

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
<<ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ- ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ>>
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΜΕΛΕΤΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΒΙΔΙΑΝΟ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ –ANNA E. ΚΛΩΝΤΖΑ

ΕΠΙΒΛΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
<<ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ- ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ>>
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΒΙΔΙΑΝΟ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ –ANNA E. ΚΛΩΝΤΖΑ

ΕΠΙΒΛΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
<<ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ- ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ>>
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΒΙΔΙΑΝΟ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ –ANNA E. ΚΛΩΝΤΖΑ

ΕΠΙΒΛΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2018

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

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

Καλλίθρακα Σταματίνα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ρούσσοις Πέτρος Αναπληρωτής Καθηγητής Δενδροκομίας, Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι διπλός. Πρώτο στόχο αποτέλεσε τόσο η ποιοτική, όσο και η ποσοτική ανάλυση εν ζύμωσει δειγμάτων πρότυπου γλεύκου, που περιείχαν εκχυλίσματα φλοιών της ποικιλίας Βιδιανό, με σκοπό την ανίχνευση συστατικών του αρώματος που είτε προέρχονταν από τους φλοιούς της συγκεκριμένης ποικιλίας, είτε δημιουργήθηκαν κατά την αλκοολική ζύμωση. Παράλληλα, δεύτερο στόχο αποτέλεσε η ποιοτική ανάλυση εμφιαλωμένου οίνου της ίδιας ποικιλίας, με σκοπό την ανίχνευση και τον προσδιορισμό τόσο συστατικών του αρώματος που καθορίζουν το άρωμα του οίνου, όσο και άλλων ενώσεων που παρουσιάζουν εξαιρετικό επιστημονικό ενδιαφέρον.

Σε λυοφιλωμένους φλοιούς από σταφύλια της ποικιλίας Βιδιανό, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας (Πεντάνιο, σύστημα Διαιθυλαιθέρα- Πεντανίου 1:1, Διαιθυλαιθέρα, σύστημα Διαιθυλαιθέρα- Μεθανόλης 1:1, Μεθανόλη). Τα κλάσματα από την κάθε εκχύλιση εξατμίστηκαν με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστή (rotary evaporator) μέχρι τον τελικό όγκο των 2 ml. Έπειτα ένα από τα 2ml προσετίθετο σε 2 φιάλες, που η καθμία περιείχε 200ml πρότυπου γλεύκου (model must), ο οποίος στη συνέχεια εμβολιαζόταν με προσθήκη 250mg/l ζυμομύκητα εμπορικού στελέχους UCLM S325, δημιουργώντας 2x5 δείγματα, στα οποία έλαβε χώρα αλκοολική ζύμωση.

Στη συνέχεια, δείγματα που λήφθηκαν κατά την τέταρτη, έβδομη αλλά και την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης με τη χρήση υγρής- υγρής εκχύλισης (με διαλύτη Διχλωρομεθάνιο) αναλύθηκαν με τις μεθόδους GC-O και GC-MS, με σκοπό τόσο τη μελέτη του αρώματος όσο και την ανίχνευση/ ποσοτικοποίηση των συστατικών του αρώματος που παρέσυραν οι διαλύτες από τους φλοιούς. Με τη μέθοδο GC-MS ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν τα εξής συστατικά: Βουτυρικός Αιθυλεστέρας, Ισοβουτυρικός Αιθυλεστέρας, Οξικός Εστέρας της Ισοαμυλικής αλκοόλης, Καπριλικός Αιθυλεστέρας, 2- μέθυλο Βουτυρικός Αιθυλεστέρας, Καπροϊκός Αιθυλεστέρας, 2- Οξικός Φαινυλεστέρας, 2- μέθυλο

Βουτανόλη, 2- φαίνυλο Αιθανόλη, Ισοαμυλική Αλκοόλη, 3- μέθυλ- Θείο Προπανόλη. Με τη μέθοδο GC-O και τη βοήθεια αναλυτών (Αέρια Χρωματογραφία) καταγράφηκαν αρώματα, οσμές αλλά και ο χρόνος έκλουσής τους.

Όσον αφορά την ανάλυση εμφιαλωμένου οίνου από την ποικιλία Βιδιανό, δείγμα αυτού συλλέχθηκε με τη χρήση υγρής- υγρής εκχύλισης (με διαλύτη Διχλωρομεθάνιο), συμπυκνώθηκε σε τελικό όγκο 1.5ml με τη χρήση τόσο περιστροφικού εξατμιστή (rotary evaporator) όσο και με τη χρήση ρεύματος αερίου Αζώτου και αναλύθηκε με τη μέθοδο του Mplc. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά συστήματα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας: Πεντάνιο- Διαιθυλαιθέρας (100%-0%/0%-100%), Διαιθυλαιθέρας- Μεθανόλη (100%-0%/0%-100%). Δημιουργήθηκαν συνολικά 7 κλάσματα, τα οποία τελικώς αναλύθηκαν με τη μέθοδο GC-MS, ούτως ώστε να ταυτοποιηθούν οι ενώσεις που παρασύρθηκαν από τους διαλύτες, και καθορίζουν το άρωμα. Τέτοιες ενώσεις είναι οι εξής: Βουτυρικός Αιθυλεστέρας, Ισοβουτυρικός Αιθυλεστέρας, Οξικός Εστέρας της Ισοαμυλικής αλκοόλης, Καπριλικός Αιθυλεστέρας, 2- μέθυλο Βουτυρικός Αιθυλεστέρας, Καπροϊκός Αιθυλεστέρας, 2- Οξικός Φαινυλεστέρας, 2- μέθυλο Βουτανόλη, 2- φαίνυλο Αιθανόλη, Ισοαμυλική Αλκοόλη, 3- μέθυλ- Θείο Προπανόλη, Οξείδιο της Λιναλόλης, Φουρφουράλη, Κουμαρίνη, 4- Βινύλ Γουαϊακόλη, 1,2 Πυρρόλιο Πυραζίνη κα.

Τα αποτελέσματα όλων των παραπάνω πειραμάτων έδειξαν ότι όλα τα συστατικά του αρώματος που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα που περιείχαν εκχυλίσματα των φλοιών, (απομονώθηκαν και από το δείγμα του εμφιαλωμένου οίνου) όταν χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ο Διαιθυλαιθέρας που έχει μέτρια πολικότητα. Τα ίδια συστατικά του αρώματος κατά την ανάλυση του οίνου ανιχνεύτηκαν στο 3^ο και στο 4^ο κλάσμα, τα οποία δημιουργήθηκαν τόσο στο τέλος της εφαρμογής του πρώτου συστήματος διαλυτών (Πεντάνιο 0%- Διαιθυλαιθέρας100%) όσο και κατά τη διάρκεια εναλλαγής του με το δεύτερο σύστημα (Διαιθυλαιθέρας 100%- Μεθανόλη 0%), δηλαδή στο σημείο που η συγκέντρωση του Διαιθυλαιθέρα υπερτερούσε έναντι των άλλων διαλυτών.

Λέξεις κλειδιά: Βιδιανό, πτητικά συστατικά, Αιθυλεστέρες, Εστέρες ανώτερων αλκοολών, Αλκοόλες, GC-MS, GC-O, Mplc,

ABSTRACT

The goal of this postgraduate study is double. First aim suggests the qualitative as well as the quantitative analysis of samples during alcoholic fermentation, which contain extract of the grape skin of Vidiano grapes, in order to detect the flavour components either from the skin of the grape variety of Vidiano or from the alcoholic fermentation. Another aim is the qualitative analysis of bottled wine of the same variety, in order to detect and determine both aromatic components that define the aroma of wine and other compounds of outstanding scientific interest

In lyophilized grape skin of Vidiano grapes successive extractions were carried out with increasingly polar solvents (Pentane, 1: 1 Diethyl ether-Pentane system, Diethyl ether, 1: 1 diethyl ether-methanol system, Methanol). The fractions from each extraction were evaporated using a rotary evaporator to a final volume of 2 ml. Then one of the 2ml was added to 2 bottles, each containing 200ml of must, which was then ingrained by addition of 250mg / 1 UCLM S325 commercial strain to create 2x5 samples, in which alcoholic fermentation took place.

Subsequently, samples taken on the fourth, seventh and last day of the alcoholic fermentation using liquid-liquid solvent extraction with dichloromethane were analyzed by the GC-O and GC-Ms methods, both for the study of the aroma and the detection / quantification of the aroma components that the solvents removed from the grape skin. The following components were detected and quantitated by the GC-Ms method: Ethyl butyrate, Ethyl isobutyrate, Isobutyl acetate, Ethyl caprylate, Ethyl 2-methyl-butyrate, Ethyl caproate, Phenyl- ethyl-acetate, 2-Methyl butanol, 2- Ethanol, Isoamyl Alcohol, 3-Methyl-thio Propanol, Isoamyl acetate, Isoamyl alcohol. With the GC-O method and the help of analyzers (Gas Chromatography), aroma, odours and retention time were detected.

With regard to the analysis of bottled wine from the Vidiano grape variety, a sample was collected using liquid-liquid Dichloromethane extraction, was concentrated to a final volume of 1.5ml using both a rotary evaporator and a nitrogen gas stream, and was analyzed by the Mplc method. In this method two different systems of increasing polarity were used: Pentane-Diethyl ether (100% -0% / 0% - 100%), Diethyl ether -Methanol (100% -0% / 0% -100%). A total of 7 fractions were generated, which were finally analyzed by the GC-Ms method, to identify the

compounds drawn from the wine from the solvents and determine the wine's aroma. Such compounds are as follows: Ethyl Butyrate, Ethyl Isobutyrate, Isoamyl acetate, Ethyl Caprylate, 2-Methyl Butyrate, Ethyl Caproate, 2- Phenyl ethanol, Isoamyl alcohol, 2-Phenyl Acetate, 2-methyl- Butanol, 3methyl-thio propanol, linalol oxide, furfural, coumarin, 4-vinyl guaiacol, 1,2-pyrrole pyrazine.

The results of all the above experiments showed that all aroma's components detected in the samples containing grape skin extracts were isolated from the sample of bottled wine using the medium-polar diethyl ether solvent. All aroma components were detected in the 3rd and 4th fractions, which were created both at the end of the first solvent system (Pentane 0% - Diethyl ether 100%) and during its alternation with the second system (Diethyl ether 100% Methanol 0%).

Key words: Vidiano grape variety, volatile compounds, Ethyl esters, High alcohol esters, Alcohols, GC-MS, GC-O, Mplc

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, σηματοδοτεί το τέλος σε ένα από τα σημαντικότερα κεφάλαια της ζωής μου μέχρι και σήμερα. Σε αυτό το σημείο λοιπόν, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που, ο καθένας με το δικό του τρόπο, με βοήθησαν να φτάσω μέχρι εδώ.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής κ. Γιώργο Κοτσερίδη. Τον ευχαριστώ θερμά τόσο για τη διαρκή του καθοδήγηση, όσο και για την μεγάλη εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την πραγματοποίηση του προτύπου αυτού project. Παράλληλα, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω που μου μετέδωσε τόσο όλες αυτές τις πολύτιμες γνώσεις, όσο και την αγάπη αλλά και το πάθος για το κρασί και την επιστήμη της Οινολογίας.

Ακόμα ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κ. Σταματίνα Καλλίθρακα, η οποία πάντα ήταν πρόθυμη να με βοηθήσει και να μου λύσει ό,τι απορία είχα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τόσο την πολυαγαπημένη μου κ. Νίκη Προξενιά, η οποία καθημερινά με βοηθούσε, με στήριζε, με παρηγορούσε, και μου έδινε τη δύναμη να συνεχίσω, όσο και τη Χαρά Γκόγκου, της οποίας η βοήθεια ήταν πολύτιμη για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θέλω να εκφράσω το ευχαριστώ μου στους φίλους μου Μήτσο, Αργυρώ, Μαριάννα και Σοφία για τις ατέλειωτες ώρες διαβάσματος, και πάνω από όλα τις ατέλειωτες ώρες γέλιου που περάσαμε αυτά τα 2 χρόνια. (Τη Σοφία την ευχαριστώ λίγο πιο πολύ, τόσο για την τέλεια συνεργασία μας, όσο και την υπομονή που έδειξε στις ατέλειωτες ώρες γκρίνιας μου κατά τη διάρκεια των πειραμάτων).

Τελειώνοντας το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στους γονείς μου Μαρίνα και Μανόλη, για την αγάπη και τη στήριξη τους (χωρίς αυτούς δεν θα είχα φτάσει μέχρι εδώ), στον αδερφό μου Μιχάλη, που το πάθος για τη δουλειά του αποτέλεσε πρότυπο για μένα, στην κολλητή μου Ολίνα που η πίστη της σε εμένα και οι συμβουλές της μου δίνουν τη δύναμη να πετυχαίνω τους στόχους μου, και στον αγαπημένο μου Γιώργο που με στήριξε και με στηρίζει σε όλα!

Σας ευχαριστώ όλους

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	- 4 -
ABSTRACT	- 6 -
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	- 8 -
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	- 9 -
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	- 10 -
1.1. Η ποικιλία Βιδιανό	- 11 -
1.2 Αρώμα των οίνων- ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	- 13 -
1.3. ΕΝΩΣΕΙΣ ΥΠΕΥΘΥΝΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΑΡΩΜΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ	- 15 -
1.4. επιδραση των καλλιεργητικων τεχνικων στην παραγωγη πτητικων αρωματικων ενωσεων	- 32 -
2. ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	- 35 -
2.1. Αέρια Χρωματογραφία σε σύζευξη με Φασματόμετρο μάζας - GC-MS.....	- 35 -
2.2 Αέρια Χρωματογραφία- Ολφακτομετρία.....	- 43 -
2.3 Υγρή Χρωματογραφία μέτριας Πίεσης (Mplc)	- 54 -
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 65 -

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	72
5. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	92
6. ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	97
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	99
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	100

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΒΙΔΙΑΝΟ

Η ποικιλία Βιδιανό αποτελεί μία από τις σημαντικότερες λευκές ποικιλίες του Κρητικού αμπελώνα. Κέντρο καλλιέργειάς της είναι κυρίως ο νομός Ρεθύμνου (με επίκεντρο καλλιέργειας την επαρχία Μυλοποτάμου) και δευτερευόντως ο νομός Ηρακλείου. Η συνολική καλλιέργεια και στους δύο αυτούς νομούς ανέρχεται μέχρι και σήμερα σε εκτάσεις μεγαλύτερες των 500 στρεμμάτων¹. Νομοθετικά η ποικιλία Βιδιανό ανήκει τόσο στις οινοποιήσιμες συνιστώμενες ποικιλίες αμπέλου που μπορούν να καλλιεργηθούν στο αμπελουργικό διαμέρισμα της Κρήτης, όσο και στις οινοποιήσιμες αλλά προσωρινώς επιτρεπόμενες ποικιλίες αμπέλου στο αμπελουργικό διαμέρισμα της Στερεάς Ελλάδας και πιο συγκεκριμένα στο νομό Φθιώτιδας².

Οι βασικότεροι αμπελογραφικοί χαρακτήρες της συγκεκριμένης ποικιλίας αμπέλου είναι η σταφυλή, η ράγα και τα γίγαρτά της ¹.

- Σταφυλή: Μέτριου έως μεγάλου μεγέθους, κωνικού ή κυλινδρικού σχήματος, με αρκετά μεγάλη πυκνότητα κατά κανόνα ισομεγέθους ραγών.
- Ράγα: Μέτριου μεγέθους με σχήμα ελλειψοειδές ή αντρωοειδές. Ο φλοιός της είναι παχύς, ανθεκτικός και έχει χαρακτηριστικό κίτρινο-χρυσίζον χρώμα. Η στυφή γεύση του φλοιού αντισταθμίζεται από τη γλυκιά και γεμάτη αρώματα γεύση της σάρκας.
- Γίγαρτα: Η κάθε ράγα περιέχει δύο γίγαρτα μεγάλου μεγέθους, απιοειδούς σχήματος, με αρκετά κοντό ράμφος.

Το Βιδιανό χαρακτηρίζεται από μέτρια ζωηρότητα και μέτρια παραγωγικότητα, με αρκετά χαμηλό ποσοστό καρπόδεσης, αφού μόνο το 25-30% των συνολικών ανθέων μετατρέπονται σε ράγες. Στην επαρχία Μυλοποτάμου (νομός Ρεθύμνου), που αποτελεί το επίκεντρο της καλλιέργειας της συγκεκριμένης ποικιλίας, τα πρέμνα είναι κατά κανόνα αυτόρριζα και μορφωμένα σε χαμηλά κύπελλα, που έχουν δεχθεί βραχύ κλάδεμα καρποφορίας (1 κεφαλή ανά βραχίονα με 2 οφθαλμούς). Όμως μετά την εμφάνιση της φυλλοξήρας η καλλιέργεια της ποικιλίας με αυτόρριζα

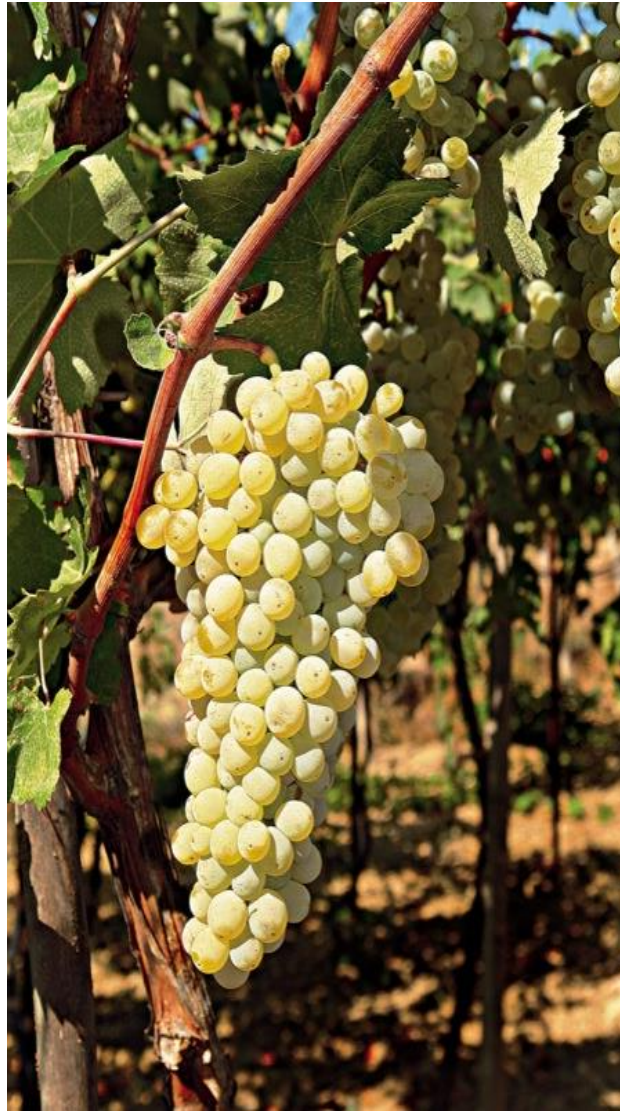
◦8Ï

¹ Αμπελογραφία Μανόλης Ν. Σταυρακάκης, 2010, εκδόσεις Τροπή.

² ΦΕΚ 24771/04-03-2010, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων - Γενική διεύθυνση φυτικής παραγωγής, Εθνικός Κατάλογος Ποικιλιών Αμπέλου.

πρέμνα σταμάτησε και η χρήση των υποκειμένων 41B, 110R, 140Ru και 1103P εξαπλώθηκε λόγω καλύτερης συμβατότητας με το Βιδιανό¹.

Η συγκεκριμένη ποικιλία ξεκινά να ωριμάζει περίπου το 3^ο δεκαήμερο του Ιουλίου, ενώ στις περιοχές της Κρήτης η πλήρης ωρίμανση των ραγών λαμβάνει χώρα περίπου από το 3^ο δεκαήμερο του Αυγούστου έως το 1^ο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου. Τα ώριμα σταφύλια μετά την οينوποίησή τους παράγουν οίνους με χαρακτηριστικό άρωμα βερίκοκου^{3,4}.



ΕΙΚΟΝΑ 1: ΒΙΔΙΑΝΟ, ΜΑΝΟΛΗΣ Ν. ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ, ΑΜΠΕΛΟΓΡΑΦΙΑ , 2010 ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΤΡΟΠΗ

©8Ϊ

³ Αμπελογραφία Δημήτριος Ε. Σταύρακας, 2010, εκδόσεις Ζήτη.

⁴ www.winesofcrete.gr/βιδιανό

1.2 ΑΡΩΜΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ- ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το άρωμα των οίνων εξαρτάται από ενώσεις οι οποίες είτε υπάρχουν στα σταφύλια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των οίνων, είτε δημιουργούνται κατά την αλκοολική ζύμωση λόγω χημικών, ενζυματικών και θερμικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα τότε, είτε παράγονται μετά το τέλος αυτής, τόσο κατά την ωρίμανση όσο και κατά την παλαίωση του οίνου λόγω άλλων χημικών ή ενζυμικών αντιδράσεων^{5,6}. Πιο συγκεκριμένα, το άρωμα των οίνων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της κάθε ποικιλίας αμπέλου που χρησιμοποιείται κατά την οινοποίηση (πρωτογενές άρωμα) και μπορεί να δημιουργηθεί τόσο κατά την αλκοολική ζύμωση (δευτερογενές άρωμα), όσο και κατά την ωρίμανση ή την παλαίωση του οίνου (τριτογενές άρωμα)⁷.

Το πρωτογενές -χαρακτηριστικό για κάθε ποικιλία- άρωμα των οίνων, σε συνδυασμό με το δευτερογενές άρωμα που δημιουργείται κατά την αλκοολική ζύμωση, συνθέτουν το άρωμα των νέων οίνων. Αντίθετα η δημιουργία του αρώματος των παλαιωμένων οίνων, που ονομάζεται μπουκέτο (bouquet) ή ανθοσμία, οφείλεται στο τριτογενές άρωμα που προκύπτει κατά την παλαίωση των οίνων λόγω μετασχηματισμού συστατικών του αρώματος των νεαρών οίνων⁸.

Η μελέτη των ενώσεων που ευθύνονται για τις διαφορετικές κατηγορίες αρωμάτων των οίνων, είναι αρκετά δύσκολη. Αυτό εξηγείται λόγω των πάρα πολύ μικρών ποσοτήτων τους στους οίνους, με συγκεντρώσεις που ποικίλουν από μερικά mg/l έως ελάχιστα ng/l. Παράλληλα η δυσκολία της μελέτης τους ενισχύεται τόσο λόγω της αστάθειας των ενώσεων αυτών, όσο και της διαφορετικής φύσης τους, που επιφέρει διαφορές στην πολικότητα, τη διαλυτότητα, την πτητικότητα αλλά και το pH τους⁹. Οι βασικές κατηγορίες στις οποίες μπορούν να διακριθούν οι ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το άρωμα είναι οι εξής^{10,11}:

ο8Ï

⁵ Salinas et. al, 1998 E. Sánchez-Palomo et. al, 2009

⁶ Rapp et. al, 1998

⁷ Maria Joã o Cabrita et. al, 2007

⁸ Ευάγγελος Ηρ. Σουφλερός, 2015

⁹ E. Sánchez-Palomo et. al, 2009

¹⁰ Handbook of Enology 2006, volume2, chapter 2

¹¹ Winetasting, A professional handbook, Ronald S. Jackson, Food and Science and Technology, International series

- Ανώτερες Αλκοόλες
- Λιπαρά οξέα
- Εστέρες
- Καρβονυλικές ενώσεις
- Λακτόνες
- Ακετάλες
- Θειούχες ενώσεις
- Πτητικές Φαινόλες
- Τερπένια
- Νορισοπρενοειδή
- Μεθοξυπυραζίνες
- Παράγωγα υδρογονανθράκων

Η περιγραφή του αρώματος των οίνων αποτελεί την πιο δύσκολη διαδικασία σε γευστιγνώσιες, αντίθετα με τις διαδικασίες περιγραφής του χρώματος και της γεύσης τους. Αυτό συμβαίνει λόγω της αλληλεπίδρασης μεταξύ των αρωμάτων, στοιχείο που συμβάλλει όμως στην πολυπλοκότητα και τη διαμόρφωση του χαρακτήρα των οίνων¹¹. Κάποια από τα βασικά αρώματα που συναντιούνται στους οίνους και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους είναι τα παρακάτω:

- Αρώματα λουλουδιών (βιολέτα, γιασεμί, κ.α.)
- Αρώματα φρούτων (μαύρο κεράσι, ροδάκινο, κ.α.)
- Αρώματα αποξηραμένων φρούτων (αποξηραμένο δαμάσκηνο, αποξηραμένο μήλο, κ.α.)
- Αρώματα ξηρών καρπών (καβουρδισμένο αμύγδαλο, φουντούκι, κ.α.)
- Αρώματα λαχανικών (πιπεριά, σπαράγγια, κ.α.)
- Αρώματα μπαχαρικών (μαύρο πιπέρι, κανέλα, κ.α.)¹²

Εκτός από τα παραπάνω επιθυμητά αρώματα, που συναντάμε συχνά στους οίνους, μπορεί να υπάρξουν και σφάλματα (οσμές), τα οποία τους καθιστούν ελαττωματικούς. Ομοίως με το άρωμα, και οι οσμές οφείλονται σε συγκεκριμένες πτητικές ουσίες, η ύπαρξη των οποίων κάποιες φορές μπορεί να θεωρηθεί και επιθυμητή, όταν βρίσκονται κοντά στο κατώφλι αντίληψής τους, αφού προσδίδουν

◦8Ï

¹² WSET London, Level 3, Systematic Approach to Tasting (SAT), 2016

επιπλέον αρωματική πολυπλοκότητα. Τέτοια παραδείγματα είναι τόσο τα οξειδωτικά άρώματα των Sherries, όσο και το άρωμα καυσίμων στο port. Σήμερα διεξάγονται όλο και περισσότερες έρευνες για τη μελέτη όλων των ενώσεων που δημιουργούν τόσο το «επιθυμητό» άρωμα όσο και τις οσμές. Οι έρευνες αυτές επικεντρώνονται στην ανάλυση των πτητικών ενώσεων (ποιοτική, ποσοτική), που είναι υπεύθυνες για την εμφάνισή των αρωμάτων/οσμών, στην ταυτοποίησή τους αλλά και στη συσχέτιση ορισμένων με συγκεκριμένες ποικιλίες αμπέλου¹¹.

Τα δεδομένα από μελέτες που έχουν γίνει δείχνουν ότι οι σημαντικότερες ενώσεις που καθορίζουν το άρωμα του οίνου είναι αλκοόλες, οξικοί εστέρες, αλειφατικά οξέα, αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων και καρβονυλικές ενώσεις, οι οποίες κατά κύριο λόγο παράγονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης¹³.

1.3. ΕΝΩΣΕΙΣ ΥΠΕΥΘΥΝΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΑΡΩΜΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ

1.3.1. ΕΣΤΕΡΕΣ

Στις ημέρες μας πάνω από 160 Εστέρες έχουν απομονωθεί από τους οίνους, χωρίς όμως να εντοπίζονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε αυτούς (έως 100 mg/l). Παρόλα αυτά αποτελούν καθοριστικές ενώσεις για τη διαμόρφωση του αρώματος των νέων οίνων στους οποίους εντοπίζονται, λόγω των φρουτώδων και λουλουδέων αρωμάτων τους. Παράλληλα μελέτες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις των Εστέρων που υπάρχουν στους οίνους είναι κοντά στο κατώφλι αντίληψής τους, στοιχείο που μπορεί να επιδράσει αρνητικά στο άρωμα καθώς, αν οι ενώσεις αυτές βρεθούν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, το φρουτώδες τους άρωμα θα μετατραπεί σε σφάλμα¹⁴.

Οι πιο σημαντικοί εστέρες που συναντάμε στους οίνους είναι οι αιθυλεστέρες, οι οποίοι δημιουργούνται ύστερα από αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ ενός μορίου αιθανόλης και ενός μορίου οξέος (με μικρή αλειφατική αλυσίδα), με την ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Η ποσότητα των αιθυλεστέρων είναι αρκετά μεγάλη

ο8Ï

¹³ Rapp et. Al, 1986

¹⁴ Amerine and Roessler, 1983

στους οίνους, διότι η αιθανόλη βρίσκεται σε πολύ μεγάλη ποσότητα σε αυτούς¹⁵. Γενικά οι εστέρες που υπάρχουν στους οίνους μπορούν να παραχθούν με δύο τρόπους:

- Μέσω ενζυμικής εστεροποίησης κατά την αλκοολική ζύμωση
- Μέσω χημικής εστεροποίησης κατά την παλαίωση¹⁶.

Ο βασικότερος αιθυλεστέρας του οίνου είναι ο οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate), ο οποίος παράγεται από τη συμπύκνωση του οξικού οξέος με την αιθανόλη. Αυτός μπορεί να παραχθεί τόσο σε μικρή ποσότητα από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση όσο και κατά την παλαίωση του οίνου σε δρύινα βαρέλια ύστερα από τη δράση αερόβιων βακτηρίων (τα γαλακτικά βακτήρια δεν είναι ικανά να παραγάγουν αυτόν τον εστέρα). Στην τελευταία περίπτωση ο οξικός αιθυλεστέρας παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα σε σχέση με την πρώτη. Το κατώφλι αντίληψης της συγκεκριμένης ένωσης είναι 150- 160mg/l. Όμως μόνο όταν ο οξικός αιθυλεστέρας βρίσκεται σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 50 mg/l μπορεί να συνεισφέρει στην αύξηση της πολυπλοκότητας του οίνου. Αντίθετα, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 mg/l, μπορεί να δημιουργήσει σφάλματα στο άρωμα, αφού δημιουργείται οσμή βερνικιού νυχιών¹⁴.

Άλλη σημαντική κατηγορία εστέρων, που όμως παράγονται μόνο κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, είναι οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων, με κύρια παραδείγματα τους ethyl caproate/caprylate¹⁰. Αυτή η κατηγορία εστέρων παράγεται από οξέα, τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από το συνένζυμο Α (HS-CoA). Γενικά η συγκέντρωση των εστέρων αυξάνεται κατά την παλαίωση του οίνου, όμως η συγκέντρωση των αιθυλεστέρων των λιπαρών οξέων μειώνεται, επειδή παράγονται από τη δράση των ζυμών κατά την αλκοολική ζύμωση σε αναερόβιες συνθήκες και κατά την παλαίωση υδρολύονται¹⁷. Παράλληλα οι συγκεκριμένοι εστέρες σε συγκεντρώσεις μερικών mg/l συνεισφέρουν στη διαμόρφωση του εκλεπτυσμένου αρώματος των λευκών οίνων, αφού έχουν αρώματα κεριού και μελιού¹⁰.

Στην κατηγορία των εστέρων που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση ανήκουν και οι οξικοί εστέρες ανώτερων αλκοολών, όπως οι isoamyl acetate και phenylethyl acetate. Αυτές οι ενώσεις υπάρχουν σε μέτριες ποσότητες στον οίνο

◊8Ï

¹⁵ Arctander S, 1969

¹⁶ Bertrand A., 1983

¹⁷ Garofolo and Piracci, 1994

αλλά είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία ευχάριστων αρωμάτων, όπως αυτά της μπανάνας και του μήλου¹⁸.

Συνεπώς, όλοι οι παραπάνω Εστέρες που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση συνεισφέρουν στην αύξηση του πολυπλοκότητας του αρώματος των οίνων, αλλά μπορεί να κρύψουν τα ποικιλιακά αρώματα που προέρχονται από ενώσεις, οι οποίες υπάρχουν στο σταφύλι. Έτσι η δημιουργία αυτών των εστέρων ευνοείται όταν η αλκοολική ζύμωση γίνεται σε διαυγασμένο γλεύκος, με αργό ρυθμό σε δύσκολες συνθήκες λόγω της απουσίας οξυγόνου, και σε χαμηλές θερμοκρασίες^{19,16}. Γενικά μελέτες έχουν δείξει ότι οι Εστέρες που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση σχηματίζονται αρχικά εντός των κυττάρων των ζυμών και μετά, λόγω της λιποδιαλυτικής τους ικανότητας, διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και διαχέονται στο γλεύκος (μέσο ανάπτυξης)²⁰.

Εκτός από τους εστέρες που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση από τις ζύμες, υπάρχουν οι εστέρες οι οποίοι δημιουργούνται κατά τη διαδικασία της παλαίωσης. Αυτοί δημιουργούνται όταν τα οξέα (τρυγικό, μηλικό, γαλακτικό) και η αιθανόλη που υπάρχουν στον οίνο ενωθούν με τη διαδικασία της συμπύκνωσης που αναλύθηκε στην αρχή²¹. Όμως έχει αποδειχθεί ότι οι εστέρες που παράγονται κατά την παλαίωση του οίνου επηρεάζουν ελάχιστα τις οργανοληπτικές ιδιότητες των οίνων, γι' αυτό δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι συνεισφέρουν στη βελτίωση των οίνων κατά την παλαίωση¹⁰. Αντίθετα με αυτό, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας, η δημιουργία του οποίου συνδέεται με τη Μηλογαλακτική ζύμωση και καταλύεται από μία εστεράση βακτηριακής φύσης, συνεισφέρει στη βελτίωση του αρώματος του οίνου κατά την παλαίωση, όπου και η συγκέντρωσή του αυξάνεται εξαιτίας χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα²².

Παράλληλα πρέπει να αναφερθεί ότι τα επιθυμητά αρώματα στους οίνους δημιουργούνται από εστέρες μικρού μοριακού βάρους (Mr). Όμως, καθώς το βάρος αυξάνεται λόγω της χρήσης οξέων με μεγάλη υδρογονανθρακική αλυσίδα C₁₆-C₁₈, τα φρουτώδη, λουλουδένια αρώματα κεριού και μελιού μετατρέπονται σε οσμές σαπώνων, που θεωρούνται μη επιθυμητές¹¹.

