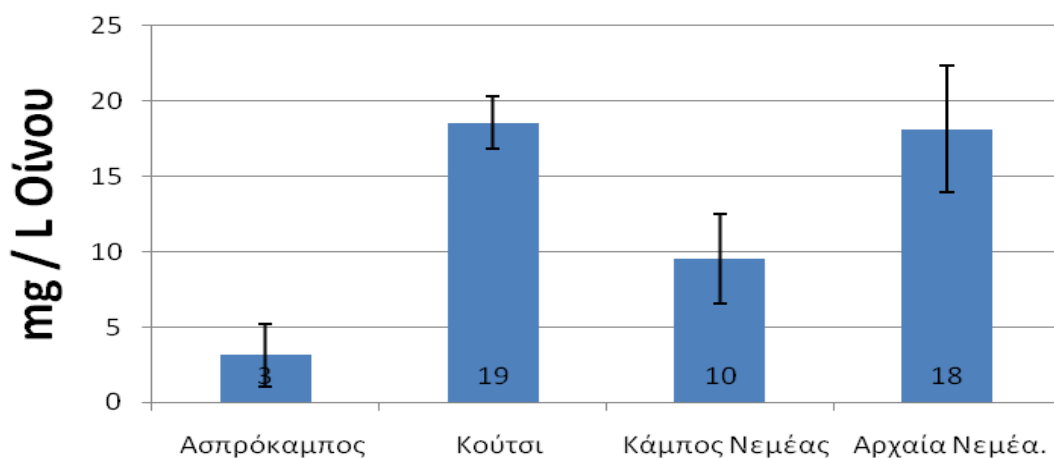
Συγκέντρωση Φενυλαλανίνης το 2014



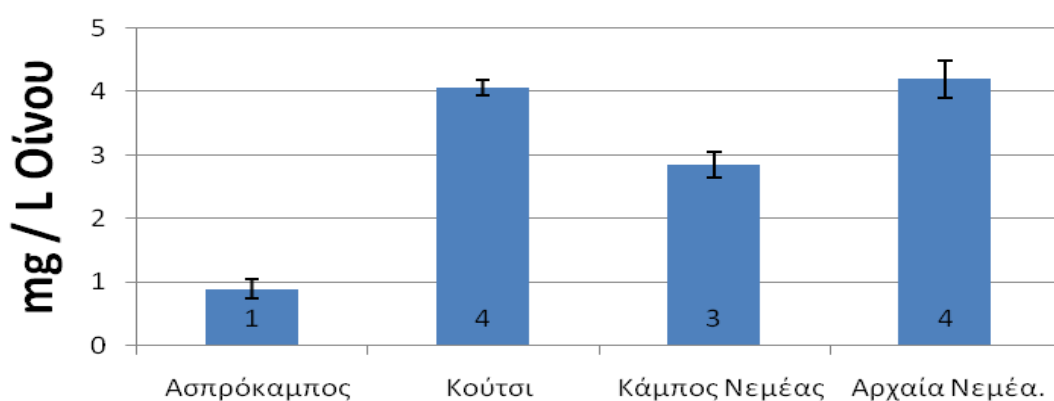
Συγκέντρωση Λευκίνης το 2014

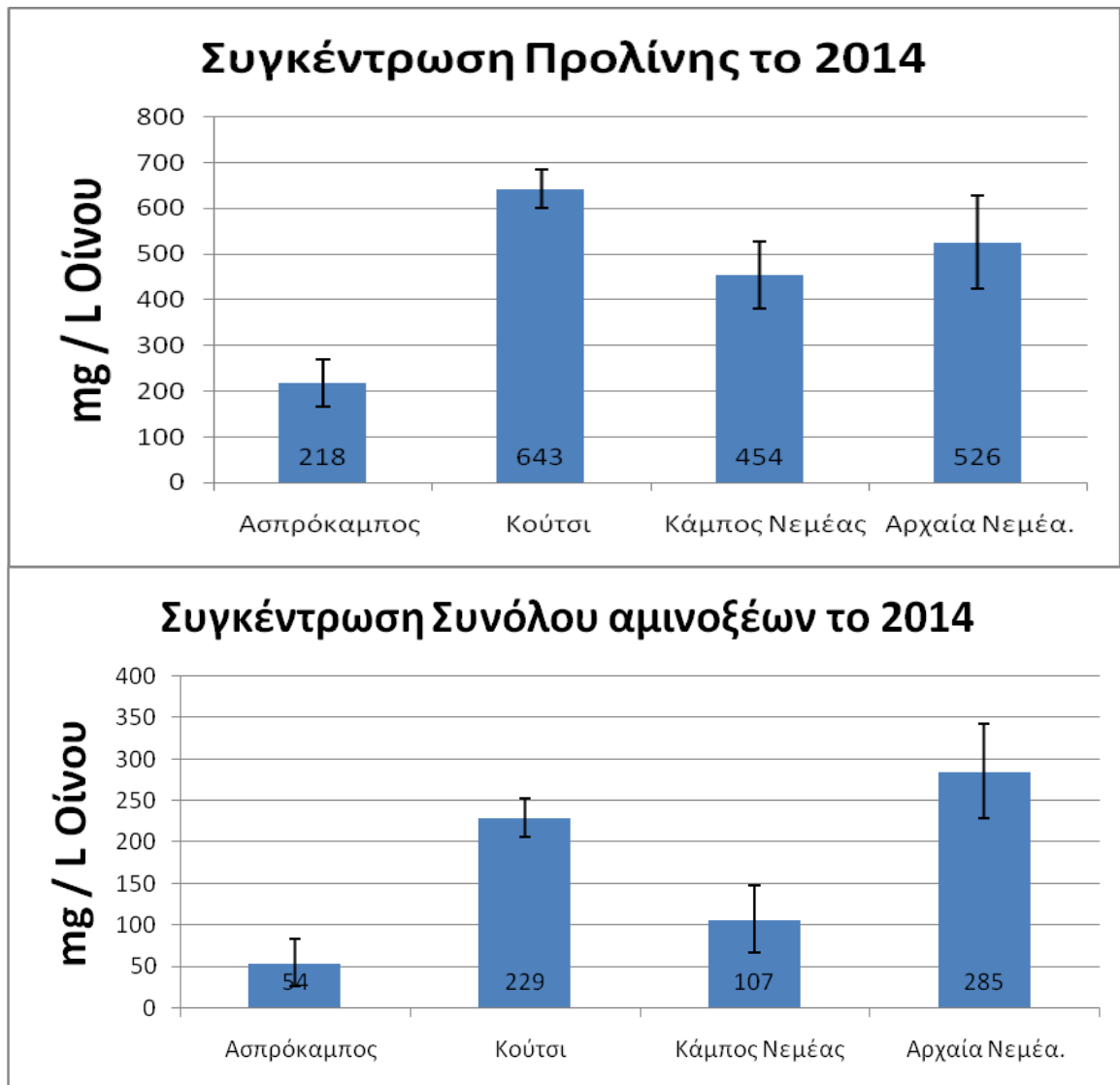


Συγκέντρωση Λυσίνης το 2014



Συγκέντρωση Υδροξυπρολίνης το 2014





Διάγραμμα 1.3

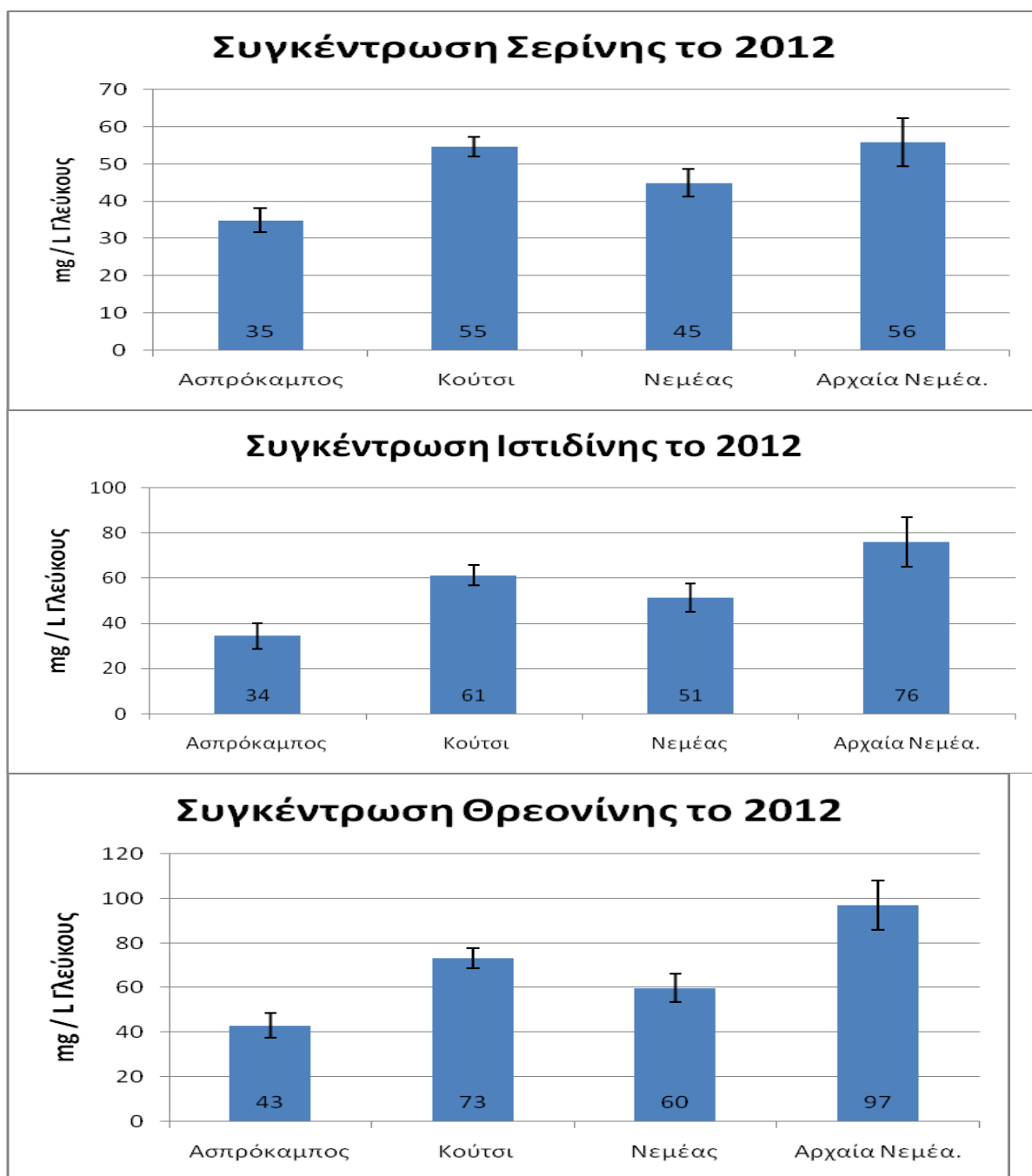
Συγκέντρωση των αμινοξέων glu, ser, gln, his, gly, thr, tyr, phe, leu, lys, hyc, pro και (total-pro)-hyc στο κρασί, το 2014 στις υποζώνες Ασπρόκαμπος (1), Κούτσι (2), Κάμπος Νεμαίας (3), Αρχαία Νεμαία (4).

