ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Δ.Π.Μ.Σ «ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ-ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΜΕΛΕΤΗ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΚΑΙ ΟΙΝΩΝ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΜΟΥΧΤΑΡΟ»

ΔΡΟΣΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ

Αθήνα, 2017

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΚΑΙ ΟΙΝΩΝ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΜΟΥΧΤΑΡΟ

ΔΡΟΣΟΥ Δ. ΚΑΛΛΙΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κοτσερίδης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οινολογίας, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Καλλίθρακα Σταματίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Οινολογίας, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ταραντίλης Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οινολογίας του τμήματος «Επιστήμης Τροφίμων και διατροφής του ανθρώπου» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Οινολογίας-Αμπελουργίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον επιβλέποντα Αναπληρωτή καθηγητή και Διευθυντή του εργαστηρίου, κο. Γεώργιο Κοτσερίδη για την αρωγή και την συμπαράστασή του. Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποτίω επίσης στην υπεύθυνη του εργαστηρίου κα. Νίκη Προξενιά για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά της, καθώς επίσης και στον διδακτορικό Γιάννη Βουκίδη για την διαρκή καθοδήγηση.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τα εργαστήρια Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων, Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων καθώς επίσης και το Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής για την πολύτιμη συμβολή στην εκπόνηση του πειράματος.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους παραγωγούς της Κοιλάδας των Μουσών που μου εμπιστεύτηκαν την πρώτη ύλη τους για την μελέτη.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους γονείς μου, Σταυρούλα και Διονύση για την διαρκή στήριξη, κατανόηση και βοήθεια που πάντα μου παρέχουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....

ABSTRACT.....

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ποικιλία Μούχταρο.....

1.2 Άρωμα οίνων.....

1.2.1 Πτητικές ενώσεις.....

1.2.2 Πρόδρομες ενώσεις αρώματος.....

1.3 Μέθοδοι προσέγγισης απομόνωσης και ταυτοποίησης πρόδρομων ενώσεων αρώματος.....

1.3.1 Αέρια Χρωματογραφία (GC-FID SPME).....

1.3.2 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS)...

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σκοπός του πειράματος.....

2.2 Πειραματική Πορεία.....

2.2.1 Επίδραση στελέχους ζυμομύκητα στα χημικά χαρακτηριστικά των οίνων.....

2.2.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση πτητικών ενώσεων και ενώσεων αρώματος.....

2.3 Αναλύσεις.....

2.3.1 Έλεγχος αλκοολικής ζύμωσης.....
2.3.2 Βασικές αναλύσεις.....
2.3.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....
2.3.4 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων- μέθοδος DNS.....
2.3.5 Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-liquid extraction).....
2.4 Αέρια Χρωματογραφία (GC-FID SPME).....
2.5 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS).....

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ
3.1 Επίδραση στελέχους ζυμομύκητα.....
3.1.1 Έλεγχος αλκοολικής ζύμωσης.....
3.1.2 Βασικές αναλύσεις.....
3.1.2.1 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων (Μέθοδος Lüff).....
3.1.2.2 Προσδιορισμός ολικής οξύτητας.....
3.1.2.3 Προσδιορισμός ενεργούς οξύτητας.....
3.1.2.4 Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας.....
3.1.2.5 Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου.....
3.1.3 Εκτίμηση αρωματικού χαρακτήρα οίνων.....
3.1.3.1 Σύγκριση αρωματικού προφίλ οίνων με GC-FID SPME.....
3.1.3.2 Σύγκριση αρωματικού προφίλ οίνων με GC-MS.....
3.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση πτητικών ενώσεων και ενώσεων αρώματος.....
3.2.1 Ποιοτικός προσδιορισμός πτητικών ενώσεων με GC-MS.....

3.2.2 Ημιποσοτικός προσδιορισμός ενώσεων αρώματος με GC-MS.....

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η ερυθρή γηγενής ποικιλία Μούχταρο. Στο πρώτο σκέλος του πειράματος πραγματοποιήθηκε σύγκριση των χημικών χαρακτηριστικών των οίνων που προέκυψαν κατόπιν κλασσικής ερυθρής οινοποίησης με δυο διαφορετικά στελέχη ζυμών και μιας αυθόρμητης ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε με αυτόχθονες ζύμες, χωρίς εξωγενή προσθήκη. Την αλκοολική ζύμωση ακολούθησε και η μηλογαλακτική κατόπιν εμβολιασμού με γαλακτικά βακτήρια. Ακολούθησαν οι κλασσικές αναλύσεις. Τέλος, οι τρεις οίνοι συγκρίθηκαν και με βάση το αρωματικό προφίλ τους μετά από ποσοτικό και ημιποσοστικό προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων του αρώματός τους που πραγματοποιήθηκαν με τις τεχνικές GC-FID και GC-MS αντίστοιχα.

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης έγινε προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης πρόδρομων μορίων που συμμετέχουν στο πρωτογενές άρωμα της ποικιλίας Μούχταρο. Γλεύκος εκχυλίστηκε αρχικά με νερό και αιθανόλη και στην συνέχεια κατεργάστηκε με τρεις διαφορετικούς διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας. Τα κλάσματα ύστερα από εξάτμιση σχεδόν μέχρι ξηρού προστέθηκαν σε πρότυπο γλεύκος και ακολούθησε ζύμωση με το εμπορικό στέλεχος UCLM 325. Παράλληλα δημιουργήθηκε και ένας μάρτυρας (control), όπου πραγματοποιήθηκε ζύμωση με το ίδιο στέλεχος. Ο μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση αποτελεσμάτων και για έλεγχο δημιουργίας artifacts. Την κλασματοποίηση ακολούθησε υγρή-υργή εκχύλιση και για τα τρία κλάσματα των διαλυτών και τέλος ημιποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων με GC-MS.

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων ως προς το πρώτο σκέλος του πειράματος προέκυψε ότι και οι δύο εμπορικές ζύμες αλλά και η αυθόρμητη ζύμωση απέδωσαν κυρίως έναν φρουτώδη χαρακτήρα στους οίνους, ακολουθούμενο από ανθικά αρώματα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τα χημικά τους χαρακτηριστικά.

Στο δεύτερο σκέλος του πειράματος τα αποτελέσματα του ημιποσοτικού προσδιορισμού κατέδειξαν ορισμένα σημαντικά ευρήματα, όπως ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με πιθανή προέλευση πρόδρομα μόρια προερχόμενα από το σταφύλι, φαίνεται όμως πως τα στοιχεία δεν επαρκούν ώστε να χαρακτηριστεί η συγκεκριμένη ποικιλία ως αρωματική ή μη. Περαιτέρω μελέτη καθώς και βελτίωση της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε είναι απαραίτητες ώστε να μπορέσουν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Λέξεις-κλειδιά: Μούχταρο, GC-FID, GC-MS, πρόδρομες ενώσεις, πρωτογενές άρωμα, αυθόρμητη ζύμωση

ABSTRACT

The current thesis is a research about the red indigenous grape variety of Mouhtaro. In the first part of the experiment we compared the chemical characteristics of three wines from this grape variety, two of them inoculated with two different commercial strains of yeasts and the third one was the result of a spontaneous fermentation with indigenous yeasts, without any inoculation. In every sample a classical red vinification was held, followed by a malolactic fermentation, after inoculation with commercial strains of lactic acid bacteria. When malolactic fermentation was completed, the classical analysis were held in every wine sample. The aroma profile of the three wines was also compared through a quantitative and semi-quantitative determination that performed with the GC-FID and GC-MS analytical techniques.

In the second part of the experiment there was an effort for isolation and identification of the aroma precursors that are present in the Mouhtaro grape and constitute its varietal aroma profile. Grape must extracted initially with water and methanol and then treated furthermore with three different solvents of increasing polarity. The fractions that occurred after evaporation were added to a model must that was inoculated with the commercial strain UCLM 325. At the same time a control was created where the fermentation also took place with the same commercial yeast. This control was used to compare the results and for the control of artifacts creation. The fractionation was followed by a liquid-liquid chromatography for every sample of the solvents and in the end the results underwent semi-quantitative determination through GC-MS analysis.

The results, as they occurred for the first part of the experiment, showed that both the commercial strains and the spontaneous fermentation attributed the same fruity character with floral notes to every wine sample, while no important difference was obtained in the chemical characteristics between the samples.

In the second part, the results of the semi-quantitative assay showed some important evidences, such as compounds identified by possible origin precursors derived from grapes, but it seems that the elements are not sufficient to characterize the particular variety as aromatic or not. Further study and improvement of the method are necessary to be able to draw reliable conclusions.

Key-words: Mouhtaro, GC-FID, GC-MS, aroma precursors, varietal aroma, spontaneous fermentation

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ποικιλία Μούχταρο

Σπάνια ερυθρή γηγενής ποικιλία με αναφορές στον Ησίοδο. Φημολογείται ότι ήταν η πρώτη ύλη για τον Βίβλινο Οίνο της αρχαιότητας. Απαντάται στην Κεντρική Ελλάδα ενώ σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία η καλλιέργειά της επιτρέπεται στις νομαρχιακές αυτοδιοικήσεις Βοιωτίας και Φωκίδας (*http://www.newwinesofgreece.com*). Στις μέρες μας κύριο κέντρο καλλιέργειάς της όπου και οινοποιείται αποτελεί η Κοιλάδα των 9 Μουσών στους πρόποδες του Ελικώνα, στην περιοχή της Βοιωτίας. Συμμετέχει στον Τοπικό Οίνο «Θήβας».

Ορισμένα από τα συνώνυμά της είναι: Μουχτούρι, μοχτάρι, μαύρο αραχωβίτικο, μουχτάρμα, μούχτουρο.

Αμπελογραφικά χαρακτηριστικά:

- **Σταφυλή** μεσαίου μεγεθους, απλή και καμιά φορά διπλή, κωνική έως και πτερυγωτή, πυκνή προς έντονα πυκνή.
- **Ράγα** μέσου μεγέθους, σφαιρική ή δισκοειδής, κυανοϊώδης, καλυμμένη με κηρώδες επάνθισμα, επιδερμίδα λεπτή, στυφή· σάρκα μαλακή, χυμώδης, μικρής γλυκύτητας

Ιδιότητες:

- **Πρέμνο** ζωηρό, μετρίως παραγωγικό που διαμορφώνεται σε κυπελλοειδές και γραμμοειδές Royat και δέχεται κλάδεμα καρποφορίας βραχύ.
- **Τεχνολογική ωριμότητα** γύρω στο τρίτο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου (*Αμπελογραφία, Δημ. Ευστ. Σταύρακας, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, 2010*).

Φωτο.1:Μούχταρο, Κοιλάδα Μουσών, Βοιωτία

1.2 Άρωμα οίνων

Στους οίνους υπάρχουν δύο κατηγορίες αρωματικών ενώσεων. Εκείνες που συνιστούν το «άρωμα» στους νέους οίνους και εκείνες που συνιστούν το «μπουκέτο» (*bouquet*) στους παλαιωμένους (*Σουφλερός, 2009*).

Πιο συγκεκριμένα, αναφερόμαστε στο *πρωτογενές ή ποικιλιακό* άρωμα, το οποίο οφείλεται σε χημικές ενώσεις που προέρχονται από το σταφύλι και αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό για κάθε ποικιλία, στο *δευτερογενές* άρωμα, το οποίο οφείλεται σε ενώσεις που σχηματίζονται κατά την ζύμωση από την δράση ζυμών και βακτηρίων και τέλος στο *τριτογενές* άρωμα, το οποίο αναπτύσσεται κατά την παλαίωση των οίνων. Οι δύο πρώτες κατηγορίες συνιστούν το άρωμα των νέων οίνων, ενώ η ανάπτυξη του «μπουκέτου» (ή «ανθοσμίας») προκύπτει από τον μετασχηματισμό των συστατικών του αρώματος των νέων οίνων.

Το άρωμα των οίνων συνιστάται από αρκετές εκατοντάδες πτητικών ενώσεων, σε συγκεντρώσεις που μπορεί να ποικίλουν από μερικά mg/l έως λίγα ng/l, ή ακόμη λιγότερο *(Handbook of Oenology, Volume 2, 2006).* Για τον λόγο αυτό η μελέτη τους με αναλυτικές μεθόδους παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες.

Η οσμή είναι μια βιολογική και ηλεκτροφυσιολογική διεργασία που μετατρέπει την μοριακή πληροφορία ενός αρώματος σε αντιληπτική αντίδραση (*Hasin-Brumshtein, 2009*). Το ανθρώπινο οσφρητικό επιθήλιο φιλοξενεί εκατομμύρια οσφρητικών αισθητήριων νεύρων που εφάπτονται στους οσφρητικούς υποδοχείς, καθένας από τους οποίους είναι ικανός να ανιχνεύσει πολλαπλές ενώσεις με κοινές λειτουργικές ομάδες. Ταυτόχρονα πολλαπλοί διαφορετικοί υποδοχείς μπορούν να αναγνωρίσουν την ίδια αρωματική ένωση αν πολλές λειτουργικές ομάδες είναι παρούσες (*Hasin-Brumshtein, 2009).* Σήμερα, 347 εν δυνάμει λειτουργικά γονίδια οσφρητικών υποδοχέων έχουν αναγνωρισθεί επιτρέποντας στον άνθρωπο να αναγνωρίσει χιλιάδες αρωματικές ενώσεις που βρίσκονται στην φύση.

Το άρωμα του οίνου έχει ως προέλευση πολλαπλές πηγές και διεργασίες μεταξύ των οποίων:

• Απευθείας συμβολή των αρωματικών ενώσεων του σταφυλιού, μεταξύ των οποίων μονοτερπένια, μη ισοπρενοειδή, αλοιφατικές ενώσεις, μεθοξυπυραζίνες και πτητικές θειούχες ενώσεις (*Gonzalez-Barreiro 2013)*

• Δευτερογενείς μεταβολίτες μετά από μικροβιακή επίδραση που σχηματίζονται από το μεταβολισμό των σακχάρων, των λιπαρών οξέων, οργανικών αζωτούχων ενώσεων (πυριμιδίνες, πρωτείνες και νουκλεϊκά οξέα) και κινναμωνικών οξέων που βρίσκονται στο σταφύλι

• Η συμβολή των αρωμάτων με προέλευση το ξύλο βελανιδιάς που εκχυλίζονται κατά τη ζύμωση και παλαίωση του οίνου και που ποικίλουν ανάλογα με την προέλευση , ωρίμαση και καύση του ξύλου *(Garde-Cerdan 2010)*

• Χημικές μεταβολές που σχετίζονται με οξέα και ενζυματική κατάλυση μη αρωματικών και αρωματικών συστατικών του σταφυλιού

• Χημικές μετατροπές που σχετίζονται με οξειδωτικές διεργασίες στο κρασί οι οποίες σχετίζονται με την παρουσία οξυγόνου κατά τις οινολογικές πρακτικές, την αποθήκευση και τέλος το υλικό συσκευασίας.

Τα πτητικά που έχουν ανιχνευτεί στο κρασί, αριθμούν σε μόρια περισσότερα από 600. Συνεπώς η δυσκολία κατά την περιγραφή του αρώματος ενός οίνου έγκειται στο ότι δεν οφείλεται σε ένα μόνο στοιχείο αλλά σε πληθώρα χημικών ενώσεων και στην αλληλεπίδραση αυτών.

Ορισμένα από τα αρώματα που ανιχνεύονται στους οίνους είναι ενδεικτικά:
• Αρώματα λουλουδιών
• Αρώματα φρούτων
• Αρώματα ξηρών φρούτων και καρπών
• Αρώματα χόρτων
• Αρώματα μπαχαρικών κ.ά.

Όσον αφορά στην ποιότητα του αρώματος, ο οίνος μπορεί να χαρακτηρισθεί αρωματικός ή ότι έχει λεπτό άρωμα, κομψό, κοινό, ελαττωματικό κ.λ.π.

Αναμφισβήτητα, το μεγαλύτερο ποσοστό των αρωματικών ενώσεων που βρίσκονται στους οίνους παράγεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και αποτελείται κυρίως από αλκοόλες, αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων, οξικούς εστέρες αλκοολών, αλειφατικά οξέα και καρβονυλικές ενώσεις *(RAPP και MANDERY 1986).*

1.2.1 Πτητικές ενώσεις

Τις σημαντικότερες κατηγορίες πτητικών ενώσεων που απαντώνται στο γλεύκος και στον οίνο αποτελούν οι: αλκοόλες, εστέρες, λιπαρά οξέα, καρβονυλικές ενώσεις, θειούχες ενώσεις, τερπένια και μεθοξυπυραζίνες.

ΑΛΚΟΟΛΕΣ

Οι σημαντικότερες αλκοόλες που περιέχονται σε όλους ανεξαιρέτως τους οίνους είναι η μεθανόλη, η οποία προέρχεται από την υδρόλυση των πηκτινών του σταφυλιού και η αιθανόλη, η οποία αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος του όγκου του οίνου μετά το νερό και είναι το κύριο προϊόν μεταβολισμού των σακχάρων από τις ζύμες.

Οι ανώτερες αλκοόλες είναι δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης με εξαίρεση την 1-εξανόλη, η οποία δεν προέρχεται από την ζύμωση αλλά από το σταφύλι και δίνει στους οίνους χορτώδη οσμή και γεύση. Οι ανώτερες αλκοόλες προέρχονται από τα κετονοξέα, τα οποια πάλι σχηματίζονται με μηχανισμούς διαφορετικούς τόσο από τα ζάχαρα όσο και από τα αμινοξέα. Η προπανόλη φαίνεται να μην ασκεί μεγάλη επίδραση στο άρωμα των οίνων, γιατί έχει ουδέτερη οσμή.

Οι αμυλικές αλκοόλες επίσης φαίνεται να μην έχουν ευνοϊκή επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων.

Η φαινυλο-2-αιθανόλη έχει ευχάριστη οσμή τριαντάφυλλου.