◦8Ï

¹⁸ Vernin et. al, 1986

¹⁹ Dubois, 1993

²⁰ Nykanen 1977

²¹ Ribereau- Gayon et. al, 1982

²² Masuda et. al, 1984

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται -τόσο με το κατώφλι αντίληψής τους, όσο και το άρωμά τους^{23,24} - κάποιοι βασικοί εστέρες που υπάρχουν στους οίνους αλλά και εστέρες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΕΣΤΕΡΕΣ-ΑΡΩΜΑ-ΚΑΤΩΦΛΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ

ΕΣΤΕΡΕΣ	ΚΑΤΩΦΛΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ (ppm)	ΑΡΩΜΑ
Οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate)	7,5	Ανανάς, Βερνίκι νυχιών
Οξικός εστέρας της ισοαμυλικής αλκοόλης (isoamyl acetate)	0,03	Μπανάνα
2- οξικός φαινυλεστέρας (2-phenyl-ethyl acetate)	0,25	Τριαντάφυλλο
Ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας (ethyl isobutyrate)	0,1	Γλυκό, Καουτσούκ
Ισοβαλερικός αιθυλεστέρας (ethyl valerate)	1,5-5	Φρουτώδες, Ζύμη
2 μέθυλο -βουτυρικός αιθυλεστέρας (ethyl-2 methyl butyrate)	0,1-0,3	Μήλο
Δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (ethyl decanoate)	0,2	Λουλούδια, Σαπούνι
Οξικός εξυλεστέρας (hexyl acetate)	0,7	Μπανάνα, Πρασινίλα
Οξικός ισοβουτυλ-εστέρας (isobutyl acetate)	66	Μήλο, Μπανάνα
Καπροϊκός αιθυλεστέρας (ethyl caproate)	1	Κερί, Μέλι
Βουτυρικός αιθυλεστέρας (ethyl butyrate)	1	Μήλο
Καπριλικός αιθυλεστέρας (ethyl caprylate)	0,15	Κερί, Μέλι

οἶ

²³ Odor and flavour detection thresholds: <http://www.leffingwell.com/odorthre.htm>

²⁴ Άρωμα εστέρων : <http://www.flavornet.org/flavornet.html>

1.3.2 ΑΛΚΟΟΛΕΣ

Αιθανόλη

Εκτός από το νερό, η αιθανόλη αποτελεί το συστατικό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στον οίνο και το ποσοστό αυτής κατ' όγκο χρησιμοποιείται για την έκφραση του αλκοολικού τίτλου του οίνου. Ο κύριος τρόπος παραγωγής της αιθανόλης είναι ο μεταβολισμός των σακχάρων από τις ζύμες, διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά την αλκοολική ζύμωση, όπου χρειάζονται περίπου 18g/l σακχάρων για να παραχθεί περίπου 10% αιθανόλη. Συνεπώς η παραγωγή της ένωσης αυτής εξαρτάται άμεσα από την ωριμότητα των σταφυλιών, αφού όσο πιο ώριμα είναι τα σταφύλια, τόσο περισσότερα σάκχαρα θα υπάρχουν, άρα θα παραχθεί περισσότερη αιθανόλη. Συνεπώς, όταν οι κλιματολογικές συνθήκες είναι καλές και οι σταφυλές εκτίθενται επαρκώς στο ηλιακό φως, η παραγωγή της αιθανόλης ευνοείται, στοιχείο που οδηγεί στη δημιουργία οίνων με υψηλό αλκοολικό τίτλο. Εκτός όμως από την αλκοολική ζύμωση, η αιθανόλη μπορεί να παραχθεί σε μικρότερο ποσοστό όταν τα κυτταρικά τοιχώματα του σταφυλιού κάτω από αναερόβιες συνθήκες υποστούν οινοποίηση σε ατμόσφαιρα CO₂ (carbonic maceration)¹⁰.

Λόγω του ότι η αιθανόλη μπορεί εύκολα να διαλυθεί στο νερό δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου, αποκτά απολυμαντικές ιδιότητες, οι οποίες σε συνδυασμό με την οξύτητα του οίνου ενισχύουν την παλαιώση του τελευταίου, αφού δεν μπορούν να αναπτυχθούν παθογόνοι μικροοργανισμοί. Τέλος η αιθανόλη αποτελεί μία τοξική ένωση για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού μπορεί να επηρεάσει τα νευρικά κύτταρα και το συκώτι²⁵.

Μεθανόλη

Η μεθανόλη υπάρχει πάντα στους οίνους σε πολύ μικρές ποσότητες (μεταξύ 30-35mg/l), δεν επηρεάζει την οργανοληπτική αξιολόγησή τους, όμως σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι τοξική για τον ανθρώπινο οργανισμό. Η ένωση αυτή παράγεται

ο§Ï

²⁵ Sahar Y. Issa et. al, 2016

αποκλειστικά από την ενζυμική υδρόλυση των μέθοξυ (-OCH₃) ομάδων των πηκτινών κατά την αλκοολική ζύμωση. Συνεπώς, όσο μικρότερη είναι η ποσότητα των πηκτινών που υπάρχουν στα σταφύλια, τόσο λιγότερη ποσότητα μεθανόλης θα υπάρχει στους παραγόμενους οίνους. Οι πηκτίνες βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς των σταφυλιών, γι' αυτό και οι ερυθροί οίνοι έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση μεθανόλης (152 mg/l) σε σχέση με τους ροζέ οίνους (91 mg/l) και τους λευκούς (63 mg/l)²¹.

Τέλος, λόγω του αυξημένου ποσοστού πηκτινών που περιέχονται στους φλοιούς των αμερικάνικων ποικιλιών, οι οίνοι που προέρχονται από αυτές τις ποικιλίες περιέχουν περισσότερη ποσότητα μεθανόλης, σε σχέση με τους οίνους που προέρχονται από ευρωπαϊκές ποικιλίες αμπέλου *Vitis Vinifera*¹⁰.

Ανώτερες Αλκοόλες

Οι αλκοόλες των οποίων η ανθρακική αλυσίδα αποτελείται από περισσότερα από δύο άτομα άνθρακα λέγονται ανώτερες αλκοόλες, με βασικότερες τις ισοαμυλικές και τις ισοβουτυλικές. Αρκετές από τις ανώτερες αλκοόλες παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση και φτάνουν στους οίνους τις συγκεντρώσεις των 150-550 mg/l ²⁶. Σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 0,3 g/l οι ενώσεις αυτές συνεισφέρουν στην πολυπλοκότητα των αρωμάτων των οίνων, όμως σε υψηλότερες συγκεντρώσεις καλύπτουν το εκλεπτυσμένο άρωμά τους¹⁰.

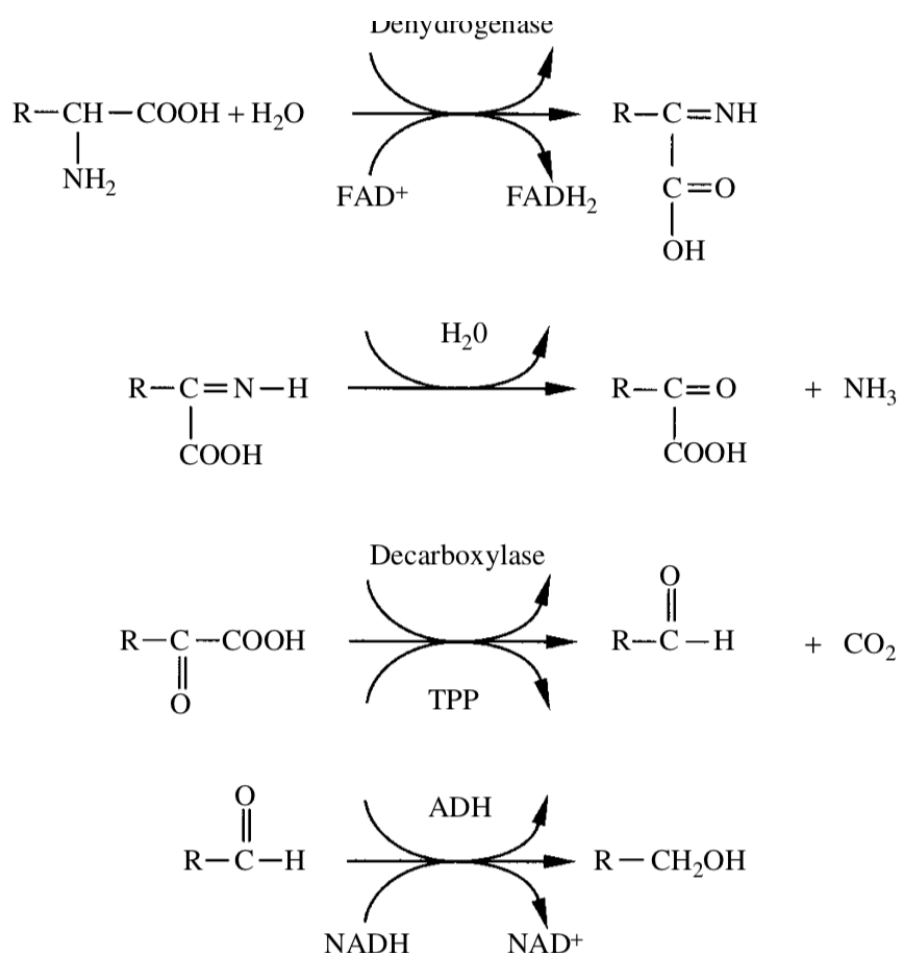
Οι ανώτερες αλκοόλες παράγονται από τον *saccharomyces cerevisiae* απευθείας, είτε κατά τον καταβολισμό των σακχάρων, είτε από τα αμινοξέα που υπάρχουν στα σταφύλια διαμέσου των αντιδράσεων Ehrlich (εικόνα 2). Οι αντιδράσεις αυτές δημιουργούνται από την FAD⁺ αφυδρογονάση, η οποία είναι υπεύθυνη για την οξειδωτική απαμίνωση των αμινοξέων μέσω της δημιουργίας ακετοοξέων ²⁷. Διαμέσου αυτής της οδού η λευκίνη (Leu) παράγει τις ισοαμυλικές αλκοόλες, ενώ η ισολευκίνη (IsoLeu) παράγει τις αμυλικές αλκοόλες. Όμως η συγκεκριμένη οδός παραγωγής ανώτερων αλκοολών από αμινοξέα δεν μπορεί να εξηγήσει το αυξημένο ποσοστό τους στους οίνους, γι' αυτό και η πλειοψηφία αυτών

◦§Ï

²⁶ Jackson 1994

²⁷ Peyneau and Guimberteau, 1962

των ενώσεων παράγεται από τη διαδικασία καταβολισμού των σακχάρων σε ακετοοξέα, με την παραγωγή του πυροσταφυλικού οξέος ως ενδιάμεσο προϊόν²⁸.



ΕΙΚΟΝΑ 2: ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΑΛΚΟΟΛΩΝ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ ΕΗRLICH, HANDBOOK OF ENOLOGY, 2006, VOLUME 2, CHAPTER 2

Η συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών στους οίνους ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης αλλά και με το είδος των ζυμομυκήτων που χρησιμοποιούνται. Γενικά η συγκέντρωση των συγκεκριμένων ενώσεων αυξάνεται με την αύξηση της βιομάζας των ζυμών που παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση με τη θερμοκρασία της οινοποίησης²⁹, αλλά και λόγω βακτηριακής προσβολής του οίνου¹⁰. Αντιθέτως η συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών μειώνεται όταν υπάρχει CO₂ στην ατμόσφαιρα της οινοποίησης.

◉

²⁸ Bertrand 1978

²⁹ Soufleros and Bertrand 1980

Γενικά οι ανώτερες αλκοόλες έχουν κυρίως δυσάρεστα βαριά αρώματα. Οι 1-προπανόλη, 2 μέθυλο-προπανόλη, 3 μέθυλο-βουτανόλη μυρίζουν καύσιμα (τα οποία είναι επιθυμητά μόνο στους οίνους Port), ενώ οι εξανόλες έχουν βοτανικές οσμές. Όμως η πλειοψηφία των φαινύλ-αίθυλο αλκοολών έχουν οσμή τριαντάφυλλου. Παράλληλα, ανώτερες αλκοόλες που προέρχονται από τον *Botrytis cinerea* έχουν οσμή μανιταριού^{11,13}. Οι ανώτερες αλκοόλες που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα^{24,30}:

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΑΝΩΤΕΡΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΩΜΑΤΑ/ΟΣΜΕΣ ΤΟΥΣ

ΑΝΩΤΕΡΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ	ΑΡΩΜΑ/ΟΣΜΗ
2 φαίνυλο-αιθανόλη	Τριαντάφυλλο
Ισοαμυλική αλκοόλη	Βότανα/πρασινάδα
Cis 3-εξενόλη	Κομμένο γρασίδι/ φύλλα
Cis 2-εξενόλη	Φύλλα/πρασινίλα
2 μέθυλο-βουτανόλη	Βύνη
1 εξανόλη	Λουλούδι/πρασινάδα

1.3.3. ΤΕΡΠΗΝΙΑ

Κάθε ποικιλία αμπέλου περιέχει συγκεκριμένες πτητικές ενώσεις, οι οποίες καθορίζουν το ποικιλιακό (πρωτογενές) άρωμα του οίνου, με τις σημαντικότερες από αυτές να ανήκουν στην οικογένεια των τερπενίων. Τα τερπένια είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό άρωμα τόσο των Μοσχάτων ποικιλιών (Μοσχάτο Αλεξανδρείας, Μοσχάτο Frontignan), όσο και κάποιων άλλων αρωματικών ποικιλιών αμπέλου, όπως Gewurztraminer, Pinot Gris, Riesling κ.α³¹.

Γενικά στους οίνους και τα σταφύλια τα τερπένια μπορούν να βρεθούν σε ελεύθερη μορφή (μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, C₁₃ παράγωγα Νορισοπρενοειδών) ή σε μορφή γλυκοσιδίων (πρόδρομες ενώσεις), ενωμένα δηλαδή με μόριο γλυκόζης,

⊙8Ï

³⁰ www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov /open chemistry database

³¹ Ribereau- Gayon et. al, 1975

αραβινόζης ή ραμινόζης³². Η πρώτη μορφή είναι η υπεύθυνη για το άρωμα των οίνων, ενώ στη δεύτερη τα τερπένια χάνουν την πτητικότητά τους, δεν έχουν άρωμα και έτσι δε συνεισφέρουν καθόλου στη διαμόρφωση του αρώματος. Ωστόσο με ενζυμική υδρόλυση των γλυκοσιδίων τα τερπένια μπορούν να βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο το άρωμα των οίνων³³.

Μονοτερπένια

Τα μονοτερπένια αποτελούνται από 10 άτομα άνθρακα και συναντώνται υπό τη μορφή μονοτερπενοειδών αλκοολών, αλδεϋδών, οξέων αλλά και εστέρων. Οι βασικότερες από αυτές τις ενώσεις είναι οι μονοτερπενοειδείς αλκοόλες και πιο συγκεκριμένα η Λιναλόλη, η Γερανιόλη, η Νερόλη, η Σιτρονελόλη αλλά και η α-Τερπινεόλη, οι οποίες χαρακτηρίζονται από έντονο άρωμα λουλουδιών¹⁰.

Μέχρι και σήμερα έχουν απομονωθεί περίπου 20 μονοτερπένια, με την τελευταία απομόνωση να έχει γίνει σε σταφύλια Fernao- Pires στην Πορτογαλία. Παράλληλα μελέτες έχουν δείξει ότι η ποσότητα των μονοτερπενίων μεταβάλλεται με βάση το pH αλλά και τη θερμοκρασία τόσο του γλεύκους όσο και των οίνων. Για παράδειγμα, σε όξινο περιβάλλον και αυξημένη θερμοκρασία η Γερανιόλη και η Λιναλόλη σχηματίζουν αντίστοιχα οξειδία Λιναλόλης και α-Τερπινεόλης, στοιχείο που μπορεί να ενισχύσει το χαρακτήρα των παλαιωμένων οίνων, αφού οι συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να επικρατήσουν κατά τη μεταφορά ή την αποθήκευση των οίνων³⁴. Η ποσότητα των μονοτερπενίων μπορεί να επηρεαστεί και από την ανάπτυξη του *Botrytis cinerea* στα σταφύλια, αφού η ύπαρξή του ενισχύει τη διάσπαση των κυρίως μονοτερπενοειδών αλκοολών προς τη δημιουργία ενώσεων με λιγότερο άρωμα³⁵. Στα σταφύλια μπορούν να υπάρξουν και μονοτερπενικές πολυόλες (διόλες, τριόλες) σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 1mg/l, χωρίς όμως να συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στο αρωματικό προφίλ του οίνου. Έχουν όμως την ικανότητα να δημιουργούν κάποια περισσότερο αρωματικά μονοτεροπένια (όπως αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω), όταν υποστούν όξινη υδρόλυση³⁶.

©8Ï

³² Voirin et. al, 1990

³³ Bonnländer et, al. 1998

³⁴ Silva Ferreira et.al, 2002

³⁵ Boidron, 1978

³⁶ Strauss et. al, 1986

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3) αναφέρονται τόσο τα μονοτερπένια που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία, όσο και το άρωμα αλλά και το κατώφλι αντίληψής τους¹⁰:

ΜΟΝΟΤΕΡΠΙΕΝΙΑ	ΚΑΤΩΦΛΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ (μg/l)	ΑΡΩΜΑ
Λιναλόλη	50	Τριαντάφυλλο
Σιτρονελόλη	18	Σιτρονέλα
Γερανιόλη	130	Τριαντάφυλλο, Γεράνι
Νερόλη	400	Τριαντάφυλλο

C₁₃ Νορισοπρενοειδή και τα παράγωγά τους

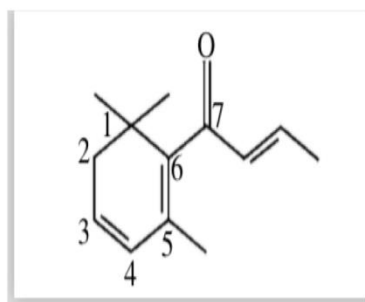
Η οξειδωτική διάσπαση των καροτενοειδών (τερπένια με 40 άτομα άνθρακα που βρίσκονται στους χλωροπλάστες των σταφυλιών) είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία ενώσεων που αποτελούνται από 9,10,11 ή 13 άτομα άνθρακα. Από αυτές τις ενώσεις μόνο αυτές με 13 άτομα άνθρακα στο μόριό τους έχουν ενδιαφέρον, λόγω του αρώματός τους³⁷.

Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις με 13 άτομα άνθρακα χωρίζονται σε 2 κατηγορίες. Στην πρώτη ανήκουν οι ενώσεις οι οποίες έχουν οξυγόνο στο 7^ο άτομο άνθρακα του μορίου τους (σειρά Δαμασκηνόνης), ενώ στη δεύτερη ανήκουν οι ενώσεις που έχουν οξυγόνο στο 9^ο άτομο άνθρακα του μορίου τους (σειρά Ιονόνης), όπως φαίνονται στην εικόνα 3¹⁰. Η πιο βασική ένωση που ανήκει στην πρώτη σειρά είναι η β-Δαμασκηνόνη, με χαρακτηριστικό άρωμα τροπικών φρούτων ή ψημένου μήλου, ενώ βασικότερη ένωση που ανήκει στη δεύτερη σειρά είναι η β- Ιονόνη, με άρωμα βιολέτας³⁸.

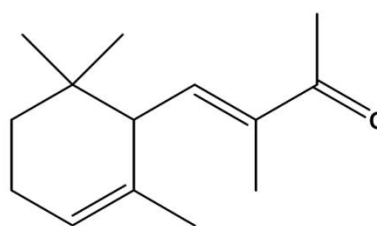
ο8Ϊ

³⁷ Demole et. al, 1970

³⁸ Schreier et. al, 1976



Σειρά Δαμασκηνόνης



Σειρά Ιονόνης

ΕΙΚΟΝΑ 3 ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΣΕΙΡΩΝ ΔΑΜΑΣΚΗΝΟΝΗΣ-ΙΟΝΟΝΗΣ

Η β- Δαμασκηνόνη ταυτοποιήθηκε πρώτα σε γλεύκος των ποικιλιών Riesling, Μοσχάτου και Scheurebe³⁹ και πιθανότατα υπάρχει σε όλες τις ποικιλίες αμπέλου⁴⁰. Η συγκέντρωση της συγκεκριμένης ένωσης ποικίλει αναλόγως με το χρώμα των ποικιλιών και έχει κατώφλι αντίληψης 40-60 ng/l. Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις της β- Δαμασκηνόνης σε ερυθρούς οίνους σε σχέση με ξηρούς λευκούς, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να απαντώνται σε οίνους γλυκούς φυσικούς από Μοσχάτο¹⁰. Ομοίως με τη β-Δαμασκηνόνη, η β- Ιονόνη υπάρχει σε όλες τις ποικιλίες αμπέλου, έχει κατώφλι αντίληψης 800 ng/l και αποτελεί ακόμα μία ένωση καθοριστική για το άρωμα τόσο των λευκών ποικιλιών, όσο και των ερυθρών³⁸. Και οι δύο αυτές ενώσεις μελετώνται στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία.

Πρόδρομες ενώσεις Τερπενίων

Όπως προαναφέρθηκε, ως πρόδρομες ενώσεις τερπενίων θεωρούνται τα τερπένια που έχουν ενωθεί με μόριο σακχάρου (γλυκοσίδια) γλυκόζης, αραβινόζης και ραμνόζης³². Παράλληλα, λόγω της υδατοδιαλυτότητας των σακχάρων που υπάρχουν στο μόριο των ενώσεων, τα πρόδρομα αποτελούν μέσο μεταφοράς των ελεύθερων τερπενίων στο πρέμνο, με τελικό προορισμό τους τη σταφυλή⁴¹.

Όλες οι ποικιλίες αμπέλου έχουν παρόμοια ποσότητα γλυκοσιδιωμένων τερπενίων στα σταφύλια τους, όμως οι Μοσχάτες έχουν λίγη περισσότερη ποσότητα. Αυτή η μορφή των ενώσεων είναι η συνηθέστερη μορφή των τερπενίων που

ο8ÿ

³⁹ Etievant et. al, 1983

⁴⁰ Sefton et. al, 1993

⁴¹ Bayonove et. al, 1984

συναντάται στα σταφύλια των ποικιλιών, με τους μονογλυκοζίτες (τερπένιο ενωμένο με ένα μόριο σακχάρου) να είναι λιγότεροι από τους διγλυκοζίτες (τερπένιο ενωμένο με δύο μόρια σακχάρου). Γενικά οι φλοιοί των σταφυλιών σε σχέση με τη σάρκα τους περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα τόσο των ελεύθερων μορφών των τερπενίων όσο και των προδρόμων τους ⁴².

Στους φλοιούς των σταφυλιών περιέχονται επίσης και β-γλυκοσιδάσες, ένζυμα υπεύθυνα για τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ τερπενίων-σακχάρου, με σκοπό την απελευθέρωση των ελεύθερων τερπενίων που συνεισφέρουν στον καθορισμό του αρώματος των οίνων ⁴³. Τα ένζυμα αυτά έχουν βέλτιστη δράση σε pH≤5, όμως όταν τόσο το pH όσο και η θερμοκρασία του γλεύκους είναι υψηλά, τα ένζυμα αυτά έχουν μειωμένη δράση. Παράλληλα, η δράση αυτών των ενζύμων μειώνεται και με τη διαύγαση του γλεύκους ⁴⁴. Έτσι η συγκέντρωση των προδρόμων τερπενίων στο γλεύκος είναι περίπου όμοια με αυτή του γλεύκους, γι' αυτό είναι απαραίτητη η εξωγενής προσθήκη τέτοιων ενζύμων με σκοπό την απελευθέρωση των ελεύθερων ενώσεων και ενίσχυση του αρώματος των οίνων ⁴⁵.

1.3.4 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Τα βασικότερα οξέα που συνεισφέρουν στον καθορισμό του αρώματος των οίνων είναι τα λιπαρά οξέα των αλειφατικών σειρών με C₃ – C₁₀ (πχ. Φορμικό οξύ, Οξικό οξύ, Βουτυρικό οξύ, Ισοβουτυρικό οξύ, κ.α), με το κυριότερο από αυτά να είναι το Οξικό οξύ. Αυτό αποτελεί τη βασικότερη ένωση που καθορίζει την πτητική οξύτητα του οίνου και αυξημένες συγκεντρώσεις του υποδηλώνουν τη μόλυνση του οίνου λόγω προσβολής του από οξικά ή γαλακτικά βακτήρια. Όμως μικρές συγκεντρώσεις του οξικού οξέος μπορεί να παραχθούν και από τις δράσεις των ζυμών κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ⁴⁶. Εκτός από το Οξικό οξύ, η ύπαρξη οξέων με C₃ (Προπιονικό οξύ) αλλά και με C₄ (Βουτυρικό οξύ) συνδέεται επίσης με βακτηριακή προσβολή του οίνου¹⁰.

ο8Ϊ

⁴² Di Stefano and Maggiorotto, 1993

⁴³ Biron et. al, 1988

⁴⁴ Grossmann et. al, 1990

⁴⁵ Gunata, 1993

⁴⁶ Buttery et. al, 1988

Λιπαρά οξέα με C₆ (Εξανοϊκό οξύ), C₈ (Οκτανοϊκό οξύ) και C₁₀ (Δεκανοϊκό οξύ) δημιουργούνται από τις ζύμες. Ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις μπορούν να σταματήσουν την αλκοολική ζύμωση, αφού δρουν ως αναστολείς της⁴⁷. Αντίθετα με αυτά, λιπαρά οξέα με C₁₈ (Λινολεϊκό οξύ, Ολεϊκό οξύ) και C₂₀, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των στερολών και βρίσκονται στην κηρώδη επιφάνεια του φλοιού των σταφυλιών, δρουν σαν ενεργοποιητές της αλκοολικής ζύμωσης²¹.

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3) αναφέρονται κάποια βασικά λιπαρά οξέα με το άρωμά τους^{24,30}:

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ-ΑΡΩΜΑ/ΟΣΜΗ

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	ΑΡΩΜΑ/ ΟΣΜΗ
Οξικό οξύ	Όξινη οσμή (σαν ξύδι)
Βουτυρικό οξύ	Τυρί, ταγγισμένο λάδι, ιδρώτας
Ισοβουτυρικό οξύ	Πρασινίλα, βούτυρο, ιδρώτας
Εξανοϊκό οξύ	Ιδρώτας
Οκτανοϊκό οξύ	Τυρί, ιδρώτας
Δεκανοϊκό οξύ	Ταγγισμένο λάδι, λίπος

1.3.5 ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ (ΑΛΔΕΥΔΕΣ- ΚΕΤΟΝΕΣ)

Οι Αλδεΐδες και οι Κετόνες αποτελούν και αυτές ενώσεις που στις κατάλληλες συγκεντρώσεις συνεισφέρουν στην πολυπλοκότητα του αρώματος των οίνων. Όσον αφορά τις Αλδεΐδες, η Αιθανάλη είναι η σημαντικότερη. Αυτή προέρχεται από την οξειδωση της αιθανόλης ή από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος, έχει καυστική οσμή και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλλαγή του χρώματος των οίνων κατά τον συμπολιμερισμό των φαινολών (Ανθοκυανίνες και Κατεχίνες)⁴⁸. Εκτός από την Αιθανάλη, η Βανιλίνη και η Εξανάλη αποτελούν ακόμα δύο σημαντικές Αλδεΐδες. Η πρώτη σχετίζεται με την ανάπτυξη του αρώματος βανίλιας σε οίνους οι οποίοι έχουν παλαιώσει σε βαρέλι, ενώ η δεύτερη συνεισφέρει στην ανάπτυξη βοτανικών οσμών¹⁰. Όσον αφορά τις Κετόνες, η σημαντικότερη είναι η

οξείνη

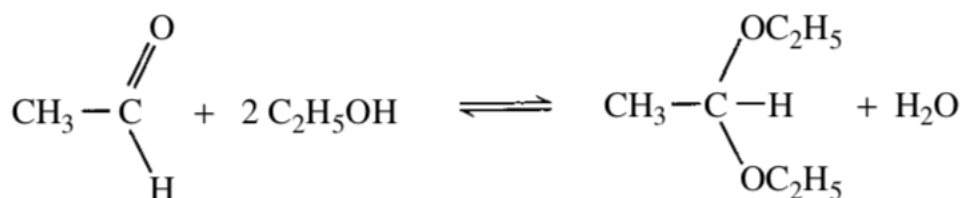
⁴⁷ Laure et. al, 1982

⁴⁸ Moreira et. al, 2016

Μερκαπτοπεντανόνη, η οποία συνεισφέρει στη δημιουργία του χαρακτηριστικού αρώματος πιπεριάς του Sauvignon Blanc⁴⁹.

1.3.6. ΑΚΕΤΑΛΕΣ ΚΑΙ ΛΑΚΤΟΝΕΣ

Οι Ακετάλες και οι Λακτόνες αποτελούν ακόμα δύο κατηγορίες ενώσεων που έχουν απομονωθεί στους οίνους και συνεισφέρουν στην πολυπλοκότητα του αρώματός τους. Οι Ακετάλες δημιουργούνται ύστερα από την αντίδραση ενός μορίου Αλδεΐδης με δύο μόρια Αλκοόλης, σύμφωνα με την αντίδραση της παρακάτω εικόνας (εικόνα 4). Γενικά έχουν απομονωθεί περίπου 20 Ακετάλες από τους οίνους, με σημαντικότερη την Διεθοξυαιθάνη, η οποία δημιουργείται ύστερα από την αντίδραση της Αιθανάλης με την Αιθανόλη. Συνεπώς η συγκέντρωση με την οποία η ένωση αυτή, υπάρχει στους οίνους εξαρτάται από τη συγκέντρωση της Αιθανάλης, αφού η Αιθανόλη έχει αυξημένη συγκέντρωση σε αυτούς. Τόσο η Διεθοξυαιθάνη όσο και γενικά οι Αιθανάλες, λόγω των βοτανικών οσμών τους, καθορίζουν το άρωμα των οίνων και συγκεκριμένα των Sherry⁵⁰.



ΕΙΚΟΝΑ 4 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΕΘΟΞΥΑΙΘΑΝΗΣ¹⁰

Αντίθετα με τη δημιουργία των Ακεταλών, οι Λακτόνες δημιουργούνται ύστερα από ενδομοριακή εστεροποίηση μεταξύ ομάδας οξέος και ομάδας αλκοόλης, που υπάρχουν στην ίδια ένωση. Οι Λακτόνες που έχουν απομονωθεί στους οίνους είναι αρκετές και μπορεί να παραχθούν είτε κατά την αλκοολική ζύμωση (γ-Βουτυρολακτόνη), είτε λόγω της προσβολής του Botrytis cinerea στα σταφύλια (Σοτολόνη), είτε από τα βαρέλια κατά τη διάρκεια παλαίωσης των οίνων (whisky Λακτόνες)¹⁰. Η γ-Βουτυρολακτόνη είναι η κυριότερη Λακτόνη, όμως μελέτες έχουν

◉8Ï

⁴⁹ Ferreira et. al, 2006

⁵⁰ Arctander, 1969

δείξει ότι δε συνεισφέρει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, στοιχείο αντίθετο με άλλες Λακτόνες (που παράγονται ομοίως κατά την αλκοολική ζύμωση), οι οποίες συνεισφέρουν στον καθορισμό του ποικιλιακού αρώματος, όπως έχει μελετηθεί στην ποικιλία Riesling⁵¹.

Ακόμα μία σημαντική Λακτόνη είναι η Σοτολόνη, η οποία συνεισφέρει στη δημιουργία του καβουρδισμένου αρώματος αλλά και αρώματος ξηρών καρπών σε οίνους που έχουν παραχθεί ύστερα από προσβολή των σταφυλιών από την ευγενή σήψη⁵². Τέλος, οι whisky Λακτόνες, που έχουν άρωμα καρύδας, μεταφέρονται από τα βαρέλια στους οίνους το χρονικό διάστημα που παραμένουν σε αυτά για να παλαιώσουν.

1.3.7. ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΕΣ

Οι Μεθοξυπυραζίνες είναι ενώσεις που το μόριό τους αποτελείται από ένα ετεροκυκλικό δακτύλιο με Άζωτο και προέρχονται από το μεταβολισμό των Αμινοξέων, αν και κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι μπορεί να είναι προϊόν μικροβιακής προσβολής των οίνων⁵³. Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές για την οσμή σπαραγγιών, πράσινης πιπεριάς ή μπιζελιού και αποτελούν τις βασικές ενώσεις καθορισμού του ποικιλιακού αρώματος των οίνων Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sauvignon Blanc, Merlot και Carmenere⁵⁴.

Οι Μεθοξυπυραζίνες, αν και υπάρχουν σε όλους τους ιστούς του πρέμνου συμπεριλαμβανομένων και των ριζών, των ανθέων, και των ελίκων (εκτός των ιστών των φύλλων), δε μετακινούνται από αυτούς στη ράγα με σκοπό να μεταφερθούν στο γλεύκος⁵⁵. Αυτό επιβεβαιώνεται αφού, σύμφωνα με τον Roujou de Boube, η σύσταση του οίνου σε Μεθοξυπυραζίνες εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση αυτών των ενώσεων στη ράγα της σταφυλής⁵⁶. Παράλληλα μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση των μεθοξυπυραζινών και το άρωμα λαχανικών που δημιουργούν

◦8Ï

⁵¹ Mesuda et. al, 1984

⁵² Martin et. al, 1992

⁵³ Allen et. al, 1995a

⁵⁴ Calo et. al, 1991

⁵⁵ Koch et. al, 2010

⁵⁶ Roujou de Boube et. al, 2002

στους οίνους αυξάνεται όσο πιο άγουρα είναι τα σταφύλια που έχουν χρησιμοποιηθεί για την οινοποίηση¹⁰.

Οι πιο σημαντικές τέτοιες ενώσεις καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 5), σε συνδυασμό με την οσμή/ άρωμα και το κατώφλι αντίληψής τους¹⁰:

Μεθοξυπυραζίνες	Κατώφλι Αντίληψης (ng/l)	Άρωμα/ Οσμή
2- μέθοξυ-3-ισοβουτυλική πυραζίνη	2	Πράσινη πιπεριά
2- μέθοξυ-3-ισοπροπυλική πυραζίνη	2	Πράσινη πιπεριά, γη
2- μέθοξυ-3-sec-βουτυλική πυραζίνη	1	Πράσινη πιπεριά
2- μέθοξυ-3-αιθυλική πυραζίνη	400	Πράσινη πιπεριά, γη

1.3.8. ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΘΕΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Στην αρχή της μελέτης τους, οι Θειούχες ενώσεις που υπάρχουν στους οίνους συσχετίστηκαν αποκλειστικά και μόνο με την εμφάνιση ελαττωματικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, θεωρία όμως που στις ημέρες μας έχει καταρριφθεί. Μέχρι και σήμερα έχουν απομονωθεί αρκετές Θειούχες ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία επιθυμητών αρωμάτων στους οίνους, όπως αρώματα βοτάνων, φρούτων και καπνού⁵⁷. Οι βασικότερες και σε μεγαλύτερα αφθονία τέτοιες ενώσεις είναι οι Θειόλες ή αλλιώς Μερκαπτάνες, πολλές εκ των οποίων είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία των χαρακτηριστικών αρωμάτων κάποιων φρούτων, με πιο σημαντικό παράδειγμα αυτό του μαύρου Φραγκοστάφυλου⁵⁸. Μεγάλος αριθμός Θειολών έχουν απομονωθεί μέχρι και σήμερα τόσο σε Αμερικάνικα είδη αμπέλου (*Vitis Labrusca*) όσο και σε Ευρωπαϊκά (*Sauvignon Blanc*)⁵⁹, με την 4-μέρκαπτο-4-μέθυλο-πενταν-2όνη να αποτελεί τη βασικότερη

ο8Ï

⁵⁷ Dubourdieu and Tominaga,2009

⁵⁸ Riguad et.al, 1986

⁵⁹ Winter et. al, 1990

ένωση δημιουργίας του χαρακτηριστικού βοτανικού αρώματος-αρώματος λαχανικών στην τελευταία ποικιλία⁶⁰.

Ακόμα μία βασική Θειόλη που έχει μελετηθεί είναι η Μεθειονόλη, η ύπαρξη της οποίας προσδίδει -ιδιαίτερα στους λευκούς οίνους που έχουν εκτεθεί σε υψηλή θερμοκρασία και Οξυγόνο- αρώματα λαχανικών, όπως ωμής πατάτας ή κουνουπιδιού. Η συγκεκριμένη ένωση μπορεί να ανιχνευτεί στους οίνους σε συγκεντρώσεις έως και 5 mg/l. Μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να παραχθεί τόσο από το *Saccharomyces cerevisiae*, όσο και από τον *Oenococcus oeni*, μέσω του μονοπατιού για τον καταβολισμό του Αμινοξέος Μαθειονίνη⁶¹.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η Θειόλη 3-μέθυλ-θειολ-1-Προπανόλη, η οποία -όπως και η Μεθειονόλη που προαναφέρθηκε - έχει άρωμα ωμής πατάτας²³.

©8Ï

⁶⁰ Darriet et. al, 2001

⁶¹ Yi.Xin Seow et.al, 2010

1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Μελέτες έχουν δείξει ότι όλες οι καλλιεργητικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται από τους αμπελουργούς με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας των σταφυλιών επηρεάζουν με διάφορους τρόπους την παραγωγή των ενώσεων που είναι υπεύθυνες για το άρωμα του οίνου⁶².