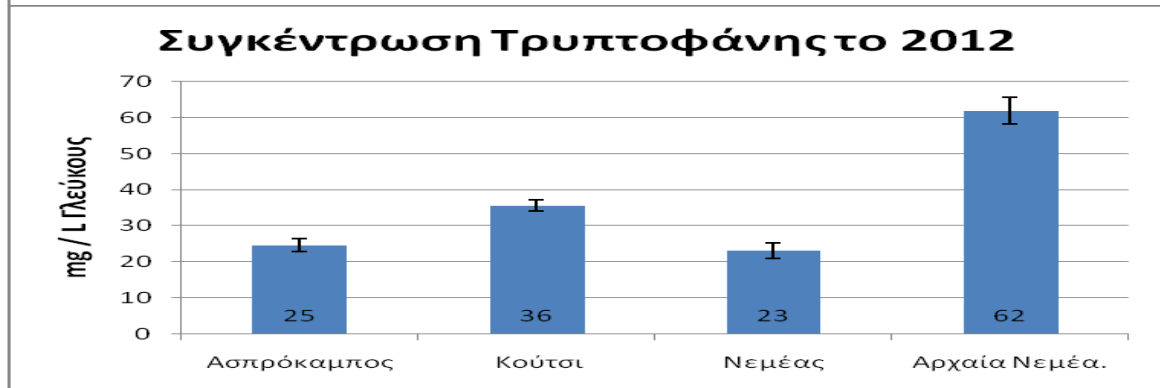
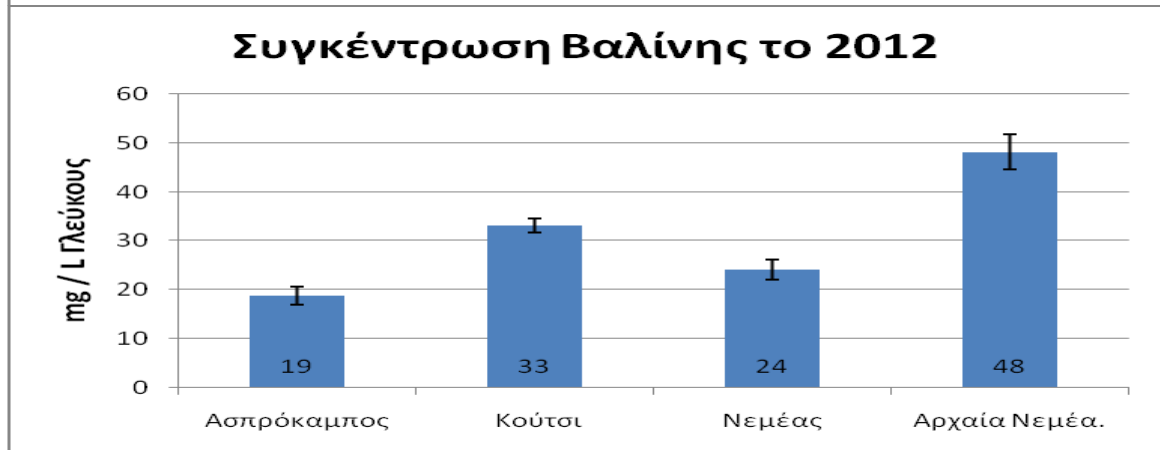
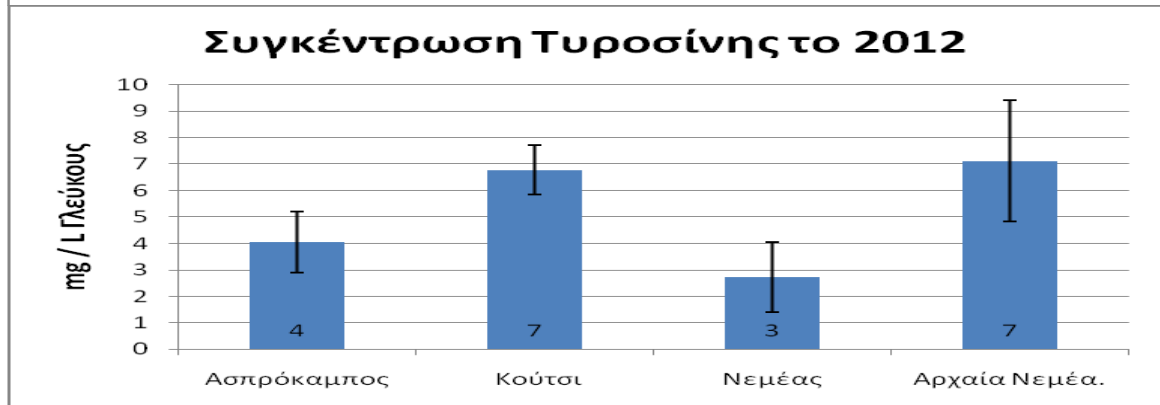
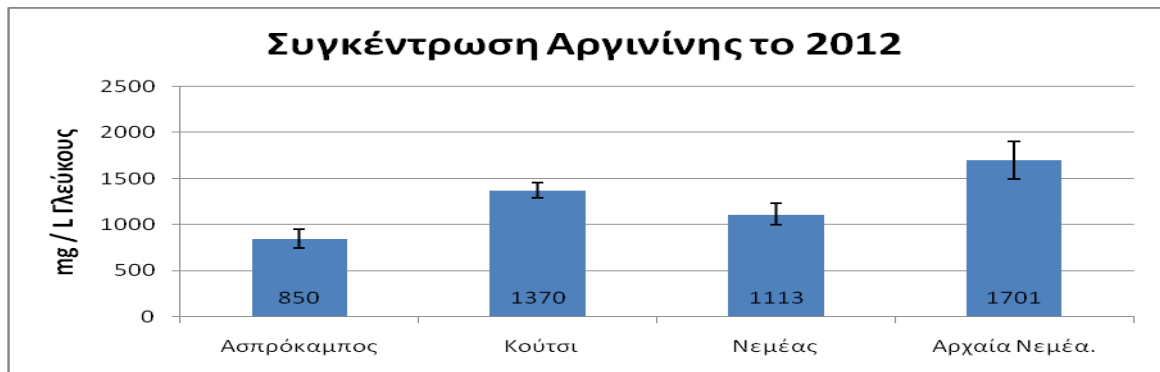
Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2 για τη συγκέντρωση του γλουταμινικού οξέος, της σερίνης, της γλουταμίνης, της ιστιδίνης, της γλυσίνης, της θρεονίνης, της τυροσίνης, της φενυλαλανίνης, της λευκίνης, της λυσίνης, της προλίνης, και του συνόλου (total-pro-hyc). Όπου η υποζώνη 2 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1 – 3, 1- 4, 2 – 3, για τη συγκέντρωση της υδροξυπρολίνης. Όπου η υποζώνη 2 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση.

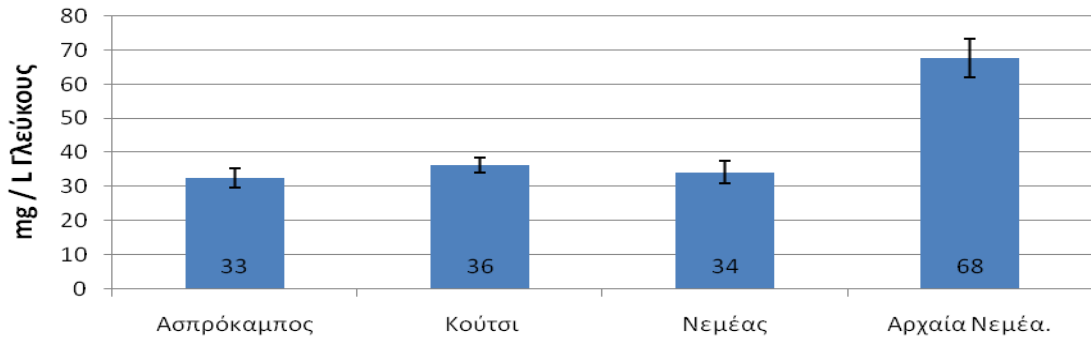
3.3 Αποτελέσματα μετρήσεων υπολογισμού των αμινοξέων σε γλεύκη των ζωνών της Νεμέας

Σε αυτό το κεφάλαιο, θα παρουσιαστεί η συγκέντρωση του κάθε αμινοξέως, αλλά και του συνόλου των αμινοξέων στα γλεύκη για την κάθε υποζώνη που έχουμε ορίσει, για την κάθε χρονολογία 2012, 2013, 2014, χωριστά. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της συγκέντρωσης των αμινοξέων, εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Count είναι ο αριθμός επαναλήψεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι.