Άλλες ανώτερες αλκοόλες: βουτανόλη-1, ισοαμυλική βουτανόλη, πεντανόλη-1 κλπ *(Σουφλερός, 2009).*

Στις πολυόλες ανήκουν η γλυκερόλη, η οποία είναι δευτερογενές προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης, έχει γλυκειά γεύση και η παρουσία της καθιστά τους οίνους πιο «μυελλώδεις», η 2,3-βουτανεδιόλη, η μαννιτόλη, η σορβιτόλη, η ινοσιτόλη και η τυροσόλη.

ΕΣΤΕΡΕΣ

Οι εστέρες σχηματίζονται κατά την αντίδραση των ελεύθερων οργανικών οξέων του οίνου με την αιθανόλη. Οι εστέρες των οίνων σχηματίζονται τόσο διά της χημικής οδού-κατά την παλαίωση αυτών-όσο και διά της ενζυματικής οδού, κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ το τεχνολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οφείλεται στους οργανοληπτικούς χαρακτήρες αυτών. Οι εστέρες με μεγαλύτερο μοριακό βάρος έχουν αρώματα λουλουδιών ή φρούτων, ενώ ο προπιονικός αιθυλεστέρας δεν φαίνεται να παίζει κάποιον ιδιαίτερο ρόλο στην διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων των οίνων. Αντίθετα οι οξικοί εστέρες του 2-μεθυλοπροπυλίου, του 3-μεθυλοβουτυλίου, του 2-φαινυλοαιθυλίου και οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα

αποτελούν σπουδαία συστατικά του αρώματος και του μπουκέτου των οίνων *(Σουφλερός, 2009).*

Σημαντικότερος όλων θεωρείται ο οξικός αιθυλεστέρας ο οποίος αντιπροσωπεύει από μόνος του συχνά έως και το 80% του συνόλου των πτητικών εστέρων.

Η παρουσία του οξικού αιθυλεστέρα στους οίνους οφείλεται τόσο στην εστεροποίηση του οξικού οξέος και της αιθυλικής αλκοόλης, που πραγματοποιείται κατά την διάρκεια της παλαίωσης αυτών δια της χημικής οδού, όσο και στην σύνθεση αυτού από τους μικροοργανισμούς κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Το τεχνολογικό ενδιαφέρον του οξικού αιθυλεστέρα βρίσκεται στο γεγονός ότι το συστατικό αυτό είναι υπεύθυνο για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων που έχουν προσβληθεί από οξικά βακτήρια και όχι το οξικό οξύ, όπως πιστευόταν παλιότερα *(Σουφλερός, 2009).*

Οι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων, κυρίως ο καπροϊκός και ο καπρυλικός, παράγονται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Οι εστέρες αυτοί έχουν ευχάριστη λιπαρή οσμή και οσμή μελιού, συνεισφέροντας ιδιαίτερα στο άρωμα λευκών οίνων.

Οι οξικοί εστέρες ανώτερων αλκοολών (isoamyl acetate, phenylethyl acetate), συμπεριλαμβάνονται επίσης ανάμεσα στους εστέρες ζύμωσης. Έχουν ιδιαίτερα έντονη οσμή -μπανάνας και μήλου- συνεισφέροντας έτσι στην αρωματική πολυπλοκότητα ουδέτερων οίνων, όμως είναι πιθανό να καλύψουν το ποικιλιακό άρωμα. Ο σχηματισμός των εστέρων αυτών προωθείται κυρίως όταν η ζύμωση είναι αργή, λόγω απουσίας οξυγόνου και χαμηλών θερμοκρασιών (*Bertrand, 1983; Dubois, 1993*).

Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας είναι μια ιδιαίτερη πρίπτωση. Ο σχηματισμός του είναι συνδεδεμένος με την μηλογαλακτική ζύμωση και δεν μπορεί να αποκλειστεί η συμμετοχή μιας εστεράσης βακτηριακής προέλευσης. Οι συγκεντρώσεις του γαλακτικού αιθυλεστέρα αυξάνουν κατά την παλαίωση, μέσω χημικών αντιδράσεων. Σύμφωνα με το *Arctander (1969),* ο γαλακτικός αιθυλεστέρας έχει οσμή που θυμίζει βούτυρο ή ακόμη και ξινόγαλα *(Handbook of Oenology, Volume 2, 2006*).

ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι αλδεϋδες αποτελούν επίσης μέρος των πτητικών ενώσεων που συμμετέχουν στο άρωμα του οίνου. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι η βανιλλίνη, που σχετίζεται με την παλαίωση σε βαρέλια και έχει χαρακτηριστικό άρωμα βανίλιας. Στον φλοιό του σταφυλιού όμως περιέχεται μικρή ποσότητα αλδεϋδών.

Η σημαντικότερη αλδεϋδη που εντοπίζεται στους οίνους είναι η ακεταλδεϋδη η οποία αποτελεί δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και παράγεται μετά την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος (ενζυματική οδός).

Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά μόρια με τις ιδιότητες των κετονών, συμπεριλαμβανομένων των προπανόνη, βουτανόνη και πεντανόνη. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι η ακετυλομεθυλο καρβιτόλη και το διακετύλιο. Επίσης έχουν ταυτοποιηθεί η γλυοξάλη, η μεθυλογλυοξάλη και η υδροξυπροπανεδιάλη με αρκετές από τις ιδιότητες αλδεϋδών και κετονών *(Handbook of Oenology, Volume 2, 2006).*

Άλλες καρβονυλικές ενώσεις όπως η υδροξυ-μεθυλο-φουρφουράλη, η ακετοϊνη και το διακετύλιο ή 2,3-βουτανεδιόνη (οσμή βουτύρου) συνεισφέρουν επίσης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου.

Οι ακετάλες συντίθενται από την ένωση μιας αλδεϋδης με μια αλκοόλη. Σημαντικότερη θεωρείται το διαιθοξυαιθάνιο, λόγω του ότι χαρακτηρίζεται από ισχυρή οσμή αλδεϋδης.

Οι λακτόνες σχηματίζονται κατά την αντίδραση μιας εσωτερικής εστεροποίησης που συμβαίνει μεταξύ ενός οξέος και μιας αλκοόλης στο ίδιο μόριο. Η πιο διαδεδομένη είναι η γ-βουτυρολακτόνη, η οποία εντοπίζεται στους οίνους σε συγκεντρώσεις της τάξης των mg/l. Οι λακτόνες μπορεί επίσης να προέρχονται από το σταφύλι συμμετέχοντας στο ποικιλιακό άρωμα (περίπτωση Riesling). Στα προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea* σταφύλια παράγεται επίσης σοτολόνη, η οποία συμβάλει στο χαρακτηριστικό «ψημένο» άρωμα των οίνων που παράγονται από σταφύλια τα οποία έχουν προσβληθεί από «ευγενή σήψη».

Τέλος, η δρυς απελευθερώνει λακτόνες στον οίνο κατά την διάρκεια παλαίωσής του σε αντίστοιχα βαρέλια. Το cis- και trans- ισομερές της 3-μεθυλο-γ-οκταλακτόνης είναι γνωστά ως λακτόνες δρυός ή ουισκυλακτόνες. Τα συστατικά αυτά έχουν οσμή καρύδας και κατά την διάλυσή τους δίνουν το χαρακτηριστικό άρωμα οίνου παλαιωμένου σε δρύ *(Handbook of Oenology, Volume 2, 2006).*

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Από την κατηγορία των λιπαρών οξέων σημαντικότερο θεωρείται το οξικό οξύ, το βασικό στοιχείο της πτητικής οξύτητας. Η συγκέντρωσή του υποδηλώνει την ύπαρξη και δράση βακτηρίων (γαλακτικών ή οξικών) που εξηγεί την επερχόμενη αλλοίωση του οίνου. Άλλα οξέα όπως το προπιονικό και το βουτυρικό, σχετίζονται επίσης με βακτηριακές αλλοιώσεις. Τα C_6, C_8 και C_{10} λιπαρά οξέα σχηματίζονται από τους ζυμομύκητες. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου ανήκουν στην οικογένεια των στερολών. Τα στοιχεία αυτά είναι ενεργοποιητές ζύμωσης, κυρίως υπό ανερόβιες συνθήκες. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι το ολεϊκό και το λινολεϊκό οξύ. Είναι ενεργά ακόμη κ σε ελάχιστες ποσότητες και προέρχονται από την κηρώδη επιφάνεια του φλοιού των σταφυλιών (*Handbook of Oenology, Volume 2, 2006*).

Το άρωμα των λιπαρών οξέων έχει περιγραφεί να μοιάζει με αυτό του ξυδιού, του βουτύρου, του τυριού και των λαχανικών.

1.2.2 Πρόδρομες ενώσεις αρώματος

Οι αρωματικές ενώσεις που προέρχονται από το σταφύλι (ανάλογα με την κάθε ποικιλία, το έδαφος και το μικροκλίμα) διαδραματίζουν τον πιο καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα και τον χαρακτήρα του αρώματος των οίνων από οποιαδήποτε άλλη ένωση. Αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για το «πρωτογενές» ή «ποικιλιακό» άρωμα.

Οι πρόδρομες ενώσεις του αρώματος των σταφυλιών είναι μη οσμηρά μόρια τα οποία εξαιτίας της επίδρασης διαφορετικών βιολογικών, βιοτεχνολογικών και φυσικοχημικών παραγόντων μπορούν να απελευθερώσουν οσμηρές ενώσεις.

Τα μόρια αυτά αποτελούνται από το μέρος της πτητικής αγλυκόνης ενωμένο με γλυκοζιτικό δεσμό με ένα μόριο σακχάρου (γλυκόζη). Το μέρος της αγλυκόνης αποτελείται κυρίως από τερπενόλες -ιδίως τις λιναλοόλη, γερανιόλη και νερόλη- οξείδια της λιναλοόλης, τερπενικές διόλες και τριόλες, καθώς και άλλα συστατικά όπως κυκλικές ή ευθείας αλύσου αλκοόλες (εξανόλες, εξενόλες), αρωματικές αλκοόλες (φαινυλοαιθανόλη, βενζυλική αλκοόλη), C-13 νορισοπρενοειδή και πτητικές φαινόλες όπως η βανιλίνη *(Williams,1981; Di Stefano, 1982, Gunata, Bayonove, 1985).*

Όλες οι ποικιλίες περιέχουν παρόμοιους γλυκοζίτες αλλά οι Μοσχάτες ποικιλίες έχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτών. Ιδιαίτερα οι φλοιοί βρέθηκε ότι έχουν υψηλότερη συγκέντρωση ελεύθερων και γλυκοζυλιωμένων μονοτερπενίων σε σχέση με την σάρκα του σταφυλιού.
Οι ποικιλιακές πρόδρομες ενώσεις αρώματος δεν είναι απαραίτητα όλες γλυκοζυλιωμένες, καθώς επίσης δεν είναι όλες οι μη-τερπενικές αγλυκόνες οσμηρές.

Στην συνέχεια αναφέρονται οι σημαντικότερες κατηγορίες ενώσεων που συμμετέχουν στο ποικιλιακό άρωμα.

ΤΕΡΠΕΝΙΑ

Οι περισσότερες αρωματικές ενώσεις που έχουν περιγραφεί σε ποικιλίες Vitis Vinifera, ανήκουν στην οικογένεια των τερπενίων. Τα συστατικά αυτά είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό άρωμα των Μοσχάτων ποικιλιών, αν και βρίσκονται (σε μικρότερες συγκεντρώσεις) και σε μη-αρωματικές ποικιλίες.

Η μεγάλη οικογένεια των τερπενίων που περιλαμβάνει γύρω στα 4000 συστατικά, είναι από τις πλέον διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο. Οι οσμηρές ενώσεις αυτής της οικογένειας είναι κυρίως τα μονοτερπένια (με 10 άτομα άνθρακα) και τα σεσκιτερπένια (με 15 άτομα άνθρακα), τα οποία αποτελούνται από δυο και τρεις μονάδες ισοπρενίου αντίστοιχα.

Τα μονοτερπένια συναντώνται κυρίως στην μορφή των απλών υδρογονανθράκων (λεμονένιο), των αλδεϋδών (λιναλάλη, γερανιάλη), των αλκοολών (λιναλοόλη, γερανιόλη), των οξέων (λιναλικό και γερανικό οξύ) ακόμη και των εστέρων αυτών.

Στα σταφύλια έχουν εντοπιστεί πρόδρομες μορφές τερπενίων και σε ελεύθερη και σε γλυκοζυλιωμένη μορφή (πρακτικά άοσμη). Έχει διαπιστωθεί ότι η πλειοψηφία των μονοτερπενίων που ανευρίσκονται στο σταφύλι και τον οίνο δεν είναι στην ελεύθερη μορφή τους αλλά δεσμευμένα με την γλυκόζη ή κάποιο άλλο σάκχαρο. Τα δεσμευμένα μονοτερπένια δεν συνεισφέρουν άμεσα στο άρωμα αλλά αποτελούν μη οσμηρές πρόδρομες ενώσεις του μεταγενέστερου *αρώματος (Câmara, 2007; Câmara, 2004).*

Έχουν καταγραφεί αρκετοί μονοτερπενικοί και σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες με χαρακτηριστική την οσμή ρητίνης, όπως τα *α*-terpinene, *p*-cimene και myrcene, αλλά και ορισμένες τερπενικές αλκοόλες όπως η φαρνεσόλη, παρ'όλο που η συμβολή των ενώσεων αυτών στον οργανοληπτικό χαρακτήρα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως *(Schreier et al., 1976; Bayonove, 1993).*

ΝΟΡΙΣΟΠΡΕΝΟΕΙΔΗ

Άλλες ενώσεις που συνεισφέρουν στο πρωτογενές άρωμα είναι τα νορισοπρενοειδή, τα οποία δεν χαρακτηρίζονται αυστηρά ως τερπένια και προέρχονται από την χημική ή ενζυμική υδρόλυση των καροτενοειδών που υπάρχουν στο σταφύλι. Εντοπίζονται επίσης στην πρόδρομη γλυκοζυλιωμένη μορφή. Η οξειδωτική διάσπαση των καροτενοειδών, τερπενίων με 40 άτομα άνθρακα, δίνει παράγωγα με 9,10,11 ή 13 άτομα άνθρακα. Ανάμεσα σε αυτά τα συστατικά, τα νορισοπρενοειδή παράγωγα με 13 άτομα άνθρακα φαίνεται να έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τις αρωματικές τους ιδιότητες. Τα πιο γνωστά από αυτά είναι η β-δαμασκηνόνη και η β-ιονόνη με χαρακτηριστικά αρώματα λουλουδιών και τροπικών φρούτων *(Handbook of Oenology, Volume 2,2006).*

ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΕΣ

Οι μεθοξυπυραζίνες έχουν περιγραφεί για τον βοτανικό και χορτώδη χαρακτήρα που αποδίδουν σε συγκεκριμένες ποικιλίες, όπως το Cabernet Sauvignon. Τα συστατικά αυτά υπάρχουν στο σταφύλι σε ελεύθερη μορφή και δεν έχουν καταγραφεί πρόδρομες ενώσεις αυτών. Οι μεθοξυπυραζίνες είναι αζωτούχα ετεροκυκλικά παράγωγα που παράγονται κατά τον μεταβολισμό των αμινοξέων. Οι ενώσεις 2-methoxy-3-isopropylpyrazine, 2-methoxy-3-*sec*-butylpyrazine και 2-methoxy-3-isobutylpyrazine έχουν την χαρακτηριστική οσμή πράσινης πιπεριάς και σπαραγγιού, ακόμη και γήινα αρώματα. Αρκετά φυτά όπως οι πράσινες πιπεριές, ο αρακάς και οι πατάτες φαίνεται να περιέχουν 2-methoxy-3-isobutylpyrazine. Στους ερυθρούς οίνους του Bordeaux, το κατώφλι αντίληψης της of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine είναι της τάξης των 15 ng/l. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις

είναι εντονότερος ο χορτώδης χαρακτήρας, γεγονός που αποδίδει στους οίνους αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά *(Handbook of Oenology, Volume 2,2006).*

ΘΕΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι θειούχες ενώσεις που ανευρίσκονται στους οίνους ταξινομούνται σε πέντε κατηγορίες, σύμφωνα με τη χημική τους δομή: θειόλες, μερκαπτάνες, θειοεστέρες, σουλφίδια, και ετεροκυκλικές ενώσεις. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις προσδίδουν αρώματα, τα οποία έχουν περιγραφεί παρόμοια με του λάχανου, του σκόρδου και του κρεμμυδιού και σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζονται ως μη επιθυμητά.

Ορισμένες ενώσεις αυτής της κατηγορίας, όπως έχουν ταυτοποιηθεί και στην ποικιλία Sauvignon Blanc, είναι οι 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one, 3-mercaptohexan-1-ol acetate, 4-mercapto-4-methylpentan-1-ol, 3-mercaptohexan-1-ol και 3-mercapto-3 methyl-butan-1-ol. Συχνά ταυτίζονται επίσης με αρώματα τροπικών ή εξωτικών φρούτων και μαύρου πιπεριού.

1.3 Μέθοδοι προσέγγισης απομόνωσης και ταυτοποίησης πρόδρομων ενώσεων αρώματος

Οι μέθοδοι προσέγγισης που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για προσδιορισμό πρόδρομων μορίων που συμμετέχουν στο πρωτογενές άρωμα ποικιλιών οινοποιίας περιλαμβάνουν κυρίως κλασματοποίηση με διαφορετικούς διαλύτες, ενζυματική και όξινη υδρόλυση των κλασμάτων, προσδιορισμό της γλυκοζυλιωμένης γλυκόζης που προκύπτει από τα πρόδρομα μόρια των γλυκοζιτών και ιδιαιτέρως χρήση αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας.

Στην συνέχεια αναφέρονται ορισμένες από τις συνηθέστερες μεθοδολογίες της διεθνούς βιβλιογραφίας, ορισμένες από τις οποίες δίνουν την δυνατότητα εφαρμογής όχι μόνο σε κάποιο αναλυτικό εργαστήριο αλλά ακόμη και σε οινοποιείο.

