



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ - ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



2017

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΖΩΤΟΥΧΟΥ ΘΡΕΨΗΣ ΤΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ
ΣΤΟ ΧΗΜΙΚΟ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΚΡΑΣΙΩΝ
ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ**

ΚΑΤΣΑΜΠΑ Α. ΦΩΤΕΙΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Αθήνα, 2017

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΖΩΤΟΥΧΟΥ ΘΡΕΨΗΣ ΤΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΟ ΧΗΜΙΚΟ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΚΡΑΣΙΩΝ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟ

Φωτεινή Α. Κατσάμπα

Εξεταστική Επιτροπή

Κοτσερίδης Γ., Αναπληρωτής καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας
Τροφίμων

Καλλίθρακα Στ., Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων

Μπιλάλης Δ., Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη διεξήχθη στο εργαστήριο Οινολογίας του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Αμπελουργίας - Οινολογίας», υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή Κοτσερίδη Γεώργιου, τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη, την υπομονή, τις συμβουλές καθώς και τη βοήθεια του, καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησεως της εργασίας μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα επίσης να δώσω στη κ. Καλλίθρακα για τη πολύτιμη βοήθειά της, προκειμένου να ολοκληρώσω το πρωτόκολλο του οργανοληπτικού ελέγχου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αξίζουν στη κ. Νίκη Προξενιά, χωρίς την οποία η διεξαγωγή της πτυχιακής μου θα ήταν πάρα πολύ δύσκολη. Οποιαδήποτε στιγμή τη χρειάστηκα ήταν εκεί για να με βοηθήσει και να μου προσφέρει τις γνώσεις της με απόλυτη υπομονή και προσήλωση. Είμαι ευγνώμων που γνώρισα ένα άνθρωπο με έντονα τα χαρακτηριστικά της ανιδιοτέλειας, της ηθικής και την επικοινωνιακής διάθεσης.

Ευχαριστώ επίσης τον Βουκίδη Γιάννη, ο οποίος έδειξε απίστευτη υπομονή μαζί μου μέχρι και τη τελευταία στιγμή και με βοήθησε όσο περισσότερο μπορούσε κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων αλλά και στη συνέχεια σε ότι άλλο χρειάστηκα κατά τη διάρκεια της συγγραφής, προσφέροντας τη γνώση και την εμπειρία του.

Ευχαριστώ τον κ. Μπιλάλη για τη συμμετοχή του ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής αλλά και για τις γνώσεις που μου προσέφερε κατά την διδασκαλία του μαθήματός του.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον παππού μου, που χωρίς αυτόν δε θα είχα τη δυνατότητα να ξεκινήσω τις μεταπτυχιακές σπουδές, αλλά και τους γονείς και τους φίλους μου, οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου και με στήριξαν σε κάθε βήμα και κάθε απόφασή μου, καθ' όλη τη περίοδο των σπουδών μου.

Περίληψη

Η ποικιλία **Ασύρτικο** αποτελεί μία ευγενή, λευκή ποικιλία του ελληνικού αμπελώνα, κέντρο καλλιέργειας της οποίας αποτελεί η θηραϊκή γη. Από τη ποικιλία Ασύρτικο παράγονται οίνοι υψηλής ποιότητας, λευκοί ξηροί, με υψηλό αλκοολικό τίτλο (12.8%-14%) και υψηλή οξύτητα (6.4 g/L σε τρυγικό οξύ με pH 2.9-3.1).

Η περιεκτικότητα του γλεύκους των σταφυλιών σε αφομοιώσιμο από τους ζύμες άζωτο, αποτελεί ένα κρίσιμο θρεπτικό συστατικό το οποίο έχει αποδειχθεί μη επαρκές σε στους αμπελουργικές περιοχές οι οποίες έχουν συμμετάσχει σε έρευνες, σε παγκόσμιο επίπεδο. Το άθροισμα των ελεύθερων αμινοξέων και του αμμωνιακού αζώτου παρέχει μία χρήσιμη εκτίμηση του αφομοιώσιμου αζώτου των ζυμών.

Στη παρούσα μελέτη, μούστος από τη συγκεκριμένη ποικιλία χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση στους **αζωτούχου θρέψης** με **οργανικό** και **ανόργανο άζωτο** στους **πτητικές** και **μη πτητικές ενώσεις** των παραγόμενων οίνων. Κατά τον εμβολιασμό, ο μούστος διαιρέθηκε σε 5 δεξαμενές στους οποίες προστέθηκαν 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις οργανικού αζώτου (0, 10, 20, 30, 40 g/hL), και κατά το 1/3 στους αλκοολικής ζύμωσης η κάθε δεξαμενή διαιρέθηκε ξανά σε στους 5, στους οποίες προστέθηκαν 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις ανόργανου αζώτου (0, 10, 20, 30, 40 g/hL). Στα δείγματα των τελικών οίνων διεξήχθησαν αναλύσεις pH και οξύτητας καθώς και προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου και αζώτου βασικών αμινοξέων. Για τον προσδιορισμό των πτητικών μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε η **μέθοδος GC-FID** ενώ για το προσδιορισμό των οργανικών οξέων, στους γλυκερόλης και στους αιθανόλης, χρησιμοποιήθηκε η **μέθοδος HPLC**. Τέλος, διεξήχθη και οργανοληπτικός έλεγχος, μόνο όσον αφορά τα αρωματικά χαρακτηριστικά.

Όσον αφορά στους **πτητικές ενώσεις** που αναλύθηκαν, οι περισσότεροι αιθυλικοί εστέρες των λιπαρών οξέων, φάνηκε να έχουν θετική συνάρτηση με την αύξηση του ποσοστού του ανόργανου αζώτου, ενώ παρατηρήθηκε μια σχετική μείωση στους συγκέντρωσής στους κατά το συνδυασμό οργανικού και ανόργανου αζώτου. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί ο εστέρας ethyl-2-methyl-butyrate, ο οποίος μειώθηκε με την αύξηση του ποσοστού του ανόργανου αλλά και του οργανικού

αζώτου. Παρατηρώντας τη μεταβολή των ανώτερων αλκοολών, οι διαφορετικές συνθήκες θρέψης φάνηκε να μην επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη συγκέντρωση στους 1-hexanol ενώ αντίθετα η συγκέντρωση στους phenyl-ethanol μειώθηκε κατά την αύξηση του ανόργανου αζώτου και αυξήθηκε κατά την αύξηση του οργανικού. Τέλος, όσον αφορά στους συγκεντρώσεις των οξικών εστέρων των ανώτερων αλκοολών, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του isoamyl acetate αυξήθηκε κατά τη θρέψη με τη μέγιστη ποσότητα ανόργανου αζώτου και μειώθηκε κατά τη θρέψη με οργανικό άζωτο ή το συνδυασμό και των δύο μορφών, ενώ η συγκέντρωση του phenethyl acetate ακολούθησε αυξητική πορεία κατά τη θρέψη και με στους δύο μορφές αζώτου.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα στους παρούσας μελέτης, έδειξαν εξάρτηση των περισσότερων **μη πτητικών μεταβολιτών** που παρήχθησαν κατά τη διάρκεια στους αλκοολικής ζύμωσης, κατά τη συμπλήρωση με άζωτο. Έτσι, οι συγκεντρώσεις οργανικών οξέων στους το κιτρικό, το μηλικό και το γαλακτικό, φάνηκαν να επηρεάζονται από στους αλλαγές στους ποσότητες και το είδος στους αζωτούχας θρέψης ενώ η συγκέντρωση στους γλυκερόλης παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη. Όσον αφορά το ποσοστό στους αιθανόλης των τελικών οίνων, φάνηκε ότι ούτε εκείνη επηρεάστηκε σε μεγάλο βαθμό από το είδος και τη συγκέντρωση του ανόργανου και του οργανικού αζώτου.

Τέλος, τα αποτελέσματα του **οργανοληπτικού ελέγχου** έδειξαν ότι υπάρχει διακριτή διαφορά στο άρωμα των οίνων μεταξύ στους μέγιστης και στους ελάχιστης συγκέντρωσης ανόργανου αζώτου για το δείγμα του αρχικού μούστου.

Λέξεις κλειδιά: Ασύρτικο, αζωτούχος θρέψη, ανόργανο και οργανικό άζωτο, πτητικές – μη πτητικές ενώσεις, μέθοδος HPLC, μέθοδος GC-FID, οργανοληπτικός έλεγχος

THE EFFECT OF NITROGENOUS SUPPLEMENT OF THE YEASTS ON THE CHEMICAL AND THE ORGANOLEPTIC PROFILE OF WINES MADE OF THE ASSYRTIKO VARIETY

Abstract

The **Assyrtiko** variety is a noble, white variety of the Greek vineyard, the center of its cultivation is the island of Santorini. From the Assyrtiko variety, are produced high quality white dry wines with high alcoholic strength (12.8%-14%) and high acidity (6.4 g/L in tartaric acid at pH 2.9-3.1).

The content of grape must in assimilable nitrogen, is a critical nutrient that has been proved to be inadequate in many viticultural regions that have participated in surveys on a global scale. The combination of the free amino acids and the ammonium nitrogen provides a useful estimate of the assimilable nitrogen of the yeasts.

In the present study, must from the Assyrtiko variety, was used to examine the effect of nitrogen nutrition with **organic and inorganic nitrogen** on the **volatile and non-volatile compounds** of the produced wines. During inoculation, the must was divided into 5 tanks in which 5 different concentrations of organic nitrogen (0, 10, 20, 30, 40 g/hL) were added, and during the 1/3 of the alcoholic fermentation each tank was divided again to another 5 tanks, in which 5 different concentrations of inorganic nitrogen (0, 10, 20, 30, 40 g/hL) were added. The samples of final wines were subjected to pH and acidity analysis, as well as to ammonium nitrogen and basic amino acid determination analysis. The **GC-FID method** was used to determine the volatile compounds while the **HPLC method** was used to determine the organic acids, the glycerol and the ethanol. Finally, organoleptic analysis was carried out only with regard to aromatic characteristics.

With regard to the volatile compounds analyzed, most fatty acid ethyl esters appeared to have a positive function with increasing the percentage of inorganic nitrogen, while a relative decrease in their concentration was observed when combining organic and inorganic nitrogen. The only exception is ethyl 2-methyl-

butyrate, which has been reduced by increasing the percentage of both inorganic and organic nitrogen. Observing the change in the higher alcohols, the different nutrition conditions did not appear to affect the concentration of 1-hexanol to a large extent, whereas the concentration of phenyl-ethanol decreased on increasing the inorganic nitrogen and increased on organic growth. Finally, with respect to concentrations of the higher alcohol acetate esters, it was observed that the concentration of isoamyl acetate was increased during nutrition with the maximum amount of inorganic nitrogen and decreased by nutrition with organic nitrogen or the combination of both forms. Phenethyl acetate followed a growing course during nutrition with both forms of nitrogen.

In addition, the results of the present study showed dependence of the most non-volatile compounds produced during alcoholic fermentation upon nitrogen supplementation. Thus, concentrations of organic acids such as citrate, malate and lactate appeared to be affected by the changes in the amounts and the type of **nitrogenous nutrition** while the glycerol concentration remained almost unchanged. Concerning the percentage of ethanol in final wines, it appeared that it was not influenced to a large extent by the type and concentration of inorganic and organic nitrogen.

Finally, the results of **organoleptic analysis** showed that there is a distinct difference in the aroma characteristics of wines, between the maximum and minimum concentration of inorganic nitrogen, for the sample of the control must.

Λέξεις κλειδιά: Assyrtiko, nitrogenous nutrition, inorganic and organic nitrogen, volatile and non-volatile compounds, HPLC method, GC-FID method, organoleptic analysis

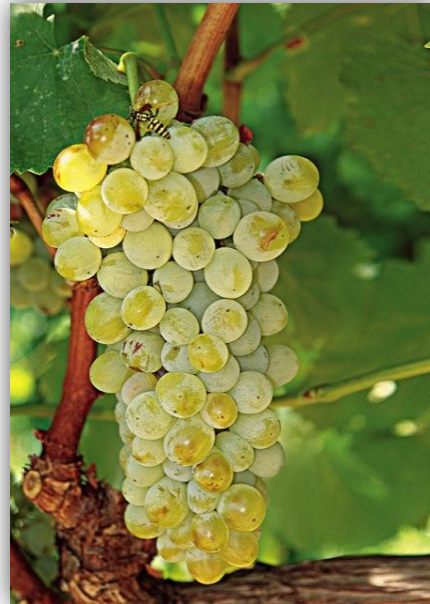
Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Η ποικιλία Ασύρτικο	1
1.1.1. Ο οίνος	1
1.2. Διαδικασία αλκοολικής ζύμωσης.....	2
1.2.1. Αλκοολική ζύμωση.....	2
1.2.2. Λευκή οινοποίηση	11
1.3. Στελέχη ζυμομυκήτων κατά την αλκοολική ζύμωση.....	14
1.4. Θρέψη ζυμομυκήτων κατά την αλκοολική ζύμωση.....	16
1.5. Οι πτητικές ενώσεις των οίνων	20
1.6. Οργανοληπτικές ιδιότητες οίνων	24
1.6.1. Η φυσιολογία στους όσφρησης.....	25
1.6.2. Δοκιμασίες διάκρισης.....	27
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	28
2.1. Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας.....	28
2.1.1. Σκοπός και σχεδιασμός πειράματος.....	28
2.2. Αναλύσεις.....	31
2.2.1. Αναλύσεις pH και ολικής οξύτητας.....	31
2.2.2. Προσδιορισμός αζώτου βασικών αμινοξέων	31
2.2.3. Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου.....	33
2.2.4. Μέθοδος υγρής-υγρής εκχύλισης αρωματικών συστατικών (liquid/liquid extraction)	34
2.3. Οργανοληπτικός έλεγχος.....	37
2.3.1. Πρωτόκολλο οργανοληπτικής διαδικασίας.....	37
3. Αποτελέσματα	40
3.1. Συγκέντρωση ανόργανου και οργανικού αζώτου στο δείγμα αρχικού μούστου.....	40
3.2. Αποτελέσματα βασικών παραμέτρων των τελικών οίνων	41
3.3. Πτητικά συστατικών των παραγόμενων οίνων.....	44
3.4. Προσδιορισμός οργανικών οξέων και γλυκερόλης μέσω HPLC.....	56
4. Οργανοληπτικός έλεγχος	63
4.1. Αποτελέσματα δοκιμής duo-trio	63
5. Συμπεράσματα	65
6. Βιβλιογραφία	67
7. Παράρτημα.....	71

1. Εισαγωγή

1.1. Η ποικιλία Ασύρτικο

Η ποικιλία Ασύρτικο αποτελεί την πλέον ευγενή, λευκή ποικιλία του ελληνικού αμπελώνα, κέντρο καλλιέργειας στους οποίους αποτελεί η θηραϊκή γη (Εικόνα 1). Ο αμπελώνας στους Σαντορίνης θεωρείται ο πιο ιστορικός σε όλη την Ελλάδα και ο πιο αρχαίος στην Ευρώπη. Η καλλιέργεια στους ποικιλίας θεωρείται μοναδική, παραδοσιακή και αυθεντική. Το νησί συγκεντρώνει το 70% των καλλιεργούμενων εκτάσεων στην Ελλάδα, περίπου 12,000-15,000



Εικόνα 1: Σταφυλή της ποικιλίας Ασύρτικο

στρέμματα. Η καλλιέργειά τους συναντάται στους και στα αμπελουργικά διαμερίσματα στους Δωδεκανήσου, των Κυκλάδων, στους Θεσσαλίας, στους Θράκης, στους Μακεδονίας, στους Πελοποννήσου, στους Στερεάς Ελλάδας και επιτρέπεται και στους νομούς Λασιθίου, Χίου, Λέσβου καθώς και στην Ικαρία. Πρόκειται για μία πολυδυναμική ποικιλία με άριστα γλευκογραφικά χαρακτηριστικά και μεγάλη δυνατότητα για εφαρμογή ποικίλων μεθόδων καλλιέργειας και οινοποίησης σε διάφορους βαθμούς τεχνολογικής ωριμότητας (Σταυρακάκης Μ., 2013).

1.1.1. Ο οίνος

Κατά την πλήρη ωρίμανση, η περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα είναι 250-260 g/L, η ολική οξύτητα 7-9.5 g/L σε τρυγικό οξύ, το pH 3.10-3.30 ενώ παρά το γεγονός ότι αποτελεί μια λευκή ποικιλία, διαθέτει πλούσια περιεκτικότητα σε τανίνες και ευοξειδωτες ουσίες. Από τη ποικιλία Ασύρτικο

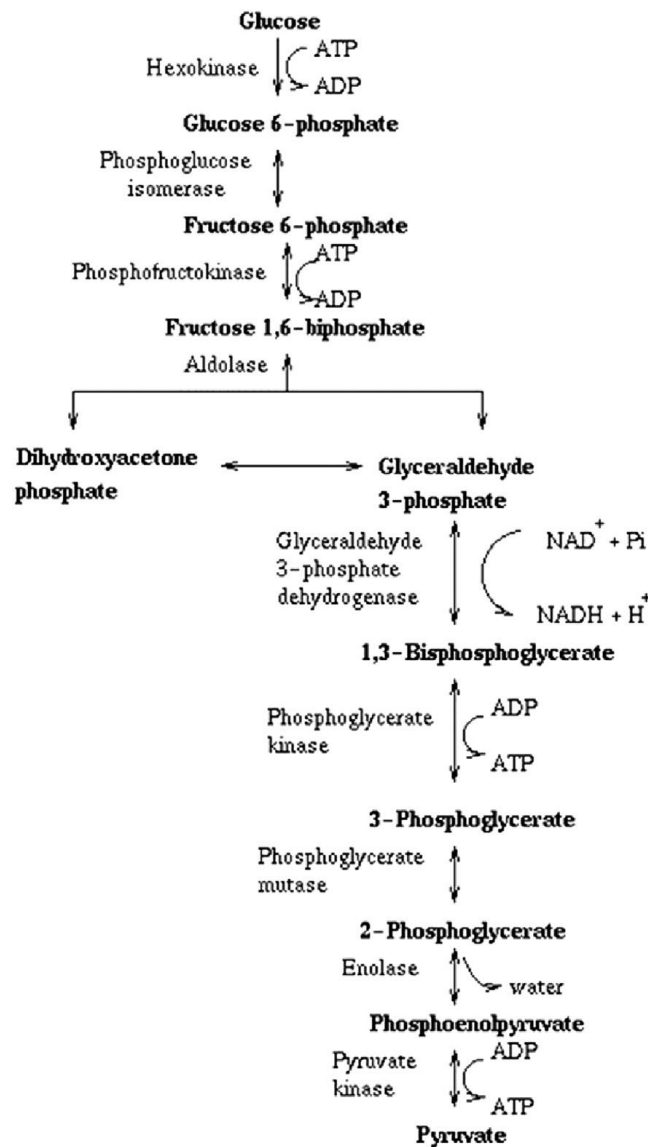
παράγονται οίνοι υψηλής ποιότητας, λευκοί ξηροί, με υψηλό αλκοολικό τίτλο (12.8%-14%), υψηλή οξύτητα (6.4 g/L σε τρυγικό οξύ, pH 2.9-3.1), με ευχάριστο άρωμα αλλά με τάση προς οξείδωση. Μεταξύ αυτών οι οίνοι Π.Ο.Π (π.(χ). Σαντορίνη Ασύρτικο), οι ημίγλυκοι οίνοι (Τοπικοί Οίνοι) και οι φυσικώς γλυκοί (π.(χ). Βινσάντο) (Σταυρακάκης Μ., 2013).

1.2. Διαδικασία αλκοολικής ζύμωσης

1.2.1. Αλκοολική ζύμωση

Ως αλκοολική ζύμωση χαρακτηρίζεται το βιοχημικό φαινόμενο κατά το οποίο πραγματοποιούνται ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξη ζυμών (βιολογικό φαινόμενο) καθώς και η μετατροπή σακχάρων σε αλκοόλη (χημικό φαινόμενο) και οφείλεται στα ένζυμα (ζυμάση) που περιέχουν τα κύτταρα των ζυμών. Συγκεκριμένα οι ζυμομύκητες καταναλώνουν τα σάκχαρα του γλεύκους (γλυκόζη, φρουκτόζη κ.α) και παράγουν αιθανόλη, CO₂ και μια σειρά δευτερευόντων προϊόντων (γλυκερόλη, οξικό οξύ, ακεταλδεΐδη, ανώτερες αλκοόλες, γαλακτικό οξύ κ.α) (Σουφλερός Ευ., 2012).

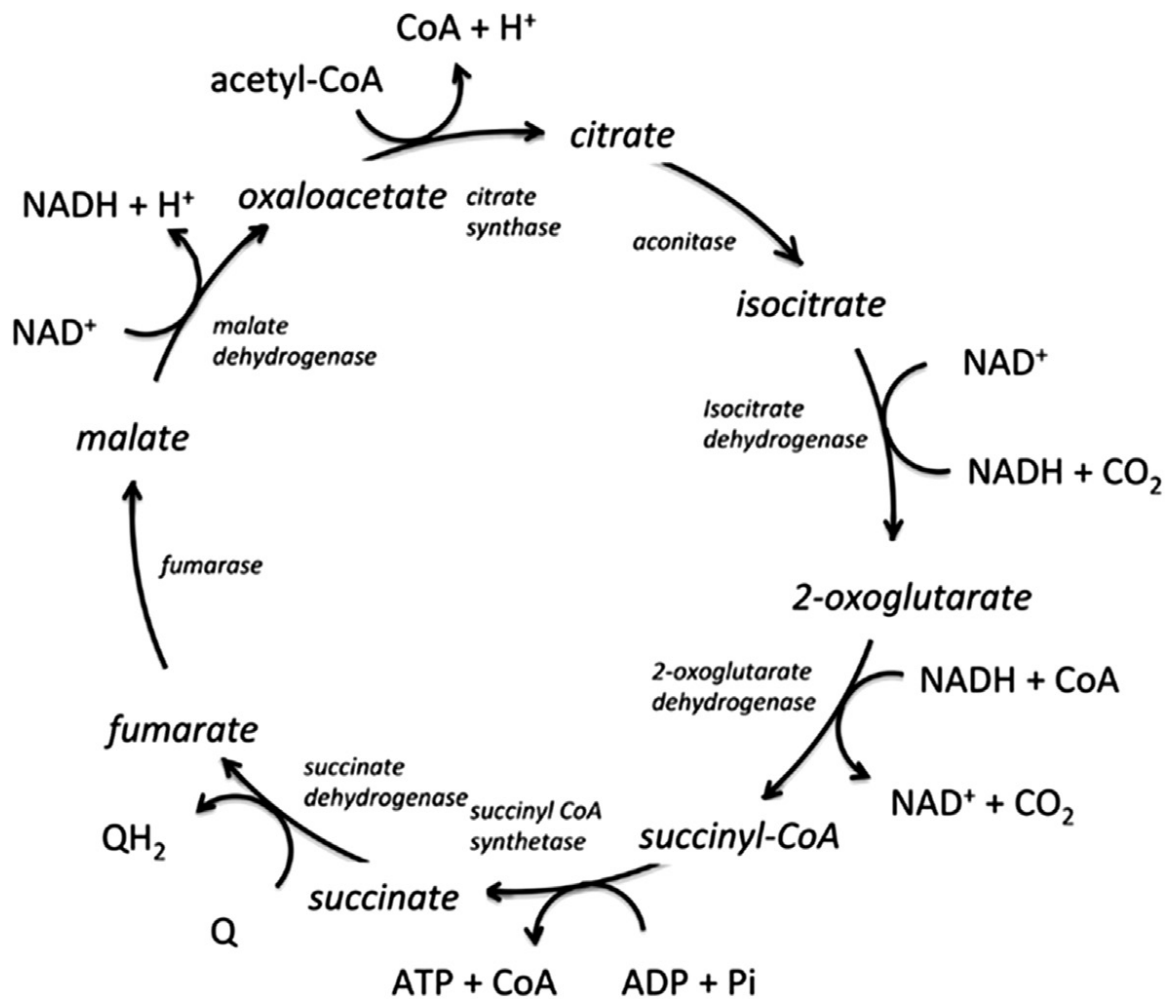
Γενικά, η γλυκολυτική οδός (Σχήμα 1) περιλαμβάνει τη μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό, μέσω μια σειράς αντιδράσεων που περιλαμβάνουν έναν αριθμό ενζύμων. Η διαδικασία μεταβολισμού της γλυκόζης για τη παραγωγή ενός οίνου περιλαμβάνει τρία στάδια, τη μεταφορά σακχάρων στο κύτταρα, τη φωσφορυλίωση, τη μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη και τέλος τη μετατροπή σε πυροσταφυλικό οξύ. Υπό αναερόβιες συνθήκες ωστόσο, η μεταφορά των σακχάρων αποτελεί το βασικό βήμα για τον έλεγχο της γλυκολυτικής ροής. Η γλυκόζη καταναλώνεται με ταχύτερο ρυθμό από τη φρουκτόζη στις περισσότερες ζυμώσεις. Η μεταφορά της γλυκόζης έχει επίσης συσχετιστεί με το βιομηχανικό στέλεχος του σακχαρομύκητα (*S. cerevisiae* (UCD 522)) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του σταφυλοχυμού (Rupasinghe H.P. Vasantha et al., 2016).



Σχήμα 1: Διάγραμμα ροής γλυκολυτικής οδού

Η γλυκόλυση απελευθερώνει σχετικά λιγότερο ποσοστό ενέργειας σε σχέση με την ενέργεια που παράγεται κατά την λειτουργία του κύκλου του κιτρικού οξέος ή του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA cycle) (Σχήμα 2) και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ακολουθώντας αυτή τη διαδρομή υπό αερόβιες συνθήκες, το πυρουβικό οξύ μετατρέπεται σε ακέτυλο-CoA μέσω του ενζύμου της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και έπειτα εισέρχεται στο κύκλο TCA. Μετά τη γλυκόλυση, το πυροσταφυλικό αποτελεί το κύριο μεταβολίτη από τον οποίο σχηματίζεται ένας μεγάλος αριθμός προϊόντων, από ένζυμα που βρίσκονται σε διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Στη περίπτωση του *S. cerevisiae* το

πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (Rupasinghe H.P. Vasantha et al., 2016).