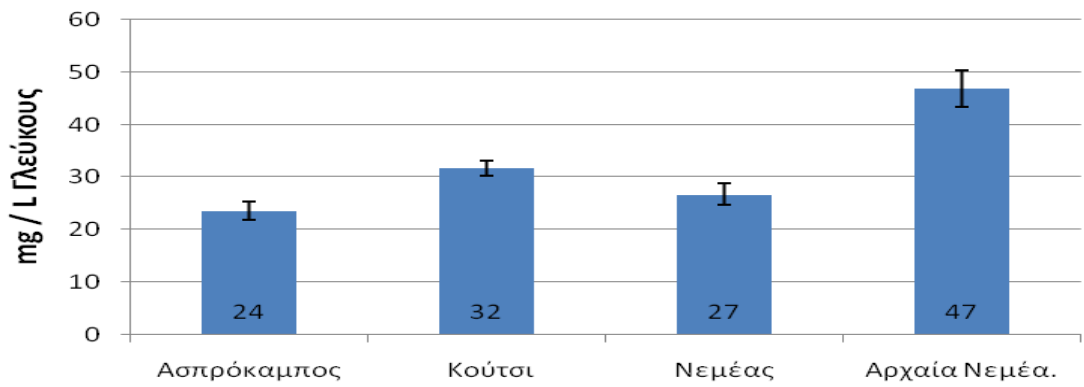




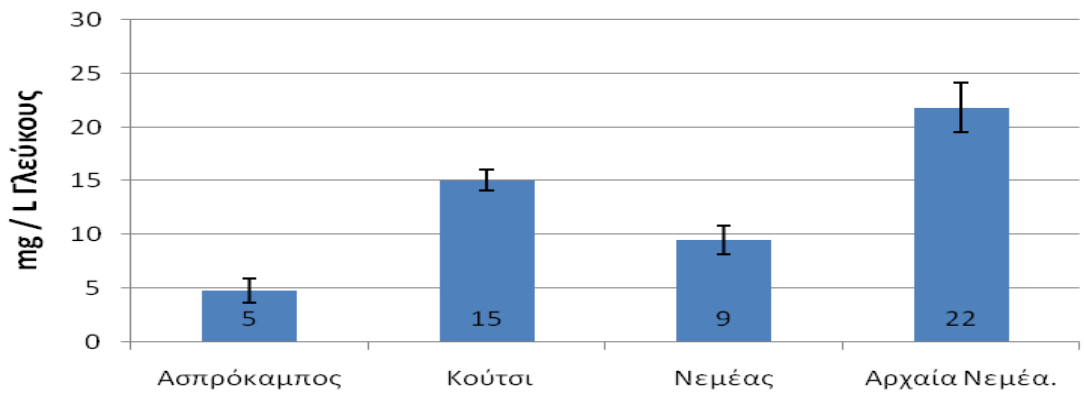
Συγκέντρωση Φενυλαλανίνης το 2012

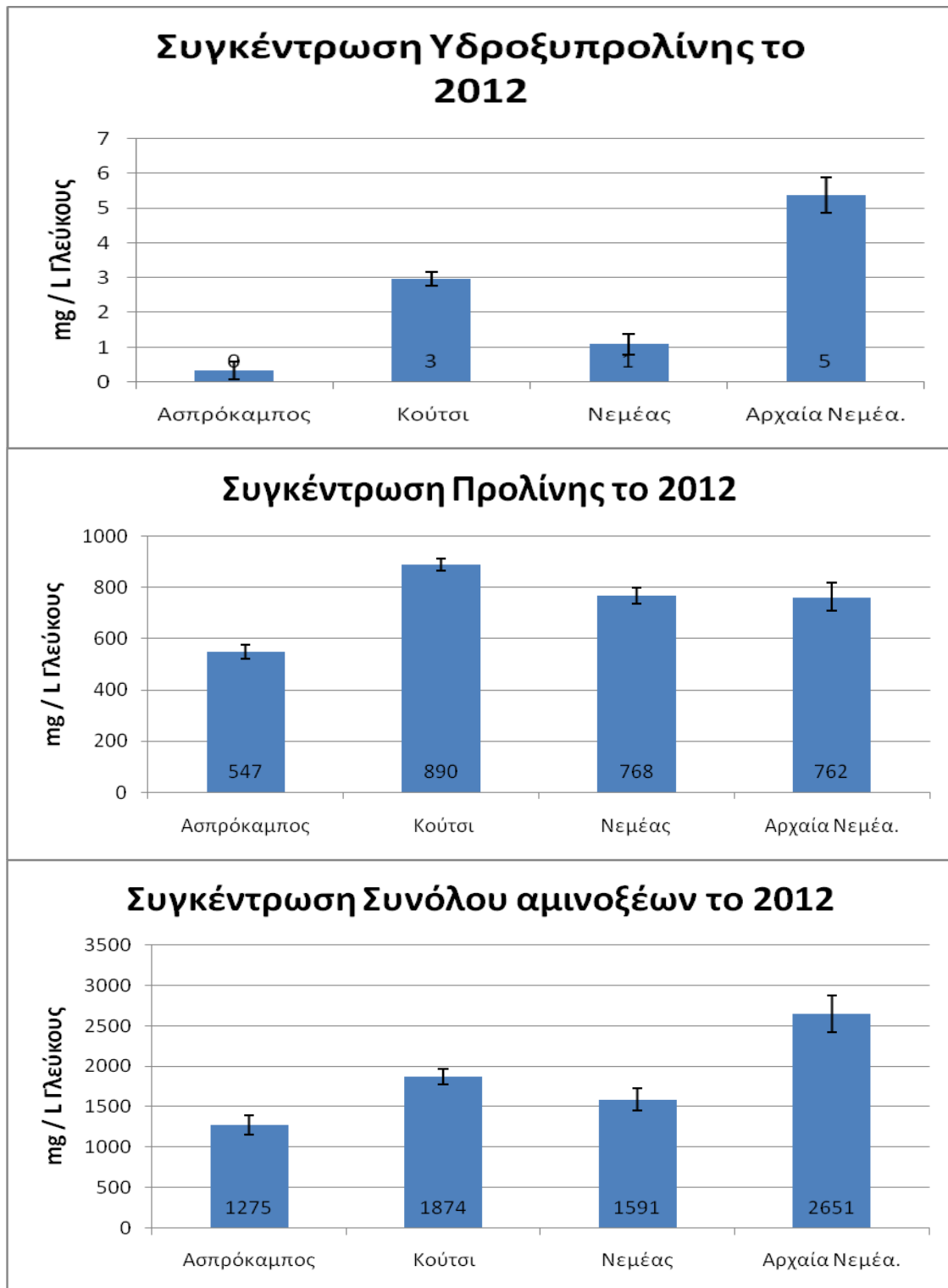


Συγκέντρωση Λευκίνης το 2012



Συγκέντρωση Λυσίνης το 2012





Διάγραμμα 1.4

Συγκέντρωση των αμινοξέων ser, his, thr, arg, tyr, val, trp, phe, leu, lys, hyc, pro και (total-pro)-hyc στο γλεύκος, το 2012 στις υποζώνες Ασπρόκαμπος (1), Κούτσι (2), Κάμπος Νεμαίας (3), Αρχαία Νεμαία (4).

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2 για τη συγκέντρωση της σερίνης. Όπου η υποζώνη 2 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2, 1-4, και 3-4 για τη συγκέντρωση της βαλίνης και της λυσίνης. Όπου η υποζώνη 4 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2, 1-4, 2-3, 2-4, 3-4 για τη συγκέντρωση της τρυπτοφάνης. Όπου η υποζώνη 4 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 4, 2-4, 3-4 για τη συγκέντρωση της φενυλαλανίνης και της τυροσίνης. Όπου η υποζώνη 4 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 4, 3-4 για τη συγκέντρωση της λευκίνης. Όπου η υποζώνη 4 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2, 1-4, 2-3, 3-4 για τη συγκέντρωση της υδροξυπρολίνης. Όπου η υποζώνες 2 και 4 παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2, 1-3 για τη συγκέντρωση της προλίνης. Όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει τη μικρότερη συγκέντρωση.

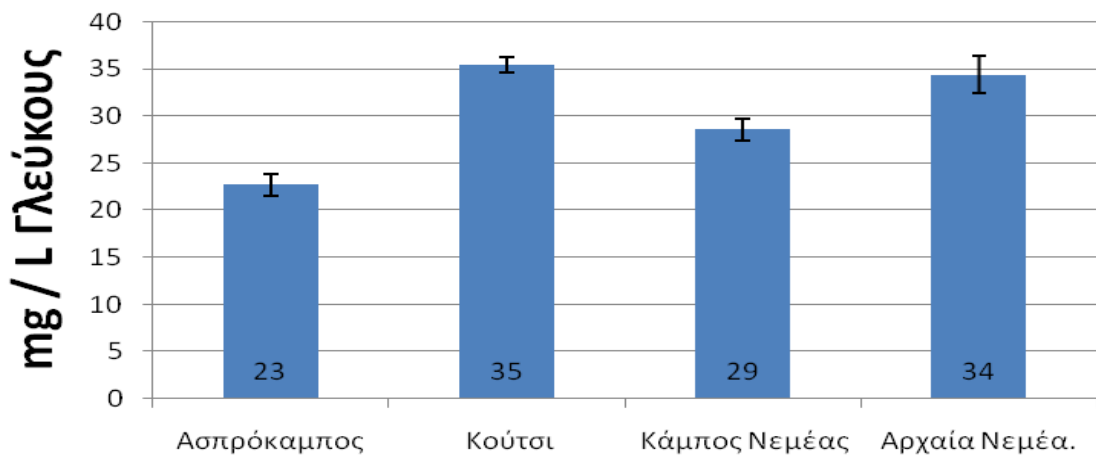
Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 4 για τη συγκέντρωση του συνόλου των αμινοξέων χωρίς την προλίνη και την υδροξυπρολίνη.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2, 1-3, 1-4, 2-4 και 3-4 για τη συγκέντρωση της ιστιδίνης. . Όπου η υποζώνη 4 παρουσιάζει τη μέγιστη συγκέντρωση.

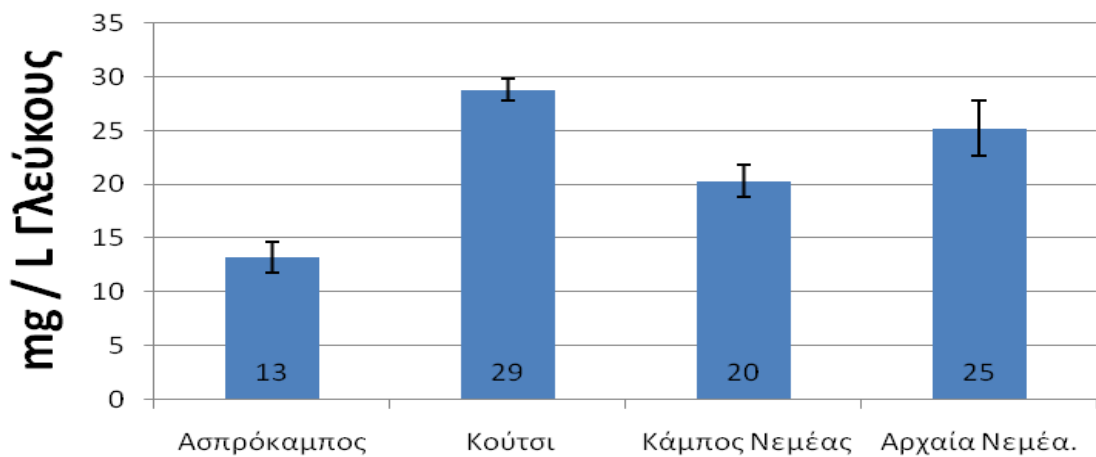
Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2, 1-4 για τη συγκέντρωση της θρεονίνης. . Όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει τη μικρότερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2, 1-3, 1-4 για τη συγκέντρωση της αργινίνης. . Όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει τη μικρότερη συγκέντρωση.