Οι πρόδρομες ενώσεις που συνιστούν το ποικιλιακό άρωμα μπορεί να είναι γλυκοζίτες, πολυδροξυλιωμένα μόρια ή κυστεϊνυλιωμένα παράγωγα. Πρόσφατη έρευνα απέδειξε ότι περισσότερες από 40 διαφορετικές ενώσεις που συνεισφέρουν στο άρωμα και ανήκουν σε διαφορετικές χημικές τάξεις σχηματίζονται ή απελευθερώνονται από τα πρόδρομα μόριά τους κατά την διάρκεια της ζύμωσης από στελέχη του Saccharomyces cerevisiae (ως αποτέλεσμα αντιδράσεων των ενζύμων που παράγουν/εκκρίνουν οι ζυμομύκητες με τα μόρια αυτά).

Σε αντίστοιχη μελέτη τα εμπορικά στελέχη που επιλέχθηκαν λόγω της ιδιαίτερης παραγωγής β-γλυκοσιδάσης, για να διεξαχθεί η έρευνα ανήκαν στα γένη Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus, Brettanomyces, Hanseniaspora uvarum, Kloeckera apiculata, Torulaspora delbrueckii και Debaryomyces carsonii. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε μέσο καλλιέργειας. Φλοιοί και γλεύκος διαχωρίστηκαν (διηθήθηκαν) μετά από ομογενοποίηση και κατεργάστηκαν ξεχωριστά (οι φλοιοί εκχυλίστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα και το μίγμα ονομάστηκε «macerate») και κατόπιν εξάτμισης ακολούθησε η προσρόφηση και των δύο μιγμάτων σε ρητίνες (LiChrolut EN). Κατόπιν έκλουσης των πρόδρομων μορίων τα μίγματα (γλεύκους και «macerate») αναμίχθηκαν. Τα στελέχη εμβολιάστηκαν σε μέσο ζύμωσης και προστέθηκε το εκχύλισμα των πρόδρομων ενώσεων. Η πορεία της ζύμωσης ελέγθηκε με βάση την μείωση του βάρους των δειγμάτων. Ακολούθησε ποιοτικός προσδιορισμός των μορίων που βρίσκονταν σε πολύ μικρές ποσότητες, μέσω SPE και GC-ion trap-MS ανάλυσης καθώς και ποσοτική ανάλυση μέσω GC-FID για τις ενώσεις σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Η μελέτη αυτή απέδειξε ότι διαφορετικά γένη ζυμομυκήτων έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν διαφορετικές μορφές πτητικών οσμηρών ενώσεων από τα πρόδρομα μόριά τους, ενώ το πιο αποτελεσματικό, ακόμη και για πτητικές ενώσεις που σχηματίζονται σε πολύ μικρές ποσότητες κατά την ζύμωση, είναι το γένος Saccharomyces Cerevisiae (*P.Hernandez-Orte et all, 2008*).

Ανάλογη πειραματική μελέτη βασισμένη στην χρήση στελέχους ζυμομύκητα πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό στέλεχος S.cerevisiae 71B. Οι φλοιοί διαχωρίστηκαν από το γλεύκος, στο οποίο ακολούθησε προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων και εμβολιασμός με το εμπορικό αυτό στέλεχος. Τα δείγματα των οίνων που προέκυψαν μετά το τέλος της ζύμωσης αναλύθηκαν συγκριτικά με δείγματα γλεύκους της ίδιας ποικιλίας. Ακολούθησε προσδιορισμός του κλάσματος των ελεύθερων πτητικών και του κλάσματος που προέκυψε κατόπιν ενζυματικής και όξινης υδρόλυσης με τις αναλυτικές τεχνικές GC-MS και GC-olfactometry. Όπως διαπιστώθηκε το δεύτερο κλάσμα περιείχε περισσότερες χημικές τάξεις πτητικών ενώσεων, οι οποίες σχηματίστηκαν κατά την υδρόλυση των πρόδρομων ενώσεων των σταφυλιών (τερπένια, νορισοπρενοειδή, αλειφατικές αλκοόλες κλπ). Καταδείχθηκε ότι ενώσεις όπως η λιναλοόλη και η γερανιόλη σχηματίζονται κυρίως κατά την ενζυματική υδρόλυση των γλυκοζιτών ως αποτέλεσμα της δράσης των ζυμών, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η συνεργιστική δράση ανάμεσα στο αρωματικό δυναμικό μιας ποικιλίας και του μεταβολισμού των ζυμών προσδιορίζουν την τελική συγκέντρωσή τους στον οίνο. Αντιθέτως, νορισοπρενοειδή, όπως η β-δαμασκηνόνη φάνηκε να δημιουργούνται σχεδόν αποκλειστικά κατά την όξινη υδρόλυση (*M.Ugliano, 2008*).

Αντίστοιχη μεθοδολογία με διαφορετικό εμπορικό στέλεχος εφαρμόστηκε με σκοπό να διερευνηθεί το κατά πόσο το στέλεχος του Saccharomyces cerevisiae (UCLM 325) μπορεί να υδρολύσει τις πρόδρομες ενώσεις αρώματος σε μορφή ετεροζιτών που απαντώνται φυσικώς στις οινοποιήσιμες ποικιλίες σταφυλιών, αφού προηγουμένως είχε γίνει κλασματοποίηση σε κατηγορίες των ενώσεων αυτών κατά μειούμενη πολικότητα των χρησιμοποιούμενων διαλυτών.
Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στην περιοχή του Πιεμόντε στις ποικιλίες Cortese και Sauvignon Blanc, ιδιαίτερα πλούσιες σε ετεροζίτες τερπενίων καθώς και σε Chardonnay λόγω της παρουσίας των νορισοπρενοειδών στην ποικιλία αυτή.

Γλυκοζυλιωμένες πρόδρομες ενώσεις από τις τρεις αυτές ποικλίες κλασματοποιήθηκαν σε στήλη 5 g C18 RP. Τα κλάσματα που συλλέχθησαν διαχωρίστηκαν σε τρία μέρη: το πρώτο εξ' αυτών υδρολύθηκε με πηκτινάση (Pectinol), προκειμένου να προσδιοριστούν συνολικά οι ετεροζίτες αρώματος, ενώ στο δεύτερο πρστέθηκε ένα ενεργό στέλεχος του ζυμομύκητα Saccharomyces cerevisiae (UCLM 325) και στο τρίτο ακετονική σκόνη του ίδιου ζυμομύκητα.

Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι το στέλεχος το οποίο μελετήθηκε ήταν ικανό να απελευθερώσει ορισμένους ετεροζίτες και συγκεκριμένα αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην απελευθέρωση ορισμένων βενζενοειδών όπως τα: acetovanillone, methyl vanillate και zingerone, ορισμένων νορισοπρενοειδών όπως τα: 3-oxo-a-ionol και vomifoliol αλλά και ορισμένων τερπενίων όπως τα: linalool, nerol, geraniol, 8-hydroxydihydrolinalool, cis-8-hydroxylinalool και p-menth-1-ene-7, 8-diol, αν και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις συγκρινόμενες με αυτές που προέκυψαν μετά την υδρόλυση με την πηκτινάση.

Όπως παρατηρήθηκε από τα αποτελέσματα ο ζυμομύκητας ήταν ικανός να μετατρέψει μια ποσότητα γερανιόλης σε κιτρονελλόλη σε ποσό μεγαλύτερο από εκείνο που παράγεται κατά την υδρόλυση με προσθήκη ενζύμου. Το συστατικό αυτό φαίνεται να παράγεται κυρίως κατά τον μεταβολισμό των ζυμών, παρά κατά την ενζυμική υδρόλυση.
Η μελέτη αυτή απέδειξε την σημασία του ζυμομύκητα στην παραγωγή πρόδρομων ενώσεων πρωτογενούς αρώματος και υπέδειξε ότι οι ζύμες μπορεί να έχουν ορισμένη επίδραση στην έκφραση των ποικιλιακών χαρακτηριστικών στους μονοποικιλιακούς οίνους (*Fernandez-Gonzalez et all, 2003).*

Σε ένα επόμενο στάδιο της προσπάθειας προσέγγισης του αρωματικού δυναμικού από μη οσμηρά πρόδρομα μόρια, μελετήθηκε η επίδραση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων (από τα γένη Oenococcus oeni και Lactobacillus). Στην πειραματική αυτή πορεία τα δύο κλάσματα που δημιουργήθηκαν- γλεύκους και «macerate» (εκχύλιση των φλοιών σε ρυθμιστικό 0.1 M Na2HPO4/NaH2PO4)- κατόπιν εξάτμισης και ανάκτησης των πρόδρομων μορίων τους μετά από προσρόφηση σε ρητίνες, ενώθηκαν. Σε δείγματα model wine που είχαν δημιουργηθεί έγινε μηλογαλακτική ζύμωση κατόπιν εμβολιασμού με εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων και σε κάθε δείγμα προστέθηκε και το εκχύλισμα των πρόδρομων μορίων που δημιουργήθηκε αρχικά. Ακολούθησε εκχύλιση και SPE ανάλυση καθώς και GC-ion Trap-MS ανάλυση για τα συστατικά σε ελάχιστες συγκεντρώσεις καθώς και GC-MS ανάλυση για τα συστατικά που ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Όπως διαπιστώθηκε την μεγαλύτερη γλυκοσιδική δραστηριότητα κατέδειξαν στελέχη του O.oeni, ακολουθούμενα από στελέχη του Lactobacillus. Τα στελέχη και των δύο γενών είναι ικανά να απελευθερώσουν τερπένια, νορισοπρενοειδή, φαινόλες και βανιλίνες από ένα εκχύλισμα πρόδρομων ενώσεων αρώματος. Η ενζυματική δράση είναι παρούσα ακόμη και αν δεν πραγματοποιείται η ΜΛΖ, κάτι το οποίο φανερώνει ότι βακτήρια τα οποία δεν είναι ικανά να πραγματοποιήσουν την ζύμωση, μπορούν και μόνο με την παρουσία τους να συμβάλλουν στο τελικό άρωμα των οίνων. Τέλος, ο οργανοληπτικός έλεγχος που πραγματοποιήθηκε, απέδειξε ότι η παρουσία των βακτηρίων σε ένα μέσο το οποίο περιλαμβάνει πρόδρομα μόρια πτητικών ενώσεων αρώματος, μπορεί να προκαλέσει σημαντική μεταβολή στο αρωματικό προφίλ των δειγμάτων (*P.Hernandez et all, 2009*).

Μελετώντας διαφορετικές παραμέτρους που επιδρούν στο πρωτογενές άρωμα, σε πειραματική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην ιταλική ποικιλία Nebbiolo, η παρουσία και η συγκέντρωση πρόδρομων ενώσεων αρώματος που απομονώθηκαν από το σταφύλι συσχετίστηκαν με την επίδραση του μικροκλίματος της κάθε περιοχής από όπου προήλθαν

τα διαφορετικά δείγματα. Στην μεθοδολογία που ακολουθήθηκε το ομογενοποιημένο μίγμα που προέκυψε μετά από έκθλιψη των ραγών και αφαίρεση γιγάρτων, κατεργάστηκε σε στήλη C18 ανεστραμμένης φάσης. Οι γλυκοζίτες ανακτήθηκαν με μεθανόλη και το κλάσμα αφού εξατμίστηκε μέχρι ξηρού, ακολούθησε ενζυματική υδρόλυση και περαιτέρω κατεργασία σε στήλη C18-RP (για απομόνωση του τμήματος της αγλυκόνης). Τα συστατικά που εκλούσθηκαν ανακτήθηκαν με διχλωρομεθάνιο και ακολούθησε προσδιορισμός με GC-MS ανάλυση. Όπως αποδείχθηκε κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων το αρωματικό δυναμικό της ποικιλίας και συγκεκριμένα η παρουσία ορισμένων πρόδρομων ενώσεων που συμμετέχουν στο ποικιλιακό άρωμα αλλά και η συγκέντρωσή τους, φάνηκε να επηρεάζεται από το μικροκλίμα των διαφορετικών περιοχών και τις συνθήκες που επικρατούσαν κατά την διάρκεια του περκασμού και της ωρίμασης των σταφυλιών (*A.Asproudi et all, 2016*).

Αν και στις συνήθεις πρακτικές για απομόνωση πρόδρομων ενώσεων και προσδιορισμό πρωτογενούς αρώματος ποικιλιών οινοποιίας δεν χρησιμοποιούνται συχνά τεχνικές υγρής χρωματογραφίας, σε μελέτη που έγινε για τον προσδιορισμό του ποικιλιακού αρώματος της ποικιλίας Moscato Giallo, εντοπίστηκαν αρκετές πρόδομες ενώσεις στο γλεύκος των σταφυλιών και χαρακτηρίστηκαν με LC-MS και NMR τεχνικές. Τα δείγματα προσροφήθηκαν σε Amberlite XAD ρητίνες και ακολούθησε ανάλυση με flash chromatography καθώς και απομόνωση του κλάσματος των γλυκοζιτών με τεχνικές LC-MS-MS και NMR (*E.Schievano et all, 2013*).

Σε διαφορετική έρευνα όπου εγινε χρήση υγρής χρωματογραφίας, ο προσδιορισμός του αρωματικού προφίλ διαφορετικών ποικιλιών και η μεταξύ τους σύγκριση εγινε με συνδυασμό των μεθόδων GC-MS και LC-HRMS, πριν και μετά την ενζυματική υδρόλυση. Τα σταφύλια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν καταψύχθηκαν αρχικά και κονιοποιήθηκαν σε υγρό άζωτο χρησιμοποιώντας έναν αναλυτικό μύλο. Η σκόνη που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων και ακολούθησε SPE ανάλυση. Για να απελευθερωθούν οι γλυκοζυλιωμένες ενώσεις οι στήλες κατεργάστηκαν με μεθανόλη και το μεθανολικό διάλυμα υπέστη περαιτέρω προσδιορισμό με LC-HRMS. Το κλάσμα των ελεύθερων πτητικών αναλύθηκε με GC-MS. Εξήντα έξι οσμηρές πτητικές ενώσεις σε ελεύθερη μορφή ταυτοποιήθηκαν, οι οποίες απελευθερώθηκαν μετά την υδρόλυση μέσω GC-MS ανάλυσης, ενώ 15 γλυκοζυλιωμένα πρόδρομα μόρια ταυτοποιήθηκαν μέσω LC-HRMS και σε συσχέτιση με τα δεδομένα από το GC-MS (*M. Ghaste, 2015*).

Όπως έχει προαναφερθεί το πρωτογενές άρωμα διαχωρίζεται στο κλάσμα των ελεύθερων πτητικών οσμηρών μορίων και στο κλάσμα των πρόδρομων μη οσμηρών μορίων, τα οποία υπό ορισμένες συνθήκες απελευθερώνουν πτητικές ενώσεις που συνεισφέρουν στο άρωμα. Η μορφή αυτών των ενώσεων είναι γλυκοζυλιωμένη, πρόκειται δηλαδή για ένα μόριο στο οποίο το πτητικό τμήμα της αγλυκόνης είναι ενωμένο με ένα μόριο γλυκόζης με κάποιον γλυκοζιτικό δεσμό. Η υδρόλυση του δεσμού αυτού προς απελευθέρωση της αγλυκόνης μπορεί να γίνει ενζυματικά ή σε όξινες συνθήκες. Ενώ όμως η ενζυματική υδρόλυση είναι πολύ επιλεκτική ως προς συγκεκριμένα μόρια αγλυκονών, η όξινη υδρόλυση είναι μη επιλεκτική (επιτρέπει δηλαδή την απελευθέρωση όλων των πτητικών αγλυκονών). Ο προσδιορισμός του πτητικού κλάσματος μπορεί να γίνει είτε με τον ποσοτικό προσδιορισμό του κλάσματος των πτητικών αγλυκονών (το οποίο απαιτεί συνήθως κλασματοποίηση σε Amberlite ρητίνες μέσω μιας στήλης C18) είτε με τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκοσιδικής γλυκόζης (με την χρήση τεχνικών όπως UV-Vis spectroscopy ή HPLC -ωστόσο όμως υπάρχει ο κίνδυνος παρεμβολής και μέτρησης παράλληλα και της ελεύθερης γλυκόζης).

Ο συλλογισμός αυτός έχει οδηγήσει αρκετούς να μελετήσουν τις πρόδρομες ενώσεις αρώματος με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκοζυλιωμένης γλυκόζης.

Σε αντίστοιχη μελέτη που έγινε σε ερυθρή ισπανική ποικιλία, τα σταφύλια αφού εκχυλίστηκαν -κατόπιν έκθλιψης- με νερό και αιθανόλη, φυγοκεντρήθηκαν και ακολουθήθηκε η ανάλυση για τον προσδιορισμό της γλυκοζυλιωμένης γλυκόζης. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε SPE ανάλυση για εξάλειψη των παρεμβολών από γλυκοζυλιωμένα φαινολικά συστατικά και της ελεύθερης γλυκόζης. Στα κλάσματα που εκλούσθηκαν η ελεύθερη γλυκόζη απομακρύνθηκε με προσθήκη αντιδραστηρίου Fehling. Ακολούθησε όξινη υδρόλυση του κλάσματος των πρόδρομων γλυκοσιδικών ενώσεων και προσδιορισμός της γλυκόζης μέσω HPLC-RID. Η έκφραση αυτής έγινε σε mmol Glu / kg σταφυλιών αφού πραγματοποιήθηκαν και οι ανάλογες διορθώσεις. Η ακρίβεια της μεθόδου αυτής επηρεάζεται από το στάδιο της όξινης υδρόλυσης καθώς σε αυτό προκύπτει το ποσοσστό της γλυκόζης που τελικώς προσδιορίζεται. Ο παράγων συγκράτησης από την στήλη των πρόδρομων μορίων και το ποσοστό της υδρόλυσης υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας ένα γλυκοζυλιωμένο πρότυπο αναφοράς αρώματος, λόγω της δομικής ομοιότητάς του με τις γλυκοζυλιωμένες πρόδρομες ενώσεις αρώματος αλλά και της ικανότητάς του να αναλύεται από την τεχνική HPLC, όπως και η γλυκοζυλιωμένη γλυκόζη. Η μέθοδος αυτή υπερέχει έναντι άλλων παρόμοιων λόγω της απλότητάς της και του γεγονότος ότι απαιτεί μόνο μια μέτρηση της γλυκοζυλιωμένης γλυκόζης (*M.R.Salinas, 2012*).