Σχήμα 2: Κύκλος τρικαρβοξυλικών οξέων

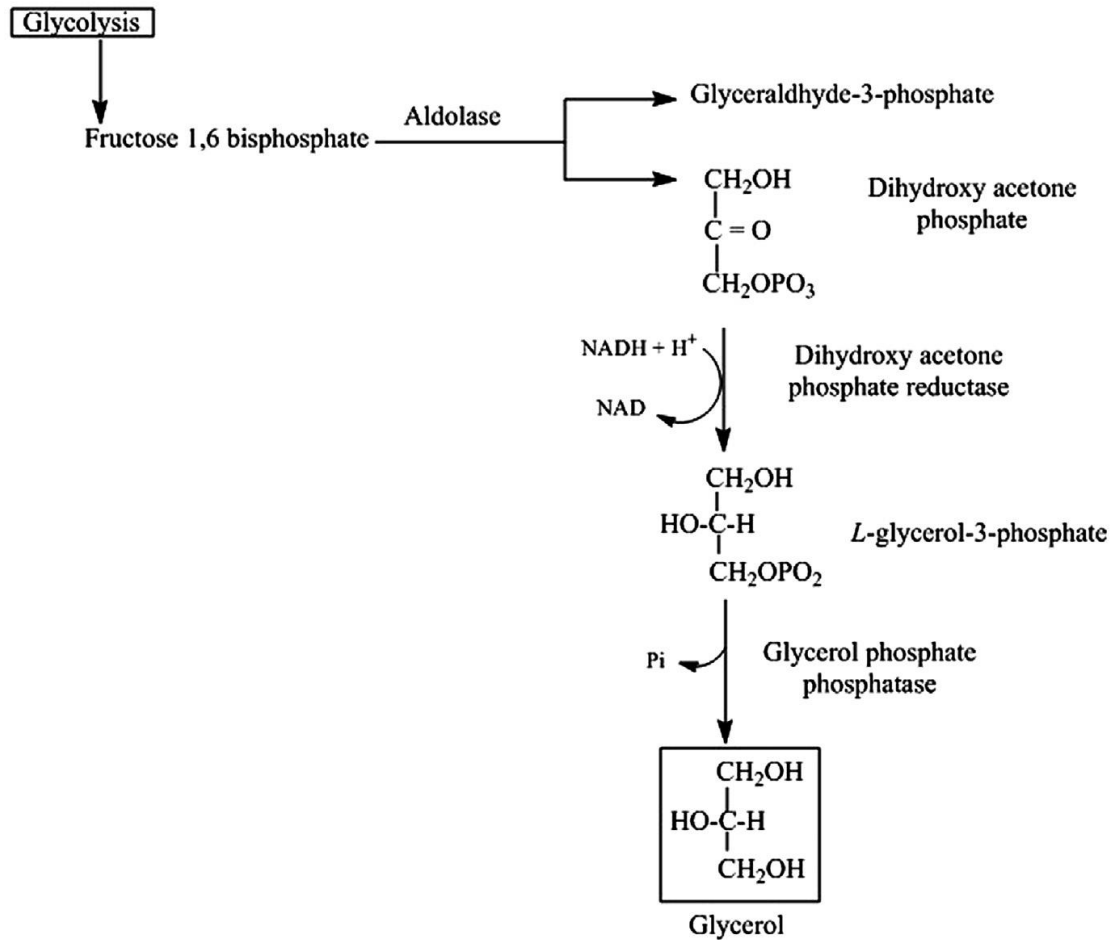
Μετά από το νερό, η αιθανόλη είναι η ένωση που βρίσκεται σε αφθονία στο κρασί. Ο αλκοολικός τίτλος ενός κρασιού εκφράζεται σε ισοδύναμα αλκοόλης ή αλλιώς σε περιεκτικότητα κατ' όγκο αλκοόλης. Η συγγένεια της αιθανόλης με το νερό καθώς και η διαλυτότητά της, αφού σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου, την κατατάσσει ως ένα ισχυρά αφυδατικό μέσο. Η ιδιότητα αυτή είναι χρήσιμη στην κροκίδωση υδρόφιλων κολλοειδών, πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών. Επίσης, προσδίδει στην αιθανόλη αντισηπτικές ιδιότητες (disinfectant properties) οι οποίες είναι ιδιαίτερα πολύτιμες για την παλαίωση των οίνων. Ο συνδυασμός αιθανόλης και χαμηλού pH, δύναται να διατηρήσει το κρασί αναλλοίωτο για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η προσθήκη αιθανόλης για τη σταθεροποίηση ορισμένων οίνων αφορά μία τεχνική μακράς παράδοσης. Ωστόσο, η αιθανόλη είναι τοξική για τον ανθρώπινο οργανισμό, επηρεάζοντας τα νευρικά κύτταρα και το συκώτι. Η θανατηφόρος δόση (LD₅₀) εκ του στόματος κατανάλωση είναι 1400 mg/kg σωματικού βάρους.

Η αιθανόλη έχει όλες τις χημικές ιδιότητες μιας λειτουργικής αλκοόλης. Πιο συγκεκριμένα, εστεροποιείται με τρυγικό, μηλικό και γαλακτικό οξύ. Ο οξικός αιθυλεστέρας προσδίδει στον οίνο μια δυσάρεστη οσμή και είναι σημάδι βακτηριακής επιμόλυνσης. Η αιθανόλη μπορεί επίσης να αντιδράσει και με αλδεΐδες, όχι όμως στα θειωμένα κρασιά καθώς ο θειώδης ανυδρίτης αντιδρά ισχυρά με την αιθανόλη παράγοντας μία ακετάλη. Επίσης, αντίδραση της αιθανόλης συμβαίνει και με το υδρόθειο που παράγεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ή από υπολείμματα ορισμένων προϊόντων επεξεργασίας του αμπελώνα. Η αντίδραση αυτή παράγει αιθανοδιόλη, η οποία έχει δυσάρεστη οσμή. Καθώς η ένωση αυτή είναι λιγότερο πτητική από το H₂S, είναι πιο δύσκολο να απομακρυνθεί. Γι' αυτό το λόγο συνίσταται η μετάγγιση του κρασιού μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης αλλά και της μηλογαλακτικής ζύμωσης, αφού το υδρόθειο μπορεί να παραχθεί και από γαλακτικά βακτήρια (με αυτό το τρόπο επιτυγχάνεται διαύγαση και σταθεροποίηση ενώ το κρασί αφήνεται να ωριμάσει πάνω στις οινολάσπες, αποφεύγοντας την παραγωγή δυσάρεστων οσμών). Τέλος, η οξειδωαναγωγική ανισορροπία μπορεί να οδηγήσει στη παραγωγή αιθανοθειόλης, προς το σχηματισμό διεθυλ-δισουλφιδίων. Οι ενώσεις αυτές είναι λιγότερο πτητικές και

μεταβάλλουν αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά καθώς είναι πολύ δύσκολο να απομακρυνθούν (*Ribereau-Gayon P. et al., 2006*).

Κατά τη αλκοολική ζύμωση από τον σακχαρομύκητα, εκτός από το νερό και την αιθανόλη, παράγεται και η γλυκερόλη, η οποία είναι πιθανώς η χημική ένωση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο κρασί (*Σχήμα 3*). Είναι το πιο σημαντικό παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Η ελάχιστη συγκέντρωση γλυκερόλης στο κρασί είναι 5 g/L, αλλά δύναται να φτάσει τιμές που κυμαίνονται στα 15-20 g/L, εξαρτώμενα από τις συνθήκες της οινοποίησης (ειδικά στα θειωμένα γλεύκη). Σταφύλια προσβεβλημένα από ευγενή σήψη, περιέχουν ήδη μερικά γραμμάρια γλυκερόλης, τα οποία προστίθενται στη ποσότητα που παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση. Η γλυκερόλη παράγεται από τις ζύμες κατά τα αρχικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Θεωρείται γενικά ότι παράγεται «με τα πρώτα 50 γραμμάρια σακχάρων που ζυμώνουν». Το γεγονός αυτό αντιστοιχεί στην έναρξη της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης. Ο μόνος τρόπος για να διασφαλιστεί η επαναοξειδωση του συνενζύμου $\text{NADH} + \text{H}^+$ είναι η μείωση της διυδροξη ακετόνης σε γλυκερόλη. Σε αυτό το στάδιο, τα επίπεδα αιθανάλης είναι πολύ χαμηλά για να λάβει μέρος η επαναοξειδωση, αλλά και για να υπάρξει παραγωγή αιθανόλης. Όταν ο μούστος υποβάλλεται σε υψηλή θείωση, το μόριο ενώνεται με την αιθανάλη αυξάνοντας έτσι το ρυθμό της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης και την ποσότητα της γλυκερόλης που παράγεται. Η γλυκερόλη στο κρασί μπορεί να δράσει ως θρεπτικό για την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών. Επίσης, ορισμένα επιβλαβή βακτήρια είναι ικανά να αποικοδομούν τη γλυκερόλη, με μία αντίδραση διπλής αφυδάτωσης και να παράξουν ακρολείνη. Η ακρολείνη αντιδρά με τις

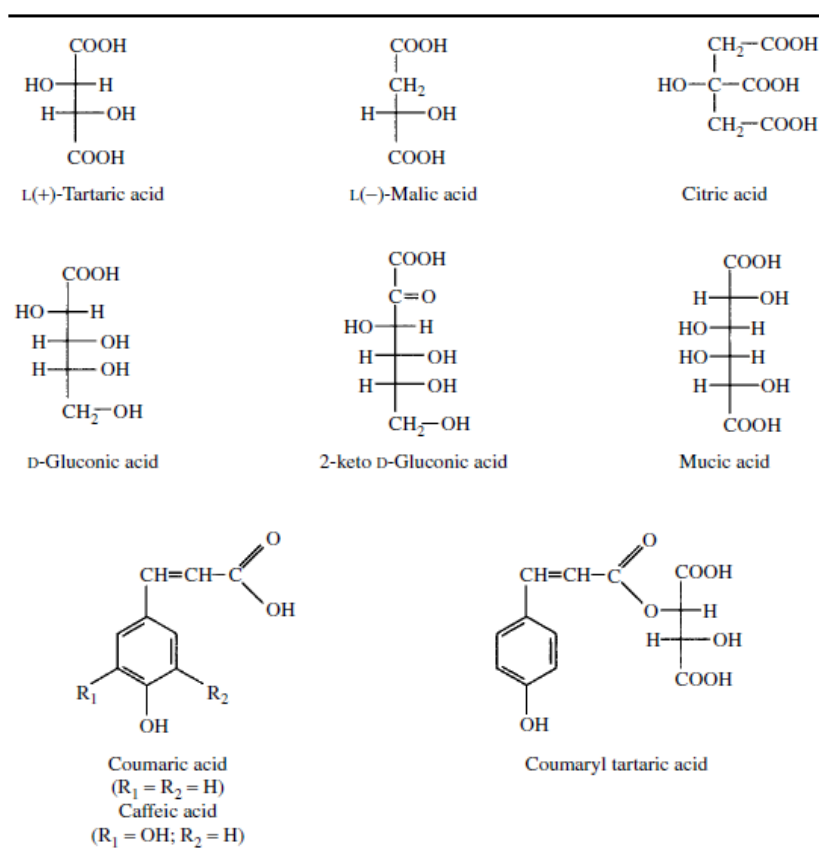
τανίνες ενισχύοντας την αίσθηση του πικρού. Λόγω της υψηλής της συγκέντρωσης, θεωρήθηκε ότι η γλυκερόλη μπορεί να επηρεάσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, δίνοντας την εντύπωση της πληρότητας (λόγω αυξημένου ιξώδους) και της απαλότητας όσον αφορά σώμα. Η γλυκερόλη έχει γλυκιά γεύση η οποία ενισχύει την γλυκάδα της αιθανόλης στα ξηρά κρασιά (Ribereau-Gayon P. et al., 2006).



Σχήμα 3: Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής γλυκερόλης (Goyal R.K., 1999)

Βασικά συστατικά των σταφυλιών και κατ' επέκταση του γλεύκους αποτελούν τα οργανικά οξέα, οι υδατάνθρακες, η ξηρή μάζα και τα ανόργανα συστατικά, οι αζωτούχες ενώσεις, οι φαινολικές ενώσεις και τέλος αλκοόλες και πτητικές ενώσεις που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Όσον αφορά στα οργανικά οξέα (Εικόνα 2) έχουν σημαντική συνεισφορά στη σύνθεση, την σταθερότητα και τις οργανοληπτικές ιδιότητες των οίνων και κυρίως στους λευκούς. Επιπλέον, οι ιδιότητές τους ως συντηρητικά, ενισχύουν τη μικροβιολογική και φυσικοχημική σταθερότητα των κρασιών. Έτσι οι λευκοί ξηροί οίνοι που δεν υποβάλλονται σε μηλογαλακτική ζύμωση (πλην ελαχίστων εξαιρέσεων), είναι πιο σταθερά τρυγικά. Επίσης, νέα κρασιά με υψηλές οξύτητες έχουν γενικά, υψηλό δυναμικό παλαίωσης (Ribereau-Gayon P. et al., 2006).



Εικόνα 2: Τα κύρια οργανικά οξέα στα σταφύλια

Τρυγικό οξύ

Το τρυγικό οξύ αποτελεί το κυρίαρχο οξύ στα άγουρα σταφύλια και στο μούστο. Η περιεκτικότητα του τρυγικού οξέος στο πράσινο σταφύλι ανέρχεται περίπου στα 15 g/L. Με τη πρόοδο της ωρίμανσης όμως, ένα μέρος του τρυγικού οξέος «καίγεται», ενώ το υπόλοιπο διαλύεται στις νέες ποσότητες νερού που διογκώνουν τις ράγες, έτσι ώστε η περιεκτικότητά του στο ώριμο σταφύλι να κατέρχεται στα 7.5 g/L περίπου. Ανάλογη πτώση των τρυγικών αλάτων (όξινο τρυγικό κάλιο και ουδέτερο τρυγικό ασβέστιο) γίνεται με την επίδραση του ψύχους του χειμώνα και τελικά η ποσότητα του τρυγικού οξέος στους οίνους σταθεροποιείται σε 1.5-4.5 g/L περίπου (Σουφλερός Ευ., 2012).

Μηλικό οξύ

Το μηλικό οξύ βρίσκεται σε όλους τους ζωντανούς ιστούς. Στο χυμό πράσινων σταφυλιών ακριβώς πριν την αλλαγή του χρώματος, η συγκέντρωση μπορεί να φτάσει τα 25 g/L. Κατά την έναρξη της ωρίμανσης, η συγκέντρωση του μηλικού μειώνεται κατά το ήμισυ (λόγω αραίωσης και καύσης). Κατά τη ωριμότητα, γλεύκη από βορειότερες περιοχές περιέχουν 4-6.5 g/L μηλικό οξύ ενώ σε νοτιότερες περιοχές οι συγκεντρώσεις φτάνουν μόνο στα 1-2g/L. Η ποσότητα του μηλικού οξέος στους οίνους κυμαίνεται από 0-4 g/L. Το μηλικό οξύ ασκεί σημαντική επίδραση στον οργανοληπτικό χαρακτήρα των οίνων, δίνοντας σ' αυτούς μια χορτώδη οσμή και γεύση και μια κάποια στυφάδα (Σουφλερός Ευ., 2012).

Κιτρικό οξύ

Το κιτρικό οξύ είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση και κυρίως σε όλα τα φρούτα. Έχει σημαντικό βιοχημικό και μεταβολικό ρόλο καθώς συμμετέχει στο κύκλο του Krebs, ενώ χρησιμοποιείται ευρέως από τις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών ως παράγοντας οξίνισης. Επίσης όσον αφορά τον οίνο, διαθέτει σε υψηλό βαθμό την ιδιότητα των υδροξυοξέων να διαλυτοποιούν το τρισθενή σίδηρο, έτσι ώστε να χρησιμοποιείται για τη προστασία από τα σιδηρικά θολώματα. Η συγκέντρωσή του στο γλεύκος και στον οίνο, πριν από τη μηλογαλακτική ζύμωση, κυμαίνονται μεταξύ των 0.5 και 1 g/L (ποσότητες της τάξεως των 0.8-1.0 g/L

οφείλονται κυρίως στη ευγενή σήψη από *Botrytis cinerea*) (Ribereau-Gayon P. et al., 2006; Σουφλερός Ευ., 2012).

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής και μηλογαλακτικής ζύμωσης μέσω των μεταβολικών μονοπατιών, παράγονται και δευτερεύοντα οξέα (πτητικά και μη) τα οποία επίσης επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων. Μερικά από αυτά αναλύονται παρακάτω:

Οξικό οξύ

Αποτελεί το 90-95% της πτητικής οξύτητας και παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από βακτηριακές προσβολές των οίνων, το μέγεθος της περιεκτικότητας του οποίου αποτελεί κριτήριο για την υγιεινή κατάσταση αυτών. Η παρουσία του οξικού οξέος στους οίνους, πέρα από μια ορισμένη ποσότητα (0.3 g/L), υποβαθμίζει τα χαρακτηριστικά αυτών, προσδίδοντας δυσάρεστη οσμή και γεύση ξυδιού (> 1 g/L) (Σουφλερός Ευ., 2012).

Ηλεκτρικό οξύ

Το ηλεκτρικό οξύ παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων και η μεγαλύτερη ποσότητα αυτού σχηματίζεται κυρίως κατά την αρχή της ζύμωσης. Η περιεκτικότητα του ηλεκτρικού οξέος στους οίνους ανέρχεται σε 0.5-1.5 g/L και βρίσκεται σε αναλογία 1/100 (κατά βάρος) με την αλκοόλη. Το συγκεκριμένο οξύ είναι πολύ ανθεκτικό στις βακτηριακές προσβολές και ασκεί σπουδαία επίδραση στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων καθώς η γεύση του συνδυάζει το πικρό, το ξινό και το αρμυρό (Σουφλερός Ευ., 2012).

Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ είναι το μόνο από τα οργανικά οξέα που συναντάται στους οίνους και όχι στα γλεύκη. Το γαλακτικό οξύ συναντάται στους οίνους σε δύο ισομερή, το (D-) ισομερές και το (L+) ισομερές και έχει τριπλή προέλευση: α) από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Με το τρόπο παράγεται κυρίως (D-) γαλακτικό σε ποσότητες 0.1-0.4 g/L ενώ το L+ παράγεται σε ίχνη, β) από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη μετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό έως και 3

g/L, γ) από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη προσβολή των σακχάρων, της γλυκερίνης και του τρυγικού οξέος. Εάν διαπιστωθεί ότι το γαλακτικό οξύ που περιέχεται στον οίνο προέρχεται από την αλκοολική ζύμωση τότε κυριαρχεί η μορφή του (D-) ισομερούς ενώ αντίθετα αν κυριαρχεί η μορφή του (L+), τότε έχει λάβει χώρα μηλογαλακτική ζύμωση. Όταν όμως στον οίνο κυριαρχούν και οι δύο μορφές και σε ποσότητες μεγαλύτερες από τα προβλεπόμενα για το εκάστοτε ισομερές όρια, τότε πρόκειται για προσβολή σακχάρων από γαλακτικά βακτήρια ή και άλλων ακόμη συστατικών του οίνου. Το γαλακτικό οξύ είναι το περισσότερο χημικώς και βιολογικώς σταθερό οργανικό οξύ του οίνου και γι' αυτό το λόγο δύναται να χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της οξύτητας ορισμένων οίνων (Σουφλερός Ευ., 2012).

1.2.2. Λευκή οινοποίηση

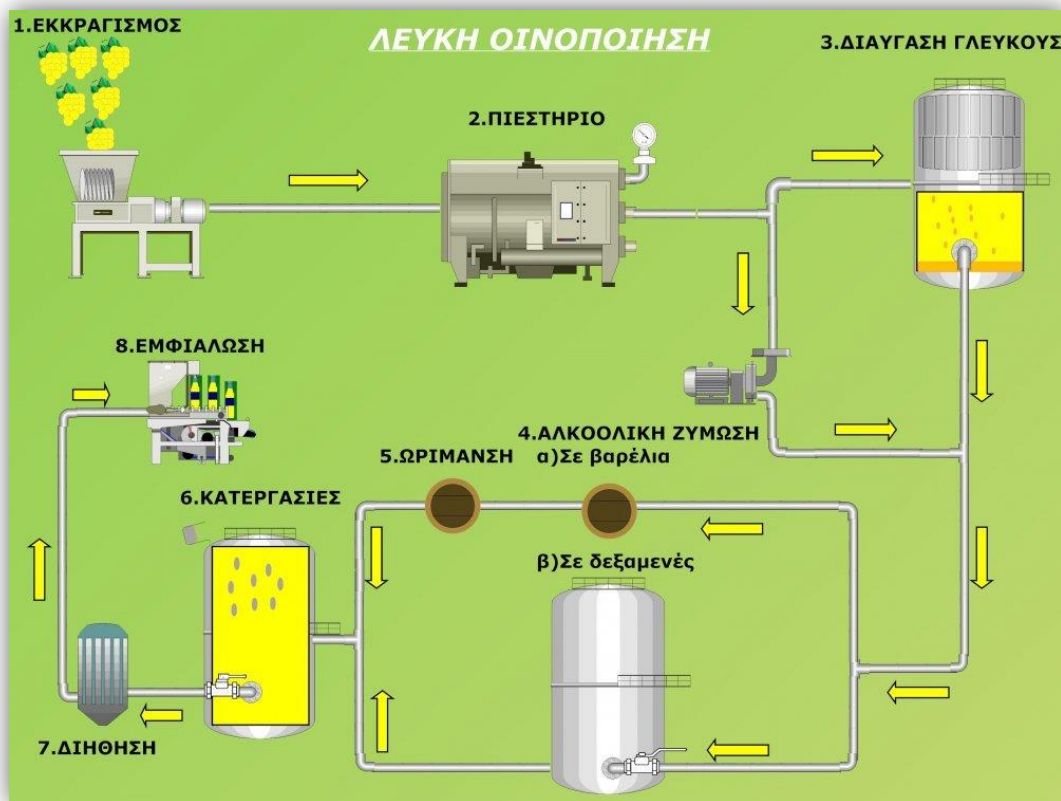
Παρόλο που τα κόκκινα κρασιά δημιουργούνται μέσω αλκοολικής ζύμωσης μούστων υπό τη παρουσία και των στέρεων μερών της ράγας (φλοιός και γίγαρτα), τα λευκά κρασιά παράγονται αποκλειστικά με τη ζύμωση του σταφυλοχυμού. Έτσι, στη παραγωγή των λευκών οίνων, η εκχύλιση του χυμού και οι ποικίλοι τρόποι απολάσπωσης, προηγούνται της αλκοολικής ζύμωσης. Η λευκή οινοποίηση διακρίνεται σε σχέση με την ερυθρή εξαιτίας της απουσίας επαφής του φλοιού με το μούστο κατά την αλκοολική φάση και δεν έχει να κάνει σχέση με το χρώμα του σταφυλιού. Έτσι λευκά κρασιά μπορούν να παραχθούν και από κόκκινα σταφύλια, εάν τα σταφύλια πιέζονται σε συνθήκες που εμποδίζουν την επαφή των ανθοκυανινών των φλοιών, οι οποίες δίνουν χρώμα στο μούστο. Το είδος των παραγόμενων οίνων καλείται *blancs de noirs*. Στην λευκή οινοποίηση, οι συνθήκες για την εκχύλιση των συστατικών της ράγας είναι εντελώς διαφορετικές καθώς η διαβροχή λαμβάνει μέρος πριν την αλκοολική ζύμωση. Σ' αυτή τη περίπτωση, οι προ-ζυμωτικές κατεργασίες επηρεάζουν την εκχύλιση ενώσεων οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Η ποιότητα των ξηρών λευκών οίνων, λοιπόν, εξαρτάται από την ποιότητα της πρώτης ύλης, το επίπεδο ωριμότητας των σταφυλιών καθώς και την ιδιαίτερη μεταχείριση του μούστου.

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι ο αρωματικός χαρακτήρας οφείλεται κυρίως στα πρωτογενή αρώματα που προέρχονται από την εκάστοτε ποικιλία του σταφυλιού, ενώ η ισορροπία μεταξύ οξύτητας και απαλότητας, η ένταση των αρωμάτων και το σώμα, είναι στοιχεία που συμβάλλουν στην εκτίμηση της ποιότητας των λευκών οίνων (Ribereau-Gayon P. et al., 2006).

Τα στάδια της λευκής οινοποίησης ακολουθούν την εξής σειρά (Σχήμα 4):

- Αρχικά γίνεται ο σωστός προσδιορισμός του τρύγου, όταν η περιεκτικότητα σε σάκχαρα και η ολική οξύτητα είναι στα επιθυμητά επίπεδα. Όταν η ολική οξύτητα βρίσκεται στα 6.5-7.5 g/L σε τρυγικό οξύ, η ζύμωση ευνοείται, καθώς ένα μεγάλος αριθμός παθογόνων και διαφόρων μικροοργανισμών που προκαλούν ασθένειες στους οίνους δεν δρα σε αυτή την οξύτητα. Σημαντική παράμετρος για την έναρξη του τρύγου αποτελεί επίσης και η τιμή της ενεργής οξύτητας (pH). Στα γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια επιθυμητής ωριμότητας, το pH κυμαίνεται μεταξύ 3.2 - 3.5. Στις τιμές αυτές είναι δύσκολο να δράσουν βακτήρια ή άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί.
- Ανάλογα με το στυλ οινοποίησης, οι ράγες μπορούν ή όχι να απομακρυνθούν από τους βόστρυχες. Οι τανίνες που περιέχονται στους βοστρύχους σε ποσοστά 2.5-3.5% έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες.
- Προαιρετικό επίσης στάδιο αποτελεί και η διαδικασία skin maceration κατά την οποία υπάρχει επαφή των φλοιών με τον σταφυλοχυμό υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Μία ειδικά προσαρμοσμένη δεξαμενή γεμίζει με ελαφρώς συνθλιμμένες ράγες και μετά από κάποιες ώρες συλλέγεται ο μούστος. Το στέρεο υπόλειμμα οδηγείται στο πιεστήριο.
- Τα σταφύλια, είτε μετά την αποβοστρύχωσή τους (έχουν απομακρυνθεί οι ράγες από τους βόστρυχες με τη βοήθεια του εκραγιστηρίου) είτε κατευθείαν, εισέρχονται στο πιεστήριο. Το γλεύκος που παραλαμβάνεται χωρίς πίεση αποτελεί τον πρόρωγο, από τον οποίο παράγονται οίνοι ποιότητας και αποτελεί περίπου το 60% του συνολικού γλεύκους. Από τις δεύτερες πιέσεις, λαμβάνεται το γλεύκος που προέρχεται από τη κεντρική ζώνη της σάρκας, το οποίο περιέχει λιγότερα σάκχαρα και μεγαλύτερο ποσοστό οξέων, γεγονός που μεταβάλλει αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων.