1.4.1. ΑΡΔΕΥΣΗ

Η πλειοψηφία των ερευνών που μελετούν την επίδραση της άρδευσης στη δημιουργία των πτητικών ενώσεων που καθορίζουν το αρωματικό προφίλ των οίνων, έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι το ήπιο υδατικό stress που εφαρμόζεται στα πρέμνα επιδρά θετικά στο άρωμα των παραγόμενων οίνων, καθώς επάγεται η δημιουργία των υπεύθυνων ενώσεων⁶³. Έρευνες που έχουν γίνει στις ποικιλίες Cabernet Sauvignon και Chardonnay έχουν αποδείξει ότι η έλλειψη νερού επηρεάζει τόσο την αντιγραφή γονιδίων όσο και κάποιες βασικές μεταβολικές οδούς. Πιο συγκεκριμένα, στην ποικιλία Chardonnay επάγονται κάποιοι φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί, οι οποίοι ενεργοποιούν μεταβολικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν καροτενοειδή και ισοπρενοειδή. Αυτά τα μονοπάτια επάγουν την παραγωγή ενώσεων υπεύθυνων για το άρωμα των οίνων.

Αντίθετα με το Chardonnay, η έλλειψη νερού στην ποικιλία Cabernet Sauvignon επάγει τόσο την αύξηση της συγκέντρωσης του Αμπσιτικού Οξέος (ABA), της Προλίνης και των σακχάρων, όσο και τη δημιουργία ενζύμων απαραίτητων για το μονοπάτι μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, το οποίο επιδρά θετικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων⁶³, όπως έχει αναλυθεί και σε

⊙

⁶² Kobayashi et. al, 2010

⁶³ Deluc et. al, 2009

προηγούμενη ενότητα. Μπορεί το συμπέρασμα των ερευνών όσον αφορά τη θετική επίδραση της ήπιας υδατικής καταπόνησης στο αρωματικό προφίλ του οίνου να είναι κοινό στην πλειοψηφία των μελετών που έχουν γίνει την τελευταία δεκαετία, όμως η κατάλληλη ήπια ποσότητα νερού για τη βέλτιστη παραγωγή των πτητικών εξαρτάται από την καλλιεργούμενη ποικιλία αμπέλου ⁶⁴.

Με βάση τα δεδομένα του Chapman το 2005, πρέμνα Cabernet Sauvignon, τα οποία ποτίζονταν κάθε εβδομάδα με 32-64l νερού, παρήγαγαν οίνους φτωχότερους σε φρουτώδες άρωμα, χαρακτήρα κόκκινου/ μαύρου βατόμουρου, άρωμα μαγειρεμένων φρούτων, άρωμα σταφίδας, λαχανικών ή μαύρου πιπεριού, σε σχέση με πρέμνα της ίδια ποικιλίας, τα οποία δεν ποτίζονταν μέχρι το δυναμικό των φύλλων να πέσει κάτω από 1.6 MPa⁶⁵. Όμοια, στην κεντρική Ελλάδα ποικιλία Cabernet εμβολιασμένη σε υποκείμενα 1103P και SO4 είχε καλύτερο αρωματικό δυναμικό όταν το νερό που δεχόταν ήταν περιορισμένο ⁶⁶.

Παράλληλα, περιορισμένη διαθεσιμότητα νερού σε πρέμνα Αγιωργίτικου στην περιοχή της Νεμέας οδήγησε σε αύξηση των γλυκοσιδιωμένων προδρόμων των κύριων πτητικών αρωματικών ενώσεων. Οι οίνοι που δημιουργήθηκαν ύστερα από την οινοποίηση σταφυλιών της συγκεκριμένης ποικιλίας επιλέχθηκαν μεταξύ άλλων με βάση τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους σε δοκιμές γευσιγνωσίας ⁶⁷.

Αντίθετα με τα παραπάνω, ο Reynolds υποστήριξε σε μελέτη του το 2007 ότι οίνοι που παράχθηκαν από σταφύλια Chardonnay, τα πρέμνα των οποίων δέχονταν συχνή άρδευση στην περιοχή του Οντάριο, είχαν εντονότερα αρώματα μήλου, λουλουδιών και εσπεριδοειδών, σε σχέση με άλλα σταφύλια πρέμνων που είχαν υποστεί υδατική καταπόνηση⁶⁸.

1.4.2. ΞΕΦΥΛΛΙΣΜΑ

Το ξεφύλλισμα επηρεάζει άμεσα την έκθεση των σταφυλιών στο ηλιακό φως, η οποία επηρεάζει και αυτή με τη σειρά της με περίπλοκο τρόπο τη δημιουργία των ενώσεων που καθορίζουν το άρωμα των οίνων ⁶⁴. Μελέτες έχουν δείξει ότι η

ο8Ϊ

⁶⁴ Carmen Gonzalez-Barreiro et. al, 2013

⁶⁵ Chapman et. al, 2005

⁶⁶ Koundouras et.al, 2009

⁶⁷ Koundouras et.al, 2006

⁶⁸ Reynold et. al, 2007

απευθείας έκθεση της σταφυλής στο ηλιακό φως (έντονο ξεφύλλισμα) μπορεί να επηρεάσει τόσο θετικά όσο και αρνητικά τη δημιουργία αρωματικών πτητικών ενώσεων. Αρχικά ενισχύεται η φωτοσυνθετική δραστηριότητα των πράσινων οργάνων του πρέμνου, στοιχείο που επιφέρει αύξηση στη συγκέντρωση των γλυκοσιδιωμένων αρωματικών προδρόμων λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης σακχάρων⁶⁹. Όμως μπορεί και να επηρεάσει αρνητικά τη δημιουργία των Μεθοξυπυραζινών, αφού αυτές οι ενώσεις είναι αρκετά φωτοευαίσθητες⁷⁰.

Μελέτες που έγιναν σε Μοσχάτο Αλεξανδρείας, του οποίου οι σταφυλές ήταν εκτεθειμένες κατά 20%,50% και 100% στο ηλιακό φως με τη χρήση κατάλληλου ξεφυλλίσματος, έδειξαν ότι οι σταφυλές που είχαν εκτεθεί κατά 50% στο ηλιακό φως εμφάνισαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ελεύθερων τερπενολών⁷¹. Επίσης άλλες μελέτες που έγιναν στην ποικιλία Syrah έδειξαν ότι η υπερβολική σκίαση των σταφυλών από τα φύλλα των πρέμνων επέφερε μείωση των γλυκοσιδίων της β-δαμασκηνόνης⁷².

◦8Ï

⁶⁹ Bureau et. al, 2000a

⁷⁰ Heymann et. al, 1986

⁷¹ Balanic et. al, 1997

⁷² Ristic et. al, 2007

2. ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΕ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΑΣ - GC-MS

Τόσο η μέθοδος της αέριας Χρωματογραφίας, όσο και η μέθοδος της Φασματομετρίας μάζας αποτελούν ισχυρές αναλυτικές τεχνικές. Η πρώτη χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών ενός διαλύματος ενώ η Φασματομετρία μάζας βοηθά τους επιστήμονες να αναγνωρίσουν ταυτόχρονα με το διαχωρισμό τη χημική δομή των επιμέρους συστατικών.

Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Ο διαχωρισμός στην αέρια Χρωματογραφία καθορίζεται από την κατανομή των προς μελέτη συστατικών των δειγμάτων μεταξύ μίας στατικής και μία κινητής φάσης. Τα συστατικά αυτά, για να μπορούν να αναλυθούν με τη συγκεκριμένη μέθοδο, θα πρέπει να είναι τόσο πτητικά ή να μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα ύστερα από την εφαρμογή κατάλληλων αντιδραστηρίων, όσο και σταθερά, δηλαδή θα πρέπει να μην αποσυντίθενται κατά την ανάλυσή τους⁷³.

Γενικά, τα δείγματα με τη χρήση μικροσύριγγας εισάγονται σε θερμαινόμενο στόμιο εισαγωγής (injector), που βρίσκεται στην κορυφή της στήλης. Στη συνέχεια το φέρον αέριο (κινητή φάση) μεταφέρει το δείγμα σε ειδικό ανιχνευτή, με σκοπό την ανίχνευση των συστατικών του. Κατά τη μεταφορά του δείγματος τα συστατικά διαχωρίζονται με διαφορετικές ταχύτητες με βάση την κίνησή τους, στοιχείο που εξαρτάται από τις διαφορετικές τάσεις ατμών των συστατικών, από τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις που έχουν αυτά με την εκάστοτε στατική φάση αλλά και από τη θερμοκρασία που υπάρχει. Η τελευταία αποτελεί το βασικότερο παράγοντα καθορισμού της ταχύτητας, γι' αυτό και η στήλη τοποθετείται σε φούρνο ακριβείας,

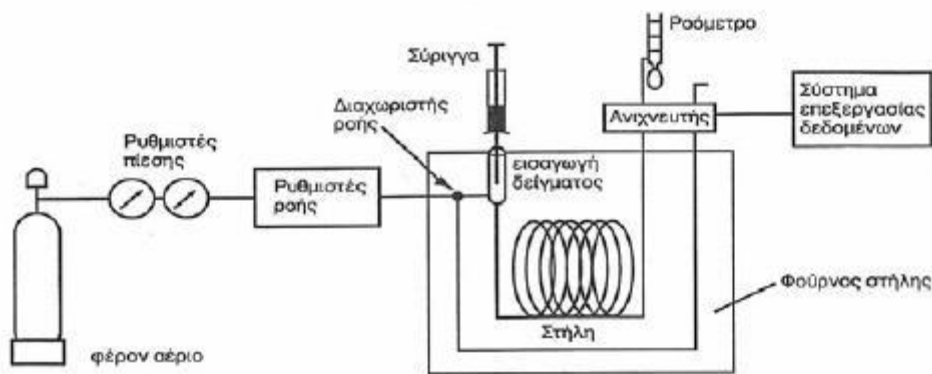
◉⁸Ϊ

⁷³ Fulton et. al, 2000

με σκοπό την εξασφάλιση επαναλήψιμων συνθηκών. Η στατική φάση που χρησιμοποιείται μπορεί να είναι υγρή ή στερεή, με επίστρωμα αυτής να περιέχεται σε στήλη, αντίθετα με την κινητή φάση (φέρον αέριο), που συνήθως είναι αέριο Υδρογόνου ή Ηλίου⁷⁴. Τέλος, τα σήματα ανίχνευσης που λαμβάνονται από τον ανιχνευτή καταγράφονται από ειδικό καταγραφικό ή οδηγούνται σε υπολογιστή για την ανάλυσή τους.

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 6) αναφέρονται οι τύποι της αέριας Χρωματογραφίας, ενώ στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 5) περιγράφεται μία απλοποιημένη διάταξη αέριου χρωματογράφου⁷⁴:

Κινητή φάση	Στατική φάση	Μηχανισμός διαχωρισμού	Μορφή στατικής φάσης	Όνομα αέριας Χρωματογραφίας
Αέριο	Στερεό	Προσρόφηση	Στήλη	Αέρια Στερεή Χρωματογραφία (GsC)
Αέριο	Στερεό	Μοριακός αποκλεισμός	Στήλη	Αέρια Στερεή Χρωματογραφία (GsC)
Αέριο	Υγρό σε στερεό φορέα ή τριχοειδή στήλη	Κατανομή	Στήλη ή τριχοειδής στήλη	Αέρια Υγρή Χρωματογραφία (GLC)



ΕΙΚΟΝΑ 5 ΔΙΑΤΑΞΗ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ

Κινητή φάση-Φέρον αέριο

Κάθε αέριο που βρίσκεται σε υπερκάθαρη κατάσταση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως Φέρον αέριο. Παράλληλα, θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις, αδρανές, χωρίς να περιέχει οξυγόνο και υγρασία. Η ύπαρξη του οξυγόνου μπορεί να οξειδώσει τη στατική φάση και να καταστρέψει τη στήλη, η οποία έχει πληρωθεί με αυτήν, ενώ η ύπαρξη υγρασίας μπορεί να ενεργοποιήσει τη στατική φάση, στοιχείο μη επιθυμητό. Τα συνηθέστερα αέρια που χρησιμοποιούνται είναι το Ήλιο, το Υδρογόνο αλλά και το Άζωτο⁷⁵. Σημαντικό στοιχείο για το Φέρον αέριο είναι η γραμμική ταχύτητά του, η οποία ορίζεται ως ο χρόνος κατακράτησης σε sec, διαιρούμενος με το μήκος της στήλης που χρησιμοποιείται σε cm. Η ταχύτητα αυτή καθορίζεται με τη μέτρηση του χρόνου από την έγχυση έως την ανίχνευση ενώσεων (Αργό ή Βουτάνιο) που δεν κατακρατούνται από τη στατική φάση⁷³.

Εισαγωγή δειγμάτων στη στήλη

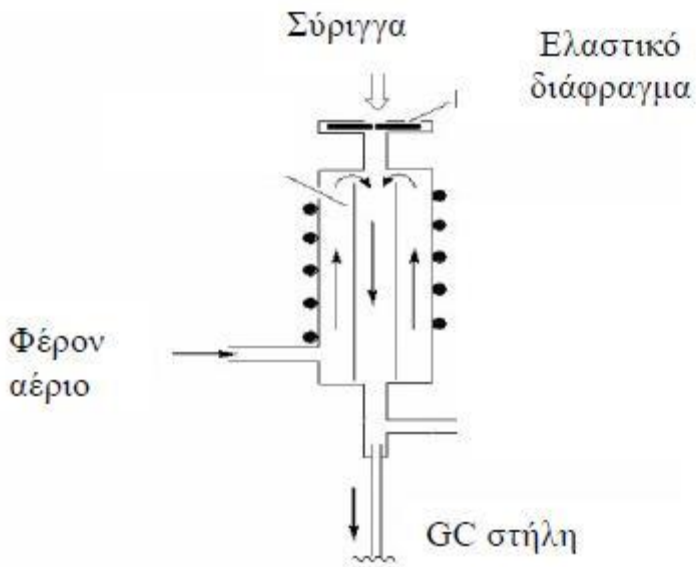
Η εισαγωγή των υγρών δειγμάτων στη στήλη γίνεται με τη χρήση μικροσύριγγας (λήψη 1 μL) μέσω ενός ειδικού διαφράγματος, που βρίσκεται στην είσοδο του Χρωματογράφου. Στη συνέχεια η κινητή φάση (Φέρον αέριο) παρασύρει το δείγμα και το οδηγεί στη στήλη, όπου εκεί υπό τις κατάλληλες συνθήκες Πίεσης και Θερμοκρασίας εξατμίζεται και διαχωρίζεται. Οι διαχωρισμοί με τα καλύτερα αποτελέσματα είναι αυτοί που το δείγμα έχει εισαχθεί στη στήλη σε μορφή ταινίας, στοιχείο που καθιστά επιτακτική την ανάγκη απότομης εξατμισμού του δείγματος. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την απότομη θέρμανση της βαλβίδας στην οποία

ο8Ϊ

⁷⁵ Skoog 2000

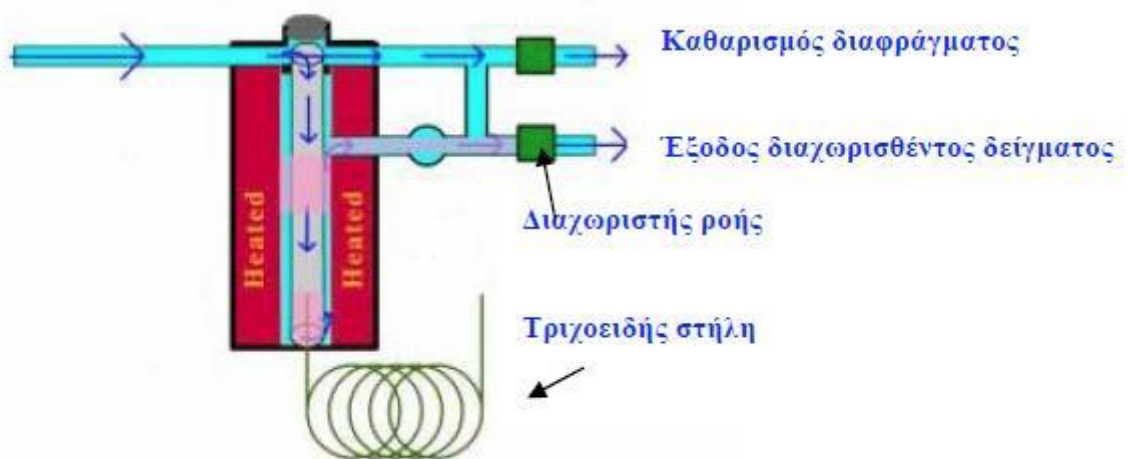
εισάγεται το δείγμα με τη μικροσύριγγα. Ο βασικότερος τύπος βαλβίδας εισαγωγής του δείγματος περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 6)⁷⁶.

Εκτός από την εισαγωγή υγρών δειγμάτων υπάρχουν και άλλα συστήματα εισαγωγής, η χρήση των οποίων καθορίζεται από την εκάστοτε εφαρμογή. Κάποια από αυτά είναι η άμεση έγχυση δείγματος και η έγχυση με διαχωρισμό ή μη της ροής. Στο πρώτο σύστημα (που είναι και το ευκολότερο να χρησιμοποιηθεί σε στήλες με μεγάλη οπή) το δείγμα εγχύεται άμεσα πάνω στη στήλη με τη χρήση βελόνας. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι αρκετά αξιόπιστη ως προς την ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων και είναι σημαντική για την ανάλυση θερμικά ασταθών ενώσεων με διαφορετικά σημεία βρασμού. Σε αυτήν την τεχνική ένα μικρό τμήμα αδρανούς τριχοειδούς σωλήνα υπάρχει μεταξύ του σημείου έγχυσης και της στήλης. Για αποτελεσματικό διαχωρισμό των συστατικών των δειγμάτων θα πρέπει αυτό να εισαχθεί ταχύτατα με τη μικροσύριγγα μέσω ενός αυτοσφραγιζόμενου ελαστικού διαφράγματος σιλικόνης (septum). Στη συνέχεια το δείγμα εισέρχεται στο χώρο ταχείας εξάτμισης που βρίσκεται στην κορυφή της στήλης, η θερμοκρασία του οποίου είναι τουλάχιστον 50°C πάνω από το σημείο βρασμού του λιγότερου πτητικού συστατικού του δείγματος. Η ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι από λίγα δέκατα του μικρόλιτρου έως 10μL. Στην περίπτωση κατά την οποία η στήλη απαιτεί μικρότερη ποσότητα δείγματος, χρησιμοποιείται σύστημα διαμοιρασμού για την εισαγωγή στη στήλη μόνο του κατάλληλου κλάσματος του δείγματος, με το υπόλοιπο να οδηγείται στα απόβλητα.



ΕΙΚΟΝΑ 6 ΒΑΛΒΙΔΑ ΕΓΧΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Όσον αφορά την έγχυση δείγματος με διαχωρισμό ροής (split injection) (εικόνα 7), το δείγμα ατμοποιείται στη ροή της κινητής φάσης και μέρος αυτού κατευθύνεται στην κεφαλή της στήλης με αναλογία από 10:1 σε 100:1. Εάν κατευθυνόταν όλη η ποσότητά του στην στήλη, τότε αυτή θα υπερφορτωνόταν^{74,76}.



ΕΙΚΟΝΑ 8 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΡΟΗΣ

Στη μέθοδο έγχυσης του δείγματος χωρίς διαχωρισμό ροής (Splitless injection)

όλο το δείγμα εξατμίζεται και συμπυκνώνεται στο αρχικό τμήμα της τριχοειδούς στήλης. Στη συνέχεια το σύστημα εισαγωγής του δείγματος καθαρίζεται με εξαερισμό λόγω της υψηλής ροής του φέροντος αερίου που εισάγεται από εξωτερική βαλβίδα. Το δείγμα, συνεπώς, συγκεντρώνεται στην κεφαλή της κρύας στήλης και μεγάλο μέρος του διαλύτη καθαρίζεται. Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν προτείνεται για δείγματα που πρέπει να αναλυθούν ποσοτικά αλλά είναι συνιστώμενη μέθοδος για ιχνοαναλύσεις αραιών δειγμάτων⁷⁴.

Οι στήλες του αερίου Χρωματογράφου

Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία είναι τριχοειδείς ή πληρωμένες, φτιαγμένες από Γυαλί, Χάλυβα, ή Πυρίτιο και περιέχουν διάφορα συστατικά (στατική φάση), αναλόγως με τα δείγματα που θέλουμε να αναλύσουμε. Η μορφή των τριχοειδών στηλών είναι ελικοειδής, με μήκος 25-30m και διάμετρο 0,2 mm έως 0,8 mm, αντίθετα με τις πληρωμένες στήλες, οι οποίες έχουν μήκος 2-3 m και διάμετρο 2-4 mm. Τόσο οι τριχοειδείς όσο και οι πληρωμένες στήλες βρίσκονται στο εσωτερικό ενός φούρνου, ο οποίος αυξάνει τη θερμοκρασία και βοηθά στην απελευθέρωση των συστατικών των δειγμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, οι τριχοειδείς στήλες στα τοιχώματά τους περιέχουν ένα λεπτό στρώμα μιας μη πτητικής χημικής ουσίας, ενώ στις πληρωμένες στήλες η ίδια ουσία έχει επιστρωθεί πάνω και σε ένα αδρανές στερεό, που έχει προστεθεί στο τέλος. Η εισαγωγή του στρώματος της παραπάνω μη πτητικής ένωσης γίνεται τόσο με τη χρήση αερίου υπό πίεση, όσο και με τη χρήση γραμμής κενού. Και στις δύο περιπτώσεις η στήλη σφραγίζεται ερμητικά⁷⁴. Από τις στήλες που αναφέρθηκαν παραπάνω η τριχοειδής είναι αυτή που χρησιμοποιείται στις ημέρες μας σε μεγαλύτερη συχνότητα, με το γυαλί να αποτελεί το συνηθέστερο υλικό δημιουργίας της. Η συνηθέστερη χρήση εξηγείται από τα αρκετά πλεονεκτήματα που έχει η συγκεκριμένη στήλη, με κάποια από αυτά να είναι ο μικρότερος χρόνος έκλουσης και ανάλυσης των συστατικών των δειγμάτων σε σχέση με τις πληρωμένες στήλες, η καλύτερη διαχωριστική ικανότητα λόγω του μεγάλου μήκους της, το ότι χρειάζονται μικρότερη ποσότητα δείγματος για έγχυση, κ.α.

Μετά την έγχυση του δείγματος, το Φέρον αέριο μεταφέρει τα συστατικά του

στη στήλη, τα οποία επιλεκτικά καθυστερούνται από τη στατική φάση. Στη συνέχεια με διαδοχική αύξηση της θερμοκρασίας του φούρνου, μέσα στον οποίο βρίσκεται η στήλη (τις περισσότερες φορές ο ρυθμός αύξησης είναι 4-20 °C/min), τα συστατικά του δείγματος απελευθερώνονται διαδοχικά. Τα λιγότερο πτητικά απελευθερώνονται τελευταία, όταν η θερμοκρασία έχει λάβει σχεδόν τη μέγιστη τιμή της⁷⁷.

Αέρια Χρωματογραφία σε σύζευξη με Φασματόμετρο μάζας (GC-MS)

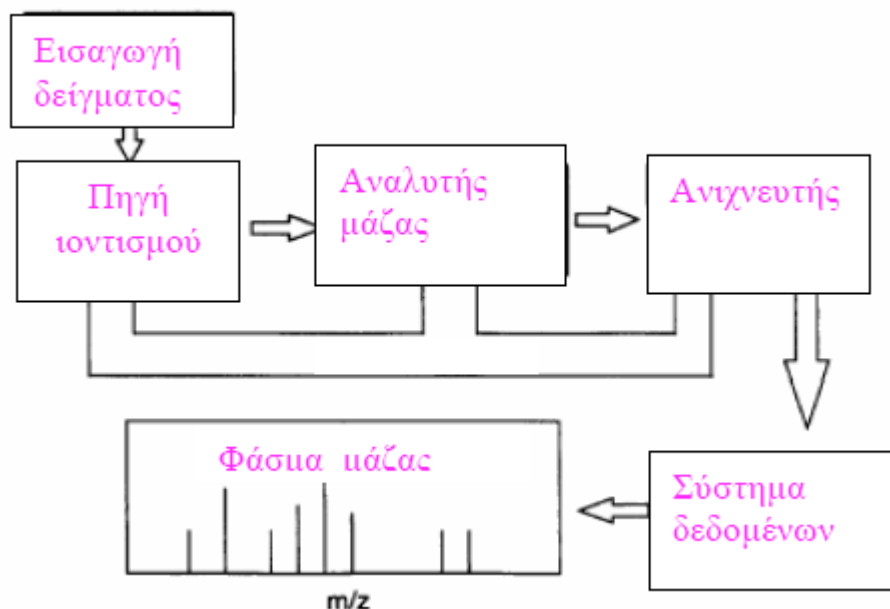
Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η αέρια Χρωματογραφία είναι η συνηθέστερη τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πτητικών ενώσεων, όμως δεν είναι ικανή να ταυτοποιήσει και να ποσοτικοποιήσει τα επιμέρους συστατικά των δειγμάτων. Γι' αυτό ο αέριος Χρωματογράφος συζευγνύεται με εύκολο τρόπο με το Φασματόμετρο μάζας, το οποίο μπορεί να δώσει στους ερευνητές περαιτέρω πληροφορίες⁷⁶. Η σύζευξη των δύο μηχανημάτων (GC-MS) γίνεται όταν η ατμοσφαιρική παραγωγή πίεσης στον αέριο Χρωματογράφο μειωθεί στο κενό 10-5 10-6 torr.

Μικρή ποσότητα δείγματος χρειάζεται να εγχυθεί στο μηχανήμα μέσα από ένα διάφραγμα (septum), που επιτρέπει την εύκολη εισαγωγή υγρών ή στερεών διαλυμάτων, τα οποία με τη βοήθεια αερίων μεταφέρονται στην πηγή ιονισμού. Η πηγή αυτή, μέσω της συνηθέστερης τεχνικής ιονισμού EI, επιφέρει τον ιονισμό των μορίων της προς ανάλυση ένωσης, αφού πρώτα αυτή ατμοποιηθεί ύστερα από αύξηση της θερμοκρασίας (της πηγής ιονισμού) και δημιουργίας κενού. Τα μόρια προσελκύονται ή αποκρούονται από κατάλληλα μαγνητικά ή ηλεκτρικά πεδία που δημιουργούνται. Τέλος, ο ιονισμός ολοκληρώνεται με την επίδραση μιας δέσμης ηλεκτρονίων 70eV, η οποία δημιουργεί και θραύση, παράγοντας σχεδόν αποκλειστικά χαρακτηριστικά θετικά ιόντα για κάθε ένωση. Αυτά οδηγούνται σε ειδικό ανιχνευτή και αναλύονται σε σύστημα δεδομένων⁷⁶. Εκτός από τον ιονισμό EI που αναλύθηκε, υπάρχουν και άλλοι τύποι, όπως είναι ο χημικός ιονισμός (CI), ο αρνητικός χημικός ιονισμός (NCI) και ο γρήγορος βομβαρδισμός των ατόμων (FAB).

ο8Ϊ

⁷⁷ Harold et. al, 1997

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 9) περιγράφεται η συνδεσμολογία ενός Φασματομέτρου μάζας:



ΕΙΚΟΝΑ 9: ΣΥΣΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΑΣ (MS)

Γενικά, η σύζευξη των δύο μεθόδων GC-MS συνδυάζει τόσο τα πλεονεκτήματα της αέριας Χρωματογραφίας, όσο και τα πλεονεκτήματα της Φασματομετρίας μαζών. Πιο συγκεκριμένα, παρέχει υψηλής απόδοσης διαχωρισμό σε λίγο χρόνο με ταυτόχρονη λήψη αποτελεσμάτων που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των επιμέρους συστατικών των προς ανάλυση δειγμάτων. Όσο αυξάνεται η τιμή του απλού μηχανήματος (50.000 ευρώ-90.000), τόσο αυξάνεται και το εύρος μαζών των συστατικών που ανιχνεύονται, το οποίο ξεκινά από 10-600 Daltons και μπορεί να καταλήξει στην ανίχνευση συστατικών με μάζα 1000 Daltons.

Παρόλο που το μηχάνημα αυτό μπορεί να παρέχει πολύ χρήσιμα αποτελέσματα για τους επιστήμονες, υπάρχουν ελάχιστα στην Ελλάδα, τόσο λόγω της έλλειψης εξειδικευμένου προσωπικού για το χειρισμό του, όσο και λόγω του υπέρογκου κόστους αγοράς του.

2.2 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ- ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑ

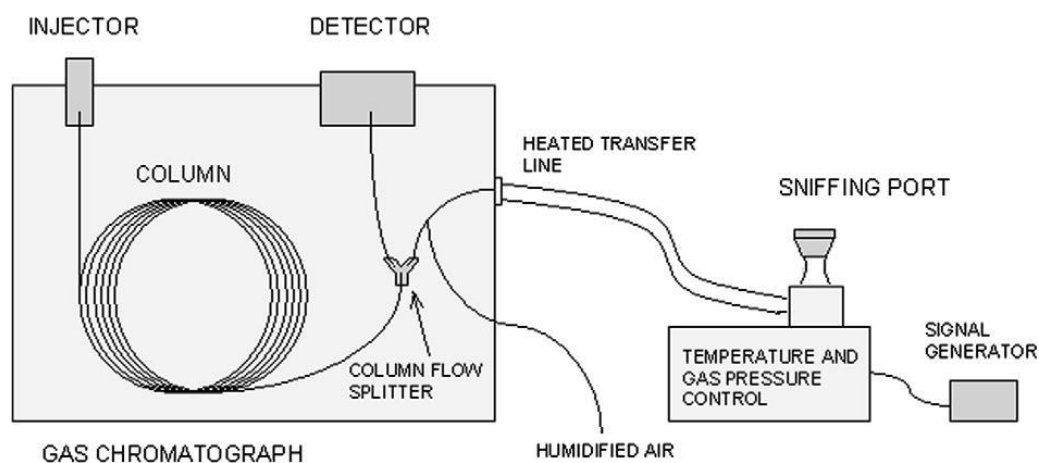
Όπως αναλύθηκε και στην ενότητα 1 της παρούσας διατριβής, ο καθορισμός του αρωματικού προφίλ των παραγόμενων οίνων εξαρτάται από την ύπαρξη πτητικών ενώσεων, που προέρχονται τόσο από το σταφύλι όσο και από την αλκοολική ζύμωση των σταφυλιών. Οι πτητικές αυτές ενώσεις χαρακτηρίζονται από διαφορετική πολικότητα και πτητικότητα και υπάρχουν στους οίνους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Τις τελευταίες δεκαετίες αυξάνονται συνεχώς οι έρευνες που σχετίζονται με την επίδραση των πτητικών ενώσεων που αναφέρθηκαν (χημική σύσταση, συγκέντρωση) στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, με τη χρήση αέριας Χρωματογραφίας σε συνδυασμό με Ολφακτομετρική ανίχνευση. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός μεθόδων έχει ως στόχο τον προσδιορισμό των ενεργών αρωματικών ουσιών μέσω οργανοληπτικής αξιολόγησής τους από εξειδικευμένους ερευνητές, όταν αυτές εξέρχονται από τη Χρωματογραφική στήλη. Κάθε εξερχόμενη ουσία μπορεί να αναλυθεί τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά, με σκοπό τη λήψη ασφαλέστερων αποτελεσμάτων για το αν η συγκεκριμένη ένωση είναι οργανοληπτικά ενεργή στη συγκέντρωση που βρίσκεται στο δείγμα, για το χρόνο που διατηρείται αλλά και την ένταση του αρώματος/οσμής που έχει. Όλα αυτά επιτυγχάνονται μέσω του ολφακτομετρικού διαύλου, που βρίσκεται παράλληλα συνδεδεμένος με τους ανιχνευτές. Αυτοί οι ανιχνευτές μπορεί να είναι είτε φλόγας ιονισμού (FID), είτε φασματοσκοπίας μάζας (Ms), είτε συνδυασμός και των δύο. Στα πειράματα που έγιναν για την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής ιονισμού φλόγας.

Το έκλουσμα φτάνει στον ολφακτομετρικό διάυλο μέσω μιας θερμαινόμενης γραμμής μεταφοράς και στον ερευνητή μέσω ενός PTFE κώνου, που έχει το σχήμα της ανθρώπινης μύτης. Η γραμμή μεταφοράς θερμαίνεται για να αποφευχθεί η συμπύκνωση ημιπτητικών ουσιών στα τείχη του σωλήνα που ενώνει τον διάυλο με τον ανιχνευτή φλόγας ιονισμού. Για να μην ξηρανθούν τα οσφρητικά κύτταρα της ρινικής κοιλότητας των εξειδικευμένων ερευνητών χρησιμοποιείται βοηθητικό αέριο-υγρός αέρας-, η χρήση του οποίου είναι επιτακτική ιδιαίτερα για χρονοβόρες αναλύσεις. Τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα εξάγονται όταν γίνεται ταυτόχρονη

αξιολόγηση των δειγμάτων από περισσότερους του ενός ερευνητές⁷⁸.

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα10) φαίνεται η συνδεσμολογία ενός συστήματος αποτελούμενου από αέριο Χρωματογράφο και Ολφακτόμετρο⁷⁹:



ΕΙΚΟΝΑ 10: ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΕΡΙΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ-ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΟΥ

Γενικά τα δείγματα των οποίων τα αρωματικά πτητικά συστατικά πρέπει να αναλυθούν, χρειάζονται κάποια στάδια επεξεργασίας πριν μελετηθούν με αέρια Χρωματογραφία - Ολφακτομετρία. Αρχικά σε πρώτο στάδιο απομονώνονται οι πτητικές ενώσεις -διαδικασία καθοριστική- με την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου απομόνωσης να είναι η πιο δύσκολη, αφού μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση διαφορετικών μεθόδων επηρεάζει τόσο τη σύσταση, όσο και τη συγκέντρωση των προς ανάλυση συστατικών⁸⁰. Μέθοδοι όπως υγρή εκχύλιση ή απόσταξη δεν είναι αντιπροσωπευτικές στη λήψη προϊόντων που έχουν πάντα την οσμή που συναντάται στο αρχικό δείγμα, όταν αυτό δοκιμαστεί πριν την επεξεργασία.

Παράλληλα, σημαντικό κομμάτι της ανάλυσης των δειγμάτων είναι ότι μόνο ένα μέρος των πτητικών ενώσεων συνεισφέρουν στον καθορισμό του αρωματικού προφίλ των οίνων και η σύνθεση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων τους μεταβάλλεται

ο8Ϊ

⁷⁸ Debonneville et. al, 2002

⁷⁹ Gc-Sciences- system- setup/www.google.gr

⁸⁰ Bonino et. al, 2003

ανάλογα με τη διαλυτότητα και τις ιδιότητες του μέσου, πχ. τη συγκέντρωση σακχάρων. Συνεπώς είναι προτιμότερο για τη λήψη περισσότερων αξιόπιστων αποτελεσμάτων να επιλέγονται μέθοδοι ανάλυσης που επικεντρώνονται στον καθορισμό της συγκέντρωσης των πτητικών συστατικών που απελευθερώνονται στον οίνο και όχι στον υπολογισμό της ολικής συγκέντρωσης αυτών⁸¹.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη των παραπάνω στόχων θα αναλυθούν στη συνέχεια. Γενικά αποτελούνται από τη στατική μέθοδο (static) και τη δυναμική (dynamic) head space ανάλυση, με την τελευταία να χρησιμοποιείται συχνότερα. Η στατική μέθοδος χρησιμοποιείται πιο σπάνια, καθώς με τη χρήση της υπάρχει πιθανότητα το δείγμα να εμπλουτιστεί σε ενώσεις που επηρεάζουν την ανάλυση των δειγμάτων⁸².