Τέλος, όπως αναφέρεται συχνά στις οινοποιίες αλλά και στα αναλυτικά εργαστήρια απαιτείται μια γρήγορη και απλή μέθοδος προσδιορισμού των πρόδρομων ενώσεων αρώματος. Μια ανάλογη μέθοδος ιδιαίτερα πρακτική και αξιόπιστη πραγματοποιήθηκε σε σταφύλια, γλεύκη και οίνους ισπανικών ποικιλιών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην απομόνωση των τερπενυλ-b-D-γλυκοζιτών μέσω επιλεκτικής προσρόφησης σε στήλη C18 ανεστραμμένης φάσης, ακολουθούμενη από υδρόλυση προς απελευθέρωση των τερπενίων, αποδίδοντας ένα ισομοριακό μίγμα ελεύθερων αγλυκονών και γλυκόζης (κατακράτηση γλυκοζιτών σε στήλη C18 ανεστραμένης φάσης, έκπλυση για την απομάκρυνση πολικών ουσιών, ανάκτηση των προδρόμων μορίων με έκλουση, όξινη υδρόλυση και μέτρηση της γλυκόζης που απελευθερώνεται). Η γλυκόζη μετρήθηκε με την βοήθεια ενός ενζυμικού αναλυτικού κιτ. Οι πρόδρομες ενώσεις ποσοτικοποιήθηκαν πραγματοποιώντας αυτήν την μέθοδο σε εκθλιμμένα σταφύλια, γλεύκος και οίνο από ισπανικές ποικιλίες. Η σημασία αυτής της μεθόδου, λόγω της απλής εφαρμογής και της αξιοπιστίας της έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να διδραματίσει καθοριστικό ρόλο στην απόφαση του χρόνου τρυγητού και στην ενζυμική κατεργασία (δοσολογία, διάρκεια κλπ) που πραγματοποιείται για την ενίσχυση απελευθέρωσης των πτητικών ενώσεων αρώματος (*M. Arevalo Vilena et all, 2006*).

1.3.1 Αέρια Χρωματογραφία Ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας (GC-FID SPME)

Αρχή μεθόδου

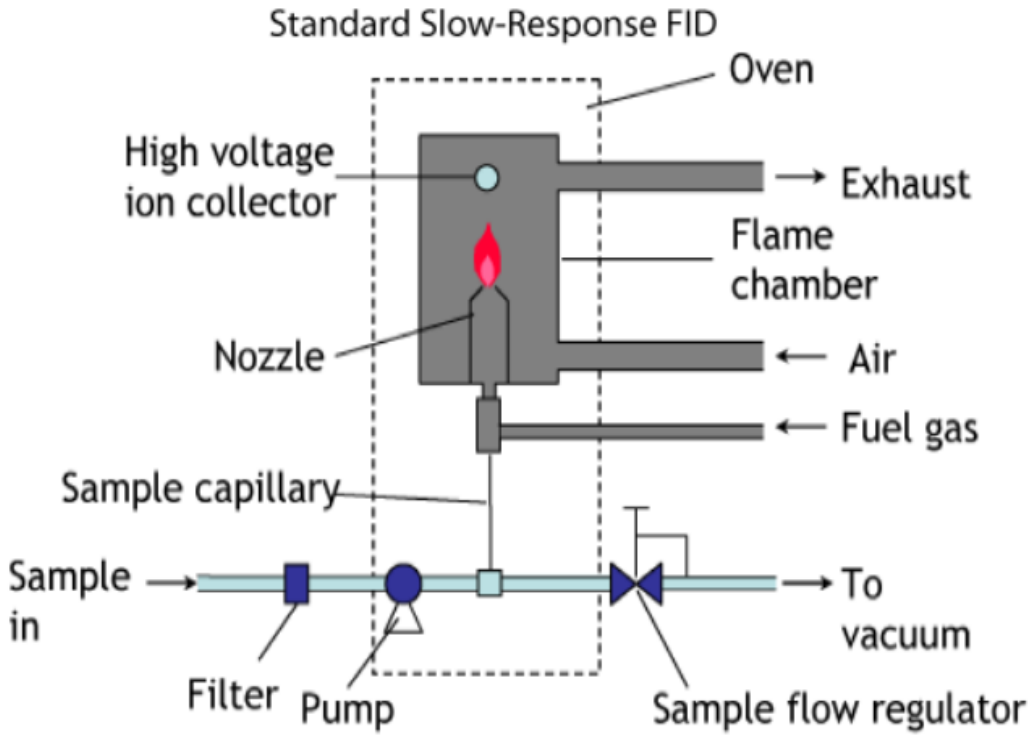
Η λειτουργία του FID βασίζεται στην ανίχνευση των ιόντων που σχηματίζονται κατά την καύση των οργανικών ενώσεων σε μία φλόγα υδρογόνου. Η δημιουργία αυτών των ιόντων είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση των οργανικών ενώσεων στο ρεύμα του αερίου δείγματος.

Οι μετρήσεις FID συνήθως αναφέρονται ως "όπως μεθάνιο", εννοώντας την ποσότητα του μεθανίου που θα παραγόταν στην ίδια απόκριση. Οι υδρογονάνθρακες έχουν γενικά συντελεστή μοριακής απόκρισης που είναι ίσος με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στο μόριό τους, ενώ οι οξυγονούχες ενώσεις και άλλα είδη που περιέχουν ετεροάτομα τείνουν

να έχουν χαμηλότερο συντελεστή απόκρισης. Το μονοξείδιο του άνθρακα και το διοξείδιο του άνθρακα δεν είναι ανιχνεύσιμα με FID.

Οι μετρήσεις FID έχουν συχνά την ένδειξη "συνολικοί υδρογονάνθρακες" ή "ολική περιεκτικότητα σε υδρογονάνθρακες» (THC), αν και μια πιο ακριβής ονομασία θα ήταν «συνολική περιεκτικότητα σε πτητικούς υδρογονάνθρακες» (TVHC), καθώς οι υδρογονάνθρακες που έχουν συμπυκνωθεί δεν είναι ανιχνεύσιμοι, αν και είναι σημαντικοί για λόγους ασφαλείας *(https://en.wikipedia.org/wiki/Flame_ionization_detector).*

Παρακάτω απεικονίζεται η συνδεσμολογία του οργάνου.



Φωτο 2

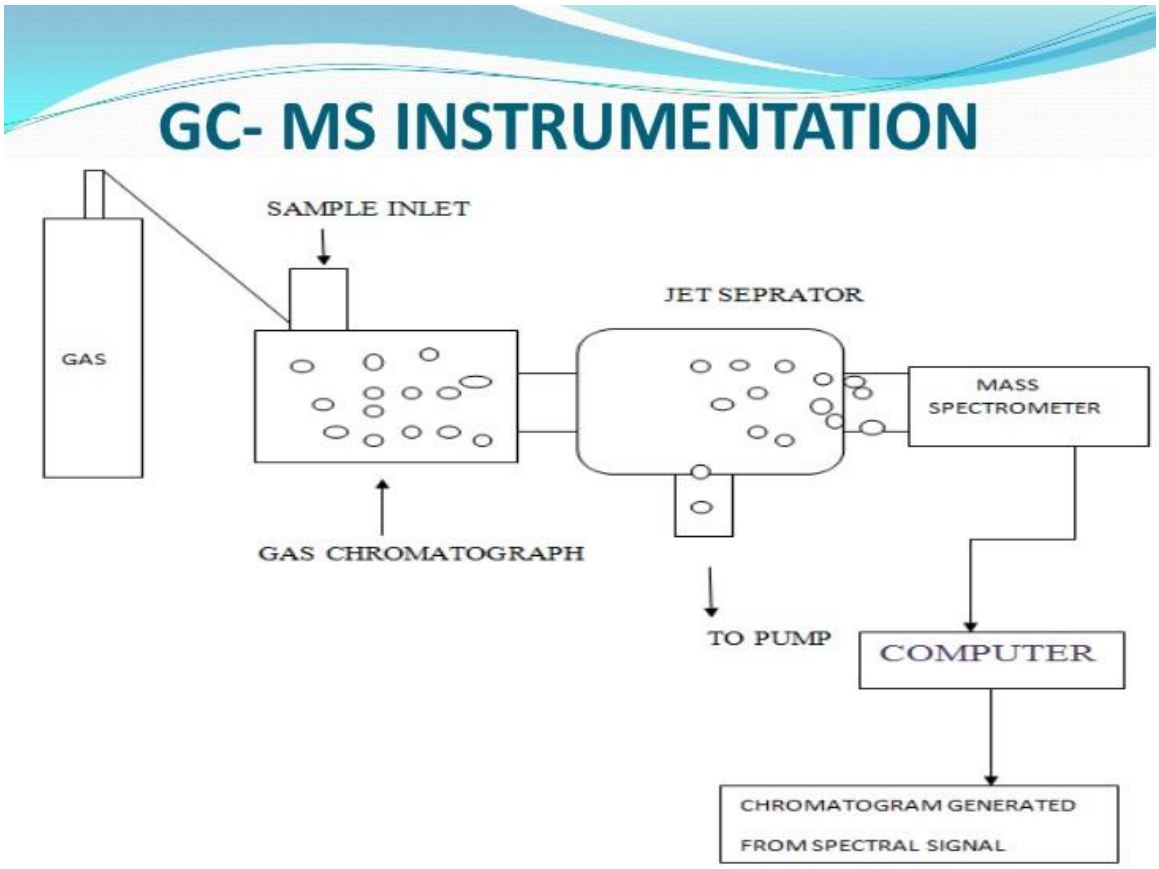
Πηγή:
https://www.google.gr/search?q=gc+fid+principle&espv=2&biw=1366&bih=638&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjC76Ojya7SAhUL7xQKHQNVCksQ_AUIBigB&dpr=1#imgrc=c2Tt2AwuTy7cvM:

1.3.2 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)

Αρχή μεθόδου

Η αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (GC/MS) χωρίζει μίγματα χημικών ουσιών και προσδιορίζει τα συστατικά σε μοριακό επίπεδο. Η αέρια χρωματογραφία λειτουργεί βάσει της αρχής ότι ένα μίγμα θα διαχωριστεί σε επιμέρους ουσίες όταν θερμαίνεται. Τα θερμαινόμενα αέρια μεταφέρονται μέσω μιας στήλης με ένα αδρανές αέριο. Καθώς οι διαχωρισμένες ουσίες αναδύονται από το άνοιγμα της στήλης, ρέουν μέσα στο φασματόμετρο μάζας. Το φασματόμετρο μάζας ταυτοποιεί τις ενώσεις από την μάζα του προς ανάλυση μορίου. Μια βιβλιοθήκη γνωστών φασμάτων μάζας, η οποία καλύπτει μερικές χιλιάδες ενώσεις, είναι αποθηκευμένη στον υπολογιστή. Το φασματόμετρο μάζας μπορεί να θεωρηθεί ως ο μόνος ακριβής αναλυτικός ανιχνευτής *(http://www.cpeo.org/techtree/ttdescript/msgc.htm).*

Παρακάτω απεικονίζεται η συνδεσμολογία των οργάνων για το GC/MS.



Φώτο 3

Πηγή: http://www.slideshare.net/9829686702/gc-ms-applications

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σκοπός του πειράματος

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η απομόνωση και ταυτοποίηση πρόδρομων αρωματικών ενώσεων και πτητικών συστατικών της ποικιλίας Μούχταρο.

Αρχικά γίνεται οινοποίηση των σταφυλιών με δύο διαφορετικές ζύμες καθώς και μια αυθόρμητη ζύμωση και ακολουθούν οι κλασσικές αναλύσεις (προσδιορισμός γλευκοσακχάρου, προσδιορισμός ολικής και ενεργούς οξύτητας, μέτρηση πτητικής οξύτητας, προσδιορισμός αλκοολικού βαθμού και προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων) αλλά και ποιοτική σύγκριση του αρώματος των παραγόμενων οίνων με αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας.

Παράλληλα, στο δεύτερο πειραματικό σκέλος, γίνεται εκχύλιση του μούστου με τρεις διαφορετικούς -κατ'αυξανόμενη πολικότητα- διαλύτες και τα κλάσματα προστίθενται σε γλεύκη όπου ακολουθεί ζύμωση. Μετά το πέρας της ζύμωσης ακολουθεί εκχύλιση αυτών και τέλος ανάλυση με αέριο χρωματογράφο-φασματόμετρο μάζας.

Όλα τα δεδομένα που εξήχθησαν αναλύθηκαν στατιστικά με την ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance – ANOVA) για έναν παράγοντα με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$ του προγράμματος Statistica V.7 (Statsoft Inc., Tulsa , Ok).

Για την σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το Tukey's HSD test.

2.2 Πειραματική πορεία

2.2.1 Επίδραση στελέχους ζυμομύκητα στα χημικά χαρακτηριστικά των οίνων

Η οινοποίηση των σταφυλιών της ποικιλίας Μούχταρο πραγματοποιήθηκε στο οινοποιείο του Εργαστηρίου Οινολογίας του Γ.Π.Α και τα σταφύλια προήλθαν από τον τρύγο του 2015, από την περιοχή της Κοιλάδας των Μουσών, Βοιωτίας.

Αρχικά τα σταφύλια μεταφέρθηκαν σε θλιπτήριο, αποβοστρυχώθηκαν χειρωνακτικά και στην συνέχεια ο μούστος με τα στέμφυλα ισομοιράστηκε σε τέσσερις πλαστικούς περιέκτες των 10 lt. Οι τρεις εξ' αυτών προορίστηκαν για ζύμωση ενώ ο τέταρτος για την διαδικασία απομόνωσης και ταυτοποίησης πρόδρομων αρωματικών ενώσεων. Ακολούθησε θείωση του γλεύκους (8gr/hl), προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων 3gr/hl (Safizym Colour, Fermentis, France) καθώς και προσθήκη ταννινών 20gr/hl.

Οι δύο περιέκτες εμβολιάστηκαν με 20gr/hl Saccharomyces cerevisiae (SC22, Fermentis, France) και 20gr/hl Saccharomyces Uvarum (UVA S111, Fermentis, France) αντίστοιχα, ενώ το τρίτο έκανε αυθόρμητη ζύμωση. Προστέθηκαν επίσης 20g/hl 100% οργανικό άζωτο Springferm και 20 g/hl ανόργανο άζωτο DAP.

Στα προς ζυμώσει γλεύκη γίνονταν καθημερινά μετρήσεις Baume (προσδιορισμός γλευκοζαχάρου), θερμοκρασίας, έντασης και ΔΦΟ. Ο διαχωρισμός στεμφύλων-εν ζυμώσει γλεύκους προσδιορίστηκε με βάση τις μετρήσεις έντασης (Κεφ.2.3.1).

Μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης ακολούθησε μηλογαλακτική ζύμωση κατόπιν εμβολιασμού με γαλακτικά βακτήρια Oenococcus oeni. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Cine και η δοσολογία η συνιστάμενη από την εταιρεία-προμηθευτή (Chr Hansen -1.5gr για 250 lt οίνου). Η πορεία και το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης παρακολουθήθηκαν με την μέθοδο TLC (Thin Layer Chromatography).

Μετά το πέρας των ζυμωτικών διεργασιών ακολούθησαν οι κλασσικές αναλύσεις-προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου, μέτρηση ολικής οξύτητας, μέτρηση πτητικής οξύτητας, προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων και μέτρηση pH.

Ακολούθησε προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων αρώματος των οίνων με αέρια χρωματογραφία ιονισμού φλόγας (GC-FID) καθώς επίσης και με αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (GC-MS).

2.2.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση πτητικών ενώσεων και ενώσεων αρώματος

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης πραγματοποιείται η απομόνωση και ταυτοποίηση των πρόδρομων αρωματικών ενώσεων της ποικιλίας Μούχταρο.

10lt μούστου εκχυλίστηκαν αρχικά με 20% αιθανόλη καθαρότητας 96% v/v και παρέμειναν υπό ψύξη (5° C) με καθημερινές αναδεύσεις. Μετά από πέντε ημέρες έγινε ο διαχωρισμός στεμφύλων-γλεύκους.

Μετά τον διαχωρισμό ακολούθησε θείωση 10g/hl και παραμονή για 48 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στις 400στρ/λεπτό. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με διήθηση.

Ακολούθησε λυοφιλίωση του μούστου.

Το λυοφιλιωμένο προϊόν εκχυλίστηκε διαδοχικά με τρεις κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας διαλύτες -πεντάνιο, διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη.

Η διαδικασία εκχύλισης με τον κάθε διαλύτη έγινε εις τριπλούν (η πρώτη εκχύλιση έγινε με 230 ml διαλύτη και παραμονή 24 ωρών. Ακολούθως η δεύτερη με 150 ml διαλύτη και παραμονή 24 ωρών. Ομοίως επαναλήφθηκε και η τρίτη εκχύλιση).

Μετά από κάθε εκχύλιση ακολούθησε εξάτμιση σχεδόν μέχρι ξηρού σε rotary evaporator για παραλαβή του διαλύτη. Τα αποστάγματα μετά το πέρας της τριπλής επανάληψης συλλέχθησαν ξεχωριστά σε ένα vial για κάθε διαλύτη (fraction πεντανίου, fraction διχλωρομεθανίου και fraction μεθανόλης).

Κάθε fraction προστέθηκε σε πρότυπο γλεύκος (model μούστου) το οποίο αποτελείτο από: 4,5g/l τρυγικό οξύ, 180g/l γλυκόζη, $(NH_4)_2SO_4$ 10g/l και yeast extract 5g/l και το οποίο εμβολιάστηκε με 20g/l ζύμη UCLM S325 (έγινε ρύθμιση του pH στο 3.3).

Παράλληλα δημιουργήθηκε και ένας μάρτυρας (control), όπου πραγματοποιήθηκε ζύμωση στο παραπάνω model με την ίδια ζύμη. Ο μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση αποτελεσμάτων και για έλεγχο δημιουργίας artifacts, δηλαδη συστατικών που είναι δυνατό να παραχθούν και χωρίς την παρουσία των πρόδρομων ενώσεων.