- Η απολάσπωση, κρίνεται απαραίτητη για τη ποιοτική βελτίωση των οίνων και αποτελεί το διαχωρισμό των οινολασπών από τον καθαρό μούστο. Η διαδικασία αποτελεί το στάδιο κατά το οποίο ο ψυχόμενος μούστος (θερμοκρασίες κάτω των 10 °C) έχει χρόνο να ηρεμίσει πριν τη ζύμωση και να καταβυθίσει την οινολάσπη στο πυθμένα προσβλέποντας σε οίνους με καθαρότερο άρωμα, σταθερότερο χρώμα και λιγότερη ευαισθησία σε οξειδώσεις. Διαρκεί περίπου 12-24 ώρες και μπορεί να γίνει είτε με στατική απολάσπωση, είτε με φυγοκέντρηση, είτε με επίπλευση.
- Η κατεργασία του μούστου με μπεντονίτη προτείνεται σε μούστους που πρόκειται να απολασπωθούν μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Πρόσθετες επεξεργασίες του μούστου κατά το στάδιο εκείνο καλό θα ήταν να αποφεύγονται καθώς στρεσάρουν τον οίνο. Ωστόσο, οίνοι που είναι ασταθείς, απαιτούν επιπρόσθετη κατεργασία με μπεντονίτη πριν την εμφιάλωσή τους.
- Ακολουθεί ο εμβολιασμός του καθαρού μούστου με την κατάλληλη, για το στυλ οινοποίησης, ζύμη και προσθήκη θρεπτικών συστατικών. Ακολουθεί η αλκοολική ζύμωση υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας (για λευκή οινοποίηση οι θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 16-20 °C).
- Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, η οποία προσδιορίζεται από την αποζύμωση των σακχάρων (λιγότερα από 1.5 g/L), ακολουθεί μετάγγιση σε δεξαμενή με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και θείωση του οίνου καθώς και οι απαραίτητες κατεργασίες πρωτεϊνικής και τρυγικής σταθεροποίησης.
- Η διαύγαση το τελικό στάδιο πριν την εμφιάλωση του οίνου, ενώ προαιρετική μπορεί να είναι και η χρήση δρύινου βαρελιού για ωρίμανση.
- Τελικό στάδιο αποτελεί η εμφιάλωση.
(*Ribereau-Gayon P. et al., 2006; Σουφλερός Ευ., 2012; Τσέτουρας.,2008*)



Σχήμα 4: Διαδικασία λευκής οινοποίησης

1.3. Στελέχη ζυμομυκήτων κατά την αλκοολική ζύμωση

Η ιστορία της αμπελουργίας και της οινοποίησης έχει βαθιές ρίζες στα βάθη των χιλιετιών και είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ιστορία της ανθρωπότητας. Τα παλαιότερα αρχαιολογικά στοιχεία σχετικά με την άνοδο της παραγωγής ζυμούμενων προϊόντων βασισμένων στο ρύζι, το μέλι και τα φρούτα, βρέθηκαν στη Κίνα σε τάφους που χρονολογούνται από το 7000 π.Χ. Δεδομένα χημικών αναλύσεων επιβεβαιώνουν το ξεκίνημα της οινοποίησης από το 5400 π.Χ., ενώ τα δεδομένα για τη χρήση ζυμών κατά την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης των οίνων στην αρχαία Αίγυπτο, χρονολογούνται το 3150 π.Χ. Από την Αίγυπτο και τη Μεσοποταμία, η παραγωγή ζυμούμενων αλκοολούχων ποτών διαδόθηκε στην Ευρώπη και τον Νέο Κόσμο. Ο ρόλος των ζυμών κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης καθιερώθηκε από τον Pasteur το 1860. Στις αρχές του 1980, ο Emil Christian

Hansen του εργαστηρίου της Carlsberg, απομόνωσε την πρώτη καθαρή καλλιέργεια ζύμης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο για την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης μούστου. Η πρακτική αυτή άρχισε να εξαπλώνεται στα μέσα του 20^{ου} αιώνα ενώ η εμπορική παραγωγή κρασιού σ' όλο το κόσμο βασίστηκε στην χρήση κινητών καλλιέργειας. Η προσεκτική χρήση επιλεγμένων εμπορικών στελεχών ζυμομυκήτων βελτίωσε σημαντικά τον έλεγχο και την αξιοπιστία της αλκοολικής ζύμωσης των οίνων, περιόρισε την ανάπτυξη μη επιθυμητών μικροβιακών στελεχών κατά τη διάρκειά της και συνέβαλε σημαντικά στην βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των παραγόμενων οίνων.

Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται για τη σύγχρονη οινοποίηση, όπως ο *Saccharomyces cerevisiae*, πρέπει να πληρούν ορισμένες συγκεκριμένες ιδιότητες όπως:

- ✓ Γρήγορη έναρξη αλκοολικής ζύμωσης
- ✓ Υψηλή αποτελεσματικότητα αλκοολικής ζύμωσης
- ✓ Υψηλή αντοχή στην αιθανόλη και θειώδη
- ✓ Υψηλή ωσμωτική αντίσταση
- ✓ Χαμηλή βέλτιστη θερμοκρασία
- ✓ Μέτρια παραγωγή βιομάζας
- ✓ Χαμηλή παραγωγή σουλφιδίων, θειολών, πτητικών οξέων, ανώτερων αλκοολών και βιογενών αμινών
- ✓ Ικανότητα απελευθέρωσης γλυκοσιδικών δεσμών
- ✓ Ικανότητα αυτόλυσης
- ✓ Χαμηλή παραγωγή αφρού και υψηλή παραγωγή συμπαγών ιζημάτων

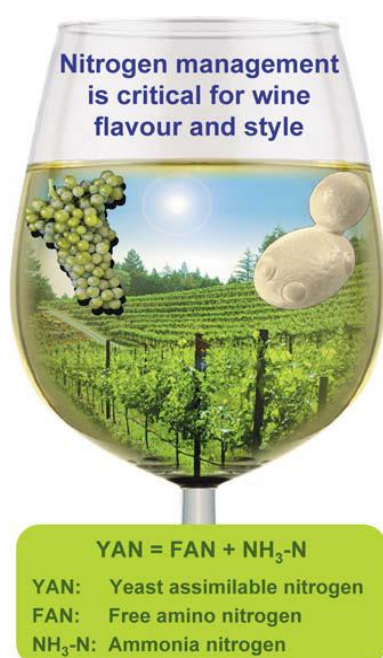
Τα βακτηριακά στελέχη των σταφυλιών αποτελούν περισσότερα από 50 είδη τα οποία ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των πρωτεοβακτηρίων. Η αναλογία μεταξύ της μικροχλωρίδας ζυμών και βακτηρίων καθώς και στελεχών *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces*, εξαρτάται από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες και είναι σημαντική για τις χημικές και οργανοληπτικές αλλαγές οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, επηρεάζοντας τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Η παρουσία νηματωδών μυκήτων από τα γένη *Aspergillus* και *Penicillium* σε μολυσμένα σταφύλια (ωίδιο, βοτρυτής), είναι ανεπιθύμητη καθώς μπορεί να οδηγήσει στη παραγωγή μυκοτοξινών οι οποίες έχουν δυσάρεστες οσμές και γεύσεις. Κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, η μικροχλωρίδα του μούστου αντιπροσωπεύεται κυρίως από

τα φυσιολογικά υπάρχοντα είδη τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλή αντίσταση στην αιθανόλη, όπως τα είδη *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Candida* και μερικά στελέχη του *S. cerevisiae*. Στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, η ποσότητα της μικροχλωρίδας του οίνου μεταβάλλεται δραματικά: ο πληθυσμός του *S. cerevisiae* κυριαρχεί έναντι ζυμών ευαίσθητων στην αιθανόλη καθώς και βακτηρίων και μυκήτων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο πλεονέκτημα του σακχαρομύκητα να προσαρμόζεται στην υψηλή ταχύτητα της ζύμωσης, το υψηλό ποσοστό αιθανόλης και τις αναερόβιες συνθήκες. Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα που τον οδήγησε στην καλύτερη κατανόηση της εξέλιξης και της μορφολογίας του για την χρήση του στην οινοποίηση, είναι η ικανότητα αλκοολικής ζύμωσης υπό αερόβιες συνθήκες (Eldarov M.A et al., 2016).

1.4. Θρέψη ζυμομυκήτων κατά την αλκοολική ζύμωση

Το άζωτο αποτελεί το πλέον άφθονο μακροστοιχείο του εδάφους της αμπέλου και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές λειτουργίες της αμπέλου και των ζυμομυκήτων που εμπλέκονται στην αλκοολική ζύμωση του οίνου. Παρόλα αυτά σε πολλές αμπελουργικές περιοχές ανά τον κόσμο, η περιορισμένη διαθεσιμότητα αζώτου δημιουργεί προβλήματα απορρόφησης του από τη ράγα. Τα σταφύλια περιέχουν μία ποικιλία αζωτούχων ενώσεων εκ των οποίων οι πιο σημαντικές είναι τα α-αμινοξέα, τα αμμωνιακά ιόντα και τα ολιγοπεπτίδια. Η προλίνη αποτελεί το κυρίαρχο αμινοξύ σε πολλές ποικιλίες σταφυλιών και δεν μπορεί να μεταβολιστεί υπό αναερόβιες συνθήκες. Αυτές οι αζωτούχες ενώσεις, εκτός από τη προλίνη, αποτελούν το αφομοιώσιμο άζωτο (yeast assimilable nitrogen, YAN) των ζυμών (Εικόνα 3). Συνεπώς η απουσία του συγκεκριμένου μακροστοιχείου σχετίζεται με τις ποικίλες πολύπλοκες βιολογικές διεργασίες τόσο στο αμπέλι όσο και στην οινοποίηση, γεγονός που οδηγεί στη μεταβολή της ποιότητας και του αρώματος του οίνου. Γλεύκη φτωχά σε άζωτο δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, γεγονός που έχει αρνητική επίπτωση στην ποιότητα του οίνου. Χαμηλή βιομάζα ζυμομυκήτων οδηγεί σε χαμηλό μεταβολικό ρυθμό, ο οποίος αποτελεί απόδειξη αργής ή μη-ολοκληρωμένης ζύμωσης. Μία επιθυμητή

ποσότητα YAN προωθεί τη σωστή εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης και την παραγωγή ποιοτικών οίνων (Vilanova Mar et al., 2015). Η περιεκτικότητα του γλεύκους των σταφυλιών σε αφομοιώσιμο από τις ζύμες άζωτο, αποτελεί ένα κρίσιμο θρεπτικό συστατικό το οποίο έχει αποδειχθεί μη επαρκές σε πολλές αμπελουργικές περιοχές οι οποίες έχουν συμμετάσχει σε έρευνες, σε παγκόσμιο επίπεδο. Επειδή τα αμινοξέα είναι χημικώς διαφοροποιημένα μόρια, ο πιο εύκολος τρόπος μέτρησης του αφομοιώσιμου αζώτου σχετίζεται με τον προσδιορισμό των ελεύθερων ή α-αμινοξέων και συνήθως αναφέρεται ως ελεύθερο άζωτο αμινοξέων (FAN).



Εικόνα 3: Το άθροισμα των ελεύθερων αμινοξέων και του αμμωνιακού αζώτου παρέχει μία χρήσιμη εκτίμηση του αφομοιώσιμου αζώτου των ζυμών

Υπάρχουν αρκετές χημικές, ενζυμικές και φυσικές μέθοδοι οι οποίες είναι διαθέσιμες αλλά συνήθως χρησιμοποιείται η μέθοδος της o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine (NOPA) (Maurizio Ugliano., 2007). Οι ζύμες μπορούν να αφομοιώσουν περίπου 400 mgN/L σε γλεύκη πλούσια σε άζωτο ενώ η ελάχιστη συγκέντρωση προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος για μία μη επιτυχή ζύμωση είναι περίπου 140 mgN/L, όπως έχει εδραιωθεί από διάφορες πειραματικές μελέτες. Συγκέντρωση που υπερβαίνει τα 140 mgN/L, θεωρείται γενικά το κατώφλι για την ολοκλήρωση μιας αλκοολικής ζύμωσης με χαμηλό ρίσκο εμφάνισης υψηλής ποσότητας στερεών, υψηλών θερμοκρασιών καθώς και υψηλής συγκέντρωσης αζύμωτων σακχάρων. Οι κύριες πηγές αφομοιώσιμου αζώτου που υπάρχουν στο

χυμό των σταφυλιών, συμπεριλαμβάνουν το αμμώνιο, τα α-αμινοξέα και σε μικρότερο βαθμό μικρά πεπτίδια. Κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της αλκοολικής ζύμωσης, οι ενώσεις αυτές καταναλώνονται ταχύτατα από τις ζύμες, πληρώνοντας έτσι τις βιοσυνθετικές απαιτήσεις για αμινοξέα, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών και την ανάπτυξή τους. Ανεπαρκείς συγκεντρώσεις αφομοιώσιμου αζώτου, μειώνουν το ρυθμό απόδοσης της βιομάζας έχοντας ως συνέπεια αργές ή κολλημένες ζυμώσεις. Ανεπαρκές αφομοιώσιμο άζωτο στο μούστο αυξάνει το μεταβολικό στρες, το οποίο επίσης συνδέεται με μη επιθυμητές οσμές, όπως τα δισουλφίδια. Έτσι, η θρέψη του γλεύκους με ανόργανο άζωτο υπό τη μορφή αμμωνιακών αλάτων, όπως το διαμμωνικό φώσφορο (DAP), μπορεί να μειώσει τέτοιους κινδύνους, περιορίζοντας επίσης και την παραγωγή ανεπιθύμητων θειούχων πτητικών ενώσεων. Εκτός από την επίδραση στην κινητική ανάπτυξης των ζυμών, το YAN μπορεί να ρυθμίσει τον μεταβολισμό των ζυμών σε διάφορα επίπεδα συμπεριλαμβανομένων των πτητικών και μη πτητικών δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι μεταβάλλουν τη γευστική ισορροπία των οίνων. Από της μη πτητικές ενώσεις, η γλυκερόλη, το μηλικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ, επηρεάζονται από τη πηγή αζώτου και τη συγκέντρωση. Πολλές από τις πτητικές ενώσεις που συντίθενται από τις ζύμες, μεταβάλλονται επίσης αναλόγως τις πηγές ή/και τις συγκεντρώσεις του αζώτου. Οι πιο σημαντικές ενώσεις περιλαμβάνουν τον οξικό αιθυλεστέρα, ανώτερες αλκοόλες, μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα (MCFA) καθώς και οξέα διακλαδισμένης αλυσίδας. Οι εστέρες προσδίδουν φρουτώδη αρώματα και αρώματα λουλουδιών, οι ανώτερες αλκοόλες συνδέονται περισσότερο με οσμές διαλύτη ή ζυμελαίων και τα λιπαρά οξέα δίνουν οσμές που σχετίζονται με το σαπούνι, το τυρί, τον ιδρώτα ζώων και το τάγγισμα. (Torrea Diego et al., 2011)

Ο μούστος συνήθως περιέχει τη χαμηλότερη αναλογία αζώτου: αμινοξέων, η οποία κυμαίνεται από 1:3-3, γεγονός που εξαρτάται από τις ιδιαίτερες καλλιεργητικές τεχνικές καθώς και τη ποικιλία και το τύπο του εδάφους. Η προσθήκη DAP αυξάνει τη συγκεκριμένη αναλογία, και για μούστο φτωχό σε άζωτο, υπερβαίνει την αναλογία 3:1. Το DAP αποτελεί προτεινόμενη πηγή αζώτου για ζύμες που προκαλούν καταστολή του καταβολικού αζώτου (NCR), αναστέλλοντας τη

μεταγραφή των γονιδίων που απαιτούνται για τη χρήση φτωχών πηγών αζώτου. Όταν οι προτιμώμενες πηγές περιοριστούν, τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη πρόσληψη και την αξιοποίηση των εναλλακτικών πηγών από-καταστέλλονται (*Deed Nathan K. et al., 2011*). Πιο συγκεκριμένα, μέσα πλούσια σε άζωτο απαιτούν τη σύνθεση οργανικών αζωτούχων μεταβολιτών (ειδικά αμινοξέα και νουκλεϊκά οξέα) από πρόδρομες ουσίες άνθρακα οι οποίες προέρχονται από τη γλυκόλυση και το κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων, ενώ το ανόργανο άζωτο δημιουργείται μέσω της τρανσαμίνωσης των αμινοξέων. Οι ρυθμοί της ανάπτυξης των ζυμομυκήτων και της πορείας της αλκοολικής ζύμωσης, επίσης τείνουν να έχουν χαμηλότερα αμμωνιακά σε σύγκριση με αμινοξέα, για το ίδιο ποσοστό αζώτου, γεγονός που εξαρτάται αποκλειστικά στα αμινοξέα. Επιπλέον, παράγονται διαφορετικοί δευτερογενείς μεταβολίτες κατά την ανάπτυξη με αμμωνιακό άζωτο, γεγονός που εμπλέκει τις βιοσυνθετικές αντιδράσεις των αμινοξέων, συγκρινόμενο με ανάπτυξη σε μέσο με μίξη αμινοξέων, όπως συμβαίνει συνήθως στο μούστο, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερο ποσοστό αποικοδόμησης των αμινοξέων.

Υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τις επιπτώσεις του ανόργανου και του οργανικού αζώτου στους πτητικούς και μη-πτητικούς μεταβολίτες τόσο των σταφυλιών όσο και των ζυμομυκήτων κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Οι περισσότερες έρευνες εστιάζουν στη συγκέντρωση του αζώτου, η οποία επιτυγχάνεται γενικά μέσω συμπλήρωσης με χαμηλό ποσοστό αζώτου, απολάσπωσης του μούστου ή δημιουργία συνθετικού μέσου με αμμωνιακό άλας. Πολλές μελέτες έχουν εξετάσει την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης YAN κατά τη διάρκεια σχηματισμού των μεταβολιτών κατά την αλκοολική ζύμωση, η οποία επιτυγχάνεται μέσω προσθήκης διαφορετικών ποσοτήτων DAP πριν τον εμβολιασμό. Τα αποτελέσματα των πειραματικών αυτών μελετών αφορούν το μέσο ελέγχου ή αναφοράς, το οποίο αποτελείται κυρίως από αμινοξέα, άρα περιέχει χαμηλό ποσοστό αμμωνιακού αζώτου το οποίο αυξάνεται σταδιακά.

Συμπερασματικά, το αφομοιώσιμο άζωτο βρέθηκε να διαμορφώνει τη συγκέντρωση πολλών μεταβολιτών, τόσο των σταφυλιών όσο και των ζυμομυκήτων, οι οποίοι διαμορφώνουν και τις χημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες των οίνων. Από τις κυριότερες ενώσεις του οίνου, η αιθανόλη, η γλυκερόλη, τα οργανικά οξέα,

ο θειώδης ανυδρίτης και τα φαινολικά μπορούν να επηρεαστούν, ενώ πτητικές ενώσεις των ζυμών όπως ανώτερες αλκοόλες, λιπαρά οξέα, οξικοί και αιθυλεστέρες, καρβονυλικές ενώσεις και θειούχες ενώσεις, μπορούν επίσης να μεταβληθούν. Οι πρωτογενείς αρωματικοί μεταβολίτες των σταφυλιών όπως, τα τερπένια, τα νορισοπρενοειδή, οι θειόλες και τα φαινολικά, επηρεάζονται επίσης αλλά σε μικρότερο ποσοστό. Η εξέλιξη της μεταβλητότητας των μεταβολιτών σε απόκριση με την προσθήκη DAP είναι πολύπλοκη, γεγονός που εκφράζει και το πλήθος των μεταβολικών και ρυθμιστικών μονοπατιών που εμπλέκονται (Vilanova Mar et al., 2015).

1.5. Οι πτητικές ενώσεις των οίνων

Πάνω από 400 πτητικά συστατικά έχουν εντοπιστεί σε οίνους, μέσω της ενόργανης ανάλυσης και με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας. Τα αρώματα του κρασιού αποτελούνται από αρκετές εκατοντάδες πτητικές ενώσεις σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από mg/L έως ng/L ή ακόμα χαμηλότερα. Τα οσφρητικά όρια αντίληψης αυτών των ενώσεων ποικίλουν επίσης σημαντικά (Ribereau-Gayon P. et al., 2006; Jackson Ronald S., 2002). Τα ανθρώπινα αισθητήρια όργανα εμφανίζουν κάποιες ευαίσθητες και μεταβλητές αντιδράσεις σε αυτές τις ποσότητες ενώσεων και έτσι το κατώφλι αντίληψης ποικίλει μεταξύ 10^{-4} και 10^{-13} g/L (Rapp A., 2008). Συνεπώς, η οσφρητική επίδραση των πτητικών ενώσεων στο κρασί εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωσή του όσο και από το είδος τους. Ορισμένες ενώσεις, που βρίσκονται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (της τάξεως των νανογραμμάτων), παίζουν κυρίαρχο ρόλο στο άρωμα, ενώ άλλες που κυμαίνονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, μπορούν να επηρεάσουν πολύ λιγότερο. Επιπλέον η επίδραση του εκάστοτε συστατικού στην ελκυστικότητα του αρώματος ενός οίνου, εξαρτάται από συγκεκριμένες ιδιότητες. Η έννοια «κατώφλι αντίληψης», εφαρμόζεται πάντα σε ένα δεδομένο μέσο (νερό, αραιωμένο διάλυμα αλκοόλης, λευκό ή κόκκινο κρασί), χρησιμοποιείται για να υποδείξει τα χαρακτηριστικά των διαφόρων αρωματικών ουσιών.

Η πολυπλοκότητα των αρωμάτων των οίνων, η οποία καθιστά δύσκολη την μελέτη τους, οφείλεται στην ποικιλομορφία των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξή τους:

- Ο μεταβολισμός των σταφυλιών, που εξαρτάται από την ποικιλία, το έδαφος, το κλίμα και τις καλλιεργητικές τεχνικές.
- Τα βιοχημικά φαινόμενα (οξειδωσης και υδρόλυσης) τα οποία λαμβάνουν χώρα στη ράγα πριν την αλκοολική ζύμωση, και μπορούν να ενεργοποιηθούν και κατά τη διάρκεια της εκχύλισης του χυμού και της επαφής του γλεύκους με τα στέμφυλα.
- Ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών κατά την αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση.
- Οι χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις οι οποίες συμβαίνουν μετά τη ζύμωση, κατά τη διάρκεια της παλαίωσης σε βαρέλια ή φιάλες.

(Ribereau-Gayon P. et al., 2006)

Στον οίνο διακρίνονται τρεις κατηγορίες αρωματικών ενώσεων, ανάλογα με τη προέλευσή τους:

- 1) Τα πρωτογενή αρώματα ή ποικιλιακά αρώματα, αφορούν αρωματικές ενώσεις οι οποίες βρίσκονται ακέραιες στα φυτικά κύτταρα των ραγών. Ο όρος «ποικιλιακό άρωμα», δεν θα πρέπει ωστόσο να παρερμηνευθεί με την έννοια ότι κάθε σταφύλι έχει συγκεκριμένες πτητικές ουσίες. Στη πραγματικότητα, οι ίδιες πτητικές ενώσεις καθώς και οι πρόδρομες ενώσεις τους, βρίσκονται στους μούστους και τα κρασιά αρκετών ποικιλιών σταφυλιών της ίδιας οικογένειας, όπως και στα υπόλοιπα φρούτα και φυτά. Η μεμονωμένη αρωματική προσωπικότητα των κρασιών τα οποία προέρχονται από συγκεκριμένες ποικιλίες, οφείλεται στους άπειρους συνδυασμούς και στις διαφορετικές συγκεντρώσεις των διαφόρων ενώσεων. Πρωτεύον χαρακτηριστικό της ποιότητας ενός οίνου αποτελεί το ιδιαίτερο ποικιλιακό του άρωμα. Εκτός από τις πτητικές ενώσεις που βρίσκονται στο σταφύλι, το πρωτογενές άρωμα μπορεί να περιλαμβάνει και ουσίες που προέρχονται από την επεξεργασία των σταφυλιών, όπως η έκθλιψη. Όταν το σταφύλι δεν έχει ωριμάσει πλήρως,

μπορεί να προσδώσει αρώματα χορτώδων οσμών (εξαιτίας της παρουσίας εξανόλης), οι οποίες μπορεί να προέρχονται και λόγω της επαφής των βοστρύχων με τη ράγα (κατά την έκθλιψη).

- 2) Τα δευτερογενή αρώματα, το λεγόμενο «μπουκέτο», αφορούν αρωματικές ενώσεις που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των σταφυλιών (αποβοστρύχωση, έκθλιψη, πίεση) και χημικές και ενζυμικές θερμικές αντιδράσεις στο μούστο, με την επίδραση ζυμών και μικροοργανισμών.
- 3) Το «μπουκέτο» ωρίμανσης, που προκαλείται από χημικές αντιδράσεις κατά την ωρίμανση του οίνου σε φιάλες ή βαρέλια. Η τελευταία κατηγορία αποτελεί το τριτογενές άρωμα, όπου οι συγκεντρώσεις των τερπενίων και των εστέρων μειώνονται ενώ οι πτητικές φαινόλες μετατρέπονται σε μη πτητικές. Ταυτόχρονα μπορούν να παραχθούν και νέες πτητικές ενώσεις, που διαμορφώνουν και εκείνες τα τελικά χαρακτηριστικά του οίνου. Οι συγκεντρώσεις των αλδευδών αυξάνονται ως αποτέλεσμα της οξειδωτικής παλαίωσης που γίνεται στα βαρέλια, ενώ εκχυλίζονται και διάφορες ουσίες από το ξύλο των βαρελιών. Κατά τη παλαίωση, ένα πιο πολύπλοκο άρωμα έρχεται να αντικαταστήσει τον έντονο, φρουτώδη και λουλουδένιο μέχρι τώρα χαρακτήρα με οσμές ζωικών αρωμάτων, δέρματος, καμένου ξύλου κλπ. (*Rapp A., 1998; Ribereau-Gayon P. et al., 2006; Jackson Ronald S., 2002*)

Με τη δράση των πτητικών συστατικών ολοκληρώνεται το χημικό και οργανοληπτικό προφίλ των οίνων, γεγονός που οδηγεί και στο καθορισμό της ποιότητάς του. Ακολούθως παρατίθενται οι κυριότερες κατηγορίες:

- ❖ Πτητικά οργανικά οξέα, τα οποία συμμετέχουν σε μεγάλο βαθμό στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, διαμορφώνοντας το άρωμά τους. Το οξικό οξύ αποτελεί το σημαντικότερο πτητικό οξύ που συναντάται στον οίνο. Το οξικό οξύ προσδίδει το άρωμα του ξυδιού και συνδέεται με αρνητικές οσμές και ελαττώματα που σχετίζονται από τη προσβολή του οίνου από οξικά βακτήρια. Η συγκέντρωσή του μπορεί να αυξηθεί κατά τη παλαίωση. Σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν τα 300 mg/L, θεωρείται σημαντικό ελάττωμα.

Ακολουθούν το βουτυρικό, το φορμικό και το προπανικό οξύ με οσμές βουτύρου, πιπεριού και σόγιας αντίστοιχα, σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις.

- ❖ Αλκοόλες, από της οποίες κυρίαρχη είναι η αιθανόλη. Οι ανώτερες αλκοόλες (3-6 άτομα άνθρακα) επηρεάζουν το άρωμα του οίνου και οι περισσότερες αποτελούν υποπροϊόντα των ζυμών και των βακτηρίων. Μπορούν να προσδώσουν ελαττωματικές οσμές αλλά να συνεισφέρουν και στη πολυπλοκότητα του μπουκέτου του παραγόμενου οίνου.
- ❖ Αλδεΐδες και κετόνες, από τις οποίες κυρίαρχη είναι η ακεταλδεΐδη. Η ακεταλδεΐδη πάνω από μια ορισμένη συγκέντρωση, μπορεί να θεωρηθεί ελάττωμα στον οίνο. Ωστόσο, σε συνδυασμό με άλλα οξειδωμένα συστατικά συμμετέχει στο μπουκέτο των οίνων sherry και άλλων οξειδωμένων κρασιών.
- ❖ Ακετάλες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από χορτώδεις οσμές και η παρουσία τους οφείλεται κυρίως στη μετατροπή τους κατά την οξειδωτική παλαίωση.
- ❖ Εστέρες, από τους πιο κοινούς αποτελεί ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος συμμετέχει στη πολυπλοκότητα του αρώματος σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 50 και 100 mg/L. Σε περιπτώσεις που ξεπερνάει τα όρια δίνει ελαττωματική οσμή που χαρακτηρίζεται ως ακετόνη.
- ❖ Τερπένια, τα οποία δίνουν χαρακτηριστικές οσμές λουλουδιών, φρούτων και ορισμένες φορές και αρώματα ξύλου. Συμβάλλουν στο πρωτογενές ποικιλιακό άρωμα ενώ από τα 44 που έχουν ταυτοποιηθεί, μόνο τα 6 φαίνεται ότι συμβάλλουν στο άρωμα των οίνων.
- ❖ Πυραζίνες, ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο στο μόριό τους και παράγονται από το μεταβολισμό των αμινοξέων. Έχουν πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης και προσδίδουν στους οίνους χορτώδη χαρακτήρα, όπως πράσινη πιπεριά, σπαράγγι, βρασμένα λαχανικά κλπ.
- ❖ Ενώσεις που περιέχουν θείο, όπως το υδρόθειο (H₂S), θεωρούνται υπεύθυνες για δυσάρεστες οσμές στον οίνο. Το H₂S εμφανίζεται κατά τη ζύμωση, την ωρίμανση και την παλαίωση σε φιάλη. Σε αυξημένες συγκεντρώσεις δίνει την οσμή κλούβιου αυγού στον οίνο. Οι δυσοσμίες λόγω θειούχων ενώσεων έχουν συνδεθεί με την αυτόλυση των νεκρών κυττάρων των ζυμών.