2.2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μέθοδοι εκχύλισης σε διαλύτη

Οι μέθοδοι που βασίζονται σε εκχύλιση σε διαλύτη είναι συνήθως χρονοβόρες και αποτελούνται από πολλά στάδια, στοιχείο που οφείλεται στο ότι το δείγμα ξεπλένεται με υδατικά διαλύματα μεταβαλλόμενου pH, για να απομακρυνθούν τα οξέα και οι μη πτητικές ενώσεις. Όμως κάποιες φορές η απομάκρυνση των μη πτητικών ενώσεων δε γίνεται σωστά, με τελικό αποτέλεσμα την ανεπαρκή εκχύλιση του δείγματος. Οι συγκεκριμένες ενώσεις δεν πρέπει να υπάρχουν στο προς ανάλυση δείγμα, διότι υπάρχει περίπτωση η χρωματογραφική στήλη να μολυνθεί και να ληφθούν λανθασμένα αποτελέσματα. Παράλληλα τα λιπαρά οξέα χαρακτηρίζονται από έντονη οσμή μεγάλης διάρκειας, στοιχείο που μπορεί να επικαλύψει ενώσεις που ακολουθούν την έκλουσή τους⁸³.

Η χρήση προσροφητικών ρητινών, που μπορούν να εκχυλιστούν με τους διαλύτες, είναι μία αποτελεσματική μέθοδος εκχύλισης αρωματικών ενώσεων και μπορεί να λύσει κάποια προβλήματα που σχετίζονται με τη χαμηλή επιλεκτικότητα

◦§Ï

⁸¹ Plutowska & Wardencki, 2007

⁸² Pollien et. al, 1997

⁸³ Ferreire et al, 1998

των διαλυτών στα συστατικά των αλκοολούχων δειγμάτων. Οι κύριοι τύποι ρητινών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι οι τύπου XAD, οι οποίες έχουν χαμηλή εκλεκτικότητα και μεγάλη αποτελεσματικότητα στη μελέτη πολικών ενώσεων⁸⁴. Η εκχύλιση με στερεά προσροφητικά μπορεί να γίνει ανακινώντας το δείγμα με προσροφητικά τεμαχίδια, ή -πιο εύκολα- χρησιμοποιώντας στήλες SPE ή γυάλινες⁸⁵. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει αρκετά πλεονεκτήματα, που όμως είναι λιγότερα από αυτά που παρέχει στους ερευνητές η δυναμική head space τεχνική, με την οποία λαμβάνονται τόσο απλούστερα, όσο και πιο ευκρινή ολφακτογραφήματα των οίνων αλλά και γενικά των αλκοολούχων ποτών⁸⁶.

Η συμβατική εκχύλιση γίνεται με τη χρήση απόσταξης, όπου το δείγμα που αποστάζεται παραλαμβάνεται πλήρως ή μερικώς απαλλαγμένο από το διαλύτη. Αυτό παρατείνει το χρόνο επεξεργασίας που απαιτείται και εμφανίζει αυξημένο ρίσκο απώλειας των πτητικών ενώσεων, λόγω εμφάνισης οξειδωτικών διεργασιών. Αυτές είναι αδύνατον να αποφευχθούν, αφού κατά την προετοιμασία των δειγμάτων αυτά έρχονται σε επαφή με το Οξυγόνο της ατμόσφαιρας. Γι' αυτό το λόγο, μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση αντιοξειδωτικών (όπως το 2-tert-Βούτυλο-4-Μεθοξυφαινόλη, ΒΗΑ) είναι απαραίτητη, αφού χωρίς αυτά μπορεί να μεταβληθούν οι ενώσεις, όπως οι ανώτερες Αλκοόλες, τα Αμινοξέα, τα Τερπένια, οι Εστέρες και κάποιες Λακτόνες⁸⁷.

Μέθοδοι Head space

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι Head space βασίζονται στη χρήση τόσο παγίδων απορρόφησης με πορώδη πολυμερή (όπως το Tenax TA και Porapak Q), όσο και ρητινών όπως η Lichrolut EN⁸⁶. Όσον αφορά την πρώτη μέθοδο, οι ενώσεις παραλαμβάνονται μέσω θερμικής εκρόφησης ή έκλουσης διαλύτη⁸⁸. Πλεονέκτημα της μεθόδου που βασίζεται στη χρήση παγίδων απορρόφησης με πορώδη πολυμερή είναι ότι τα τελευταία -και ιδιαίτερος το Porapak Q- αιχμαλωτίζει μικρές ποσότητες αιθανόλης, στοιχείο που μειώνει τόσο την πιθανότητα ύπαρξης διάτρησης της παγίδας, όσο και το πλάτος της κορυφής του διαλύτη που εμφανίζεται

ο8Ϊ

⁸⁴ Aznar et. al, 2001

⁸⁵ Cullere et. al, 2004

⁸⁶ Campo et. al, 2005

⁸⁷ Escudero et. al, 1999

⁸⁸ Garruti et. al, 2006

στο χρωματογράφημα.

Γενικά, με τη χρήση των μεθόδων Head space δεν παρατηρούνται απώλειες των περισσότερων πτητικών ουσιών, που καθορίζουν το άρωμα των οίνων, αντίθετα με τη χρήση παραδοσιακών μεθόδων, όπου η απώλεια είναι συχνό φαινόμενο. Παράλληλα η χρήση τους επιτρέπει τη χρωματογραφική ανάλυση των συγκεκριμένων ενώσεων, διαδικασία αρκετά δύσκολη με τη χρήση των μεθόδων εκχύλισης σε διαλύτη, λόγω του ότι ο διαλύτης που χρησιμοποιείται εμφανίζει κορυφή στο χρωματογράφημα⁸⁹.

Μικροεκχύλιση σταθερής φάσης (SPME)

Η μικροεκχύλιση σταθερής φάσης, χρησιμοποιείται ευρέως σε αναλύσεις Head space, απλοποιώντας αρκετά τη διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων. Αρχικά την καθιστά γρηγορότερη, επιτρέποντας τόσο την απευθείας αραίωση των δειγμάτων (αντί της αραίωσης των εκχυλισμάτων), όσο και την απάλειψη της προετοιμασίας τους⁹⁰. Η απλότητα αυτή έγκειται στο ότι η SPME δίνει στους επιστήμονες τη δυνατότητα χρήσης στηλών εκχύλισης σταθερής φάσης με διαφορετικό πάχος και μήκος, αντί να λαμβάνουν χώρα διαδοχικές αραιώσεις στα δείγματα. Για παράδειγμα η χρήση στηλών διαφορετικού μήκους μπορεί να κάνει δυνατή την αραίωση των δειγμάτων έως και 50 φορές⁹¹. Η τεχνική αυτή μπορεί να έχει αρκετά πλεονεκτήματα, έχει όμως και μειονεκτήματα, με τη μειωμένη διαθεσιμότητα στηλών εκχύλισης στο εμπόριο να είναι το βασικότερο από αυτά.

Καθώς μεταβάλλεται το είδος των στηλών που χρησιμοποιούνται, η θερμοκρασία, ο χρόνος εκχύλισης και ο όγκος του δείγματος που θα αναλυθεί, αλλάζει τόσο η ποσοτική όσο και η ποιοτική σύνθεσή του⁹⁰. Μελέτες που έχουν γίνει πάνω στο συγκεκριμένο θέμα έχουν αποδείξει ότι τις περισσότερες φορές η χρήση μίας στήλης 2cm με Διβινυλοβενζένιο-carboxen- Πολυδιμεθυλοοκτάνιο (DBV-CAR-PDMS) έχει ικανοποιητική απόδοση για το μεγαλύτερο ποσοστό των αρωματικών ενώσεων που προέρχονται από αλκοολούχα ποτά.

◦8Ï

⁸⁹ Grosch, 2001

⁹⁰ Fan et. al, 2005

⁹¹ Deibler et. al, 1999

Κλασματοποίηση εκχυλισμάτων

Τα δείγματα που πρέπει να αναλυθούν αρκετές φορές χαρακτηρίζονται από πολύπλοκη ποσοτική σύνθεση, γι' αυτό και η κλασματοποίησή τους είναι αρκετά χρήσιμη⁹², επιτρέποντας αρκετές φορές τον προσδιορισμό αρωματικών ενώσεων που βρίσκονται σε απειροελάχιστες ποσότητες σε ένα δείγμα. Για παράδειγμα, αποτελέσματα που λήφθηκαν από την κλασματοποίηση του κινέζικου αλκοολούχου ποτού Yanghe Daqu, έδειξαν ότι μπόρεσαν να αναγνωριστούν περισσότερες από 70 ενεργές αρωματικές ενώσεις⁹³, με τη δημιουργία τόσο όξινων όσο και αλκαλικών κλασμάτων και την εξαγωγή σε διαλύτη Freon 11. Πιο συγκεκριμένα, τα ουδέτερα προς αλκαλικά κλάσματα πάρθηκαν από την εκχύλιση του απομονωμένου Freon σε νερό σε υψηλό pH, ενώ τα όξινα κλάσματα πάρθηκαν μετά από την εκχύλιση σε διαιθυλαιθέρα σε χαμηλό pH. Περαιτέρω κλασματοποίηση χρησιμοποιήθηκε για τα ουδέτερα- αλκαλικά κλάσματα, λόγω της πολυπλοκότητας της σύνθεσής τους. Παρόμοια μέθοδος εφαρμόστηκε και σε ερυθρούς νέους οίνους από σταφύλια Pinot Noir⁸³.

Η χρωματογραφική κλασματοποίηση μπορεί να λάβει χώρα και με τη χρήση λειτουργίας ανεστραμμένης φάσης, με το Νερό και την Αιθανόλη να αποτελούν την κινητή φάση. Όμως η συγκεκριμένη μέθοδος έχει κάποια αρνητικά στοιχεία, όπως το ότι απαγορεύει τη χρήση τοξικών και ενεργών αρωματικά διαλυτών, καθιστά αδύνατο τον επιπρόσθετο αναλυτικό εμπλουτισμό, ενισχύοντας έτσι την ανάγκη επιπρόσθετης εκχύλισης των κλασμάτων σε διαλύτη⁸⁴. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε μελέτη οίνων τόσο της ποικιλίας Chardonnay, όσο και σε ισπανικούς οίνους Rioja. Στην πρώτη περίπτωση συνολικά αποκτήθηκαν 15 κλάσματα και προσδιορίστηκαν παραπάνω από 70 ενεργές πτητικές αρωματικές ενώσεις, που συνεισέφεραν στον καθορισμό του αρωματικού προφίλ τους⁹⁴, ενώ στη δεύτερη περίπτωση αποκτήθηκαν συνολικά 50 κλάσματα και προσδιορίστηκαν παραπάνω από 50 τέτοιες ενώσεις⁸⁴.

◦8Ï

⁹² Lee et. al, 2003

⁹³ Fan et. al, 2006a, 2006b

⁹⁴ Lopez et. al, 1999

Εκλεκτικές μέθοδοι εκχύλισης

Οι Εκλεκτικές μέθοδοι εκχύλισης χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της ποσότητας συγκεκριμένων ενώσεων⁹⁵. Για παράδειγμα, για τη μελέτη του αρωματικού προφίλ ερυθρών οίνων από το Bordeaux χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμένες μέθοδοι α) απόσταξης υπό κενό και β) επιλεκτικής παγίδευσης Θειολών, που επιτεύχθηκε μέσω αντίδρασης με τη χρήση π-ύδροξυ-υδραργυροβενζοϊκού οξέος (p-HMB). Έτσι καθορίστηκε το αρωματικό προφίλ των γαλλικών αυτών οίνων μόνο με την ανάλυση ενώσεων που περιέχουν Θείο⁹⁶, χωρίς την ύπαρξη - παρουσία άλλων αρωματικών ενώσεων ή πολυφαινόλων.

Συνεπώς, όπως επιλέγεται η παραπάνω εκλεκτική μέθοδος, έτσι επιλέγεται και η αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με την Ολφακτομετρία, με σκοπό την ανάλυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων ενώσεων που ερευνούν οι επιστήμονες.

Επιλογή κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης

Όπως προειπώθηκε, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εκχύλισης που έχει επιλεγεί και η αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος επιβεβαιώνονται μέσω της σύγκρισης οργανοληπτικού ελέγχου τόσο στο αρχικό δείγμα του αλκοολούχου ποτού, όσο και στα εκχυλίσματα που προκύπτουν⁹⁷. Για παράδειγμα, σύγκριση οργανοληπτικού ελέγχου που έγινε σε δείγμα μπύρας Lager και σε αρχικά εκχυλίσματα που πάρθηκαν με τη χρήση διαφορετικών διαλυτών, όπως εξάνιο, διαιθυλαιθέρας, οξικός αιθυλεστέρας και διχλωρομεθάνιο, έδειξαν ότι τα οργανοληπτικά αποτελέσματα των εκχυλισμάτων με διχλωρομεθάνιο ήταν πιο κοντά στο αρχικό δείγμα⁹⁸. Όμοιες μελέτες σε δείγματα Champagne, που εκχυλίστηκαν με διχλωρομεθάνιο, αιθανόλη και με προσρόφηση με χρήση XAD ρητινών, έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα που πάρθηκαν με χρήση αιθανόλης είχαν περισσότερες ομοιότητες στο οργανοληπτικό προφίλ τους σε σχέση με το αρχικό δείγμα⁹⁹.

Δυστυχώς, η σύγκριση οργανοληπτικών αναλύσεων δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί διαλύτες με έντονο άρωμα ή όταν έχει εφαρμοστεί μέθοδος head space, συμπεριλαμβανομένης και της SPME μεθόδου. Στην SPME η σύγκριση είναι δύσκολη, αφού τα εκχυλίσματα διαφέρουν ποσοτικά και

ο8Ϊ

⁹⁵ Fretz et al, 2005

⁹⁶ Bouchilloux et. al, 1998

⁹⁷ Ferreira et. al, 2003

⁹⁸ Soares de Costa et. al, 2004

⁹⁹ Priser et. al, 1997

ποιοτικά, ανάλογα με τη στήλη που έχει χρησιμοποιηθεί.

Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των εκχυλισμάτων

Ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την ποιότητα των εκχυλισμάτων είναι η τεχνική εκχύλισης που επιλέγεται από τους ερευνητές, καθώς η επιλογή της έχει αντίκτυπο στο είδος των ενώσεων που θα απομονωθούν, άρα και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων. Παράλληλα, αρκετά σημαντικός παράγοντας είναι η αποθήκευση, η οποία πρέπει να γίνεται τόσο σε ατμόσφαιρα CO₂, όσο και σε χαμηλή θερμοκρασία, με σκοπό την αποφυγή τυχόν οξείδωσης των εκχυλισμάτων, που μπορεί να καταστήσει τα δείγματα μη αντιπροσωπευτικά¹⁰⁰. Αυτό μπορεί να συμβεί και από το συνεχές άνοιγμα των φιαλιδίων αποθήκευσης των δειγμάτων, στοιχείο που καθιστά επιτακτική την ανάγκη διαμοιρασμού του εκχυλίσματος σε μικρότερες ποσότητες και την αποθήκευσή τους σε αρκετά φιαλίδια.

Τέλος, σημαντική είναι η επίδραση που έχουν οι ερευνητές στην ανάλυση των δειγμάτων. Συνεπώς, για να μειωθούν τυχόν αποκλίσεις θα πρέπει να καταγράφουν συνεχώς τις συνθήκες ανάλυσης του κάθε εκχυλίσματος, τη σειρά κατά την οποία αναλύεται, όπως και να χρησιμοποιούν την ίδια κλίμακα περιγραφής των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων¹⁰¹.

2.2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Όσον αφορά τις συνθήκες ανίχνευσης, το πιο σημαντικό στην αέρια Χρωματογραφία- Ολφακτομετρία είναι ότι το ρόλο του ανιχνευτή τον έχει η ανθρώπινη μύτη, στοιχείο που μπορεί να έχει και αρνητικές συνέπειες στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Συνεπώς ο χώρος που λαμβάνει χώρα η μέθοδος πρέπει να είναι απαλλαγμένος από οσμές - ήχους και να έχει τόσο σταθερή Θερμοκρασία όσο και Πίεση.

Ο αναλυτής θα πρέπει να είναι πολύ συγκεντρωμένος κατά την εξέταση, αφού πρέπει να ανιχνεύσει ποικιλία αρωμάτων/οσμών που διαρκούν ελάχιστα μόνο

◦§Ï

¹⁰⁰ Bernet et. al, 2002

¹⁰¹ Delahunty et. al, 2006

δευτερόλεπτα. Με βάση αυτό είναι λογικό ότι μπορεί να συμβούν λάθη, τα οποία σχετίζονται με την ικανότητα του ερευνητή να μπορεί να ανακαλεί αρώματα/οσμές που έχει μυρίσει στο παρελθόν αλλά και να μπορεί να συγκεντρωθεί και να τα μυρίσει όλα. Οι πιθανότητες λάθους μπορεί να μειωθούν όταν ο κάθε αναλυτής εξετάσει τα δείγματα περισσότερες από δύο φορές σε τυχαία σειρά.

Παράλληλα, για να εξαλειφθούν λάθη που σχετίζονται με την κόπωση των ερευνητών κατά την ανάλυση δειγμάτων που διαρκεί περισσότερο από 25 λεπτά, ορθή είναι η διάσπαση της ανάλυσης σε δύο τμήματα, με τη συνεργασία δύο ερευνητών, οι οποίοι αλλάζουν θέση σε κάθε τμήμα ¹⁰⁰. Ακόμα, μελέτες έχουν δείξει ότι η οργανοληπτική ευαισθησία μειώνεται με τη χρήση βοηθητικού αερίου στη γραμμή του ολφακτομετρικού διαύλου, δημιουργώντας διαφορά στο χρόνο ανίχνευσης των αρωμάτων/οσμών από τον ανιχνευτή. Έτσι χρειάζεται αρκετή προσοχή κατά τη χρήση του ¹⁰². Όλα τα παραπάνω πρέπει να ληφθούν υπόψη και να εφαρμοστούν από τους επιστήμονες, ιδιαίτερα όταν αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων που περιέχουν ποικιλία ενώσεων, όπως είναι ο οίνος και γενικά όλα τα αλκοολούχα ποτά.

Όσον αφορά τις συνθήκες ανάλυσης, καθοριστική είναι η επιλογή των κατάλληλων χρωματογραφικών χαρακτηριστικών. Πιο συγκεκριμένα, σημαντικός είναι ο καθορισμός της Θερμοκρασίας, της μεθόδου έγχυσης και της επιλογής της σταθερής φάσης, με την τελευταία να πρέπει χαρακτηρίζεται από υψηλή επιλεκτικότητα και διαχωριστική ικανότητα, με σκοπό τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Παράλληλα, ανάλογα με το είδος του προς ανάλυση δείγματος, δηλαδή ανάλογα με την πολυπλοκότητα των αρωματικών ενώσεων που πρέπει να αναλυθούν ή με την ύπαρξη ισομερών, ορθή θα ήταν η χρήση χρωματογραφίας δύο διαστάσεων ή χειρικής (chiral) χρωματογραφίας, για να επιτευχθεί η μέγιστη επιλεκτικότητα και καλύτερος διαχωρισμός ¹⁰³.

2.2.3 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ- ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑΣ

◉8Ï

¹⁰² Hanaoka et. al, 2000

¹⁰³ Wanikawa et. al, 2002

Οι περισσότερες αναλύσεις που έχουν διεξαχθεί με τη χρήση της GC-O είχαν στόχο τον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων στο προς ανάλυση δείγμα και τη μελέτη της συμμετοχής τους στον καθορισμό του αρωματικού προφίλ των δειγμάτων. Τέτοιες έρευνες έχουν γίνει σε διάφορα αλκοολούχα ποτά, όπως μπίρες⁹⁸, οίνους (Pinot Noir¹⁰⁴, Rhine Riesling¹⁰⁵, Turkish Kalecik Karasu¹⁰⁶), whisky¹⁰³, κονιάκ¹⁰⁷ και τεκίλα¹⁰⁸. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μετά από την ανάλυση των δειγμάτων εκφράζονται με περιγραφικούς όρους που αναφέρονται στο άρωμα ή τις οσμές που μύρισε ο ερευνητής και κάθε άρωμα αντιστοιχεί σε μία κορυφή του ολφακτογραφήματος που εξάγεται ⁸⁶.

Απαραίτητο στοιχείο που πρέπει να γίνει γνωστό είναι ότι υπάρχει περίπτωση τα αρώματα/ οσμές να μην αντιστοιχούν σε καμία κορυφή. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το ότι οι ενώσεις που τις δημιουργούν μπορεί να βρίσκονται σε απειροελάχιστη ποσότητα στο δείγμα, καθιστώντας δύσκολη την ανίχνευσή τους από τους κοινούς ανιχνευτές FID, Ms⁸³ και ενισχύοντας την αντίληψη περί μεγαλύτερης ευαισθησίας της ανθρώπινης μύτης. Σημαντική λύση στην αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος, που αφορά τη δυσκολία ανίχνευσης ενώσεων απειροελάχιστης συγκέντρωσης από τους κοινούς ανιχνευτές, είναι η κρυοπαγίδευση του εκλούσματος σε μία άδεια ανενεργή στήλη, με τη χρήση υγρού αζώτου ως φορέα ψύξης ¹⁰⁹. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει αναλυθεί σε μύρα και βασίζεται στη χρήση ενός διαχωριστή (splitter). Αυτός διαχωρίζει το ρεύμα έκλουσης, επιτρέποντας την αλλαγή της ροής ηλεκτρονικά στην παγίδα σε ένα επιλεγμένο εύρος χρόνων κατακράτησης, που γίνεται με σκοπό τον επιλεκτικό εμπλουτισμό των μη ταυτοποιημένων ενώσεων, υπεύθυνων για την ανεπιθύμητη οσμή καπνού που δημιουργείται κατά την ωρίμανση της μύρας.

Παράλληλα, όσον αφορά τη χρήση της GC-O στους οίνους, αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ταυτοποίηση ενώσεων που σχετίζονται με τη χρήση χαμηλής ποιότητας πρώτων υλών (οινοποίηση μουχλιασμένων σταφυλιών) ή με την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Η ανάπτυξη της μούχλας δημιουργεί

ο8Ϊ

¹⁰⁴ Fang et. al, 2005

¹⁰⁵ Komes et. al, 2006

¹⁰⁶ Selli et. al, 2004

¹⁰⁷ Ferrari et. al, 2004

¹⁰⁸ Benn et. al, 1996

¹⁰⁹ Callemien et. al, 2006

ανεπιθύμητες οσμές χρώματος και μπαγιατίτικου ¹¹⁰, που προκαλούνται από ενώσεις με πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης, όπως είναι η Γεωσμίνη και η 1-οκτεν-3-όνη κα¹¹⁰. Έτσι η αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με την Ολφακτομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αυτών των ενώσεων, τόσο στα πρώτα στάδια εμφάνισής τους στην πρώτη ύλη, όσο και κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ή σε ήδη έτοιμους οίνους, δίνοντας χρήσιμα στοιχεία για την οργανοληπτική ποιότητα των δειγμάτων ¹¹¹.

Επιπρόσθετα, άλλη εφαρμογή της GC-O στους οίνους είναι ο καθορισμός των πτητικών ενώσεων που παράγονται ύστερα από το κάψιμο των δουγιών. Οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν την ποιότητα των παραγόμενων οίνων (αφού εκχυλίζονται σε αυτούς) τόσο θετικά όσο και αρνητικά. Γι' αυτό το λόγο είναι σημαντική η μελέτη τους, με τελικό σκοπό τη συσχέτιση των συνθηκών κατασκευής των βαρελιών με την οργανοληπτική ποιότητα των οίνων ¹¹².

Ακόμα μία σημαντική εφαρμογή της μεθόδου που περιγράφεται είναι η μελέτη ενώσεων υπεύθυνων για την επίγευση οίνων της ποικιλίας Chardonnay. Για τη λήψη των αποτελεσμάτων ως τεχνική εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν μπάρες ανάδευσης επικαλυμμένες με πολυδιμεθυλοεξάνιο, οι οποίες απορρόφησαν τις ενώσεις που ενδιέφεραν τους ερευνητές. Πιο συγκεκριμένα, οι ράβδοι ήταν κλεισμένες σε γυαλί ενώ στη στοματική κοιλότητα των ερευνητών, που προηγουμένως είχαν διεξάγει οργανοληπτικό έλεγχο, είχαν τοποθετηθεί διάτρητες κάψουλες ¹¹³. Στην συνέχεια τα εκχυλίσματα λήφθηκαν με τη χρήση διχλωρομεθανίου και απόσταξης σε κενό και αναλύθηκαν. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι όλες οι ενώσεις που συμμετέχουν στον καθορισμό του αρωματικού προφίλ του Chardonnay, εκτός από τις περισσότερο πολικές που αντιδρούν με το σάλιο, είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία της επίγευσης.

◦8Ï

¹¹⁰ Darriet et. al, 2002

¹¹¹ Guerche et. al, 2006

¹¹² Cutzach et. al, 1997

¹¹³ Buettner et. al, 2004

2.3 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕΤΡΙΑΣ ΠΙΕΣΗΣ (MPLC)

Η υγρή Χρωματογραφία μέτριας Πίεσης πρωτοπαρουσιάστηκε το 1970 και αποτελεί μία από τις πολλές τεχνικές διαχωρισμού. Αυτή λειτουργεί με τη χρήση Χρωματογραφικών στηλών και, λόγω της πίεσης που ασκείται, η στατική φάση μπορεί να αποτελείται από σωματίδια μικρού μεγέθους, στοιχείο που ενισχύει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η Mplc επιτρέπει τον καθαρισμό/διαχωρισμό ενώσεων που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο προς ανάλυση δείγμα, σε λιγότερο χρόνο και με περισσότερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με άλλες μεθόδους διαχωρισμού, όπως είναι η Χρωματογραφία ανοικτής στήλης (open column chromatography), η Flash Χρωματογραφία ή η χαμηλής Πίεσης υγρή Χρωματογραφία (LPLC). Όμως συχνά συναντάται ο συνδυασμός χρήσης αυτών των μεθόδων ή και της Υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας (Hplc) με τη μέθοδο που αναλύεται, με σκοπό τη λήψη εγκυρότερων αποτελεσμάτων.

Τέλος, σήμερα η χρήση της Mplc έχει αυξηθεί τόσο λόγω της αποτελεσματικότητάς της και του γρήγορου χρόνου ανάλυσης των δειγμάτων, όσο και για το μειωμένο κόστος συντήρησης του οργάνου και την ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της στατικής φάσης και των στηλών ¹¹⁴.

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 7) αναφέρονται κάποιες τεχνικές διαχωρισμού με τη χρήση στηλών με τα χαρακτηριστικά τους ¹¹⁵:

Τεχνική	Μέγεθος σωματιδίων στατικής φάσης (μm)	Πίεση (bar)	Ροή (mL.min ⁻¹)	Ποσότητα δείγματος (g)
Χρωματογραφία ανοικτής στήλης	63-200	Ατμοσφαιρική	1-5	0.01-100
Flash Χρωματογραφία	40-63	1-2	2-10	0.01-100

ο8Ï

¹¹⁴ Verzele et. al, 1980

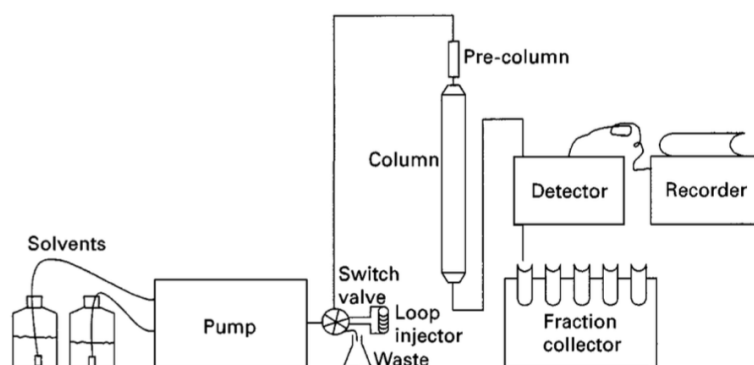
¹¹⁵ Hostettmann & Terreaux, 2000

Χαμηλής Πίεσης υγρή Χρωματογραφία	40-63	1-5	1-4	1-5
Μέτριας Πίεσης υγρή Χρωματογραφία	15-40	5-20	3-16	0.05-100
Hplc	5-30	>20	2-20	0.01-1

2.3.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Τα βασικά στοιχεία του οργάνου που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή της Μέτριας Πίεσης υγρής Χρωματογραφίας είναι μία αντλία μεταφοράς του διαλύτη, ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος, μία στήλη πληρωμένη με στατική φάση και ένα τμήμα συλλογής των διαχωρισμένων ουσιών υπό μορφή κλασμάτων. Πιο συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός των ενώσεων που έχουν αναλυθεί με Mplc μπορεί να γίνει είτε δια χειρός με τη μέθοδο TLC, είτε αυτόματα. Ο αυτόματος διαχωρισμός γίνεται με τη χρήση τόσο ενός ανιχνευτή, όσο και ενός καταγραφέα, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με την έξοδο της στήλης από την οποία περνά το δείγμα με τους διαλύτες και διαχωρίζεται. Στη συνέχεια οι διαχωρισμένες ενώσεις συλλέγονται με τη μορφή κλασμάτων σε ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι βρίσκονται σε στατό, στο τμήμα συλλογής κλασμάτων του οργάνου¹¹⁴.

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 11) περιγράφεται το όργανο που χρησιμοποιείται για τη Μέτριας Πίεσης υγρή Χρωματογραφία¹¹⁵:



ΕΙΚΟΝΑ 11: ΟΡΓΑΝΟ MPLC

Αντλία

Ο Χρωματογραφικός διαχωρισμός δείγματος ποσότητας 0,1-100g σε μερικές ώρες χρειάζεται ταχύτητα τόσο ροής διαλύτη από 5-200ml.min⁻¹, όσο και Πίεση 40bar. Οι τιμές αυτές μπορούν να μεταβληθούν, με την ταχύτητα ροής να αποκτά εύρος 0,5-100 ml.min⁻¹ και Πίεσης μεγαλύτερης των 40bar, με τη χρήση ανταλλάξιμων κεφαλών εμβόλων που παρέχουν οι εταιρίες παραγωγής των αντλιών.

Στις ημέρες μας όλο και περισσότερες εταιρίες παρέχουν στα εργαστήρια κατάλληλες αντλίες για το όργανο της Μέτριας Πίεσης υγρής Χρωματογραφίας, γι' αυτό είναι αρκετά δύσκολη η επιλογή. Αυτή επιτυγχάνεται με τη λεπτομερή εξέταση αρκετών χαρακτηριστικών των αντλιών, με τα βασικότερα από αυτά να είναι το εύρος ταχύτητας ροής του διαλύτη, η ύπαρξη ή η απουσία μηχανισμού σταθεροποίησης αυτής της ροής, η ύπαρξη μηχανισμού απαλοιοφής της Πίεσης αλλά και η ύπαρξη μηχανισμού διατήρησης της ταχύτητας και της Πίεσης κατά το διαχωρισμό^{115,114}.

Στήλη διαχωρισμού

Η στήλη του οργάνου αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα του, καθώς με τη βοήθεια τόσο της κατάλληλης στατικής φάσης που περιέχει, όσο και του κατάλληλου διαλύτη, είναι υπεύθυνη για το βέλτιστο Χρωματογραφικό διαχωρισμό κατάλληλης ποσότητας δείγματος που εισάγεται σε αυτήν. Γι' αυτό η απόφαση του ερευνητή για το είδος της στήλης που πρέπει να επιλεγεί είναι καθοριστική.

Δύο από τα βασικότερα χαρακτηριστικά της στήλης, που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιλογή της, είναι το μήκος και η διάμετρος της. Και τα δύο αυτά χαρακτηριστικά εκφράζονται με βάση τον όγκο του δείγματος που μπορεί να εισαχθεί στη στήλη, ο οποίος ποικίλει από 63ml- 1500 ml. Αυτά τα νούμερα ανταποκρίνονται στις μικρότερες στήλες 9mm x 100mm και στις μεγαλύτερες 105mm x 1760mm αντίστοιχα. Όμως η επιλογή του κατάλληλου μήκους και διαμέτρου από τους ερευνητές εξαρτάται από την ποσότητα του δείγματος που πρέπει να αναλυθεί, η οποία στην επιλογή μικρών στηλών είναι 0,1g, ενώ στις μεγαλύτερες στήλες μπορεί να είναι περισσότερη από 100 g.

Όσον αφορά τη διάμετρο της στήλης που χρησιμοποιείται, καθώς αυτή αυξάνεται αντίστοιχα αυξάνεται και η ποσότητα του δείγματος που μπορεί να αναλυθεί, ενώ παράλληλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στατική φάση αποτελούμενη από μικρότερης διάστασης σωματίδια. Αντίθετα, όσον αφορά το μήκος της στήλης, καθώς αυτό αυξάνεται, αυξάνεται και η διακριτική ικανότητα της ανάλυσης. Το τελευταίο εξαρτάται με γραμμικό τρόπο από το μέγεθος των σωματιδίων που έχει η στατική φάση της στήλης, στοιχείο που έχει μελετηθεί τόσο σε στήλες με ιδανική εσωτερική διάμετρο και διαφορετικό μήκος, όσο και σε στήλες με ίδιο μήκος και διαφορετική διάμετρο. Στην τελευταία περίπτωση παρατηρήθηκε λιγότερη γραμμική αύξηση στη διακριτική ικανότητα της ανάλυσης. Συμπερασματικά, στήλες με μεγαλύτερο μήκος πρέπει να προτιμώνται από τους ερευνητές, καθώς με τη χρήση τους βελτιώνεται ο διαχωρισμός του δείγματος¹¹⁶.

Γενικότερα, οι στήλες που χρησιμοποιούνται στο Mplc είναι φτιαγμένες από παχύ γυαλί, το οποίο εξωτερικά είναι καλυμμένο με προστατευτικό πλαστικό περίβλημα. Αυτό βοηθά τη στήλη να διατηρείται αναλλοίωτη σε πιέσεις μεγαλύτερες των 50bar. Όμως υπάρχουν και κάποιες στήλες, οι οποίες δεν έχουν τόσο μεγάλη αντοχή σε αυξημένες τιμές Πίεσης, όπως αυτές που παραμένουν αναλλοίωτες όταν η Πίεση λαμβάνει χαμηλότερες τιμές, όπως περίπου 20 bar^{115,114}.

Ανιχνευτής- Καταγραφέας σήματος

Η παρακολούθηση του Χρωματογραφικού διαχωρισμού, που λαμβάνει χώρα μετά από την ανάλυση του δείγματος με Μέτριας Πίεσης υγρή Χρωματογραφία, μπορεί να γίνει γρήγορα, είτε με ανάλυση των κλασμάτων με τη μέθοδο TLC, είτε ηλεκτρονικά. Η ηλεκτρονική ανάλυση γίνεται με τη χρήση ανιχνευτών Uv/Vis, οι οποίοι συζευγνύονται με το κυρίως όργανο.