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τριπλή επανάληψη για κάθε δείγμα (3 model control, 3model pentane, 3 model CH_2Cl_2, 3 model MeOH).

Η πορεία ζύμωσης παρακολουθήθηκε με καθημερινές μετρήσεις βάρους μέχρι σταθεροποίησης αυτού. Όταν το βάρος σταμάτησε να μειώνεται διαπιστώθηκε το τέλος της ζύμωσης φωτομετρικά με την μέθοδο μέτρησης αναγόντων σακχάρων DNS.

Ακολούθησε εκχύλιση υγρού-υγρού για κάθε δείγμα.

Κάθε εκχύλισμα που συλλέχθηκε συμπυκνώθηκε μέχρι 1 ml και ακολούθησε ποιοτικός και ημιποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων με τις τεχνικές GC-FID SPME και GC-MS.

2.3 Αναλύσεις

2.3.1 Έλεγχος πορείας αλκοολικής ζύμωσης

Καθημερινά γινόταν μέτρηση των σακχάρων για έλεγχο της πορείας της αλκοολικής ζύμωσης μέσω διαθλισιμετρίας και οι μετρήσεις εκφράστηκαν σε βαθμούς Brix. Επίσης γίνονταν μετρήσεις έντασης και απόχρωσης στα δείγματα.

2.3.2 Βασικές αναλύσεις

Οι βασικές αναλύσεις του οίνου πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους οι οποίες προβλέπονται από την ευρωπαϊκή νομοθεσία και χρησιμοποιούνται κατά κόρων σε εργαστηριακό χώρο (International organization of vine and wine, 2006) και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής :

α) Μέτρηση ογκομετρούμενης - ολικής οξύτητας

β) Μέτρηση ενεργούς οξύτητας

γ) Μέτρηση πτητικής οξύτητας

δ) Μέτρηση αλκοολικού βαθμού

ε) Μέτρηση αναγόντων σακχάρων

στ) Προσδιορισμός χρωματικών χαρακτηριστικών (ένταση, απόχρωση)

2.3.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Μία ταχεία μέθοδος προσδιορισμού (κυρίως ποιοτικού) ύπαρξης η όχι μηλικού οξέος στον οίνο είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη προκειμένου να διαπιστωθεί εάν έγινε η όχι μηλογαλακτική ζύμωση.

Υλικά και εξοπλισμός

- Δύο δοχεία που να κλείνουν ερμητικά, διαστάσεων περίπου 20x20x30 cm

- Πλακίδια TLC

- Διαλύτης στον οποίο αναμιγνύονται n mL τολουένιο, n/2 mL οξικού οξέος και n/2 mL n–οξικού βουτυλεστέρα

- Διάλυμα δείκτη πράσινο της βρωμοκρεζόλης

Πορεία

Στο δοχείο φέρονται 50 ml από το διάλυμα ισοβουτανόλης και 25 ml από το διάλυμα οξικού οξέος Το πλακίδια TLC κόβονται σε διαστάσεις 5x10 cm στη μια πλευρά του οποίου τοποθετούνται οι κηλίδες των υπό εξέταση δειγμάτων οίνου. Οι κηλίδες απέχουν 0.5 cm από την άκρη του χαρτιού και 1 cm μεταξύ τούς.
Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μάρτυρας διάλυμα που περιέχει μηλικό οξύ 2 g/l.
Το χαρτί αφού στεγνώσουν οι κηλίδες τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει το διάλυμα και κλείνει ερμητικά. Μετά από 20 λεπτά περίπου (το διάλυμα έχει φθάσει στα 9cm) αφαιρούμε το χαρτί και το αφήνουμε να εξατμισθεί ο διαλύτης. Μετέπειτά εμβαπτίζουμε τα πλακίδια μέσα στο δοχείο με τον δείκτη και περιμένουμε να στεγνώσει. Το χρώμα του πλακιδίου θα αλλάξει προς το κυανούν εκτός από τα σημεία όπου θα υπάρχουν συγκεντρωμένα τα οξέα και τα οποία 8α παραμένουν κίτρινα.

2.3.4 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων φωτομετρικά (μέθοδος DNS)

Αντιδραστήρια

1. Διάλυμα DNS: Για 500 mL αντιδραστηρίου χρειάζονται
   5 g 3,5-dinitrosalicylic acid
   150 g potassium sodium tartrate
   8 g NaOH

Θερμαίνονται ήπια 400 περίπου mL νερού και προστίθεται το NaOH. Στη συνέχεια διαλύεται **αργά και με έντονη ανάδευση** το DNS και μετά το τρυγικό καλιονάτριο. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 mL. Διατηρείται σε σκούρο μπουκάλι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2. Πρότυπο διάλυμα γλυκόζης 2 g/L: Για 50 mL πρότυπου διαλύματος ζυγίζονται 100 mg γλυκόζης και διαλύονται σε 40 περίπου mL νερού. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και συμπληρώνεται ο όγκος. Διατηρείται στο ψυγείο.

Διαδικασία

Σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται:

Δείγμα	500 μL (Προσοχή! Μπορεί να απαιτείται αραίωση)
Διάλυμα DNS	500 μL

Το μίγμα αναδεύεται και μεταφέρεται σε υδατόλουτρο 100 ^{o}C για 5 min. Κατόπιν οι σωλήνες ψύχονται με νερό βρύσης και προστίθενται 5 mL H_2O. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm. Το φωτόμετρο μηδενίζεται με τον μάρτυρα της αντίδρασης (σωλήνες που ακολουθούν την αντίδραση αλλά αντί για δείγμα έχουν νερό).

Καμπύλη αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάζονται σε eppendorf οι παρακάτω συγκεντρώσεις, από 50 έως 300 mg/L γλυκόζης, και ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού.

[γλυκόζη] (g/L)	Πρότυπο διάλυμα γλυκόζης (μL)	H_2O (μL)
0,1	50	950
0,2	100	900
0,4	200	800
0,8	400	600
1,2	600	400
1,6	800	200

Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης με τις απορροφήσεις τους στα 540 nm σε ένα σύστημα αξόνων λαμβάνεται ή καμπύλη αναφοράς και η ευθεία που την περιγράφει της μορφής $y=\alpha x+\beta$.

Υπολογισμοί

Από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων του αραιωμένου δείγματος σε ισοδύναμα γλυκόζης. Η τελική συγκέντρωση (σε g/L) υπολογίζεται με τον συν-υπολογισμό της αραίωσης του δείγματος *(Miller (1959) Anal. Chem. 31(3):426-458).*

2.3.5 Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-liquid extraction)

Αρχή μεθόδου

Η βασική αρχή της υγρής εκχύλισης είναι η επαφή ενός αρχικού υγρού διαλύματος (τροφοδοσία) με έναν άλλο υγρό διαλύτη, ο οποίος είναι μη αναμίξιμος ή μερικώς αναμίξιμος με το αρχικό διάλυμα. Ο διαλύτης επιλέγεται έτσι ώστε ένα ή περισσότερα από τα συστατικά του αρχικού διαλύματος (διαλυμένη ουσία) να είναι επιλεκτικά διαλυτά στον διαλύτη. Κατά την προσθήκη του διαλύτη δημιουργούνται δύο υγρές φάσεις, οι οποίες διαχωρίζονται λόγω της διαφορετικής τους πυκνότητας, και λαμβάνει χώρα μεταφορά μάζας της διαλυμένης ουσίας από τη φάση του αρχικού διαλύματος προς τη φάση του διαλύτη.

Προετοιμασία δείγματος

Σε μια κωνική φιάλη τοποθετούμε 250 ml δείγματος, 25 ml CH_2Cl_2, 15g NaCl και 250μl 3-οκτανόλης. Η φιάλη τοποθετείται σε σκεύος με πάγο σε μαγνητικό αναδευτήρα για 20΄στις 400στρ/λεπτό. Ακολουθεί διαχωρισμός σε χοάνη (αναμονή 10΄) και φυγοκέντρηση για 5΄. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία με μόνη προσθήκη 25 ml CH_2Cl_2. Συλλέγεται το διήθημα σε vial και σε αυτό προστίθεται επαρκής ποσότητα άνυδρου Na_2SO_4, όπου παραμένει σε μαγνητικό αναδευτήρα για 15΄. Τέλος, το δείγμα διηθείται.

2.4 Αέρια Χρωματογραφία (GC-FID SPME)

Στην παρούσα μελέτη ο ποσοτικός προσδιορισμός των αρωματικών ενώσεων έγινε με GC-FID (Gas-Chromatography-Flame Ionization Detector), της εταιρείας Hewlett- Packard series II 5890. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το Ήλιο (He) με ρυθμό ροής $1ml \times min^{-1}$. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν πολική DB-WAX (length 30m x 0.320mm I.D.), επικαλυμμένη με film 0.25μm, στατικής φάσης.

Όλες οι πρότυπες αρωματικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich (Milan, Italy).

Υλικά

- GC-FID (Gas-Chromatography-Flame Ionization Detector)
- SUPELCO Solid Phase Micro-extraction Holder (Bellefonte, PA, USA) με ίνα τριστρωματικής σύνθεσης (SUPELCO SPME Fiber assembly 2cm, 50/30 μm divinylbelzene-carboxen-poly(dimethylsiloxane) (DVB-CAR-PDMS, gray)
- Διάλυμα 3-οκτανόλης
- Χλωριούχου Νάτριο (NaCl)

Διαδικασία προσδιορισμού

Σε γυάλινο vial SPME των 20ml (βιδωτό πώμα με septum), προστέθηκαν 7 ml του προς ανάλυση δείγματος οίνου, 3ml απιονισμένο νερό, 10μl του εσωτερικού προτύπου 3-οκτανόλης και 3g χλωριούχου νατρίου (NaCl, Sigma Aldrich). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα και παρέμεινε υπό ανάδευση στις 400rpm, για 10min σε υδατόλουτρο 35° C. Με το πέρας των 10min, εισήχθη η ίνα στο εσωτερικό του vial και απελευθερώθηκε ώστε να προσροφήσει τις πτητικές ενώσεις και παρέμεινε για 30min, υπό ανάδευση. Τέλος, η ίνα μεταφέρθηκε στην υποδοχή έγχυσης (injector), όπου παρέμεινε για 10min ώστε να αποκολληθούν από την ίνα οι αρωματικές ενώσεις αλλά και να γίνει ο καθαρισμός της ίνας ώστε να είναι έτοιμη για το επόμενο δείγμα.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε, υπο αρχικές συνθήκες η θερμοκρασία εισόδου (inlet) είναι 220° C, η θερμοκρασία ανιχνευτή (detector) 250° C και η θερμοκρασία φούρνου (oven) 40° C. Σε αυτή τη θερμοκρασία διατηρείται ο φούρνος για 5min και στη συνέχεια με ρυθμό 3° C/ min ανεβαίνει στους 220° C , όπου παραμένει 5min. Όλο το πρόγραμμα διαρκεί 70 min.

	Rate	Final Time (min)	Hold Time (min)
0	-	40.0	3.00
1	3.00	160.0	0.00
2	10.00	250.0	8.00
3	0.00	0.0	0.00

Πίνακας 1: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα

2.5 Αέρια χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με το GCMS-QP2010 ULTRA της εταιρείας SHIMADZU.

Χρησιμοποιήθηκε στήλη με τα εξής χαρακτηριστικά:

Name: MEGA-5HT	Thickness: 0.25 μm
Length: 30.0 m	Diameter: 0.25mm

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα GCMS Solution Version 4.30 της SHIMADZU Corporation.

Έγινε ημιποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων σε σύγκριση με το εσωτερικό πρότυπο (3-octanol).

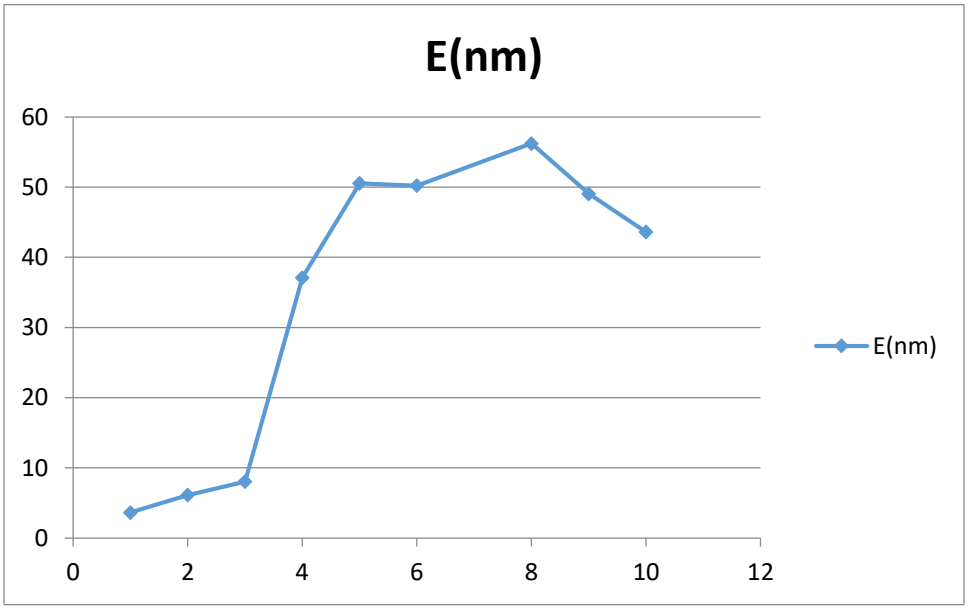
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όλων των μετρήσεων που διεξήχθησαν κατά την διάρκεια της μελέτης αυτής.

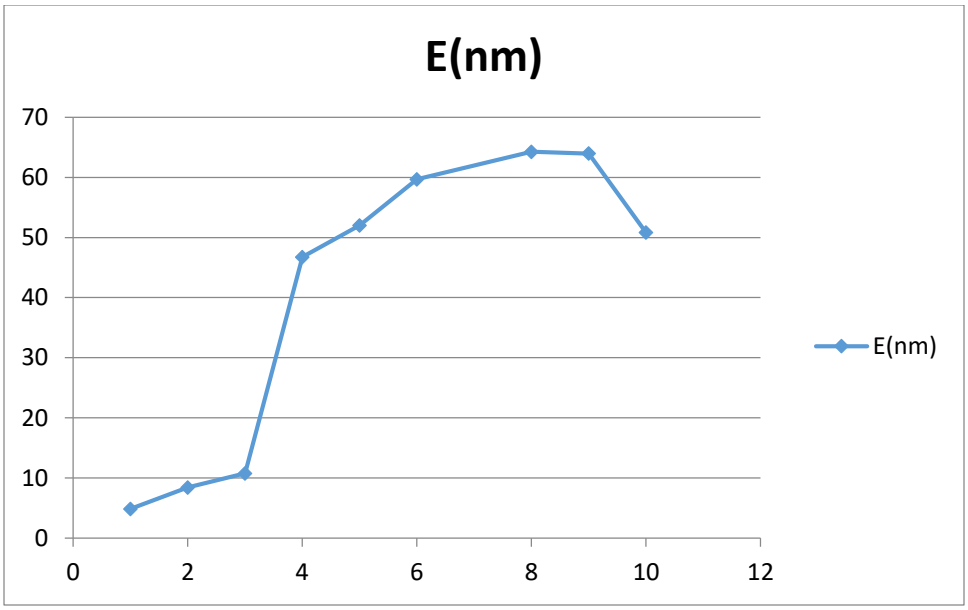
Όπως προαναφέρθηκε ο διαχωρισμός στεμφύλων-γλεύκους κατά την πορεία οινοποίησης προσδιορίστηκε με βάση την χρωματική ένταση των δειγμάτων, η οποία μετριόταν καθημερινά από την εκκίνηση της ζύμωσης.

Συγκεκριμένα ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας του μέγιστου σημείου χρωματικής έντασης, όπως μετρήθηκε φωτομετρικά.

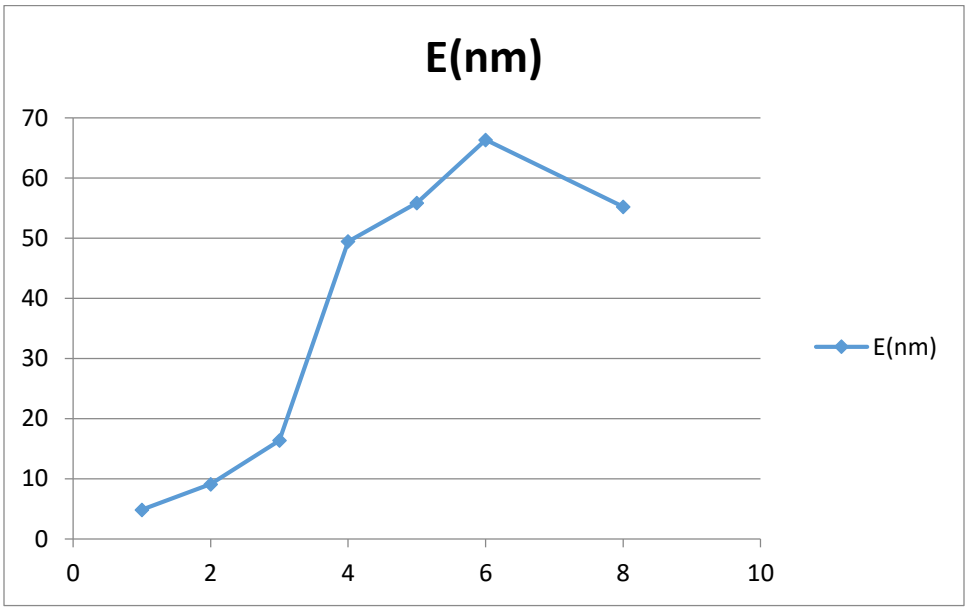
Ακολουθούν τα γραφήματα έντασης (nm)-χρόνου (ημέρα ζύμωσης) για κάθε δείγμα.