(Jackson Ronald S., 2002-2008; Δήμου Ευ., 2012)

1.6. Οργανοληπτικές ιδιότητες οίνων

Η τελική αισθητήρια ποιότητα ενός οίνου είναι το αποτέλεσμα ενός πλήθους αλληλεπιδράσεων μεταξύ όλων των χημικών συστατικών ενός κρασιού και των ειδικών περιβαλλοντικών συνθηκών στις οποίες εξελίσσεται, όπως π.(χ). η θερμοκρασία. Η χημική σύνθεση του κρασιού είναι εξαρτώμενη από το είδος και την ποιότητα των σταφυλιών. Οι αμπελουργικές πρακτικές έχουν ως κύριο στόχο την παραγωγή ποιοτικών σταφυλιών τα οποία θα αντανakλούν τα χαρακτηριστικά αρώματα της εκάστοτε ποικιλίας καθώς και τα τυπικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου *terroir*. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη συγκομιδή των σταφυλιών σε συγκεκριμένα στάδια ωρίμανσης, ανάλογα με το τύπο του κρασιού που επιθυμεί να παράγει ο οινοποιός. Αφού λάβει χώρα ο τρύγος, πρέπει να ακολουθηθούν ειδικές τεχνικές επεξεργασίας και ζύμωσης, οι οποίες θα διαμορφώσουν το τελικό οργανοληπτικό προφίλ του οίνου. Τα τελικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από όλες τις μεταζυμωτικές επεξεργασίες όπως το φιλτράρισμα, οι τεχνικές ωρίμανσης-συμπεριλαμβανομένης και της παλαίωσης σε συγκεκριμένους τύπους βαρελιών-όποτε αυτή είναι επιθυμητή. Όταν το προϊόν είναι πλέον τελειοποιημένο, η εκτίμηση του οίνου απαιτεί την συμμετοχή όλων των αισθήσεων: αρχικά γίνεται η παρατήρηση του χρώματος και της εμφάνισης, δευτερευόντως εξετάζεται το λεγόμενο *μπουκέτο* του κρασιού και τελευταία ακολουθεί η γεύση, το άρωμα στόματος και η επίγευση. Η οργανοληπτική αντίληψη του κρασιού είναι ιδιαίτερος πολύπλοκη. Το γεγονός αυτό έγκειται στη πληθώρα ενώσεων που διαμορφώνουν τη γεύση και το άρωμα. Τερπένια, εστέρες, μεθοξυπυραζίνες και αλδεύδες προσδίδουν στον οίνο διακριτά αρώματα όπως άνθη λουλουδιών, φρούτα, πιπέρι και ξύλο. Η γεύση του οίνου μπορεί να περιγραφεί ως γλυκιά, ξινή, αλμυρή και πικρή εξαιτίας της δράσης ενώσεων όπως τα σάκχαρα, οι πολυόλες, τα άλατα, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή. Ενώσεις όπως η γλυκερόλη, οι πολυσακχαρίτες και οι μαννοπρωτεΐνες, συνεισφέρουν στο ιξώδες και στην αίσθηση του στόματος ενώ οι ανθοκυανίνες στο χρώμα και η αιθανόλη στο αίσθημα «καψίματος» του στόματος. Η μοναδική και μη γραμμική αλληλεπίδραση αυτών των πολυάριθμων χημικών ενώσεων καθορίζουν το τελικό χημικό και οργανοληπτικό χαρακτήρα των

οίνων. Η απελευθέρωση του αρώματος και η αντίληψη του, είναι στενά συνδεδεμένες με φυσικές και περιβαλλοντικές επιδράσεις όπως η θερμοκρασία και το σχήμα του ποτηριού γευσιγνωσίας, τα οποία επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα της δοκιμής. Η γευσιγνωσία ενός κρασιού, αποτελεί σε μεγάλο βαθμό μια υποκειμενική εμπειρία καθώς παράγοντες όπως η παρουσία ή η απουσία σιέλου, μπορούν σε μεγάλο βαθμό να επηρεάσουν την απελευθέρωση των αρωματικών ενώσεων τόσο σε λευκούς όσο και σε κόκκινους οίνους (*Styger Gustav et al., 2011*).

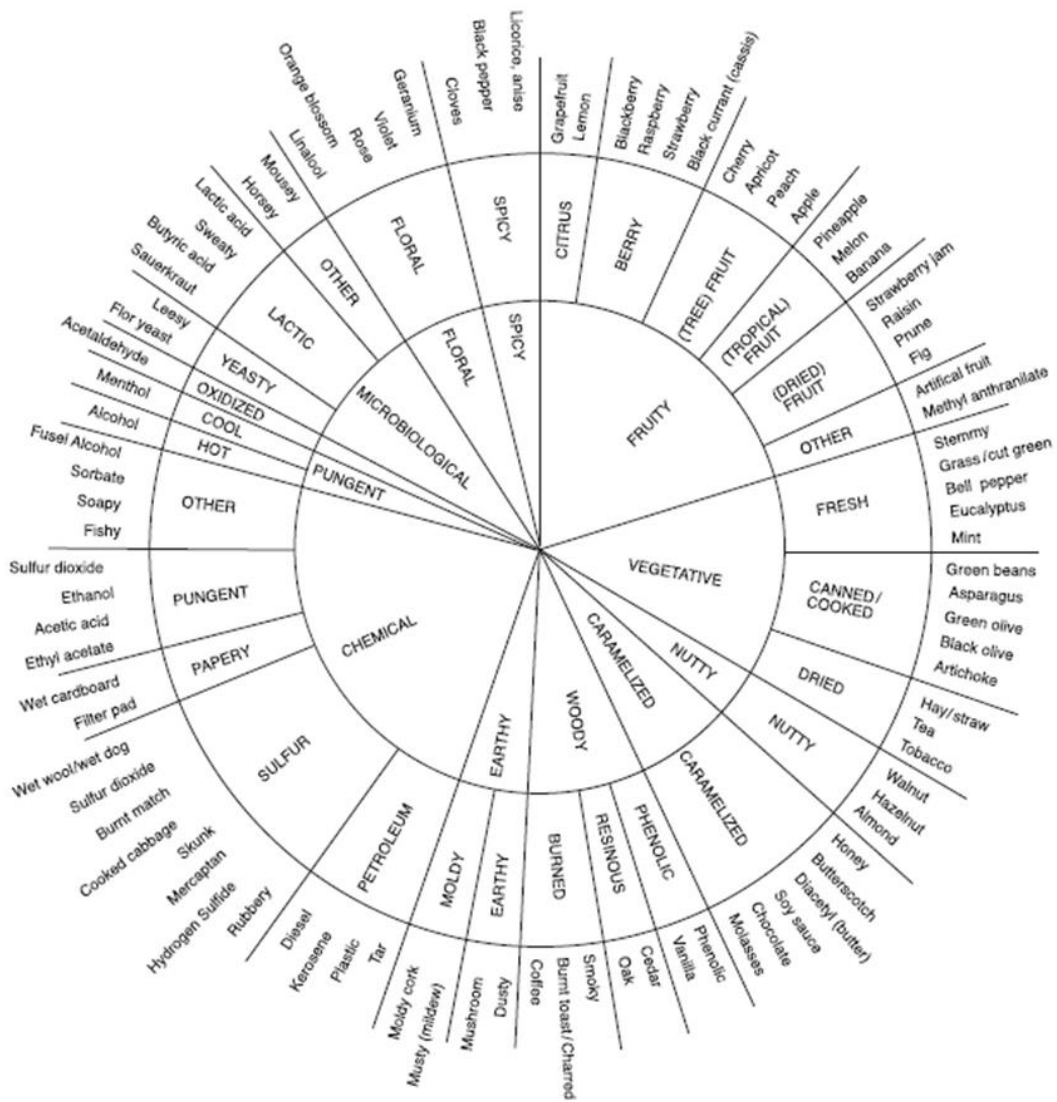
Σκοπός μιας οργανοληπτικής εξέτασης ενός κρασιού είναι η αξιολόγηση και ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών του έτσι ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την ποιότητά του. Οι χημικές αναλύσεις έχουν φέρει στο φως πάνω από 400 συστατικά που συμμετέχουν στην σύνθεσή του. Επομένως μια επιτυχημένη οργανοληπτική αξιολόγηση είναι απαραίτητο να ακολουθηθεί μία ειδική τεχνική για την εξέταση της όψης (π.χ. χρώμα, διαύγεια), των αρωμάτων και των γευστικών χαρακτηριστικών (π.χ. γλυκύτητα, οξύτητα, σώμα, επίγευση). Η οργανοληπτική αξιολόγηση και, κατά συνέπεια, η αξιολόγηση της ποιότητας ενός οίνου απαιτεί εμπειρία και γνώσεις και αποτελεί μια πιο πολύπλοκη διαδικασία από την απλή κατανάλωση (*Σγουρού Γ., 2014*).

1.6.1. Η φυσιολογία της όσφρησης

Οι οσφρητικοί υποδοχείς βρίσκονται σε δύο μικρές περιοχές του επιθηλίου, πολύ ψηλά στη ρινική κοιλότητα. Αυτή η απομακρυσμένη θέση μπορεί να προσφέρει προστατευτική λειτουργία ενάντια σε κάποια ζημιά, αλλά σημαίνει επίσης ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των αερομεταφερόμενων ουσιών που διέρχονται διαμέσου της μύτης, μπορούν να φτάσουν στη περιοχή των αισθητήριων οργάνων. Προκειμένου να αντισταθμιστεί αυτός ο παράγοντας, η οσφρητική αίσθηση έχει αρκετές ιδιότητες που ενισχύουν την ευαισθησία της. Υπάρχουν αρκετά εκατομμύρια υποδοχείς σε κάθε πλευρά της μύτης, οι οποίοι διαθέτουν ακροδέκτες (με λεπτά «κρόσσια») τα οποία προεξέχουν μέσα στη βλέννα. Μία από τις λειτουργίες των ακροδεκτών είναι να αυξάνουν την επιφάνεια του κυττάρου, εκθέτοντας του υποδοχείς στα χημικά ερεθίσματα. Το κύριο σώμα των κυττάρων των οσφρητικών υποδοχέων βρίσκεται μέσα στο επιθήλιο και το κάθε ένα στέλνει ένα λεπτό αξόνιο στους οσφρητικούς βολβούς. Ένας άλλος ανατομικός παράγοντας

ενίσχυσης είναι ότι τα εκατομμύρια των υποδοχέων στέλνουν νευρικές ίνες σε πολύ μικρότερο αριθμό σπειραματικών δομών στον οσφρητικό βολβό, αφού διέλθουν μέσω της οστεώδους πλάκας στη κορυφή της μύτης. Τα οσφρητικά νεύρα προβάλλονται σε πολλές διαφορετικές θέσεις του εγκεφάλου, μερικές από τις οποίες είναι στενά συνδεδεμένες με το συναίσθημα, την επίδραση και τη μνήμη.

Σε αντίθεση με τη περιορισμένη ικανότητα διάκρισης της έντασης των αρωμάτων, η αίσθηση της όσφρησης παρέχει στα άτομα ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα διαφορετικών οσμών. Πειράματα που έχουν γίνει σχετικά με την αναγνώριση οσμών, έδειξαν ότι ένας μεγάλος αριθμός οικείων οσμών ο οποίος μπορεί να επισημανθεί από τα άτομα, φαινομενικά δεν περιορίζεται σε ανώτερα όρια. Ωστόσο, η διαδικασία της επισήμανσης των οσμών δεν είναι εύκολη. Συχνά συμβαίνει τα άτομα να αναγνωρίζουν μία οσμή, αλλά να μην μπορούν να την ονοματίσουν, φαινόμενο το οποίο ονομάζεται «a tip-of-the-nose». Τα άτομα έχουν την τάση να αντιλαμβάνονται τις οσμές ως ολοκληρωμένα πρότυπα ενώσεων και όχι ως μεμονωμένα χαρακτηριστικά αυτών (Εικόνα 4). Αυτή η τάση καθιστά το προφίλ της οσμής και τη περιγραφή της γεύσης, ένα αρκετά δύσκολο εγχείρημα για το πάνελ των εξεταστών κατά τη διάρκεια του οργανοληπτικού ελέγχου. Συνήθως φαίνεται πιο φυσικό τα άτομα να αντιδρούν στις διάφορες οσμές με το αίσθημα του "ευχάριστου ή δυσάρεστου". Έτσι, το αναλυτικό πλαίσιο που απαιτείται για την αναγνώριση οσμών και γεύσεων κατά τη διάρκεια της οργανοληπτικής εξέτασης, κρίνεται ακόμη πιο δύσκολο (Harry T. et al., 2010).



Εικόνα 4: Ο «τροχός» των αρωμάτων του κρασιού αποτελεί ένα σύστημα διευθέτησης των κοινών χαρακτηριστικών των αρωμάτων των οίνων, σε ένα σύστημα κατηγοριοποιημένο σε τρία επίπεδα.

1.6.2. Δοκιμασίες διάκρισης

Οι δοκιμασίες διάκρισης θα πρέπει να λαμβάνουν χώρα όταν ο ειδικός θέλει να καθορίσει εάν δύο δείγματα είναι αισθητά διαφορετικά. Είναι πολύ πιθανό για δύο δείγματα να είναι χημικώς διαφορετικά ως προς τη σύνθεσή τους ωστόσο η διαφορά αυτή να μην γίνεται αντιληπτή από το καταναλωτικό κοινό. Εάν η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων είναι πολύ μεγάλη και προφανής, οι δοκιμασίες διάκρισης δεν είναι χρήσιμες. Εάν η προκαταρκτική δοκιμή της παρτίδας δείξει ότι τα δύο δείγματα είναι αισθητά διαφορετικά για όλο το πάνελ των δοκιμασιών, τότε οι συγκεκριμένες διαδικασίες διάκρισης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Σε τέτοιου είδους περιπτώσεις είναι χρήσιμο να χρησιμοποιηθούν τεχνικές κλιμάκωσης

προκειμένου να διαπιστωθεί το ακριβές μέγεθος της διαφοράς μεταξύ των δειγμάτων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι δοκιμές διακρίσεων είναι περισσότερο χρήσιμες όταν οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων είναι αμελητέες. Οι δοκιμασίες διάκρισης συνήθως χρησιμοποιούνται όταν υπάρχουν δύο δείγματα προς δοκιμή. Είναι πιθανό να γίνει η διεξαγωγή πολλαπλών δοκιμασιών προκειμένου να συγκριθούν περισσότερα από δύο προϊόντα αλλά αυτό δεν είναι αποτελεσματικό ή στατιστικά αξιόπιστο. Για τη διεξαγωγή ανάλογων δοκιμών είναι αποτελεσματικότερες οι τεχνικές κλιμάκωσης ή κατάταξης.

Όσον αφορά στις δοκιμές duo-trio, το πάνελ των δοκιμαστών λαμβάνει τρία δείγματα ταυτόχρονα. Το ένα δείγμα αποτελεί το δείγμα αναφοράς και είναι το ίδιο με ένα από τα δύο κωδικοποιημένα δείγματα. Οι δοκιμαστές πρέπει να επιλέξουν το κωδικοποιημένο δείγμα το οποίο είναι ίδιο με το δείγμα αναφοράς. Η μηδενική υπόθεση (H_0), δηλώνει ότι η πιθανότητα του πληθυσμού που κάνει τη σωστή επιλογή όταν δεν υπάρχει αισθητή διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, είναι $H_0: P_{dt} = 1/2$. Οι δοκιμασίες duo-trio επιτρέπουν στο δοκιμαστή να προσδιορίσει εάν δύο δείγματα είναι αισθητά διαφορετικά ωστόσο δεν του επιτρέπει να προσδιορίσει και το τύπο της διαφοράς. Έτσι οι δοκιμαστές μπορούν να αντιληφθούν το διαφορετικό δείγμα αλλά όχι ως προς πιο χαρακτηριστικό μπορεί να διαφέρει (Harry T. et al., 2010).

2. Υλικά και Μέθοδοι

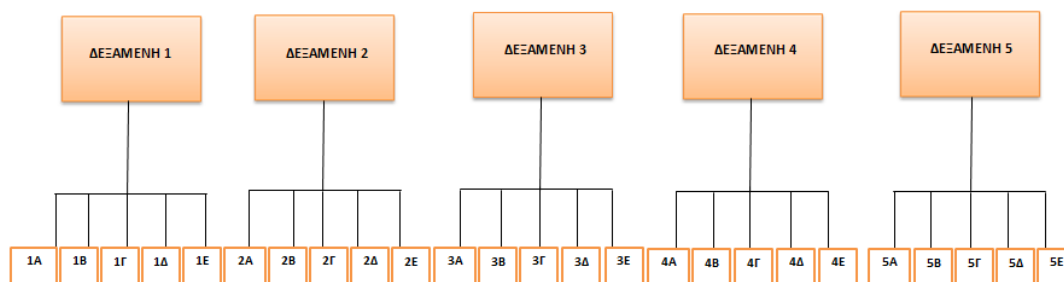
2.1. Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας

2.1.1. Σκοπός και σχεδιασμός πειράματος

Σκοπός της διεξαγόμενης μελέτης ήταν η παρακολούθηση της επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων αζωτούχας θρέψης (οργανικού και ανόργανου αζώτου) των ζυμομυκήτων στο χημικό και οργανοληπτικό προφίλ οίνων, που προήλθαν από τη ποικιλία Ασύρτικο.

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν σταφύλια που προήλθαν κατά το τρύγο του 2016, από τη περιοχή των Σπάτων. Η οινοποίηση διεξήχθη στο εργαστήριο οιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αρχικά, τα σταφύλια αποβοστρυχώθηκαν χειρωνακτικά, μεταφέρθηκαν σε θλιπτήριο και στη συνέχεια το γλεύκος, με τη βοήθεια αντλίας, μεταφέρθηκε στη δεξαμενή οινοποίησης. Στη συνέχεια, έγινε θείωση του γλεύκους με προσθήκη 4 g/hL metabisulfite και προστέθηκαν ένζυμα απολάσπωσης (sativzyme) 2 g/hL. Μετά το πέρας μίας ώρας, έγινε προσθήκη 30 g/hL Dolmar Polycel plus (30% PVPP) και το γλεύκος αφέθηκε για στατική απολάσπωση υπό ψύξη, στους 10 °C. Την επόμενη μέρα έλαβε μέρος η μετάγγιση του γλεύκους και έγινε προσθήκη Springarom, (SpringerOenologie, Fermentis) 20 g/hL. Το Springarom είναι ένα σκεύασμα που περιέχει κύτταρα απενεργοποιημένων ζυμομυκήτων πλούσιων σε γλουταθειόνη. Στη συνέχεια ακολούθησε η διαίρεσή του γλεύκους σε 5 ισόχωρες δεξαμενές των 25 λίτρων, στις οποίες τοποθετήθηκαν 17 λίτρα γλεύκους στην καθεμία (Σχήμα 5). Ακολούθως, έγινε ο εμβολιασμός της κάθε δεξαμενής (30 g/hL) με μείγμα τριών ζυμών (Melody, Vinifora, blend of *Saccharomyces cerevisiae* (60%), *Torulaspora delbrueckii* (20%) and *Lachancea thermotolerans* (20%)) (<http://www.gusmerwine.com/catalog/chr-hansen-yeast/melody/>), και προσθήκη οργανικού αζώτου σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 10, 20, 30, 40 g/hL) (Springferm, Fermentis). Το springferm αποτελεί ενεργοποιητή της ζύμωσης που βασίζεται σε μερικώς αυτολυμένα κύτταρα ζυμών, περίπου 3 φορές πλουσιότερα σε αφομοιώσιμο άζωτο σε σχέση με τα μη-ενεργοποιημένα κύτταρα ζυμών. Παράγει αμινοξέα, στερόλες, μέταλλα και βιταμίνες (www.fermentis.com). Τέλος, μετά το πέρας 4 ημερών από την αρχή της ζύμωσης (διάστημα που αντιστοιχεί περίπου στο 1/3 της αλκοολικής ζύμωσης), ακολούθησε η διαίρεση των 5 δεξαμενών, σε άλλες 5 ισόποσες έκαστη και έγινε προσθήκη ανόργανου αζώτου (DAP, διφωσφορικό διαμμώνιο) σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 10, 20, 30, 40 g/hL). Καθημερινά γινόταν ανάδευση, έτσι ώστε να ομογενοποιείται το γλεύκος, ενώ η θερμοκρασία διατηρούνταν περίπου στους 20 °C. Παράλληλα, γινόταν δειγματοληψία από όλες τις δεξαμενές (συλλέγονταν γλεύκος σε αεροστεγείς και υδατοστεγείς περιέκτες των 60 ml) και γίνονταν μετρήσεις σακχαροπεριεκτικότητας (°Brix) και θερμοκρασιών (T) (Πίνακας Α Παράρτημα). Η αλκοολική ζύμωση

ολοκληρώθηκε σε διάστημα 13 ημερών. Μετά το πέρας της αλκοολική ζύμωσης, έγινε μετάγγιση των οίνων σε περιέκτες των 5 L και θείωση με ποσότητα 10 g/hL. Οι περιέκτες τοποθετήθηκαν σε ψύξη στους 4 °C και εμφιαλώθηκαν αργότερα. Κατά την εμφιάλωση προστέθηκαν 50 mg/L metabisulfite.



Σχήμα 5: Διάγραμμα διαίρεσης δεξαμενών και κωδικοποίηση δειγμάτων

Στα παραπάνω δείγματα των μικροοινοποιήσεων (των παραγόμενων οίνων), πραγματοποιήθηκαν εξειδικευμένες αναλύσεις όπως: προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου, προσδιορισμός αζώτου βασικών αμινοξέων, ανάλυση HPLC για τον προσδιορισμό οργανικών οξέων, σακχάρων και αλκοόλης και ανάλυση GC για τον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων. Επιπλέον, εκτός από τις προαναφερόμενες αναλύσεις, πραγματοποιήθηκαν και οι αναλύσεις του pH και της ολικής οξύτητας καθώς επίσης διεξήχθη και οργανοληπτικός έλεγχος.

2.2. Αναλύσεις

2.2.1. Αναλύσεις pH και ολικής οξύτητας

Η διεξαγωγή των αναλύσεων έλαβε χώρα σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους οι οποίες προβλέπονται από την ευρωπαϊκή νομοθεσία (*International organization of vine and wine, 2006*). Αρχικά έγινε μέτρηση της ογκομετρούμενης οξύτητας όλων των δειγμάτων, με τιτλοδότηση και στη συνέχεια η μέτρηση του pH με τη χρήση πεχάμετρου.

2.2.2. Προσδιορισμός αζώτου βασικών αμινοξέων

Για το προσδιορισμό του αζώτου βασικών αμινοξέων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Για τη δημιουργία των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκαν:

- ✓ 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 και συμπληρώνεται ο όγκος με απιονισμένο νερό (pH = περίπου 9.5). Αποθηκεύεται στο ψυγείο για 3 εβδομάδες.

- ✓ Διάλυμα NAC για το 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 δειγμάτων

Σε μικρούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται με τη σειρά που αναφέρονται:

- ✓ 50 mL πρότυπη συγκέντρωση ή δείγμα προς ανάλυση
- ✓ 3 mL διάλυμα OPA-NAC

Όλοι οι σωλήνες αφήνονται σε ηρεμία για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν μετράται η απορρόφηση στα 335 nm με τη χρήση πλαστικών κυψελίδων σε φωτόμετρο διπλής δέσμης. Οι μετρήσεις εκφράζονται σε mgN/L από τη πρότυπη καμπύλη. Στην περίπτωση των παγωμένων δειγμάτων μούστου, έχει προηγηθεί φυγοκέντρηση, με διάρκεια 5 λεπτών στις 5000 στροφές, προκειμένου να ληφθεί το καθαρό υπερκείμενο, το οποίο και χρησιμοποιείται στις αναλύσεις.

Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Από το διάλυμα ισολευκίνης 10 mM δημιουργούνται οι παρακάτω αραιώσεις σε τελικό όγκο 500 μL και ακολουθεί η διαδικασία ανάλυσης (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Αραιώσεις ισολευκίνης

Ισολευκίνη (mM)	Πρότυπο διάλυμα 10 mM (μL)	ddH ₂ O (μL)	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

Έγινε η ποσοτικοποίηση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς και προέκυψε $R^2 = 0.9967$ με εξίσωση $y = 0.0069x + 0.0628$.

2.2.3. Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου

Για τον προσδιορισμό του αμμωνιακού αζώτου ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Για τη δημιουργία των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκαν:

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα: Για 100 mL διαλύματος ζυγίζονται
1.3 g Na_3PO_4 (φωσφορικό νάτριο)
3 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (τριβασικό κιτρικό νάτριο)
0.3 g EDTA

και διαλύονται σε 80 περίπου mL νερού. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 mL (pH = 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 ένα μήνα
- ✓ Πρότυπο διάλυμα θειϊκού αμμωνίου 4 mM: Για 100 mL πρότυπου διαλύματος ζυγίζονται 0.052 g και διαλύονται σε 80 περίπου mL νερού. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη και συμπληρώνεται ο όγκος. Διατηρείται στο ψυγείο.

Διαδικασία ανάλυσης δειγμάτων

Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται με τη σειρά που αναφέρονται:

- ✓ Δείγμα ή πρότυπη συγκέντρωση σε τελικό όγκο 100μL (φυγοκεντρημένο δείγμα)
- ✓ 4 mL νερό

- ✓ 2 mL φαινολικό διάλυμα καταλύτη
- ✓ 3 mL διάλυμα υποχλωριώδους

Μετά από κάθε προσθήκη αναδεύουμε επαρκώς. Οι σωλήνες μένουν για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για το σχηματισμό του χρωμοφόρου (ινδοφαινόλη) και κατόπιν γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 635 nm με τη χρήση πλαστικών κυψελίδων σε φωτόμετρο διπλής δέσμης. Οι μετρήσεις μεταφράζονται σε mgN/L με χρήση πρότυπης καμπύλης.

Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Από το πρότυπο διάλυμα του θειϊκού αμμωνίου 4 mM δημιουργούνται οι παρακάτω αραιώσεις σε τελικό όγκο 1 mL και ακολουθεί η διαδικασία ανάλυσης (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Αραιώσεις θειϊκού αμμωνίου

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	375	14
1	250	750	28
2	500	500	56

Έγινε η ποσοτικοποίηση της πρότυπης καμπύλης και προέκυψε $R^2=0,9995$ με εξίσωση $y=0.0171x + 0.0013$

2.2.4. Μέθοδος υγρής-υγρής εκχύλισης αρωματικών συστατικών (liquid/liquid extraction)

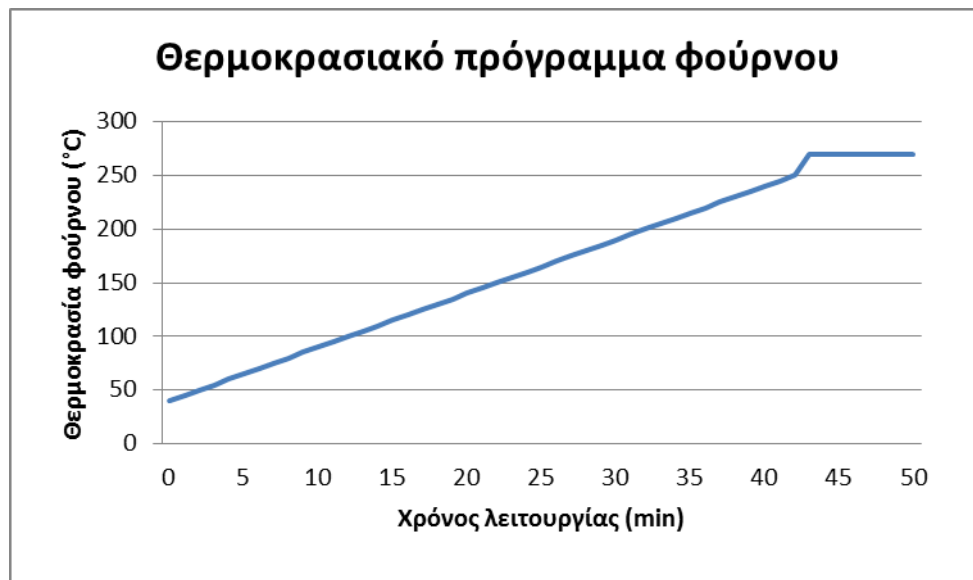
Για τη διεκπεραίωση της υγρής-υγρής εκχύλισης ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

Σε falcon των 50 mL προστίθεται 1.5 γραμμάρια άλας χλωριούχου νατρίου (NaCl) και 25 mL δείγματος (οίνος ή μούστος). Στη συνέχεια προστίθενται 3 mL διχλωρομεθανίου (CH₂Cl₂), 25 μL 3-οκτανόλη και 25 μL καριοφιλένιο. Γίνεται μικρή ανακίνηση του falcon και εκτόνωση των αερίων ώστε να μην υπάρξουν διαρροές στη συνέχεια. Ακολουθεί αναμονή των δειγμάτων σε υδατόλουτρο για 5 με 10

λεπτά και στη συνέχεια κάθε δείγμα αναδεύεται ισχυρά με vortex για 30". Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται (όπως ορίζεται) σε φυγόκεντρο (προσοχή στη συγγένεια διαλύτη και περιέκτη καθώς και στο ισοζύγισμα των δειγμάτων) για 15 λεπτά στις 9000 rpm στους 4 °C, προκειμένου να επέλθει ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Μετά το πέρας των 15 λεπτών, λαμβάνεται με τη βοήθεια σύριγγας η οργανική φάση, η οποία και συλλέγεται σε vials. Στα falcon προστίθενται ξανά 3 mL CH₂CL₂, ακολουθεί μηχανική ανάδευση (vortex) για 20" και τα δείγματα τοποθετούνται ξανά στη φυγόκεντρο ακολουθώντας τις ίδιες διαδικασίες και συνθήκες. Τέλος, γίνεται συλλογή της οργανικής φάσης στο αντίστοιχο vial. Ακολούθως, λαμβάνει χώρα η διήθηση των λαμβανόμενων οργανικών φάσεων, κατά την οποία γίνεται προσθήκη άλατος sodium sulfate anhydrous (για την απομάκρυνση υγρασίας από το δείγμα) και μαγνητική ανάδευση του δείγματος για 5'. Στη συνέχεια με τη βοήθεια ηθμού, λαμβάνεται το απαλλαγμένο από ίχνη υγρασίας δείγμα (κατά τη μετάγγιση σε νέο vial γίνεται εμπλουτισμός με 1 mL CH₂CL₂). Τέλος, πριν την ανάλυση των δειγμάτων με τη μέθοδο GC, γίνεται συμπύκνωση των δειγμάτων με αέριο άζωτο, έτσι ώστε να παραμείνει ποσότητα 1 mL. Ακολουθεί ψύξη των δειγμάτων μέχρι την επόμενη ανάλυση.

2.2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός αρωματικού δυναμικού με GC-FID

Το GC-FID που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο της εταιρίας shimadzu GC-2010 FID και τα χρωματογραφήματα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα GC solution Version 2.42.00 SU2 της εταιρείας shimadzu. Στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα (Διάγραμμα 1) που χρησιμοποιήθηκε υπό αρχικές συνθήκες, η θερμοκρασία εισόδου είναι 230 °C και η θερμοκρασία του ανιχνευτή 280 °C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα βρίσκεται στους 40 °C για 0 λεπτά και στη συνέχεια ανεβαίνει με 5 °C/min μέχρι τους 250 °C όπου μένει για 0 λεπτά και εν συνεχεία ανεβαίνει με 20 °C/min μέχρι τους 270 °C όπου παραμένει για 7 λεπτά. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν DB-5 length 32.5 m, film thickness 0.25 μm και inner diameter 0.25 mm. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιον (He) με ροή 1 mL/min.



Διάγραμμα 1: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα

2.2.6 Μέτρηση οξέων, γλυκερόλης και αλκοόλης με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η οργανολογία της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης είναι η εξής:

- ✓ Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών
- ✓ Αντλία (σταθερής ροής, σταθερής πίεσης)
- ✓ Μονάδα εισαγωγής δείγματος (βαλβίδα εισαγωγής δείγματος)
- ✓ Χρωματογραφική στήλη
- ✓ Ανιχνευτής
- ✓ Καταγραφικό

Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο της Jasco 880-PU, Intelligent HPLC Pump. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Phenomenex. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το H₂SO₄ συγκέντρωσης 5 mM (ο οποίος φιλτράρονταν υπό πίεση 300 atm). Οι ανιχνευτές ήταν ορατού-υπεριώδους όπου στον UV (Υπεριώδους 190-400 nm λάμπα D2) εμφανίζονταν οι κορυφές για τα οξέα και στο RI (Υπέρυθρο 2500-50000 nm) οι κορυφές για τις αλκοόλες και τα σάκχαρα. Το καταγραφικό ήταν ο υπολογιστής. Τα συστατικά που ανιχνεύθηκαν και μετέπειτα αναλύθηκαν μέσω αυτής της μεθόδου είναι το κιτρικό οξύ, το τρυγικό οξύ, το μηλικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ, το οξικό οξύ και τέλος η γλυκερόλη.

Η πορεία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Αρχικά αποψύχθηκαν τα δείγματα με φυσικό τρόπο, αφήνοντάς τα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ηρεμία. Έγινε ελαφριά ανακίνηση και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 λεπτά.
2. Παραλαβή του υπερκείμενου δείγματος προς ανάλυση μέσω σύριγγας χωρητικότητας 50 μL , γεμίζοντάς την με προσοχή με σκοπό τη μη ύπαρξη φυσαλίδων.
3. Εισχώρηση του δείγματος μέσα από την ειδική εσοχή με ένεση και αφού το μηχάνημα δεχόταν συγκεκριμένη συγκέντρωση για τα τελικά αποτελέσματα (20 μL), η υπόλοιπη ποσότητα απορρίπτονταν (INJECT).
4. Ακολουθεί η ενεργοποίηση των καναλιών ώστε να «τρέξει» το δείγμα και να προκύψουν οι κορυφές.
5. Μετά από διάστημα 30 περίπου λεπτών λαμβάνεται το χρωματογράφημα.

Καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας η ροή και η πίεση ήταν ρυθμισμένες 0.5 mL/min και 34 kg/cm² αντίστοιχα. Η θερμοκρασία ήταν προγραμματισμένη στους 50 °C όπου και παρέμενε σταθερή μέσω φούρνου. Η ίδια διαδικασία για κάθε δείγμα εφαρμόστηκε 2 φορές με σκοπό την καλύτερη επαναληψιμότητα.

2.3. Οργανοληπτικός έλεγχος

2.3.1. Πρωτόκολλο οργανοληπτικής διαδικασίας

Η οργανοληπτική διαδικασία έλαβε χώρα με τα αντίστοιχα κρασιά του πειράματος τα οποία εμφιαλώθηκαν στο οινοποιείο του εργαστηρίου Οινολογίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου. Όλα τα δείγματα ήταν εμφιαλωμένα σε μπουκάλια των 750 mL. Τα μπουκάλια έφεραν τους κωδικούς των δειγμάτων που αντιστοιχούν στο Σχήμα 5. Πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος από μία σχετικά σταθερή ομάδα μη εκπαιδευμένων ατόμων, σε χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων.

Υλικά:

- ✓ Γυάλινα ποτήρια σε σχήμα τουλίπας, κατάλληλα για οργανοληπτικό έλεγχο
- ✓ Δοσομετρητής

Η οργανοληπτική δοκιμή πραγματοποιήθηκε σε 2 συνεδρίες οι οποίες διήρκησαν περίπου από 1 ώρα η κάθε μια. Το σύνολο των ατόμων που συμμετείχαν ήταν άντρες και γυναίκες διαφόρων ηλικιών και η πλειονότητα αυτών κατείχαν τη βασική οργανοληπτική εξέταση. Έλαβε χώρα η δοκιμασία duo-trio (Εικόνα 5). Για τη δοκιμασία αυτή, οι δοκιμαστές είχαν μπροστά τους 3 τριάδες ποτηριών. Οι δοκιμαστές καλούνταν να μυρίσουν τα 3 δείγματα (πρώτα το δείγμα αναφοράς (R) και μετά τα άλλα δύο) και να βρουν πιο δείγμα από τα άλλα δύο είναι ίδιο μετά δείγμα αναφοράς. Στη συγκεκριμένη διαδικασία συγκρίθηκαν τα δείγμα 1A και 1E, 3A και 3E και 5A και 5E. Σκοπός ήταν η διερεύνηση για τον αν γίνεται αντιληπτή η διαφορά μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης συγκέντρωσης ανόργανου αζώτου, από τους δοκιμαστές. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστές καλούνταν να απαντήσουν σε ορισμένα χαρακτηριστικά που αφορούσαν τα συγκεκριμένα δείγματα. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν μόνο ως προς τα αρωματικά τους χαρακτηριστικά. Η οργανοληπτική δοκιμή έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (περίπου στους 22 °C) ενώ τα δείγματα ήταν διατηρημένα στην ίδια θερμοκρασία, έτσι ώστε να είναι όσο το δυνατόν πιο αντιληπτά τα αρωματικά χαρακτηριστικά των οίνων αλλά και πιο αντικειμενική η μελέτη. Η δόση που μοιράστηκε σε κάθε ποτήρι ήταν ίδια και ίση με 30 mL, ώστε να μην επηρεάζεται η κρίση του δοκιμαστή ενώ σε κάθε ποτήρι είχε τοποθετηθεί καπάκι, ώστε να επιτευχθεί η μικρότερη δυνατή απώλεια αρωμάτων. Οι δοκιμές έλαβαν χώρα στο ειδικά διαμορφωμένο χώρο, για οργανοληπτικές δοκιμές, που διαθέτει το εργαστήριο οινολογίας. Ο χώρος ήταν απαλλαγμένος από εξωτερικές οσμές, διέθετε το κατάλληλο φωτισμό και είχε χωριστεί σε 4 panels. Το ερωτηματολόγιο αφορούσε χαρακτηριστικά όπως η ένταση του αρώματος, ο φρουτώδης χαρακτήρας, τα βοτανικά αρώματα καθώς και τη προτίμηση (Εικόνα 6).



Εικόνα 5: Δοκιμή Duo-trio

ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΟΙΝΩΝ

Ημερομηνία:

Όνοματεπώνυμο:

Πάνελ :

- Μπροστά σας βρίσκονται 3 τριάδες ποτηριών. Η οργανοληπτική εξέταση θα γίνει με σύγκριση των ποτηριών της κάθε τριάδας.
- Σε κάθε τριάδα το ποτήρι με την επισήμανση R αποτελεί το δείγμα αναφοράς. Μυρίστε πρώτα το δείγμα αναφοράς και κατόπιν τα δύο αριθμημένα δείγματα.

Προσοχή! Τα ποτήρια δεν πρέπει να αλλάξουν θέση. Τοποθετείστε τα καπάκια στα ποτήρια αμέσως μετά τη δοκιμή κάθε δείγματος

Ποιό από τα δύο ποτήρια είναι ίδιο και ποιό διαφορετικό από το δείγμα αναφοράς;

Συγκρίνοντας τα δύο αριθμημένα δείγματα μεταξύ τους συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα.

			Ίδιο με το δείγμα αναφοράς	Μεγαλύτερη ένταση αρώματος	Πιο έντονος φρουτώδης χαρακτήρας	Πιο έντονα βοτανικά αρώματα	Ποιο προτιμάτε
R1							
R2							
R3							

Εικόνα 6: Ερωτηματολόγιο δοκιμαστών

3. Αποτελέσματα

3.1. Συγκέντρωση ανόργανου και οργανικού αζώτου στο δείγμα αρχικού μούστου

Μέσω των μετρήσεων προέκυψε ότι για το δείγμα αρχικού μούστου της ποικιλίας Ασύρτικο, χωρίς επιπλέον προσθήκη αζωτούχων ενώσεων, η συγκέντρωση αμμωνιακού αζώτου είναι 49.64 mg/L ενώ η συγκέντρωση του αζώτου βασικών αμινοξέων 62.05 mg/L. Από το σύνολο αυτών των δύο συγκεντρώσεων προκύπτει η συνολική περιεκτικότητα αζώτου που περιέχει ο μούστος και η οποία φαίνεται να είναι μικρότερη από την τιμή των 140 mg/L που προτείνει η διεθνής βιβλιογραφία (*Bell sally-jean et al., 2005*), ως την ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση προκειμένου να αποφευχθεί μία αργή η κολλημένη ζύμωση. Παρ' όλα αυτά, στη συγκεκριμένη περίπτωση η ποσότητα αυτή φάνηκε επαρκής για τη διεξαγωγή ομαλών και ολοκληρωμένων μικροζυμώσεων, οι οποίες οδήγησαν και στους ανάλογους οίνους, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναλύονται παρακάτω.

3.2. Αποτελέσματα βασικών παραμέτρων των τελικών οίνων

Για την διεξαγωγή των βασικών αναλύσεων ακολουθήθηκαν τα πρωτόκολλα του ΟΙV. Αρχικά έγινε μέτρηση της οξύτητας όλων των δειγμάτων με τιτλοδότηση και μέτρηση του pH. Στο παρακάτω Πίνακα 3 παρατίθενται οι ανάλογες μετρήσεις.

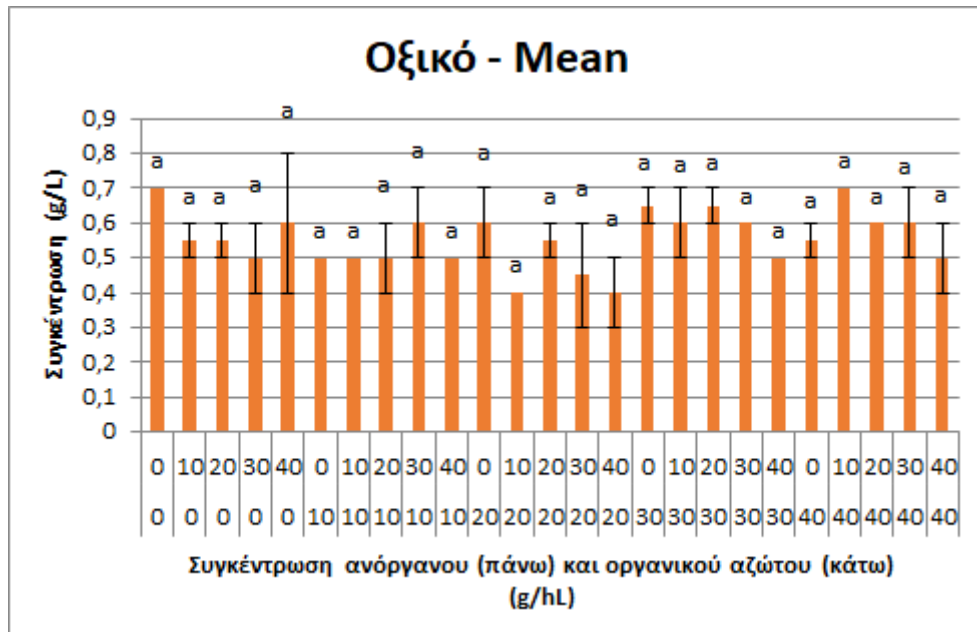
Πίνακας 3: Αποτελέσματα ολικής οξύτητας και pH

Δείγματα οίνων	Ολική Οξύτητα (g/L)	pH
1A	5.9	3.07
1B	6.0	3.05
1Γ	5.9	3.12
1Δ	5.9	3.02
1E	5.9	3.03
2A	6.0	3.08
2B	6.0	3.05
2Γ	5.8	3.04
2Δ	6.0	3.01
2E	6.0	3.00
3A	6.0	3.10
3B	5.8	3.06
3Γ	5.9	3.02
3Δ	5.9	3.00
3E	5.9	2.99
4A	6.0	3.07
4B	6.0	3.05
4Γ	6.0	3.03
4Δ	6.1	3.16
4E	6.0	3.15
5A	5.9	3.06
5B	6.0	3.04
5Γ	5.9	3.03
5Δ	5.9	3.03
5E	6.0	3.00

Παρατηρώντας τις μετρήσεις φαίνεται ότι οι τιμές της ολικής οξύτητας κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 5.8-6.01 g/L ενώ οι τιμές του pH μεταξύ 3.00-3.15. Οι τιμές αυτές φαίνεται να είναι αντιπροσωπευτικές για γλεύκος από τη ποικιλία Ασύρτικο, καθώς οι τιμές του pH συνήθως κυμαίνονται από 2.90-3.05 ενώ οι ολικές

οξύτητες μπορούν να φτάσουν τα 8.5 g/L ή και παραπάνω (Kechagia Despina et al., 2008).

Όσον αφορά τη συγκέντρωση του οξικού οξέως, από το διάγραμμα 2 φαίνεται να μην υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων.

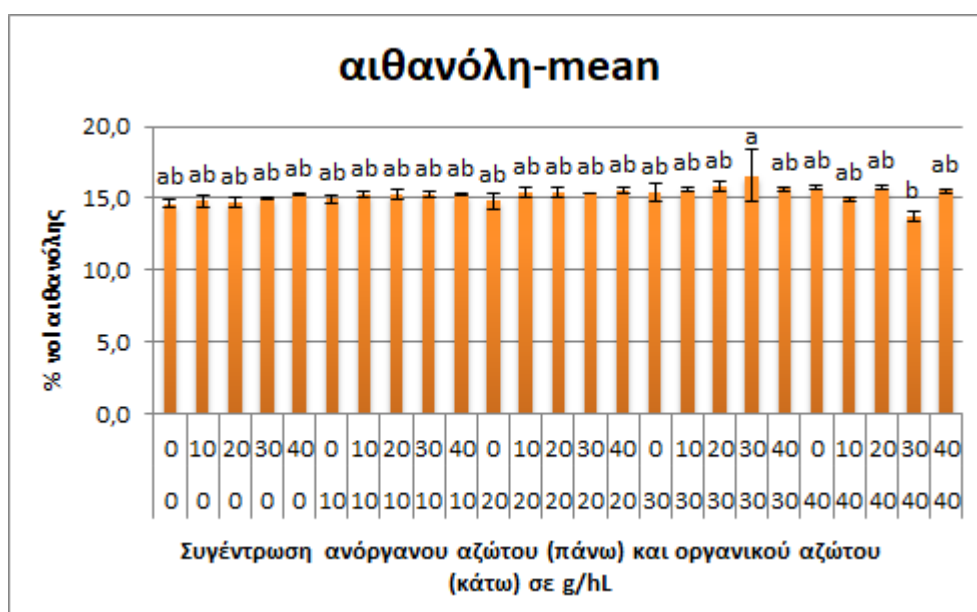


Διάγραμμα 2: Συγκέντρωση οξικού οξέος (g/L) ανά συγκέντρωση οργανικού (κάτω) και ανόργανου (πάνω) αζώτου (οι τιμές a, b, c είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p < 0,05$)

Έτσι, φαίνεται ότι η συγκέντρωση του οξικού οξέος δεν επηρεάζεται από τις διαφορετικές ποσότητες ανόργανης και οργανικής θρέψης, με μέσο όρο συγκέντρωσης τα 0.6 g/L. Στατιστικώς μη σημαντική διαφορά παρατήρησαν και οι ερευνητές Vilanova Mar et al., 2012, για τους οποίους η συγκέντρωση του οξικού οξέος κινήθηκε σε παρόμοια επίπεδα. Από την άλλη πλευρά, φαίνεται ότι γενικά η θρέψη μπορεί να επηρεάσει την ποσότητα του οξικού οξέος που παράγεται διότι έρευνες έχουν δείξει αύξηση του οξικού οξέος με αύξηση του ανόργανου κυρίως αζώτου (Torrea Diego et al., 2011), ενώ οι περισσότερες παρατηρούν μείωση του οξέος με αύξηση του αφομοιώσιμου αζώτου (Hernandez-Orte P. et al., 2006; Martínez-Moreno Rubén et al., 2014; Ugliano Maurizio et al., 2008, 2010). Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις στη βιβλιογραφία σχετικά με την αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ διαθεσιμότητας αζώτου και σχηματισμού οξικού οξέος σε χαμηλά ή μέτρια επίπεδα

διαθέσιμου αζώτου και άμεσης συσχέτισης σε υψηλότερα επίπεδα. Η υπερβολική παραγωγή οξικού άλατος σε υπερσυμπληρωμένες ζυμώσεις ίσως να σχετίζεται με αύξηση της παραγωγής βιομάζας, υπό αυτές τις συνθήκες. Η υψηλές απαιτήσεις για τη βιοσύνθεση λιπιδίων, και κατά συνέπεια του οξικού οξέος ως πρόδρομο μόριο, έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση την αύξηση της ροής μέσω αυτής τη μεταβολικής οδού που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή οξικού οξέος (Martínez-Moreno Rubén et al., 2014). Η μείωση της συγκέντρωσης του οξέος, από την άλλη πλευρά, πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η ανάπτυξη ζύμης διεγέρθηκε με την αύξηση της διαθεσιμότητας αζώτου και η αύξηση της παραγωγής των NADH, για τις εκάστοτε συνθήκες, μπορεί να μειώσει την ανάγκη του κύτταρου να παράγει NADH μέσω άλλων οξειδωαναγωγικών αντιδράσεων όπως ο οξειδωτικός σχηματισμός οξικού οξέος από την ακεταλδεΐδη. Μια άλλη εξήγηση γι' αυτό το γεγονός θα μπορούσε να είναι ότι οι υψηλές απαιτήσεις σε ακετυλο-CoA για η σύνθεση λιπιδίων υπό από τέτοιες διεγερμένες συνθήκες ανάπτυξης των ζυμών, θα μπορούσαν να προκαλέσουν μικρότερο σχηματισμό οξικού οξέος (Barbosa Catarina et al., 2009).

Τέλος, όσον αφορά το ποσοστό της αιθανόλης που περιείχαν τα δείγματα, φαίνεται ότι η θρέψη δεν επηρέασε σε μεγάλο βαθμό τη διακύμανσή της (Διάγραμμα 3), με μέση τιμή τα 15.3% vol.



Διάγραμμα 3: Συγκέντρωση αιθανόλης (% vol) ανά συγκέντρωση οργανικού (κάτω) και ανόργανου (πάνω) αζώτου (οι τιμές a, b, c είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p < 0,05$)

Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε μία στατιστικώς σημαντική διαφορά κατά τη συμπλήρωση με ίση ποσότητα ανόργανου και οργανικού αζώτου (30 g/hL) σε σχέση με τη συμπλήρωση με μεγαλύτερη ποσότητα οργανικού αζώτου (30 g/hL ανόργανο και 40 g/hL οργανικό), με το δείγμα με την υψηλότερη ποσότητα οργανικού αζώτου να κατέχει το χαμηλότερο ποσοστό αιθανόλης. Δεδομένα από μελέτες (*Hernandez-Orte P. et al., 2006*), έδειξαν ότι η ποσότητα της παραγόμενης αιθανόλης εξαρτάται από την ποσότητα του αφομοιώσιμου αζώτου καθώς και από το στέλεχος ζύμης που χρησιμοποιείται. Έτσι η προσθήκη αζώτου δύναται να επηρεάσει το περιεχόμενο αλκοόλης σε μεταβλητό βαθμό, ανάλογα με το στάδιο κατά το οποίο εισήχθη. Οι ερευνητές *Ugliano Maurizio et al., 2008*, επίσης παρατήρησαν μη στατιστικώς σημαντική διαφορά στη μεταβολή της αιθανόλης κατά τη θρέψη με ανόργανο άζωτο, ενώ η έρευνα των *Torrea Diego et al., 2011*, έδειξε αύξηση του ποσοστού αιθανόλης για την ίδια μορφή θρέψης. Παρ' όλα αυτά, τα περισσότερα δεδομένα μελετών καταλήγουν στο γεγονός ότι υπάρχει μία σχετική μείωση του ποσοστού αιθανόλης κατά τη θρέψη με άζωτο (*Martínez-Moreno Rubén et al., 2014; Vilanova Mar et al., 2012; Barbosa Catarina et al., 2009; Barbosa Catarina et al., 2009; Ugliano Maurizio et al., 2010*). Μεταβολικά, είναι πιθανό ότι η αυξημένη διαθεσιμότητα αζώτου να προκαλεί μία μετατόπιση στην χρήση άνθρακα εντός του ζυμομύκητα, με αποτέλεσμα χαμηλότερες τελικές συγκεντρώσεις αιθανόλης.