Όμως η χρήση των συγκεκριμένων ανιχνευτών αρκετές φορές, παρουσίαζε προβλήματα, τα οποία σχετιζόνταν με την υπερφόρτωσή τους, λόγω μεγάλης ποσότητας κλασμάτων που εισέρχονταν στο κελί ανίχνευσης. Αυτό το πρόβλημα στις ημέρες μας έχει αντιμετωπιστεί με τη χρήση ειδικών συστημάτων διασποράς, τα οποία συζευγνύονται με τον ανιχνευτή. Αυτά τα συστήματα διασποράς χωρίζουν τη μεγάλη ποσότητα των κλασμάτων, που κανονικά θα οδηγούνταν στο κελί

ο§Ï

¹¹⁶ Zogg et. al, 1989b

ανίχνευσης, σε μικρότερες ποσότητες δειγμάτων. Έτσι ένα μέρος του δείγματος οδηγείται απευθείας από την έξοδο της στήλης στο σύστημα συλλογής κλασμάτων, ενώ ταυτόχρονα η υπόλοιπη ποσότητα οδηγείται στο κελί ανίχνευσης του ανιχνευτή.

Γενικά, οι ανιχνευτές με μήκος διαδρομής μικρότερο από 0,1mm και ρύθμιση του μήκους κύματος σε χαμηλή τιμή (nm) είναι αρκετά χρήσιμοι για το Mplc. Ο ανιχνευτής 80-800 Lc/Un είναι ειδικά σχεδιασμένος για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μεθόδου που αναλύεται στη συγκεκριμένη ενότητα. Μπορεί να λειτουργήσει σε αυξημένες τιμές ροής διαλύτη (μεγαλύτερες από 500 ml.min⁻¹), με το έκλουσμα να οδηγείται σε κελί φτιαγμένο από χαλαζία. Όσον αφορά τον καταγραφέα του σήματος, αυτός συνδέεται με τον ανιχνευτή και είναι υπεύθυνος για την απεικόνιση του Χρωματογραφικού διαχωρισμού στην οθόνη του οργάνου^{114,115}.

Σύστημα συλλογής κλασμάτων

Τα κλάσματα που έχουν διαχωριστεί, συλλέγονται αυτόματα σε ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες στο σύστημα συλλογής κλασμάτων που υπάρχει στο κύριο όργανο της Mplc. Ο όγκος των συλλεγμένων κλασμάτων είναι άρρηκτα συνδεδεμένος τόσο με το μέγεθος και τη διάμετρο της Χρωματογραφικής στήλης που χρησιμοποιείται, όσο και με τη ροή του διαλύτη, η οποία ρυθμίζεται με βάση το χρόνο. Η χωρητικότητα και ο αριθμός των ειδικών δοκιμαστικών σωλήνων, που έχει το Σύστημα συλλογής κλασμάτων, ποικίλει από 240 x 20ml, 48 x 250 ml και 120 x 50ml, με το συνδυασμό των 120 σωλήνων χωρητικότητας 50 ml να είναι ο συνηθέστερος στο όργανο της Μέτριας Πίεσης υγρής Χρωματογραφίας^{114,115}.

2.3.2. ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΤΗΛΩΝ

Η επιλογή της στατικής φάσης αποτελεί ένα κρίσιμο παράγοντα, καθώς επηρεάζει την ποιότητα του Χρωματογραφικού διαχωρισμού. Στις ημέρες μας υπάρχουν διάφοροι τύποι στατικής φάσης στην αγορά, όμως οι επιστήμονες πρέπει να λάβουν αρκετούς παράγοντες υπόψη τους, για να επιλέξουν το υλικό της στατικής φάσης που θα χρησιμοποιήσουν. Τέτοιοι παράγοντες είναι το μέγεθος των σωματιδίων της στατικής φάσης, το μήκος της στήλης, η Πίεση που θα ασκηθεί, ο τύπος του δείγματος και το κόστος.

Όσον αφορά το κόστος της στατικής φάσης, το οικονομικότερο είδος αλλά και αυτό που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι η silica gel (Διοξείδιο του Πυριτίου). Εκτός από τον οικονομικό παράγοντα, η συγκεκριμένη στατική φάση έχει και άλλα πλεονεκτήματα, με βασικότερο το ότι επιτρέπει τη χρήση της πλειοψηφίας των διαλυτών. Υπάρχουν βέβαια και μειονεκτήματα, με το βασικότερο από αυτά να είναι ο κίνδυνος μη αναστρέψιμης προσρόφησης.

Όσον αφορά το μέγεθος των σωματιδίων, υπάρχει ένα μεγάλο εύρος μεγέθους σωματιδίων στατικής φάσης στο εμπόριο, με το μικρότερο μέγεθος να χρησιμοποιείται ευρέως στην HPLC και να λαμβάνει τιμές από 5 έως 10μm. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι βέλτιστοι διαχωρισμοί επιτυγχάνονται με τη χρήση σωματιδίων στατικής φάσης που έχουν μέγεθος περίπου 20 μm. Το μέγεθος των σωματιδίων επηρεάζει και τη διακριτική ικανότητα του οργάνου με τρόπο που μελετάται μέχρι και σήμερα. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι μειώθηκε καθώς το μέγεθός τους άλλαξε από 15 μm σε 30 μm. Τέλος, σήμερα η χρήση τροποποιημένης μορφής silica gel έχει γίνει πιο συνηθισμένη, καθώς εμφανίζει λιγότερο κίνδυνο μη αναστρέψιμης προσρόφησης¹¹⁷.

2.3.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΔΙΑΛΥΤΗ

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη αποτελεί άλλο ένα κρίσιμο σημείο για τη διεξαγωγή της Μέτριας Πίεσης υγρής Χρωματογραφίας. Η ιδανική διαδικασία για αυτήν την επιλογή κανονικά θα έπρεπε να ξεκινήσει από άμεση επιτυχή ανάλυση του δείγματος με τη χρήση διαφόρων διαλυτών και την τελική επιλογή ενός διαλύτη ή συνδυασμό διαλυτών, με τη χρήση των οποίων επιτεύχθηκε σωστός διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Όμως η διαδικασία αυτή δεν προτιμάται σήμερα, αφού για τη διεξαγωγή της δαπανάται αρκετός χρόνος αλλά και αρκετή ποσότητα δείγματος.

Δύο είναι οι βασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα από τους ερευνητές με σκοπό την μελέτη της καταλληλότητας του διαλύτη που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στην υγρή Χρωματογραφία Μέτριας Πίεσης. Αυτές είναι η μελέτη με χρήση Χρωματογραφίας χάρτου (TLC) και η χρήση διαλύτη που χρησιμοποιείται σε επιτυχή διαχωρισμό συστατικών του προς ανάλυση δείγματος με την Υψηλής απόδοσης υγρή Χρωματογραφία (HPLC).

ο§Ϊ

¹¹⁷ Zogg et. al, 1989b

Όσον αφορά τη μελέτη με χρήση Χρωματογραφίας χάρτου, η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει τη γρήγορη απεικόνιση όλων των πιθανών διαλυτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σωστό διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος. Η επιφάνεια του χάρτου που χρησιμοποιείται είναι επιστρωμένη με την ίδια στατική φάση (Διοξειδίο του Πυριτίου) που περιέχουν οι Χρωματογραφικές στήλες της Mplc αλλά σε διπλάσια ποσότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζεται το R_f , δηλαδή η απόσταση που έχει διανύσει η ουσία προς το μέτωπο του διαλύτη, και να λαμβάνει τιμές χαμηλότερες από 0,3. Αυτό σημαίνει ότι ο διαχωρισμός ο οποίος γίνεται είναι χαμηλός, στοιχείο που δυσχεραίνει τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων¹¹⁸. Αυτό το πρόβλημα, όμως, μπορεί εύκολα να αντιμετωπιστεί με τη χρήση μιας τροποποιημένης Χρωματογραφίας χάρτου, τη μέθοδο OPLC (Over Pressure Layer Chromatography), ως αρχική μέθοδο ανάλυσης του κατάλληλου διαλύτη για τη χρήση στην Mplc¹¹⁵. Η συγκεκριμένη μέθοδος (αντίθετα με την TLC) θεωρείται ένα κλειστό σύστημα επίπεδης στήλης, όπου επιτυγχάνεται ομοιογενής εξάπλωση του διαλύτη με ηλεκτρονικό τρόπο και με εφαρμογή Πίεσης (χρήση αντλίας) πάνω στη στατική φάση. Μελέτες έδειξαν ότι με τη χρήση της μεθόδου OPLC παρατηρήθηκε καλύτερος διαχωρισμός του προς ανάλυση δείγματος σε σχέση με τη Χρωματογραφία χάρτου (TLC). Παράλληλα, η εφαρμογή των αποτελεσμάτων στη Μέτριας Πίεσης υγρή Χρωματογραφία επέφερε αξιόπιστα αποτελέσματα¹¹⁹.

Όσον αφορά τη χρήση του ίδιου διαλύτη που χρησιμοποιείται στη μέθοδο HPLC στην υγρή Χρωματογραφία μέτριας Πίεσης, εμφανίζει (όπως και η μέθοδος Mplc), ομοιότητες στις φάσεις που χρησιμοποιούνται (κινητή-στατική φάση). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα συμπεράσματα που λαμβάνονται για διαχωρισμούς που έχουν γίνει και με τις δύο μεθόδους να είναι αξιόπιστα και σχεδόν όμοια. Συνεπώς, διαχωρισμοί που έχουν διεξαχθεί με επιτυχία με την Υψηλής απόδοσης υγρή Χρωματογραφία θα διεξαχθούν με επιτυχία και με τη χρήση Μέτριας Πίεσης υγρή Χρωματογραφία¹¹⁵.

Τέλος, αφού επιλεγεί ο κατάλληλος διαλύτης και γίνει με επιτυχία ο διαχωρισμός των δειγμάτων, τότε από τα κλάσματα που έχουν συλλεχθεί πρέπει να εξατμιστεί μέρος του διαλύτη. Όμως, έτσι μπορεί να παρατηρηθεί και αύξηση της συγκέντρωσης κάποιων μη πτητικών ενώσεων που έχουν παρασυρθεί από το διαλύτη. Σημαντική λεπτομέρεια είναι ότι οι διαλύτες μεγάλης καθαρότητας είναι αρκετά

¹¹⁸ Leutert et. al, 1984

¹¹⁹ Nathan Bryson and Domitille Papillard, 2004

ακριβοί, γι' αυτό η απόσταξη μη καθαρών διαλυτών ή το φιλτράρισμά τους πριν τη χρήση θα βοηθήσει τους επιστήμονες να ελαττώσουν το κόστος διεξαγωγής της μεθόδου¹¹⁵.

2.3.4 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Πριν εισαχθεί το δείγμα στη Χρωματογραφική στήλη θα πρέπει οι επιστήμονες να λάβουν υπόψιν αρκετά στοιχεία που το αφορούν, όπως η προετοιμασία που χρειάζεται, η μάζα και ο όγκος του, τα χαρακτηριστικά διαλυτότητάς του αλλά και ο τρόπος κατά τον οποίο θα εισαχθεί στη στήλη.

Όσον αφορά τον όγκο και τη συγκέντρωση του δείγματος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί, κατά τη χρήση μεγάλης ποσότητας (αυξημένες τιμές όγκου) παρατηρείται μείωση της ικανότητας διαχωρισμού, ενώ κατά την ανάλυση δειγμάτων με πολύ μικρούς όγκους παρατηρείται καθίζησή τους στον πυθμένα της στήλης, στοιχείο που οδηγεί σε αποτυχημένο διαχωρισμό. Παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι κατά τη χρήση δείγματος πολύ μεγάλης συγκέντρωσης παρατηρείται αλλαγή του ιζώδους του, που το μετατρέπει σε μορφή διαφορετική από αυτή της κινητής φάσης, δυσχεραίνοντας με αυτόν τον τρόπο το διαχωρισμό του. Γενικά, μελέτες έχουν δείξει ότι κατά τη χρήση ποσότητας δείγματος μικρού όγκου, το οποίο έχει συμπυκνωθεί λίγο (αφαίρεση του διαλύτη) πριν την εισαγωγή του στη στήλη, λαμβάνονται περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα¹¹⁵.

Όσον αφορά τη διαλυτοποίηση του δείγματος και τους τρόπους εισαγωγής του στη στήλη, η διαλυτοποίηση μπορεί να γίνει και σε διαλύτη διαφορετικό από αυτόν που αποτελεί την κινητή φάση, ενώ η εισαγωγή του στο όργανο μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα μπορούν να εισαχθούν στη στήλη είτε άμεσα, με τη χρήση ένεσης στην κορυφή της στήλης μέσω μίας διαπερατής μεμβράνης (septum), είτε έμμεσα μέσω ενός κυκλώματος ροής. Καθοριστικά στοιχεία στη λήψη ορθών αποτελεσμάτων, ανεξαρτήτως του τρόπου εισαγωγής του δείγματος, είναι τόσο η ομογενοποίηση της στατικής φάσης, όσο και η σωστή κατανομή του δείγματος μέσα στη στήλη¹¹⁵.

Όλα τα παραπάνω αφορούν την ανάλυση υγρών δειγμάτων. Όμως με τη χρήση της υγρής Χρωματογραφίας μέτριας Πίεσης μπορούν να αναλυθούν και στερεά δείγματα. Αυτό το είδος δειγμάτων πρέπει πρώτα να το επεξεργαστούμε με ειδικό τρόπο, ούτως ώστε να λάβει τη μορφή πούδρας. Στη συνέχεια η πούδρα αυτή αναμιγνύεται με τη στατική φάση και προστίθεται άμεσα στη Χρωματογραφική στήλη, ούτως ώστε να λάβει χώρα ο διαχωρισμός, όπως έχει αναλυθεί παραπάνω¹¹⁵.

2.3.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ MPLC

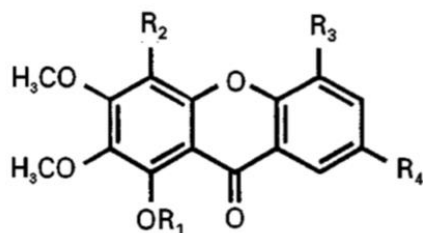
Η μέθοδος «Μέτριας Πίεσης υγρή Χρωματογραφία (Mplc)» βρίσκει εφαρμογή στις ημέρες μας σε βιομηχανίες παραγωγής φαρμάκων, τροφίμων αλλά και χημικών, με την πλειοψηφία των εφαρμογών να σχετίζεται με την ανάπτυξη μεθόδων απομόνωσης φυσικών προϊόντων. Παρακάτω θα αναφερθούν κάποια βασικά παραδείγματα εφαρμογών της Mplc που έχουν γίνει μέχρι σήμερα, με την πλειοψηφία τους να έχει εφαρμοστεί για πρώτη φορά σε υγρή Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και στη συνέχεια η μέθοδος να έχει μεταφερθεί στη Mplc¹¹⁵.

Η πρώτη εφαρμογή σχετίζεται με τη μελέτη εκχύλισματος Μεθανόλης από το φυτό *Halenia corniculata*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Gentianaceae*, που ευδοκμεί στη Μογγολία. Κατά τη μελέτη, το εκχύλισμα αυτό, επεξεργάστηκε με υγρή Χρωματογραφία Μέτριας Πίεσης και διαχωρίστηκε σε έξι γλυκοσίδια ξανθονών, τα οποία και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα Μεθανόλης εισήχθη σε στήλη gel- Sephadex LH-20 και έδωσε ένα κλάσμα πλούσιο σε ενώσεις με γλυκοσίδια. Αυτό το κλάσμα στη συνέχεια αναλύθηκε με Mplc, με τη χρήση στήλης αντίστροφης φάσης RP-18 (460mm x 12mm) και σύστημα διαλυτών Μεθανόλη/Νερό 40:60 (v/v) ροής 3 mlmin⁻¹. Μετά το διαχωρισμό που έλαβε χώρα απομονώθηκαν τα γλυκοσίδια των ξανθονών (φυτοχημικές ουσίες). Η μέθοδος αυτή στην αρχή εφαρμόστηκε στη HPLC με τη χρήση στήλης αντίστροφης φάσης RP-18 (250 mm x 4 mm) και τη χρήση συστήματος Μεθανόλης/ Νερό 40:60 (v/v) ροής 1 mlmin⁻¹¹²⁰.

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 12) φαίνεται η δομή των μορίων των έξι ξανθονών που απομονώθηκαν από τη συγκεκριμένη εφαρμογή¹¹⁵.

◉§Ï

¹²⁰ Rodriguez et. al, 1995

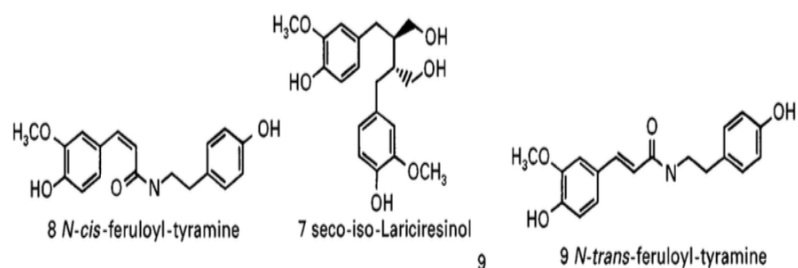


- 1 $R_1 = \text{gentiobiosyl}, R_2 = R_4 = \text{H}, R_3 = \text{OCH}_3$
- 2 $R_1 = \text{primeverosyl}, R_2 = R_4 = \text{H}, R_3 = \text{OCH}_3$
- 3 $R_1 = \text{primeverosyl}, R_2 = R_3 = \text{OCH}_3, R_4 = \text{H}$
- 4 $R_1 = \text{primeverosyl}, R_2 = R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OCH}_3$
- 5 $R_1 = \text{primeverosyl}, R_2 = R_4 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{H}$
- 6 $R_1 = \text{primeverosyl}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OCH}_3$

ΕΙΚΟΝΑ 12: ΜΟΡΙΟ ΞΑΝΘΟΝΩΝ

Η δεύτερη εφαρμογή της Μplc αναφέρεται στη μελέτη εκχυλίσματος Διγλωρομεθανίου από τις ρίζες του φυτού *Tinospora crispa* της οικογένειας Menispermaceae. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα απομονώθηκε με Χρωματογραφία φυγοκεντρικής κατανομής και η μέθοδος ανάλυσής του εφαρμόστηκε αρχικά σε HPLC, με τη χρήση στήλης αντίστροφης φάσης RP-18 (250 mm x 4 mm) και σύστημα διαλυτών Μεθανόλη / Νερό (40:60 σε 20 λεπτά) ροής ροής 1 mlmin⁻¹. Στη συνέχεια η μέθοδος αυτή μεταφέρθηκε στη μέθοδο υγρής Χρωματογραφίας μέτριας Πίεσης, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε ξανά η ίδια στήλη αντίστροφης φάσης, διαστάσεων (460mm x 12mm), με τη χρήση διαλυτών Μεθανόλη/ Νερό (30: 70) ροής 4 mlmin⁻¹. Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης, ο οποίος και επιτεύχθηκε, ήταν η απομόνωση τριών παραγώγων Φαινυλο-προπανίου¹²¹.

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 13) φαίνονται τα μόρια των τριών ενώσεων που απομονώθηκαν¹¹⁵:



ΕΙΚΟΝΑ 13 ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΦΑΙΝΥΛΟ-ΠΡΟΠΑΝΙΟΥ

Σήμερα η μέθοδος Mplc έχει χρησιμοποιηθεί και σε μελέτες που έχουν γίνει για το διαχωρισμό μείγματος εναντιωμερών. Πιο συγκεκριμένα, το μείγμα περιείχε *S-N*-formyl-1-phenylethyamine και *Racemic-N*-formyl-arylethylamine και αναλύθηκε με τη χρήση στήλης αντίστροφης φάσης και σύστημα διαλυτών ελάχιστης έως αυξημένης πολικότητας. Η ανάλυση των κλασμάτων που απομονώθηκαν έδειξε ότι το *S* εναντιωμερές εκλούστηκε σαν το λιγότερο πολικό κλάσμα, ενώ το *R* εκλούστηκε σαν το κλάσμα με τη μεγαλύτερη πολικότητα¹²².

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Παραλαβή και επεξεργασία σταφυλιών

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας συλλέχθηκαν 20 κιλά σταφύλια της ποικιλίας Βιδιανό από την Περιοχή Ηρακλείου Κρήτης, τα οποία εκραγίστηκαν και αποφλοιώθηκαν. Έπειτα οι φλοιοί ξηράνθηκαν με τη μέθοδο της Λυοφιλίωσης και έγιναν σκόνη με τη χρήση ειδικού μύλου. Στη συνέχεια 12,56g από τη συγκεκριμένη σκόνη τοποθετήθηκαν σε φιάλη των 250ml, όπου κάθε μέρα για 5 ημέρες προσετίθεντο 200ml διαφορετικού διαλύτη αυξανόμενης πολικότητας (μετά το πέρας των 24h, ο κάθε διαλύτης απομακρυνόταν από τη σκόνη με διήθηση, με τη χρήση διηθητικού χαρτιού, και στη συνέχεια προσετίθετο ο επόμενος στην ίδια σκόνη)

Οι διαλύτες με τη σειρά που προστέθηκαν ήταν Πεντάνιο, Διαιθυλαιθέρας-Πεντάνιο (1:1), Διαιθυλαιθέρας, Διαιθυλαιθέρας-Μεθανόλη (1:1) και Μεθανόλη. Κάθε ένας από αυτούς αφηνόταν σε επαφή με τη σκόνη για 24h με 1h ανάδευση, με σκοπό την εκχύλιση των προδρόμων αρωματικών ενώσεων, που -όπως αναφέρεται και στις προηγούμενες ενότητες- βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους φλοιούς των σταφυλιών. Στη συνέχεια ο κάθε διαλύτης με τις ενώσεις που είχε εκχυλίσει κατά την παραμονή του στη σκόνη των φλοιών, εξατμιζόταν με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστή (rotary evaporator) μέχρι την ποσότητα των 2ml. Έπειτα κάθε ένα από τα 2ml προσετίθετο σε 2 φιάλες, που η καθεμία περιείχε 200ml πρότυπου μούστου (model must), ο οποίος στη συνέχεια εμβολιαζόταν με προσθήκη 250mg/100l ζυμομύκητα εμπορικού στελέχους UCLM S325. Μελέτες έχουν δείξει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος ζύμης μπορεί να απελευθερώσει ορισμένα τερπένια, όπως η Λιναλόλη, η Γερανιόλη αλλά και η Νερόλη¹²³. Συνεπώς δημιουργήθηκαν 2x5 δείγματα, στα οποία έλαβε χώρα αλκοολική ζύμωση (πίνακας 8).

ο8Ϊ

¹²³ Fernandez-Gonzalez et. al, 2003

Η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης των δειγμάτων, παρακολουθούνταν σε καθημερινή βάση με τη ζύγιση του βάρους τους. Γενικά, όταν παρατηρήθηκε σταθεροποίηση του μετρούμενου βάρους για διάστημα 3-5 ημερών, τότε πιθανόν η αλκοολική ζύμωση να είχε ολοκληρωθεί, στοιχείο που μπορεί να επιβεβαιωθεί και με τη μέτρηση των αναγόντων σακχάρων των δειγμάτων με χρήση μεθόδου DNS.

Στη συνέχεια, αφού έγινε επεξεργασία των δειγμάτων που λήφθηκαν με τη χρήση υγρής - υγρής εκχύλισης την τέταρτη, έβδομη και τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης, αυτά αναλύθηκαν με τις μεθόδους GC-O, GC-MS, με σκοπό τη μελέτη των αρωμάτων/οσμών που διαμορφώνουν το άρωμα του οίνου, αλλά και την ανίχνευση/ποσοτικοποίηση των πτητικών συστατικών που εκχύλισαν οι διαλύτες από τους φλοιούς. Τα δείγματα λήφθηκαν με τη χρήση υγρής- υγρής εκχύλισης, αφού με βάση τη βιβλιογραφία, με τη χρήση αυτής παρατηρήθηκε η μέγιστη έκλυση ή εκχύλιση των πτητικών συστατικών¹²⁴. Επιπλέον κλασματοποίηση των πτητικών συστατικών από οίνο Βιδιανού, έγινε με τη χρήση μεθόδων MLPC, ενώ η ανάλυση αυτών έγινε με τη χρήση GC-MS. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) -αριστερή στήλη- παραθέτονται οι τρεις διαφορετικές ημέρες της δειγματοληψίας (τέταρτη , έβδομη και τελευταία ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης), - μεσαία στήλη- ο αριθμός των 12 δειγμάτων που προέκυψαν (Α,Β & 1-10) αλλά και το είδος του διαλύτη που περιείχε το κάθε δείγμα (δεξιά στήλη).

Ημέρες δειγματοληψίας	Δείγματα	Διαλύματα
Τέταρτη ημέρα ΑΖ + Έβδομη ημέρα ΑΖ + Τελευταία ημέρα ΑΖ	Α	ΠΡΟΤΥΠΑ ΧΩΡΙΣ ΔΙΑΛΥΤΗ
	Β	
	1	ΠΕΝΤΑΝΙΟ
	2	
	3	ΔΙΑΙΘΥΛΑΙΘΕΡΑΣ-ΠΕΝΤΑΝΙΟ
	4	
	5	ΔΙΑΙΘΥΛΑΙΘΕΡΑΣ
6		
7		

◉8Ï

¹²⁴ Helena Stashenko et. al, 1992

	8	ΔΙΑΙΘΥΛΛΑΙΘΕΡΑΣ-ΜΕΘΑΝΟΛΗ
	9	ΜΕΘΑΝΟΛΗ
	10	

Πίνακας 8 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

3.2 ΥΓΡΗ-ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Εκχύλιση δείγματος οίνου

Δείγμα οίνου από Βιδιανό ποσότητας 250ml τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη ίδιας χωρητικότητας. Στη συνέχεια προστέθηκε ποσότητα Χλωριούχου Νατρίου (NaCl) ίση με 25g, η οποία ζυγίστηκε σε ηλεκτρονικό ζυγό ενός δεκαδικού ψηφίου. Παράλληλα έγινε προσθήκη 40ml εσωτερικού προτύπου 3-Οκτανόλης 1g/l με τη χρήση μικροπιπέτας και 25ml διαλύτη Διαιθυλαιθέρα.

Το δείγμα στην πορεία, αφού μεταγγίστηκε σε κωνική φιάλη των 500ml, που βρισκόταν μέσα σε λεκάνη με πάγο, αφέθηκε για ανάδευση σε ειδική μαγνητική πλάκα για 15λεπτά στις 300rpm, ούτως ώστε να διαλυθεί το άλας. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, το δείγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη, όπου και αφέθηκε για 10 λεπτά, έως ότου δημιουργηθούν δύο φάσεις. Μετά τη δημιουργία αυτών των δύο φάσεων, συλλέχθηκε η κατώτερη, η οποία φυγοκεντρίθηκε για 10 λεπτά στις 4000 rpm. Όλη αυτή η διαδικασία έγινε 3 φορές, με σκοπό την υγρή- υγρή εκχύλιση συνολικά 750 ml οίνου.

Στη συνέχεια η υδατική φάσης απομακρύνθηκε με προσθήκη άνυδρου Θεϊκού Νατρίου και ταυτόχρονη ανάδευση σε μαγνητική πλάκα για 10 λεπτά. Έπειτα το δείγμα φιλτραρίστηκε. Τέλος, το διήθημα που περιείχε τις προς ανάλυση πτητικές ενώσεις, συμπυκνώθηκε σε δύο φάσεις. Αρχικά, με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστή (rotary evaporator), ο οποίος είχε ρυθμιστεί σε θερμοκρασία 30-35°C, η ποσότητα του διαλύματος μειώθηκε στα 4-5 ml, ενώ στη συνέχεια με περαιτέρω συμπύκνωση, με τη χρήση ρεύματος αερίου Αζώτου η ποσότητα έφτασε μέχρι το 1,5 ml.

Εκχύλιση δειγμάτων από τις μικροζυμώσεις

Η διαδικασία υγρής- υγρής εκχύλισης που ακολουθείται για τα δείγματα που έχουν προκύψει από τις μικροζυμώσεις που αναλύθηκαν παραπάνω είναι περίπου ίδια. Αρχικά από το κάθε ένα από τα δείγματα λήφθηκαν 28 ml και τοποθετήθηκαν σε 4 σωλήνες φυγοκέντρου. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση για 10λεπτά στις 4000 rpm, με σκοπό την απομάκρυνση των ζυμών και έγινε λήψη του υγρού, το οποίο τοποθετήθηκε σε καθαρούς σωλήνες, ενώ το ίζημα από τις ζύμες αφέθηκε στον πυθμένα των δοκιμαστικών σωλήνων που είχαν χρησιμοποιηθεί για τη φυγοκέντριση.

Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα που είχε τοποθετηθεί στους καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 50 μl εσωτερικού προτύπου (3-Οκτανόλης) 1g/l και 2 ml Διχλωρομεθάνιο. Αφού έγινε ανάδευση με χρήση του μηχανήματος Vortex για 1λεπτό, έλαβε χώρα ξανά φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 4000 rpm. Έπειτα έγινε λήψη της κατώτερης φάσης με τη χρήση ειδικής σύριγγας και ακολουθήθηκε φιλτράρισμα με τη χρήση fiber glass, στο οποίο είχαν προηγουμένως προστεθεί 0.4g άλας άνυδρου Θεϊκού Νατρίου. Τέλος, το διήθημα που συλλέχθηκε συμπυκνώθηκε με τη χρήση ρεύματος αερίου Αζώτου, μέχρι την τελική ποσότητα των 1,5ml.

3.3 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ- ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑ (GC-O)

Ο αέριος Χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GC Focus Series 230 της εταιρίας Thermo Lab Electron Corporation, ο οποίος ήταν συζευγμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και Sniffer 9000. Η στήλη ήταν πολική DB-Wax, με μήκος 30m, εσωτερική διάμετρο 0,32mm και πάχος εσωτερικής στιβάδας 0,25μm (30m x 0,32mm i.d, 0,25μm thickness).

Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε Ήλιο (He) με ροή 1μl/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα injector ρυθμίστηκε στους 240°C, ενώ του ανιχνευτή (detector) στους 250°C. Κατά την εισαγωγή του δείγματος εφαρμόστηκε για 5min τεχνική Splitless. Όσον αφορά το φούρνο, η θερμοκρασία του παρέμεινε στους 40°C για 3min, ενώ ακολούθησε αύξηση με ρυθμό 3°C/min μέχρι τους 160°C. Στη συνέχεια, με ρυθμό αύξησης 10°C/min, η θερμοκρασία κατέληξε να λάβει την τιμή των 240°C.

Τέλος, πριν τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος ετοιμάστηκαν πρότυπες αρωματικές ουσίες σε συγκέντρωση 1g/l. Αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή διαλυμάτων, τα οποία πριν την ανάλυση των κυρίως δειγμάτων πέρασαν από τον αέριο χρωματογράφο με ανιχνευτή φλόγας και sniffer, με σκοπό την καταγραφή του χρόνου κατακράτησης αλλά και την εκπαίδευση των ερευνητών.

3.4 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ- ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC-MS)

Η ανάλυση των πτητικών ενώσεων με τη χρήση Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας μάζας, έγινε με τη χρήση μηχανήματος Agilent 597c VL msd, το οποίο ήταν εφοδιασμένο με μία μη πολική στήλη DB-5 μήκους 30m, διαμέτρου 0.25mm και πάχους 0.25 μ m (30m x0.25mm i.d x 0.25 μ m thickness). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε Ήλιο (He), το οποίο είχε ροή 1ml/min. Ο όγκος της ένεσης ήταν 1ml. Όσον αφορά τη θερμοκρασία εισαγωγής δείγματος, καθορίστηκε στους 220°C. Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ήταν 40°C για 3 min και στη συνέχεια, με ρυθμό αύξησης 3 °C/min, έφτασε τους 160°C. Τέλος αυτή έλαβε την τιμή των 240°C ύστερα από σταδιακή αύξηση 10°C/min, όπου και παρέμεινε σταθερή για 10min.

Για την ποσοτικοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επιλογής του χαρακτηριστικού ιόντος (Selected Ion Monitoring) και το πρόγραμμα chemstation, όπου κάθε φορά επιλεγόταν το χαρακτηριστικό ιόν της κάθε ένωσης. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η 3-Οκτανόλη, με βάση την οποία ποσοτικοποιήθηκαν όλες οι άλλες πτητικές ενώσεις. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9) αναγράφονται όλες οι ενώσεις που αναλύθηκαν και το χαρακτηριστικό ιόν της κάθε μίας από αυτές.

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΙΟΝΤΑ
cis-3-hexen-1-ol	67
2-phenyl-ethyl-acetate	104
b-ionone	177
3,7-dimethyl-2,6 octadien-1-ol	69
citronelol	69
2-phenyl-ethanol	91
ethyl caproate	88

ethyl caprylate	88
ethyl isovalerate	88
ethyl decanoate	88
3-octenol	59
3-methyl-thio-propanol	106
1-hexanol	56
ethyl butyrate	71
linalool	71
ethyl isobutyrate	43
isobutyl acetate	43
isoamyl acetate	43
hexyl acetate	43
2-methyl-butanol	57
ethyl-2-methyl-butyrate	57
isoamyl alcohol	55

Πίνακας 9 Ενώσεις και χαρακτηριστικά ιόντα

3.5 ΜΕΤΡΙΑΣ ΠΙΕΣΗΣ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (MPLC)

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο κλασματοποιήθηκε εκχύλισμα δείγματος οίνου από την ποικιλία Βιδιανό, που, μετά από επεξεργασία με τη διαδικασία της υγρής-υγρής εκχύλισης με Διχλωρομεθάνιο, είχε συμπυκνωθεί σε όγκο 100μl και είχε υποστεί και προσθήκη 100μl Πεντανίου. Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Isolera Four της εταιρίας Biotage, το οποίο είχε συνδεθεί με στήλη Fsko-1107-0010 της ίδιας εταιρίας, πληρωμένη με Διοξείδιο του Πυριτίου (silica gel). Παράλληλα το μηχάνημα ήταν συζευγμένο με ανιχνευτή UV-Vis.

Για τη δημιουργία κλασμάτων χρησιμοποιήθηκαν 2 συστήματα διαλυτών αυξημένης πολικότητας, που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 10):

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΝΑΛΛΑΓΗΣ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΧΡΗΣΗΣ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΔΙΑΛΥΤΕΣ
Σύστημα 1	Αρχή	100%-0%	Πεντάνιο-Διαιθυλαιθέρας
	Τέλος	0%-100%	Πεντάνιο-Διαιθυλαιθέρας
	Αρχή	100%-0%	Διαιθυλαιθέρας- Μεθανόλη

Σύστημα 2	Τέλος	0%-100%	Διαιθυλαιθέρας- Μεθανόλη
-----------	-------	---------	--------------------------

Πίνακας 10 Συστήματα αυξημένης πολικότητας διαλυτών

Παράλληλα, η ροή είχε ρυθμιστεί στα 12ml/min και σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα συλλέγονταν 22 ml κλάσματος. Έπειτα τα κλάσματα αναμιχθηκαν ανά 3, συμπυκνώθηκαν τόσο με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστή (rotary evaporator), όσο και με τη χρήση ροής αέριου Αζώτου. Τέλος, οι πτητικές ενώσεις που παρασύρθηκαν από τα συστήματα αυξημένης πολικότητας διαλυτών, μελετήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση GC-MS.

3.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν με τρεις επαναλήψεις, με εξαίρεση τη μέθοδο Υγρής Χρωματογραφίας Μέτριας πίεσης (mplc), που πραγματοποιήθηκε μία φορά. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν έγινε στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα Jump 11. Ως πιο αρμόζουσα ανάλυση επιλέχθηκε η Ανάλυση Διασποράς με έναν Παράγοντα (One way ANOVA), με έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων κατά Tukey HSD test (Honesty Significant Difference).

Το σφάλμα του μέσου όρου των επαναλήψεων αναγράφεται τόσο ως \pm , όσο και με τη μορφή μπαρών. Η χρήση των μπαρών έγινε στην περίπτωση που τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν με τη μορφή γραφημάτων. Παράλληλα, η χρήση των Αγγλικών γραμμάτων a,b,c κ.α έγινε για την περιγραφή της στατιστικής διαφοράς των δειγμάτων σε επίπεδο 0.05%. Τα δείγματα που περιγράφηκαν με το ίδιο γράμμα δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΑΝ ΣΤΟ GC-MS

Οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς των ενώσεων φαίνονται στον Πίνακα 11. Για τον προσδιορισμό τους προστέθηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις από την κάθε πρότυπη ένωση σε διάλυμα πρότυπου οίνου (model wine), με την ταυτόχρονη προσθήκη εσωτερικού προτύπου (3-οκτανόλης). Έπειτα ακολούθησε υγρή/υγρή εκχύλιση με Διχλωρομεθάνιο και τέλος ανάλυση με τη χρήση Αέριας Χρωματογραφίας- Φασματομετρίας μάζας (GC-MS).

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ (mg/l)	ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	R ²
1-Εξανόλη (1-hexanol)	0.12-1.92	$y=0.8747x-0.0253$	0.99926
Βουτυρικός αιθυλεστέρας (ethyl butyrate)	0.12-1.92	$y=0.4641x- 0.0002$	0.99954
Λιναλόλη (linalool)	0.04-0.48	$y=0.4748x-0.0084$	0.9983
Ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας (ethyl isobutyrate)	0.12-1.92	$y=1.018x+ 0.019$	0.99949
Οξικός ισοβουτυλεστέρας (isobutyl acetate)	0.12-1.92	$y=1.1577x+0.0216$	0.99938
Οξικός εστέρας της ισοαμυλικής αλκοόλης (isoamyl acetate)	0.5-8	$y=0.7704x+ 0.075$	0.99938
Οξικός εξυλεστέρας (hexyl acetate)	0.12-1.92	$y=1.0502x- 0.0034$	0.99965
2-μέθυλο-βουτανόλη (2-methyl butanol)	0.12-1.92	$y=0.5395x- 0.0079$	0.99937
2-μέθυλο-βουτυρικός αιθυλεστέρας (ethyl-2-methyl butyrate)	0.12-1.92	$y=0.5587x+ 0.0017$	0.99947
Ισοαμυλική αλκοόλη (isoamyl alcohol)	0.12-1.92	$y=5.7091x- 0.8459$	0.93309

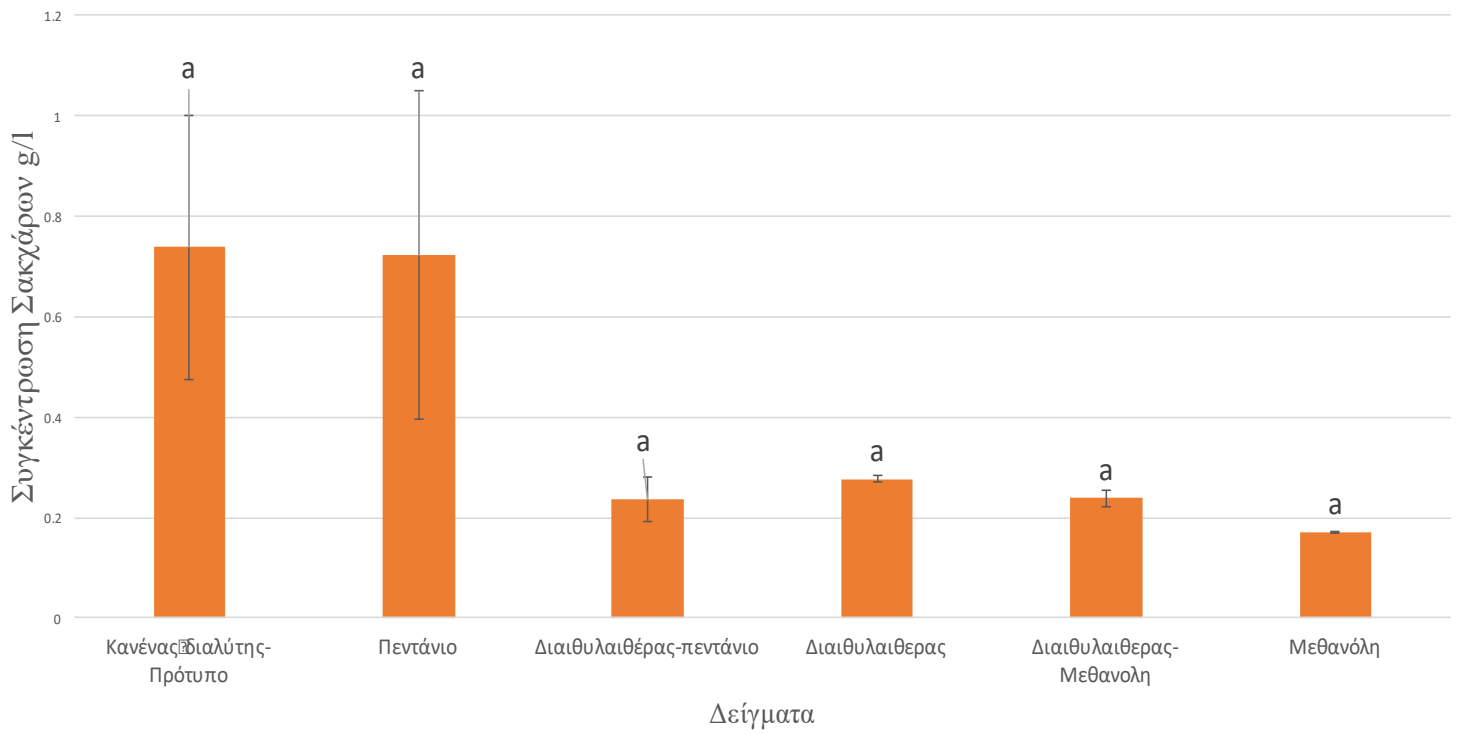
3-μέθυλ-θειολ-1-προπανόλη (3-methyl-thio-propanol)	0.12-1.92	$y=0.2282x- 0.0657$	0.80376
Καπροϊκός αιθυλεστέρας (ethyl caproate)	0.12-1.92	$y=0.4567x+ 0.0009$	0.99902
Καπριλικός αιθυλεστέρας (ethyl caprylate)	0.12-1.92	$y=0.6122x- 0.0158$	0.99859
Ισοβαλερικός αιθυλεστέρας (ethyl isovalerate)	0.12-1.92	$y=0.4755x+ 0.0043$	0.9993
Δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (ethyl decanoate)	0.12-1.92	$y=0.8133x- 0.0338$	0.99784
2 φαίνυλο- αιθανόλη (2-phenyl-ethanol)	2-32	$y=4.6626x+0.4833$	0.99844
3,7 διμέθυλο-2,6-οκταδιεν-1-όλη (cis Γερανιόλη)	0.04-0.48	$y=0.1812x-0.0021$	0.99803
Σιτρονελόλη (citronelol)	0.04-0.48	$y=1.1917x- 0.0402$	0.99575
B-Ιονόνη (b-ionone)	0.04-0.48	$y=0.8134x- 0.0259$	0.98117
Cis-3-εξέν-1-όλη (cis-e-hexen-1-ol)	0.12-1.92	$y=0.8085x- 0.0481$	0.99914
2- οξικός φαιθυλεστέρας (2-phenyl-ethyl-acetate)	0.12-1.92	$y=2.8146x- 0.0371$	0.99967

Πίνακας 11 Πρότυπες καμπύλες και εύρος συγκεντρώσεων των προς ανίχνευση ουσιών.

4.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΑΓΟΝΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ DNS- ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΕΛΟΥΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 1) παρατηρείται ότι η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων σε όλα τα δείγματα των διαφορετικών διαλυτών είναι κατώτερη από 2g/l. Αυτό δηλώνει τόσο ότι σε όλα τα δείγματα έχει τελειώσει η Αλκοολική ζύμωση (AZ), όσο και ότι αυτά ανήκουν στην κατηγορία των ξηρών οίνων. Παράλληλα, η στατιστική σύγκριση των δειγμάτων κατά το Tukeys test έδειξε ότι ανάμεσα στα δείγματα δεν υπάρχει καμία στατιστική διαφορά.

Ανάγοντα Σάκχαρα- Ισοδύναμα γλυκόζης



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΝΑΓΩΓΟΝΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ (G/L) ΣΕ ΙΣΟΔΥΝΑΜΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ ΚΑΘΕ ΔΕΙΓΜΑ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΟ \pm ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST $P < 0.05$).

4.3. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΕΣΤΕΡΩΝ, ΑΛΚΟΟΛΩΝ, ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΑΝ ΜΕ GC-MS ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ, ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΤΕΤΑΡΤΗ, ΕΒΔΟΜΗ ΚΑΙ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ (ΑΖ) ΤΟΥΣ.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις σε mg/l των Εστέρων, Αλκοολών και Τερπενίων (πίνακας 10), που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα των διαφορετικών διαλυτών (πίνακας 8) κατά την τέταρτη, την έβδομη αλλά και την τελευταία ημέρα της Αλκοολικής Ζύμωσής τους (όταν και έγινε η δειγματοληψία).

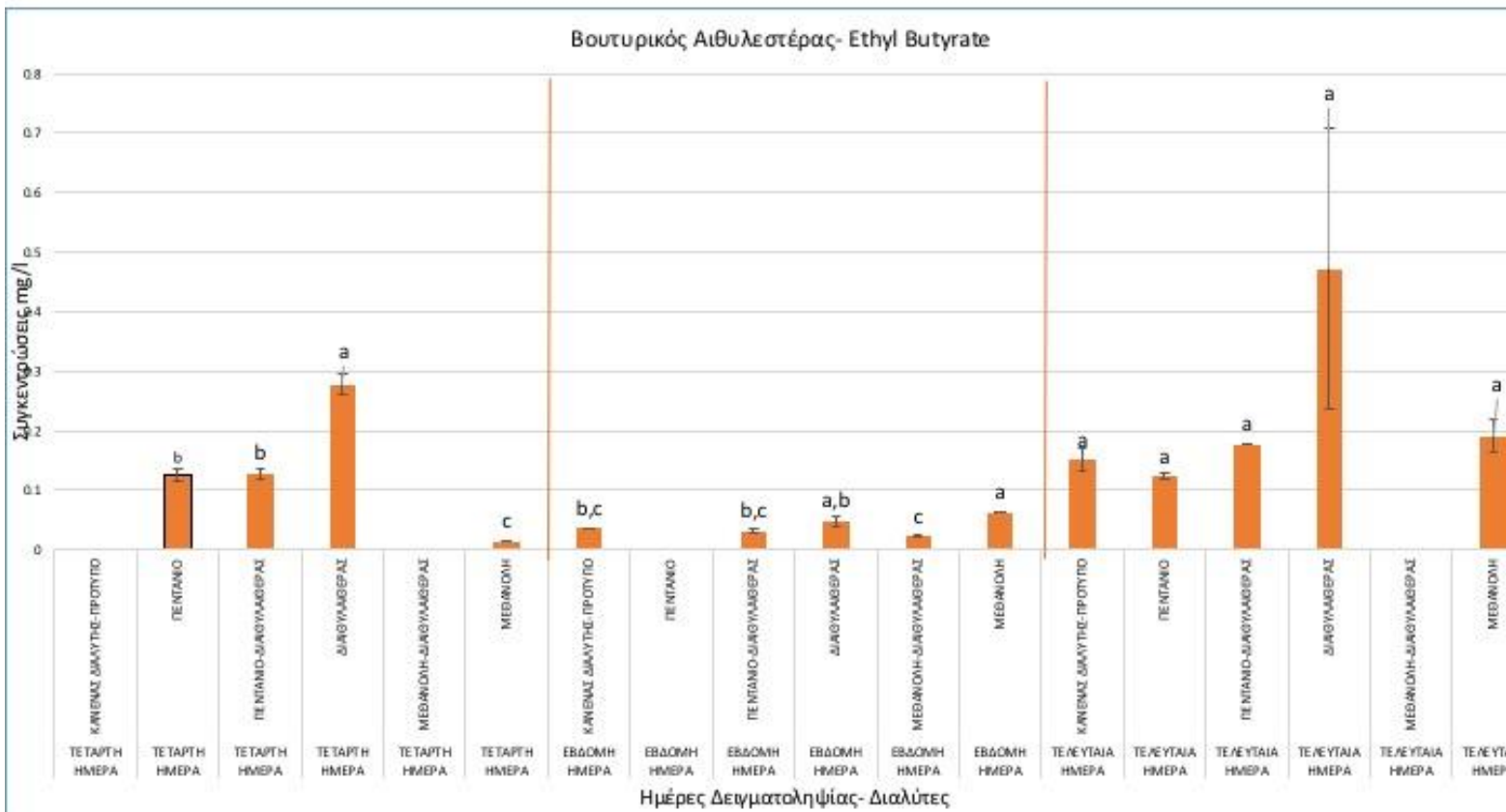
Οι κάθετες πορτοκαλί γραμμές, που υπάρχουν στα διαγράμματα, χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των αποτελεσμάτων που παρατηρήθηκαν κάθε ημέρα. Παράλληλα, τα αποτελέσματα κάθε ημέρας χρησιμοποιήθηκαν για μεταξύ τους στατιστική σύγκριση κατά το Tukeys test με $p < 0.05$. Τέλος, οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (M.O) των τιμών, με τις τιμές που έχουν διαφορετικό γράμμα να διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Αναλυτικά οι συγκεντρώσεις και τα τυπικά σφάλματα όλων των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα των διαφορετικών διαλυτών την τέταρτη, την έβδομη και την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης, όταν και έγινε η δειγματοληψία, περιγράφονται στο παράρτημα 1.

4.3.1 Εστέρες

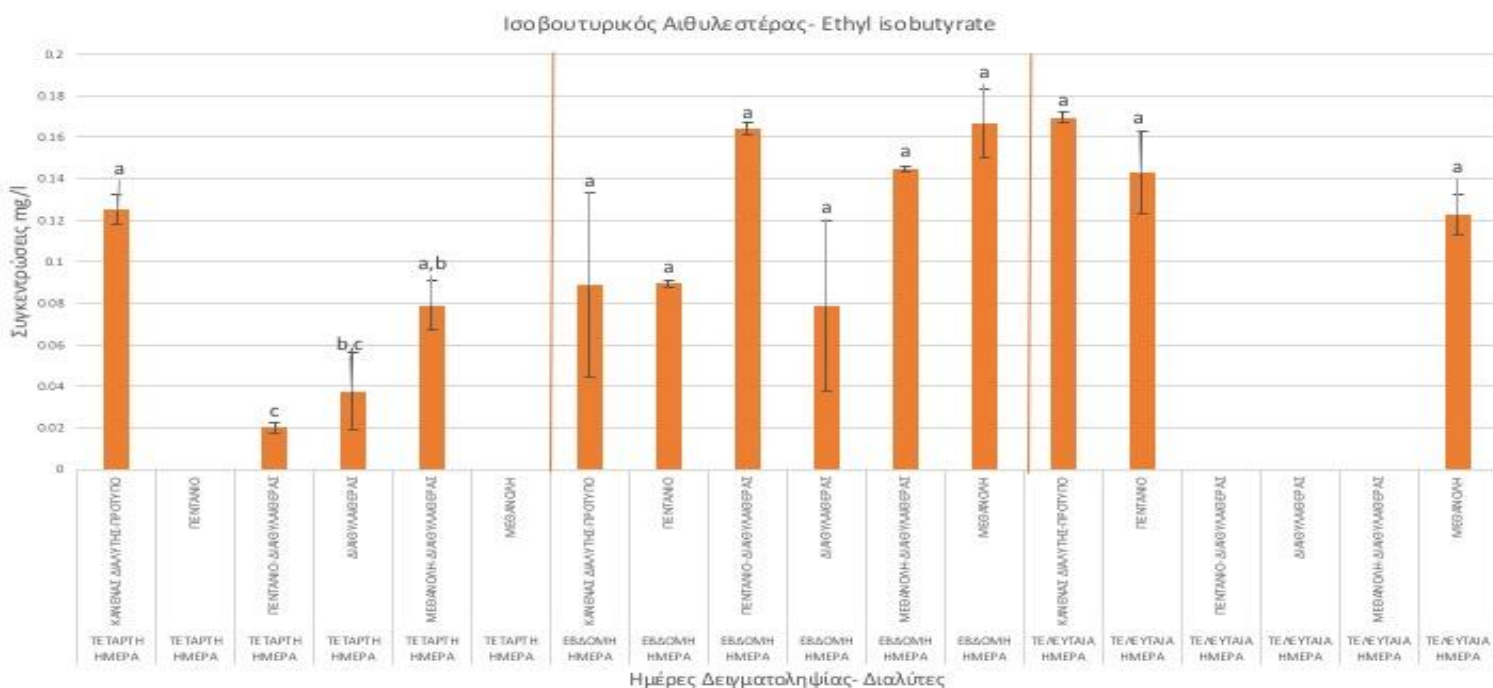
Στο διάγραμμα 2 παρατηρείται ότι κατά την τέταρτη ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης, ο Βουτυρικός Αιθυλεστέρας ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα, εκτός από αυτό του Προτύπου και αυτό που ως διαλύτης είχε χρησιμοποιηθεί το σύστημα Μεθανόλη-Διαιθυλαιθέρα. Παράλληλα, κατά την ίδια μέρα της Αλκοολικής ζύμωσης στατιστικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των δειγμάτων με το Διαιθυλαιθέρα και τη Μεθανόλη, όπου ανιχνεύτηκε η μεγαλύτερη αλλά και η μικρότερη συγκέντρωση της ένωσης αντίστοιχα. Κατά την έβδομη ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης

παρατηρείται ότι οι συγκεντρώσεις του Βουτυρικού Αιθυλεστέρα σε όλα τα δείγματα -εκτός από το δείγμα της Μεθανόλης- έχουν μειωθεί, χωρίς όμως να παρατηρούνται μεγάλες στατιστικές διαφορές μεταξύ τους. Παράλληλα, παρατηρείται ότι στο δείγμα του Πεντανίου δεν έχει ανιχνευτεί καθόλου η ένωση αυτή, αντιθέτως με αυτό του Προτύπου όπου ανιχνεύτηκε.

Την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης, οι συγκεντρώσεις του Βουτυρικού Αιθυλεστέρα στα δείγματα δεν παρουσιάζουν στατιστικές διαφορές μεταξύ τους και είναι μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές που παρατηρήθηκαν τις προηγούμενες ημέρες δειγματοληψίας, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση να παρατηρείται στο δείγμα με το Διαθυλαιθέρα.



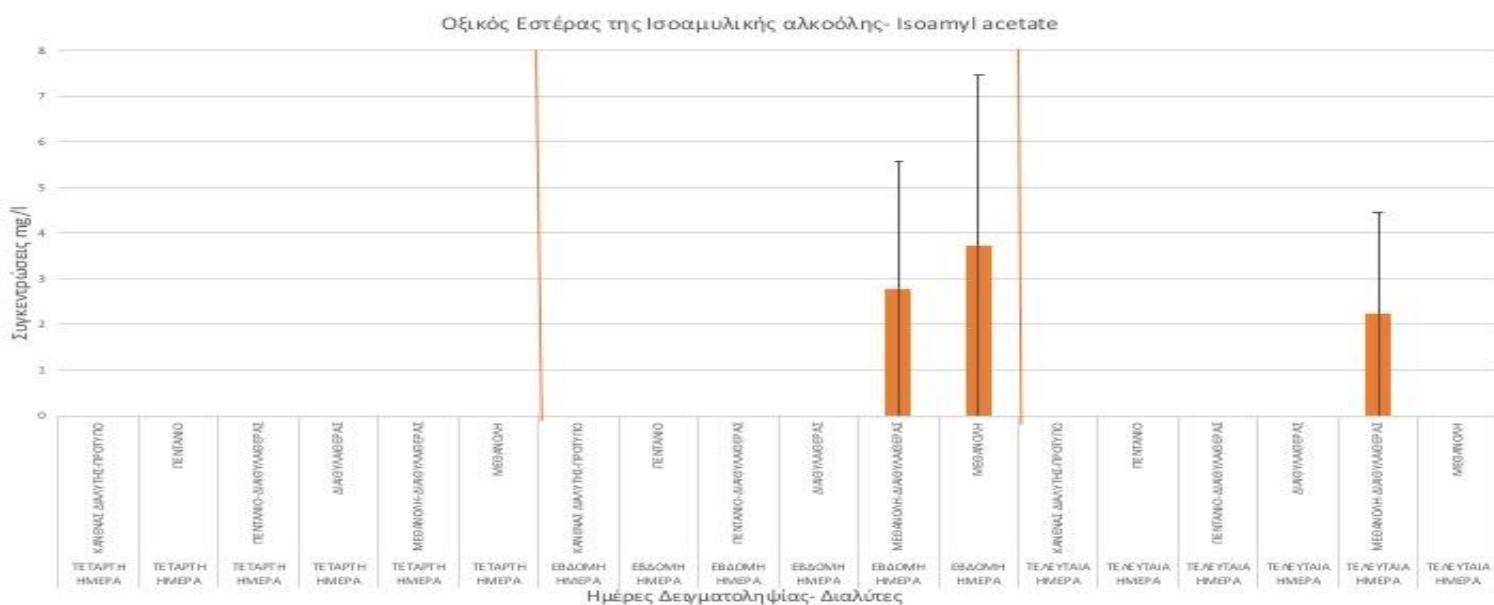
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ MG/L ΤΟΥ ΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΟ ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST P<0.05)



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ MG/L ΤΟΥ ΙΣΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΟ ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST P<0.05)

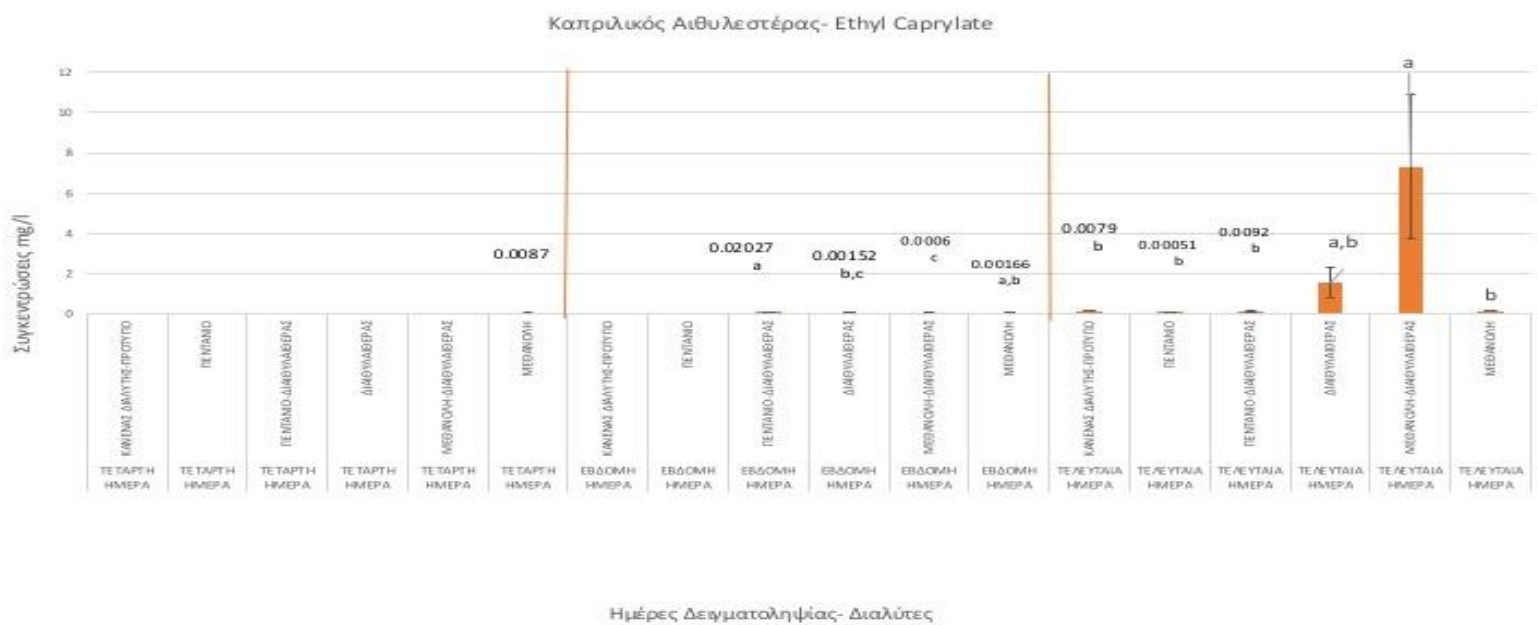
Στο διάγραμμα 3 παρατηρείται ότι κατά την τέταρτη ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης, ο Ισοβουτυρικός Αιθυλεστέρας ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα εκτός από αυτά που περιείχαν ως διαλύτη το Πεντάνιο και τη Μεθανόλη σε συγκεντρώσεις που διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους. Το αντίθετο συνέβη την έβδομη ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης, κατά την οποία η συγκεκριμένη ένωση ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα σε αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (εκτός από το Πρότυπο) και σε τιμές που δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους.

Όσον αφορά την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης, οι συγκεντρώσεις του Ισοβουτυρικού Αιθυλεστέρα στο Πρότυπο και στο δείγμα με το Πεντάνιο αυξήθηκαν, ενώ η συγκέντρωση στο δείγμα με τη Μεθανόλη μειώθηκε σε σχέση με τις προηγούμενες ημέρες, λαμβάνοντας τιμές που δεν παρουσίασαν καμία στατιστική διαφορά.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ ΜG/LΤΟΥ ΟΞΙΚΟΥ ΕΤΣΕΡΑ ΤΗΣ ΙΣΟΑΜΥΛΙΚΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΟ ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST P<0.05)

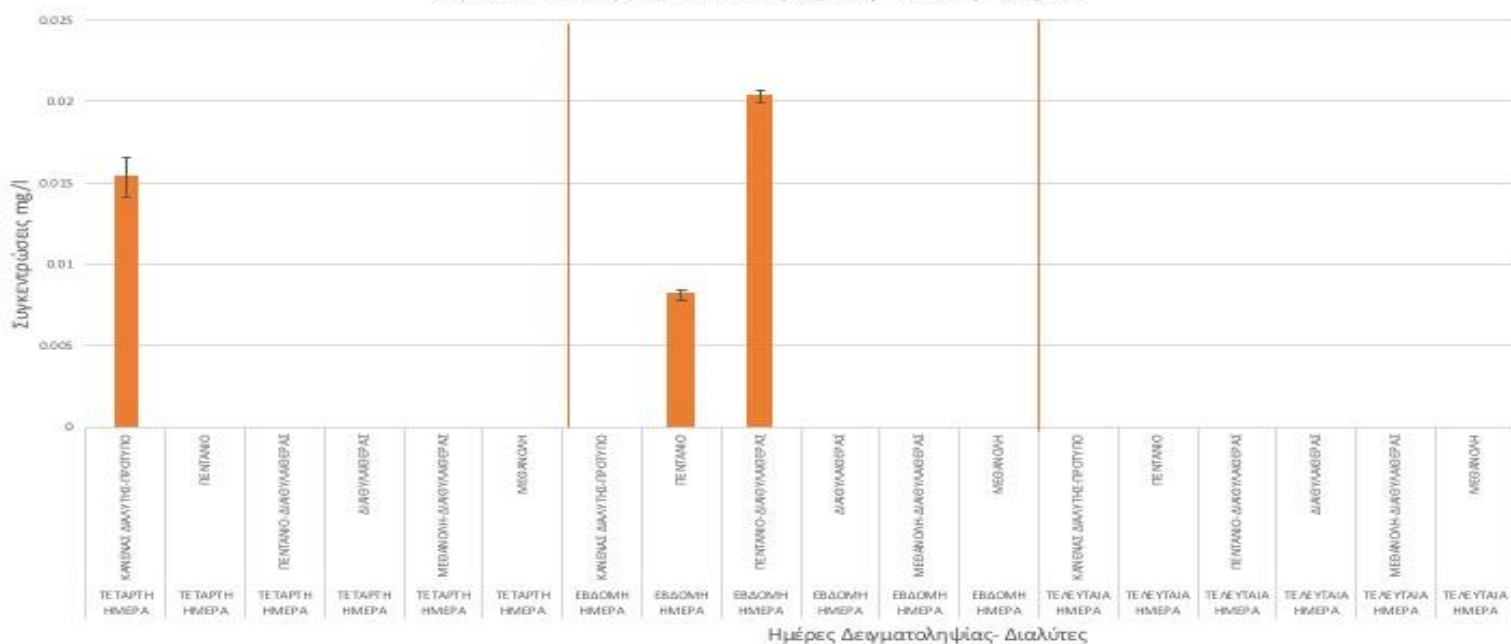
Στο διάγραμμα 4 παρατηρείται ότι ο Οξικός Εστέρας της Ισοαμυλικής αλκοόλης ανιχνεύτηκε στα δείγματα μόνο την έβδομη και την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης. Την έβδομη ημέρα ανιχνεύτηκε σε αυτά που περιείχαν Μεθανόλη- Διαιθυλαιθέρα και Μεθανόλη (εμφάνισε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση). Αντίθετα την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης, η ένωση αυτή ανιχνεύτηκε μόνο στο δείγμα που περιείχε Μεθανόλη-διαιθυλαιθέρα, σε συγκέντρωση μικρότερη από αυτή της έβδομης ημέρας.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ ΜG/LΤΟΥ ΚΑΠΡΙΛΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΚΝΟΥΝ ΤΟ ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST P<0.05)

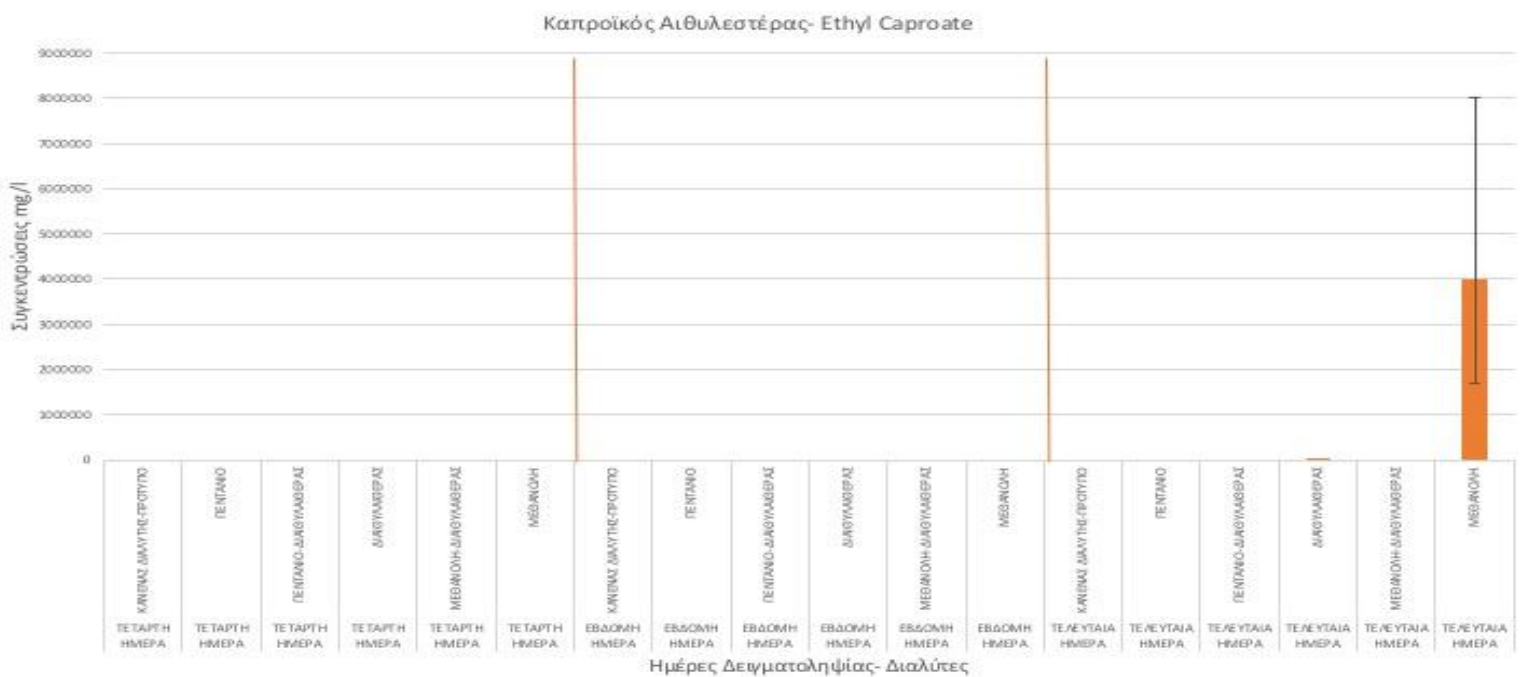
Στο διάγραμμα 5 παρατηρείται ότι την τέταρτη ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης ο Καπριλικός Αιθυλεστέρας ανιχνεύτηκε σε ελάχιστη συγκέντρωση μόνο στο δείγμα με την Μεθανόλη, αντιθέτως με την έβδομη ημέρα, κατά την οποία ανιχνεύτηκε τόσο σε αυτό το δείγμα όσο και σε αυτά που περιείχαν Πεντάνιο-Διαιθυλαιθέρα, Διαιθυλαιθέρα και Μεθανόλη-Διαιθυλαιθέρα σε συγκεντρώσεις που δεν είχαν ουσιαστική στατιστική διαφορά. Την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης, παρατηρείται ότι η συγκεκριμένη ένωση ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα, με τις μεγαλύτερες τιμές να εμφανίζονται στο δείγμα Μεθανόλης-Διαιθυλαιθέρα και Διαιθυλαιθέρα σε συγκεντρώσεις που δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους

2- μέθυλο-Βουτυρικός Αιθυλεστέρας- ethyl-2-methyl-butyrate



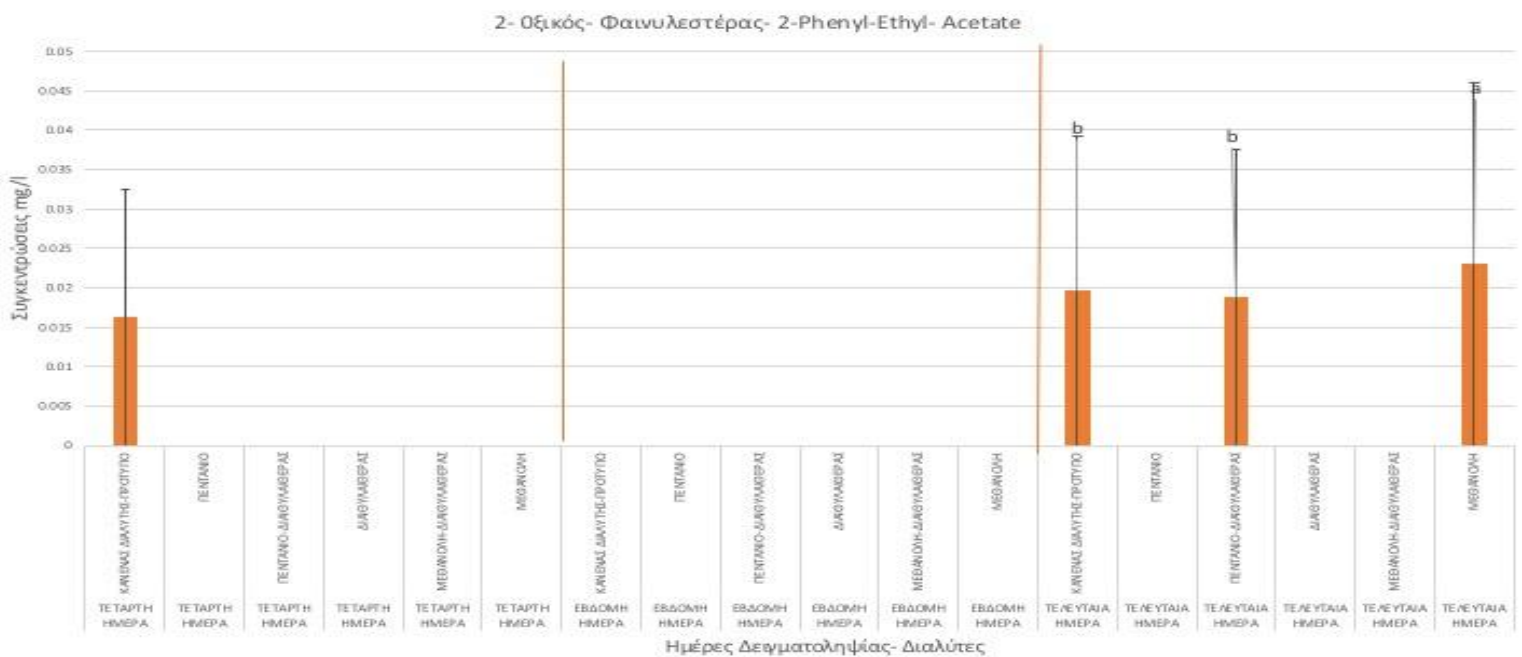
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ MG/L ΤΟΥ 2- ΜΕΘΥΛΟ-ΒΟΥΤΥΡΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΟ ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST P<0.05)

Στο διάγραμμα 6 παρατηρείται ότι ο 2-μέθυλο-Βουτυρικός Αιθυλεστέρας ανιχνεύτηκε μόνο την τέταρτη και την έβδομη ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης στο Πρότυπο και στα δείγματα με Πεντάνιο, Πεντάνιο-Διαθυλαιθέρα.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ MG/LΤΟΥ ΚΑΠΡΟΪΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΟ \pm ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST $P < 0.05$)

Η πορεία ανίχνευσης του Καπροϊκού Αιθυλεστέρα περιγράφεται στο διάγραμμα 7. Σύμφωνα με το Παράρτημα 1, η συγκεκριμένη ένωση έχει ανιχνευτεί σε απειροελάχιστες συγκεντρώσεις την τέταρτη ημέρα (Μεθανόλη), την έβδομη ημέρα (Πρότυπο, Πεντάνιο-Διαιθυλαιθέρας, Διαιθυλαιθέρας, Μεθανόλη-Διαιθυλαιθέρας, Μεθανόλη) αλλά και την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης (Πρότυπο, πεντάνιο, Πεντάνιο-Διαιθυλαιθέρας, Διαιθυλαιθέρας, Μεθανόλη). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση του Καπροϊκού Αιθυλεστέρα ανιχνεύτηκε την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης στο δείγμα με τη Μεθανόλη.



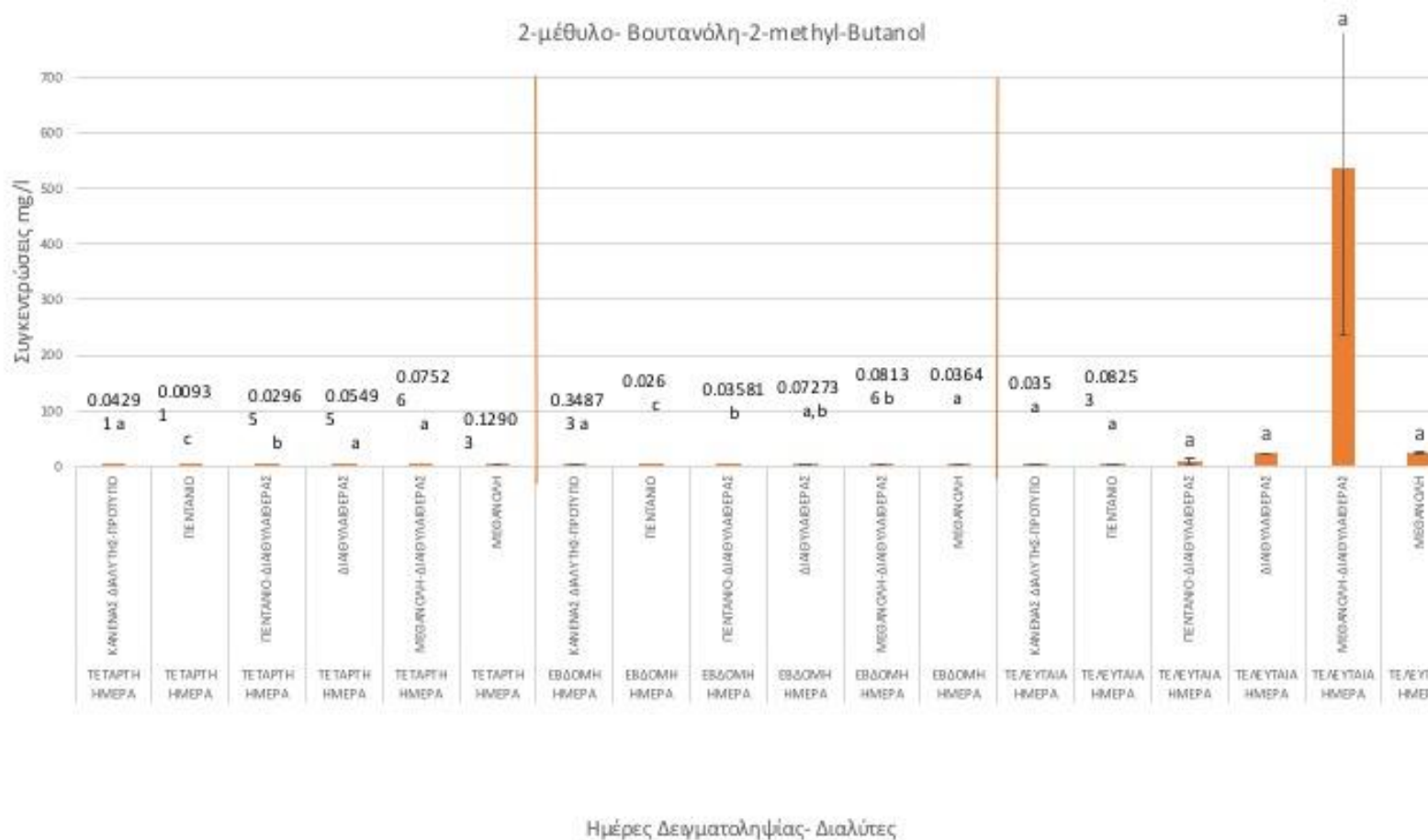
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ MG/L ΤΟΥ 2- ΟΞΙΚΟΥ ΦΑΙΝΥΛΕΣΤΕΡΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΟ ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST $P < 0.05$)

Ο 2-Οξικός Φαινυλεστέρας που περιγράφεται στο διάγραμμα 8, παρατηρείται ότι έχει ανιχνευτεί μόνο την τέταρτη μέρα ζύμωσης (Πρότυπο) και την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης σε τρία δείγματα. Αυτά τα δείγματα είναι το Πρότυπο, το Πεντάνιο-Διαθυλαϊθέρας και η Μεθανόλη, η συγκέντρωση της οποίας παρουσιάζει στατιστικές διαφορές με τις συγκεντρώσεις που είχε ο 2-Οξικός Φαινυλεστέρας στα άλλα δύο δείγματα.

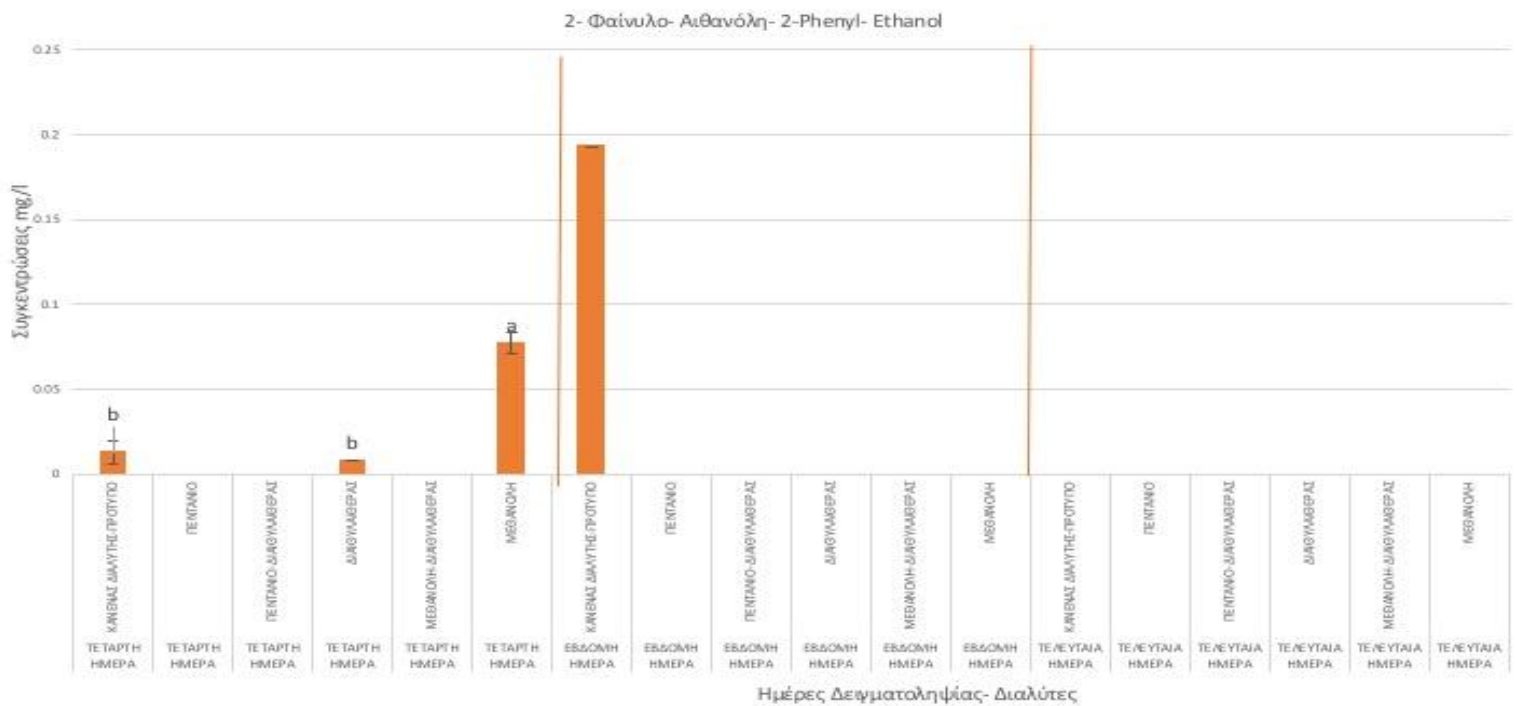
Εκτός από τους Εστέρες που αναλύθηκαν παραπάνω, καθώς ανιχνεύτηκαν στα προς ανάλυση δείγματα στις τρεις ημέρες της αλκοολικής ζύμωσης που μελετήθηκαν, αξίζει να σημειωθεί ότι ο Οξικός Ισοβουτυλεστέρας, ο Οξικός Εξυλεστέρας, ο Ισοβαλερικός Αιθυλεστέρας και ο Δεκανοϊκός Αιθυλεστέρας δεν ανιχνεύτηκαν ποθενά.

4.3.2 Αλκοόλες

Στο διάγραμμα 9 περιγράφεται η πορεία ανίχνευσης της 2-μέθυλο-Βουτανόλης. Παρατηρείται ότι η συγκεκριμένη ένωση έχει ανιχνευτεί σε όλα τα δείγματα όλες τις ημέρες της δειγματοληψίας, σε συγκεντρώσεις που δεν έχουν ουσιαστική στατιστική διαφορά. Παράλληλα παρατηρείται ότι οι μέγιστες τιμές συγκέντρωσης της 2-μέθυλο Βουτανόλης λαμβάνονται την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης και πιο συγκεκριμένα στο δείγμα που περιείχε Διαθυλαιθέρα-Μεθανόλη.

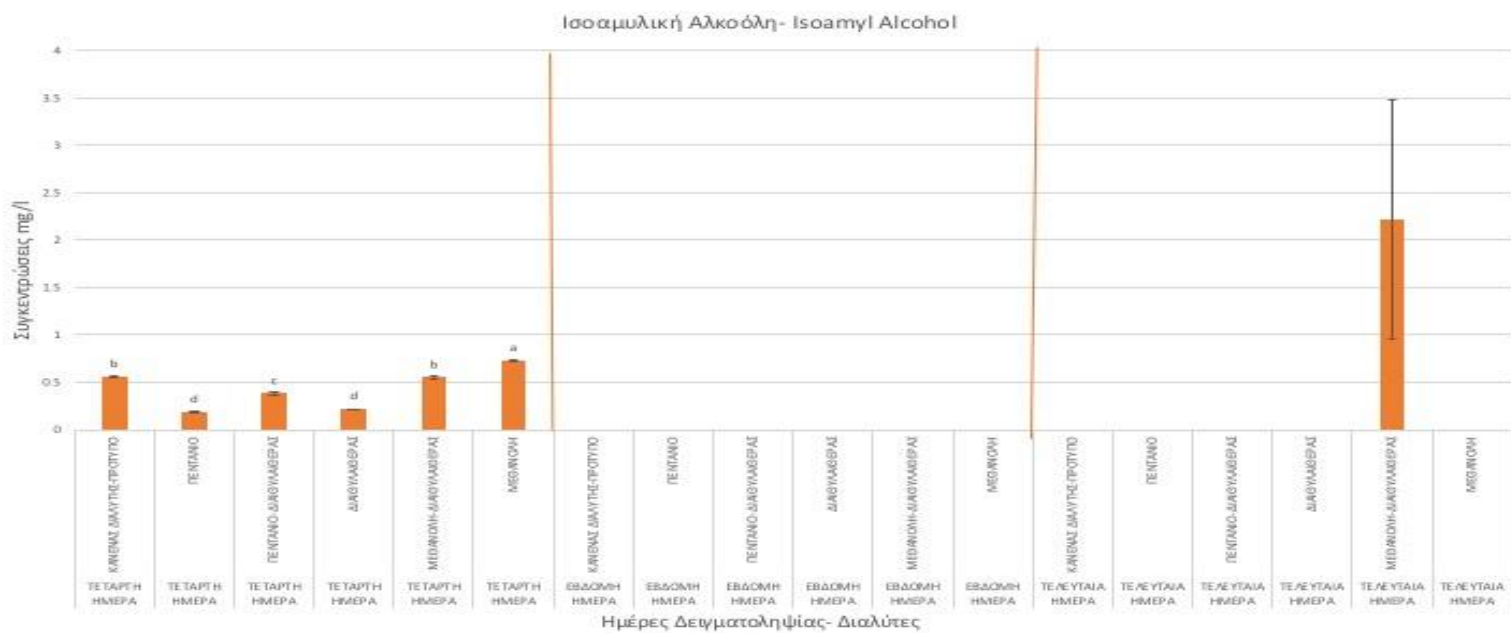


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ MG/L ΤΟΥ 2- ΜΕΘΥΛΟ ΒΟΥΤΑΝΟΛΗΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΟ ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST P<0.05)



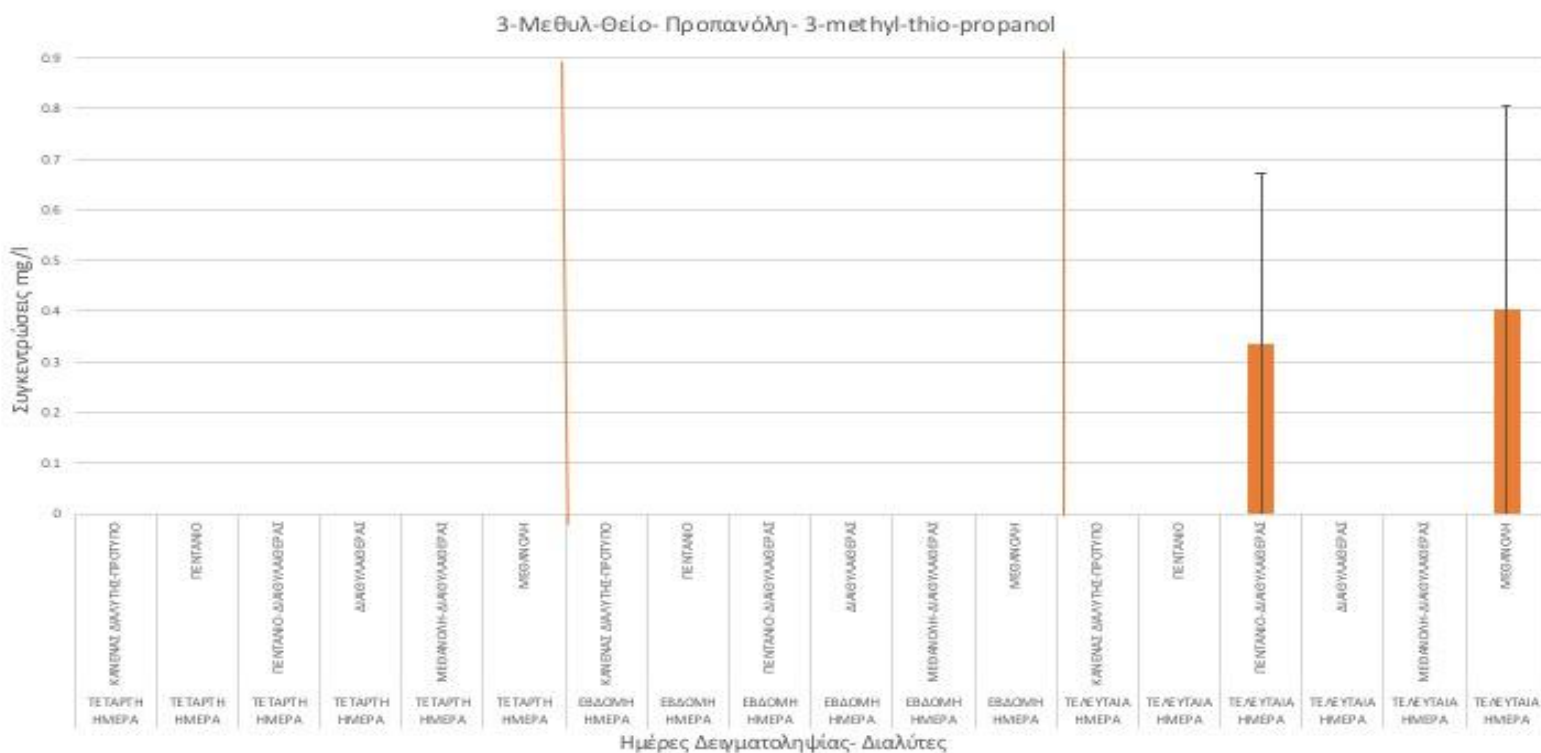
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ MG/L ΤΟΥ 2- ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΟ ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST P<0.05)

Στο διάγραμμα 10, παρατηρείται ότι η 2-Φαίνυλο- Αιθανόλη έχει ανιχνευτεί στα δείγματα μόνο την τέταρτη και την έβδομη ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης. Αρχικά την τέταρτη ημέρα της δειγματοληψίας ανιχνεύτηκε στο Πρότυπο, στο δείγμα του Διαθυλαιθέρα και της Μεθανόλης, με τις τιμές των συγκεντρώσεων των δύο πρώτων δειγμάτων να διαφέρουν στατιστικά με τη συγκέντρωση του δείγματος της Μεθανόλης. Αντίθετα όμως με την τέταρτη ημέρα, την έβδομη η συγκεκριμένη ένωση ανιχνεύτηκε μόνο στο Πρότυπο δείγμα, με τη συγκέντρωση να λαμβάνει τη μεγαλύτερη τιμή από όλες τις προηγούμενες.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ ΜG/LΤΗΣ ΙΣΟΑΜΥΛΙΚΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΤΟ ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST P<0.05)

Στο διάγραμμα 11, περιγράφονται οι συγκεντρώσεις της Ισοαμυλικής αλκοόλης που ανιχνεύτηκε στα δείγματα την τέταρτη, έβδομη αλλά και τελευταία ημέρα της αλκοολικής τους ζύμωσης. Με μία πρώτη ματιά παρατηρείται εύκολα ότι η συγκεκριμένη ένωση έχει ανιχνευτεί μόνο την τέταρτη και την τελευταία ημέρα της δειγματοληψίας. Κατά την τέταρτη ημέρα βρέθηκε σε όλα τα δείγματα σε συγκεντρώσεις που διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους, ενώ την τελευταία ημέρα ανιχνεύτηκε μόνο στο δείγμα Διαιθυλαιθέρα-Μεθανόλης, σε συγκέντρωση εμφανώς μεγαλύτερη από αυτές της τέταρτης ημέρας της δειγματοληψίας.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ MG/LΤΗΣ 3-ΜΕΘΥΛ-ΘΕΙΟ-ΠΡΟΠΑΝΟΛΗΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ. ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΔΕΙΚΝΟΥΝ ΤΟ ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΤΟΥ Μ.Ο ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ. ΤΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ (TUKEYS TEST P<0.05)

Το διάγραμμα 12, παρουσιάζει τις τιμές των συγκεντρώσεων της 3-μέθυλ-θειο-Προπανόλης, που ανιχνεύτηκε στα δείγματα με τους διαφορετικούς διαλύτες που μελετήθηκαν. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, η συγκεκριμένη ένωση ανιχνεύτηκε μόνο την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης τόσο στο δείγμα Πεντανίου-Διαθυλαιθέρα, όσο και σε αυτό της Μεθανόλης.

Τα παραπάνω διαγράμματα περιέγραψαν την πορεία ανίχνευσης και τη συγκέντρωση των αλκοολών που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα. Όμως, υπήρχαν και αλκοόλες όπως οι 1-Εξανόλη, cis-3-εξέν-1-όλη οι οποίες δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα δείγμα καμία ημέρα της δειγματοληψίας.

4.3.3 Τερπένια

Τα Τερπένια των οποίων η ύπαρξη ερευνήθηκε στα δείγματα, ήταν η Λιναλόλη, η 3,7-διμέθυλο-2,6-οκταδιεν-1-όλη (=Νερόλη= cis Γερανιόλη), η Σιτρονελόλη και η β- Ιονόνη. Σε καμία ημέρα δειγματοληψίας (τέταρτη, έβδομη, τελευταία ημέρα ΑΖ) δεν ανιχνεύτηκε κάποιο από αυτά στα δείγματα με τους διαλύτες τα οποία αναλύθηκαν.

4.3.4 Αποτελέσματα των παραπάνω Διαγραμμάτων σε μορφή Πίνακα

	ΔΙΑΛΥΤΕΣ	ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΑΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΙΣ ΗΜΕΡΕΣ ΤΗΣ ΑΖ ΟΠΟΥ ΕΓΙΝΕ Η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ										
		Ethy 1 buty rate	Ethyl isobutyra te	Isoamy l acetate	Ethyl caprylate	Ethyl caproate	Ethyl-2- methyl butyrate	2- phenyl ethyl acetate	2- methyl butanol	2 pheny l ethan ol	Isoamyl alcohol	3 methyl thio propano l
ΤΕΤΑΡΤΗ ΗΜΕΡΑ ΑΖ	ΧΩΡΙΣ ΔΙΑΛ/ΤΗ ΠΡΟΤΥΠΟ		X				X	X	X	X	X	
	ΠΕΝΤΑΝΙΟ	X						X		X		
	ΠΕΝΤΑΝΙΟ ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ	X	X					X		X		
	ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ	X	X					X	X	X		
	ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ ΜΕΘΑΝΟΛΗ		X					X		X		
	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	X			X	X		X	X	X		
ΕΒΔΟΜΗ ΗΜΕΡΑ	ΧΩΡΙΣ ΔΙΑΛ/ΤΗ ΠΡΟΤΥΠΟ	X	X			X		X	X			
	ΠΕΝΤΑΝΙΟ		X				X	X				

	ΠΕΝΤΑΝΙΟ ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ	X	X		X	X	X		X			
	ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ	X	X		X	X			X			
	ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ ΜΕΘΑΝΟΛΗ	X	X	X	X	X			X			
	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	X	X	X	X	X			X			
ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΗΜΕΡΑ ΑΖ	ΧΩΡΙΣ ΔΙΑΛ/ΤΗ ΠΡΟΤΥΠΟ	X			X	X	X	X				
	ΠΕΝΤΑΝΙΟ	X	X		X		X		X			
	ΠΕΝΤΑΝΙΟ ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ	X			X	X		X	X			X
	ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ	X			X	X			X			
	ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ ΜΕΘΑΝΟΛΗ			X	X	X			X		X	
	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	X	X		X	X	X	X	X			X

4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ- ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑ (GC-O)

Στον παρακάτω πίνακα περιγράφεται ο ποιοτικός προσδιορισμός των πτητικών συστατικών των δειγμάτων των διαφορετικών Διαλυτών (κανένας διαλύτης-πρότυπο, Πεντάνιο, Διαιθυλαιθέρας- Πεντάνιο, Διαιθυλαιθέρας, Διαιθυλαιθέρας – Μεθανόλη, Μεθανόλη) κατά την τελευταία ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης. Συνολικά έγιναν τέσσερις επαναλήψεις για κάθε δείγμα (Πίνακας 12).

Στην πρώτη στήλη αναγράφεται ο χρόνος αντίληψης του αρώματος/ οσμής από τον αναλυτή κατά τη διαδικασία διεξαγωγής του πειράματος. Οι χρόνοι κατά τους οποίους οι αναλυτές ανίχνευσαν το ίδιο άρωμα/οσμή σε συνεχόμενους χρόνους, αναγράφηκαν ως Χρονικό διάστημα.

ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΤΙΑΗΨΗΣ ΑΡΩΜΑΤΟΣ/ ΟΣΜΗΣ (RT)	ΑΡΩΜΑ/ΟΣΜΗ	ΧΩΡΙΣ ΔΙΑΛΥΤΗ- ΠΡΟΤΥΠΟ	ΠΕΝΤΑΝΙΟ	ΠΕΝΤΑΝΙΟ- ΔΙΑΙΘ/ΕΡΑΣ	ΔΙΑΙΘ/ΘΕΡΑΣ	ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ- ΜΕΘΑΝΟΛΗ	ΜΕΘΑΝΟΛΗ
8.35	Λουλούδι		X				
8.91	Καμμένο			X			
8.92	Λουλούδι				X		
9.2-9.45	Ψωμί		X				
9.52-9.76	Λουλούδι					X	X
9.6	Λουλούδι			X	X		
10.40	Πρασινίλα				X	X	
11.45	Ιδρώτας	X			X		
14-14.9	Τυρί						X
15.02-15.2	Καμμένη τρίχα					X	X
15.38	Λουλούδι	X				X	
16.08	Καβουρδισμένο	X			X		
16.09	Ξινίλα		X				
17-17.4	Λουλούδι			X			
17.59-18.10	Πρασινίλα						
17.95.18.80	Λουλούδι			X	X	X	X
19.03	Καμμένη τρίχα						
20.51	Γιαούρτι	X				X	
22.39-23	Καυστικό	X					X
23.8	Φρούτο				X		
25.67-26	Πρασινίλα			X			

26.12	Τριαντάφυλλο	X					
28.36-29.50	Καμμένο λάστιχο		X				X
30.50	Ζύμη			X	X		
31.00	Ξινισμένο						
31.46	Λουλούδι					X	
34.43-35.70	Βανίλια		X				
36.89	Πασχαλιά				X		X
39.55	Λουλούδι						X
40.00	Καμμένο ψωμί				X		
40.54	Λουλούδι			X	X		
42.57	Καβουρδισμένο				X		
42.67	Καμμένη τρίχα	X					
43.87-44.60	Πρασινίλα		X		X		
45.5	Λουλούδι	X					

Πίνακας 12 Αποτελέσματα του ποιοτικού προσδιορισμού των πτητικών συστατικών των δειγμάτων που έγιναν με τη μέθοδο της Ολφακτομετρίας.

4.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕΤΡΙΑΣ ΠΙΕΣΗΣ (MPLC)

Στη συγκεκριμένη μέθοδο συλλέχθηκαν συνολικά 7 κλάσματα με ενώσεις που παρασύρθηκαν από οίνο Βιδιανού κατά τη χρήση δύο διαφορετικών συστημάτων διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας (όπως αναφέρεται και στην ενότητα 3.4 της παρούσας πτυχιακής εργασίας). Από τα 7 κλάσματα, τα τρία πρώτα προήλθαν από το πρώτο σύστημα διαλυτών (Πεντάνιο-Διαιθυλαιθέρας), ενώ τα 3 τελευταία από τη χρήση του δεύτερου συστήματος (Διαιθυλαιθέρας- Μεθανόλη). Παράλληλα, το

ενδιάμεσο κλάσμα δημιουργήθηκε κατά την αλλαγή των διαφορετικών συστημάτων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν. Τέλος με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS), οι ενώσεις που παρασύρθηκαν από τους διαφορετικούς διαλύτες και υπήρχαν σε κάθε κλάσμα ταυτοποιήθηκαν.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ 1 ^ο ΠΕΝΤΑΝΙΟ- ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ (100%-0%/0%- 100%)	ΣΥΣΤΗΜΑ 2 ^ο ΔΙΑΙΘ/ΡΑΣ- ΜΕΘΑΝΟΛΗ (100%-0%/0%- 100%)	ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΑΝ ΣΤΟ ΚΑΘΕ ΚΛΑΣΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ
1 ^ο Κλάσμα	X		n- Επτάνιο	3.07
			Τετραχλωρομεθυλένιο	5.69
			2,4 Διμεθυλ- Επτάνιο	6.14
			4-Μεθυλο-Οκτάνιο	6.69
			2,4 Διβούτυλο- Φαινόλη	7.01
2 ^ο Κλάσμα	X		2 Μέθυλο- Εξάνιο	2.63
			3 Μέθυλο- Εξάνιο	3.75
			2,2,3,3 Τετραμέθυλο- Εξάνιο	2.92
			n- Επτάνιο	3.11
			Τετραχλωροαιθυλένιο	5.72
			4 Μέθυλο- Οκτάνιο	7.71
3 ^ο Κλάσμα	X		Ισοαμλική Αλκοόλη	3.84
			2 Μέθυλο- Βουτανόλη	3.93
			Βουτυρικό οξύ	5.43
			Βουτυρικός Αιθυλεστέρας	5.54
			Προπανοϊκό οξύ	5.93
			Φουρφουράλη	6.55
			3 Εξέν- 1- όλη	7.45
3 ^ο Κλάσμα	X		Οξικός εστέρας της Ισοαμλικής αλκοόλης	8.00
			3 Μεθυλ-Θείο- Προπανόλη	8.36
			3 Οκτανόλη	12.83
			Καπρικός αιθυλεστέρας	13.69
			Οξειδίο της Λιναλόλης	18.12

			2 Φαίνυλο- Αιθανόλη	19.47
			Διαιθυλεστέρας	22.80
			Καπριλικός Αιθυλεστέρας	23.48
			Δεκανοϊκό οξύ	32.29
4 ^ο Κλάσμα	X	X	3 Μέθυλο 1-Βουτανόλη	3.79
5 ^ο Κλάσμα		X	Δεκανοϊκός Αιθυλεστέρας	32.26
			Δωδεκανοϊκός Αιθυλεστέρας	40.21
			Κουμαρίνη	47.38
6 ^ο Κλάσμα		X	Βουτυραλδεύδη	2.68
			Βουτανεδιόλη	5.53
7 ^ο Κλάσμα		X	4 Βινύλ- Γουαϊακόλη	28.65
			1,2 Πυρρόλιο- Πυραζίνη	48.02
			Βενζοπροπανοϊκό οξύ	48.53

5. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

5.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Όπως έχει αναφερθεί και στην ενότητα 1.3.1, οι Εστέρες αποτελούν καθοριστικές ενώσεις για τη διαμόρφωση του αρώματος των νέων οίνων στους οποίους εντοπίζονται, λόγω των φρουτώδων και λουλουδένιων αρωμάτων τους.

Οι πιο σημαντικοί εστέρες που συναντάμε στους οίνους είναι οι αιθυλεστέρες, οι οποίοι δημιουργούνται κατά την Αλκοολική ζύμωση, αφού για τη δημιουργία τους, αντιδρά (αντίδραση συμπύκνωσης) ένα μόριο αιθανόλης και ένα μόριο οξέος (μικρής αλειφατικής αλυσίδας) με την ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Στα δείγματα των διαλυτών που αναλύθηκαν με GC-MS, ανιχνεύτηκαν οι παρακάτω αιθυλεστέρες: Βουτυρικός Αιθυλεστέρας, Ισοβουτυρικός Αιθυλεστέρας, 2- μέθυλο Βουτυρικός Αιθυλεστέρας, Καπριλικός Αιθυλεστέρας και Καπροϊκός Αιθυλεστέρας. Γενικά η

συγκέντρωση των αιθυλεστέρων αυξάνεται κατά την πορεία της Αλκοολικής ζύμωσης, διότι η ποσότητα της Αιθανόλης βρίσκεται σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση¹⁵. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνεται κατά την ανάλυση τόσο του Βουτυρικού όσο και του Ισοβουτυρικού Αιθυλεστέρα, καθώς οι συγκεντρώσεις τους στα δείγματα των διαφορετικών διαλυτών είναι μεγαλύτερες κατά την τελευταία ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης σε σχέση με την έβδομη. Τόσο η μείωση της συγκέντρωσης των συγκεκριμένων εστέρων από την τέταρτη ημέρα στην έβδομη ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης, όσο και η διαφορά της συγκέντρωσης του 2- Μέθυλο Βουτυρικού Αιθυλεστέρα από την έβδομη ημέρα στην τελευταία ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης, εξηγούνται πιθανόν λόγω της αστάθειας των εστέρων, που οδηγεί στη διάσπασή τους στις μονομερείς τους ενώσεις (Αιθανόλη- οξέα μικρής αλειφατικής αλυσίδας)⁹.

Όμοια με τους παραπάνω Αιθυλεστέρες, ο Καπροϊκός και ο Καπριλικός Αιθυλεστέρας παράγονται και αυτοί κατά τη διάρκεια της Αλκοολικής ζύμωσης, από οξέα όμως, που έχουν ενεργοποιηθεί από το συνένζυμο Α (HS- CoA). Με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές¹⁷, οι δύο αυτοί εστέρες παράγονται από τη δράση των ζυμών κατά τη διάρκεια της Αλκοολικής ζύμωσης σε αναερόβιες συνθήκες, ενώ κατά την παλαίωση η συγκέντρωσή τους μειώνεται, λόγω υδρόλυσής τους. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων και στους δύο αυτούς εστέρες συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, αφού έδειξε ότι κατά την τελευταία ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης οι συγκεντρώσεις τόσο του Καπροϊκού όσο και του Καπριλικού Αιθυλεστέρα ήταν μεγαλύτερες σε σχέση με τις απειροελάχιστες συγκεντρώσεις με τις οποίες ανιχνεύτηκαν τις δύο προηγούμενες ημέρες της Αλκοολικής ζύμωσης.

Εκτός από τους Αιθυλεστέρες που αναφέρθηκαν παραπάνω, στα δείγματα των διαφορετικών διαλυτών ανιχνεύτηκαν και οξικοί εστέρες ανώτερων αλκοολών και πιο συγκεκριμένα ο Οξικός εστέρας της Ισοαμυλικής Αλκοόλης και ο Οξικός Φαινυλεστέρας. Ο τελευταίος, ανιχνεύτηκε κατά την τέταρτη ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ στη συνέχεια κατά την έβδομη ημέρα πιθανόν διασπάστηκε και δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα δείγμα. Αντιθέτως, την τελευταία ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης, ξαναδημιουργήθηκε τόσο στο ίδιο δείγμα με την τέταρτη ημέρα (Πρότυπο), όσο και στο δείγμα Πεντανίου- Διαιθυλαιθέρα, όπου λογικά η Αιθανόλη υπήρχε σε μεγαλύτερη ποσότητα. Όσον αφορά τον Οξικό εστέρα της Ισοαμυλικής Αλκοόλης, αυτός ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις την έβδομη ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης αντί για την τελευταία, πράγμα που μπορεί να εξηγηθεί λόγω της αστάθειας των ενώσεων αυτών που προαναφέρθηκε⁹.

Εκτός όμως από τους εστέρες, στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε στα δείγματα των διαφορετικών διαλυτών και η ύπαρξη κάποιων ανώτερων Αλκοολών (Πίνακας 2) τόσο κατά την τέταρτη και την έβδομη ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης, όσο και κατά την τελευταία ημέρα.

Γενικά, οι ανώτερες Αλκοόλες παράγονται από τον *saccharomyces cerevisiae* απευθείας, είτε κατά τον καταβολισμό των σακχάρων είτε από τα αμινοξέα που υπάρχουν στα σταφύλια, διαμέσου των αντιδράσεων Ehrlich με διαδικασία που έχει αναλυθεί στην ενότητα 1.3.2. Συνεπώς, με βάση αυτές τις αντιδράσεις και με τη χρήση των αμινοξέων Leu και IsoLeu παράγονται οι ισοαμυλικές Αλκοόλες και οι αμυλικές Αλκοόλες αντίστοιχα, ενώ με τη χρήση του αμινοξέος Cys παράγονται οι Αλκοόλες που έχουν στο μόριο τους Θείο²⁸. Παράλληλα μελέτες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις όλων των ανώτερων Αλκοολών αυξάνονται με την αύξηση της βιομάζας των ζυμών που παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση αλλά και με την αύξηση της θερμοκρασίας της οινοποίησης²⁹.

Στα δείγματα που αναλύθηκαν ανιχνεύτηκαν οι παρακάτω ανώτερες Αλκοόλες: 2- μέθυλο Βουτανόλη (ενεργός αμυλική αλκοόλη), 2- φαίνυλο Αιθανόλη, Ισοαμυλική Αλκοόλη και η 3- μέθυλο- θείο- Προπανόλη. Όσον αφορά τη 2- μέθυλο Βουτανόλη η ένωση αυτή ανιχνεύτηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο δείγμα που είχε ως διαλύτη Μεθανόλη- Διαιθυλαιθέρα την τελευταία ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης. Η συγκεκριμένη ανώτερη αλκοόλη παράγεται μέσω των αντιδράσεων Ehrlich με τη χρήση του αμινοξέος IsoLeu που προέρχεται από τα σταφύλια (όπως αναφέρθηκε και παραπάνω), συνεπώς, αυτό το σύστημα διαλυτών (Διαιθυλαιθέρας- Μεθανόλη) παρέσυρε από τους φλοιούς των σταφυλιών το αμινοξύ αυτό, σε μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Ομοίως με την ενεργό αμυλική Αλκοόλη, παράγεται και η Ισοαμυλική Αλκοόλη, με τη χρήση όμως του Αμινοξέος Leu. Η συγκεκριμένη ένωση ανιχνεύτηκε τόσο κατά την τέταρτη ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης όσο και κατά την τελευταία. Την τέταρτη ημέρα ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα των διαφορετικών διαλυτών με μεγαλύτερη συγκέντρωση σε αυτό με τη Μεθανόλη, πράγμα που σημαίνει ότι αμινοξύ Leu παρασύρθηκε από όλους τους διαλύτες αλλά ο ιδανικότερος ήταν η Μεθανόλη, διότι παρέσυρε την επιθυμητή ένωση σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Όμως κατά την πορεία της Αλκοολικής ζύμωσης πιθανόν η ένωση αυτή διασπάστηκε, ενώ ο πιθανότερος λόγος που ανιχνεύτηκε την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης είναι λόγω αυτόλυσης των ζυμών στο συγκεκριμένο δείγμα. Με

την αυτόλυση αυτή απελευθερώνονται στον οίνο συστατικά του κυτταροπλάσματος των ζυμών, όπως αμινοξέα, νουκλεοτίδια αλλά και κάποια λιπαρά οξέα¹²⁵. Όμοια, λόγω αυτόλυσης ζυμών στα δείγματα Πεντανίου- Διαιθυλαιθέρα και Μεθανόλης μπορεί να εξηγηθεί, η ανίχνευση της 3- μέθυλ- Θείο Προπανόλης αποκλειστικά κατά την τελευταία ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης στα δείγματα αυτά, πράγμα που σημαίνει ότι πιθανόν κανένας διαλύτης δεν ήταν ικανός για να παρασύρει το αμινοξύ Cys από τους φλοιούς των σταφυλιών.

Όσον αφορά την 2- φαίνυλο Αιθανόλη, (η οποία δεν παράγεται από τις αντιδράσεις Ehrlich), πιθανόν δημιουργήθηκε από τον *saccharomyces cerevisiae* απευθείας κατά τον καταβολισμό των σακχάρων. Κατά την ανάλυση των δειγμάτων παρατηρήθηκε ότι κατά την αλκοολική ζύμωση του πρότυπου δείγματος και ιδιαίτερα την έβδομη ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης η συγκεκριμένη ένωση έλαβε τη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης. Ιδιαίτερη εντύπωση (και ανάγκη περισσότερης μελέτης) όμως προκαλεί το γεγονός ότι δεν δημιουργήθηκε σε όλα τα δείγματα των διαλυτών, και ότι στα δείγματα του Διαιθυλαιθέρα και της Μεθανόλης την έβδομη και την τελευταία ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης η συγκέντρωσή της έλαβε μηδενικές τιμές.

Γενικά, οι συγκεντρώσεις τόσο των ανώτερων αλκοολών, όσο και των εστέρων έπρεπε να αυξάνονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (από την τέταρτη ημέρα της Αλκοολικής ζύμωσης έως την τελευταία) λόγω του καταβολισμού των σακχάρων, των αντιδράσεων Ehrlich, της αυτόλυσης των ζυμών - και της απελευθέρωσής τους στον οίνο, αλλά και λόγω της συνεχόμενης παραγωγής της Αιθανόλης αντίστοιχα. Συνεπώς χρειάζεται περαιτέρω ανάλυση και επανάληψη των συγκεκριμένων πειραμάτων, με σκοπό την εξήγηση της μείωσης της συγκέντρωσης των ενώσεων αυτών κατά την πορεία της Αλκοολικής ζύμωσης. Παράλληλα χρειάζεται και η διεξαγωγή των συγκεκριμένων πειραμάτων με διαφορετικά στελέχη ζυμών, καθώς η παραγωγή των Αλκοολών και των Εστέρων εξαρτάται άμεσα και από αυτά.

Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι κανένα Τερπένιο δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα των διαλυτών, πράγμα που σημαίνει ότι κατά πάσα πιθανότητα κανένας διαλύτης από αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν (Πεντάνιο,

◦§Ï

¹²⁵Εισαγωγή στη Βιοχημεία, Διαμαντίδης 2^η έκδοση

Πεντάνιο- Διαιθυλαιθέρας, Διαιθυλαιθέρας, Μεθανόλη- Διαιθυλαίθερας, Μεθανόλη) δεν ήταν ικανός να παρασύρει τις ενώσεις αυτές από τους φλοιούς των σταφυλιών.

5.2 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κατά τον ποιοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων των διαφορετικών διαλυτών με τη χρήση Ολφακτομετρίας ήταν σχετικά αναμενόμενα. Τα κυριότερα αρώματα τα οποία εντοπίστηκαν ήταν αρώματα Λουλουδιών και πρασινάδας τα οποία γενικά προέρχονται τόσο από τα τερπένια (τα οποία όμως δεν ανιχνεύτηκαν στα δείγματα), όσο και από τις ανώτερες Αλκοόλες και πιο συγκεκριμένα από τη 2- φαίνυλο Αιθανόλη (τριαντάφυλλο) και την Ισοαμυλική Αλκοόλη (φύλλο/ πρασινίλα). Παράλληλα, εντοπίστηκαν «βαριές» οσμές όπως αυτές της ζύμης, του τυριού αλλά και του ιδρώτα, οι οποίες κατά πάσα πιθανότητα προέρχονται είτε από οξέα μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας (Βουτυρικό οξύ, Εξανοϊκό οξύ, Οκτανοϊκό οξύ) είτε από τον Ισοβαλερικό εστέρα (ζύμη), ο οποίος όμως δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα. Ιδιαίτερα εντυπωσιακό ήταν το γεγονός ότι δεν ανιχνεύτηκαν αρώματα φρούτων και συγκεκριμένα αυτό του βερίκοκου, το οποίο αποτελεί το χαρακτηριστικό άρωμα της ποικιλίας Βιδιανού^{3,4}.

Τα περισσότερα αρώματα/ οσμές καταγράφηκαν στο δείγμα που είχε ως διαλύτη Διαιθυλαιθέρα (μεσαίας πολικότητας). Αντίθετα, στο δείγμα που είχε ως διαλύτη Πεντάνιο, (άπολος διαλύτης) καταγράφηκαν τα λιγότερα. Αυτό το γεγονός προκαλεί εντύπωση και χρήζει περαιτέρω ανάλυσης, αφού κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό, την τελευταία ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης στο πρότυπο δείγμα (κανένας διαλύτης) ταυτοποιήθηκαν οι περισσότερες ενώσεις, ενώ στο δείγμα με το διαιθυλαιθέρα ταυτοποιήθηκαν οι λιγότερες.

Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η μη καταγραφή αρωμάτων μελιού ή κεριού, τα οποία χαρακτηρίζουν την ύπαρξη του Καπροϊκού, Καπριλικού αλλά και του Βουτυρικού Αιθυλεστέρα, τα οποία ανιχνεύτηκαν στα δείγματα κατά την ανάλυσή τους με GC-MS.

5.3 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕΤΡΙΑΣ ΠΙΕΣΗΣ (MPLC)

Κατά την μελέτη του οίνου από σταφύλια της ποικιλίας Βιδιανό, παρατηρήθηκε ότι οι περισσότερες πτητικές ενώσεις ανιχνεύτηκαν στο 3^ο κλάσμα, το οποίο δημιουργήθηκε κατά την εφαρμογή του 1^{ου} συστήματος διαλυτών. Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις διαχωρίστηκαν και συλλέχτηκαν, καθώς η συγκέντρωση του Πεντανίου (άπολος διαλύτης) μειωνόταν και αυξανόταν αυτή του Διαιθυλαιθέρα (διαλύτης μεσαίας πολικότητας).

Αρκετό ενδιαφέρον προκαλεί η ανίχνευση της Κουμαρίνης (παράγωγο των Κιναμμομικών οξέων), της Βινύλ- Γουαϊακόλης (πτητική Φαινόλη) και της Φουρφουράλης (Αλδεΐδη). Η πρώτη και η τελευταία ένωση γενικά μπορεί να ανιχνευτεί σε οίνους που έχουν ωριμάσει σε βαρέλι, στοιχείο που δημιουργεί ερωτηματικά, αφού ο οίνος από Βιδιανό που αναλύθηκε δεν είχε υποστεί ωρίμανση σε ξύλινο μέσο. Αντίθετα όμως με την ύπαρξη της Κουμαρίνης, η ύπαρξη της Φουρφουράλης μπορεί να εξηγηθεί, αφού η συγκεκριμένη ένωση μπορεί να έχει προέλθει από σταφύλια προσβεβλημένα από ευγενή σήψη. Από την άλλη πλευρά, η Βινύλ- Γουαϊακόλη μπορεί να παραχθεί από τη δράση μικροοργανισμών, όπως ζύμες, γένη Βρετανομυκήτων αλλά και από Βακτήρια.

6. ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των εστέρων στην πλειοψηφία τους συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, ενώ τυχόν παρεκκλίσεις από αυτά εξηγούνται με πιθανή διάσπαση αυτών των ενώσεων λόγω αστάθειάς τους.

Το κατάλληλο σύστημα διαλυτών για την απομόνωση των αμινοξέων IsoLeu/Leu που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την παραγωγή Αμυλικών και Ισοαμυλικών Αλκοολών ήταν ο Διαιθυλαιθέρας-Μεθανόλη/ Μεθανόλη αντίστοιχα. Αντίθετα, κανένας Διαλύτης- σύστημα Διαλυτών δεν ήταν ικανό να παρασύρει τα Τερπένια από τους φλοιούς, γι' αυτό και δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου.

Τα αποτελέσματα της Ολφακτομετρίας ήταν σχετικά αναμενόμενα αφού τα αρώματα/ οσμές που ανιχνεύτηκαν ήταν τα χαρακτηριστικά των ενώσεων που

ταυτοποιήθηκαν. Παράλληλα, τα περισσότερα αρώματα καταγράφηκαν στα δείγματα που είχαν διαλύτη μέτριας πολικότητας (Διαθυλαιθέρα), ενώ τα λιγότερα καταγράφηκαν σε αυτά που είχαν άπολο διαλύτη (Πεντάνιο). Όμως ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί η μη καταγραφή αρωμάτων κεριού/μελιού που σχετίζονται με την ύπαρξη του Καπροϊκού, Καπριλικού και του Βουτυρικού Αιθυλεστέρα.

Όσον αφορά την ανάλυση του οίνου, οι περισσότερες ενώσεις διαχωρίστηκαν και συλλέχτηκαν έπειτα από την εφαρμογή συστήματος διαλυτών μέτριας πολικότητας.

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

HMEPES		ENOCPE																	
ΔΙΑΤΥΠΕΣ		2-methyl-ethyl acetate	2-methyl-ethyl alcohol	ethylacetate	ethylpropylate	ethylbutylate	ethylisobutylate	2-methyl-1-butanol	ethyl-2-methyl-butylate	isomylalcohol	6-3-heven-ol	2,5- octadien-1- diol	ethyl isovalerate	ethyl decyl 3-methyl- propyl	1-phenol field	isobutyl acetate	isomylacetate	heptyl acetate	
T	KANEMAS	0.06531 ± 0.00088	0.02455 ± 0.00699 ab	ND	ND	ND	0.12333 ± 0.01044 b	0.12333 ± 0.01072 a	0.1889 ± 0.0493 a	0.1005 ± 0.00931 c	ND	0.1005 ± 0.00931 d	0.5536 ± 0.01177 b	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	PERIANO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T	ΔΙΑΘΥΜΑ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A	GEPLAS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P	PERIANO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H	ΔΙΑΘΥΜΑ	ND	0.00455 ± 0.000289 b	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H	EPAL	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M	ΔΙΑΘΥΜΑ	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M	EPAL	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	PERIANO	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A	GEPLAS	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
O	PERIANO	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M	ΔΙΑΘΥΜΑ	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M	EPAL	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H	ΔΙΑΘΥΜΑ	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H	EPAL	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	PERIANO	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	MEΓΑΝΟΛΑ	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P	H	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A	MEΓΑΝΟΛΑ	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B	H	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A	H	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Z	H	ND	ND	ND	ND	0.2714 ± 0.0137 a	0.1738 ± 0.01894 b	0.2717 ± 0.0545 a	ND	0.2135 ± 0.0089 d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T	KANEMAS	0.05994 ± 0.00076 b	ND	0.08374 ± 0.00976 a	0.1323 ± 0.0079 b	0.15107 ± 0.0188 a	0.16955 ± 0.00271 a	4.108 ± 0.035 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	PERIANO	ND	ND	ND	ND	0.1033 ± 0.0051 b	0.12333 ± 0.00538 a	2.76 ± 0.0053 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A	ΔΙΑΘΥΜΑ	ND	ND	ND	ND	0.12333 ± 0.00538 a	0.14284 ± 0.0021 a	2.76 ± 0.0053 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	GEPLAS	0.00887 ± 0.00018 b	ND	0.12002 ± 0.00957 a	0.11631 ± 0.0092 b	0.17694 ± 0.00074 a	ND	10.67 ± 16.01 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
T	PERIANO	ND	ND	0.12002 ± 0.00957 a	0.11631 ± 0.0092 b	0.17694 ± 0.00074 a	ND	10.67 ± 16.01 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A	ΔΙΑΘΥΜΑ	ND	ND	0.12002 ± 0.00957 a	0.11631 ± 0.0092 b	0.17694 ± 0.00074 a	ND	10.67 ± 16.01 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A	EPAL	ND	ND	1.16798 ± 0.1615805 a	1.5539 ± 0.1794 ab	0.47192 ± 0.2395 a	ND	22.57 ± 1.66 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H	ΔΙΑΘΥΜΑ	ND	ND	1.16798 ± 0.1615805 a	1.5539 ± 0.1794 ab	0.47192 ± 0.2395 a	0.4284 ± 0.0021 a	22.57 ± 1.66 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M	EPAL	ND	ND	1.16798 ± 0.1615805 a	1.5539 ± 0.1794 ab	0.47192 ± 0.2395 a	0.4284 ± 0.0021 a	22.57 ± 1.66 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	MEΓΑΝΟΛΑ	ND	ND	1.16798 ± 0.1615805 a	1.5539 ± 0.1794 ab	0.47192 ± 0.2395 a	0.4284 ± 0.0021 a	22.57 ± 1.66 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P	H	ND	ND	1.16798 ± 0.1615805 a	1.5539 ± 0.1794 ab	0.47192 ± 0.2395 a	0.4284 ± 0.0021 a	22.57 ± 1.66 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A	H	ND	ND	1.16798 ± 0.1615805 a	1.5539 ± 0.1794 ab	0.47192 ± 0.2395 a	0.4284 ± 0.0021 a	22.57 ± 1.66 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B	MEΓΑΝΟΛΑ	ND	ND	1.16798 ± 0.1615805 a	1.5539 ± 0.1794 ab	0.47192 ± 0.2395 a	0.4284 ± 0.0021 a	22.57 ± 1.66 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A	H	ND	ND	1.16798 ± 0.1615805 a	1.5539 ± 0.1794 ab	0.47192 ± 0.2395 a	0.4284 ± 0.0021 a	22.57 ± 1.66 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Z	H	0.02295 ± 0.00092 a	ND	40.6700 ± 23.86384 a	0.15302 ± 0.0106 b	0.19099 ± 0.0279 a	0.12265 ± 0.00898 a	13.271 ± 1.72 a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allen M.S., Lacey M.J. and Boyd S.J. (1995a).** *J. Agric Food Chem.*, 43, 769
- Alentejo Portugal, Maria Joã o Cabrita, A.M. Costa Freitas, Olga Laureano, Daniela Borsa, Rocco Di Stefano.** Aroma compounds in varietal wines
- Amerine, M. A., and Roessler, E. B. (1983).** “Wines, Their Sensory Evaluation.” 2nd ed., Freeman, San Francisco, CA
- Arctander S, (1969).** Perfume and flavour chemicals
- Bayonove C., Guñata Z. and Cordonnier R. (1984).** *Bull. OIV*, 741
- Belancic, A., Agosin, E., Ibacache, A., Bordeu, E., Baumes, R., Razungles, A. and Bayonove, C. (1997).** Influence of sun exposure on the aromatic composition of Chilean Muscat grape cultivars Moscatel de Alejandria and Moscatel rosada. *Amer. J. Enol. Vitic.* 48:181–186
- Benn, S. M., & Peppard, T. L. (1996).** Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 557–566
- Bernet, C., Dirninger, N., Claudel, P., Etievant, P., & Schaeffer, A. (2002).** Application of finger span cross modality matching method (FSCM) by naive assessors for olfactometric discrimination of Gewurztraminer wines. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*, 35, 244–253
- Bertrand (1978).** Les levures de la région viticole de Naoussa (Grèce). These de l’ Univversite de Bordeaux
- Bertrand A. (1983).** volatiles from grape must fermentation, in flavour of distilled beverages, origin and development. Ellis Harwood Ltd.
- Biron C., Cordonnier R., Glory O., Gunata Z. and Sapis J.-C. (1988).** *Conn. Vigne Vin*, 22, 125–134

- Boidron J.-N. (1978).** *Ann. Technol. Agric.*, 27 (1), 141
- Bonino, M., Schellino, R., Rizzi, C., Aigotti, R., Delfini, C., & Baiocchi, C. (2003).** Aroma compounds of an Italian wine (Ruche) by HS-SPME analysis coupled with GC–ITMS. *Food Chemistry*, 80, 125–133
- Bonnlander, B.; Baderschneider, B.; Messerer, M.; Winterhalter, P. (1998)** Isolation of two novel terpenoid glucose esters from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1474-1478.
- Bryson Nathan and Domitille Papillard, Bionisis SA, Le Plessis Robinson(2004),** France, An introduction to OPLC-operation and Applications
- Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruege, V., & Dubourdieu, D. (1998).** Identification of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3095–3099
- Bureau, S. M., Baumes, R. L. and Razungles, A. J. (2000a).** Effects of vine or bunch shading on the glycosylated flavor precursors in grapes of *Vitis vinifera* L. Cv. Syrah. *J. Agric. Food Chem.* 48:1290–1297
- Buttery, R. G., Turnbaugh, J. G., & Ling, L. C. (1988).** Contribution of volatiles to rice aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(5), 1006-1009
- Buettner, A. (2004).** Investigation of potent odorants and afterodor development in two Chardonnay wines using the buccal odor screening system (BOSS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2339–2346
- Callemien, D., Dasnoy, S., & Collin, S. (2006).** Identification of a stalebeer-like odorant in extracts of naturally aged beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1409–1413
- Calo A., Di Stefano R., Costacurta A. and Calo G. (1991).** *Riv. Viticult. Enol.*, 3, 3
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., & Cacho, J. (2005).** Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic headspace gas chromatography–olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5682–5690

Carmen González-Barreiro, Raquel Rial-Otero, Beatriz Cancho-Grande & Jesús Simal-Gándara . Wine Aroma Compounds in Grapes: A Critical Review

Cavin A, Hostettmann K, Dyatmyko W and Pot-terat O (1998) Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Medica* 64: 393}396

Chapman, D. M., Roby, G., Ebeler, S. E., Guinard, J.-X. and Matthews, M. A. (2005). Sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines made from vines with different water status. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11:339–347

Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Gas chromatography–olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1653–1660.

Cutzach, I., Chatonnet, P., Henry, R., & Dubordieu, D. (1997). Identification of volatile compounds with a “Toasty” aroma in heated oak used in barrelmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2217–2224

Darriet P ., Bouchilloux P ., Poupot C., Bugaret Y ., Cler-jeau M., Sauris P., Medina B. and Dubourdiou D. (2001). *Vitis*, 40, 93

Debonneville C., Orsier B., Flament I., Chaintreau A., (2002). Improved hardware and software for quick gas chromatography-olfactometry using CHARM and GC-Snif analysis. *Analytical chemistry* 74, 2345-2351

Darriet, P., Pons, M., Henry, R., Dumont, O., Findeling, V., Cartolaro, P., et al. (2002). Impact odorants contributing to the fungus type aroma from grape berries contaminated by powdery mildew (*Uncinula necator*); incidence of enzymatic activities of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3277–3282

Deibler, K. D., Acree, T. E., & Lavin, E. H. (1999). Solid phase microextraction application in gas chromatography/olfactometry dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1616–1618

Demole E., Enggist P ., Sa“uberli U., Stoll M. and Kovats E. (1970). *Helv. Chim.*

Acta, 53, 541.

Delahunty, C. M., Eyres, G., & Dufour, J.-P. (2006). Gas chromatography–olfactometry. *Journal of Separation Science*, 29, 2107–2125

Deluc, L. G., Quilici, D. R., Decendit, A., Grimplet, J., Wheatley, M. D., Schlauch, K. A., Mé rillon, J.-M., Cushman, J. C. and Cramer, G. R. (2009). Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics*, 10:212

Di Stefano R. and Maggiorotto G. (1993). In *Comptes- Rendus du Symposium International on Connaissance Aromatique des Cé pages et Qualite´ des Vins*, Montpellier, 9–10 February 1993, *Rev. Fr. Œnologie Ed.*

Dubois P. (1993). *Rev. Fr. (Enol., 144,63)*

Dubourdieu, D., and T. Tominaga. (2009). Polyfunctional thiol compounds. In *Wine Chemistry and Biochemistry*. M.V. Moreno-Arribas and M.C. Polo (eds.), pp. 275-293. Springer, New York

Escudero, A, Ferreira, V., Hernandez-Orte, P.,, Lopez, R., & Cacho, J. (1999). Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 864, 77–88

Etievant P.-X., Issanchou S.N. and Bayonove C.-L. (1983). *J. Sci. Food Agric.*, 34, 497.

Fan, W., & Qian, M. C. (2005). Headspace solid phase microextraction and gas chromatography–olfactometry dilution analysis of young and aged Chinese “Yanghe Daqu” liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7931–7938

Fan, W., & Qian, M. C. (2006a). Characterization of aroma compounds of Chinese “Wuliangye” and “Jiannanchun” liquors by aroma extract dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2695–2704

Fan, W., & Qian, M. C. (2006b). Identification of aroma compounds in Chinese

“Yanghe Daqu” liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography/olfactometry. *Flavour Fragrance Journal*, 21, 333–342

Fang, Y., & Qian, M. (2005). Aroma compounds in Oregon Pinot Noir wine determined by aroma extract dilution analysis (AEDA). *Flavour Fragrance Journal*, 20, 22–29

M. Fernandez-Gonzalez et al (2004). Fractionation of glycoside aroma precursors in neutral grapes. Hydrolysis and conversion by *S. cerevisiae*,

Ferrari, G., Lablanquie, O., Cantagrel, R., Ledauphin, J., Payot, T., Fournier, N., et al. (2004). Determination of key odorant compounds in freshly distilled cognac using GC–O, GC–MS, and sensory evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5670–5676

Ferreira, V., Lopez, R., Escudero, A., & Cacho, J. F. (1998). The aroma of Grenache red wine: Hierarchy and nature of its main odorants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 259–267

Ferreira, V., Aznar, M., Lopez, R., & Cacho, J. (2001). Quantitative gas chromatography–olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4818–4824

Ferreira, Petka, J. & Aznar, (2002). Aroma extract dilution analysis. Precision and optimal experimental design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1508–1514

Ferreira, A. C. S., Hogg, T., & Guedes de Pinho, P. (2003). Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1377–1381

Fretz, C., Kanel, S., Luisier, J.-L., & Amado, R. (2005). Analysis of volatile components of Petite Arvine wine. *European Food Research and Technology*, 221, 504–510

Fulton G. Kitson, Barbara S., Larsen, Charles n. McEwen (2000). Gas Chromatography and Mass Spectrometry,

Garofolo A. and Piracci A. (1994). Bull. OIV,67 (757-758),225

Garruti, D. S., Franco, M. R. B., Silva, M. A. A. P., Janzantti, N. S., & Alves, G. L. (2006). Assessment of aroma impact compounds in a cashew apple-based alcoholic beverage by GC–MS and GC–olfactometry. LWT, 39, 372–377

Grosch, W. (2001). Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. Chemical Senses, 26, 533–545

Grossmann M., Sukran I. and Rapp A. (1990). *Deutsche Lebensmitt. Rund.*, 83, 7

Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., & Darriet, P. (2006). Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 9193– 9200

Gunata Z. (1993). *Progress in Flavour Precursor Studies* (eds. P. Schreier and P. Winterhalter), Wurzburg, October 1992

Hanaoka, K., Sieffermann, J.-M., & Giampaoli, P. (2000). Effects of the sniffing air makeup in gas chromatography–olfactometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 2368–2371

Harold M.Mc Nair, James M.Miller, (1998). Basic Gas Chromatography, May (1997)

Helena Stashenko, Carlos Macku and Takayuki shibamoto(1992). Monitoring volatile chemicals formed from must during yeast fermentation.. J. Agric, Food Chem., 40, 2257-2259

Heymann, H., Noble, A. C. and Boulton, R. B. (1986). Analysis of methoxypyrazines in wines. 1. Development of a quantitative procedure. *J. Agric. Food Chem.* **34**:268–271

Hostettmann K., C. Terreaux (2000), Medium pressure liquid chromatography, Encyclopedia of Separation Science, pages 3296-3303

Jackson R.S (1994). Wine sciences. Principles and applications. Academic Press, San Diego.

Koch A. C.LC Doyle, M.A. Matthews, L.E. Williams, and S.E. Ebeler. (2010). 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and its dependence on genotype. *Phytochemistry* 71:2190-2198

Kobayashi, H., Takase, H., Kaneko, K., Tanzawa, F., Takata, R., Suzuki, S. and Konno, T. (2010). Analysis of s-3-(hexan-1-ol)-glutathione and s-3-(hexan-1-ol)-l-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. *Amer. J. Enol. Vitic.* **61**:176–185.

Komes, D., Ulrich, D., & Lovric, T. (2006). Characterization of odoractive compounds in Croatian Rhine Riesling wine, subregion Zagorje. *European Food Research and Technology*, 222, 1–7

Koundouras, S., Marinos, V., Gkoulioti, A., Kotseridis, Y. and van Leeuwen, C. (2006). Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *J. Agric. Food Chem.* 5077–5086

Koundouras, S., Hatzidimitriou, E., Karamolegkou, M., Dimopoulou, E., Kallithraka, S., Tsialtas, J. T., Zioziou, E., Nikolau, N. and Kotseridis, Y. (2009). Irrigation and rootstock effects on the phenolic concentration and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grapes. *J. Agric. Food Chem.* **57**:7805–7813

Larue F., Lafon-Lafourcade S. and Ribéreau-Gayon P. (1982). *CR Acad. Sci., Série III*, 294, 587

Lee, S.-J., & Noble, A. C. (2003). Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay Wines using GC–olfactometry and GC–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8036–8044

Leutert T and Von Arx E (1984) Parative Mitteldruck-Fluoreszenzchromatographie. *Journal of Chromatography* 292: 333-344

Lopez, R., Ferreira, V., Hernandez, P., & Cacho, J. F. (1999). Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: A comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1461–1467

Martin B., Etievant P., Le Quere J.-L. and Schlich P. (1992). *J. Agric. Food. Chem.*, 40, 475

Masuda, J., Okawa, E., Nishimura, K., and Yunome, H. (1984). Identification of 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanone (Sotolon) and ethyl 9-hydroxy-nonanoate in botrytised wine and evaluation of the roles of compounds characteristic of it. *Agric. Biol. Chem.* 48, 2707–2710.

N. Moreira P.Lopes^cH.Ferreira^dM.Cabral^cP. Guedesde Pinho^a. Influence of packaging and aging on the red wine volatile composition and sensory attributes

Mutshuhiro Goti, Kaori Tateishi, Kenki Ebine, Vadim Soloshonok, Christian Roussel, Osamu Kitagawa (2016) Chiral additive induced self-assembly of enantiomers under MPLC conditions preparation of enantiomerically pure samples of 1-(aryl)ethylamines from racemates

Plutowska, B., & Wardencki, W. (2007). Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*, 101, 845–872

Pollien, P., Ott, A., Montigon, F., Baumgartner, M., Munoz-Box, R., & Chaintreau, A. (1997). Hyphenated headspace-gas chromatography-sniffing technique: Screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2630–2637

Rapp, A, Mandery, H.(1986). Wine aroma. *Experientia* 42: 873-884

Rapp, A., and Güntert, M. (1986). Changes in aroma substances during the storage of white wines in bottles. In “The Shelf Life of Foods and Beverages” (G. Char-

alambous, ed.), pp. 141–167. Elsevier, Amsterdam.

Rapp, A., (1998). Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung* 42, 351–363.

Reynolds, A. G., Lowrey, W. D., Tomek, L., Hakimi, J. and de Savigny, C, (2007). Influence of irrigation on vine performance, fruit composition, and wine quality of chardonnay in a cool, humid climate. *Amer. J. Enol. Vitic.* **58**:217–228

Ribereau-Gayon, P., Boidron, J. N., & Terrier, A. (1975). Aroma of Muscat grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 1042–1047

Ribereau- Gayon J., Peyneaud E. and Sudraud P. (1982). *Sciences et Techniques du Vin, Vol I: Analyse et controle des vins*, 2nd edn. Dunod, Paris

Rigaud J., Etie´vant P., Henry R. and Latrasse A. (1986) *Sciences des. Aliments*, 6, 213

Ristic, R., Downey, M. O., Iland, P. G., Bindon, K., Francis, I. L., Herderich, M. and Robinson, S. P. (2007). Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Aust. J. Grape Wine Res.* **13**:53–65

Rodriguez S, Wolfender J-L, Odontuya G, Purev O and Hostettmann K (1995) Xanthones, secoiridoids and Savonoids from *Halenia corniculata*. *Phytochemistry* 40: 1265}1272

Salinas, M.R., Gonzalo, L.A., Pardo, F., Bayonove, C., (1998). Free and bound volatiles of monastrell wines. *Sciences des Aliments* 18, 223–231.

Sánchez-Palomo E., M.E. Alañón , M.C. Díaz-Maroto, M.A. González-Viñ as, M.S. Pérez-Coello .Comparizon of extraction methods for volatile compounds of Muscat grape juice

Schreier P., Drawert F. and Junker A. (1976). *J. Agric. Food Chem.*, 24 (2), 331.

Sefton M.A., Francis I.L. and Williams P.J. (1993). *Am. J. Enol. Viticult.*, 44, 359

Selli, S., Cabaroglu, T., Canbas, A., Erten, H., Nurgel, C., Lepoutre, J. P., et al.

(2004). Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karasu grown in central Anatolia. *Food Chemistry*, 85, 207–213

Soares da Costa, M., Goncalves, C., Ferreira, A., Ibsen, C., Guedes de Pincho, P., & Silva Ferreira, A. C. (2004). Further insights into the role of Methional and Phenylacetaldehyde in Lager Beer Flavor stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7911–7917

Soufleros, Bertrand,(1980). *Conn. Vigne Vin*. 14(2), 97-109

Skoog (2000). Αρχές ενόργανης ανάλυσης

Strauss C.R., Wilson B., Gooley P .R. and Williams P .J. (1986). In *Biogenesis of aromas, Parliament* (ed. Croteau) American Chemical Society, Washington DC, p. 222

Vernin, G., Metzger, J., Rey, C., Mezieres, G., Fraise, D., and Lamotte, A. (1986). Arômes des cépages et vins du sud-est de la France. *Prog. Agric. Vitic.* **103**, 57–98

Verzele M and Geeraert E (1980). Preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 18, 559}570

VicenteFerreiraNataliaOrtínJuan F.Cacho. Optimization of a procedure for the selective isolation of some powerful aroma thiols: Development and validation of a quantitative method for their determination in wine

Voirin S., Baumes R., Bittour S., Guñata Z. and Bayonove C. (1990). *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1373.

Wanikawa, A., Hosoi, K., Kato, T., & Nakagawa, K. (2002). Identification of green note compounds in malt whisky using multidimensional gas chromatography. *Flavour Fragrance Journal*, 17, 207–211

Winter M., Velluz A., Furrer A. and Winterhagen W. (1990). *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 23, 94

Yi-XinSeowPeter K.C.OngShao-QuanLiu. Production of flavour-active methionol from methionine metabolism by yeasts in coconut cream

Zogg GC, Nyiredy S and Sticher O (1989b) Operating conditions in preparative medium pressure liquid chromatography (MPLC). I. Influence of column preparation and particle size of silica. *Journal of Liquid Chromatography* 12, 2031 }2048

Διαμαντίδης Γρηγόρης, Εισαγωγή στη Βιοχημεία, , 2^η έκδοση

Καψημάλη Δ. (2008). Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου μορφοειδικού προσδιορισμού μονομεθυλο- και ανόργανου υδραργύρου σε βιολογικά υγρά με μικροεκχύλιση στερεής φάσης από υπερκείμενη αέρια φάση (HS-SPME) και αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματοόμετρο μάζας (GC-MS). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