Γράφημα 1: Γραφική αναπαράσταση της χρωματικής έντασης του δείγματος **wild** συναρτήσει της χρονικής πορείας της ζύμωσης



Γράφημα 2: Γραφική αναπαράσταση της χρωματικής έντασης του δείγματος **uva** συναρτήσει της χρονικής πορείας της ζύμωσης

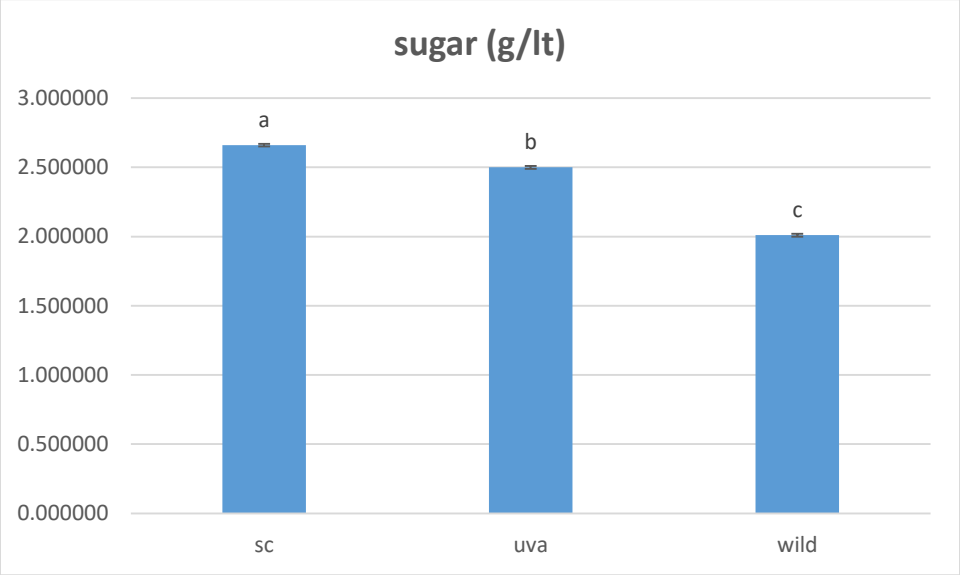


Γράφημα 3: Γραφική αναπαράσταση της χρωματικής έντασης του δείγματος **sc22** συναρτήσει της χρονικής πορείας της ζύμωσης

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα αποτελέσματα των κλασσικών αναλύσεων όπως προσδιορίστηκαν για τα δείγματα των τριών διαφορετικών οινοποιήσεων της ποικιλίας Μούχταρο.

Κωδικός δείγματος	**Ειδικό βάρος**	**Ολική οξύτητα (g/l θειϊκού οξέος)**	**pH**	**Πτητική οξύτητα (g/l οξικού οξέος)**	**Αλκοολικός τίτλος (% v/v)**	**Ανάγοντα σάκχαρα (g/l)**
SC22	0,9915	6,5	3,3	0,40	14,3	2,66
UVA	0,9920	6,7	3,4	0,45	14,0	2,50
WILD	0,9920	6,9	3,5	0,49	13,8	2,01

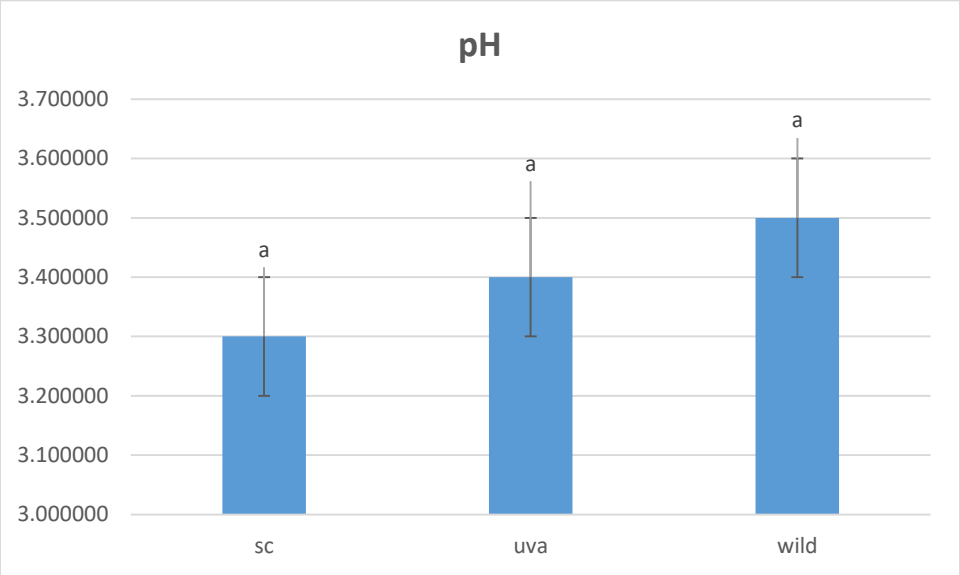
Πίνακας 2: Πίνακας βασικών αναλύσεων



Γράφημα 4: Απεικόνιση της τελικής συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων (g ιμβερτοσακχάρου/lt οίνου) για κάθε δείγμα

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d… είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p<0.05$)

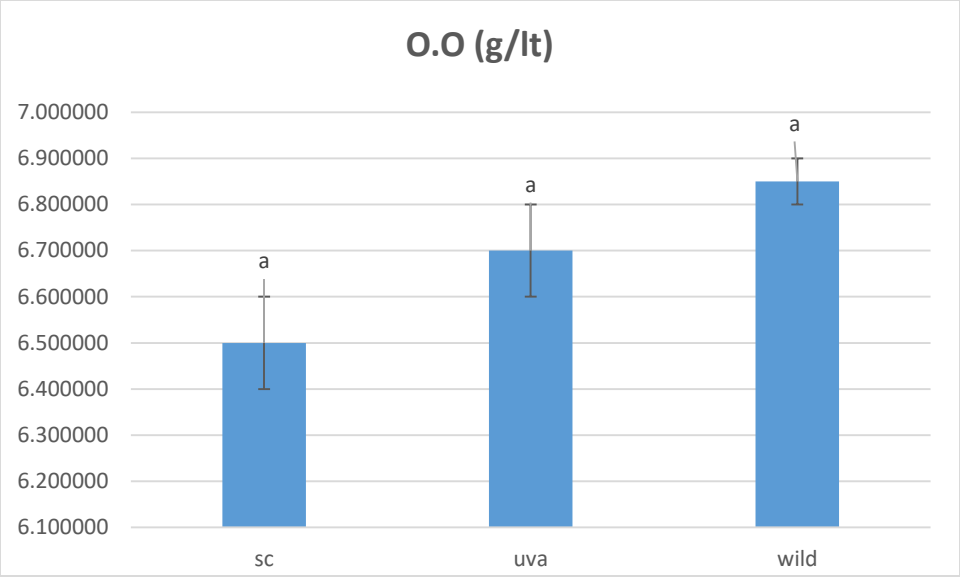
Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα και στα τρία δείγματα, με τον οίνο sc22 να παρουσιάζει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα (2,66 g/l) και τον οίνο wild την μικρότερη αντίστοιχα (2,01 g/l). Και τα τρία δείγματα παρ'όλα αυτά ανήκουν στην κατηγορία ξηρών οίνων.



Γράφημα 5: Απεικόνιση ενεργούς οξύτητας τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d… είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p<0.05$)

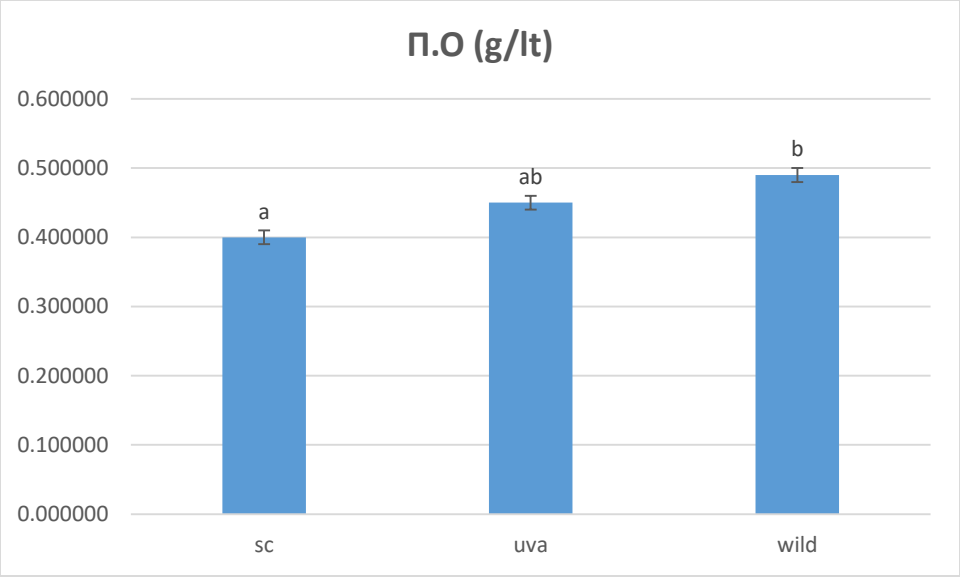
Ως προς το pH δεν παρατηρείται σημαντικά στατιστική διαφορά για κανένα δείγμα. Και οι τρεις οίνοι έδωσαν φυσιολογικές μετρήσεις με αναμενόμενες τιμές από 3,3-3,5.



Γράφημα 6: Απεικόνιση ολικής οξύτητας τελικών οίνων (g/lt τρυγικού οξέος)

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d… είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p<0.05$)

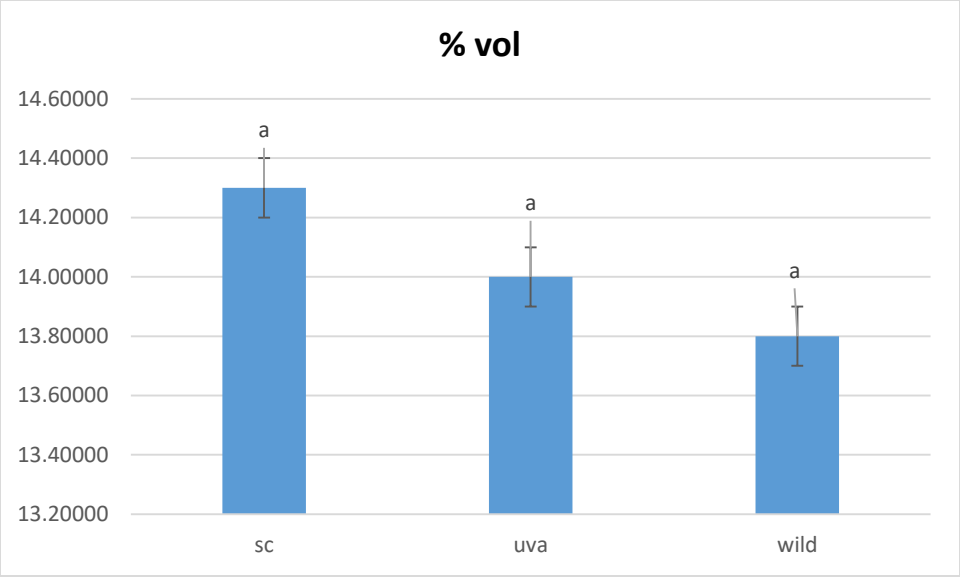
Κανένα δείγμα δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τα υπόλοιπα για την ολική οξύτητα. Και οι τρεις οίνοι έδωσαν παρ'όλα αυτά αρκετά υψηλές τιμές (6,5-6,9 g/lt τρυγικού οξέος), δεδομένου ότι οι τελικές μετρήσεις έγιναν μετά το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης.



Γράφημα 7: Απεικόνιση πτητικής οξύτητας τελικών οίνων (g/lt οξικού οξέος)

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d… είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p<0.05$)

Στις μετρήσεις της πτητικής οξύτητας παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα sc και wild, με το τελευταίο να δίνει την υψηλότερη τιμή, κάτι αναμενόμενο λόγω του ότι οι «άγριες» (αυτόχθονες) ζύμες έχουν την τάση να παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές πτητικής οξύτητας (μεγαλύτερη παραγωγή οξικού εστέρα).



Γράφημα 8: Αλκοολικός τίτλος τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d… είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p<0.05$)

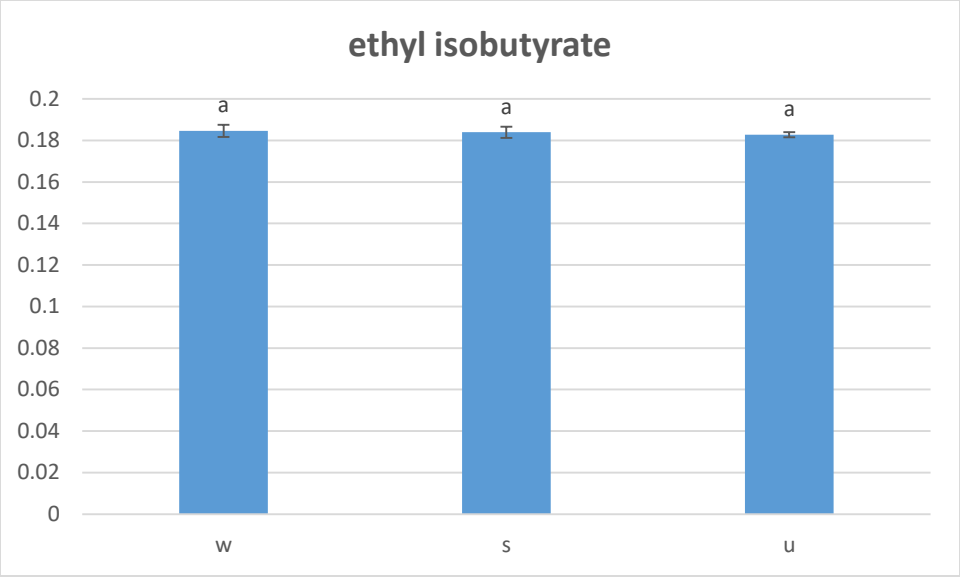
Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τον τελικό αλκοολομετρικό τίτλο σε κανένα δείγμα. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 13,8% vol έως 14,3% vol.

Στην συνέχεια απεικονίζονται τα γραφήματα ορισμένων πτητικών ενώσεων, όπως προέκυψε από τον ποσοτικό προσδιορισμό τους κατά την αέρια χρωματογραφία (GC-FID SPME).

Ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι εξής ενώσεις:

Ένωση	**Χαρακτηριστικό άρωμα**
Ethyl isobutyrate	Τροπικά φρούτα
Ethyl caproate	Φρουτώδες
Phenethyl alcohol	Ανθικό, τριαντάφυλλο
Ethyl 2-methyl butyrate	Φρουτώδες, κεράσι
Isoamyl alcohol	Ελαιώδες
Isoamyl acetate	Μπανάνα, αχλάδι

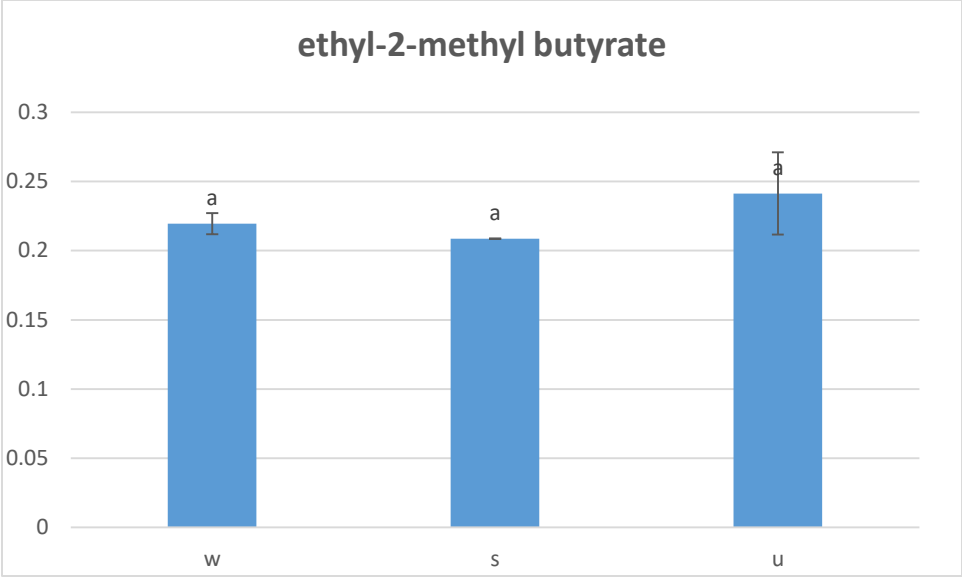
Στην συνέχεια ακολουθούν τα διαγράμματα ποσοστικού προσδιορισμού των ενώσεων αυτών



Γράφημα 9: ethyl isobutyrate τελικών οίνων - C (mg/l)

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d… είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p<0.05$)

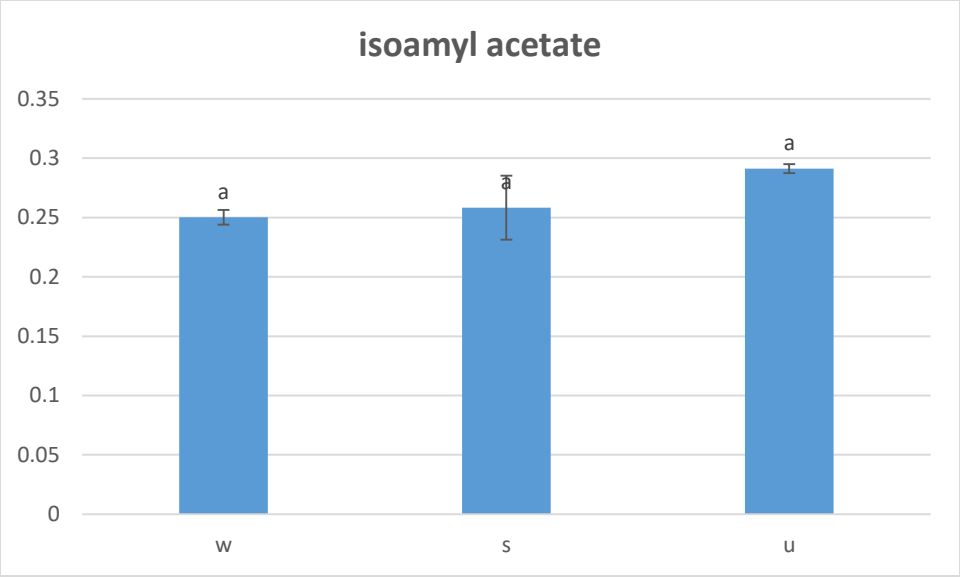
Όπως απεικονίζεται στο παραπάνω γράφημα δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών δειγμάτων ως προς το ethyl isobutyrate. Και οι τρεις οίνοι παρουσιάζουν συγκέντρωση μεγαλύτερη από το κατώφλι αντίληψης της ένωσης (0.1 μg/lt) και συνεπώς και στους τρεις είναι αισθητό το άρωμα τροπικών φρούτων που αποδίδεται στην ένωση αυτή.