3.3. Πτητικά συστατικών των παραγόμενων οίνων

Εφαρμόστηκε απομόνωση των πτητικών συστατικών με υγρή/υγρή εκχύλιση και στη συνέχεια διαχωρισμός με αέρια χρωματογραφία και ανάλυση με ανιχνευτή FID, σε 4 δείγματα τελικών οίνων, προκειμένου να καθοριστεί το αρωματικό προφίλ μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν (*Πίνακας Β Παράρτημα*). Αναγνωρίστηκαν 8 πτητικές ενώσεις οι οποίες παρουσιάζονται στο παρακάτω *Πίνακα 4*:

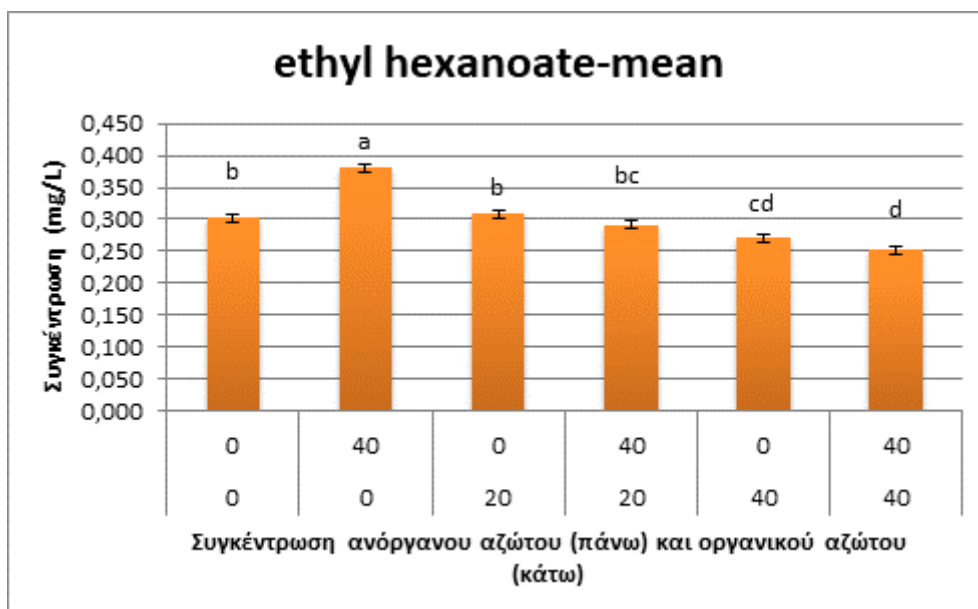
Πίνακας 4: Ομάδες πτητικών ενώσεων (Rodrigues Heber et al., 2017)

Ομάδα αρωματικών ουσιών	Αρωματικές ενώσεις	Κατώφλι αντίληψης (μg/L)
Αιθυλικοί εστέρες λιπαρών οξέων	Ethyl-hexanoate (εξανοϊκός αιθυλεστέρας) (ανανάς, μήλο)	62
	Ethyl-octanoate (οκτανοϊκός αιθυλεστέρας) (φρούτα, ανανάς)	580
	Ethyl-decanoate (δεκανοϊκός αιθυλεστέρας) (σταφύλι)	200
	Ethyl-2-methylbutyrate (2-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας) (πράσινο μήλο, kiwi, κέρασι)	3-18
Οξικοί εστέρες ανώτερων αλκοολών	Isoamyl-acetate (οξικός ισοαμυλεστέρας) (μπανάνα)	30
	Phenylethyl-acetate (οξικός 2-φαινυλεθυλεστέρας) (τριαντάφυλλο, μέλι, λουλούδια)	250
Ανώτερες αλκοόλες	Phenylethanol (φαινύλ-2-αιθανόλη) (τριαντάφυλλο)	14000
	1-hexanol (1-εξανόλη) (γρασίδι)	8000

Τα δεδομένα αναλύθηκαν στατιστικά μέσω του προγράμματος statistica V7, Statsoft και έγινε ανάλυση της διακύμανσης για δύο παράγοντες. Για τη σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το Tukey's HSD test, για $p < 0.05$. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα με τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν, για επιλεγμένες συγκεντρώσεις οργανικού και ανόργανου αζώτου. Έτσι, εξετάστηκαν 4 αιθυλικοί εστέρες λιπαρών οξέων, 2 οξικοί εστέρες ανώτερων και 2 ανώτερες αλκοόλες για τις συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL, οργανικού και ανόργανου αζώτου (δείγματα 1A, 1E, 3A, 3E, 5A, 5E όπως αντιστοιχούν στα διαγράμματα).

Οι εστέρες λιπαρών οξέων με ευχάριστα αρώματα φρούτων και λουλουδιών, προέρχονται από το μεταβολισμό των σακχάρων και των αμινοξέων

(Vilanova Mar et al., 2012), μέσω αντίδρασης ενζυμικής κατάλυσης μεταξύ της αιθανόλης και των ενεργοποιημένων μεσαίων ή μεγάλων αλυσίδων λιπαρών οξέων (Garde-Cerdan Teresa et al., 2008). Στο παρακάτω διάγραμμα 4 παρουσιάζεται ο εστέρας ethyl hexanoate.

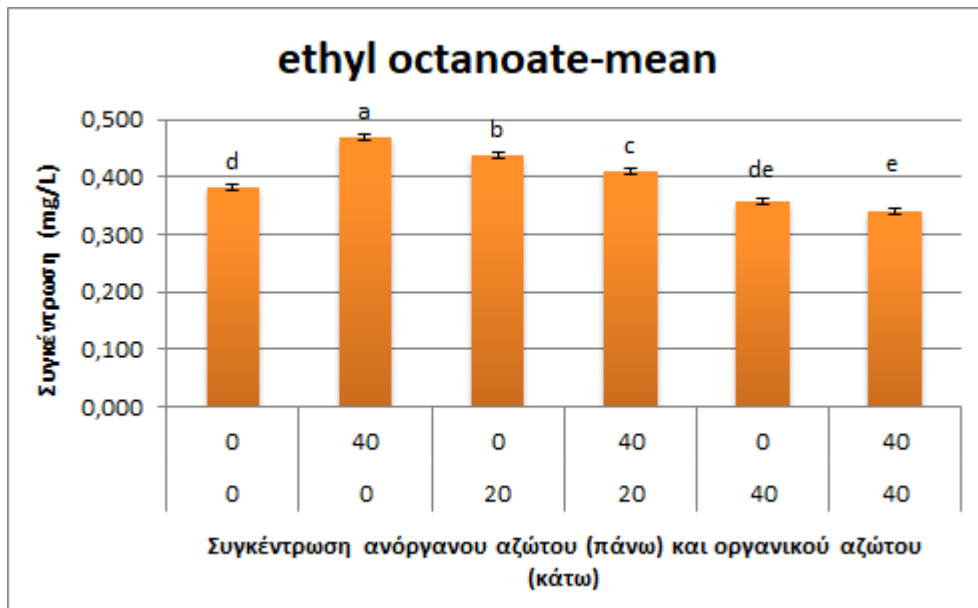


Διάγραμμα 4: Συγκέντρωση ethyl hexanoate (mg/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Η συγκέντρωση του ethyl hexanoate εμφανίζει τη μέγιστη τιμή για το δείγμα 1E, με συγκέντρωση 0.38 mg/L ενώ δείγμα 5E εμφάνισε τη χαμηλότερη με τιμή 0.25 mg/L. Από το διάγραμμα είναι φανερό πως η συγκέντρωση του εστέρα αυξήθηκε κατά την αύξηση του ανόργανου αζώτου, όπως συμφωνούν και οι μελέτες των Ugliano Maurizio et al., 2008, ενώ η συγκέντρωσή του μειώθηκε κατά την αύξηση του οργανικού αζώτου. Η αύξηση της συγκέντρωσης με αύξηση του ανόργανου αζώτου είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι η βιοσύνθεση των ενώσεων μακράς αλύσου επηρεάζεται περισσότερο από την αύξηση του διαθέσιμου αζώτου, εξαιτίας της διέγερσης των ζυμών για την αύξηση της παραγωγής λιπαρών οξέων (Ugliano Maurizio et al., 2008). Για τους ερευνητές Vilanova Mar et al., 2012, δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων του συγκεκριμένου εστέρα κατά την αύξηση του ανόργανου

αζώτου. Επίσης, φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις που παρήχθησαν με τη χρήση οργανικού αζώτου είναι χαμηλότερες σε σχέση με τις συγκεντρώσεις με τη χρήση μόνο ανόργανου, γεγονός που συμφωνεί με τους μελετητές *Miller et al., 2007*, οι οποίοι παρατήρησαν ότι σε μούστους με υψηλή συγκέντρωση αφομοιώσιμου αζώτου, η προσθήκη αμινοξέων μπορεί να μειώσει τις συγκεντρώσεις των εστέρων εξαιτίας της αναστολής της ανατροφοδότησης που καταστέλλει την πρόσληψη αμινοξέων. Μείωση των MCFA (C₆-C₁₀), παρατηρείται σε υπερσυμπληρωμένα γλεύκη με αμμωνιακό άζωτο σε σχέση με το συνδυασμό και των δύο πηγών αζώτου (*Torrea Diego et al., 2011,*), γεγονός που δε συμφωνεί με τα παραπάνω δεδομένα. Δεδομένα διαφορετικών μοντέλων ζύμωσης, έχουν δείξει ότι η συμπλήρωση του γλεύκους με αμμωνιακό άζωτο έχει επίδραση στις συγκεντρώσεις των MCFA αιθυλικών αστέρων και των MCFA στον οίνο, αν και η επίδραση αυτή εξαρτάται από το είδος των ζυμομυκήτων καθώς επίσης και τις πειραματικές συνθήκες. Οι εστέρες των MCFA σχηματίζονται, συνήθως κατά την στατική φάση της ζύμωσης (*Barbosa Catarina et al., 2009*), μέσω της ακυλίωσης από το συνένζυμο A, κατά τα πρώτα στάδια της σύνθεσης των λιπαρών οξέων. Οι αντίστοιχοι εστέρες στη συνέχεια σχηματίζονται ενζυμικά μέσω της δράσης μιας εστεράσης ή μιας τρανσφεράσης ακυλ-CoA αιθανόλης, με την τελευταία να είναι υπεύθυνη για ένα μεγάλο μέρος των αιθυλεστέρων MCFA που παράγονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (*Ugliano Maurizio et al., 2008*).

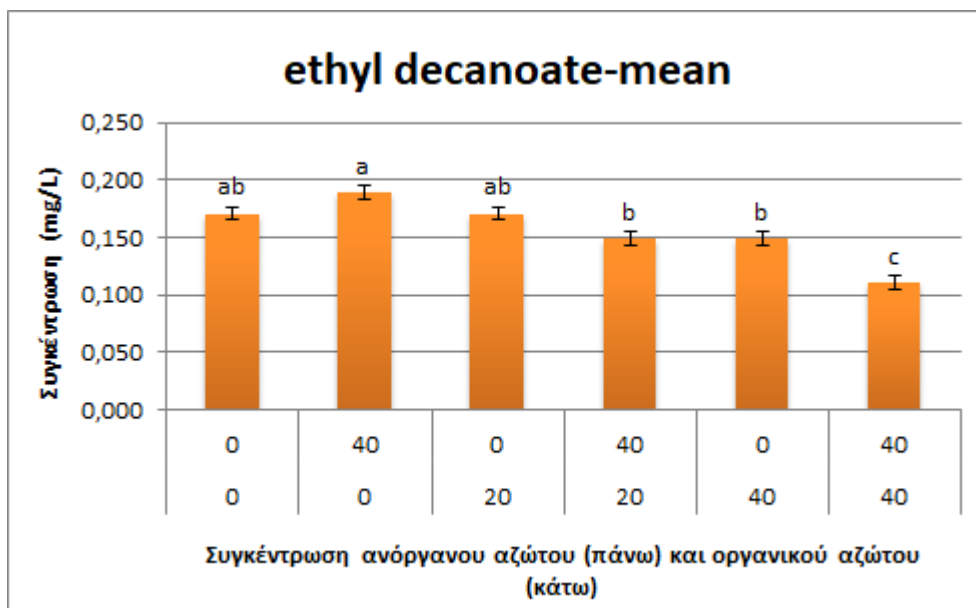
Στην ίδια κατηγορία εστέρων (MCFA C₆-C₈) ανήκει και ο εστέρας ethyl octanoate, η μεταβολή της συγκέντρωσης του οποίου φαίνεται στο παρακάτω **διάγραμμα 5**.



Διάγραμμα 5: Συγκέντρωση ethyl octanoate (mg/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Παρόμοια αποτελέσματα φαίνεται να παρουσιάζονται και για τον ethyl octanoate, με τη μέγιστη συγκέντρωση του να κατέχει το δείγμα 1E (θρέψη με μέγιστη συγκέντρωση ανόργανου αζώτου), φτάνοντας τα 0.47 mg/L, ενώ κατά τη συμπλήρωση με συνδυασμό ανόργανου και οργανικού αζώτου, φαίνεται να επέρχεται αύξηση με τη χαμηλή ποσότητα οργανικού αζώτου και μείωση με την υψηλότερη δόση οργανικού, συγκρινόμενα με το μάρτυρα (1A). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα των *Ugliano Maurizio et al., 2008* και των *J.R. Mouret et al., 2014*, οι οποίοι βρήκαν αυξημένες συγκεντρώσεις αυτού του εστέρα κατά την αύξηση του αμμωνιακού αζώτου. Επιπλέον παρατηρείται ότι η συμπλήρωση με οργανικό άζωτο δίνει χαμηλότερη συγκέντρωση του εστέρα σε σχέση με τη συμπλήρωση με ανόργανο γεγονός που συμφωνεί με τους *Miller et al., 2007*.

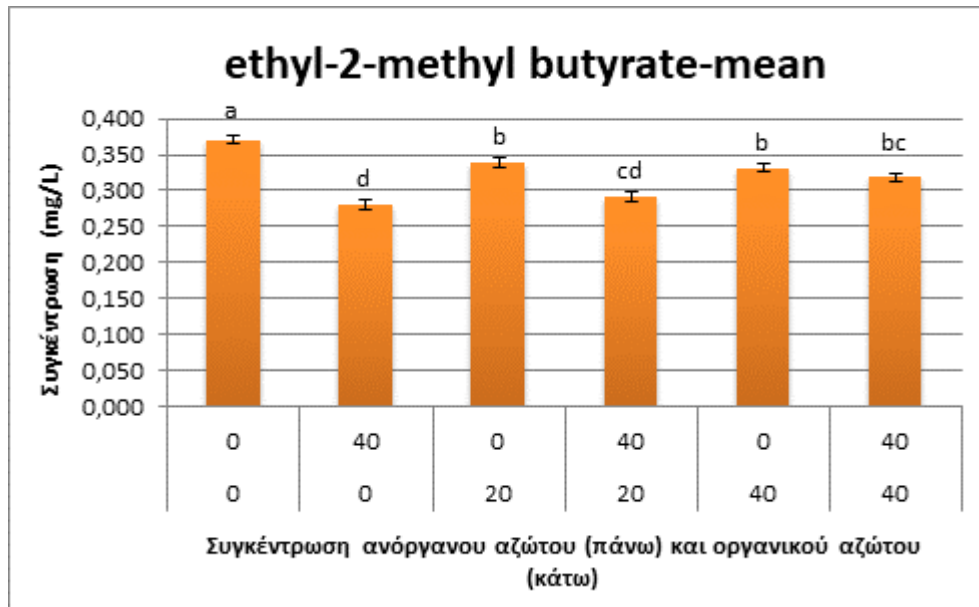
Όσον αφορά τον αθυλεστέρα ethyl decanoate, ανήκει στους εστέρες μακράς αλύσου (MCFA C₈-C₁₂) και η μεταβολή της συγκέντρωσής του παρουσιάζεται στο *διάγραμμα 6*.



Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση ethyl decanoate (mg/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Όπως φαίνεται, η θρέψη του γλεύκους με ανόργανο άζωτο δεν επηρέασε τη συγκέντρωση του συγκεκριμένου εστέρα, με τη τιμή να φτάνει τα 0.19 mg/L. Το συμπέρασμα αυτό συγκλίνει με τα αποτελέσματα των *Vilanova Mar et al., 2012* και τους *Ugliano Maurizio et al., 2008*, οι οποίοι επίσης δεν βρήκαν συσχέτιση του εστέρα σε συνάρτηση με την αύξηση του αμμωνιακού αζώτου. Από την άλλη πλευρά φαίνεται να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά κατά την αύξηση του ανόργανου αζώτου σε συνδυασμό με τη μέγιστη ποσότητα του οργανικού, καθώς παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του εστέρα. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στην αναστολή της ανατροφοδότησης που καταστέλλει την πρόσληψη αμινοξέων σε μούστους υπερσυμπληρωμένους με οργανικό άζωτο. Σε υψηλές συγκεντρώσεις YAN, το αμμωνιακό άζωτο καταστέλλει τη συσσώρευση των εστέρων μακράς αλύσου, σε σχέση με το συνδυασμό αζώτου αμινοξέων και αμμωνιακού αζώτου (*Torrea Diego et al., 2011*), ωστόσο κάτι τέτοιο δε παρατηρείται στη δεδομένη περίπτωση.

Τέλος, όσον αφορά τον εστέρα ethyl-2-methyl butyrate, από το *διάγραμμα 5*, φαίνεται να ακολουθεί αντίθετη πορεία σε σχέση με τους προηγούμενους εστέρες μακράς αλύσου.

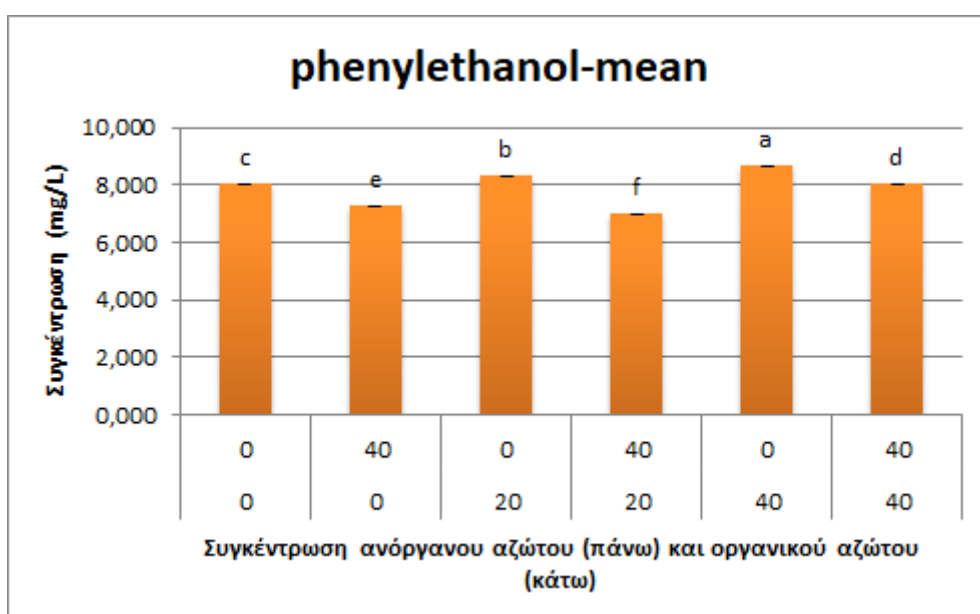


Διάγραμμα 7: Συγκέντρωση ethyl-2-methyl butyrate (mg/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Παρατηρώντας τη πορεία της συγκέντρωσης του εστέρα φαίνεται ότι, η συγκέντρωσή του μειώθηκε με αύξηση της συγκέντρωσης του ανόργανου αζώτου, φτάνοντας τα 0.28 mg/L, ενώ και κατά τη θρέψη με οργανικό άζωτο παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, με αύξηση της συγκέντρωσης στα 0.33 mg/L. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τους ερευνητές *Ugliano Maurizio et al., 2008* και τους *Torrea Diego et al., 2011*, οι οποίοι επίσης παρατήρησαν μείωση του συγκεκριμένου εστέρα κατά τη θρέψη με ανόργανο άζωτο. Παρόλο που ο εστέρας αυτός ανήκει στους εστέρες μικρής αλύσου, φαίνεται ότι διαφέρει με τους προηγούμενους, ethyl hexanoate και ethyl octanoate, ως προς τη συγκέντρωση που παράγεται κατά τη θρέψη με οργανικό άζωτο, καθώς φαίνεται να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τη θρέψη με ανόργανο. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των *Garde- Cerdan Teresa et al., 2007*, οι οποίοι υποστήριξαν ότι δεν υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του συγκεκριμένου εστέρα και

της θρέψης με οργανικό άζωτο, καθώς τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι κατά τη θρέψη με αμινοξέα η συγκέντρωση του εστέρα βρίσκεται σε ίχνη.

Όσον αφορά την επίδραση της αζωτούχας θρέψης στη συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών, για το δεδομένο πείραμα εξετάστηκαν οι phenyl ethanol και η 1-hexanol. Έτσι, παρατηρώντας το *διάγραμμα 8*, η συγκέντρωση της phenyl ethanol φαίνεται να μειώνεται με αύξηση του ανόργανου και να αυξάνεται με αύξηση του οργανικού αζώτου, με μέγιστη συγκέντρωση τα 8.67 mg/L κατά τη θρέψη με τη μέγιστη συγκέντρωση οργανικού αζώτου.

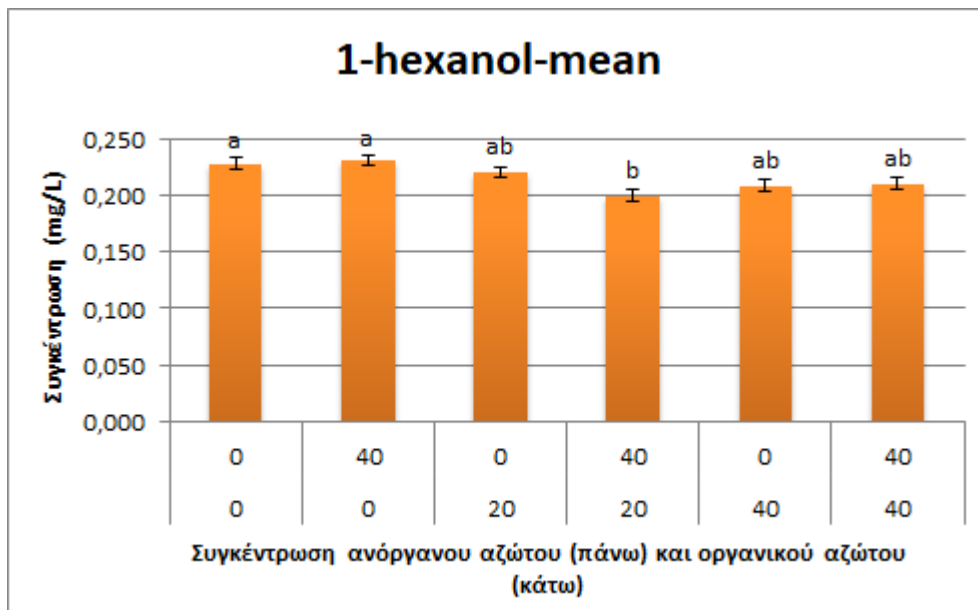


Διάγραμμα 8: Συγκέντρωση phenylethanol (mg/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Η συγκέντρωση της phenylethanol φαίνεται να εμφανίζει στατιστικώς σημαντική διαφορά κατά τη θρέψη με ανόργανο αζώτο, με τη χαμηλότερη συγκέντρωση να κατέχει το δείγμα 3E. Το αποτέλεσμα αυτό συγκλίνει με τα αποτελέσματα των *Ugliano Maurizio et al., 2008*, των *Torrea Diego et al., 2011* και των *Martínez-Moreno Rubén et al., 2014*, οι οποίοι παρατήρησαν σημαντική μείωση των ανώτερων αλκοολών κατά τη θρέψη με υψηλές ποσότητες ανόργανου αζώτου. Οι ενώσεις αυτές προέρχονται από τα αντίστοιχα α-κετοξέα μέσω αντιδράσεων του

μονοπατιού Ehrlich. Με τη σειρά τους, τα α-κετοξέα προέρχονται από την αποικοδόμηση (τρανσαμίνωση) των αμινοξέων ή από τη *de novo* βιοσύνθεση των σακχάρων. Η χρήση αμμωνιακού αζώτου, δύναται να οδηγήσει σε κατανάλωση των α-κετοξέων, προκειμένου να γίνει η απορρόφηση του αζώτου, αποτρέποντας τα να αποικοδομηθούν μέσω του μονοπατιού Ehrlich (Martínez-Moreno Rubén et al., 2014). Για τον ίδιο λόγο, οι ερευνητές Torrea Diego et al., 2011, υποστηρίζουν ότι η συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών ήταν μεγαλύτερη σε οίνους που είχαν συμπληρωθεί με μίξη αμινοξέων και αμμωνιακού αζώτου σε σχέση με τη θρέψη μόνο με αμμωνιακό άζωτο, γεγονός που για τη συγκεκριμένη μελέτη ισχύει μόνο για το δείγμα 5E. Η αυξημένη συγκέντρωση της επιμέρους αλκοόλης κατά τη θρέψη με μέγιστη συγκέντρωση οργανικού αζώτου, πιθανώς να οφείλεται στη σχέση μεταξύ του συγκεκριμένου πρόδρομου αμινοξέος και της συνολικής συγκέντρωσης του αζώτου στο γλεύκος (Vilanona Mar et al., 2012). Σε ίδιο αποτέλεσμα κατέληξαν και οι Teresa Garde-Cerdan et al., 2007, για χαμηλότερες ωστόσο δόσεις οργανικού αζώτου.

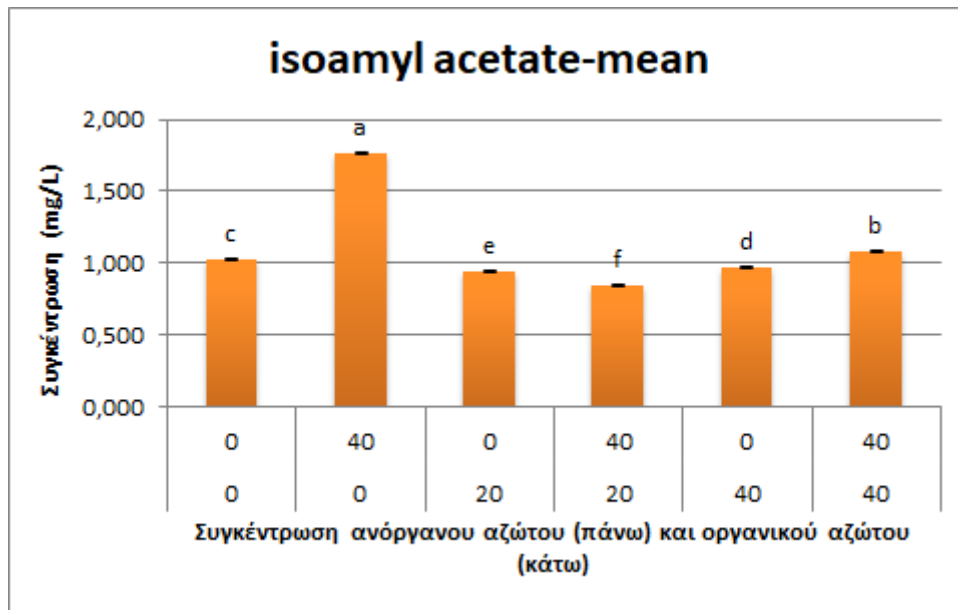
Όσον αφορά τη μεταβολή της συγκέντρωσης της 1-hexanol (Διάγραμμα 9), φαίνεται ότι η θρέψη δεν επηρέασε σε μεγάλο βαθμό την συγκέντρωσή της καθώς δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, με εξαίρεση μόνο το δείγμα 3E σε σχέση με το μάρτυρα. Η συγκέντρωση της 1- hexanol κυμάνθηκε στα 0.22 mg/L.



Διάγραμμα 9: Συγκέντρωση 1-hexanol (mg/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Μελέτες επίσης έχουν δείξει, μη στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση της 1-hexanol κατά τη θρέψη με οργανικό άζωτο, ενώ σε άλλες έχει παρουσιαστεί κάποια μείωση (Teresa Garde-Cerdan et al., 2007). Αν συγκρίνουμε τα δείγματα 1E και 3E, είναι φανερό ότι διατηρώντας ίδια συγκέντρωση ανόργανου αζώτου και μεταβάλλοντας το οργανικό άζωτο, επέρχεται μείωση της συγκέντρωσης της ένωσης. Από την άλλη πλευρά όπως προαναφέρθηκε, οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει μείωση των ανώτερων αλκοολών κατά την αύξηση του ανόργανου αζώτου (Vilanova Mar et al., 2012).