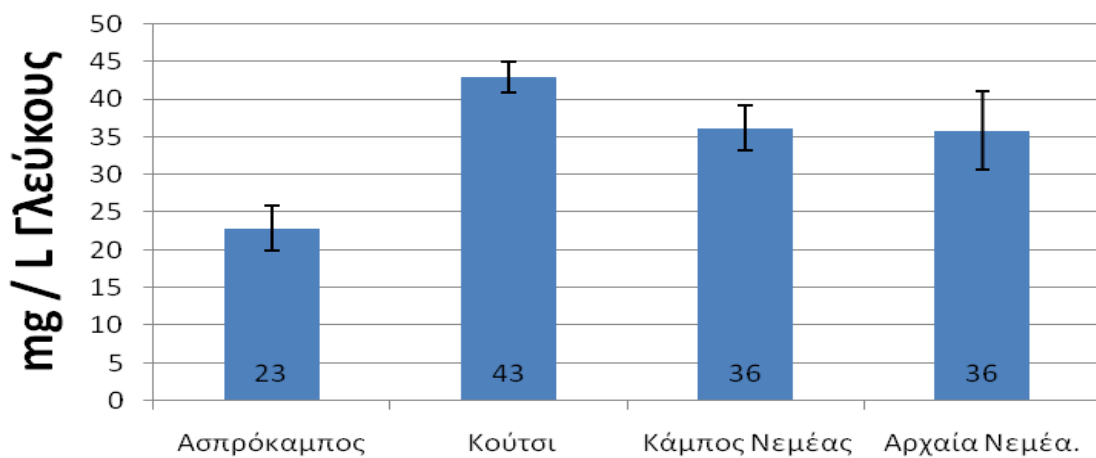
Συγκέντρωση Σερίνης το 2013



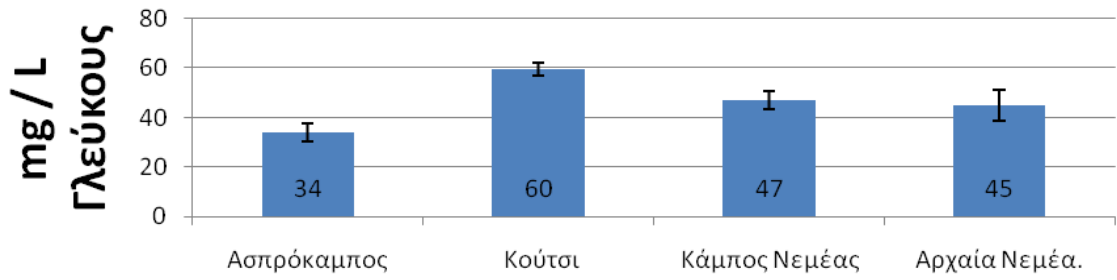
Συγκέντρωση Ιστιδίνης το 2013



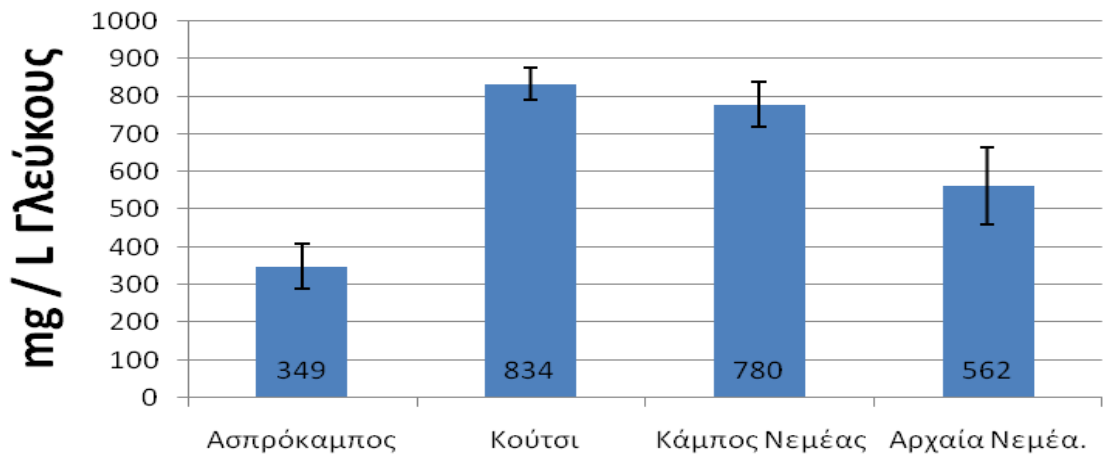
Συγκέντρωση Θρεονίνης το 2013



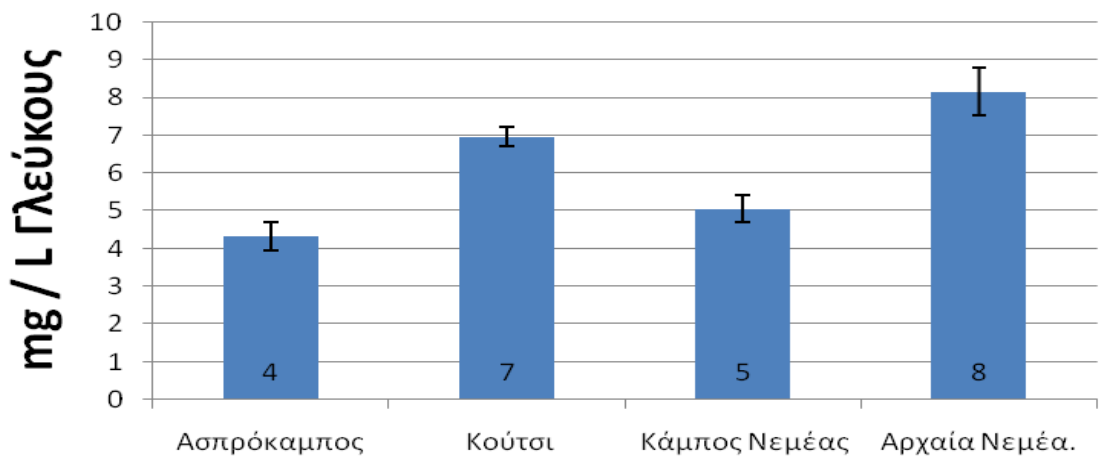
Συγκέντρωση Αλανίνης το 2013



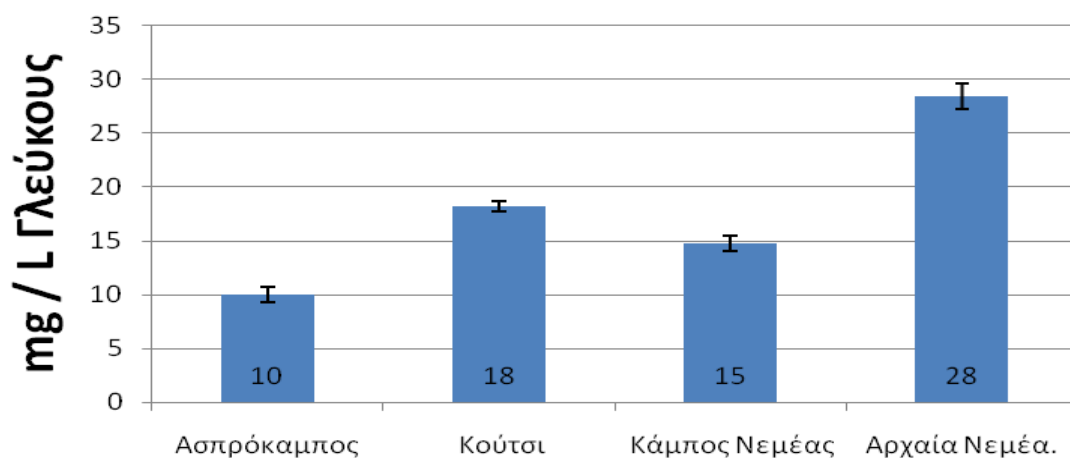
Συγκέντρωση Αργινίνης το 2013



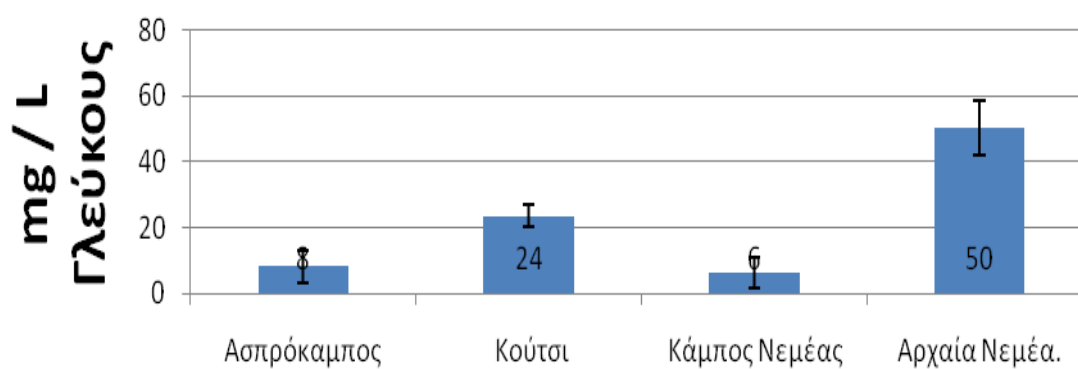
Συγκέντρωση Τυροσίνης το 2013



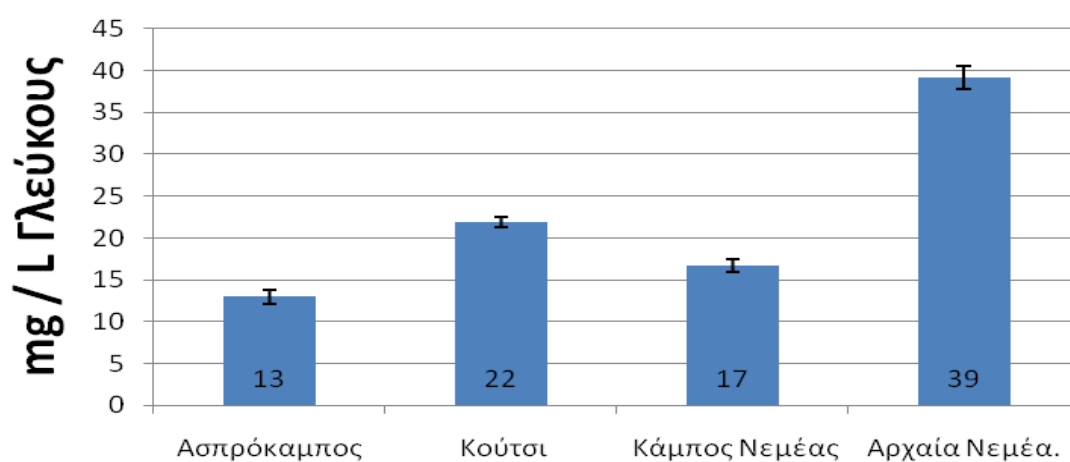
Συγκέντρωση Βαλίνης το 2013



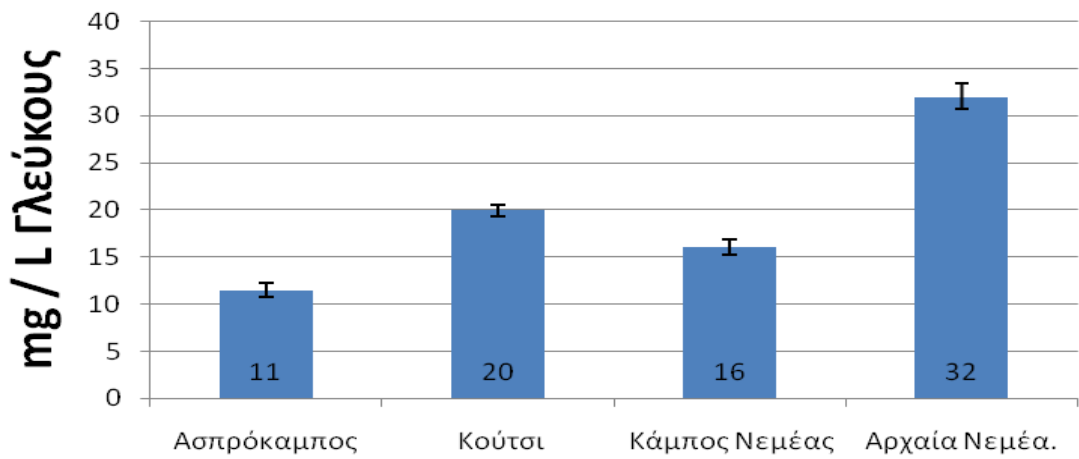
Συγκέντρωση Τρυπτοφάνης το 2013



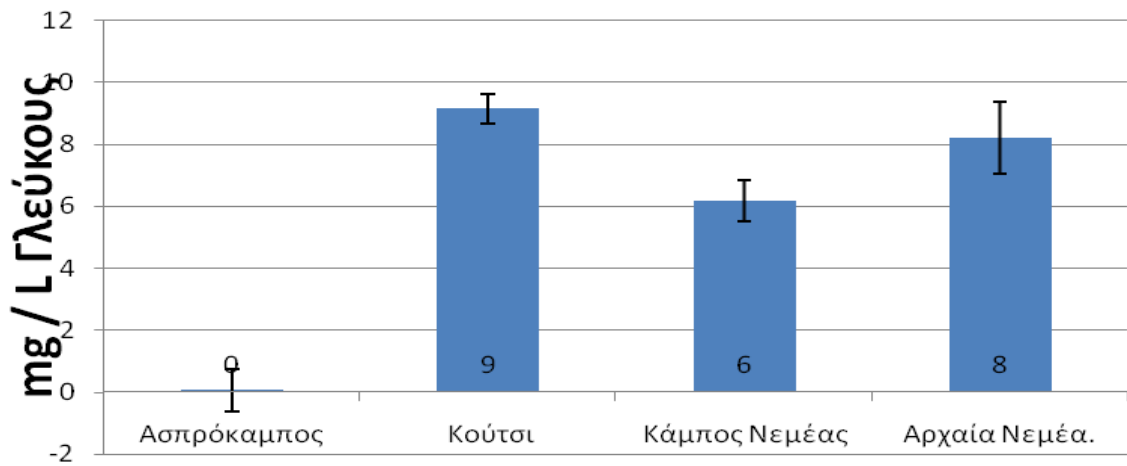
Συγκέντρωση Φενυλαλανίνης το 2013



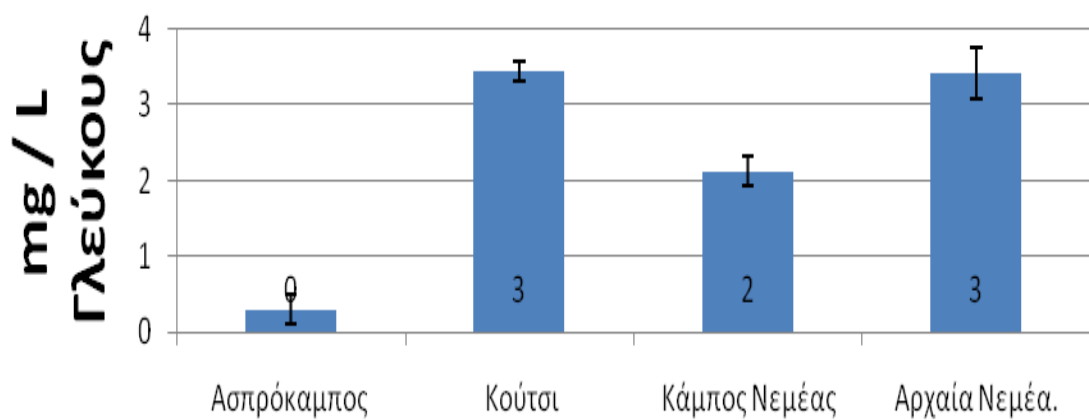
Συγκέντρωση Λευκίνης το 2013

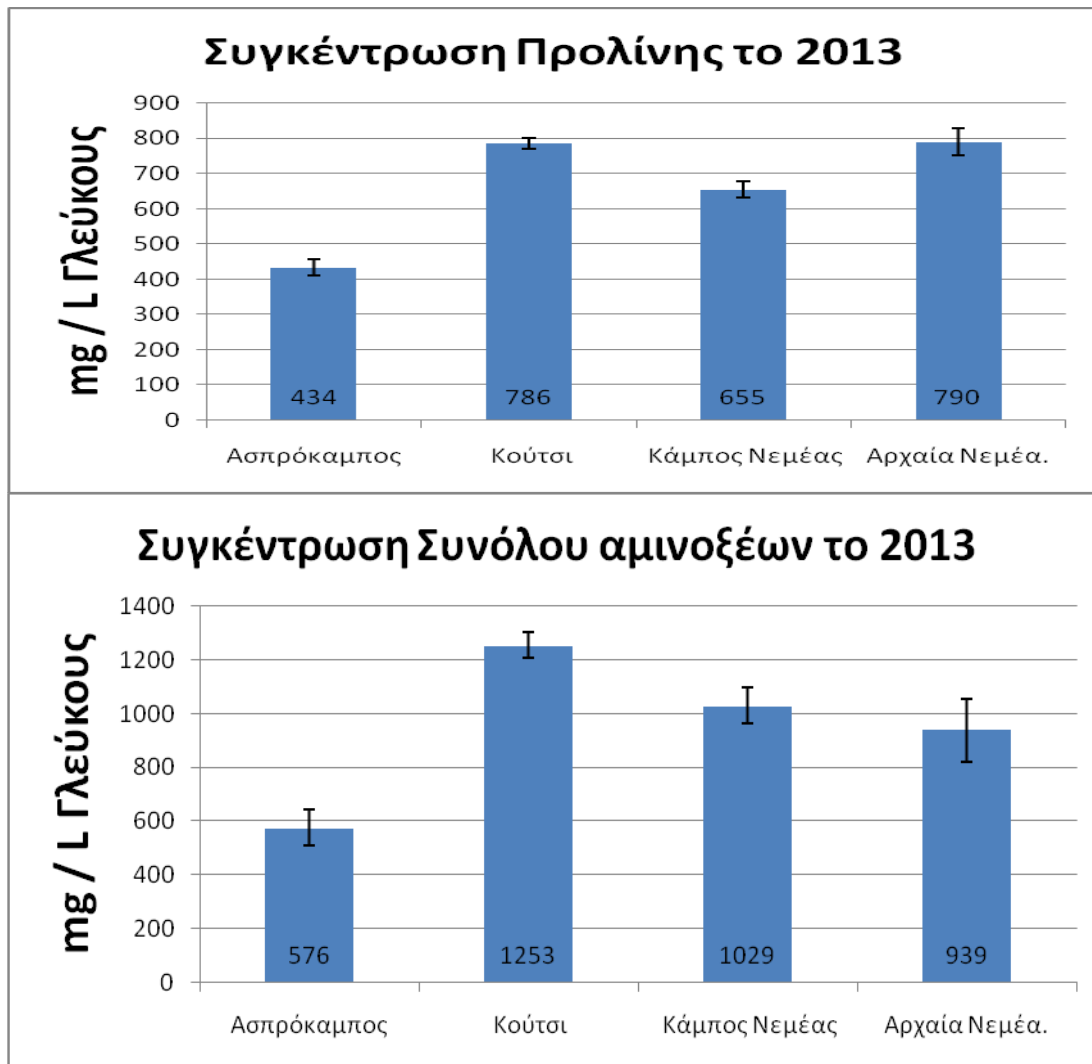


Συγκέντρωση Λυσίνης το 2013



Συγκέντρωση Υδροξυπρολίνης το 2013





Διάγραμμα 1.5

Συγκέντρωση των αμινοξέων ser, his, thr, ala, arg, tyr, val, trp, phe, leu, lys, hys, pro, (total-pro)-hys στο γλεύκος, το 2013 στις υποζώνες Ασπρόκαμπος (1), Κούτσι (2), Κάμπος Νεμαίας (3), Αρχαία Νεμαία (4).

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-4, 2-3 για τη συγκέντρωση της σερίνης. Όπου η υποζώνη 2 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 2-3 για τη συγκέντρωση της ιστιδίνης. Όπου η υποζώνη 2 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 - 2 για τη συγκέντρωση της θρεονίνης και της αλανίνης. Όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει μικρότερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-3 για τη συγκέντρωση της αργινίνης, και του συνόλου (total-pro-hyx). Όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει μικρότερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-4 για τη συγκέντρωση της τυροσίνης.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-3, 1-4, 2-4, 3-4 για τη συγκέντρωση της βαλίνης. Όπου η υποζώνη 4 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 3-4 για τη συγκέντρωση της τρυπτοφάνης.

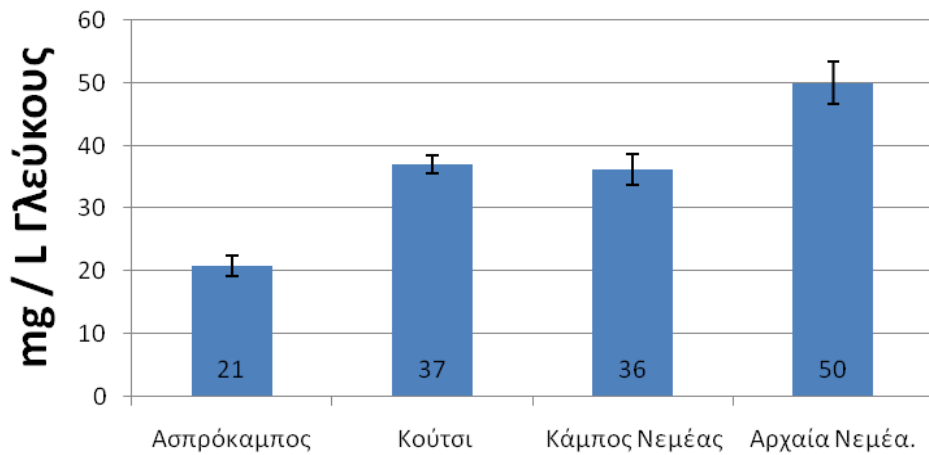
Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-4, 2-3, 2-4, 3-4 για τη συγκέντρωση της φενυλαλανίνης. Όπου η υποζώνη 4 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-4, 2-4, 3-4 για τη συγκέντρωση της λευκίνης. Όπου η υποζώνη 4 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

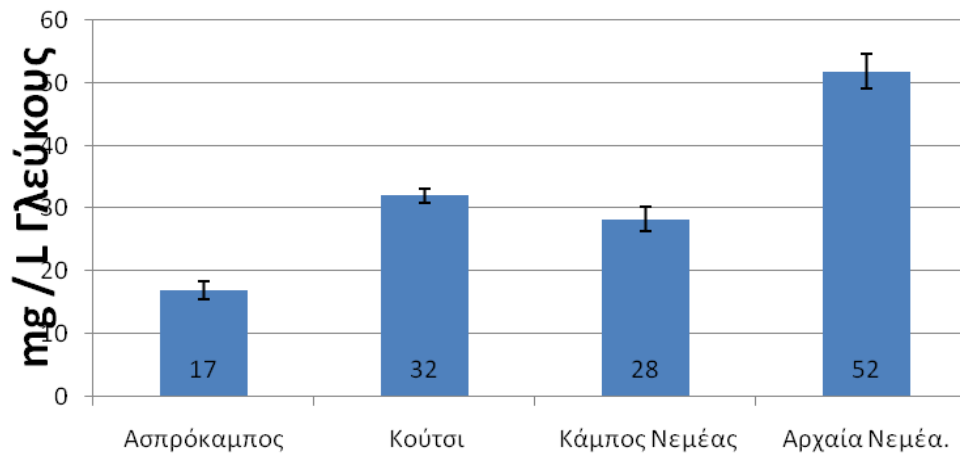
Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-3, 1-4 για τη συγκέντρωση της λυσίνης. Όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει μικρότερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-3, 1-4, 2-3 για τη συγκέντρωση της υδροξυπρολίνης και της προλίνης. Όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει μικρότερη συγκέντρωση.

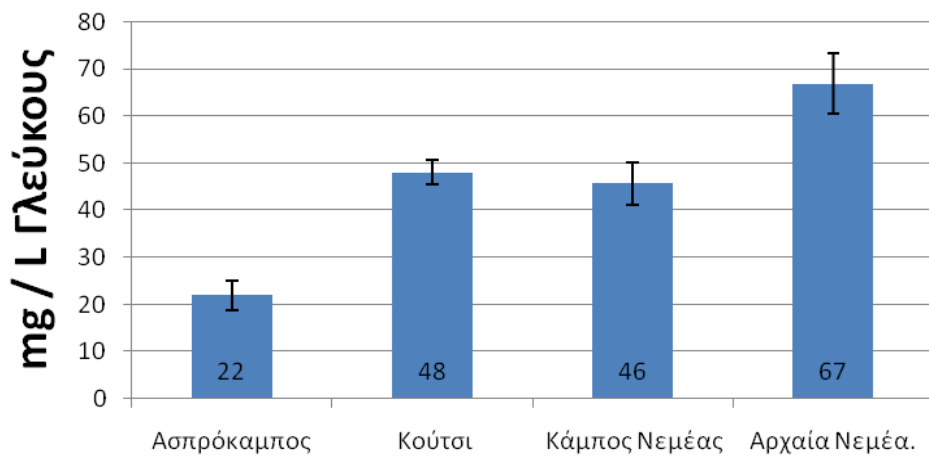
Συγκέντρωση Σερίνης το 2014



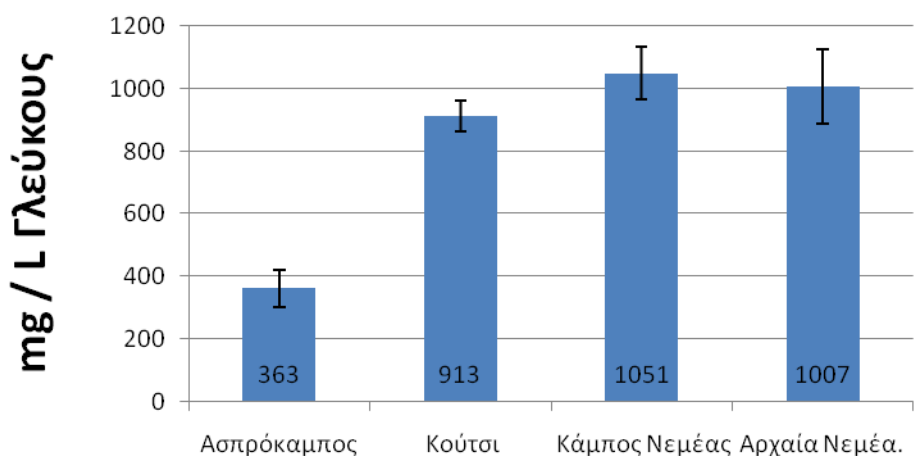
Συγκέντρωση Ιστιδίνης το 2014



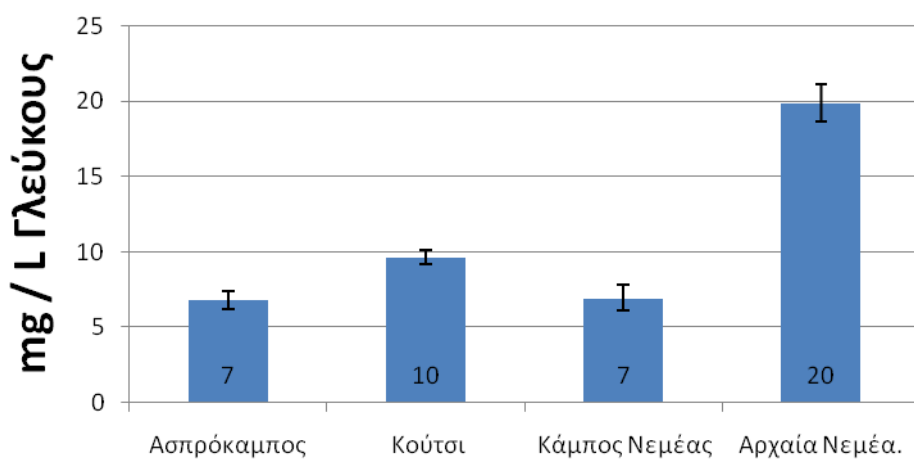
Συγκέντρωση Θρεονίνης το 2014



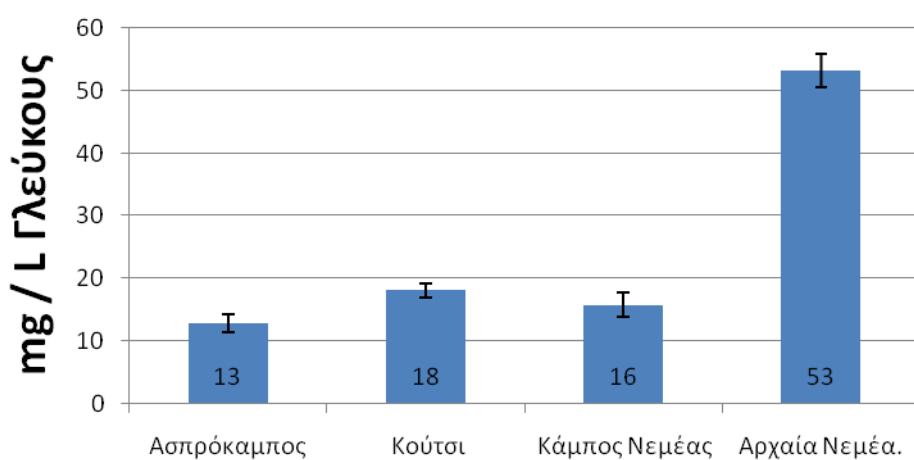
Συγκέντρωση Αγρινίνης το 2014



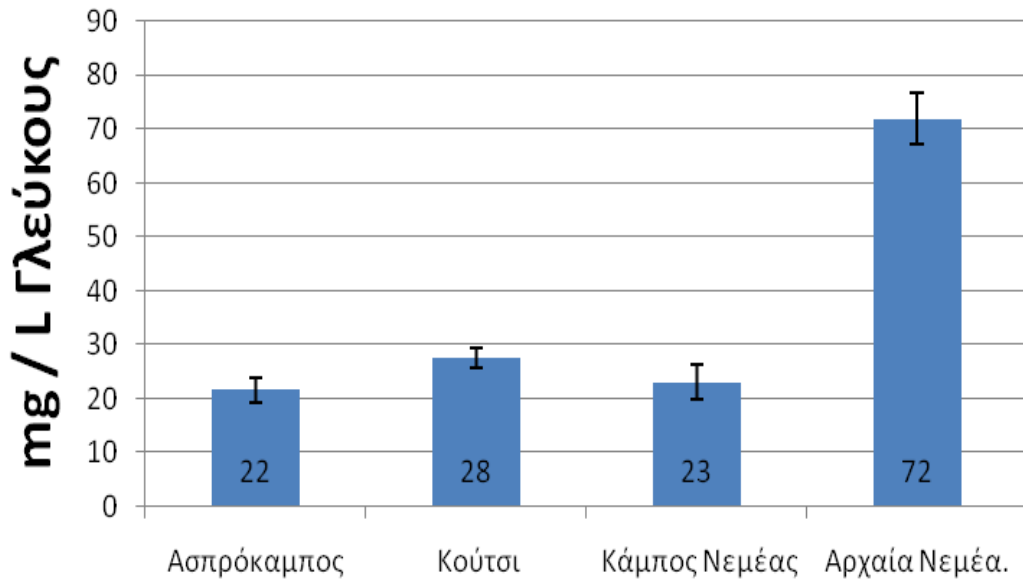
Συγκέντρωση τυροσίνης το 2014



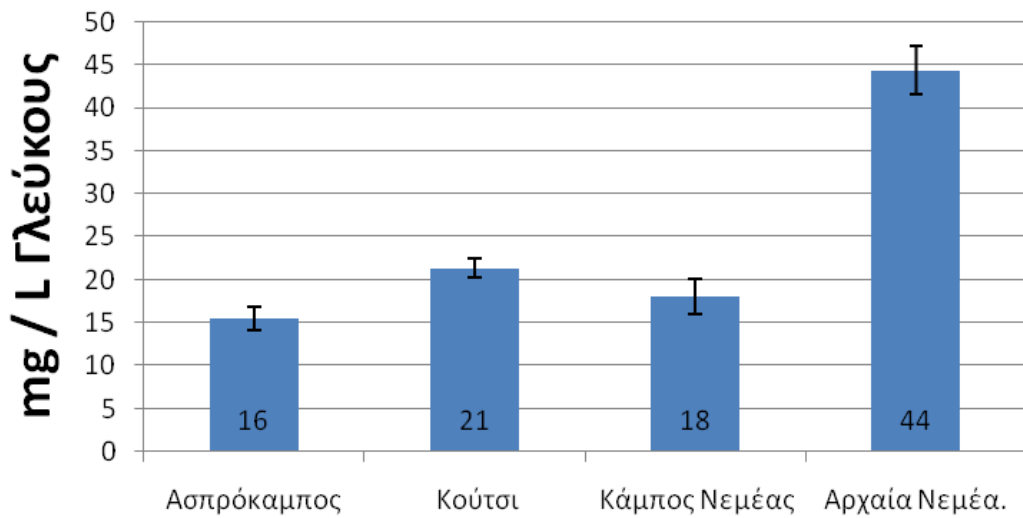
Συγκέντρωση Βαλίνης το 2014

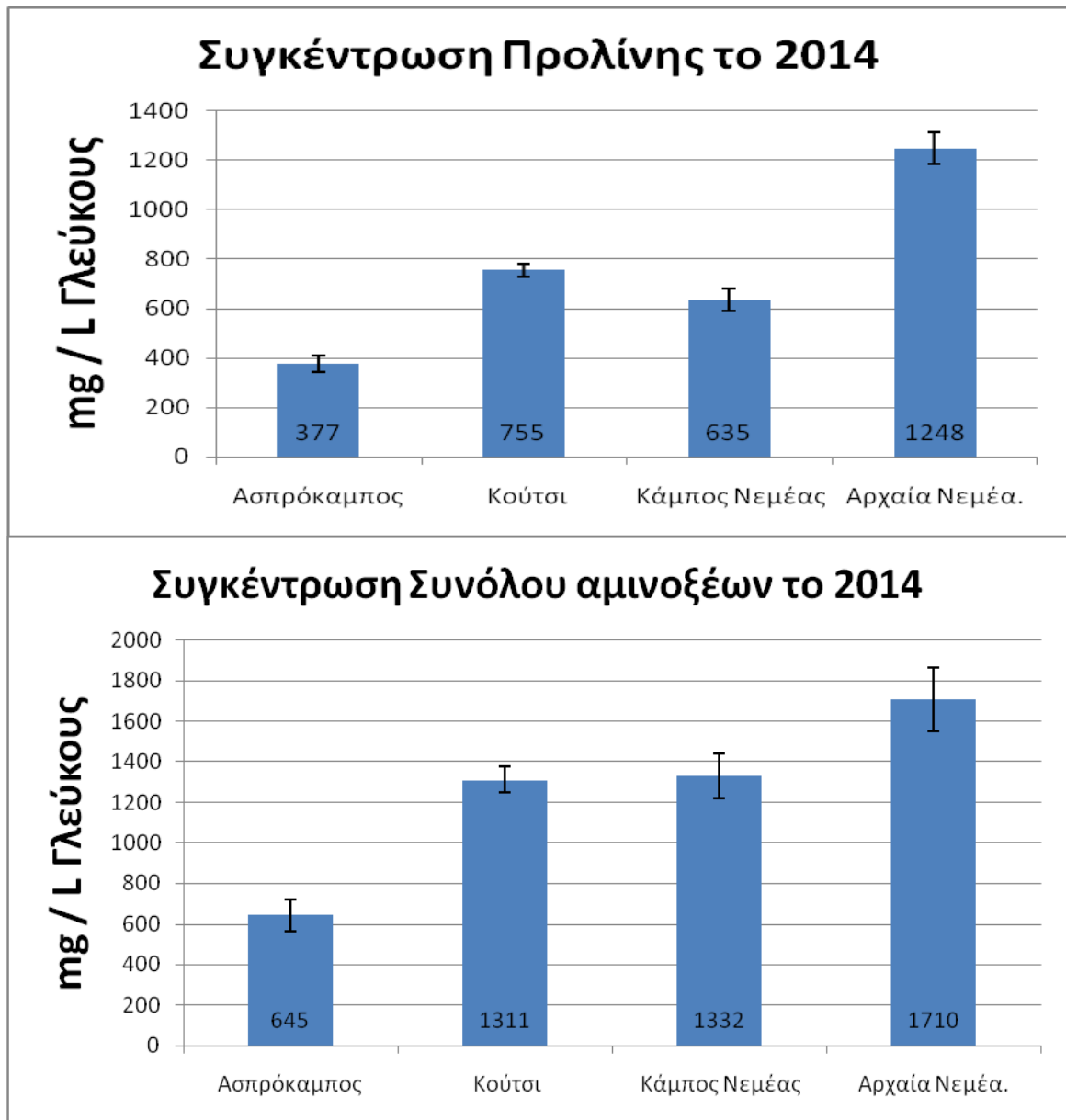


Συγκέντρωση Φενυλαλανίνης το 2014



Συγκέντρωση Λευκίνης το 2014





Διάγραμμα 1.6

Συγκέντρωση των αμινοξέων ser, his, thr, arg, tyr, val, phe, leu, pro και (total-pro)-hyx στο γλεύκος, το 2014 στις υποζώνες Ασπρόκαμπος (1), Κούτσι (2), Κάμπος Νεμαίας (3), Αρχαία Νεμαία (4).

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-3, 1-4 για τη συγκέντρωση της σερίνης, της αργινίνης και του συνόλου (total-pro-hyx). Όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει μικρότερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-3, 1-4, 2-4, 3-4 για τη συγκέντρωση της ιστιδίνης και της προλίνης. Όπου η υποζώνη 4 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-4 για τη συγκέντρωση της θρεονίνης.

Στατιστικώς σημαντική διαφορά υπάρχει μεταξύ των υποζωνών 1-4, 2-4, 3-4 για τη συγκέντρωση της τυροσίνης, της βαλίνης, της φενυλαλανίνης και της λευκίνης. Όπου η υποζώνη 4 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση.

3.4 Αποτελέσματα μετρήσεων υπολογισμού αζώτου βασικών αμινοξέων

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για το άζωτο των βασικών αμινοξέων. Έχει υπολογιστεί το YAN για την κάθε χρονολογία 2012, 2013, 2014, χωριστά.

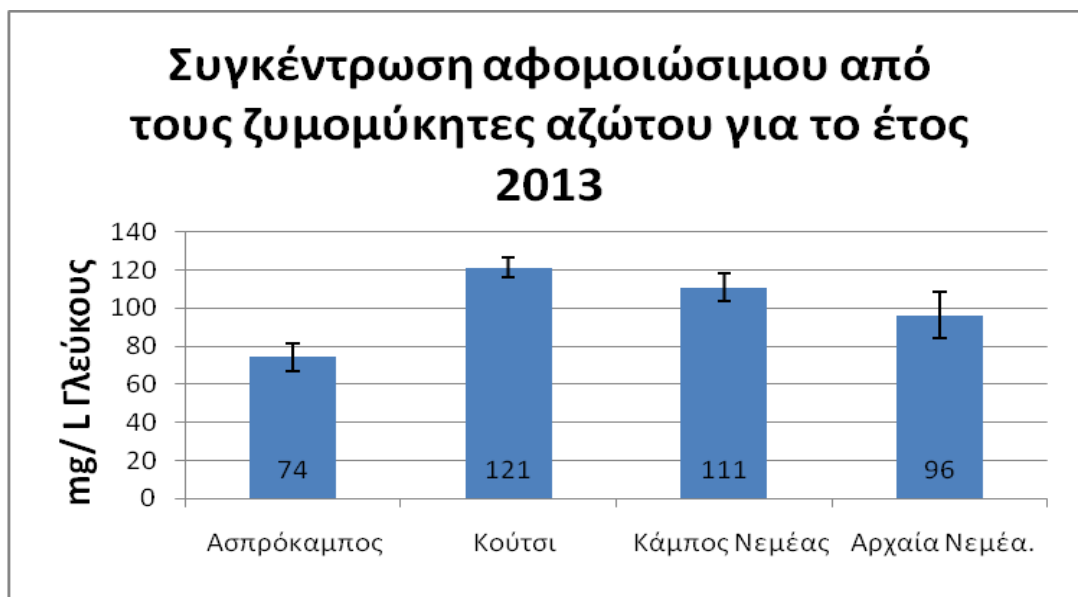
Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της συγκέντρωσης του αζώτου των βασικών αμινοξέων , εφαρμόσθηκε η ανάλυση ANOVA. Count είναι ο αριθμός επαναλήψεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι .



Διάγραμμα 1.7

Συγκέντρωση του συνολικού αφομειώσιμου αζώτου από τους ζυμομύκητες (YAN) για τις υποζώνες Ασπρόκαμπος (1), Κούτσι (2), Κάμπος Νεμαίας (3), Αρχαία Νεμαία (4) για το 2012.

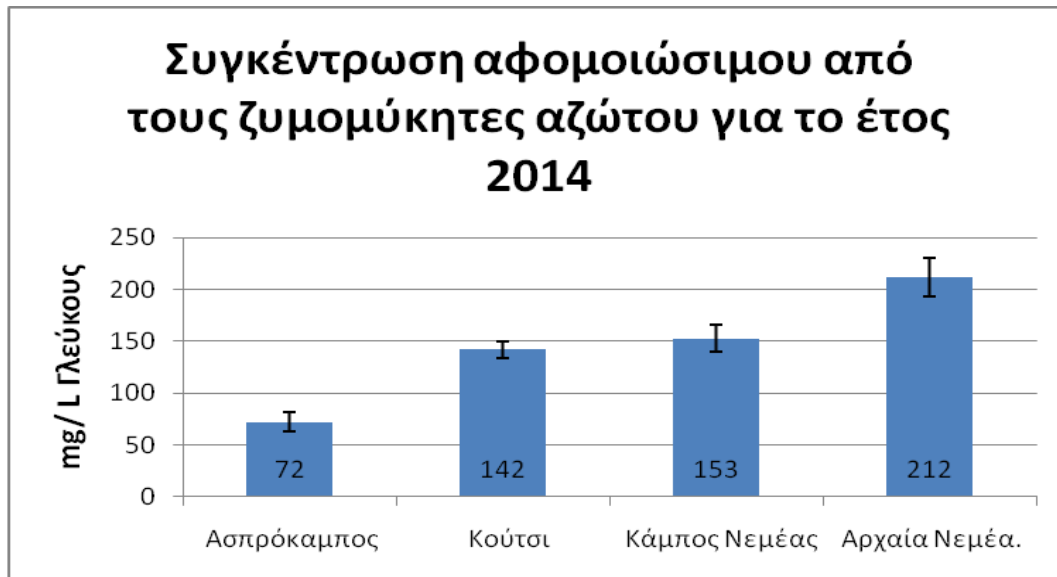
Για το έτος 2012 δεν παρατηρείται διαφορά στο σύνολικό αφομοιώσιμο άζωτο των ζυμονυκήτων στα γλεύκη μεταξύ των υποζωνών.



Διάγραμμα 1.8

Συγκέντρωση του συνολικού αφομειώσιμου αζώτου από τους ζυμομύκητες (YAN) για τις υποζώνες Ασπρόκαμπος (1), Κούτσι (2), Κάμπος Νεμαίας (3), Αρχαία Νεμαία (4) για το 2013.

Για το έτος 2013 παρατηρείται διαφορά στο συνολικό αφομοιώσιμο άζωτο των αμινοξέων στα γλεύκη μεταξύ των υποζωνών 1 – 2. Όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει μικρότερη συγκέντρωση.



Διάγραμμα 1.9

Συγκέντρωση του συνολικού αφομειώσιμου αζώτου από τους ζυμομύκητες (YAN) για τις υποζώνες Ασπρόκαμπος (1), Κούτσι (2), Κάμπος Νεμαίας (3), Αρχαία Νεμαία (4) για το 2014.

Για το έτος 2014 παρατηρείται διαφορά στο συνολικό αφομοιώσιμο άζωτο των αμινοξέων στα γλεύκη μεταξύ των υποζωνών 1 – 2, 1-3, 1-4. Όπου η υποζώνη 1 παρουσιάζει τη μικρότερη συγκέντρωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη τα διαγράμματα στο προηγούμενο κεφάλαιο, μπορούν να εξαχθούν σημαντικά συμπεράσματα για τις υποζώνες Ασπρόκαμπος, Κούτσι, Κάμπος Νεμαίας και Αρχαία Νεμαία όσον αφορά το παραγόμενο γλεύκος, την οينوποίησή του και τον τελικό οίνο ανά υποζώνη.

Εξετάζοντας το αμινοξύ αργινίνη το οποίο βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα γλεύκη και ταυτόχρονα αξιοποιείται περισσότερο από τους ζυμομύκητες, παρατηρείται ότι τα έτη 2012 και 2014 η υποζώνη Αρχαία Νεμέα εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Ακολουθούν η υποζώνη Κούτσι, Κάμπος Νεμέας και τελευταία με τη μικρότερη συγκέντρωση ο Ασπρόκαμπος. Το έτος 2013 τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζει η υποζώνη Κούτσι ακολουθεί ο κάμπος Νεμέας η Αρχαία Νεμέα και τελευταίος ο Ασπρόκαμπος.

Το ίδιο μοτίβο με την αργινίνη παρατηρείται και για το σύνολο των αμινοξέων. Για όλες τις χρονολογίες και τις περιοχές η συγκέντρωση του συνόλου των αμινοξέων είναι πολύ μεγαλύτερο από 756mg/l το οποίο αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως μέγιστη συγκέντρωση των αμινοξέων για τις ερυθρές ελληνικές ποικιλίες. Εξαίρεση εμφανίζεται το έτος 2012 και 2014 στην υποζώνη Ασπρόκαμπο όπου η συγκέντρωση είναι χαμηλότερη αλλά μεγαλύτερη από το μέσο όρο.

Εξετάζοντας τα αμινοξέα σερίνη, αλανίνη, βαλίνη, τριπτοφάνη, λευκίνη, φενυλαλανίνη και τυροσίνη, τα οποία συνδέονται με μεταβολίτες αρωματικών συστατικών παρατηρείται ότι η υποζώνη Αρχαία Νεμέα εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση σε όλα τα έτη. Ακολουθούν οι υποζώνες Κούτσι και Κάμπος Νεμέας με μικρή διαφορά μεταξύ τους. Η μικρότερη συγκέντρωση εμφανίζεται στην υποζώνη Ασπρόκαμπος. Η μόνη απόκλιση παρουσιάζεται το έτος 2013 για τη σερίνη και την αλανίνη όπου η υψηλότερη συγκέντρωση εμφανίζεται στην υποζώνη Κούτσι, ενώ η χαμηλότερη εξακολουθεί να εμφανίζεται στον Ασπρόκαμπο.

Ακολουθώς εξετάζουμε το αφομοιώσιμο από τους ζυμομύκητες άζωτο. Παρατηρούμε ότι για τα έτη 2013 και 2014 τη μικρότερη συγκέντρωση εμφανίζει η υποζώνη Ασπρόκαμπος όπως και στα προηγούμενα, ενώ για τις υπόλοιπες υποζώνες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Για το έτος 2012 δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των υποζωνών.

Τέλος ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το αμμωνιακό άζωτο που μετρήθηκε στους οίνους σε όλες τις ζώνες και όλες τις χρονολογίες παρουσίασε μηδενική συγκέντρωση.

Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η υποζώνη Αρχαία Νεμέα εμφανίζει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε αμινοξέα αλλά και σε αφομοιώσιμο άζωτο. Αυτό

μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι βρίσκεται σε χαμηλότερο σε σχέση με τις άλλες υποζώνες υψόμετρο χωρίς μεγάλη κλίση εδάφους, κάτι το οποίο ωφελεί την καλή και ομαλή ανάπτυξη της αμπέλου αλλά και ωρίμανση του φορτίου. Για το λόγο αυτό τα γλεύκη που προέρχονται από αυτή την υποζώνη δεν χρειάζεται να εμπλουτίζονται με εξωγενείς τροφές για τους ζυμομύκητες. Επιπλέον οι μεταβολίτες των υπάρχοντων αμινοξέων θα εμπλουτίσουν το αρωματικό δυναμικό του οίνου.

Αντιθέτως η υποζώνη Ασπρόκαμπος, εμφανίζει τη χαμηλότερη συγκέντρωση σε αμινοξέα αλλά και σε αφομοιώσιμο άζωτο. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο μεγάλο υψόμετρο που βρίσκεται η υποζώνη αυτή, με την υψηλή ηλιακή ακτινοβολία και τις μεγάλες θερμοκρασιακές διακυμάνσεις ημέρας και νύκτας. Επομένως τα γλεύκη που προέρχονται από την υποζώνη αυτή θα πρέπει να εμπλουτίζονται με τροφές για τους ζυμομύκητες ανάλογα βέβαια τη χρονιά, καθώς όπως φάνηκε, παρ' ότι εμφανίζουν τη χαμηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τις υπόλοιπες υποζώνες, η συγκέντρωσή τους είναι μεγαλύτερη από τη μέση συγκέντρωση των ερυθρών ελληνικών ποικιλιών, αλλά και τις ελάχιστης συγκέντρωσης που πρέπει να υπάρχει σε ένα γλεύκος για να εξελιχθεί ομαλά η ζύμωση του.

Η έρευνα πρέπει να συνεχιστεί για την εξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) σταυρακακης 2010
- 2)Κουράκου, (2000), ΝΕΜΕΑ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΟΙΝΟΠΕΔΙΟ, Αθήνα: Φοίνικα
- 3)Κανονισμός (ΕΚ) 1234/2007 Άρθρο 118 γ, Παρ/φος 2
- 4)Κουράκου, 1991
- 5) Σουφλερός 2000
- 6) Henschke, P. A., and V. Jiranek. "Yeasts-metabolism of nitrogen compounds." *Wine microbiology and biotechnology* (1993): 77-164.
- 7) Amino Acid and Ammonium Utilization by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts From a Chemically Defined Medium
V. Jiranek, P. Langridge and P. A. Henschke
- 8) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine
SALLY-JEAN BELL* and PAUL A. HENSCHKE
- 9) Begona Rodriguez – Lovelle and Jean - Pierre Gaudillere. Carbon and nitrogen partitioning in either fruiting or non-fruiting grapevines: effects of nitrogen limitation before and after veraison.
- 10)Agenbach, W. A. "A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity." *Proceedings of the South African Society for enology and viticulture. South African Society of Enology and Viticulture: Stellenbosch, South Africa, 1977.*
- 11)Vos, P. J. A., and R. S. Gray. "The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must." *American Journal of Enology and Viticulture* 30.3 (1979): 187-197.
- 12)Bouloumpasi, E., et al. "Primary amino acid composition and its use in discrimination of Greek red wines with regard to variety and cultivation region." *VITIS-Journal of Grapevine Research* 41.4 (2015): 195.
- 13)Henschke, P. A., and V. Jiranek. "Yeasts-metabolism of nitrogen compounds." *Wine microbiology and biotechnology* (1993): 77-164.
- 14)Bely, Marina, Jean-Marie Sablayrolles, and Pierre Barre. "Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70.4 (1990): 246-252.
- 15)Sablayrolles, Jean-Marie, et al. "Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations." *Journal of fermentation and bioengineering* 82.4 (1996): 377-381.
- 16)Munoz, E., and W. M. Ingledew. "Yeast hulls in wine fermentations—a review." *Journal of Wine Research* 1.3 (1990): 197-209.
- 17)Conradie, W. J. "Timing of nitrogen fertilisation and the effect of poultry manure on the performance of grapevines on sandy soil. II. Leaf analysis, juice analysis and wine quality." *South African Journal for Enology and Viticulture* 22.2 (2001): 60-68.
- 18)Rodriguez, Lovelle, Begona and Jean Pierre Gaudillere. "Carbon and nitrogen partitioning in either fruiting or non-fruiting grapevines: effects of nitrogen limitation before and after veraison." *Australian journal of grape and wine research* 8.2 (2002): 86-94.
- 19)Spayd, S. E., et al. "Nitrogen fertilization of white Riesling grapes in Washington. Must and wine composition." *American Journal of Enology and Viticulture* 45.1 (1994): 34-42.

- 20)Jiranek, V., P. Langridge, and P. A. Henschke. "Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen." *Applied and environmental microbiology* 61.2 (1995): 461-467.
- 21)Jiranek, V., P. Langridge, and P. A. Henschke. "Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium." *American Journal of Enology and Viticulture* 46.1 (1995): 75-83.
- 22)Henschke, P. A., and C. S. Ough. "Urea accumulation in fermenting grape juice." *American journal of enology and viticulture* 42.4 (1991): 317-321.
- 23)Monteiro, Francisco F., and Linda F. Bisson. "Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations." *American journal of enology and viticulture* 42.3 (1991): 199-208.
- 24)Duteurtre, Bruno, Claude Bourgeois, and Bernard Chollot. "Study of the assimilation of proline by brewing yeasts." *Journal of the Institute of Brewing* 77.1 (1971): 28-35.
- 25)Dittrich, H. H., W. R. Sponholz, and H. G. Gößrü. "Vergleidiende Untersudiungen von Mosten und Weinen aus gesunden und aus *Botrytis*-infizierten Traubenbeeren." *Vitis* 13.33 (1975): 6-347.
- 26)Grenson, M., C. Hou, and M. Crabeel. "Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae* IV. Evidence for a general amino acid permease." *Journal of Bacteriology* 103.3 (1970): 770-777.
- 27)Huang, Z., and C. S. Ough. "Amino acid profiles of commercial grape juices and wines." *American Journal of Enology and Viticulture* 42.3 (1991): 261-267.
- 28)Lilly, M., M. G. Lambrechts, and I. S. Pretorius. "Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates." *Applied and environmental microbiology* 66.2 (2000): 744-753.
- 29)Fleet, Graham H. "Yeast interactions and wine flavour." *International journal of food microbiology* 86.1 (2003): 11-22.
- 30)Smyth, Gordon K. "Limma: linear models for microarray data." *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. Springer New York, 2005. 397-420.
- 31)Versini, Giuseppe, et al. "Structural identification and presence of some p-menth-1-enediols in grape products." *Vitis* 30.3 (1991): 143-149.
- 32)Henschke, Paul A., and Vladimir Jiranek. "Hydrogen sulfide formation during fermentation: effect of nitrogen composition in model grape must." *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine: Seattle, Washington, Usa 18-19 june 1991*. American Society for Enology and Viticulture, ASEV, 1991.
- 33)Vilanova, M., et al. "Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts." *Applied Microbiology and Biotechnology* 77.1 (2007): 145-157.
- 34)Spiropoulos, Apostolos, et al. "Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*." *American Journal of Enology and Viticulture* 51.3 (2000): 233-248.
- 35)Swiegers, J. H., and I. S. Pretorius. "Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast." *Applied Microbiology and Biotechnology* 74.5 (2007): 954-960.
- 36)Henschke, Paul A., and Vladimir Jiranek. "Hydrogen sulfide formation during fermentation: effect of nitrogen composition in model grape must." *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine: Seattle, Washington, Usa 18-19 june 1991*. American Society for Enology and Viticulture, ASEV, 1991.

- 37) BELL, SALLY-JEAN, and Paul A. Henschke. "Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine" *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11.3 (2005): 242-295.
- 38) Lee, Jungmin, et al. "Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and-3) on the fruit composition of Oregon Vitis vinifera L. cv. Pinot noir: Free amino acids, sugars, and organic acids." *Food Chemistry* 117.1 (2009): 99-105.
- 39) Vilanova, M., et al. "Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts." *Applied Microbiology and Biotechnology* 77.1 (2007): 145-157.
- 40) Jiranek, V., P. Langridge, and P. A. Henschke. "Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen." *Applied and environmental microbiology* 61.2 (1995): 461-467.
- 41) Mendes-Ferreira, A., A. Mendes-Faia, and C. Leao. "Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts." *Journal of Food Protection* 65.6 (2002): 1033-1037.
- 42) Thomas, M. R., and N. S. Scott. "Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs)." *Theoretical and Applied Genetics* 86.8 (1993): 985-990.
- 43) Swiegers, J. H., et al. "Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour." *Australian Journal of grape and wine research* 11.2 (2005): 139.
- 44) Dubois, Evelyne, and Marcelle Grenson. "Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation." *Molecular and General Genetics* 175.1 (1979): 67-76.
- 45) Monteiro, F. Ferreira, and Linda F. Bisson. "Nitrogen supplementation of grape juice. I. Effect on amino acid utilization during fermentation." *American Journal of Enology and Viticulture* 43.1 (1992): 1-10.
- 46) Mishra, Prashant, and Rajendra Prasad. "Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*." *Applied microbiology and biotechnology* 30.3 (1989): 294-298.
- 47) Horák, J., A. Kotyk, and L. Říhová. "Specificity of trans-inhibition of amino acid transport in Baker's yeast." *Folia microbiologica* 22.5 (1977): 360-362.
- 48) Castor, J. G. B., and T. E. Archer. "The free amino acids of musts and wines. III. Effect of added ammonia and of fermentation temperature on the fate of amino acids during fermentation." *Journal of Food Science* 24.2 (1959): 167-175.
- 49) Pekur, G. N., N. I. Bur'yan, and N. M. Pavlenko. "Characteristics of nitrogen metabolism in wine yeasts under different fermentation conditions [*Saccharomyces cerevisiae*]." *Applied Biochemistry and Microbiology* (1981).
- 50) Knatchbull, Fiona B., and J. Colin Slaughter. "The effect of low CO₂ pressures on the absorption of amino acids and production of flavor - active volatiles by yeast" *Journal of the Institute of Brewing* 93.5 (1987): 420-424.
- 51) Monteiro, F.F.; Bisson, L.F. (1991) Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 42: 47-57.

52) Dukes, BC and Butzke, CE (1998) Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an *o*-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay Am. J. Enol. Vitic. 49:125-134

53)Πηγή: <http://www.sepscience.com/Techniques/LC/Articles/159-/Things-to-Consider-When-Selecting-HPLC-System-Tubing>

54)Πηγή: <http://www.sestosensosapori.it/en/produzione/>

55)Πηγή: <http://www.antemisaris.gr/product.aspx?iid=11515>