Γράφημα 10: ethyl-2-methyl butyrate – C (mg/l)

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d… είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p<0.05$)

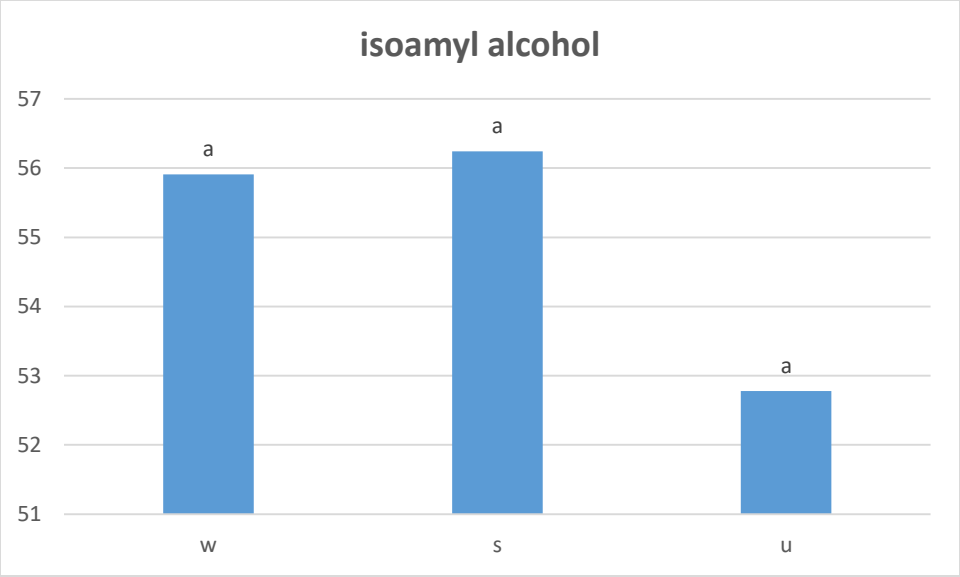
Δεν παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές, όπως φαίνεται από το παραπάνω γράφημα ως προς το ethyl-2-methyl butyrate ανάμεσα στους τρεις οίνους, ενώ το δείγμα u (uvarum) φαίνεται να έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση. Με κατώφλι αντίληψης 0.1-0.3 μg/l, η ένωση αυτή φαίνεται να αποδίδει φρουτώδη χαρακτήρα με νότες κερασιού και στους τρεις οίνους.



Γράφημα 11: isoamyl acetate τελικών οίνων – C (mg/l)

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d… είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p<0.05$)

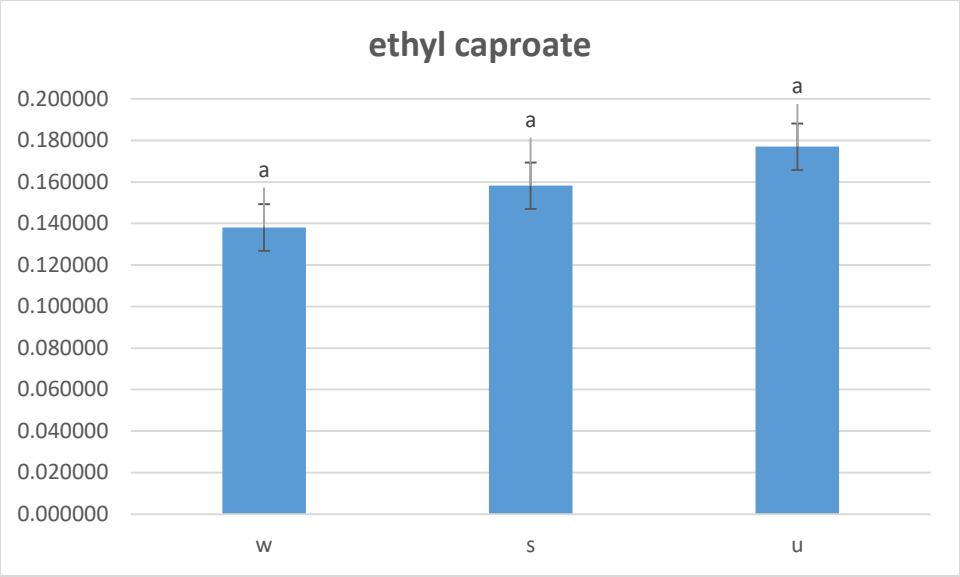
Ούτε η ένωση isoamyl acetate φαίνεται να εμφανίζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα τρία δείγματα, παρ' όλο που το δείγμα uvarum φαίνεται να εμφανίζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση. Στην ένωση αυτή αποδίδεται η χαρακτηριστική οσμή μπανάνας.



Γράφημα 12: isoamyl alcohol τελικών οίνων – C (mg/l)

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d… είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p<0.05$)

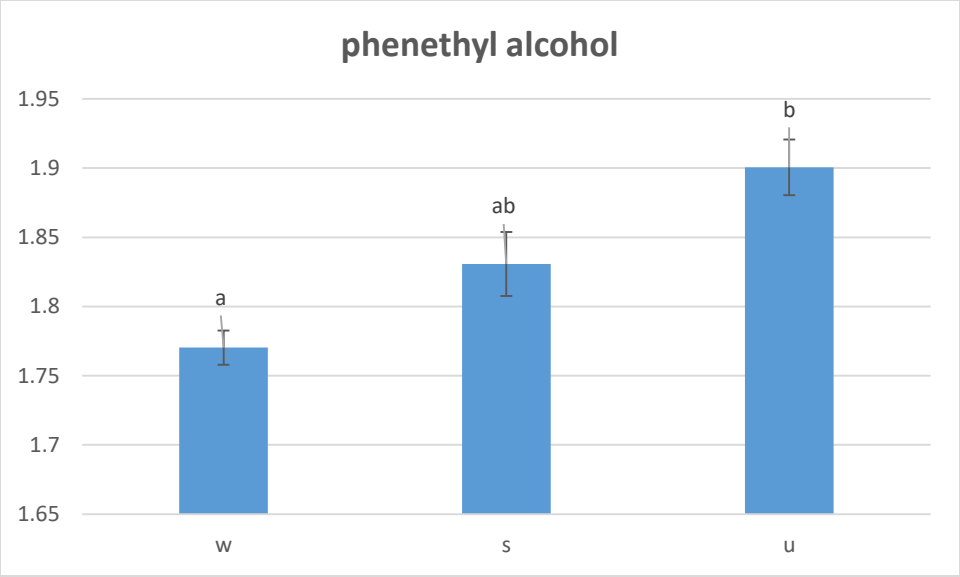
Η ένωση isoamyl alcohol παρά την ιδιαίτερη οσμή της (fusel), όπως ταυτοποιήθηκε και προσδιορίστηκε φαίνεται να μην διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε κανέναν από τους τρεις οίνους, με τον οίνο sc22 να παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση. Σε κάθε περίπτωση οι συγκεντρώσεις και των τριών δειγμάτων υπερβαίνουν το κατώφλι αντίληψης της ένωσης (250-300 μg/l).



Γράφημα 13: ethyl caproate τελικών οίνων – C (mg/l)

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d… είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p<0.05$)

Η ένωση ethyl caproate ανιχνεύτηκε και ταυτοποιήθηκε και στα τρία δείγματα σε συγκέντωση μεγαλύτερη από το κατώφλι αντίληψης της ένωσης (1μg/l). Ο εστέρας αυτός είναι υπεύθυνος για φρουτώδη αρώματα. Κανένα δείγμα δεν παρουσίασε σημαντικά στατιστική διαφορά από τα υπόλοιπα.



Γράφημα 14: phenethyl alcohol τελικών οίνων – C (mg/l)

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d… είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p<0.05$)

Ως προς τις συγκεντρώσεις της ένωσης phenethyl alcohol παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα wild και uvarum, με το τελευταίο να εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό. Η ένωση αυτή χαρακτηρίζεται από ανθώδη αρώματα, ιδιαίτερα αρώματα τριαντάφυλλου. Και οι τρεις οίνοι πάντως υπερβαίνουν το κατώφλι αντίληψής της (750-1100 μg/l).

Στην συνέχει ακολουθούν τα αποτελέσματα των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν από το GC-MS.

Ο πίνακας που παρατίθεται παρακάτω αποτελεί ποιοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που εντοπίστηκαν στα τρία δείγματα οίνων.

COMPOUNDS	**ODOUR**	**SC22**	**UVA**	**WILD**
ALCOHOLS				
3-methyl butanol-1	Banana	+	+	+
2,3-butanediol	odorless	+	+	+
3-methyl pentanol-1	Soil, mushroom	+	+	+
3-hexenol-1	Lemon, green	+		
Hexanol-1	Green, grass	+	+	+
Phenylethyl alcohol	Floral	+	+	+
1-propanol-3-(methyl-thio)	potato	+		+
Prenol	fruity	+		
4-methyl pentanol-1	nutty	+		
ESTERS	**ODOUR**	**SC22**	**UVA**	**WILD**
Ethyl butanoate	Fruity, pineapple	+	+	+
2-hydroxy ethyl propano-ate	Buttery,cream,coconut	+	+	+
3-hydroxy ethyl buta-noate	Fruity, tropical	+	+	+
Ethyl hexanoate	Fruity	+	+	+
Ethyl octanoate	Fruity, apple, sweet	+	+	+
2-phenylethyl acetate	Rose, raspberry	+	+	+
Ethyl hexadecanoate	Wax-like	+	+	
Ethyl octadecanoate	waxy	+	+	+
2-methyl ethyl propano-ate		+	+	+
3-methyl butyl heptanoate		+	+	
1,4-butanediol diacetate		+		

Isoamyl lactate		+	+	+
1-butanol-2-methyl acetate		+	+	+
Isoamyl acetate	Pear, banana	+		
Isobutyl acetate	Fruity	+	+	+
Ethyl oleate		+	+	
Ethyl 2,2-diethoxy propionate		+		
Hydroxy-diethyl butanedioate		+	+	+
Ethyl vanillate		+	+	+
Isopentyl hexanoate				+
ACIDS	**ODOUR**	**SC22**	**UVA**	**WILD**
2-methyl butanoic acid	cheesy		+	
Hexadecanoic acid	oily	+	+	+
Octadecanoic acid	Pungent, oily		+	+
Butanoic acid	unpleasant			+
MISCELLANEOUS				
2,3-pentanedione	Buttery,nutty,caramel	+	+	
Acetoin	buttery	+	+	+
1-methoxy, 2-propanone			+	
1,1-diethoxyethane	nutty			+

Πίνακας 3: Ποιοτικός προσδιορισμός πτητικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν σε κάθε δείγμα οίνου

Στην συνέχεια παρουσιάζεται ο πίνακας ημιποσοτικού προσδιορισμού (Πίνακας 4) των ενώσεων αυτών με τις τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d να είναι σημαντικά διαφορετικές (Tuckey's HSD test, $p<0.05$).

COMPOUNDS	SC22 (Mean+Std error)	UVA (Mean+Std error)	WILD (Mean+Std error)	ODOUR
ALCOHOLS				
3-methyl butanol-1	38.53±0.01 a	40.06±0.01 b	35.54±0.01 c	banana
3-methyl pentanol-1	0.1±0.01 a	0.09±0.01 a	0.06±0.01 a	soil,mushroom
2,3-butanediol	0.34±0.01 a	3.15±0.01 b	2.59±0.01 c	odorless
3-hexenol	0.06±0.01 a	0 b	0 b	lemon,green
1-hexanol	0.75±0.01 a	0.03±0.01 b	0.68±0.01 c	green,grass
phenylethyl alcohol	27.45±0.01 a	33.63±0.01 b	27.43±0.01 a	floral (rose)
Prenol	0.03±0.01 a	o a	o a	fruity
1-propanol-3-(methylthio)	0.17±0.01 a	0 b	0.32±0.01 c	Potato
4-methyl pentanol-1	0.04±0.01 a	0 b	0 b	nutty,coconut
ESTERS				
Ethyl butanoate	0.12±0.01 a	0.1±0.01 a	0.11±0.01 a	Pineapple
2-hydroxy ethyl propanoate	4.89±0.01 a	6.12±0.01 b	5.69±0.01 c	buttery,cream,coconut
3-hydroxy ethyl butanoate	0.18±0.01 b	0.31±0.01 a	0.28±0.01 a	tropical fruit
Ethyl hexanoate	0.19±0.01 a	0.24±0.01 a	0.21±0.01 a	fruity
Ethyl octanoate	0.16±0.01 a	0.22±0.01 b	0.2±0.01 ab	apple
2-phenylethyl acetate	0.08±0.01 a	0.1±0.01 a	0.09±0.01 a	rose,raspberry
Ethyl hexadecanoate	0.18±0.01 b	0.03±0.01 a	o a	wax-like
Ethyl octadecanoate	0.1±0.01 b	0.02±0.01 a	0.01±0.01 a	waxy
2-methyl ethyl propanoate	0.06±0.01 a	0.02±0.01 a	0.02±0.01 a	
3-methyl butyl heptanoate	0.11±0.01 a	0.06±0.01 b	0 c	
1,4-butanediol diacetate	0.08±0.01 b	o a	o a	
Isoamyl lactate	0.11±0.01 a	0.11±0.01 a	0.11±0.01 a	
1-butanol-2-methyl acetate	0.12±0.01 b	0.06±0.01 a	0.07±0.01 ab	
Isoamyl acetate	0.03±0.01 a	o a	o a	pear,banana
Isobutyl acetate	0.03±0.01 a	0.02±0.01 a	0.03±0.01 a	fruity
Ethyl oleate	0.14±0.01 a	0.05±0.01 b	0 c	
Ethyl 2,2-diethoxy propionate	0.02±0.01 a	o a	o a	
Hydroxy-diethyl butanedioate	0.09±0.01 a	0.13±0.01 a	0.01±0.01 a	
Ethyl vanillate	0.07±0.01 a	0.06±0.01 a	0.08±0.01 a	
Isopentyl hexanoate	o a	o a	0.06±0.01 b	
ACIDS				
2-methyl butanoic acid	o a	0.01±0.01 a	o a	cheesy
Hexadecanoic acid	0.18±0.01 a	0.1±0.01 b	0.24±0.01 c	oily
Octadecanoic acid	o a	0.13±0.01 b	0.01±0.01 a	pungent,oily
Butanoic acid	o a	o a	0.01±0.01 a	unpleasant
MISCELLANEOUS				
2,3-pentanedione	0.07±0.01 a	0.05±0.01 a	0 b	buttery,nutty,caramel
Acetoin	0.39±0.01 a	0.99±0.01 b	0.59±0.01 c	buttery
1-methoxy, 2-propanone	o a	0.1±0.01 b	o a	nutty
1,1-diethoxyethane	o a	o a	1.22±0.01 b	

Αρχικά στην κατηγορία των αλκοολών στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ και των τριων δειγμάτων φαίνεται να εμφανίζουν οι: 3-methyl-butanol-1, 2,3-butanediol, 1-hexanol (η οποία προέρχεται από το σταφύλι) και 1-propanol-3-(methylthio). Υψηλότερο ποσσοστό αλκοολών και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμφανίζει το δείγμα sc22, ακολουθεί το δείγμα uvarum και τέλος το δείγμα wild. Και στα τρία δείγματα υψηλότερη συγκέντρωση εμφανίζει αρχικά η 3-methyl-butanol-1 (με χαρακτηριστικό άρωμα μπανάνας) και ακολουθεί η phenylethyl alcohol (αρώματα τριαντάφυλλου). Η 3-hexenol (αρώματα γρασιδιού) εντοπίζεται μόνο στο δείγμα sc22, όπως επίσης η prenol (αρώματα φρούτων) και η 4-methyl-pentanol-1 (αρώματα καρύδας). Η 3-methyl-pentanol-1 (γήινο άρωμα) είναι η μόνη που ανιχνεύεται και στα τρία δείγματα αλλά δεν διαφέρει στατιστικά σε κανέναν οίνο.