Τέλος, όσον αφορά τους οξικού εστέρες των ανώτερων αλκοολών, εξετάστηκαν οι phenethyl acetate και isoamyl acetate. Για τον isoamyl acetate (Διάγραμμα 10), φαίνεται ότι η θρέψη με ανόργανο άζωτο απέδωσε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση του εστέρα, με τιμή τα 1.78 mg/L.

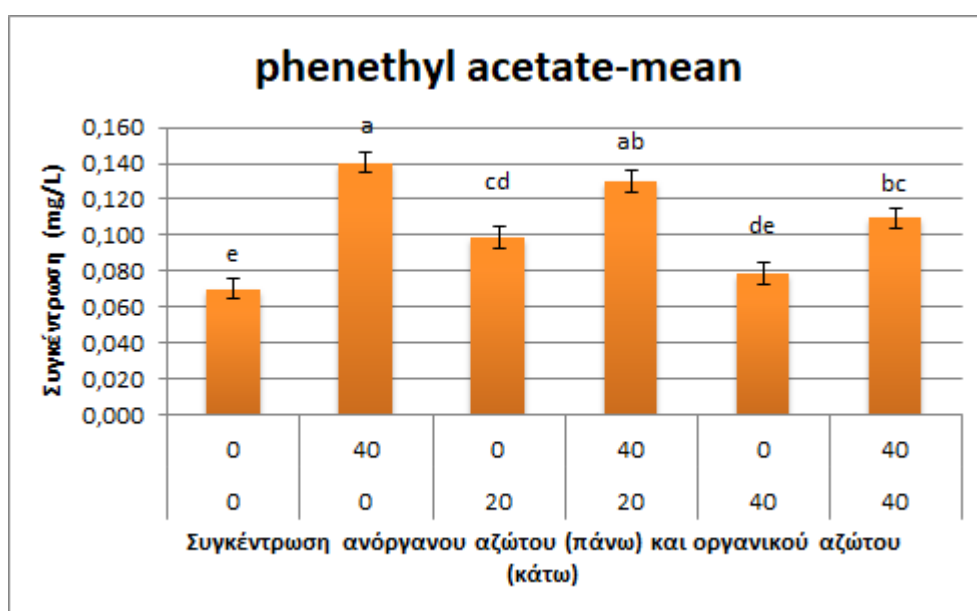


Διάγραμμα 10: Συγκέντρωση isoamyl acetate (mg/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Τα παραπάνω αποτελέσματα για την θρέψη με ανόργανο άζωτο συμφωνούν και με άλλους ερευνητές, οι οποίοι διαπίστωσαν την αύξηση του εστέρα με αύξηση της συγκέντρωσης του ανόργανου αζώτου (Burin Vívian Maria et al., 2016; Torrea Diego et al., 2011), ενώ οι ερευνητές Mouret J.R. et al., 2014 διαπίστωσαν αύξηση του εστέρα με αύξηση της ποσότητας του διαθέσιμου αζώτου, σε συνδυασμό οργανικού και ανόργανου αζώτου, όπως ισχύει και στη συγκεκριμένη μελέτη συγκρίνοντας το δείγμα 1A και το δείγμα 5E. Η αύξηση του σχηματισμού οξικών εστέρων ως απόκριση στην συμπλήρωση του αζώτου είναι το αποτέλεσμα της υψηλότερης έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα της αλκοόλης της αλκυλικής τρανσφεράσης. Το ένζυμο αυτό συμμετέχει στη σύνθεση οξικών ενώσεων μέσω της αντίδρασης συμπύκνωσης μεταξύ των ανώτερων αλκοολών και του ακετυλ-CoA (Burin Vívian Maria et al., 2016). Ο τύπος της πηγής αζώτου γενικά, παρουσίασε ελάχιστη επίδραση στην παραγωγή των περισσότερων οξικών αλάτων, αν και ο συνδυασμός οργανικής και ανόργανης θρέψης επηρέασε περισσότερο την παραγωγή οξικών εστέρων. Πιθανώς, ο τύπος πηγής αζώτου επηρεάζει την έκφραση συνθετικών/υδρολυτικών γονιδίων των εστέρων (Torrea Diego et al., 2011; Mouret J.R. et al., 2014). Όσον αφορά τη θρέψη με οργανικό άζωτο, οι

ερευνητές *Teresa Garde-Cerdan et al., 2007*, βρήκαν θετική συσχέτιση του εστέρα με την αύξηση του οργανικού αζώτου, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τη δεδομένη μελέτη, ωστόσο δε μπορούσαν να συσχετίσουν την αύξηση αυτή με τις ισοαμυλικές αλκοόλες καθώς οι ανώσεις αυτές δεν είχαν θετική συσχέτιση με την αύξηση της συγκεκριμένης μορφής αζώτου.

Η πορεία του οξικού εστέρα phenylethyl acetate φαίνεται να επηρεάζεται από τις εκάστοτε συνθήκες θρέψης καθώς από το *διάγραμμα 11*, παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του με αύξηση της ποσότητας του ανόργανου αζώτου αλλά και του οργανικού αζώτου.



Διάγραμμα 11: Συγκέντρωση phenethyl acetate (mg/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

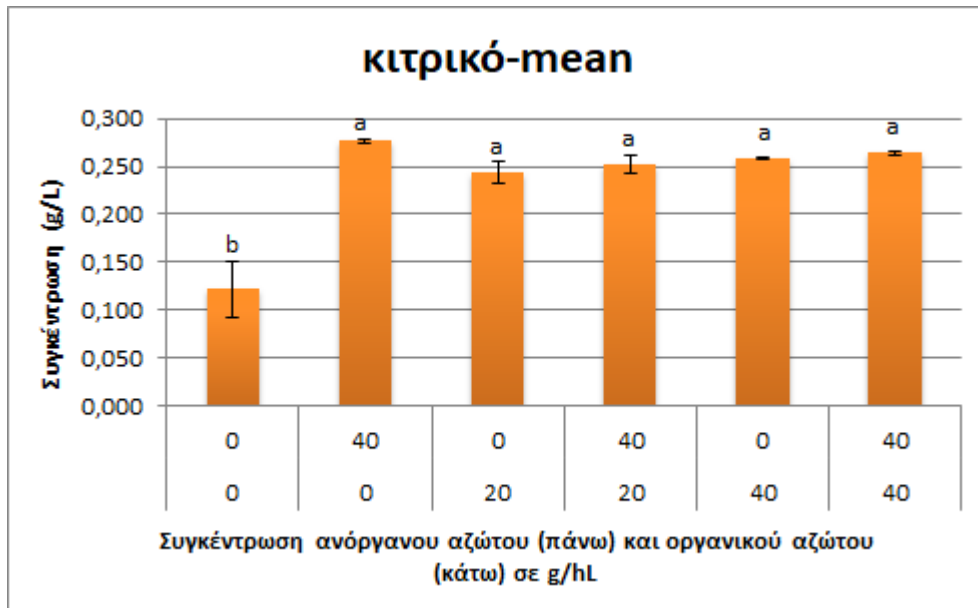
Η συγκέντρωση του εστέρα εμφανίζει τη μέγιστη τιμή κατά τη θρέψη με μέγιστη ποσότητα ανόργανου αζώτου. Στη συγκεκριμένη μελέτη δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων 1A και 5A, ενώ το αντίθετο αποτέλεσμα προέκυψε για τα δείγματα 1A και 3A. Στη μελέτη των *Teresa Garde-Cerdan et al., 2007*, βρέθηκε θετική συσχέτιση της ένωσης αυτής με την αύξηση του οργανικού αζώτου, η οποία οφείλονταν και στην αύξηση της 2-phenylethanol στο

μέσο με την αυξημένη ποσότητα οργανικού αζώτου. Επίσης, θετική συσχέτιση σχετικά με την αύξηση της ένωσης σε σχέση με την αύξηση του ανόργανου αζώτου, βρίσκουν οι ερευνητές *Catarina Barbosa et al., 2009*, ενώ οι ερευνητές *Torrea Diego et al., 2011* βρήκαν ότι η συγκέντρωση της συγκεκριμένης ένωσης ήταν μεγαλύτερη κατά τη θρέψη με οργανικό άζωτο συγκρινόμενη με τη θρέψη με ανόργανο, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης. Σε αντίθεση έρχονται και τα αποτελέσματα των *Vilanona Mar et al., 2012*, για τους οποίους η συγκεκριμένη ένωση μειώθηκε με αύξηση του ανόργανου αζώτου. Πιθανή εξήγηση για αυτό το φαινόμενο είναι ότι ενώ η παραγωγή των αλκοολών με διακλαδιζόμενη αλυσίδα και των οξικών εστέρων συνδέονται με τη βιοσύνθεση των αμινοξέων, η σύνθεση των ανώτερων αλκοολών συνδέεται επίσης και με τη παραγωγή συνενζύμων των νουκλεοτιδίων πυριδίνης.

3.4. Προσδιορισμός οργανικών οξέων και γλυκερόλης μέσω HPLC

Παρακάτω αναλύονται οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στις συγκεντρώσεις των οξέων κιτρικό, τρυγικό, μηλικό, γαλακτικό και ηλεκτρικό καθώς και στη παραγωγή γλυκερόλης, κατά τις διαφορετικές ποσότητες θρέψης με οργανικό και ανόργανο άζωτο, για 6 δείγματα οίνων της ποικιλίας Ασύρτικο.

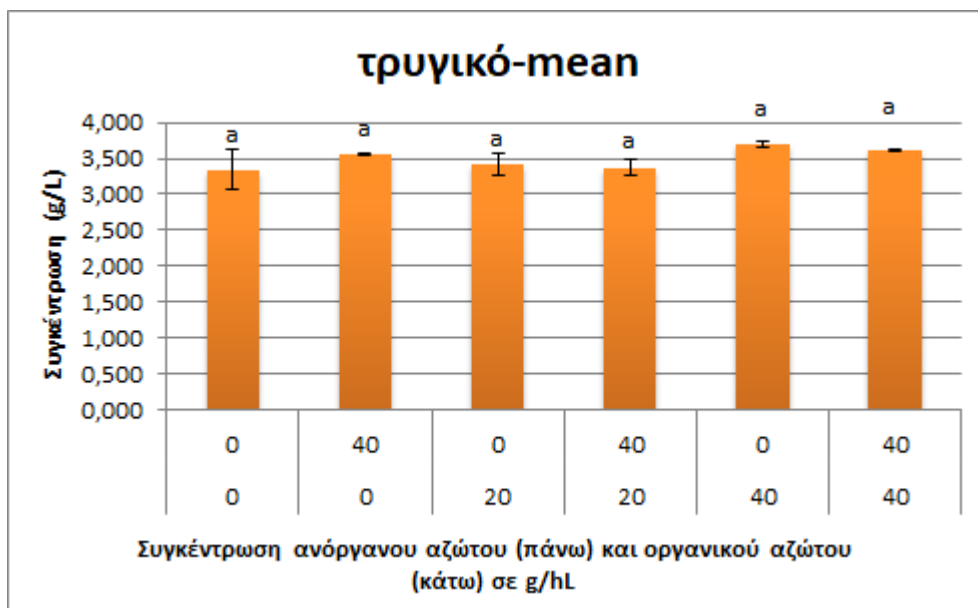
Ξεκινώντας με το κιτρικό οξύ, παρατηρείται μεταβολή της συγκέντρωσής του κατά την αύξηση του ανόργανου και του οργανικού αζώτου (*Διάγραμμα 12*).



Διάγραμμα 12: Συγκέντρωση κιτρικού οξέος (g/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Για τον μάρτυρα η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος αντιστοιχεί στα 0.12 g/L ενώ κατά τη προσθήκη είτε ανόργανου είτε οργανικού αζώτου, αλλά και κατά το συνδυασμό αυτών των δύο μορφών θρέψης, φαίνεται να μην υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά των συγκεντρώσεων η οποία φτάνει τα 0.27 g/L περίπου. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με του ερευνητές *Vilanova Mar et al., 2012*, στο πείραμα των οποίων δε παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση του κιτρικού οξέος κατά την αύξηση του διαθέσιμου αζώτου.

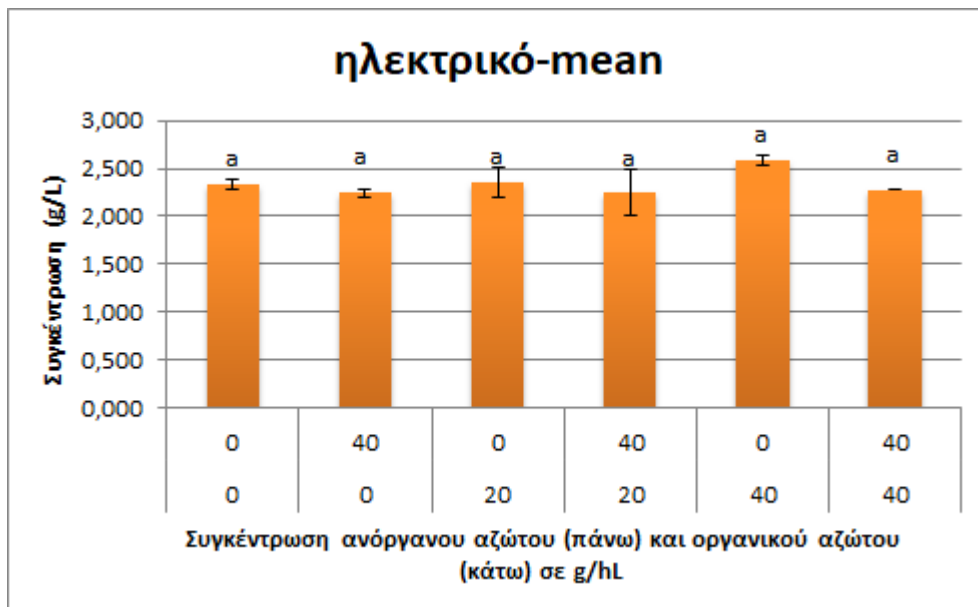
Συνεχίζοντας με τη συγκέντρωση του τρυγικού οξέος, από το *διάγραμμα 13* φαίνεται να μην υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων του οξέος κατά την αύξηση της αζωτούχας θρέψης σε οποιαδήποτε μορφή.



Διάγραμμα 13: Συγκέντρωση τρυγικού οξέος (g/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Η συγκέντρωση του οξέος βρίσκεται στα 3.6 g/L περίπου. Γενικά η περιεκτικότητα του ανόργανου αζώτου δύνανται να επηρεάσει τη συγκέντρωση των οργανικών οξέων και των οξέων του οίνου (Torrea et al., 2011; Ugliano Maurizio et al., 2007), ωστόσο για το συγκεκριμένο οξύ τα αποτελέσματα της μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Vilanova Mar et al., 2012 οι οποίοι επίσης δε βρήκαν διαφορές στη συγκέντρωση του τρυγικού οξέος κατά τη θρέψη με άζωτο.

Ακολούθως, και η συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος φαίνεται να μην παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά κατά τη θρέψη με άζωτο, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 14.

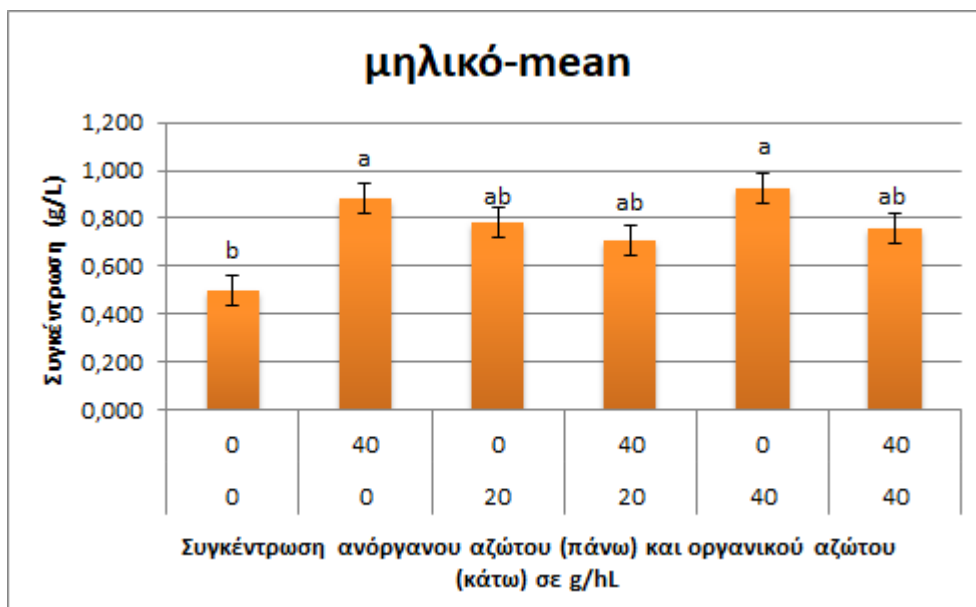


Διάγραμμα 14: Συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος (g/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Η συγκέντρωση του οξέος φαίνεται να κυμαίνεται περίπου στα 2.3 g/L. Για του ερευνητές *Vilanova Mar et al., 2012*, η συγκέντρωση του οξέος φαίνεται επίσης να μην επηρεάστηκε από τη θρέψη με διαφορετικές συγκεντρώσεις ανόργανου αζώτου. Από την άλλη πλευρά οι ερευνητές *Martínez-Moreno Rubén et al., 2014*, βρίσκουν αρνητική συσχέτιση του ηλεκτρικού οξέος με αύξηση του ανόργανου αζώτου. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι η βιοσύνθεση αυτού του μορίου είναι σχετικά μικρή υπό αναερόβιες συνθήκες οπότε και συναγωνίζεται τη διαθεσιμότητα του πυροσταφυλικού οξέος. Αναλόγως το μεταβολικό μονοπάτι στο οποίο λαμβάνει μέρος το ηλεκτρικό οξύ, μπορεί να συμβάλλει στην οξειδωαναγωγική ισορροπία. Το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης έρχεται σε αντίθεση και με τους *Torrea Diego et al., 2011*, για τους οποίους το ηλεκτρικό οξύ μειώθηκε με θρέψη με ανόργανο άζωτο ενώ παρατηρήθηκε αύξηση κατά των συνδυασμό και των δύο μορφών θρέψης.

Όσον αφορά στη συγκέντρωση του μηλικού οξέος (*Διάγραμμα 15*), παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης κατά τη θρέψη με οποιαδήποτε πηγή αζώτου, συγκρινόμενη με το δείγμα αναφοράς, ενώ μεταξύ των υπόλοιπων

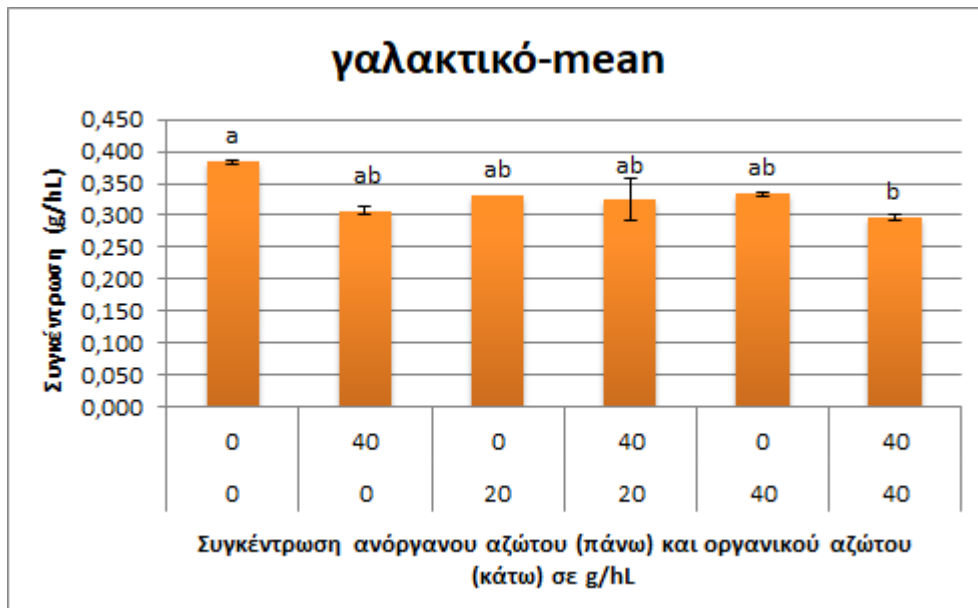
δειγμάτων, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 0.5-0.9 g/L περίπου.



Διάγραμμα 15: Συγκέντρωση μηλικού οξέος (g/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Τα αποτελέσματα των ερευνητών φαίνεται να είναι συγκεχυμένα καθώς το μηλικό οξύ δύναται να επηρεαστεί από τις διαφορετικές συνθήκες θρέψης, αλλά υπάρχουν έρευνες στις οποίες οι συγκεντρώσεις του μηλικού οξέος δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές κατά την αύξηση του διαθέσιμου αζώτου (Vilanova Mar et al., 2012), ενώ σε άλλες παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσής του οξέος (Torrea Diego et al., 2011; Vilanova Mar et al., 2007)

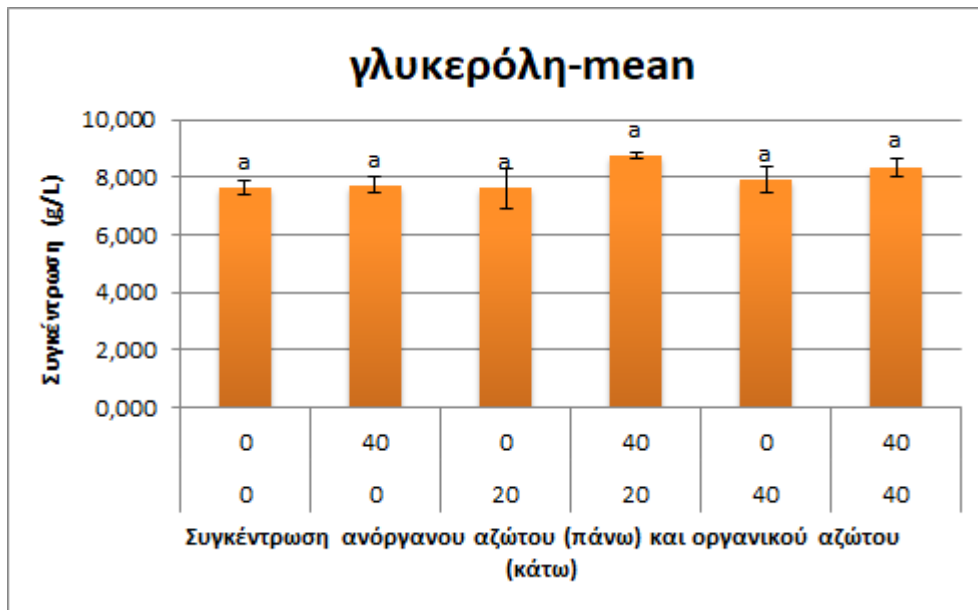
Τέλος, όσον αφορά τη μεταβολή του γαλακτικού οξέος, από το διάγραμμα 16, φαίνεται ότι τη χαμηλότερη συγκέντρωση κατέχει το δείγμα 5E, κατά τη θρέψη, δηλαδή, με συνδυασμό οργανικού και ανόργανου αζώτου στις μέγιστες συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 16: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (g/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Η μέγιστη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος αντιστοιχίζεται στο δείγμα 1A με τιμή 0.38 g/L ενώ η χαμηλότερη για το δείγμα 5E με τιμή 0.30 g/L, ενώ γενικά δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Για τους ερευνητές *Vilanova Mar et al., 2012* δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των δειγμάτων με αυξημένες ποσότητες θρέψης με ανόργανο άζωτο. Από την άλλη πλευρά, οι ερευνητές *Martínez-Moreno Rubén et al., 2014*, παρατήρησαν αύξηση του γαλακτικού οξέος κατά την θρέψη με υψηλές ποσότητες ανόργανου αζώτου, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με το δεδομένο αποτέλεσμα αυτής της μελέτης. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι πάντα υψηλότερη σε γλεύκη συμπληρωμένα με άζωτο. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι η παραγωγή γαλακτικού οξέος υπό αναερόβιες συνθήκες γίνεται μέσω της οδού της μεθυλο-γλυοξάλης υπό διεγερμένο μεταβολισμό, υποδεικνύοντας ότι η προσθήκη αζώτου προκαλεί αύξηση της γλυκολυτικής ροής.

Όσον αφορά τη συγκέντρωση της γλυκερόλης, από το *διάγραμμα 17* φαίνεται να μη επηρεάστηκε από τις διαφορετικές συνθήκες θρέψης με τη συγκέντρωση να κυμαίνεται περίπου στα 7.8 g/L.



Διάγραμμα 17: Συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), για τα 6 δείγματα οίνων με συγκεντρώσεις 0 g/hL, 20 g/hL και 40 g/hL. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$

Στατιστικώς μη σημαντική διαφορά παρατήρησαν και οι *Torrea Diego et al., 2011* και *Vilanona Mar et al., 2012*, για τους οποίους οι διαφορετικές συνθήκες θρέψης δεν επηρέασαν τη συγκέντρωση της γλυκερόλης. Από την άλλη πλευρά, μελέτες έχουν δείξει θετική συνάρτηση της ένωσης με αύξηση του ανόργανου αζώτου. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε διάφορες παραμέτρους. Αρχικά, υπό συνθήκες αναερόβιας ανάπτυξης, η βιοσύνθεση της γλυκερόλης επιτρέπει την αναγέννηση περίσσειας ισοδύναμων που προκύπτουν από τη σύνθεση της βιομάζας. Η πρόσληψη και ο μεταβολισμός των αμινοξέων συνεπάγονται υψηλότερη κατανάλωση NADH, ενώ οι μεταβολικές οδοί που εμπλέκονται στην αφομοίωση των αμμωνιακών συμβάλλουν στην αναγέννηση της δεξαμενής NADH. Επιπλέον, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η προσθήκη αζώτου δεν έχει επίδραση στον σχηματισμό της γλυκερόλης και ότι οι διαφορές στη συγκέντρωση της γλυκερόλης σχετίζονται με τη χρησιμοποιούμενο στέλεχος ζυμομύκητα. Δεδομένου ότι ο σχηματισμός γλυκερόλης είναι σε μεγάλο βαθμό το αποτέλεσμα της απόκρισης στο στρες, ιδιαίτερα της οσμωρύθμισης και της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, είναι λογικό ότι οι φυσιολογικές καταπονήσεις που σχετίζονται με συμπληρωμένα γλεύκη θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνες για τις διαφορετικές

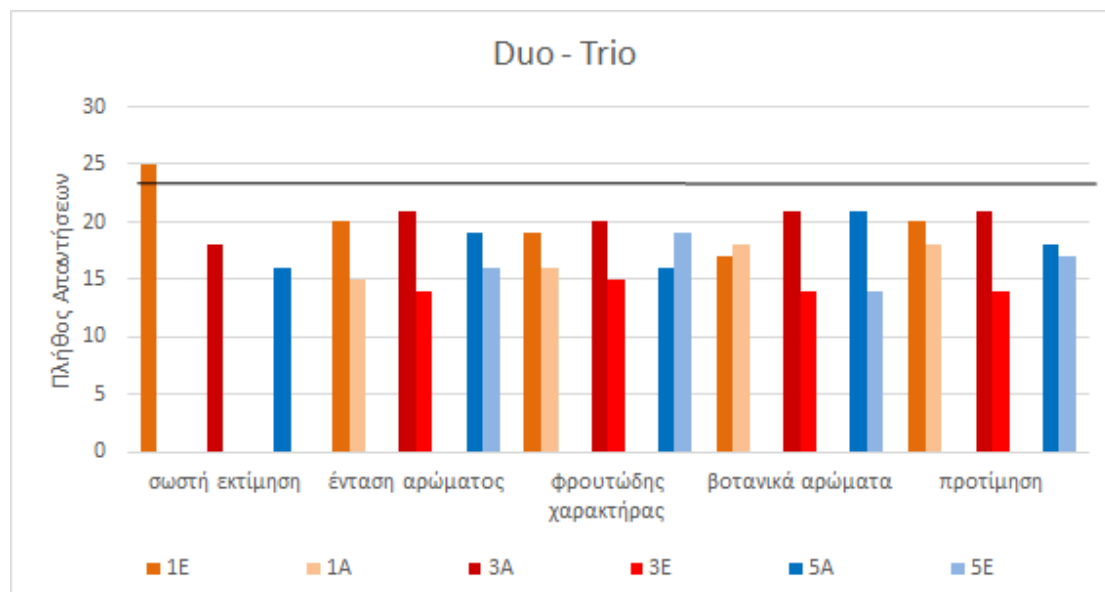
παρατηρήσεις σχετικά με την επίδραση της προσθήκης αζώτου στον σχηματισμό γλυκερόλης (Teresa Garde-Cerdan et al., 2007; Martínez-Moreno Rubén et al., 2014; Ugliano Maurizio et al., 2008, 2010).

4. Οργανοληπτικός έλεγχος

4.1. Αποτελέσματα δοκιμής duo-trio

Η οργανοληπτική δοκιμή duo-trio έλαβε χώρα στο διάστημα δύο εβδομάδων, στις 10/05/2017 και στις 17/05/2017. Συμμετείχαν συνολικά 35 δοκιμαστές. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη βοήθεια πινάκων. Για τη δοκιμή duo-trio: Significance in Paired-Sample and Duo-Trio Tests $H_0: p=1/2$, The number n is the number of trials, i.e., the number of judges or judgments in the test (Roessler et al., 1956).

Αναλυτικότερα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στο παρακάτω διάγραμμα 18.



Διάγραμμα 18: Αποτελέσματα δοκιμασίας duo trio. Σε κάθε εξεταζόμενο ζεύγος δειγμάτων αντιστοιχεί και ένα χρώμα. Τα δείγματα είναι ομαδοποιημένα βάσει των ερωτημάτων που καλούνταν να απαντήσουν οι δοκιμαστές. Η μαύρη οριζόντια γραμμή στο επάνω μέρος αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο παραπάνω διάγραμμα, αποτελούν τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των δύο συνεδριών που έλαβαν χώρα. Το σύνολο των δοκιμασιών είναι 35, άρα μέσω πίνακα προκύπτει ότι για $p=0.05$, υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά για τα δείγματα που έχουν συγκεντρώσει πλήθος απαντήσεων μεγαλύτερο ή ίσο του 23. Έτσι φαίνεται, ότι το δείγμα που παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά είναι τα δείγμα 1E. Πιο αναλυτικά, οι δοκιμαστές φαίνεται ότι μπόρεσαν να δώσουν σωστή εκτίμηση για 1 από τα 3 εξεταζόμενα ζεύγη δειγμάτων, παρόλο που το συνολικό πλήθος των απαντήσεων ήταν πολύ κοντά στη σωστή εκτίμηση και για τα υπόλοιπα ζεύγη. Έτσι, για το ζεύγος 1A (0 g/hL οργανικό άζωτο και 0 g/hL ανόργανο άζωτο) και 1E (0 g/hL οργανικό άζωτο και 40 g/hL ανόργανο άζωτο), οι δοκιμαστές έδωσαν σωστή εκτίμηση και μπόρεσαν να αντιληφθούν τη διαφορά μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης συγκέντρωσης ανόργανου αζώτου. Για τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά δε φαίνεται να

υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, ωστόσο οι απαντήσεις τείνουν να κατατάξουν το δείγμα 3Α, με τη μεγαλύτερη ένταση ως προς το φρουτώδη χαρακτήρα, την ένταση του αρώματος, το βοτανικό χαρακτήρα και τη προτίμηση και το δείγμα 3Ε ως προς τη χαμηλότερη ένταση για τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά

5. Συμπεράσματα

Υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με την επίδραση του οργανικού και ανόργανου αζώτου στους πτητικούς και μη πτητικούς μεταβολίτες των ζυμών που προέρχονται κατά τις διαδικασίες ζύμωσης. Οι περισσότερες έρευνες εστιάζουν στη συγκέντρωση του αζώτου, η οποία επιτυγχάνεται με ενίσχυση ενός μούστου με άζωτο, με απολάσπωση ή με τη δημιουργία συνθετικού μούστου εμπλουτισμένου με αμμωνιακά άλατα.

Από την παρούσα έρευνα, έγινε φανερό ότι οι περισσότεροι μεταβολίτες που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους Ασύρτικου, δύναται να επηρεαστούν από το διαφορετικό είδος θρέψης καθώς και τη ποσότητα του διαθέσιμου αζώτου. Παρ' όλα αυτά κρίνεται σημαντικό να σημειωθεί, ότι η μεταβολές των συγκεντρώσεων των ενώσεων αυτών, προκύπτουν ως αποτέλεσμα του συνδυασμού και των εκάστοτε συνθηκών ζύμωσης, του εκάστοτε στελέχους ζυμομύκητα που χρησιμοποιείται, τη ποικιλία καθώς και η χρονική παρέμβαση της θρέψης σε σχέση και με την αρχική ποσότητα διαθέσιμου αζώτου του μούστου.

Όσον αφορά τις πτητικές ενώσεις που αναλύθηκαν, οι περισσότεροι αιθυλικοί εστέρες των λιπαρών οξέων, φάνηκε να έχουν θετική συνάρτηση με την αύξηση του ποσοστού του ανόργανου αζώτου, ενώ παρατηρήθηκε μια σχετική μείωση της συγκέντρωσής τους κατά το συνδυασμό οργανικού και ανόργανου αζώτου. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί ο εστέρας ethyl-2-methyl-butyrate, ο οποίος μειώθηκε με την αύξηση του ποσοστού του ανόργανου αλλά και του οργανικού αζώτου. Παρατηρώντας τη μεταβολή των ανώτερων αλκοολών, οι διαφορετικές

συνθήκες θρέψης φάνηκε να μην επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη συγκέντρωση της 1-hexanol ενώ αντίθετα η συγκέντρωση της phenyl-ethanol μειώθηκε κατά την αύξηση του ανόργανου αζώτου και αυξήθηκε κατά την αύξηση του οργανικού. Τέλος, όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των οξικών εστέρων των ανώτερων αλκοολών, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του isoamyl acetate αυξήθηκε κατά τη θρέψη με τη μέγιστη ποσότητα ανόργανου αζώτου και μειώθηκε κατά τη θρέψη με οργανικό άζωτο ή το συνδυασμό και των δύο μορφών, ενώ η συγκέντρωση του phenethyl acetate ακολούθησε αυξητική πορεία κατά τη θρέψη και με τις δύο μορφές αζώτου.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, έδειξαν εξάρτηση των περισσότερων μη πτητικών μεταβολιτών που παρήχθησαν κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, κατά τη συμπλήρωση με άζωτο. Έτσι, οι συγκεντρώσεις οργανικών οξέων όπως το κιτρικό, το μηλικό και το γαλακτικό, φάνηκαν να επηρεάζονται από τις αλλαγές στις ποσότητες και το είδος της αζωτούχας θρέψης ενώ η συγκέντρωση της γλυκερόλης παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη. Όσον αφορά το ποσοστό της αιθανόλης των τελικών οίνων, φάνηκε ότι ούτε εκείνη επηρεάστηκε σε μεγάλο βαθμό από το είδος και τη συγκέντρωση του ανόργανου και του οργανικού αζώτου.

Τέλος, όσον αφορά τα αποτελέσματα της διεξαγωγής του οργανοληπτικού ελέγχου, διακριτή έγινε μόνο η διαφορά του αρώματος μεταξύ της μέγιστης και της ελάχιστης τιμής ανόργανου αζώτου για το δείγμα του αρχικού μούστου (μάρτυρας). Για τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά δεν προέκυψε κάποιο συμπέρασμα καθώς δε φάνηκαν να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων.

6. Βιβλιογραφία

- Barbosa Catarina, Virgilio Falco, Arlete Mendes-Faia, Ana Mendes-Ferreira.(2009). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, VOL. 108, No. 2, 99–104.
- Burin Vívian Maria, Vinícius Caliari, Marilde T. Bordignon-Luiz.(2016). Nitrogen compounds in must and volatile profile of white wine: Influence of clarification process before alcoholic fermentation. *Food Chemistry* 202, 417–425.
- Ciani Maurizio, Angela Capece, Francesca Comitini, Laura Canonico, Gabriella Siesto, Patrizia Romano.(2016). Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Food Microbiology*, *Frontiers in Microbiology*.
- Deed Nathan K., Hennie J. J. van Vuuren, Richard C. Gardner.(2011). Effects of nitrogen catabolite repression and diammonium phosphate addition during wine fermentation by a commercial strain of *S. cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89:1537–1549, DOI: 10.1007/s00253-011-3084-y.
- Eldarov M. A., S. A. Kishkovskaia, T. N. Tanaschuk, A. V. Mardanov.(2016). Genomics and Biochemistry of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 81, No. 13, 1650-1668, DOI: 10.1134/S0006297916130046.
- Garde-Cerdan Teresa, Carmen Ancin-Azpilicueta.(2007). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT* 41, 501–510.
- Goyal R.K.(1999). Biochemistry of fermentation. *Biotechnology: Food Fermentation*. In: Joshi, V.K., Pandey, A. (Eds.), Asiatech Publishers Inc., New Delhi, Vol. 1, 87–172.
- Harry T. Lawless and Hildegarde Heymann.(2010). Sensory evaluation of food: Principles and practices, Springer, ISBN: 978-1-4419-6487-8
- Hernandez-Orte P., M. Bely, J. Cacho, V. Ferreira Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different

- Saccharomyces cerevisiae strains during fermentation in controlled synthetic media.(2006). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 150–160.
- Jackson Ronald.(2002). Wine tasting: A professional handbook. Elsevier Academic Press. San Diego, California
- Jackson Ronald.(2008). Wine science principles and applications. Elsevier Academic Press. San Diego, California
- Kechagia Despina, Yannis Paraskevopoulos, Eleni Symeou, Maria Galiotou-Panayotou, Yorgos Kotseridis.(2008). Influence of prefermentative treatments to the major volatile compounds of Assyrtiko wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4555–4563.
- Martínez-Moreno Rubén, Manuel Quirós, Pilar Morales, Ramon Gonzalez.(2014). New insights into the advantages of ammonium as a winemaking nutrient. *International Journal of Food Microbiology* 177, 128–135.
- Miller A. C., Wolff S. R., Bisson L. F., Ebeler S. E.(2007). Yeast strain and nitrogen supplementation: Dynamics of volatile ester production in Chardonnay juice fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(4), 470–483.
- Mouret J.R., C. Camarasa, M. Angenieux, E. Aguera, M. Perez, V. Farines, J.M. Sablayrolles.(2014). Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Research International* 62, 1–10.
- Rapp A. 1998. Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception.
- Ribereau-Gayon P., D. Dubourdieu, B. Doneche, A. Lonvaud.(2006). Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition, John Wiley & Sons, Ltd ISBN: 0-470-01034-7.
- Rodrigues Heber, María-Pilar Sáenz-Navajas, Ernesto Franco-Luesma, Dominique Valentin, Purificación Fernández-Zurbano, Vicente Ferreira, Arancha De La Fuente Blanco, Jordi Ballester.(2017). Sensory and chemical drivers of wine minerality aroma: An application to Chablis wines. *Food Chemistry* 230, 553-562

- Roessler E. B., Baker G. A., Amerine M. A.(1956). One-tailed and two-tailed tests in organoleptic comparisons. *Journal of Food Science*, 21(1), 117-121.
- Rupasinghe Vasantha, H.P., Joshi, V.K., Smith, A., Parmar, I.(2017). Chemistry of Fruit Wines. In: Kosseva, M.R., Joshi, V., Panesar, P. (Eds.), Science and Technology of Fruit Wine Production. *Academic Press*, 105–176, ISBN: 9780128008508.
- Styger Gustav, Bernard Prior, Florian F. Bauer.(2011). Wine flavor and aroma. *J Ind Microbiol Biotechnol*, Vol. 38, 1145-1159, DOI: 10.1007/s10295-011-1018-4.
- Torrea Diego, Cristian Varel, Maurizio Ugliano, Carmen Ancin-Azpilicueta, I. Leigh Francis, Paul A. Henschke.(2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice - Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chemistry* 127, 1072–1083.
- Ugliano Maurizio, Brooke Travis, Leigh Francis, Paul A. Henschke Volatile Composition and Sensory Properties of Shiraz Wines As Affected by Nitrogen Supplementation and Yeast Species: Rationalizing Nitrogen Modulation of Wine Aroma, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12417–12425.
- Ugliano Maurizio, Bruno Fedrizzi, Tracey Siebert, Brooke Travis, Franco Magno, Giuseppe Versini, Paul A. Henschke.(2009). Effect of Nitrogen Supplementation and *Saccharomyces* Species on Hydrogen Sulfide and Other Volatile Sulfur Compounds in Shiraz Fermentation and Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4948–4955.
- Ugliano Maurizio, Paul A. Henschke, Markus J. Herderich, Isak S. Pretorius.(2007). Nitrogen management is critical for wine flavor and style. *The Australian Wine Research Institute*, Vol 22, No.6.
- Ugliano Maurizio, Tracey Siebert, Meagan Mercurio, Dimitra Capone, Paul A. Henschke.(2008). Volatile and Color Composition of Young and Model-Aged Shiraz Wines As Affected by Diammonium Phosphate Supplementation Before Alcoholic Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9175–9182 9175.

Vilanova Mar, Isak S. Pretorius, Paul A. Henschke.(2015). Influence of diammonium phosphate addition to fermentation on wine biological. *ResearchGate*.

Vilanova Mar, Tracey E. Siebert, Cristian Varela, Isak S. Pretorius, Paul A. Henschke.(2012). Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. *Food Chemistry 133*, 124–131.

Bell Sally-Jean, Paul A.Henschke.(2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 242–295.

Δήμου Ευάγγελος Φ.(2012). Μελέτη των πτητικών συστατικών που συμμετέχουν στο άρωμα των οίνων από τις ερυθρές ποικιλίες Ξινόμαυρο και Μαυροτράγανο. Μεταπτυχιακή Διατριβή.

Σγουρού Γεωργία Μ.(2014). Επίδραση προσθήκης ριζισμάτων ξύλου Γαλλικής και Αμερικανικής δρυός στον οργανοληπτικό χαρακτήρα οίνων ποικιλίας «Αγιωργίτικο».

Σουφλερός Ευ.(2012). Οινολογία, Δεύτερη έκδοση, Θεσσαλονίκη.

Σταυρακάκης Μανόλης Ν.(2015). Αμπελογραφία, σελ.121, Τροπή, ISBN: 978-960-99357-0-8.

Τσέτουρας, Π.(2008). Οινotecχνία, Η Επιστήμη του κρασιού στην πράξη, Σταμούλη Α.Ε.

Ηλεκτρονικές Πηγές

<http://www.gusmerwine.com/catalog/chr-hansen-yeast/melody/>

www.fermentis.com

7. Παράρτημα

Πίνακας Α: Περιγραφή και παρουσίαση των μετρήσεων °Brix και θερμοκρασίας δεξαμενών κατά τη πειραματική πορεία.

Ημερομηνία	Διαδικασία	Σακχαροπερι- εκτικότητα (Brix)	Βαθμοί Baume στους 20 °C	Ολική Οξύτητα (g/L)	pH	Θολερότητα (NTU)
1/9/2016	τρύγος σταφυλιών Ασύρτικου					
6/9/2016	Γλυκοποίηση προσθήκη 4 g/hL metabisulfite 2 g/hL ένζυμα απολάσπωσης, 30 g/hL polycel plus απολάσπωση στους 10°C	24				
7/9/2016	προσθήκη Springarom 20 g/hL, διαίρεση γλεύκους σε 5 ισόχωρες δεξαμενές προσθήκη εμβολίου με ζύμες (Melody) 30 g/L προσθήκη springferm	22.8	13.3	3.9	3.37	7

Πίνακας Α: Περιγραφή και παρουσίαση των μετρήσεων °Brix και θερμοκρασίας δεξαμενών κατά τη πειραματική πορεία.
(συνέχεια)

Springferm	Δεξαμενή 1		Δεξαμενή 2		Δεξαμενή 3		Δεξαμενή 4		Δεξαμενή 5	
	0 g/hL		10 g/hL		20 g/hL		30 g/hL		40 g/hL	
	(0 g/hL)		(10 g/hL)		(20 g/hL)		(30 g/hL)		(40 g/hL)	
Ημερομηνία	Τδεξ	Brix	Τδεξ	OBrix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix
7/9/2016	20.0	22.8	20.0	22.8	20.0	22.8	20	22.8	20.0	22.8
8/9/2016	21.5	22.4	21.5	23.8	21.5	22.5	21.5	22.2	21.5	22.6
9/9/2016	22.0	20.5	22	19.7	22.5	19.8	23	19.6	23.0	19.6
10/9/2016	22.0	17.9	22	17.6	22.5	17.3	22.5	17.2	22.5	17.0
11/9/2016	20.0	16.2	19.5	16	19.5	15.8	19.5	15.3	19.5	15.1

διαίρεση γλεύκουσ κάθε δεξαμενής σε 5 ίσες ποσότητες και προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων DAP

DAP	Δεξαμενή 1Α		Δεξαμενή 1Β		Δεξαμενή 1Γ		Δεξαμενή 1Δ		Δεξαμενή 1Ε	
	0 g/hL		10 g/hL		20 g/hL		30 g/hL		40 g/hL	
	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix
12/9/2016	20.5	14.7	21	14.3	21	14.2	10.5	14.2	21	14.2
13/9/2016	21	13.2	21	12.9	21	12.3	20.5	12.1	21	12.0
14/9/2016	20	11.4	20.5	11.4	20	10.7	19.5	10.6	19.0	10.3
15/9/2016	19.5	10.6	19.5	10.1	19.5	9.9	19.5	9.4	19.5	9.1
16/9/2016	19.5	10.2	20	9.4	20	8.9	20	8.5	19.5	8.2
17/9/2016	20	8.9	19	8.5	19	8.0	18	7.9	19	7.7
18/9/2016	20	8.6	19.5	7.8	19	7.8	19.5	7.4	19	7.3
19/9/2016	20.5	7.9	20	7.5	20	7.4	19.5	7.3	20	7.3
20/9/2016	19.5	7.6	19	7.5	19	7.4	18.5	7.2	18.5	7.1
21/9/2016	20.5	7.2	19.5	7.4	19.5	7.2	19.5	7.1	19.5	6.9
23/9/2016	μετάγγιση και θείωση 10 g/hL									

DAP	Δεξαμενή 2Α		Δεξαμενή 2Β		Δεξαμενή 2Γ		Δεξαμενή 2Δ		Δεξαμενή 2Ε	
	0 g/hL		10 g/hL		20 g/hL		30 g/hL		40 g/hL	
	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix
12/9/2016	20.5	14.3	20.5	13.8	20.5	13.8	20.5	13.7	20.5	13.9
13/9/2016	21	13.0	20.5	12.3	21	12.2	21	11.8	21	11.8
14/9/2016	20.0	11.1	20.0	10.7	20	10.3	19.5	10.1	19.0	10.0
15/9/2016	19.5	10.5	19.5	9.9	19.5	9.4	19	9.1	19	8.9
16/9/2016	19.5	9.5	19.5	8.9	19.5	8.6	19.5	8.1	19.5	8.0
17/9/2016	19	8.8	20	8.1	19	7.8	19	7.5	19	7.5
18/9/2016	20	7.9	20	7.5	19.5	7.6	19	7.4	19	7.3
19/9/2016	20	7.5	20	7.3	20	7.2	19.5	7.1	19	7.1
20/9/2016	19	7.3	18.5	7.2	18.5	7.2	18.5	7.0	18.5	6.9
21/9/2016	19.5	7.2	19	7.0	19	7.2	19.5	6.9	19	6.9
23/9/2016	μετάγγιση και θείωση 10 g/hL									

Πίνακας Α: Περιγραφή και παρουσίαση των μετρήσεων °Brix και θερμοκρασίας δεξαμενών κατά τη πειραματική πορεία. (συνέχεια)

DAP	Δεξαμενή 3Α		Δεξαμενή 3Β		Δεξαμενή 3Γ		Δεξαμενή 3Δ		Δεξαμενή 3Ε	
	0 g/hL		10 g/hL		20 g/hL		30 g/hL		40 g/hL	
Ημερομηνία	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix
12/9/2016	20.5	14.2	21	13.9	21	13.8	21.0	13.7	20.5	13.9
13/9/2016	20.5	12.9	21	12.1	20.5	12.1	20.5	11.9	20.0	11.8
14/9/2016	20.0	11.3	20.0	10.8	19.5	10.6	19.0	10.2	19.0	10.1
15/9/2016	19	10.3	19	10.3	19.5	9.4	18.5	9.0	19.0	8.7
16/9/2016	19.5	9.1	19.5	9.1	19.5	8.7	19.0	8.3	19.5	7.9
17/9/2016	19	8.1	19	8.1	19.0	8.0	18.0	7.6	18.5	7.4
18/9/2016	20	7.7	20	7.7	19.5	7.5	19.0	7.4	19.0	7.2
19/9/2016	19.5	7.4	19.5	7.4	19.0	7.2	19.0	7.2	19.0	7.1
20/9/2016	18.5	7.0	18.5	7.0	19.0	7.2	19.0	7.0	19.0	6.9
21/9/2016	19.5	7.0	19.5	7.0	19.0	7.0	19.0	7.0	19.0	6.9
23/9/2016	μετάγγιση και θείωση 10 g/hL									
DAP	Δεξαμενή 4Α		Δεξαμενή 4Β		Δεξαμενή 4Γ		Δεξαμενή 4Δ		Δεξαμενή 4Ε	
	0 g/hL		10 g/hL		20 g/hL		30 g/hL		40 g/hL	
Ημερομηνία	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix
12/9/2016	21.0	13.8	21.0	13.3	20.5	13.3	21.0	13.1	20.5	13.5
13/9/2016	20.0	12.4	20.5	11.8	20.0	11.4	20.0	11.3	20.0	11.7
14/9/2016	19.5	11.1	20.0	10.6	20.0	10.4	19.5	10.0	19.0	9.7
15/9/2016	19.5	10.1	19.5	9.6	19.0	9.3	18.5	8.9	18.5	8.7
16/9/2016	19.0	9.1	20.0	8.6	19.0	8.2	19.0	7.9	19.0	7.8
17/9/2016	19.0	8.2	19.0	7.8	19.0	7.7	18.0	7.4	18.0	7.4
18/9/2016	19.0	7.5	19.0	7.5	19.0	7.4	18.5	7.2	18.0	7.2
19/9/2016	19.5	7.3	19.5	7.3	19.5	7.1	19.0	7.1	18.5	7.0
20/9/2016	19.0	7.2	19.0	7.0	18.5	7.1	18.5	6.9	18.5	6.9
21/9/2016	19.5	7.0	19.0	7.0	19.0	7.0	19.0	6.9	19.0	6.9
23/9/2016	μετάγγιση και θείωση 10 g/hL									
DAP	Δεξαμενή 5Α		Δεξαμενή 5Β		Δεξαμενή 5Γ		Δεξαμενή 5Δ		Δεξαμενή 5Ε	
	0 g/hL		10 g/hL		20 g/hL		30 g/hL		40 g/hL	
Ημερομηνία	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix	Τδεξ	Brix
12/9/2016	20.5	13.7	20.5	13.3	20.5	13.3	20.5	13.2	20.5	13.4
13/9/2016	20.5	12.0	20.0	11.7	20.0	11.7	20.5	11.4	20.0	11.5
14/9/2016	19.5	11.4	19.5	10.8	19.0	10.3	18.5	10.0	19.0	9.8
15/9/2016	19.0	10.1	19.0	9.8	18.5	9.2	18.5	8.8	18.5	8.6
16/9/2016	19.5	9.2	19.5	8.6	19.5	8.3	19.0	7.9	18.5	7.8
17/9/2016	19.0	8.2	18.5	8.0	19.5	7.7	18.0	7.5	18.0	7.5
18/9/2016	19.0	7.9	19.0	7.5	19.0	7.0	18.0	7.2	18.0	7.1
19/9/2016	19.5	7.3	20.0	7.1	19.5	7.1	18.5	7.1	19.0	7.0
20/9/2016	19.0	7.1	19.0	7.0	19.0	7.0	18.5	6.9	18.5	6.9
21/9/2016	19.5	7.1	19.0	6.9	19.5	6.9	19.0	6.9	18.5	6.9
23/9/2016	μετάγγιση και θείωση 10 g/hL									

Πίνακας Β: Διακύμανση του μέσου όρου (\pm τυπικό σφάλμα) των συγκεντρώσεων των 8 πτητικών ενώσεων σε σχέση με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις ανόργανης και οργανικής θρέψης. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα a, b, c δηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, Tukey's HSD test, $p < 0,05$.

οργανικό άζωτο (g/hL)	ανόργανο άζωτο (g/hL)	phenylethanol-mean (mg/L)	std. error		ethyl octanoate-mean (mg/L)	std. error
0	0	8.051	0.006	c	0.381	0.006 d
0	40	7.279	0.006	e	0.468	0.006 a
20	0	8.329	0.006	b	0.439	0.006 b
20	40	6.991	0.006	f	0.409	0.006 c
40	0	8.669	0.006	a	0.359	0.006 de
40	40	8.021	0.006	d	0.339	0.006 e
οργανικό άζωτο (g/hL)	ανόργανο άζωτο (g/hL)	1-hexanol-mean (mg/L)	std. error		phenethyl acetate-mean (mg/L)	std. error
0	0	0.229	0.006	a	0.070	0.006 e
0	40	0.231	0.006	a	0.141	0.006 a
20	0	0.220	0.006	ab	0.099	0.006 cd
20	40	0.200	0.006	b	0.130	0.006 ab
40	0	0.209	0.006	ab	0.079	0.006 de
40	40	0.211	0.006	ab	0.109	0.006 bc
οργανικό άζωτο (g/hL)	ανόργανο άζωτο (g/hL)	isoamyl acetate-mean (mg/L)	std. error		ethyl decanoate-mean (mg/L)	std. error
0	0	1.031	0.006	c	0.171	0.006 ab
0	40	1.769	0.006	a	0.189	0.006 a
20	0	0.941	0.006	e	0.171	0.006 ab
20	40	0.841	0.006	f	0.149	0.006 b
40	0	0.969	0.006	d	0.149	0.006 b
40	40	1.082	0.006	b	0.111	0.006 c
οργανικό άζωτο (g/hL)	ανόργανο άζωτο (g/hL)	ethyl hexanoate-mean (mg/L)	std. error		ethyl-2-methyl butyrate-mean (mg/L)	std. error
0	0	0.302	0.006	b	0.371	0.006 a
0	40	0.380	0.006	a	0.280	0.006 d
20	0	0.308	0.006	b	0.339	0.006 b
20	40	0.291	0.006	bc	0.292	0.006 cd
40	0	0.270	0.006	cd	0.331	0.006 b
40	40	0.251	0.006	d	0.319	0.006 bc