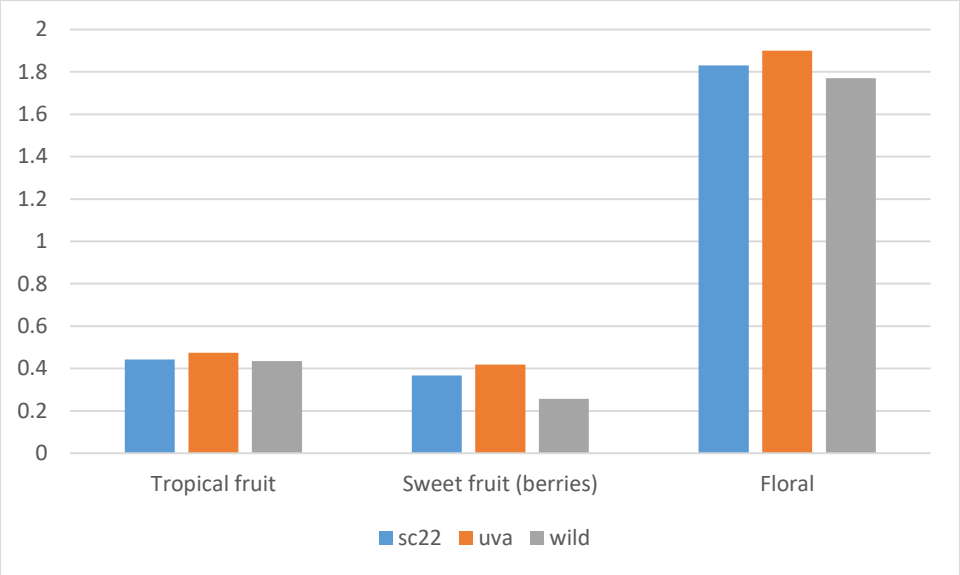
Στην κατηγορία των εστέρων εμφανίζονται αρκετοί ανώτεροι εστέρες, εκ των οποίων οι περισσότεροι φαίνεται να συμβάλλουν στον αρωματικό χαρακτήρα των οίνων με φρουτώδεις νότες. Ωστόσο φαίνεται να υπάρχουν και ορισμένοι που δεν είναι ξεκάθαρη η συμβολή τους στο αρωματικό προφίλ. Ανάμεσα στους τρεις οίνους δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τους εξής εστέρες: ethyl butanoate (άρωμα ανανά), ethyl hexanoate (φρουτώδες άρωμα), 2-phenyl ethyl acetate (άρωμα τριαντάφυλλου), 2-methyl ethyl propanoate, isoamyl lactate, isobutyl acetate (άρωμα φρούτων), hydroxy diethyl butanedioate και ethyl vanillate. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα και στα τρία δείγματα εμφανίζουν οι 2-hydroxy-ethyl propanoate (άρωμα κρέμας, καρύδας), όπου την μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζει το δείγμα uvarum και 3-methyl-butyl heptanoate, με μεγαλύτερη την συγκέντρωση στο δείγμα sc22.

Γενικά, παρατηρείται και εδώ ότι τους περισσότερους εστέρες εμφανίζει το δείγμα sc22, ενώ ο εστέρας με την μεγαλύτερη συγκέντρωση και στα τρία δείγματα σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους εστέρες είναι ο 2-hydroxy-ethyl propanoate. Το δείγμα wild (αυθόρμητη ζύμωση) δεν φαίνεται να υστερεί σημαντικά, σε σχέση με τα άλλα δύο ως προς την παρουσία και τις συγκεντρώσεις των εστέρων που προσδίδουν ευχάριστα αρώματα φρούτων.

Ταυτοποιήθηκαν επίσης λιπαρά οξέα τα οποία προσδίδουν έναν ελαιώδη χαρακτήρα αλλά και χαρακτηριστικά αρώματα τάγγισης. Αυτά που φαίνεται να διαφέρουν στατιστικά ανάμεσα και στα τρία δείγματα είναι κυρίως τα οξέα hexadecanoic και octadecanoic ακολούθως. Το δείγμα sc22 εμφάνισε την μικρότερη παρουσία και χαμηλότερη συγκέντρωση λιπαρών οξέων, ενώ το δείγμα wild την μεγαλύτερη.

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η acetoin με βουτυρώδη χαρακτήρα, η οποία διαφέρει στατιστικά ανάμεσα και στους τρεις οίνους, με τον οίνο uvarum να έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση και τον οίνο wild να ακολουθεί. Επίσης, η 2,3-pentanedione (αρώματα βουτύρου, καραμέλας) εμφανίζεται μόνο στα δείγματα sc22 και uvarum, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις τους.

Στην παρούσα μελέτη δεν έγινε οργανοληπτική αξιολόγηση των τελικών οίνων. Το διάγραμμα που ακολουθεί έχει ως σκοπό να αποδώσει συνοπτικά την σύγκριση του αρωματικού προφίλ μεταξύ των τριών οίνων με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν κατά την ανάλυση GC-FID.



Όπως φαίνεται ο ανθικός χαρακτήρας κυριαρχεί και στα τρία δείγματα, ενώ έπονται τα φρουτώδη αρώματα από τροπικά και γλυκά φρούτα. Το δείγμα uvarum φαίνεται να παρουσιάζει μικρή αύξηση και στις τρεις κατηγορίες αρωμάτων σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα.

Στην συνέχεια των αποτελεσμάτων παρατίθεται ο πίνακας ημιποσοτικού διαχωρισμού που καταρτίστηκε με βάση τα αποτελέσματα της αερίου χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας.

Καταγράφονται οι ενώσεις που εντοπίστηκαν σε ένα ή περισσότερα από τα τρία fractions (πεντανίου, διχλωρομεθανίου, μεθανόλης) αλλά δεν εντοπίστηκαν στο control (το δείγμα που δεν είχε προστεθεί εκχύλισμα μούστου-διαλύτη).

COMPOUND	CONTROL	PENTANE (Mean+Std Error)	CH2Cl2 (Mean+Std Error)	MeOH (Mean+Std Error)
ESTERS				
butyl acetate	-	0.19±0.01 b	0.03±0.01 a	0 a
ethyl laurate	-	0.23±0.01 b	0 a	0.03±0.01 a
farnesol acetate	-	0.02±0.01 a	0 a	0 a
ethyl palmitate	-	0.08±0.01 a	0 b	0.32±0.01 c
ethyl stearate	-	0.04±0.01 a	0 a	0.16±0.01 b
butyl formate	-	0 a	0 a	0.03±0.01 a
ethyl lactate	-	0 a	0 a	0.16±0.01 b
1-butanol-2methyl acetate	-	0 a	0 a	0.03±0.01 a
2-phenylethyl acetate	-	0 a	0 a	0.09±0.01 b
FATTY ACIDS				
linoleic acid	-	0.06±0.01 b	0 a	0 a
9-decenoic acid	-	0 a	0 a	0.19±0.01 b
MISCELLANEOUS				
2,4-dimethyl- Benzaldehyde	-	0.06±0.01 a	0.05± a	0 b
3-Penten-2-one	-	0 a	0 a	0.02±0.01 a
4-hydroxy- Benzeneethanol	-	0 a	0 a	0.06±0.01 b

Πίνακας 5

Οι ενώσεις που εντοπίστηκαν κατηγοριοποιήθηκαν σε εστέρες, λιπαρά οξέα και λοιπές ενώσεις. Το μεγαλύτερο ποσοστό αποτελούν οι εστέρες.

Όπως ήταν αναμενόμενο οι περισσότερες ενώσεις φαίνεται να συμπαρασύρθηκαν από τον διαλύτη μεγαλύτερης πολικότητας και πλησιέστερο χημικά ως προς την αιθανόλη, την μεθανόλη.

Η παρουσία των εστέρων στον οίνο προέρχεται όπως είναι γνωστό κυρίως από τον μεταβολισμό των ζυμών κατά την αλκοολική ζύμωση, αλλά ορισμένοι εστέρες υπάρχουν

σε μικρές ποσότητες και στο σταφύλι (*Ribéreau-Gayon, 2007*). Αυτή η ομάδα χημικών ενώσεων θεωρείται ως η κυρίαρχη υπεύθυνη για τις φρουτώδεις νότες του αρώματος των νεαρών οίνων και συγκεκριμένα οι αιθυλικοί εστέρες οργανικών οξέων βρίσκονται σε μεγαλύτερα ποσοστά, ακολουθούμενοι από τους οξικούς (acetates) και τους αιθυλικούς εστέρες των λιπαρών οξέων (*Etiévant, 1991, Rapp & Versini, 1996*).
Πιο συγκεκριμένα από τα ευρήματα της παραπάνω ανάλυσης στην συγκεκριμένη κατηγορία φαίνεται να ανήκει η ένωση butyl acetate, που εντοπίστηκε στο κλάσμα πεντανίου και διχλωρομεθανίου. Η ένωση αυτή ενυπάρχει φυσικώς στο σταφύλι σε μικρές ποσότητες και είναι υπεύθυνη για φρουτώδη οσμή (μπανάνας και μήλου). Επίσης η ένωση 2-phenyl ethyl acetate, η οποία απομονώθηκε στο κλάσμα της μεθανόλης, εντοπίζεται στα φρούτα σε μικρές ποσότητες και είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό άρωμα τριαντάφυλλου.
Η ένωση ethyl palmitate, προκύπτει από την εστεροποίηση της αιθανόλης με το παλμιτικό (εξαδεκανοϊκό) οξύ, το οποίο είναι το πιο κοινώς ευρισκόμενο λιπαρό οξύ στα φυτά.

Σημαντικό εύρημα φαίνεται να αποτελεί η ένωση farnesol acetate, η οποία εντοπίστηκε μόνο στο κλάσμα του πεντανίου. Η φαρνεσόλη είναι μία άκυκλη σεσκιτερπενική αλκοόλη με γλυκειά-λιπαρή οσμή η οποία όμως παράγεται φυσικά σε ελάχιστες ποσότητες. Παράγεται κατά την αποφωσφορυλίωση του farnesyl diphosphate (FPP), ενός ενδιαμέσου των ισοπρενοειδών (*C. Wanga, 2011).* Η παρουσία του farnesol acetate φαίνεται να προέρχεται από την εστεροποίηση της φαρνεσόλης -ως πρόδρομη αρωματική ένωση- με το οξικό οξύ.

Στην κατηγορία των λιπαρών οξέων ανήκουν το λινολεϊκό οξύ και το 9-δεκενοϊκό οξύ, τα οποία εντοπίστηκαν στο κλάσμα του πεντανίου και της μεθανόλης αντίστοιχα. Τα λιπαρά οξέα απαντώνται στο σταφύλι και συγκεκριμένα η σάρκα των φλοιών αλλά και των γιγάρτων φαίνεται να είναι ιδιαίτερα πλούσιες σε ενώσεις όπως αυτές.

Τέλος, εντοπίστηκαν και άλλες ενώσεις όπως οι 2,4-dimethylbenzaldehyde, 3-penten-2-one και 4-hydroxy benzeneethanol. Από αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές η τελευταία ένωση φαίνεται να εντοπίζεται σε αρκετές ποικιλίες σταφυλιών και οίνων που προέρχονται από αυτά ως πρόδρομη αρωματική ένωση (όπως εντοπίστηκε στην ποικιλία Verdelho-*F. Sonni et all, 2016*).

ΣΤ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η γηγενής ποικιλία Μούχταρο ως προς τις πτητικές ενώσεις και τις ενώσεις που συμμετέχουν στο ποικιλιακό της άρωμα. Έγιναν τρεις οινοποιήσεις με δύο διαφορετικές εμπορικές ζύμες καθώς και μια αυθόρμητη ζύμωση με σκοπό να μελετηθούν και να συγκριθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της και οι τεχνολογικές παράμετροί της σε σχέση με τις εμπορικές ζύμες. Μετά την ζύμωση έγιναν οι κλασσικές αναλύσεις, όπως ορίζονται από τις αρχές του OIV και τέλος προσδιορίστηκε το αρωματικό δυναμικό με τις μεθόδους της αέριας χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μάζας. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε η μέθοδος απομόνωσης και ταυτοποίησης πτητικών συστατικών και πρόδρομων αρωματικών ενώσεων της ποικιλίας Μούχταρο. Η μέθοδος περιελάμβανε εκχύλιση του μούστου με αιθανόλη και περαιτέρω κατεργασία του εκχυλίσματος με τρεις διαφορετικούς διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας. Τα κλάσματα προστέθηκαν σε γλεύκη όπου πραγματοποιήθηκε ζύμωση και κατόπιν εκχύλισης υγρού-υγρού ακολούθησε προσδιορισμός με GC-MS.

Οι τρεις διαφορετικές ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν εξίσου ικανοποιητικά, δίνοντας οίνους με αποδεκτά αποτελέσματα. Μετρήσεις με στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκαν μόνο στην περίπτωση της πτητικής οξύτητας, όπου οι αυτόχθονες ζύμες του σταφυλιού φαίνεται να έδωσαν αυξημένες τιμές. Επίσης, ο οίνος αυθόρμητης ζύμωσης είχε τον χαμηλότερο αλκοολικό τίτλο. Οι τιμές ολικής οξύτητας ήταν ιδιαίτερα υψηλές και στους τρεις οίνους παρόλο που μετά την αλκοολική, ακολούθησε και μηλογαλακτική ζύμωση.

Ως προς τον ποσοτικό προσδιορισμό του αρωματικού προφίλ των οίνων που πραγματοποιήθηκε με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση με GC-FID SPME δεν φαίνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές για τις ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν, με εξαίρεση την phenethyl alcohol και το ethyl caproate που εμφανίζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωσή τους στο δείγμα uvarum.

Από τον ημιποσοτικό προσδιορισμό που ακολούθησε τα αποτελέσματα της ανάλυσης με GC-MS, τα δείγματα sc22 και uvarum φαίνεται να εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό ανώτερων αλκοολών και εστέρων με ανθικά και φρουτώδη αρώματα, ενώ τελευταίος ακολουθεί ο οίνος wild.

Η γραφική απεικόνιση του αρωματικού προφίλ των οίνων συμφωνεί ότι τα αρώματα που διακρίνουν και τα τρία δείγματα είναι κυρίως αρώματα λουλουδιών και ακολούθως αρώματα τροπικών αλλά και γλυκών φρούτων.

Ως προς τα αποτελέσματα του ημιποσοτικού διαχωρισμού των πρόδρομων αρωματικών ενώσεων του Μούχταρου κατόπιν ανάλυσης με GC-MS, φαίνεται πως εντοπίστηκαν αρκετές ενώσεις στα γλεύκη που ζύμωσαν με τα εκχυλίσματα διαλυτών που προστέθηκαν, σε σχέση με τον μάρτυρα. Από τις ενώσεις αυτές, οι περισσότερες εμφανίστηκαν στο

κλάσμα της μεθανόλης, όπως ήταν αναμενόμενο. Ταυτοποιήθηκαν αρκετοί εστέρες και ορισμένα λιπαρά οξέα. Μερικές από τις ενώσεις αυτές φαίνεται να παρουσιάζουν κάποιο ενδιαφέρον ως πιθανές προδρομες μορφές αρωματικών ενώσεων με προέλευση το σταφύλι.

Συγκρινόμενη με την διεθνή βιβλιογραφία η συγκεκριμένη μελέτη ως προς το κομμάτι της απομόνωσης και ταυτοποίησης των πρόδρομων ενώσεων αρώματος, διαφοροποιήθηκε σε αρκετά σημεία. Όπως κατέδειξαν τα αποτελέσματα, ο πειραματικός σχεδιασμός θα έπρεπε να στηριχθεί στην κατεργασία μόνο φλοιών των σταφυλιών, όπου και βρίσκεται η πληθώρα των πρόδρομων ενώσεων που συμμετέχουν στο άρωμα, ιδίως δε οι γλυκοζυλιωμένες μορφές των τερπενίων. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν χαμηλής πολικότητας, ενώ σημαντικότερα ευρήματα θα μπορούσαν να αναδειχθούν με την επιλογή μιας πολικής στήλης. Τέλος, η χρήση μια ποικιλίας η οποία ανήκει στην κατηγορία των αρωματικών ποικιλιών (Μοσχάτες ποικιλίες) θα απέδιδε πιθανά ασφαλέστερα συμπεράσματα ως προς τις ενώσεις που προσπαθήσαμε να ταυτοποιήσουμε. Σε κάθε περίπτωση η μέθοδος η οποία διερευνήθηκε καθώς επίσης και το στέλεχος του Saccharomyces Cerevisiae (UCLM 325) το οποίο χρησιμοποιήθηκε φάνηκαν να ανταποκρίνονται στους σκοπούς της παρούσας μελέτης επαρκώς επιτυχημένα, καθώς το στέλεχος το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ξανά για ανάλογη μελέτη βρέθηκε να επιτελεί τον επιδιωκόμενο στόχο αντί της εξωγενούς προσθήκης ενζύμων.

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα και δεδομένου του ημιποσοτικού προσδιορισμού που έγινε σε όσες ενώσεις μπόρεσαν και ταυτοποιήθηκαν με την τεχνική GC-MS, με την μεθοδολογία απομόνωσης η οποία αναπτύχθηκε δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το αν η ποικιλία Μούχταρο ανήκει στις αρωματικές ποικιλίες.

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Ε. Σουφλερός, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, 2009
- Αμπελογραφία, Δημ. Ευστ. Σταύρακας, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, 2010

ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Handbook of Enology Volume 2, The chemistry of wine stabilization and treatments, P. Ribereau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, WILEY, 2006
- Free and hydrolytically released volatile compounds of Vitis Vinifera L.cv Fiano grapes as odour-active constituents of Fiano wine, M. Ugliano, L.Moio, 2008
- The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera, P. Hernandez-Orte et all, 2008
- Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria, P. Hernandez-Orte et all, 2009
- Grape aroma precursors in cv. Nebbiolo as affected by vine microclimate, A. Asproudi et all, 2016
- Identification of wine aroma in Moscato Giallo grape juice: A nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-mass spectrometry tandem study, E. Schievano et all, 2013
- Analysis of red grape glycosidic aroma precursors by glycosyl glucose quantification, M. Rosario-Salinas et all, 2012
- Fractionation of glycoside aroma precursors in neutral grapes. Hydrolysis and conversion by S. cerevisiae, M. Fernandez-Gonzalez et all, 2004
- A rapid method for quantifying aroma precursors: Application to grape extract, musts and wines made from several varieties, M. Arevalo Villena et all, 2006
- Chemical composition of volatile aroma metabolites and their glycosylated precursors that can uniquely differentiate individual grape cultivars, M.Ghaste et all, 2015

- Microbial production of farnesol (FOH): Current states and beyond, Chonglong Wanga, Jae-Yean Kim, Eui-Sung Choi, Seon-Won Kim,2011
- Characterisation of Australian Verdelho wines from the Queensland Granite Belt region, Francesca Sonni et all, 2016

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- http://www.leffingwell.com/odorthre.htm
- http://www.newwinesofgreece.com
- http://www.slideshare.net/9829686702/gc-ms-applications
- *http://www.cpeo.org/techtree/ttdescript/msgc.htm*
- *https://en.wikipedia.org/wiki/Flame_ionization_detector*
- https://www.google.gr/search?q=gc+fid+principle&espv=2&biw=1366&bih=638&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjC76Ojya7SAhUL7xQKHQNVCksQ_AUIBigB&dpr=1#imgrc=c2Tt2AwuTy7cvM: