

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
ΔΠΜΣ "Αμπελουργία- Οινολογία"

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΑΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑΣ”

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΚΟΤΡΙΔΟΥ ΣΟΦΙΑ

Αθήνα, 2020

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
ΔΠΜΣ "Αμπελουργία- Οινολογία"

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΑΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑΣ”

“STUDY OF THE AROMATIC COMPOUNDS OF MALAGOUSIA WINES”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ

ΡΟΥΣΣΟΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΚΟΤΡΙΔΟΥ ΣΟΦΙΑ

Αθήνα, 2020

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου όλο αυτό το διάστημα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γ. Κοτσερίδη, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του τόσο κατά την διεξαγωγή της διπλωματικής αυτής εργασίας όσο και κατά την διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Θέλω να ευχαριστήσω την κυρία Ν. Πρόξενιά για την βοήθεια της στο εργαστήριο και τον Γ. Βουκίδη για την καθοδήγηση του σε όλη την πειραματική διαδικασία.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την Κατιάννα, για την άψογη συνεργασία σε όλη την διάρκεια των πειραμάτων και για την ψυχολογική υποστήριξη όταν χρειαζόταν.

Θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Στέφανο και Μαριάνθη, χωρίς των οποίων την υλική και ψυχολογική βοήθεια τίποτα από αυτά δεν θα ήταν δυνατό.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την Αθηνά, τον Αποστόλη, τον Θεόδωρο, τον Σπύρο, τον Φάνη, τον Θοδωρή και τον Δημήτρη για την βοήθεια τους με το ξεφλούδισμα των σταφυλιών.

Σας ευχαριστώ πολύ όλους.

Περίληψη

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των αρωματικών ενώσεων που συμμετέχουν στο άρωμα των οίνων από Μαλαγουζιά.

Οι αρωματικές ενώσεις στα σταφύλια βρίσκονται στον φλοιό. Για τον λόγο αυτό στο πρώτο σκέλος της μελέτης έγινε απομόνωση των φλοιών από σταφύλια Μαλαγουζιάς. Έπειτα οι φλοιοί ξηράνθηκαν με την μέθοδο της λυοφιλίωσης ώστε να διατηρηθούν οι πτητικές ενώσεις που βρίσκονται σε αυτούς. Οι λυοφιλωμένοι και κονιορτοποιημένοι φλοιοί προστέθηκαν σε διαλύτες και μείγματα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας ώστε να εκχυλιστούν οι διάφορες πτητικές ενώσεις που βρίσκονται σε αυτούς. Μετά το πέρας 24 ωρών εκχύλισης στον κάθε διαλύτη το διήθημα συλλέχθηκε και έγινε απομάκρυνση του διαλύτη με περιστροφικό εξατμιστή. Η ξηρά ουσία που προέκυψε μετά από την ολική απομάκρυνση του διαλύτη διαλύθηκε σε 2ml αιθανόλης. Από την διαδικασία αυτή προέκυψαν τέσσερα κλάσματα. Το κάθε κλάσμα χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη (με όγκο 1 ml το κάθε μέρος) και προστέθηκε σε 200ml πρότυπου μούστου στον οποίο προστέθηκε ζυμομύκητας ώστε να πραγματοποιηθεί η αλκοολική ζύμωση και να είναι δυνατή η μελέτη των ενώσεων που συμμετέχουν στο δευτερογενές άρωμα του οίνου. Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης ακολούθησε εκχύλιση των οίνων με διχλωρομεθάνιο και 3-οκτανόλη ως εσωτερικό πρότυπο και η οργανική φάση (κάτω μέρος) συλλέχθηκε σε φιαλίδιο. Έπειτα ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη με τη χρήση αέριου αζώτου. Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκε αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (GC-MS). Επίσης για την ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας- ολφακτομετρίας (GC-O).

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης έγινε απομόνωση των αρωματικών ενώσεων από εμφιαλωμένο οίνο της ποικιλίας Μαλαγουζιάς. Για τον σκοπό αυτό έγινε υγρή- υγρή εκχύλιση οίνου Μαλαγουζιάς με διχλωρομεθάνιο. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η 3-οκτανόλη. Μετά το πέρας της εκχύλισης ακλούθησε απομάκρυνση του διαλύτη με περιστροφικό εξατμιστή και με αέριο άζωτο. Ο τελικός όγκος του εκχυλίσματος ήταν 1,5ml. Το εκχύλισμα αναλύθηκε με υγρή χρωματογραφία μέτριας πίεσης (MPLC) στην οποία χρησιμοποιήθηκαν συστήματα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας (πεντάνιο-δισουλφιδίου και δισουλφιδίου-μεθανόλη). Τα επτά κλάσματα που προέκυψαν από την υγρή χρωματογραφία μέτριας πίεσης (MPLC) αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) ώστε να ταυτοποιηθούν ποιοτικά οι αρωματικές ενώσεις που περιέχονται στον οίνο από Μαλαγουζιά.

Λέξεις κλειδιά: Μαλαγουζιά, πτητικά συστατικά, Αιθυλεστέρες, Αλκοόλες, GC-MS, GC-O, MPLC.

Abstract

The purpose of the present study was to determine the aromatic compounds involved in the aroma of Malagousia wines.

The aromatic compounds in the grapes are found in the skin. For this reason, in the first part of the study, Malagousia grape skins were isolated. The skins were then dried by the lyophilization method to maintain the volatile compounds present in them. The lyophilized and powdered skins were added to solvents and mixtures of solvents (Pentane, Pentane-Diethyl ether 1:1, Diethyl ether, Methanol) of increasing polarity to extract the various volatile compounds present in them. After 24 hours of extraction in each solvent the filtrate was collected and the solvent was removed by rotary evaporator. The dry substance obtained after total removal of the solvent was dissolved in 2 ml of ethanol. The result of this procedure was four fractions. Each fraction was divided into two equal portions (1 ml volume each) and added to 200ml of model must to which commercial yeast strains were added to start alcoholic fermentation in order to study the compounds involved in the secondary aroma of the wine. After the alcoholic fermentation the wines were extracted with dichloromethane and 3-octanol as an internal standard and the organic phase (bottom) was collected in a vial. The solvent was then removed using gaseous nitrogen. For the qualitative and quantitative analysis of the resulting extracts, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used. The gas chromatography-olfactometry (GC-O) method was also used for the qualitative analysis of the extracts.

In the second part of the study, the aromatic compounds were isolated from bottled Malagousia wine. For this purpose, liquid-liquid extraction of Malagousia wine with dichloromethane was used. At the end of the extraction, the solvent was removed by rotary evaporator and nitrogen gas. The final volume of the extract was 1.5ml. The extract was analyzed by medium pressure liquid chromatography (MPLC) in which increasing polarity solvent systems (pentane-diethyl ether and diethyl ether-methanol) were used. The seven fractions resulting from medium pressure liquid chromatography (MPLC) were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to qualitatively identify the aromatic compounds contained in Malagousia wines.

Keywords: Malagousia grape variety, volatile compounds, Ethyl esters, Alcohols, GC-MS, GC-O, MPLC.

Πίνακας περιεχομένων

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1.	Η ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ.....	8
1.2.	ΤΟ ΑΡΩΜΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ	9
1.3.	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ	10
1.3.1	Τερπένια	10
1.3.2	Εστέρες	12
1.3.3	Αλκοόλες.....	14
1.3.4	Λιπαρά οξέα	16
1.3.5	Καρβονυλικές ενώσεις	17
1.3.6	Ακετάλες και Λακτόνες.....	18
1.3.7	Μεθοξυπυραζίνες.....	19
1.3.8	Θειόλες	20
1.3.9	Θειούχες ενώσεις	22
1.4.	ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ.....	24
1.4.1.	Άρδευση και βροχόπτωση.....	27
1.4.2.	Ξεφύλλισμα	29
2.	Θεωρητικό Μέρος	30
2.1.	ΕΚΧΥΛΙΣΗ	30
2.2.	ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC-MS).....	31
2.2.1.	Φέρον αέριο	32
2.2.2.	Εισαγωγή δείγματος.....	32
2.2.3.	Εισαγωγή υγρών δειγμάτων	33
2.2.4.	Στήλες Αέριας Χρωματογραφίας.....	34
2.2.5.	Επιλογή της στήλης	35
2.2.6.	Ανιχνευτές αέριας χρωματογραφίας	36
2.2.7.	Φασματοσκοπία Μάζας (MS)	36
2.2.8.	Συνδυασμένη Τεχνική Αέριας Χρωματογραφίας- Φασματοσκοπίας Μάζας (GC-MS)	37
2.2.9.	Πηγές ιονισμού.....	38
2.2.10.	Πλεονεκτήματα- Μειονεκτήματα GC-MS.....	39
2.3.	ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ - ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑ (GC-O).....	39
2.3.1.	Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, F.I.D.).....	42
2.4.	ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕΣΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (MPLC).....	43

3.	Πειραματικό Μέρος	46
3.1.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	46
3.1.1.	Σκοπός	46
3.1.2.	Εκχύλιση και Μικροζυμώσεις Λυοφιλωμένων Φλοιών	46
3.1.3.	Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων με την μέθοδο DNS.....	48
3.1.4.	Απομόνωση πτητικών συστατικών	49
3.1.5.	Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας.....	50
3.1.6.	Αέρια Χρωματογραφία- Ολφакτομετρία.....	50
3.1.7.	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	50
3.1.8.	Εκχύλιση Οίνου Μαλαγουζιάς με Διχλωρομεθάνιο	51
3.1.9.	Κλασματοποίηση των εκχυλισμάτων οίνου Μαλαγουζιάς με MPLC	51
4.	Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	53
4.1.	ΠΡΟΤΥΠΑ ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ	53
4.2.	ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΕΛΟΥΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΜΕ ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΑΓΟΝΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ (ΜΕΘΟΔΟΣ DNS)	55
4.3.	ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΜΕΤΑ ΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ	56
4.3.1.	Εστέρες	57
4.3.2.	Αλκοόλες.....	63
4.4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑΣ (GC-O).....	65
4.5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕΤΡΙΑΣ ΠΙΕΣΗΣ (MPLC).....	67
5.	Συμπεράσματα	70
6.	Βιβλιογραφία.....	73

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ

Η Μαλαγουζιά είναι μια ποικιλία οινοποιίας με αρκετούς κλώνους, οι οποίοι διαφέρουν αρκετά τόσο στα αμπελογραφικά τους χαρακτηριστικά όσο και στις ιδιότητες του γλεύκους (π.χ. άρωμα) (26). Η πρώτη αναφορά της ποικιλίας Μαλαγουζιά γίνεται στο βιβλίο “Οινολογικά” του Όθωνα Ρουσόπουλου (1888) όπου αναφέρεται ότι η Μαλαγουζιά καλλιεργούνταν στην Ναύπακτο και το Μεσολόγγι (23). Η Μαλαγουζιά πλέον καλλιεργείται σε διάφορες αμπελουργικές περιοχές της Πελοποννήσου, της Στερεάς Ελλάδας, της Μακεδονίας, της Ηπείρου, της Θεσσαλίας κ.α. (26).

Η σταφυλή της Μαλαγουζιάς είναι μεγάλη- πολύ μεγάλη, κωνική, απλή και σε κάποιες περιπτώσεις πτερυγωτή και πυκνή- πολύ πυκνή. Η ράγα είναι μέτρια, σφαιρική ή δισκοειδής με παχύ κιτρινοπράσινο φλοιό και μαλακή σάρκα, μετρίως χυμώδης και γλυκιά (26). Είναι πρώιμη ποικιλία (τρυγιέται τέλη Αυγούστου), ζωηρή και παραγωγική. Στις περιοχές της Βορείου Ελλάδας παρουσιάζει των ποιοτικών της χαρακτήρων σε αμμώδη, αμμοαργιλοπηλώδη, αμμοασβεστώδη και σχιστολιθικά εδάφη. Η Μαλαγουζιά είναι ανθεκτική στην ξηρασία αλλά πολύ ευαίσθητη στον περονόσπορο, το ωίδιο, τις ιώσεις και τον βοτρυτή (φαιά σήψη). Έτσι χαρακτηρίζεται ως δύσκολη και απαιτητική ποικιλία στην καλλιέργεια της (23).

Η Μαλαγουζιά είναι μια ποικιλία χαμηλής οξύτητας. Η απευθείας έκθεση των σταφυλών στο ήλιο μειώνει την οξύτητα και αυξάνει την οξείδωση των αρωματικών συστατικών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπερτερούν τα τερπενικά αρώματα. Τα χαρακτηριστικά ποικιλιακά αρώματα της Μαλαγουζιάς είναι:

- Βοτανικά (χαμομήλι)
- Αρώματα εσπεριδοειδών (κίτρο, περγαμόντο, άνθη πορτοκαλιάς)
- Αρώματα πυρηνόκαρπων φρούτων (βερίκοκο, ροδάκινο)
- Μπαχαρικά (άσπρο πιπέρι, πράσινη πιπεριά) (23).

Η Μαλαγουζιά οινοποιείται συνήθως με κλασική λευκή οινοποίηση (έκθλιψη, εκπίεση σταφυλομάζας, αλκοολική ζύμωση σε βαρέλια ή δεξαμενές). Αυτός ο τρόπος οινοποίησης έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια αρωματικών συστατικών καθώς αυτά βρίσκονται στου φλοιούς των σταφυλιών. Έτσι αναπτύχθηκε η τεχνική της κρυσταλλοποίησης (skincontact), με την οποία παραμένει το γλεύκος με τα στέμφυλα σε χαμηλή θερμοκρασία για κάποιες ώρες για να εμπλουτιστεί ο χυμός με αρωματικά συστατικά χωρίς να οξειδωθεί και χωρίς να εκχυλιστούν σε αυτόν ταννοειδείς ενώσεις (23).

1.2. ΤΟ ΑΡΩΜΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ

Το άρωμα των οίνων δημιουργείται από αρκετές εκατοντάδες πτητικές ενώσεις, οι οποίες βρίσκονται στο κρασί σε συγκεντρώσεις που ποικίλλουν, με εύρος από μερικά mg/l μέχρι και ng/l ή και ακόμα μικρότερες. Επίσης το οσφρητικό κατώφλι αντίληψης των πτητικών αυτών ενώσεων διαφέρει επίσης σημαντικά. Συνεπώς, το οσφρητικό αποτέλεσμα των πτητικών ενώσεων στον οίνο εξαρτάται και από την συγκέντρωση και από το είδος της ένωσης. Κάποιες ενώσεις οι οποίες βρίσκονται στο κρασί σε πολύ μικρές ποσότητες (της τάξης των ng/l) μπορεί να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο άρωμα του οίνου, ενώ άλλες που βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να μην γίνονται αντιληπτές. Έτσι κάθε ένωση συμμετέχει στο άρωμα του κρασιού ανάλογα με τις ιδιότητες της. Το κατώφλι αντίληψης είναι η μικρότερη συγκέντρωση στην οποία γίνεται αντιληπτή η παρουσία μια ευώδους ουσίας από το 50% των δοκιμαστών σε ένα τριγωνικό τεστ (14).

Οι αρωματικές ενώσεις παράγονται στα σταφύλια (ποικιλιακό άρωμα) ή/και κατά την διάρκεια της οινοποίησης (π.χ. από δρύινα βαρέλια) (15).

Ποικιλιακές αρωματικές ενώσεις: Τα σταφύλια είναι μη αρωματικά φρούτα, εκτός από μερικές ποικιλίες όπως το Μοσχάτο, το οποίο είναι πλούσιο σε μονοτερπενόλες. Ωστόσο, τα σταφύλια επιτρέπουν την παραγωγή οίνων ποιότητας, στους οποίους το άρωμα είναι σημαντικό. Αυτή η ιδιαιτερότητα οφείλεται στην παρουσία άοσμων ενώσεων στα σταφύλια, που ονομάζονται πρόδρομες αρωματικές ενώσεις που θα μπορούσαν να δημιουργήσουν, κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, αρωματικές ενώσεις χαρακτηριστικές της χρησιμοποιούμενης ποικιλίας σταφυλιών. Οι ποικιλιακές αρωματικές ενώσεις υπάρχουν στα σταφύλια είτε σε ελεύθερη μορφή, που σημαίνει ότι είναι πτητικές και άμεσα αντιληπτές από τους οσφρητικούς υποδοχείς ή σε δεσμευμένη μορφή, που σημαίνει ότι συνδέονται με έναν ομοιοπολικό δεσμό με ένα μη πτητικό μόριο (αμινοξύ, σάκχαρο, κλπ.). Η διάσπαση αυτού του χημικού δεσμού θα μπορούσε να συμβεί κατά τη διάρκεια της οινοποίησης και να οδηγήσει στις λεγόμενες ποικιλιακές αρωματικές ενώσεις στις οποίες ο αρχικός σκελετός του πτητικού τμήματος, το οποίο είχε βιοσυντεθεί στο φυτό, διατηρείται (15).

Προζυμωτικά αρώματα: Αυτές οι ουσίες εμφανίζονται μεταξύ της συγκομιδής και της αλκοολικής ζύμωσης μέσω ενζυματικών αντιδράσεων που εμφανίζονται όταν τα σταφύλια συνθλίβονται (15).

Αρώματα ζύμωσης: Αυτές οι ενώσεις, όπως οι αιθυλεστέρες και οι αλκοόλες, είναι δευτερογενή προϊόντα μεταβολισμού από τους μικροοργανισμούς

(ζυμομύκητες ή γαλακτικά βακτήρια) και είναι υπεύθυνες για τα οσφρητικά χαρακτηριστικά του κρασιού (15).

Αρώματα μετά τη ζύμωση: Αυτές οι ενώσεις σχηματίζονται κατά την παλαίωση του κρασιού και περιλαμβάνουν χημική ή βιοχημική μετατροπή πτητικών ενώσεων. Είναι υπεύθυνοι για την πολυπλοκότητα του μπουκέτου των παλαιωμένων οίνων (15).

Οι κατηγορίες στις οποίες κατανέμονται τα συστατικά του οίνου που συμβάλλουν στο άρωμα αυτού είναι:

- Εστέρες
- Ανώτερες αλκοόλες
- Τερπένια
- Λιπαρά οξέα
- Καρβονυλικές ενώσεις
- Λακτόνες
- Ακετάλες
- Πτητικές φαινόλες
- Θειούχες ενώσεις
- Υδρογονάνθρακες και παράγωγα
- Πτητικές αζωτούχες ενώσεις

1.3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ

1.3.1 Τερπένια

Τα τερπένια είναι χαρακτηριστικά του πρωτογενούς αρώματος και η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από την ποικιλία του πρέμνου. Τέτοιες ποικιλίες, με σχετικά μεγάλη συγκέντρωση τερπενίων, είναι το Μοσχάτο και το Riesling και χαρακτηρίζονται από έντονο άρωμα (25). Οι ενώσεις της οικογένειας των τερπενίων που μπορεί να είναι αρωματικές είναι τα μονοτερπένια (ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα που σχηματίζονται από δύο μονάδες ισοπρενίου) και τα σεσκιτερπένια (ενώσεις με 15 άτομα άνθρακα που σχηματίζονται από τρεις μονάδες ισοπρενίου). Τα μονοτερπένια εμφανίζονται ως απλοί υδρογονάνθρακες (λιμονένιο κ.λπ.), ως αλδεΐδες (γερανιάλη, κλπ.), ως αλκοόλες (λιναλόλη, γερανιόλη, κλπ.), ως οξέα (λινελαϊκό και γερανικό οξύ, κλπ.) ακόμη και ως εστέρες (14).

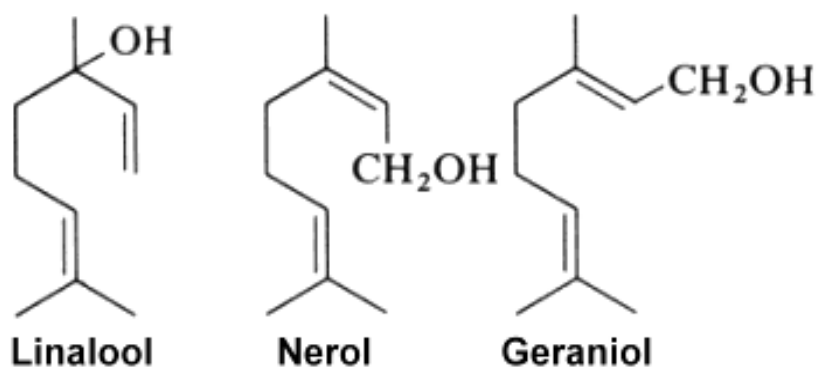
Περίπου σαράντα τερπενικές ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί στα σταφύλια και βρίσκονται κυρίως στον φλοιό και σε μικρότερες συγκεντρώσεις στη σάρκα (25). Οι μονοτερπενικές αλκοόλες (λιναλοόλη, νερόλη, γερανιόλη, σιτρονελόλη, α-τερπινεόλη, είναι από τις πιο αρωματικές τερπενικές ενώσεις. Το κατώφλι αντίληψης αυτών των ενώσεων είναι χαμηλά, της τάξης των $\mu\text{g/l}$. Τα τερπένια παίζουν σημαντικό ρόλο στο άρωμα των σταφυλιών και των κρασιών της οικογένειας των Μοσχάτων, καθώς οι συγκεντρώσεις είναι συχνά πολύ πιο πάνω το κατώφλι αντίληψης (14).

Ο φλοιός του σταφυλιού έχει υψηλότερη συγκέντρωση ελεύθερων και γλυκοζυλιωμένων μονοτερπενίων από ότι η σάρκα ή ο χυμός. Η σύνθεση των ελεύθερων τερπενολών ποικίλει πολύ στα διάφορα τμήματα του σταφυλιού. Έτσι, η γερανιόλη και η νερόλη είναι πιο κοινές στο φλοιό από ότι στη σάρκα και το χυμό (14). Σε γενικές γραμμές, υπάρχουν αναλογικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις νερόλης σε μοσχάτα σταφύλια με μικρές ράγες σε σύγκριση με εκείνα με μεγαλύτερες ράγες όπως το Μοσχάτο Αλεξανδρείας. Η γερανιόλη και η νερόλη αντιπροσωπεύουν το 75-80% της συνολικής περιεκτικότητας των σταφυλιών και του οίνου σε τερπένια (10).

Οι διαφορετικές τεχνικές πίεσης μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την σύσταση του γλεύκους σε τερπένια και την ποιότητα των οίνων. Σε γενικές γραμμές το γλεύκος πίεσης περιέχει τερπενικές αλκοόλες σε συγκεντρώσεις δύο ως τέσσερις φορές μεγαλύτερες από αυτές που περιέχονται στον πρόρογο. Η αιθανόλη μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση των τερπενίων από τα μέρη του σταφυλιού. Ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις η αιθανόλη μπορεί να λειτουργήσει σαν διαλύτης εκχύλισης (10).

Τα τερπένια μπορεί να μετατραπούν σε άλλες ενώσεις κατά την διάρκεια της παραγωγής και ωρίμανσης των οίνων. Οι τερπενικές ενώσεις στα σταφύλια και στους οίνους είναι ευαίσθητες στις όξινες συνθήκες, στις αυξημένες θερμοκρασίες και στην διάρκεια αποθήκευσης. Υπό αυτές τις συνθήκες μετατρέπονται σε ενώσεις που μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο αρωματικές και μπορεί να δώσουν έναν διαφορετικό χαρακτήρα στον οίνο. Ένα παράδειγμα είναι η αναδιάταξη της νερόλης και της λιναλοόλης παρουσία οξέος σε κοινό καρβοκατιόν το οποίο σταθεροποιείται περεταίρω σε τερπινεόλη και λιμονένιο. Κάποιες τερπενικές ενώσεις που είναι σχεδόν άοσμες μπορούν να υποστούν αναδιάταξη με όξινη υδρόλυση ώστε να επιτευχθεί αύξηση των υπαρχόντων τερπενίων καθώς και ο σχηματισμός νέων τερπενικών ενώσεων. Παράγοντες όπως η ποικιλία, οι κλιματολογικές συνθήκες, η ωριμότητα των σταφυλιών, το pH, τα ένζυμα, ο μεγάλος χρόνος αποθήκευσης, η διαδικασία της εκχύλισης και οι οινολογικές διαδικασίες, όπως π.χ. η διαβροχή, η θερμική επεξεργασία και η συμπίεση μπορεί να έχουν

σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα σε πτητικά τερπένια των σταφυλιών και του οίνου και στην ποιότητα του οίνου(10).



Έικονα 1: Χημική δομή κυριότερων τερπενίων.

1.3.2 Εστέρες

Οι εστέρες σχηματίζονται όταν αντιδράσει η λειτουργική ομάδα μια αλκοόλης με την λειτουργική ομάδα ενός καρβοξυλικού οξέος με την ταυτόχρονη απελευθέρωση ενός μορίου νερού. Είναι μια αντιστρεπτή αντίδραση, δηλαδή η αντίδραση παραγωγής του εστέρα συμβαίνει ταυτόχρονα με την αντίδραση της υδρόλυσης του. Όταν το σύστημα βρίσκεται σε ισορροπία, υπάρχει σταθερή συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των παρούσων ουσιών, που διέπονται από τον νόμο δράσης των μαζών (14).

Στο κρασί υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών αλκοολών και οξέων, και έτσι ο αριθμός των εστέρων που μπορεί να παραχθούν είναι επίσης πολύ μεγάλος. Οι οξικοί εστέρες είναι οι πιο κοινοί για κινητικούς λόγους, δηλαδή λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης αιθανόλης. Στο σταφύλι υπάρχουν λίγοι εστέρες(14).

Οι εστέρες στο κρασί σχηματίζονται είτε μέσω της χημικής οδού (κατά την διάρκεια της παλαίωσης του κρασιού) είτε μέσω της ενζυματικής οδού (κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης). Οι ίδιοι εστέρες μπορούν να συντεθούν και με τους δύο αυτούς τρόπους (25).

Ο επικρατέστερος εστέρας του κρασιού είναι ο οξικός αιθυλεστέρας (αποτελεί περίπου το 80% των εστέρων του οίνου). Μικρή ποσότητα του οξικού αιθυλεστέρα σχηματίζεται από το ζυμομύκητα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ μεγαλύτερες ποσότητες προκύπτουν από την δραστηριότητα αερόβιων οξικών βακτηρίων, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της παλαίωσης σε δρύινα βαρέλια. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι υπεύθυνος για την πνιγηρή οσμή που έχουν κάποιοι οίνοι. Αυτοί οι οίνοι έχουν επίσης υψηλή πτητική οξύτητα. Το κατώφλι αντίληψης του οξικού αιθυλεστέρα είναι 160 mg/l (σχετικά υψηλό), όμως η παρουσία του στον οίνο ασκεί δυσμενή επίδραση στο άρωμα του (25). Ωστόσο, είναι πιθανό σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (50-80 mg / l) ο οξικός αιθυλεστέρας να συνεισφέρει στην οσφρητική πολυπλοκότητα του οίνου και συνεπώς έχει θετικό αντίκτυπο στην ποιότητα αυτού (14).

Μια κατηγορία εστέρων που συναντώνται στους οίνους είναι οι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων, (όπως ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας και ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας) οι οποίοι παράγονται από τον ζυμομύκητα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Συντίθενται από μορφές των οξέων που ενεργοποιούνται από το συνένζυμο A (HS-CoA), ακυλ-S-CoA, ακετυλ-S-CoA, από το πυροσταφυλικό οξύ. Επομένως, το ακετυλ-S-CoA παράγει βουτυρυλ-S-CoA, στη συνέχεια εξανυλ-S-CoA, κτλ. Ειδικά ένζυμα καταλύονται στη συνέχεια την αλκοόλυση του ακυλ-S-CoA σε αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων. Την ίδια στιγμή, το συνένζυμο A αναγεννάται (14).

Γενικά, οι συγκεντρώσεις των εστέρων αυξάνονται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης των οίνων. Οι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων σχηματίζονται από τον ζυμομύκητα, υπό αναερόβιες συνθήκες, σε ποσότητες μεγαλύτερες από αυτές που προβλέπονται από το νόμο δράσεως των μαζών. Κατά την διάρκεια της παλαίωσης των οίνων οι συγκεντρώσεις τους μειώνονται λόγω υδρόλυσης τους. Η υδρόλυση των εστέρων κατά την διάρκεια της παλαίωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH (14).

Οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων έχουν πολύ ευχάριστες οσμές κηρού και μελιού που συμβάλλουν στην αρωματική φινέτσα των λευκών οίνων. Είναι παρόντες σε ολικές συγκεντρώσεις λίγων mg / l. Οι οξικοί εστέρες ανώτερων αλκοολών (οξικός ισοαμυλεστέρας και οξικός φαινυλαιθυλεστέρας) θα πρέπει επίσης να περιλαμβάνονται μεταξύ των εστέρων ζύμωσης. Αυτές οι ενώσεις υπάρχουν σε μέτριες ποσότητες, αλλά έχουν έντονες, μάλλον ασυνήθιστες οσμές (όπως μπανάνα και μήλο). Συνεισφέρουν στην αρωματική πολυπλοκότητα των φυσικά ουδέτερων οίνων, αλλά μπορεί να καλύψουν κάποια ποικιλιακά αρώματα (14).

Εστέρας	Άρωμα
Οξικός εστέρας της ισοαμυλικής αλκοόλης (Isoamyl acetate)	Μπανάνα
2-οξικός φαινυλεστέρας (2-phenyl-ethyl acetate)	Τριαντάφυλλο
Οξικός μεθυλο βουτυλεστέρας (Ethyl-2-methyl butyrate)	Μήλο
Οξικός ισοπεντυλεστέρας (Ethyl isovalerate)	Φρουτώδες
Οξικός ισοβουτυλεστέρας (Isobutyl acetate)	Φρουτώδες, Μήλο, Μπανάνα
Οξικός εξυλεστέρας (Hexyl acetate)	Φρουτώδες, Βοτανικό
Δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (Ethyl decanoate)	Γλυκό, Σταφύλι
Ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας (Ethyl isobutyrate)	Γλυκό
Καπροϊκός αιθυλεστέρας (Ethyl caproate)	Μήλο, Φρούτο
Καπρυλικός αιθυλεστέρας (Ethyl caprylate)	Φρούτο, Λιπαρό
Βουτυρικός αιθυλεστερας (Ethyl butyrate)	Μήλο

Πίνακας 1: Αρώματα των πιο κύριων εστέρων που εμφανίζονται στους οίνους (28).

1.3.3 Αλκοόλες

Η αιθανόλη είναι, με εξαίρεση το νερό, η πιο άφθονη ένωση στο κρασί. Η δύναμη των οίνων εκφράζεται σε περιεκτικότητα σε αλκοόλ ή σε ποσοστό αλκοόλης κατ' όγκο. Η αιθανόλη στο κρασί παράγεται κυρίως κατά την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους. Παρ' όλα αυτά τα κύτταρα των σταφυλιών μπορούν να παράγουν μικρές ποσότητες αιθανόλης κυρίως σε αναερόβιες συνθήκες. Η παρουσία ιχνών αιθανόλης στα σταφύλια είναι αποτέλεσμα της αλκοολικής αφυδρογονάσης η οποία ενεργεί ως δείκτης ωριμότητας (14).

Η αιθανόλη έχει διαλυτικές ιδιότητες οι οποίες χρησιμεύουν στην διάλυση των φαινολών από τα στέμφυλα κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Αυτή η ιδιότητα εμπλέκεται και διαλυτοποίηση ορισμένων αρωματικών μορίων και συμβάλλει στην έκφραση των αρωμάτων στο κρασί. Η αιθανόλη λόγω των ιδιοτήτων της λειτουργικής της ομάδας (-OH) εστεροποιείται με το τρυγικό, το μηλικό και το

γαλακτικό οξύ. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι ανεπιθύμητος στο κρασί γιατί δίνει μη ευχάριστη οσμή και είναι σημάδι βακτηριακής προσβολής. Επίσης αντιδρά με τις αλδεΐδες, όπως η ακεταλδεΐδη αν αυτή υπάρχει στο κρασί (14).

Η μεθανόλη υπάρχει πάντα στους οίνους σε πολύ μικρές ποσότητες (30-35 mg/l). Η μεθανόλη δεν παράγεται από την αλκοολική ζύμωση αλλά είναι αποτέλεσμα αποκλειστικά της ενζυμικής υδρόλυσης των μεθοξυλομάδων των πηκτινών κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Η περιεκτικότητα σε μεθανόλη εξαρτάται από την έκταση με την οποία τα στέμφυλα, ειδικά οι φλοιοί οι οποίοι έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε πηκτίνες, διαβρέχονται. Έτσι οι ερυθροί οίνοι έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε μεθανόλη από τους ροζέ και τους λευκούς. Η μεθανόλη είναι τοξική για τον ανθρώπινο οργανισμό. Οξειδώνεται σε φορμαλδεΐδη και μυρμηκικό οξύ, ενώσεις τοξικές για το κεντρικό νευρικό σύστημα (14).

Ανώτερες αλκοόλες ονομάζονται αυτές που στο μόριο τους περιέχουν πάνω από δύο άτομα άνθρακα. Οι περισσότερες από αυτές παράγονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης και οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται από 150-500 mg/l. Είναι ελαφρώς τοξικές και αποτελούν τα ζυμέλαια. Οι ανώτερες αλκοόλες και οι εστέρες τους παίζουν σημαντικό ρόλο στον αρωματικό χαρακτήρα του κρασιού λόγω του έντονου αρώματος τους. Οι κυριότερες από αυτές τις αλκοόλες είναι η 1-προπανόλη, η 1-βουτανόλη, η ισοβουτανόλη, η 3-μέθυλο-1-βουτανόλη (ισοαμυλική), η 2-μέθυλο-1-βουτανόλη, η 1-εξανόλη, η 2-φαίνυλο αιθανόλη κ.α. Οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται από τον ζυμομύκητα, είτε απευθείας από τα σάκχαρα είτε από τα αμινοξέα του σταφυλιού με την αντίδραση του Ehrlich. Μέσω αυτής της αντίδρασης τα αμινοξέα καταναλώνονται στα πρώτα στάδια αύξησης των ζυμών και έτσι παράγονται οι αντίστοιχες ανώτερες αλκοόλες κατά την στάσιμη φάση των ζυμών. Με αυτόν τον τρόπο από την λευκίνη παράγεται η ισοαμυλική αλκοόλη. Η περιεκτικότητα του κρασιού σε ανώτερες αλκοόλες ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει τον σχηματισμό των ανώτερων αλκοολών είναι το είδος του ζυμομύκητα. Αύξηση της περιεκτικότητας σε ανώτερες αλκοόλες προκαλείται και από τους παράγοντες που αυξάνουν τον ρυθμό της ζύμωσης (βιομάζα, αερισμός κατά την διάρκεια της ζύμωσης, υψηλή θερμοκρασία). Επίσης ο σχηματισμός των ανώτερων αλκοολών εξαρτάται από τη σύσταση του γλεύκους (έλλειψη φωσφορικού αμμωνίου προκαλεί αύξηση των παραγόμενων ανώτερων αλκοολών) και το pH αυτού. Τέλος αύξηση της περιεκτικότητας τους στο κρασί μπορεί να προκληθεί από μικροβιακή προσβολή (από ζύμες ή βακτήρια) (25) .

Οι ανώτερες αλκοόλες συμμετέχουν στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (μικρότερες από 300 mg/l) οι ανώτερες αλκοόλες συμβάλλουν στην αρωματική πολυπλοκότητα του οίνου, ενώ σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις (μεγαλύτερες από 500-600mg/l) η διαπεραστική

τους οσμή καλύπτει την αρωματική φινέτσα του κρασιού. Από τις κυριότερες ανώτερες αλκοόλες που υπάρχουν στο κρασί η προπανόλη έχει ουδέτερη οσμή και έτσι δεν συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Η 1-εξανόλη δεν προέρχεται από την ζύμωση αλλά από το σταφύλι και δίνει στο κρασί χορτώδη οσμή. Η 2-φαίνυλο αιθανόλη έχει οσμή τριαντάφυλλου και επιδρά θετικά στον αρωματικό χαρακτήρα του οίνου (25).

1.3.4 Λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα (μονοκαρβονικά οξέα) είναι πτητικά και αποτελούν συστατικά του δευτερογενούς αρώματος του οίνου, δηλαδή εμφανίζονται κυρίως μετά την ζύμωση του γλεύκους (με εξαίρεση το μυρμηκικό οξύ που βρίσκεται στο σταφύλι) (25). Τα λιπαρά οξέα που παράγονται από τους ζυμομύκητες είναι μικρής αλυσίδας (<6 άτομα άνθρακα), μεσαίας αλυσίδας (6-12 άτομα άνθρακα) και μεγάλης αλυσίδας (>12 άτομα άνθρακα). Τα λιπαρά οξέα που εμφανίζονται στο κρασί είναι το μυρμηκικό, το οξικό, το προπιονικό, το βουτυρικό, το ισοβουτυρικό, το βαλερικό, το ισοβαλερικό, το εξανοϊκό, το επτανοϊκό, το οκτανοϊκό, το δεκανοϊκό, το λινελαϊκό, το ελαϊκό κ.α. (14).

Το σημαντικότερο οξύ από αυτήν την κατηγορία είναι το οξικό οξύ, το οποίο είναι το βασικό συστατικό της πτητικής οξύτητας. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος στο κρασί περιορίζεται από την νομοθεσία, καθώς αυξημένες συγκεντρώσεις του στο κρασί υποδηλώνουν βακτηριακή προσβολή. Με βακτηριακή προσβολή σχετίζονται επίσης και άλλα οξέα, όπως το προπιονικό οξύ και τα βουτυρικά οξέα (14).

Τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (1-6 άτομα άνθρακα) φαίνεται να προσδίδουν στον οίνο σπουδαία οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Τα οξέα αυτά (προπιονικό, ισοβουτυρικό, βουτυρικό, ισοβαλερικό και εξανοϊκό) είναι δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης ή προϊόντα μικροβιακών προσβολών (14).

Τα λιπαρά οξέα με 6, 8, και 10 άτομα άνθρακα σχηματίζονται κατά τη ζύμωση και είναι παρεμποδιστές αυτής. Ακόμα και σε συγκεντρώσεις μερικών mg/l μπορούν να προκαλέσουν το σταμάτημα της αλκοολικής ζύμωσης. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (C18, C20) σχετίζονται με την οικογένεια των στερολών. Αυτές οι ενώσεις είναι ενεργοποιητές ζύμωσης, κυρίως υπό αναερόβιες συνθήκες. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι το ελαϊκό (C18 με ένα διπλό δεσμό) και το λινελαϊκό οξύ (C18 με δύο διπλούς δεσμούς). Είναι ενεργά σε πολύ μικρές ποσότητες και προέρχονται από την κηρώδη ανθρότητα του φλοιού του σταφυλιού(14).

Τα λιπαρά οξέα συμμετέχουν στο οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου. Η συμβολή τους στο άρωμα του οίνου είναι μεγάλη καθώς δίνουν ευχάριστους αρωματικά εστέρες. Το βουτυρικό και το ισοβαλερικό οξύ έχουν οσμή που θυμίζει τυρί. Το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ αποτελούν πρόδρομες ενώσεις από τις οποίες προέρχονται η εξανόλη και η εξανάλη, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα χορτώδη αρώματα των οίνων. Τέλος το οξικό οξύ σε μικρές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητο συστατικό του οίνου γιατί συμβάλλει στην αρωματική πολυπλοκότητα του (27).

1.3.5 Καρβονυλικές ενώσεις

Η ακεταλδεΐδη (αιθανάλη) είναι η σημαντικότερη καρβονυλική ένωση στο κρασί. Η ακεταλδεΐδη είναι σημαντικό συστατικό του κρασιού καθώς μπορεί να παραχθεί με πολλούς τρόπους, η λειτουργική της ομάδα (CHO) έχει μεγάλη δραστηριότητα, αντιδρά αμέσως με το θειώδη ανυδρίτη σε χαμηλές θερμοκρασίες και έχει σημαντικές οργανοληπτικές ιδιότητες (οσμή μήλου). Η ακεταλδεΐδη είναι δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και σχηματίζεται από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος (25). Επίσης η ακεταλδεΐδη στο κρασί παράγεται και από την οξείδωση της αιθανόλης (οξειδοαναγωγική αντίδραση) και συμμετέχει στον μηχανισμό της αλκοολικής ζύμωσης. Επιπλέον, η ακεταλδεΐδη παίζει σημαντικό ρόλο στις αλλαγές χρώματος που εμφανίζονται στους ερυθρούς οίνους κατά τη διάρκεια της παλαίωσης γιατί διευκολύνει τον συμπολυμερισμό των φαινολών (ανθοκυάνες και κατεχίνες). Οι οίνοι που έχουν μεγάλη συγκέντρωση ακεταλδεΐδης χαρακτηρίζονται επίπεδοι (14).

Εκτός από την ακεταλδεΐδη στο κρασί υπάρχουν και άλλες αλδεΐδες σε πολύ μικρές ποσότητες. Οι ανώτερες αλδεΐδες συμμετέχουν στο τριτογενές άρωμα κάποιων κρασιών (14). Επίσης στο κρασί υπάρχουν και αρωματικές αλδεΐδες, όπως η βανιλίνη η οποία σχετίζεται με την παλαίωση σε βαρέλι και έχει μια ευχάριστη οσμή βανίλιας (14). Η εξανάλη προέρχεται από το σταφύλι και μαζί με την εξανόλη είναι υπεύθυνη για τα χορτώδη αρώματα των οίνων (14).

Οι κετόνες που έχουν βρεθεί στο κρασί είναι η προπανόνη, η βουτανόνη, και η πεντανόνη. Οι πιο σημαντικές από αυτές που συναντώνται στο κρασί είναι η ακετοΐνη (πολύ ευχάριστη οσμή) και το διακετύλιο (ευχάριστη οσμή βουτύρου) (14).

1.3.6 Ακετάλες και Λακτόνες

Οι ακετάλες σχηματίζονται κάθε φορά που έρχεται σε επαφή μια αλδεΐδη με μια αλκοόλη. Η αντίδραση περιλαμβάνει δύο μόρια αλκοόλης και ένα μόριο αλδεΐδης (14).

Περίπου είκοσι ενώσεις αυτού του τύπου έχουν αναφερθεί στο κρασί. Η πιο σημαντική από αυτές, το διαιθοξυαιθάνιο, προκύπτει από μια αντίδραση μεταξύ αιθανάλης και αιθανολης. Η αντίδραση αυτή είναι μια αργή, αναστρέψιμη αντίδραση, καταλυόμενη από τα υδρογονοκατιόντα. Η αντίδραση ευνοείται από χαμηλό pH, και έτσι ολοκληρώνεται σε λίγες ώρες σε pH 2-3, ενώ χρειάζονται αρκετές ημέρες για την πραγματοποίηση της σε pH 4 (14).

Λαμβάνοντας υπόψη τις πολύ μικρές ποσότητες ακεταλδεΐδης που υπάρχουν στο κρασί, η περιεκτικότητά τους σε ακετάλη είναι σχεδόν μηδέν (<5mg/l) (25). Αντίθετα, τα αποστάγματα και τα Sherry που έχουν υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης έχουν και σημαντική συγκέντρωση ακετάλης. Οι ακετάλες έχουν μια βοτανική οσμή που μπορεί να προστεθεί στην αρωματική πολυπλοκότητα του Sherry. Το διαιθοξυαιθάνιο αναφέρεται ότι έχει μια φρουτώδη οσμή (14).

Οι λακτόνες σχηματίζονται από μια εσωτερική αντίδραση εστεροποίησης μεταξύ μια λειτουργικής ομάδα οξέος και μιας λειτουργικής ομάδας αλκοόλης που βρίσκονται στο ίδιο μόριο. Αυτή η αντίδραση παράγει ένα ετεροκυκλικό δακτύλιο οξυγόνου (14).

Οι πτητικές λακτόνες, που παράγονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, είναι πιθανό να συμβάλουν στο άρωμα του κρασιού. Η πιο γνωστή είναι η γ-βουτυρολακτόνη, που περιέχεται στον οίνο σε συγκεντρώσεις της τάξης των mg / l. Αυτή η ένωση προκύπτει από την εσωτερική αντίδραση του γ-υδροξυβουτυρικού οξέος, το οποίο είναι ένα ασταθές μόριο που παράγεται με απαμίνωση και αποκαρβοξυλίωση του γλουταμικού οξέος, σύμφωνα με την αντίδραση Ehrlich. Δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Οι λακτόνες μπορεί επίσης να προέρχονται από το σταφύλι, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ποικιλίας Riesling, όπου είναι στοιχεία του ποικιλιακού αρώματος (14).

Η μόλυνση των σταφυλιών από *Botrytis cinerea* πιθανώς να οδηγεί στην παραγωγή σοτολόνης (4,5-διμεθυλ-3-υδροξυ-2-φουρανόνη) η οποία εμπλέκεται στα πικάντικα αρώματα που είναι χαρακτηριστικά των οίνων που παράγονται από σταφύλια με ευγενή σήψη. Οι συγκεντρώσεις που υπάρχουν στο κρασί της τάξης των 5mg/l είναι πάνω από το κατώφλι αντίληψης. Η σοτολόνη επίσης μπορεί να

προκύπτει από μια αντίδραση συμπύκνωσης, που δεν καταλύεται από ένζυμα, μεταξύ α-κετο βουτυρικού οξέος και ακεταλδεΐδης (14).

Οι λακτόνες στο κρασί μπορεί να έχουν προέλθει και από την ωρίμανση του κρασιού σε δρύινο βαρέλι. Η δρυς απελευθερώνει λακτόνες στο κρασί κατά τη διάρκεια της παλαίωσης στο βαρέλι. Τα cis και trans ισομερή της 3- μεθυλο-γ-οκταλακτόνης είναι γνωστά ως «λακτόνες δρυός» ή «ουίσκι λακτόνες». Οι καθαρές ενώσεις έχουν μια οσμή καρύδας. Οι συγκεντρώσεις τους στο κρασί είναι της τάξης μερικών δεκάδων mg / l, αρκετά υψηλότερες από το κατώφλι αντίληψης (το οποίο είναι της τάξης των mg / l) (14).

1.3.7 Μεθοξυπυραζίνες

Οι μεθοξυπυραζίνες είναι ενώσεις του ποικιλιακού αρώματος του οίνου. Είναι αζωτούχοι ετερόκυκλικοί δακτύλιοι που παράγονται από το μεταβολισμό των αμινοξέων. Η 2-μεθοξυ-3-ισοπροπυλοπυραζίνη, 2-μεθοξυ-3-sec-βουτυλπυραζίνη και 2-μεθοξυ-3-ισοβουτυλοπυραζίνη, έχουν οσμές που θυμίζουν πράσινη πιπεριά και σπαράγγια. Αυτές οι πολύ αρωματικές ενώσεις έχουν πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης στο νερό, της τάξης του 1 ng / l. Η 2-μεθοξυ-3-ισοβουτυλοπυραζίνη βρέθηκε για πρώτη φορά στα σταφύλια της ποικιλίας Cabernet Sauvignon και αργότερα εντοπίστηκε και σε άλλα φυτά όπως η πράσινη πιπεριά, το μπιζέλι και η πατάτα (14).

Η 2-μεθοξυ-3-ισοβουτυλοπυραζίνη και οι άλλες πυραζίνες έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλές ποικιλίες σταφυλιών και στα κρασιά τους (Sauvignon Blanc, Caberne tFranc, Merlot, Pinot Noir, Gewurztraminer, Chardonnay, Riesling κ.λπ.). Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων είναι ελάχιστα μεγαλύτερες από το κατώφλι αντίληψης στα σταφύλια και στα κρασιά των ποικιλιών Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon και Cabernet Franc, και μερικές φορές Merlot. Αυτό το βοτανικό άρωμα των μεθοξυπυραζινών είναι συνήθως πιο εμφανές όταν τα σταφύλια είναι άγουρα όταν γίνει ο τρύγος και δεν είναι ποιοτικό χαρακτηριστικό (14).

Η συγκέντρωση της 2-μέθοξυ-3-ισοβουτυλπυραζίνης σε γλεύκη και οίνους των ποικιλιών Sauvignon Blanc και Cabernet Sauvignon κυμαίνονται από 0,5-50 ng/l. Το κατώφλι αντίληψης της 2-μέθοξυ-3-ισοβουτυλπυραζίνης είναι 15 ng/l και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η έντονη βοτανική της οσμή καταστρέφει το άρωμα του κρασιού. Τέλος, η 2-μεθοξυ-3-μεθυλπυραζίνη και η 2-μέθοξυ-3-αιθυλπυραζίνη έχουν επίσης ταυτοποιηθεί σε σταφύλια και σε κρασί, όμως είναι πολύ λιγότερο αρωματικές από την 2-μεθοξυ-3-ισοβουτυλοπυραζίνη (14).

1.3.8 Θειόλες

Οι θειούχες ενώσεις της οικογένειας των θειολών (ή μερκαπτανών) γενικά θεωρούνται υπεύθυνες για τα οσφρητικά ελαττώματα στο κρασί (ενότητα 8.2.2). Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι έχουν και θετική συμβολή στο άρωμα των οίνων με αρώματα φρούτων και αρωματικών φυτών. Έτσι, συγκεκριμένες θειόλες εμπλέκονται στα χαρακτηριστικά αρώματα φρούτων όπως το φραγκοστάφυλο, γκρέιπφρουτ, φρούτα του πάθους και γκουάβα (14).

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, ένας αριθμός εξαιρετικά αρωματικών θειολών έχουν ταυτοποιηθεί στους οίνους από Sauvignon Blanc. Αυτοί οι οίνοι έχουν ιδιαίτερα, χαρακτηριστικά αρώματα, με βοτανικές, φρουτώδεις και καπνιστές αποχρώσεις. Στα βοτανικά και φρουτώδη αρώματα περιλαμβάνονται η πράσινη πιπεριά, ο πυξός, ο ευκάλυπτος, τα μπουμπούκια φραγκοστάφυλου, το ραβέντι, τα φύλλα ντομάτας, οι τσουκνίδες, το γκρέιπφρουτ, τα φρούτα πάθους, τα λευκά ροδάκινα, τα φραγκοστάφυλα, τα σπαράγγια, καθώς και το ξύλο και τα άνθη ακακίας. Μετά από μερικά χρόνια παλαίωσης των οίνων σε μπουκάλι, μερικά κρασιά αναπτύσσουν αρώματα που θυμίζουν καπνό και ψητά κρέατα (14).

Η 4-μερκαπτο-4-μεθυλο-πενταν-2-όνη ήταν η πρώτη ένωση που ταυτοποιήθηκε ως συστατικό του αρώματος των οίνων από Sauvignon Blanc (Σχήμα 7.9α). Η ένωση αυτή έχει ένα ευχάριστο άρωμα πυξού. Το κατώφλι αντίληψης της σε πρότυπο διάλυμα είναι 0,8 ng / l. Η μερκαπτοπεντανόνη αυτή έχει μεγάλη οργανοληπτική επίδραση, καθώς οι συγκεντρώσεις της μπορεί να υπερβαίνουν τα εκατό mg / l στους οίνους Sauvignon Blanc στους οποίους εκφράζεται έντονα ο ποικιλιακός χαρακτήρας (14).

Άλλες πτητικές θειόλες που έχουν ταυτοποιηθεί σε οίνους Sauvignon Blanc είναι η οξική 3-μερκαπτοεξαν-1-όλη, η 4-μερκαπτο-4-μεθυλοπενταν-1-όλη, η 3-μερκαπτοεξαν-1-όλη και η 3-μερκαπτο-3-μεθυλβουταν-1-όλη. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και το κατώφλι αντίληψης των ενώσεων αυτών (14).

Ένωση	Άρωμα	Κατώφλι αντίληψης σε πρότυπο διάλυμα ng/l
4-μερκαπτο-4-μεθυλ-πενταν-2-όνη	Πυξός	0,8
οξικός 3-μερκαπτοεξυλεστέρας	Πυξός, Φρούτα του πάθους	4
3-μερκαπτοεξαν-1-όλη	Φρούτα του πάθους, Ξύσμα γκρέιπφρουτ	60
4-μερκαπτο-4-μεθυλοπενταν-2-όλη	Ξύσμα εσπεριδοειδών	55
3-μερκαπτο-3-μεθυλ-βουταν-1-όλη	Μαγειρεμένα πράσα	1500
Βενζυλομεθανοθειόλη	Καπνός	0,3

Πίνακας 2: Οργανοληπτική επίπτωση των πτητικών θειολών σε οίνους από Sauvignon Blanc (14).

Ο οξικός 3-μερκαπτοεξυλεστέρας έχει μια πολύπλοκη οσμή που θυμίζει πυξό, ξύσμα από γκρέιπφρουτ και φρούτα του πάθους. Κάποιοι οίνοι Sauvignon Blanc περιέχουν τον οξικό 3-μερκαπτοεξυλεστέρα σε συγκέντρωση αρκετών εκατοντάδων ng /l (αρκετά μεγαλύτερη από το κατώφλι αντίληψης). Η συγκέντρωση του μειώνεται κατά την παλαίωση του οίνου καθώς σχηματίζεται η 3-μερκαπτοεξανόλη σχηματίζεται. Η 3-μερκαπτοεξανόλη έχει άρωμα γκρέιπφρουτ και φρούτο του πάθους. Η οργανοληπτική επίδραση της 4-μερκαπτο-4-μεθυλ-πενταν-1-όλης η οποία μυρίζει σαν ξύσμα εσπεριδοειδών είναι περιορισμένη καθώς η συγκέντρωση της στο κρασί είναι συνήθως χαμηλότερη από το κατώφλι αντίληψης. Τέλος η 3-μέρκαπτο-3-μεθυλ-βουταν-1-όλη η οποία μυρίζει σαν μαγειρεμένα πράσα δεν φτάνει ποτέ το κατώφλι αντίληψης της και έτσι δεν γίνεται αντιληπτή. Αυτές οι πτητικές θειόλες έχουν επίσης ταυτοποιηθεί και σε λευκά κρασιά από άλλες ποικιλίες (Riesling, Gewurztraminer, Pinot Gris, Manseng, Colombard κ.α.) και συμβάλλουν στο ποικιλιακό τους άρωμα (14).

Η βενζυλομεθανοθειόλη είναι μια πολύ αρωματική μερκαπτάνη με χαμηλό κατώφλι αντίληψης (0,3 ng/l) η οποία ταυτοποιήθηκε σε λευκά (Chardonnay, Sauvignon Blanc και Semillon) και ερυθρά κρασιά (Merlot και Cabernet). Η ένωση αυτή συμβάλλει στα καπνιστά αρώματα των οίνων (14).

Η παρουσία της 2-μέθυλο-φουρανθειόλης (η οποία μυρίζει σαν μαγειρεμένο κρέας έχει ανιχνευθεί σε ερυθρούς οίνους του Bordeaux (8). Ωστόσο, καθώς δεν έχει αναλυθεί ακόμη στο κρασί, η επίδρασή της στο άρωμα δεν έχει επαληθευτεί. Επιπλέον, δεν είναι σίγουρο ότι αυτή η ένωση συμβάλλει στο ποικιλιακό άρωμα,

καθώς μπορεί να σχηματιστεί από την φουρφουράλη που απελευθερώνεται από το βαρέλι που χρησιμοποιείται για την παλαίωση αυτών των οίνων (14).

Τα γλεύκη από Sauvignon Blanc, όπως και τα γλεύκη των περισσότερων ποικιλιών, δεν είναι ιδιαίτερα αρωματικά. Το χαρακτηριστικό άρωμα της ποικιλίας εμφανίζεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (14).

Οι Darriet κ.α. (1993) έδειξαν ότι απελευθερώθηκε 4-MMP από ένα άοσμο γλεύκος είτε λόγω βιομετατροπής από την ζύμη κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ή χημικά, *in vitro*, εξαιτίας της δράσης του ασκορβικού οξέος. Ένας πρόδρομος του 4-MMP είχε αποδειχθεί ότι υπήρχε στα σταφύλια, αλλά η χημική του σύσταση δεν ήταν ακόμη γνωστή. Το γεγονός ότι ήταν αδύνατο να απελευθερωθεί 4-MMP από τον πρόδρομο του με όξινη υδρόλυση ή χρησιμοποιώντας εξωγενείς β-γλυκοσιδάσες σημαίνει ότι ο πρόδρομος αυτής της αρωματικής ένωσης του Sauvignon Blanc δεν είναι ένα γλυκοσίδιο. Αργότερα χρησιμοποιήθηκε μια β-λυάση ειδική για τις ενώσεις της κυστεΐνης ώστε να απελευθερωθεί 4-MMP, 4-MMPOH και 3-MH από μη πτητικά πρόδρομα από Sauvignon Blanc. Έτσι αποδείχθηκε ότι αυτές οι τρεις θειόλες που υπάρχουν στα σταφύλια βρίσκονται σε κυστεΐνυλιωμένη μορφή (20).

1.3.9 Θειούχες ενώσεις

Η οργανοληπτική επίδραση των ενώσεων του θείου στο κρασί μπορεί να θετική ή αρνητική. Από τη μία πλευρά, ορισμένες θειούχες πτητικές ενώσεις όπως το υδρόθειο, προσδίδουν ένα άσχημο άρωμα σαν χαλασμένο αυγό και αυτό έχει αρνητικό αντίκτυπο στο άρωμα και την ποιότητα του κρασιού και, αφετέρου, μερικές ενώσεις θείου όπως 3-μερκαπτοεξανόλη, προσδίδουν φρεσκάδα και έχουν θετικό αντίκτυπο στη γεύση και το άρωμα του κρασιού. Επιπλέον, αυτές οι ενώσεις μπορούν να γίνουν λιγότερο ή περισσότερο ελκυστικές ή απωθητικές ανάλογα με την συγκέντρωσή τους στο κρασί. Αυτό αποτελεί μια ενδιαφέρουσα πρόκληση για τον οινοποιό ο οποίος μπορεί να τροποποιήσει τις συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων που καθορίζουν την ποιότητα του οίνου σύμφωνα με τα κριτήρια και με τις προτιμήσεις των καταναλωτών. Η ζύμη του κρασιού *Saccharomyces cerevisiae* διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παραγωγή των πτητικών ενώσεων του θείου. Μέσω του μονοπατιού της αναγωγής των θειικών, σχηματίζεται το HS⁻, το οποίο μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό υδρόθειου και διαφόρων μερκαπτανών. Επομένως, ο περιορισμός του σχηματισμού του ιόντος HS⁻ από τις ζύμες είναι ένας σημαντικός στόχος στην παραγωγή του κρασιού. Η ζύμη είναι επίσης υπεύθυνη για τον μετασχηματισμό των μη πτητικών προδρόμων των θειούχων ενώσεων, που υπάρχουν στα σταφύλια, σε πτητικές, αρωματικές δραστικές θειόλες. Συγκεκριμένα, 4-μερκαπτο-4-μεθυλοπενταν-2-όνη, 3-μερκαπτοεξανόλη, και ο οξικός

3-μερκαπτοεξυλεστέρας είναι οι πιο σημαντικές πτητικέςθειόλες που προσδίδουν φρεσκάδα στο κρασί (19).

Το θείο είναι ένα στοιχείο άφθονο στη φύση και παρόν σε πολλές ενώσεις. Μπορεί να εμφανιστεί σε οξειδωμένη κατάσταση (θειική) ή ανηγμένη μορφή (σουλφίδιο). Το θείο είναι ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία που απαιτούνται για τη ζωή, ιδιαίτερα ως συστατικό των αμινοξέων κυστεΐνη και μεθειονίνη. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να μεταβολίσουν τις ενώσεις του θείου με δύο οδούς. Στην πρώτη οδό της αναγωγής των θεικών, απορροφάται θεικό και χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση οργανικών ενώσεων όπως η κυστεΐνη και η μεθειονίνη. Στη δεύτερη οδό, το θεικό μόριο ανάγεται ως μέρος μιας αναπνευστικής οδού προς θειώδες ή σουλφίδιο χωρίς κανένα από αυτά να μεταβολίζεται και τα περισσότερα να αποβάλλονται. Η τελευταία οδός διεξάγεται με αναγωγή του θεικού μορίου από βακτήρια, τα οποία κατανέμονται ευρέως σε αναερόβια περιβάλλοντα όπως τα εδάφη, τα ιζήματα, τα θαλάσσια και τα φρέσκα νερά και στα στόμια και τα έντερα πολλών ζώων. Οι μικροοργανισμοί μπορούν επίσης να αποκοδομήσουν το θείο που περιέχεται στα αμινοξέα (κυστεΐνη και μεθειονίνη) για τον σχηματισμό σουλφιδίων και στη συνέχεια άλλων πτητικώνθειούχων ενώσεων και θειολών (19).

Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* είναι υπεύθυνος για την παραγωγή αρκετών πτητικώνθειούχων ενώσεων, που επηρεάζουν την ποιότητα του κρασιού. Οι σημαντικότερες πτητικέςθειούχες ενώσεις που βρίσκονται στο κρασί είναι: το υδρόθειο (άρωμα σάπιου αυγού), η μεθανοθειόλη (άρωμα μαγειρεμένου λάχανου) διμεθυλοσουλφίδιο, διμεθυλοδισουλφίδιο και διμεθυλοτρισουλφίδιο (άρωμα λάχανου, κουνουπιδιού, σκόρδου), μεθυλοθειοεστέρες (S-θειοοξικός μεθυλεστέρας, S-θειοπροπανοϊκός μεθυλεστέρας και S-θειοβουτανοϊκός μεθυλεστέρας, μαγειρεμένο κουνουπίδι, τυρί, και αρώματα πίτας) και οι «φρουτώδεις πτητικέςθειόλες» στο κρασί (οξική 3-μερκαπτοεξαν-1-όλη, η 4-μερκαπτο-4-μεθυλοπενταν-1-όλη, η 3-μερκαπτοεξαν-1-όλη και η 3-μερκαπτο-3-μεθυλοβουταν-1-όλη, πασχαλιές, γκρέιπφρουτ, φραγκοστάφυλο, γκουάβα) (18).

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των οίνων, η αφομοιωτική αναγωγή των θεικών από τον ζυμομύκητα (για την βιοσύνθεση κυστεΐνης και μεθειονίνης) μπορεί να οδηγήσει στην υπερβολική παραγωγή του ιόντος HS^- , που οδηγεί στο σχηματισμό υδροθείου στο κρασί (17). Αυτό είναι ένα από τα πιο κοινά προβλήματα σε ένα οινοποιείο, και αν δεν αντιμετωπιστεί, το κρασί που θα προκύψει θα έχει ελαττώματα προκαλώντας υποβάθμιση της ποιότητας και την απόρριψη από τους καταναλωτές (19).

Η συγκέντρωση του υδρόθειου που παράγεται κατά τη ζύμωση του οίνου εξαρτάται από την παρουσία θειούχων ενώσεων, το στέλεχος του ζυμομύκητα, τις

συνθήκες της ζύμωσης και τη θρεπτική κατάσταση του γλεύκους. Κάποια στελέχη ζυμομυκήτων παράγουν υδρόθειο χωρίς να επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (19).

Από την άλλη πλευρά, οι ζυμομύκητες μπορούν επίσης να παράγουν πτητικές θειούχες ενώσεις που είναι επωφελείς για την ποιότητα του κρασιού. Μια από αυτές είναι η φουρφουρυλοθειόλη, μια ένωση που αναγνωρίστηκε στο άρωμα του λευκού Pinot Manseng, σε κόκκινα κρασιά του Bordeaux, και σε καμένο βαρέλι. Η φουρφουρυλοθειόλη είναι μια εξαιρετικά ισχυρή ένωση γεύσης (κατώφλι αντίληψης 0,4 ng / l) και έχει επίσης ταυτοποιηθεί σε καβουρδισμένο καφέ, κρέας, ψωμί σιταριού και ποπκορν. Πιστεύεται ότι η φουρφουρυλοθειόλη σχηματίζεται από τη ζύμη μέσω του μετασχηματισμού της φουρφουράλης, που απελευθερώνεται από το βαρέλι κατά την διάρκεια της ζύμωσης (19).

Άλλες πτητικές θειόλες που παράγονται στο κρασί από τις ζύμες από πρόδρομες ενώσεις του σταφυλιού είναι η 4-μερκαπτο-4-μεθυλοπενταν- 2-όνη (4MMP), 3-μερκαπτοεξάν-1-όλη (3MH) και ο οξικός 3-μερκαπτοεξυλεστέρας(3MHA). Αυτές οι πτητικές θειόλες είναι εξαιρετικά ισχυρές και έχουν χαμηλά όρια αντίληψης: 0,8 ng / l (4MMP), 60 ng / l (3MH) και 4 ng / l (3MHA) (19).

Η πρόκληση για τη σύγχρονη οινοποίηση είναι να περιοριστεί (ή να εξαλειφθεί) η παραγωγή των ανεπιθύμητων θειούχων ενώσεων όπως το υδρόθειο και οι μερκαπτάνες και, ταυτόχρονα, να ενισχυθεί η παραγωγή των ευνοϊκών πτητικών θειολών. Η χρήση θειικού χαλκού θέτει ένα ενδιαφέρον δίλημμα στον οινοποιό καθώς χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των οίνων που έχουν μολυνθεί με H₂S και μερκαπτάνες, αλλά ταυτόχρονα, μειώνει τη συγκέντρωση των επιθυμητών πτητικών θειολών καθώς το ιόν Cu²⁺ δεν διακρίνει μεταξύ των δύο κατηγοριών των ενώσεων θείου (19).

1.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ

Μια ποικιλία παραγόντων καθορίζει τη σύνθεση αρώματος ενός οίνου, που συμπεριλαμβάνει αλλά δεν περιορίζεται στην ωρίμανση των σταφυλιών, τη θρέψη του αμπελιού, τη μέθοδο συγκομιδής, την αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση και την παλαίωση. Μεταξύ αυτών, η ωριμότητα των σταφυλιών και η αλκοολική

ζύμωση θεωρούνται τα πιο κρίσιμα στάδια. Οι ενώσεις που σχετίζονται με την ποικιλία και την τυπικότητα των σταφυλιών, όπως τα μονοτερπενοειδή, τα C13-νορισοπρενοειδή, οι πυραζίνες και οι πολυλειτουργικές θειόλες, που προέρχονται από το ίδιο το σταφύλι, να βρίσκονται είτε σε ελεύθερη μορφή είτε να δεσμεύονται ως γλυκοζίτες ή συζευγμένα με αμινοξέα, ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλιού. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ο μεταβολισμός του *S. cerevisiae* παράγει πολλές από τις αρωματικές ενώσεις που αναγνωρίστηκαν ως σημαντικές για τον οίνο, όπως οι εστέρες και οι αλκοόλες, από τις θρεπτικές ουσίες, τα στοιχεία και τις διάφορες ενώσεις που υπάρχουν στο χυμό ή το γλεύκος (5).

Το Terroir έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα σημαντικό στοιχείο για το αρωματικό προφίλ του κρασιού. Κάθε περιοχή παραγωγής οίνου, προσδίδει ορισμένα αρωματικά χαρακτηριστικά στους οίνους που παράγονται μέσω του μοναδικού συνδυασμού των καιρικών συνθηκών, της σύστασης του εδάφους, του γεωγραφικού πλάτους, του γεωγραφικού μήκους, του υψομέτρου και των αμπελουργικών πρακτικών, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι οινολογικές μεταβλητές (5).

Η καρπόδεση, η ωρίμανση και η συσσώρευση και η συγκέντρωση των προδρόμων αρώματος και των ελεύθερων ενώσεων στα σταφύλια επηρεάζονται από περιβαλλοντικές και αγρονομικές πρακτικές όπως η διαχείριση του φυλλώματος, η γονιμοποίηση και η απόδοση. Η ανάπτυξη του σταφυλιού είναι πολύ ευαίσθητη στις αλλαγές της ηλιακής ακτινοβολίας, της θερμοκρασίας, της βροχόπτωσης, της άρδευσης, της σύνθεσης του εδάφους και του υψομέτρου. Συγκεκριμένα, το ηλιακό φως φαίνεται να έχει το μεγαλύτερο αντίκτυπο στις συγκεντρώσεις μονοτερπενοειδών και C13-νορισοπρενοειδών μεταξύ όλων των παρατιθέμενων παραμέτρων. Η αύξηση της έκθεσης στον ήλιο αυξάνει την ποσότητα προδρόμων γλυκοσιλιωμένων αρωματικών ενώσεων που υπάρχουν στο σταφύλι. Τα C13-νορισοπρενοειδή προκύπτουν από την ενζυματική διάσπαση των καροτενοειδών. Εάν το σταφύλι λάβει υψηλότερη έκθεση στον ήλιο πριν από τον περκασμό, η συγκέντρωση των καροτενοειδών θα αυξηθεί. Εάν η έκθεση στο φως του ήλιου είναι υψηλότερη μετά τον περκασμό, γενικά θα επιταχύνει την αποικοδόμηση του καροτενοειδούς και θα προκαλέσει αύξηση της ποσότητας των γλυκοζυλιωμένων C13-νορισοπρενοειδών που υπάρχουν. Ομοίως, η υψηλότερη έκθεση στο ηλιακό φως αυξάνει τις συγκεντρώσεις των μονοτερπενοειδών, με αυτό το φαινόμενο να είναι πιο έντονο σε ψυχρότερα έτη (5).

Η πτητική σύσταση του οίνου από έναν αμπελώνα επηρεάζεται επίσης από τις αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες μεταξύ των διαφορετικών σοδειών. Οι Louw κ.α. έδειξαν ότι με εξαίρεση της 2-φαινυλαιθανόλης, του οξικού οξέος, του εξανοϊκού αιθυλίου, του εξανοϊκού οξέος, της 3-μεθυλ-1-βουτανόλης και της

προπανόλης, το επίπεδο των 20 από τα 26 πτητικά συστατικά είχε σημαντικές διαφορές κατά την διάρκεια τριών διαφορετικών σοδειών στην νότια Αφρική. Αυτό σημαίνει αλλαγές στα λιπαρά οξέα και τους αιθυλεστέρες τους, καθώς και στις ανώτερες αλκοόλες. Αυτές οι ενώσεις σχετίζονται με τα πτητικά που προέρχονται από τη ζύμωση υποδηλώνοντας μεταβολή στη σύσταση των σταφυλιών (π.χ. διαφορές στα αμινοξέα και σε άλλα θρεπτικά συστατικά) που χρησιμοποιήθηκαν στην ζύμωση (5).

Ανάλογα με την ένταση και το χρόνο, η έλλειψη νερού προκαλεί μείωση της ποιότητας του κρασιού Chardonnay, δημιουργώντας οίνους με υψηλό pH, χαμηλή οξύτητα και επιρρεπείς στην άτυπη γήρανση (δηλαδή κρασιά με χαμηλότερη ένταση ποικιλιακών αρωμάτων και εμφανή ελαττώματα που θυμίζουν "άνθος ακακίας" "βερνίκι νυχιών", "φαρμακευτικές οσμές" και "ναφθαλίνη"). Η άτυπη γήρανση μπορεί να προκληθεί από τα υψηλά επίπεδα της 2-αμινοκετοφαινόνης και άλλων ενώσεων όπως η σοτολόνη. Η έρευνα που διεξήχθη από τους Reynolds κ.α. έδειξε ότι τα κρασιά Chardonnay που παράχθηκαν από αμπέλια που είχαν αρδευτεί σε διαφορετικές χρονικές στιγμές είχαν υψηλότερες εντάσεις "μήλων" και "εσπεριδοειδών" σε σύγκριση με τους μη αρδευόμενους αμπελώνες και χαμηλότερα "γήινα" αρώματα σε τρεις από τέσσερις περιπτώσεις. Ωστόσο, σύμφωνα με τους ελέγχους, τα κρασιά έδειξαν μεγαλύτερη άτυπη δυνατότητα γήρανσης όταν τα αμπέλια υποβλήθηκαν σε άρδευση μέχρι την υστέρηση ή τη φάση υστέρησης. Από τα αποτελέσματά τους, το στρες του νερού θα μπορούσε να έχει παρεμποδίσει την ικανότητα των μούρων σταφυλιών να συνθέσουν και να συσσωρεύσουν μονοτερπενοειδή και πρόδρομες ενώσεις εστέρων και μπορεί να προωθούσε τη συσσώρευση ενώσεων που είναι υπεύθυνες για τον χαρακτήρα άτυπης ηλικίας ανάλογα με το χρόνο του υδατικού στρες (5).

Ο καιρός μπορεί να αντιμετωπιστεί εν μέρει μέσω διαφορετικών καλλιεργητικών τεχνικών, όπως η αφαίρεση των φύλλων και η αραίωση των καλλιεργειών. Η απομάκρυνση των φύλλων συνιστάται ιδιαίτερα σε κρύα και δροσερά κλίματα για να μειωθεί η παρουσία των "πράσινων" και "ανώριμων" οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στο κρασί. Υπό αυτές τις συνθήκες, η απομάκρυνση φύλλων έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τα θετικά "ανθικά" και "φρουτώδη" οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η επίδραση του ξεφυλλίσματος εξαρτάται από το πότε εφαρμόζεται κατά την διάρκεια του κύκλου ανάπτυξης της αμπέλου. Όταν εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια της καρπόδεσης και του περκασμού τα αποτελέσματα είναι παρόμοια. Σε περιοχές με υψηλή φωτεινότητα και πιθανότητα για ηλιακά εγκαύματα των σταφυλιών προτιμάται μια σκιασμένη ζώνη καρποφορίας επειδή ένας συνδυασμός υψηλής έντασης φωτός και θερμοκρασίας στην επιφάνεια του σταφυλιού μεταξύ 40-43 °C μόνο για 5 λεπτά είναι αρκετό για να προκαλέσει ηλιακά εγκαύματα στα ώριμα σταφύλια Chardonnay. Τα ηλιακά εγκαύματα καταστρέφουν το φλοιό του σταφυλιού, υποβαθμίζοντας την ποιότητα

και αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών, υδροξυκιναμικών, φλαβονοειδών και τανινών, ενώ υπό συνθήκες έντονου φωτός και θερμοκρασίας η σκίαση μπορεί να οδηγήσει σε τραγανότερα και πιο κομψά κρασιά που έχουν περισσότερο αρώματα "εσπεριδοειδών", "μήλου" και "κυδωνιού" (5).

1.4.1. Άρδευση και βροχόπτωση

Τα περισσότερα ποιοτικά κρασιά παράγονται σε περιοχές όπου η ετήσια βροχόπτωση είναι κάτω από 700 έως 800 mm, και τα στοιχεία δείχνουν ότι η υψηλή βροχόπτωση και η υπερβολική άρδευση μειώνουν την ποιότητα. Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τους οποίους αυτό μπορεί να συμβαίνει (7).

Η βροχή, ειδικά μετά από τον περκασμό, μαζί με τη σχετική υγρασία προκαλεί στα σταφύλια για τη διάσπαση των σταφυλιών, botrytis, και άλλες μυκητιακές ασθένειες. Οι μολυσμένοι καρποί προκαλούν δυσκολίες για τον οινοποιό που μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη ποιότητα αλλά επιπλέον, η βροχή ή η απειλή βροχής μπορεί να ωθήσει τους καλλιεργητές σε πρόωρο τρύγο και να δώσουν ανώριμα σταφύλια για οινοποίηση (7).

Το υδατικό στρες δεν έχει βρεθεί ότι ενισχύει πάντα την ωρίμανση. Οι Matthews και Anderson (11) έδειξαν ότι παρόλο που το υδατικό στρες μπορεί να αυξήσει τις φαινόλες στον χυμό και στο φλοιό και τις ανθοκυάνες στο φλοιό και να μειώσει το μηλικό και να αυξήσει την προλίνη, δεν είχε καμία επίδραση στην έναρξη του περκασμού ή στη διάρκεια της ωρίμανσης. Σύμφωνα με έρευνες όπου χρησιμοποιήθηκαν φυτά που καλλιεργήθηκαν σε γλάστρα, διαπιστώθηκε ότι η εναλλαγή του στρες και της επάρκειας νερού τρεις φορές την εβδομάδα βοήθησε την ωρίμανση ενώ το μόνιμο υδατικό στρες την καθυστέρησε. Επίσης αποδείχθηκε ότι το μέγεθος των αλλαγών στη σύνθεση του σταφυλιού λόγω του υδατικού στρες ήταν πολύ μικρότερο από τις μεταβολές στην φυτική ανάπτυξη και στην απόδοση (7).

Η διαθεσιμότητα του νερού μπορεί να έχει επιπτώσεις όχι μόνο στην ωρίμανση αλλά και στην ποιότητα. Κατά την εξέταση των αποτελεσμάτων άρδευσης, οι Smart και ο Coombe (16) σημείωσαν ότι η υπερβολική άρδευση επιβραδύνει την ωρίμανση, αυξάνει μερικώς την απόδοση με το μέγεθος του σταφυλιού, αυξάνει το pH του χυμού και την περιεκτικότητα σε οξέα, και μειώνει την περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες λόγω της σκίασης από την μεγάλη ανάπτυξη των βλαστών. Αντίθετα, το υδατικό στρες βοηθά στην πρόωρη ωρίμανση, αλλά μειώνει την απόδοση, το βάρος των σταφυλιών και το μηλικό οξύ από την υπερβολική έκθεση (7).

Η πιο αργή ωρίμανση που συνήθως είναι επακόλουθο της άρδευσης, μπορεί να μην επιφέρει απαραίτητα μείωση στη συγκέντρωση των σακχάρων. Η υπερβολική άρδευση θα μειώσει τη συγκέντρωση των σακχάρων αλλά η μέτρια άρδευση ειδικά σε ξηρές χρονιές θα την αυξήσει (7).

Ενώ το μέγεθος του υδατικού στρες μπορεί να είναι σημαντικό, μεγάλη σημασία έχει και ο χρόνος στον οποίο γίνεται. Κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες σε ένα θερμοκήπιο, άφθονο νερό στην αρχή του πειράματος αύξησε την απόδοση και μείωσε τα σάκχαρα ενώ όταν εφαρμόστηκε προς το τέλος της ανάπτυξης των σταφυλιών δεν επηρέασε την απόδοση, αλλά αύξησε τα σάκχαρα. Η ποικιλία Muller-Thurgau ήταν η κοινή ποικιλία που χρησιμοποιήθηκε και στα δύο σύνολα πειραμάτων, αλλά ποικίλες διαφορές μπορεί να είναι σημαντικές σε τέτοιες αντιδράσεις. Το Riesling ήταν πολύ λιγότερο ευαίσθητο στις συνθήκες ξηρασίας από το Miiller-Thurgau (7).

Η ποικιλία Miiller-Thurgau, που καλλιεργήθηκε σε γλάστρες και σε ξηρές συνθήκες (έλλειψη εδαφικής υγρασίας) από τον περκασμό στη συγκομιδή, έδωσε κρασί το οποίο χαρακτηρίστηκε ως "φρουτώδες, αρωματικό και κομψό". Τα κρασιά που προήλθαν από σταφύλια με επαρκή υγρασία εδάφους κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου ήταν «γεμάτα και λιγότερο κομψά». Τα κρασιά που προτιμήθηκαν ήταν από αμπέλια υγρά έως τον περκασμό και μετά ξηρά, λιγότερο προτιμώμενα αυτά που προήλθαν από αμπέλια που ήταν ξηρά ως τον περκασμό και μετά υγρά. Οι Brandt και Herper (2) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο έλεγχος του σθένους μέσω της διαχείρισης των αρδεύσεων σε ξηρά κλίματα μπορεί να επιτύχει την πιο επιθυμητή κατάσταση ταχείας αύξησης την άνοιξη ακολουθούμενη από μια επιβράδυνση από τον περκασμό ως την ωρίμανση. Επομένως, φαίνεται ότι υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η διαθεσιμότητα του νερού μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του κρασιού. Πράγματι, στο ανασκόπηση σημαντικών παραγόντων για την ποιότητα, Seguin τονίζει τη σημασία του νερού και καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η ανεπάρκεια μπορεί να είναι τόσο άσχημη όσο η υπέρβαση(7).

Πρόσθετοι παράγοντες που συμβάλλουν στην ποιότητα ήταν έχουν αναφερθεί. Η αυξημένη διαθεσιμότητα νερού αυξάνει συχνά το επίπεδο του καλίου και το pH στο μούστο και στο κρασί, και μπορεί να μειώσει το χρώμα και το περιεχόμενο του σε ανθοκυάνες. Η άφθονη άρδευση έδωσε σε κρασιά Semillon γεύση "χόρτου" που θα μπορούσε να μειωθεί με την απομάκρυνση των φύλλων γύρω από τα τσαμπιά. Οι McCarthy και Coombe (12) διερεύνησε την επίδραση της άρδευσης στη γεύση και το άρωμα του χυμού όπως έγινε αντιληπτό από ένα πάνελ γεύσης σε ένα ζεστό κλίμα όπως αυτό της Αυστραλίας. Η γεύση και το άρωμα βαθμολογήθηκαν ως υψηλότερα στα μη αρδευόμενα αμπέλια τα οποία είχαν επίσης υψηλότερο δυναμικό σε πτητικά τερπένια. Επίσης, υδατικό έλλειμμα στο Cabernet Sauvignon προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών του

χυμού και των εκχυλίσμων φαινολών και ανθοκυανών των φλοιών, ενώ το πρώιμο υδατικό έλλειμμα μείωσε το μηλικό οξύ αλλά αύξησε την προλίνη σε γλεύκος από Cabernet Franc (7).

1.4.2. Ξεφύλλισμα

Η αφαίρεση των φύλλων γύρω από τα τσαμπιά είναι μια κοινή πρακτική, ειδικά σε δροσερές και υγρές περιοχές. Στην Ελβετία έχει αναφερθεί ότι η απομάκρυνση των βασικών φύλλων προκαλεί την αύξηση των σακχάρων και την μείωση του μηλικού οξέος και των ασθενειών. Τα πρέμνα στα οποία έχει γίνει ξεφύλλισμα τα φύλλα που λείπουν αντισταθμίζονται εν μέρει από ελαφρά αύξηση του μεγέθους των γειτονικών φύλλων και αύξηση της περιοχής φύλλων των πλευρικών βλαστών. Όσο πιο νωρίς γίνει το ξεφύλλισμα, τόσο περισσότερο αυξάνεται το μήκος και ο αριθμός των πλευρικών βλαστών. Το ξεφύλλισμα μετά τον περκασμό δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξη των πλευρικών βλαστών (7).

Επιπλέον, καθώς μεγαλώνει η ηλικία των φύλλων γίνονται λιγότερο αποτελεσματικά φωτοσυνθετικά, και ως εκ τούτου, η αφαίρεση των χαμηλότερων φύλλων μπορεί να μειώσει μόνο οριακά την αποτελεσματική φυλλική επιφάνεια. Η απομάκρυνση των φύλλων έχει διαπιστωθεί ότι καθιστά τα υπόλοιπα φύλλα πιο δραστικά φωτοσυνθετικά. Το ξεφύλλισμα ήταν επίσης αποτελεσματικό στη μείωση του μηλικού οξέος και του χορτώδους πυραζινικού χαρακτήρα του Sauvignon blanc και την αύξηση των ανθοκυανών και των φαινολών των φλοιών του Cabernet Sauvignon εάν γίνει μεταξύ τεσσάρων εβδομάδων από την πτώση των πηλιδίων ως τον περκασμό. Το ξεφύλλισμα του Sauvignon blanc προκάλεσε μείωση των φυτικών αρωμάτων (όπως κονσερβοποιημένα πράσινα φασόλια, σέλινο, φρέσκα λαχανικά) και την φυτική γεύση και δεν επηρέασε την αντίληψη των φρουτώδων αρωμάτων. Το μερικό ξεφύλλισμα του Cabernet Sauvignon προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης των ανθοκυανών των φλοιών και το αποτέλεσμα έγινε μεγαλύτερο όσο αργότερα εφαρμόστηκε. Η υψηλότερη συγκέντρωση επήλθε όταν το ξεφύλλισμα έγινε κατά τον περκασμό. Επίσης η ποιότητα των οίνων από μερικώς ξεφυλλισμένα πρέμνα βαθμολογήθηκε υψηλότερα από αυτούς που προήλθαν από πρέμνα που δεν είχαν υποστεί ξεφύλλισμα. Το ξεφύλλισμα έχει επίσης αναφερθεί ότι μειώνει την προσβολή από Βοτρύτη (7).

Είναι προφανές ότι, με το κλάδεμα και το ξεφύλλισμα, ο καλλιεργητής έχει ισχυρά εργαλεία για να επηρεάσει την ποιότητα. Ανάλογα με το βαθμό του χειμερινού κλαδέματος, η απόδοση μπορεί να ρυθμιστεί με τον σχεδιασμό της υποστήλωσης, την πυκνότητα βλαστών, και το μικροκλίμα. Η διαχείριση βλαστών

και φύλλων κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού μπορούν να γίνουν για ειδικούς σκοπούς: να αυξηθεί η διείσδυση του φωτός στα φύλλα και τα σταφύλια, να μειωθεί η υγρασία, ή ίσως να μειωθεί ο ανταγωνισμός από νέους βλαστούς. Η παραπάνω συζήτηση δείχνει ότι οι συνέπειες αυτών των ενεργειών δεν είναι πάντα καθορισμένες και μπορεί να φέρουν διαφορετικά αποτελέσματα με την αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών(7).

2. Θεωρητικό Μέρος

2.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η εκχύλιση είναι μια από τις παλαιότερες και ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος. Με την διαδικασία της εκχύλισης μεταφέρεται μια ουσία από την φάση στην οποία βρίσκεται (σε διάλυμα ή σε διασπορά) σε κάποια υγρή φάση. Έτσι πραγματοποιείται η απομόνωση κάποιας ουσίας από μείγμα ουσιών με την επαφή της με κάποιον διαλύτη ο οποίος είναι εκλεκτικός προς αυτήν. Το αρχικό μείγμα είναι είτε στερεό είτε υγρό και έτσι ανάλογα με το αρχικό μείγμα εφαρμόζεται και η ανάλογη τεχνική (29). Η βασική αρχή της εκχύλισης είναι ότι "Το όμοιο διαλύει το όμοιο" (30).

Στην κλασική Υγρή-Υγρή εκχύλιση τα συστατικά ενός μίγματος κατανέμονται σε μια υδατική φάση (ανόργανα ιόντα και πολικές οργανικές ουσίες) και σε μια οργανική φάση (μη πολικές οργανικές ουσίες) (30).

Οι κύριοι παράγοντες που επιδρούν στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης υγρού-υγρού είναι:

- Η επιλογή του διαλύτη
- Η ιονική ισχύς δείγματος
- Το pH του δείγματος

Οι πιο σημαντικές ιδιότητες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη είναι ο συντελεστής κατανομής και η εκλεκτικότητα. Ο συντελεστής κατανομής είναι ο λόγος των συγκεντρώσεων του επιθυμητού συστατικού στις δύο υγρές φάσεις (εκχυλίσματος και υπολλείμματος). Η εκλεκτικότητα του διαλύτη ορίζεται σαν την ικανότητα του να διαλύει εκλεκτικά την επιθυμητή ουσία από το αρχικό μείγμα σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά του μίγματος. Επίσης ο διαλύτης δεν πρέπει να αντιδρά με την εκχυλιζόμενη ουσία.

Πρέπει να είναι οπτικά διαφανής για φασματοφωτομετρικές μετρήσεις και να μην είναι τοξικός και εύφλεκτος. Η διαλυτότητα του επιθυμητού συστατικού στον διαλύτη θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ενώ των παρεμποδιστικών ουσιών που μπορεί να υπάρχουν στο μείγμα να είναι μικρότερη. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να γίνεται πλήρης διαχωρισμός των δύο στοιβάδων μετά από ανακίνηση, δηλαδή η αναμειξιμότητα των δύο φάσεων να είναι μικρή και να υπάρχει διαφορά στις πυκνότητες τους. Επίσης δεν πρέπει να υπάρχει η τάση σχηματισμού γαλακτώματος μεταξύ των δύο φάσεων. Τέλος, πρέπει ο διαλύτης να είναι περισσότερο πτητικός από το επιθυμητό συστατικό, ώστε να είναι εύκολη η ανάκτηση του συστατικού από το εκχυλιστικό (30).

Στην περίπτωση που ο συντελεστής κατανομής λαμβάνει οριακές τιμές τότε μπορεί να προστεθεί στην υδατική φάση ένα ανόργανο άλας (π.χ. NaCl ή Na₂SO₄). Η προσθήκη του άλατος έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της διαλυτότητας της οργανικής ουσίας στην υδατική φάση και την διευκόλυνση της παραλαβής της από την οργανική φάση. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται εξαλάτωση (salting out) (29).

Τέλος το pH του δείγματος επηρεάζει την εκχύλιση των ασθενών οξέων και βάσεων (31).

Η εκχύλιση οργανικών στερεών ουσιών από μείγματα στερεών είναι ο κύριος τρόπος για την παραλαβή φυσικών προϊόντων από τις πηγές τους. Η εκχύλιση είναι ο κύριος τρόπος παραλαβής αλκαλοειδών από τα φυτά, συστατικών γεύσης από σπόρους, αρωμάτων από άνθη κ.α. Η εκχύλιση στερεού μπορεί να γίνει είτε με θέρμανση της ουσίας με επιλεγμένο διαλύτη και εν συνεχεία διήθηση του μείγματος, είτε απλούστερα με την παραμονή του στερεού μείγματος σε επαφή με τον κατάλληλο διαλύτη για ένα χρονικό διάστημα σε πωματισμένη φιάλη (29).

2.2. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ/ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) είναι ο συνεργιστικός συνδυασμός δύο ισχυρών αναλυτικών τεχνικών. Η αέρια χρωματογραφία διαχωρίζει τα συστατικά ενός μείγματος ανάλογα με τον χρόνο και η φασματοσκοπία μάζας δίνει πληροφορίες που βοηθούν στην δομική ταυτοποίηση κάθε συστατικού (4).

Ο αέριος χρωματογράφος παρέχει ένα χρονικό διαχωρισμό των συστατικών σε ένα μείγμα. Η βασική αρχή λειτουργίας του αέριου χρωματογράφου περιλαμβάνει την εξαέρωση του δείγματος σε μια θερμαινόμενη θύρα εισόδου (injector), τον διαχωρισμό των συστατικών του μείγματος σε ειδικά προετοιμασμένη στήλη και την ανίχνευση του κάθε συστατικού από έναν ανιχνευτή. Μια σημαντική πτυχή του αέριου χρωματογράφου είναι η χρήση ενός φέροντος αερίου, όπως το υδρογόνο ή το ήλιο, για την μεταφορά του δείγματος από το σημείο εισαγωγής του δείγματος, διαμέσου της στήλης και τέλος στον ανιχνευτή. Η στήλη ή το υλικό πλήρωσης της στήλης, περιέχει επικάλυψη μιας στατικής φάσης. Ο διαχωρισμός των συστατικών καθορίζεται από την κατανομή του κάθε συστατικού μεταξύ του φέροντος αερίου (κινητή φάση) και της στατικής φάσης. Ένα συστατικό που παραμένει στην στατική φάση για μικρό χρονικό διάστημα εκλύεται γρήγορα. Μόνο εκείνα τα υλικά που μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να αποσυντεθούν είναι κατάλληλα για ανάλυση με GC (4).

2.2.1. Φέρον αέριο

Συνήθως το φέρον αέριο είναι το ήλιο, αλλά χρησιμοποιούνται επίσης και το υδρογόνο και το άζωτο σε συγκεκριμένες εφαρμογές. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και να μην προσροφάται από την στατική φάση της στήλης. Μια σημαντική παράμετρος είναι η γραμμική ταχύτητα του φέροντος αερίου. Για το ήλιο η βέλτιστη ταχύτητα είναι 30 cm/sec. Η γραμμική ταχύτητα μπορεί να καθοριστεί με την ένεση ενός συστατικού όπως είναι το αργό ή το βουτάνιο, το οποίο δεν καθυστερείται από την στατική φάση και μπορεί να μετρηθεί ο χρόνος από την ένεση ως την ανίχνευση. Έτσι η γραμμική ταχύτητα είναι ο χρόνος συγκράτησης (retention time) μετρημένος σε δευτερόλεπτα (sec) ως προς το μήκος της στήλης σε εκατοστά (cm). Η ροή του φέροντος αερίου πρέπει να είναι σταθερή και επαναλήψιμη (4).

2.2.2. Εισαγωγή δείγματος

Υπάρχουν πολλοί τύποι συστημάτων εισαγωγής δείγματος για την ανάλυση με GC. Αυτοί περιλαμβάνουν βαλβίδες δειγματοληψίας αερίου, εγχυτήρες με διαχωρισμό και χωρίς διαχωρισμό ροής (split/ splitless), συστήματα έγχυσης σε στήλη, εγχυτήρες με προγραμματισμένη θερμοκρασία και διατάξεις με αυτόματο δειγματολήπτη. Η εισαγωγή του δείγματος εξαρτάται από την εφαρμογή (4).

2.2.3. Εισαγωγή υγρών δειγμάτων

Η εισαγωγή των υγρών δειγμάτων στην στήλη γίνεται συνήθως μέσω ενός διαφράγματος στην είσοδο του οργάνου, με μία μικροσύριγγα . Το δείγμα οδηγείται μέσα στην στήλη από το φέρον αέριο και με τις συνθήκες πίεσης, θερμοκρασίας και παροχής του φέροντος αερίου, το δείγμα εξατμίζεται, εξαερώνεται και διαχωρίζεται στην στήλη. Η εξάχνωση του δείγματος πρέπει να γίνεται απότομα ώστε ο διαχωρισμός των συστατικών να είναι ικανοποιητικότερος. Η απότομη εξάχνωση του δείγματος επιτυγχάνεται με απότομη θέρμανση της βαλβίδας εισαγωγής του δείγματος (24). Οι κυριότεροι τύποι βαλβίδων εισαγωγής δείγματος στη στήλη είναι:

- Άμεση έγχυση

Το δείγμα εισάγεται με σύριγγα, μέσω διαφράγματος από σιλικόνη ή PTFE ώστε να μην προσροφά ουσίες για να μην υπάρχουν κορυφές από προηγούμενες αναλύσεις (24).

- Εισαγωγή δείγματος με διαχωρισμό ή χωρίς διαχωρισμό (split/ splitless)

Στην πρώτη περίπτωση το δείγμα αραιώνεται 100 φορές με το φέρον αέριο κυρίως όταν χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες ανάλυσης. Εισάγονται και εξατμίζονται 1-5 μL δείγματος αλλά μόνο τμήμα αυτού οδηγείται στην στήλη ώστε να μην προκληθεί υπερφόρτωση της στήλης. Το υπόλοιπο απομακρύνεται με ρεύμα αερίου (purge stream) (24).

Στην δεύτερη περίπτωση όλο το δείγμα (10 μL) εξατμίζεται και συμπυκνώνεται στις πρώτες στροφές της τριχοειδούς στήλης. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος καθαρίζεται από υψηλή ροή του φέροντος αερίου που εισάγεται μέσω εξωτερικής βαλβίδας. Η συγκεκριμένη τεχνική επιλέγεται συνήθως για αραιά δείγματα (24).

- Αυτόματος δειγματολήπτης

Υπάρχουν διάφορες διατάξεις οι οποίες επιτρέπουν την αυτόματη εισαγωγή δειγμάτων (στερεών, υγρών, αέριων) στην χρωματογραφική στήλη. Οι διατάξεις ρυθμίζονται ώστε να εισάγουν αυτόματα σε ορισμένα χρονικά διαστήματα μικροποσότητες δείγματος, να ρυθμίζουν την θερμοκρασία αυτόματα, ακόμα και να ψύχουν την στήλη (24).

2.2.4. Στήλες Αέριας Χρωματογραφίας

Στον αέριο χρωματογράφο ο διαχωρισμός γίνεται σε ένα θερμαινόμενο κοίλο σωλήνα, που ονομάζεται στήλη. Η στήλη περιλαμβάνει ένα λεπτό στρώμα ενός μη πτητικού υλικού το οποίο είτε επικαλύπτει τα τοιχώματα της στήλης (τριχοειδείς στήλες) είτε επικαλύπτει ένα αδρανές στερεό υλικό μέσα στη στήλη (στήλες πλήρωσης). Τα συστατικά του δείγματος μεταφέρονται στη στήλη με το φέρον αέριο και καθυστερούνται επιλεκτικά από την στατική φάση. Η θερμοκρασία του φούρνου στον οποίο βρίσκεται η στήλη συνήθως αυξάνεται 4° - 20° /min ώστε τα συστατικά με υψηλότερο σημείο βρασμού και αυτά που συγκρατούνται πιο ισχυρά, να απελευθερωθούν διαδοχικά. Η αέρια χρωματογραφία περιορίζεται σε ενώσεις που είναι πτητικές ή μπορούν να γίνουν πτητικές και είναι επαρκώς σταθερές ώστε να μπορούν να περάσουν από την στήλη. Η παραγοντοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αυξήσει την πτητικότητα και την σταθερότητα κάποιων δειγμάτων. Η παραγοντοποίηση συνήθως χρησιμοποιείται για οξέα, αμινοξέα, αμίνες, αμίδια, σακχαρίτες, φάρμακα και στεροειδή (4).

Η στήλη που χρησιμοποιείται στην αέρια χρωματογραφία είναι ο βασικότερος παράγοντας που καθορίζει την επιτυχία ή την αποτυχία ενός πειράματος. Η βασική αρχή του διαχωρισμού των συστατικών ενός δείγματος στηρίζεται στην προσρόφηση ή κατανομή αυτών σε δύο μη αναμίξιμες φάσεις, την κινητή και την στατική (το φέρον αέριο και το υλικό πλήρωσης της στήλης αντίστοιχα) (24).

Οι χρωματογραφικές στήλες συνήθως φτιάχνονται από ανοξείδωτο χάλυβα, ύαλο, τεφλόν, τηγμένο πυρίτιο με διάμετρο από 0,2mm ως 0,8mm και είναι είτε τριχοειδείς είτε στήλες πλήρωσης γεμισμένες με διάφορες στατικές φάσεις (24).

Η πλήρωση των στηλών γίνεται με τους εξής τρόπους:

- Με χρησιμοποίηση αερίου το οποίο είναι υπό πίεση ή
- Με χρησιμοποίηση γραμμής κενού.

Μετά το τέλος της πλήρωσης πρέπει η στήλη να σφραγιστεί ερμητικά (24).

Εκτός από τις στήλες με υλικό πλήρωσης υπάρχει και μια ακόμη κατηγορία στηλών, οι τριχοειδείς (capillary columns), οι οποίες είναι γυάλινες ή μεταλλικές. Σ' αυτές η στατική φάση τοποθετείται απευθείας στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης (coating) ή σε ένα υπόστρωμα το οποίο βρίσκεται δεσμευμένο στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης.

Οι δύο κύριοι τύποι είναι:

1. *Τριχοειδείς στήλες στατικής φάσης (Wall Coated Open Tubular, WCOT)*, οι οποίες έχουν ανοιχτά άκρα και στα εσωτερικά τους τοιχώματα φέρουν λεπτή επικάλυψη μιας στατικής φάσης.
2. *Τριχοειδείς στήλες υλικών πλήρωσης και στατικής φάσης (Support Coated Open Tubular, SCOT)*, στις οποίες η εσωτερική επιφάνεια καλύπτεται με λεπτό υμένιο (30μm) αδρανούς υλικού στήριξης ώστε να κρατά την υγρή στατική φάση (24).

Τα πλεονεκτήματα των τριχοειδών στηλών είναι:

- Μεγάλος αριθμός θεωρητικών πλακών σε σχέση με τις στήλες πλήρωσης και έτσι μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα.
- Μικρότερη ποσότητα δείγματος (ng) με παρόμοια όρια ανίχνευσης.
- Μικρότερος χρόνος έκλουσης και ανάλυσης.
- Μικρότερες θερμοκρασίες διαχωρισμού.
- Διαχωρισμός μιγμάτων που δεν θα μπορούσαν να επιτευχθούν λόγω εξέλιξης της τεχνολογίας.
- Με μικρό αριθμό στηλών μπορεί να διαχωριστεί μεγάλο φάσμα ενώσεων (πολικές, μέτρια πολικές, μη πολικές)
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύζευξη με ανιχνευτές που επιτυγχάνουν ταυτοποίηση των ενώσεων.
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες με μεγάλο μήκος για μεγάλη διαχωριστική ικανότητα (24).

2.2.5. Επιλογή της στήλης

Η επιλογή της στήλης εξαρτάται από το δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί και από την πείρα του αναλυτή. Ο γενικός κανόνας που ακολουθείται συνήθως, είναι ότι για την ανάλυση πολικών ενώσεων χρησιμοποιούνται στήλες με πολικό υλικό πλήρωσης, ενώ για την ανάλυση μη πολικών ενώσεων χρησιμοποιούνται στήλες με μη πολικό υλικό πλήρωσης (24).

Τα πολικά μόρια είναι εκείνα που περιέχουν δίπολα τα οποία δημιουργούνται από την παρουσία ηλεκτροαρνητικού ατόμου ή ατόμων τοποθετημένων σε ασύμμετρες θέσεις μέσα στο μόριο. Κάποιες φορές η πολικότητα ενός μορίου μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της ανάλυσης είτε λόγω δημιουργίας δεσμών μεταξύ αυτών και της στατικής φάσης, είτε από την δημιουργία

γέφυρας υδρογόνου. Η επιτυχία της ανάλυσης εξαρτάται από την ικανότητα που έχει η στήλη να διαχωρίζει τα συστατικά του δείγματος (24).

2.2.6. Ανιχνευτές αέριας χρωματογραφίας

Ένα από τα μεγάλα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας είναι η ποικιλία των ανιχνευτών που είναι διαθέσιμοι. Τέτοιοι ανιχνευτές είναι ο Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας (Flame Ionization Detector, F.I.D.) , ο Ανιχνευτής Θερμικής Αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector, T.C.D.), ο Ανιχνευτής Δέσμησης Ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, E.C.D.), ο Ανιχνευτής Πλάσματος (Plasma Detector, P.D.), ο Φωτομετρικός Ανιχνευτής Φλόγας (FPD) κ.α. (24)(4).

Ο ιδανικός ανιχνευτής ενός αέριου χρωματογράφου πρέπει να διαθέτει:

- Ικανοποιητική ευαισθησία
- Σταθερότητα και επαναληψιμότητα
- Γραμμική απόκριση
- Περιοχή θερμοκρασιών λειτουργίας από 20-400°C τουλάχιστον
- Σύντομους χρόνους απόκρισης ανεξάρτητους από την ταχύτητα ροής
- Εξαιρετική αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση
- Παρόμοια απόκριση προς όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες ή εκλεκτική απόκριση προς την προσδιοριζόμενη ουσία
- Να μην καταστρέφει το δείγμα (22).

2.2.7. Φασματοσκοπία Μάζας (MS)

Το φασματόμετρο μάζας είναι ένα όργανο που μετρά την αναλογία μάζας/φορτίου (m/z) των ιόντων που βρίσκονται στην αέρια φάση και παρέχει ένα μέτρο αφθονίας για κάθε ιοντικό είδος. Η μέτρηση βαθμονομείται έναντι ιόντων γνωστού m/z . Όλα τα φασματόμετρα μάζας λειτουργούν με διαχωρισμό των ιόντων αέριας φάσης σε περιβάλλον χαμηλής πίεσης με την αλληλεπίδραση μαγνητικών ή ηλεκτρικών πεδίων στα φορτισμένα σωματίδια (4).

Παρόλο που οι φασματογράφοι μάζας μετρούν απλώς την μάζα και την αφθονία των ιόντων, είναι πολύ ισχυρά όργανα ανάλυσης εν μέρει λόγω της εξαιρετικά μεγάλης ευαισθησίας τους. Ένα ολοκληρωμένο φάσμα μάζας μπορεί να

ληφθεί από μερικά ng ενός υλικού (ακόμα και λιγότερο), και τα επιλεγμένα ιόντα μπορούν να παρατηρηθούν με την κατανάλωση μερικών μόνο pg. Η ικανότητα λήψης του μοριακού βάρους και των χαρακτηριστικών θραυσμάτων των ιόντων είναι συχνά επαρκής για την ταυτοποίηση υλικών χωρίς τη βοήθεια άλλων αναλυτικών μεθόδων. Ο συνδυασμός της MS με μεθόδους διαχωρισμού όπως η Αέρια Χρωματογραφία έχει παράγει μια πολύ ισχυρή αναλυτική μέθοδο με την οποία τα συστατικά ενός πολύπλοκου μείγματος μπορούν να προσδιοριστούν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (4).

2.2.8. Συνδυασμένη Τεχνική Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματοσκοπίας Μάζας (GC-MS)

Η συνδυασμένη τεχνική GC-MS είναι μια από τις πρώτες που βρήκαν εφαρμογή και μπορεί να έχει διπλό στόχο. Δηλαδή ο φασματογράφος μαζών μπορεί να έχει το ρόλο του ανιχνευτή στην αέρια χρωματογραφία αλλά και ο αέριος χρωματογράφος να είναι το σύστημα κατεργασίας/ εισαγωγής του δείγματος για το φασματογράφο μαζών. Η συνδυασμένη τεχνική GC-MS είναι πολύ ισχυρή αναλυτική τεχνική καθώς αξιοποιεί τα πλεονεκτήματα και των δύο τεχνικών, δηλαδή την δυνατότητα άριστου διαχωρισμού και ποσοτικού προσδιορισμού που παρέχει ο αέριος χρωματογράφος και τη δυνατότητα ταυτοποίησης που παρέχει το φασματόμετρο μαζών (24).

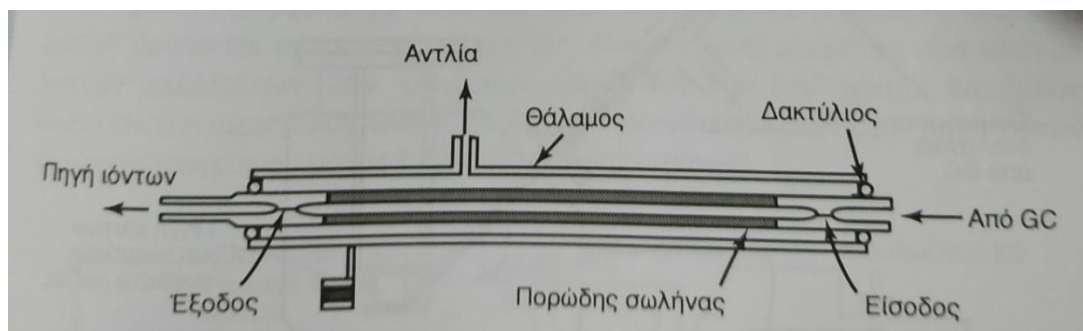
Κατά τον σχεδιασμό ενός οργάνου GC-MS πρέπει να υπολογιστούν δύο παράγοντες : το φέρον αέριο στην αέρια χρωματογραφία και η συμβατότητα των δύο τμημάτων , όσον αφορά την ταχύτητα. Η σύζευξή τους πρέπει να γίνεται έτσι ώστε να μην υποβιβάζονται τα πλεονεκτήματα του ενός και του άλλου. Ένα πρόβλημα ασυμβατότητας είναι η διαφορά στην πίεση που απαιτείται για την λειτουργία του GC και του MS. Το GC λειτουργεί σε υψηλή πίεση ενώ το MS έχει σχεδιαστεί να λειτουργεί σε υψηλό κενό (24).

Η διάταξη σύζευξης των δύο οργάνων αποτελείται από μια διάταξη εμπλουτισμού καθώς η συγκέντρωση του συστατικού που μεταφέρεται από το φέρον αέριο είναι πολύ μικρή (εικόνα 2). Η διάταξη σύζευξης μπορεί να είναι διαχωρισμός έκχυσης, άνοιγμα εκροής ή μεμβράνη. Όταν χρησιμοποιείται το αντιδρών αέριο του χημικού ιονισμού, τότε η εισαγωγή γίνεται απευθείας στο MS (24).

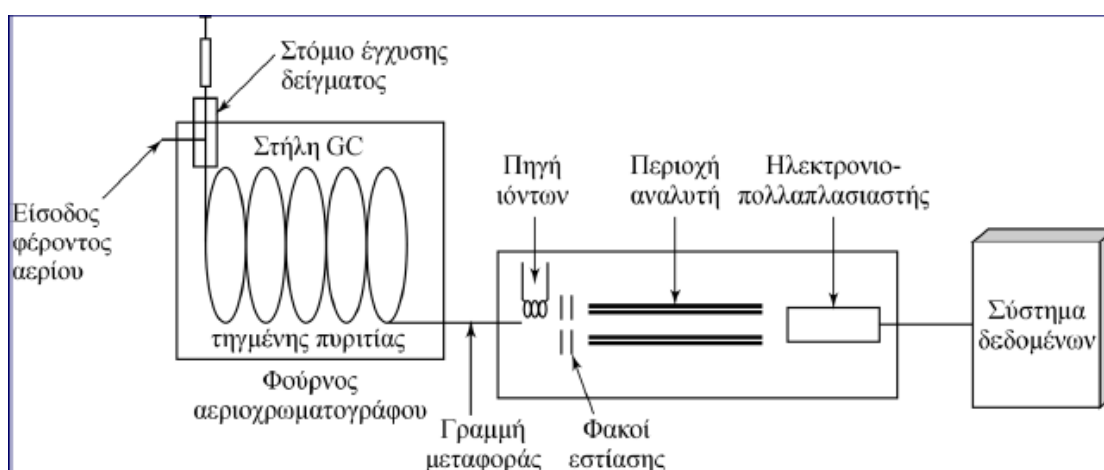
Η σύζευξη των οργάνων πρέπει να γίνει με τέτοιο τρόπο ώστε ο αναλύτης να μην συμπυκνώνεται στη διεπιφάνεια ούτε να αποσυντίθεται πριν εισέλθει στην

πηγή ιόντων του φασματομέτρου μάζας. Επιπλέον, η ποσότητα του αερίου που εισέρχεται στην πηγή ιόντων πρέπει να βρίσκεται εντός της αντλητικής ικανότητας του φασματομέτρου μάζας (4).

Στο θάλαμο εκροής γίνεται η απομάκρυνση των μορίων του φέροντος αερίου λόγω του ότι είναι ελαφρύτερα από τα συστατικά του δείγματος (4).



Εικόνα 2: Διάταξη σύζευξης GC-MS (24).



Εικόνα 3: Σύζευξη GC-MS(22).

2.2.9. Πηγές ιονισμού

Τα μόρια της αναλυόμενης ένωσης πρέπει να ιονιστούν ώστε να προσελκυστούν ή να αποκρουσθούν από τα κατάλληλα ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία. Οι τεχνικές ιονισμού που υπάρχουν είναι πολλές αλλά η επίδραση ηλεκτρονίων (EI) είναι ο πιο παλιός, ο πιο κοινός και ο απλούστερος. Η πηγή ιονισμού θερμαίνεται και υπό κενό και έτσι τα πιο πολλά δείγματα ατμοποιούνται

εύκολα και έπειτα ιονίζονται. Ο ιονισμός συνήθως ολοκληρώνεται από την επίδραση μιας δέσμης ηλεκτρονίων (21).

Σε μια χαρακτηριστική πηγή αυτά που εκρέουν περνούν μέσω των στηλών GC σε μια θερμαινόμενη πηγή ιονισμού σε χαμηλό κενό. Τα ηλεκτρόνια προέρχονται από μια ίνα βολφραμίου με ένα συλλέκτη δυναμικού 70 eV. Τα ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας συγκρούονται με τα ουδέτερα μόρια της αναλυόμενης ένωσης και έτσι προκαλείται ο ιονισμός και η θραύση. Έτσι παράγονται σχεδόν αποκλειστικά τα θετικά ιόντα. Άλλες τεχνικές ιονισμού είναι: ο χημικός ιοντισμός (CI), ο αρνητικός χημικός ιονισμός (NCI), η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (FI), ο βομβαρδισμός με γρήγορα ουδέτερα άτομα Xe ή Ar ή ιόντα Cs (FIB) (21).

2.2.10. Πλεονεκτήματα- Μειονεκτήματα GC-MS

Το GC-MS μπορεί και συνδυάζει τα πλεονεκτήματα και των δύο τεχνικών, δηλαδή τον υψηλό διαχωρισμό και την ταχύτητα ανάλυσης του GC και τον προσδιορισμό και τις ποσοτικές αναλύσεις σε συγκεντρώσεις κάτω του $\mu\text{g/ml}$ του MS (21).

Τα μειονεκτήματα του GC-MS είναι ότι τα όργανα είναι πιο ακριβά, πιο περίπλοκα στον χειρισμό τους (σε σχέση με την GC) και υπάρχει έλλειψη ειδικευμένων χειριστών των οργάνων αυτών (21).

2.3. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ - ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑ (GC-O)

Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας-ολφακτομετρίας (GC-O) συνδυάζει την παραδοσιακή ανάλυση αερίου χρωματογραφίας με την αισθητική ανίχνευση προκειμένου να μελετήσει σύνθετα μίγματα οσμηρών ενώσεων και να προσδιορίσει τις δραστικές αρωματικές ενώσεις. Η τεχνική GC-O χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση των αρωμάτων των τροφίμων (1).

Για την δημιουργία μιας οσφρητικής αντίληψης μπορούν να συμβάλλουν πολλοί παράγοντες και ιδιότητες:

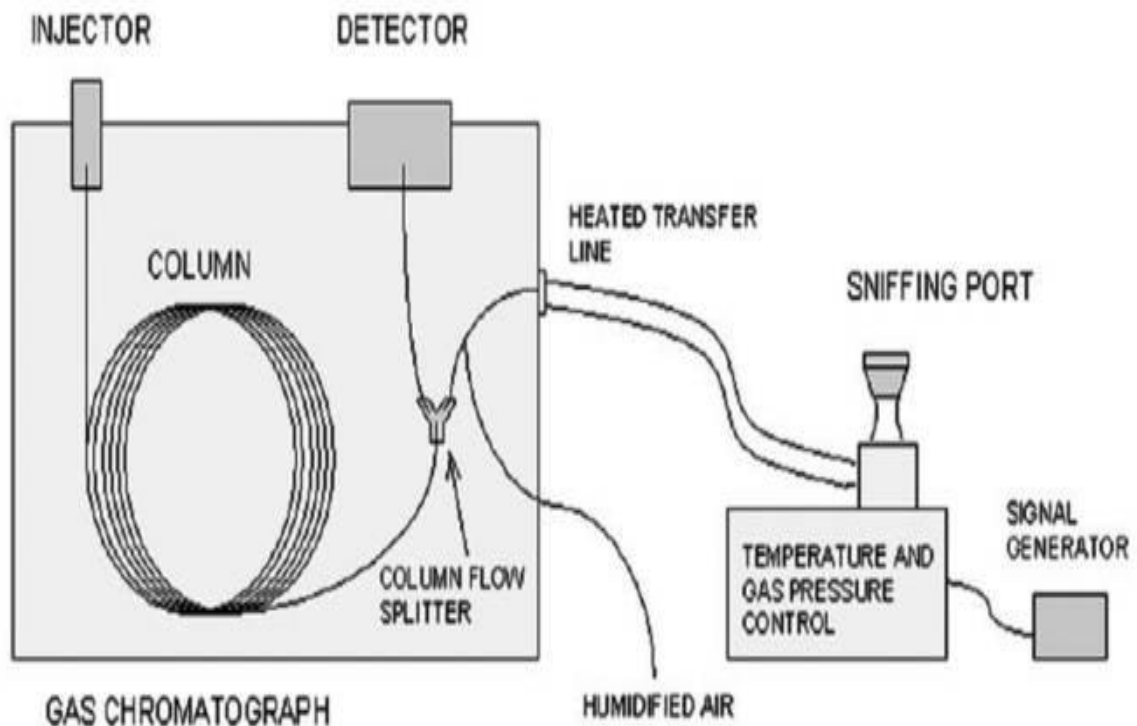
- Το κατώφλι οσμής που είναι η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία το 50% ενός πάνελ δοκιμαστών μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία οσμής χωρίς να

χαρακτηρίζει το ερέθισμα. Αυτό είναι διαφορετικό από το κατώφλι αντίληψης που είναι η συγκέντρωση που το 50% ενός πάνελ είναι σε θέση να ανιχνεύσει και να περιγράψει ποιοτικά μια οσμή.

- Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες όπως η πτητικότητα μιας ουσίας σε συνηθισμένες θερμοκρασίες ώστε να διαπεράσει τον αέρα κοντά στην αισθητήρια περιοχή, την ελαφρά υδατοδιαλυτότητα που επιτρέπει στην οσμή να διέρχεται διαμέσου του βλεννογόνου στρώματος στα οσφρητικά κύτταρα και την λιποδιαλυτότητα που είναι απαραίτητη επειδή τα οσφρητικά στρώματα αποτελούνται πρωτίστως από λιπιδικό υλικό.
- Η ένταση, που είναι η σχετική ισχύς της οσμής πάνω από το κατώφλι αντίληψης και συνδέεται λογαριθμικά με την συγκέντρωση της αρωματικής ένωσης.
- Ο ηδονικός τόνος, που είναι ένα μέτρο της ευχαρίστησης ή της δυσαρέσκειας ενός μείγματος οσμών.
- Η ποιότητα, η οποία αναγνωρίζει μια οσμή και τη διαφοροποιεί από μια άλλη ίσης έντασης.
- Η μοριακή δομή, δηλαδή η μοριακή γεωμετρία, η σύνθεση και η δομή των λειτουργικών ομάδων μέσα σε ένα μόριο, μπορεί να επηρεάσει βαθιά την ποιότητα και τα χαρακτηριστικά μιας οσμής (1).

Οι οσμές είναι πολύπλοκα μείγματα πολλών πτητικών χημικών ουσιών που υπάρχουν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Αυτές οι χημικές ενώσεις μπορούν να αλληλεπιδρούν συνεργιστικά ή προσθετικά στα μείγματα σύμφωνα με απρόβλεπτους κανόνες και είναι στη βάση της συνολικής αίσθησης της οσμής (1).

Η αέρια χρωματογραφία-ολφακτομετρία (GC-O) είναι μια πολύτιμη μέθοδος για την επιλογή των αρωματικών συστατικών από ένα πολύπλοκο μείγμα. Ένας κατάλληλα καταρτισμένος αξιολογητής ή μια ομάδα από αυτούς χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής και μπορεί να μυρίζει το έκλουσμα για να ανιχνεύσει την παρουσία ενώσεων με δραστική οσμή μέσω μιας ειδικά σχεδιασμένης θυρίδας οσμής (ODP) συνδεδεμένης παράλληλα με συμβατικούς ανιχνευτές (θερμική αγωγιμότητα, φωτο-ιονισμός ή ιονισμός με φλόγα), όπως φαίνεται στην εικόνα 4 (1).



Εικόνα 4: Αέρια χρωματογραφία- ολφακτομετρία (GC-O) (1).

Κάθε ξεχωριστή ένωση, που εκλύεται από το GC, μπορεί να ανιχνευθεί από έναν αξιολογητή (οσμή που υπάρχει ή όχι), ο οποίος είναι σε θέση να μετρήσει τον χρόνο που διαρκεί η οσμή (αρχή μέχρι το τέλος), να περιγράψει την ποιότητα της οσμής που γίνεται αντιληπτή και να ποσοτικοποιήσει την έντασή του. Το GC-O σε συνδυασμό με ένα φασματόμετρο μάζας (GC-O / MS) όχι μόνο καθιστά δυνατή την αξιολόγηση των αρωματικών ενώσεων, αλλά και την αναγνώρισή τους με φασματικές πληροφορίες μάζας (1).

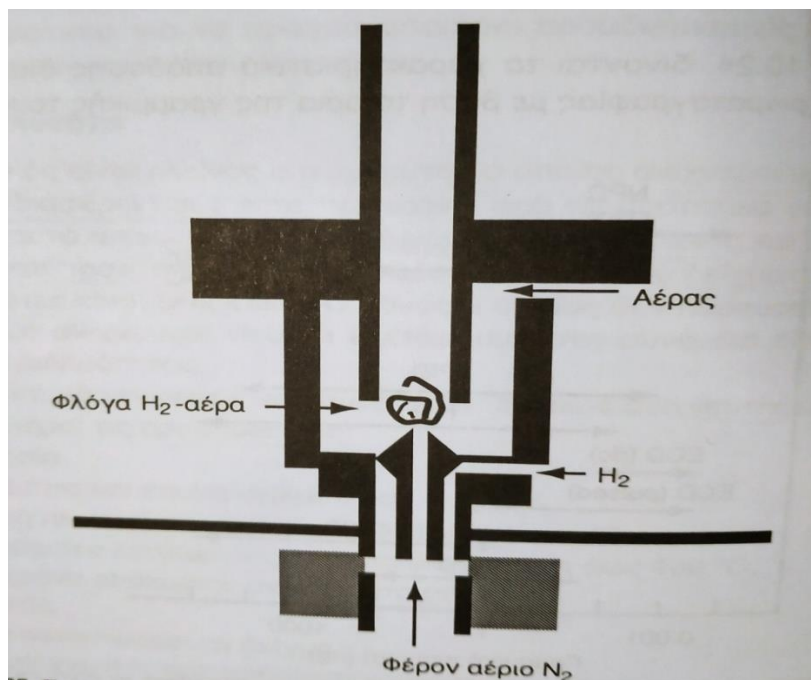
Ο σχεδιασμός όλων των εμπορικά διαθέσιμων ολφακτομετρικών θυρών είναι παρόμοιος. Το έκλουσμα φθάνει στην θύρα διαμέσου μίας μη επικαλυμμένης γραμμής μεταφοράς και εισπνέεται σε κωνική θύρα στο σχήμα της μύτης φτιαγμένη από γυαλί ή PTFE. Η γραμμή μεταφοράς θερμαίνεται για να αποφευχθεί η συμπύκνωση των ημι-πτητικών συστατικών στα τοιχώματα του τριχοειδούς. Βοηθητικό αέριο (υγρός αέρας) προστίθεται στο έκλουσμα για να αποφευχθεί η ξήρανση των βλεννογόνων μεμβρανών των αξιολογητών, πράγμα που θα μπορούσε να προκαλέσει δυσφορία ειδικά σε αναλύσεις μεγάλης διάρκειας. Το μήκος της γραμμής μεταφοράς μπορεί να ποικίλει, αλλά πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο ώστε να επιτρέπει το άνετο κάθισμα του αξιολογητή. Αν το εκχύλισμα που αναλύεται είναι αρκετά πυκνό, το ρεύμα εκλούσματος μπορεί μερικές φορές να διαχωριστεί σε διάφορα ρεύματα και να καταλήξει σε περισσότερες ολφακτομετρικές θυρίδες, για

την ταυτόχρονη ανίχνευση από περισσότερους αξιολογητές. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να ληφθούν πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα (1).

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που καθορίζουν την ποιότητα των δεδομένων που συλλέγονται από το GC-O. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση πτητικών ενώσεων από τα δείγματα καθορίζει τη σύνθεση του εκχυλίσματος και επομένως την ποιότητα του εκλούσματος που είναι διαθέσιμο για αξιολόγηση. Η τοποθέτηση του οργάνου GC και των συνθηκών διαχωρισμού επηρεάζει την ποιότητα της χρωματογραφίας και την απόκριση του ανιχνευτή ανθρώπων. Το σχήμα κορυφής επηρεάζει την αντίληψη της έντασης της οσμής και τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης. Η χρωματογραφική συμπεριφορά των αρωματικών ουσιών ποικίλλει ανάλογα με τη φύση των ενώσεων και τη στατική φάση της στήλης GC. Οι μη πολικές στατικές φάσεις επιτρέπουν την έκλυση πτητικών οσμηρών ουσιών στη χαμηλότερη δυνατή θερμοκρασία. Ωστόσο, πολύ πολικά μόρια, όπως τα λιπαρά οξέα, καταλήγουν σε φτωχά σχήματα αιχμής χρησιμοποιώντας μη πολικές φάσεις. Οι πολικές φάσεις επιδεικνύουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, αν και η συνολική ποιότητα του διαχωρισμού εξαρτάται από τη σύνθεση του δείγματος. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες πτητικές ενώσεις είναι ασταθείς και αποσυντίθενται εύκολα στο θερμαινόμενο σημείο της έγχυσης, σχηματίζοντας παράγωγα όπως για παράδειγμα, ενώσεις θείου που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην αποσύνθεση που προκαλείται από τη θερμότητα (1).

2.3.1. Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, F.I.D.)

Η λειτουργία του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας βασίζεται στην παραγωγή ιόντων όταν μια οργανική ένωση καεί σε φλόγα υδρογόνου και αέρα. Αυτά τα ιόντα συλλέγονται πάνω σε ένα ζεύγος πολωμένων ηλεκτροδίων στον ανιχνευτή και το παραγόμενο ρεύμα ενισχύεται στον ενισχυτή και καταγράφεται (24).



Εικόνα 5: Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (24).

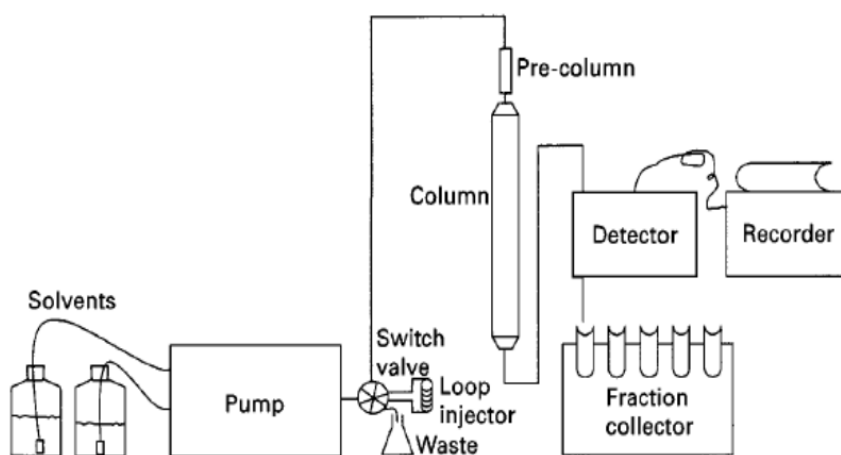
Ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας χρησιμοποιείται στις περισσότερες διατάξεις αέριας χρωματογραφίας γιατί:

- Δίνει καλή γραμμικότητα .
- Έχει χαμηλό όριο ανίχνευσης.
- Ανιχνεύει όλες τις οργανικές ενώσεις.
- Είναι εκλεκτικός και δίνει την δυνατότητα χρήσης νερού και διθειάνθρακα ως διαλύτες .
- Αποκρίνεται γρήγορα.
- Είναι αξιόπιστος.
- Η λειτουργία του ρυθμίζεται εύκολα(24).

2.4. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕΣΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (MPLC)

Η υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC) είναι μια από τις διάφορες προπαρασκευαστικές τεχνικές με χρωματογραφική στήλη. Ο διαχωρισμός υπό πίεση καθιστά δυνατή τη χρήση μικρότερου μεγέθους σωματιδίων και αυξάνει την ποικιλία των στατικών φάσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Η MPLC χρησιμοποιείται τώρα και σε συνδυασμό με άλλες προπαρασκευαστικές τεχνικές όπως η χρωματογραφία ανοικτής στήλης ή η προπαρασκευαστική HPLC. Η MPLC

επιτρέπει τον καθαρισμό μεγάλων ποσοτήτων ενώσεων και σε αντίθεση με την χρωματογραφία ανοικτής στήλης επιτυγχάνονται ταχύτεροι και βελτιωμένοι διαχωρισμοί. Η πλήρωση με μικρότερο μέγεθος σωματιδίων υπό πίεση βελτιώνει την ποιότητα του διαχωρισμού και η στατική φάση μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί. Η απλότητα και η διαθεσιμότητα των οργάνων, σε συνδυασμό με την ανακύκλωση των υλικών πλήρωσης και το χαμηλό κόστος συντήρησης, συμβάλλουν στην ελκυστικότητα της τεχνικής. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση ενός οργάνου MPLC (6).



Εικόνα 6: Τυπική εγκατάσταση οργάνου MPLC (6).

Το όργανο αποτελείται από μια αντλία για την παροχή διαλύτη, ένα σύστημα έγχυσης δείγματος και μια στήλη. Ο διαχωρισμός των προϊόντων μπορεί να παρακολουθείται είτε χειροκίνητα με παρακολούθηση με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) είτε αυτόματα με έναν ανιχνευτή και έναν καταγραφέα συνδεδεμένο στην έξοδο της στήλης. Οι διαχωρισμένες ενώσεις συλλέγονται μέσω ενός συλλέκτη κλασμάτων (6).

Η στήλη είναι το κεντρικό σημείο για τη βελτιστοποίηση ενός προπαρασκευαστικού χρωματογραφικού διαχωρισμού και πρέπει να εξεταστούν προσεκτικά κριτήρια όπως η ποσότητα του δείγματος που πρόκειται να καθαριστεί, η ποσότητα του υλικού πλήρωσης και το μήκος της στήλης έναντι της διαμέτρου της στήλης. Οι στήλες MPLC είναι γενικά κατασκευασμένες από παχύ γυαλί επικαλυμμένο με προστατευτικό πλαστικό και μπορούν να αντέξουν πιέσεις μέχρι 50 bar. Ωστόσο, μερικές στήλες από ορισμένους κατασκευαστές δεν μπορούν να αντέξουν πιέσεις που υπερβαίνουν τα 20 bar. Οι στήλες ποικίλουν τόσο σε μήκος όσο και σε εσωτερική διάμετρο και τα μεγέθη εκφράζονται ως όγκοι πλήρωσης (6).

Η επιλογή των διαστάσεων της στήλης εξαρτάται από την ποσότητα δείγματος που πρόκειται να διαχωριστεί, κυμαινόμενη από 0,1 g (μικρότερες στήλες) μέχρι 100 g (μεγάλες στήλες). Η εκλεκτικότητα (α) και ο παράγοντας κατακράτησης (k) είναι οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάλυση. Η φόρτωση δείγματος μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανάλυση. Ως εκ τούτου, όταν ο διαχωρισμός είναι «εύκολος», μπορούν να φορτωθούν μεγαλύτερες ποσότητες δείγματος. Η αύξηση της διαμέτρου της στήλης επιτρέπει την έγχυση μεγαλύτερης μάζας δείγματος (υψηλότερη απόδοση), αλλά επίσης κάνει δυνατή τη χρήση μικρότερου μεγέθους σωματιδίων. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση του μήκους της στήλης έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη ανάλυση αλλά έχει ελάχιστη ή καθόλου επίδραση στη ροή του δείγματος (6).

Η αυτόματη συλλογή των κλασμάτων μπορεί να γίνει με τη σύνδεση ενός συλλέκτη κλάσματος στη στήλη ή την έξοδο του ανιχνευτή. Ο όγκος των κλασμάτων που συλλέγονται εξαρτάται από την εσωτερική διάμετρο της στήλης και τον ρυθμό ροής (6).

Η επιλογή της στατικής φάσης είναι ίσως η πιο σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την ποιότητα του διαχωρισμού. Στην MPLC χρησιμοποιούνται συνήθως διάφοροι τύποι υλικών πλήρωσης και κατά την επιλογή του υλικού πλήρωσης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράγοντες όπως:

- Το μέγεθος των σωματιδίων
- Το μήκος της στήλης
- Η πίεση
- Ο τύπος του δείγματος
- Το κόστος (6).

Όσον αφορά τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στατική φάση είναι το silica gel. Εκτός από το οικονομικό του πλεονέκτημα, το silica gel διαθέτει και άλλα πλεονεκτήματα όπως ένα ευρύ φάσμα πιθανών διαλυτών ως μέσων έκλουσης, εύκολη εξάτμιση των κλασμάτων και έκλουση με υψηλούς ρυθμούς ροής. Ένα πιθανό μειονέκτημα του silica gel είναι ο κίνδυνος μη αναστρέψιμης προσρόφησης (6).

Η επιλογή του συστήματος έκλουσης είναι επίσης ένα σημαντικό σημείο στην ανάπτυξη και τη βελτιστοποίηση ενός διαχωρισμού με MPLC. Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται κυρίως για επιλογή διαλυτών: βελτιστοποίηση με TLC ή μεταφορά των συνθηκών αναλυτικής HPLC σε MPLC (6).

3. Πειραματικό Μέρος

3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ταυτοποίηση πτητικών συστατικών του αρώματος της ποικιλίας Μαλαγουζιά.

Αρχικά απομονώθηκαν οι φλοιοί από τα σταφύλια, καταψύχθηκαν και στην συνέχεια λυοφιλιώθηκαν. Οι λυοφιλιωμένοι φλοιοί κονιορτοποιήθηκαν και μέρος της σκόνης εκχυλίστηκε με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας ώστε να γίνει εκχύλιση πρόδρομων αρωματικών συστατικών. Τα κλάσματα προστέθηκαν σε πρότυπο μούστο και προκλήθηκε αλκοολική ζύμωση. Έπειτα έγινε εκχύλιση των δειγμάτων από τις μικροζυμώσεις και τέλος ανάλυση με GC-MS και GC-O.

Επιπρόσθετα έγινε εκχύλιση οίνου Μαλαγουζιάς και κλασματοποίηση του εκχυλίσματος με MPLC. Τα κλάσματα αναλύθηκαν με GC-MS.

3.1.2. Εκχύλιση και Μικροζυμώσεις Λυοφιλιωμένων Φλοιών

Τα σταφύλια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας προήλθαν από τον τρύγο του 2017 από τον πειραματικό αμπελώνα του Κτήματος Βιβλία Χώρα που βρίσκεται στο Κοκκινοχώρι Καβάλας. Το σύστημα μόρφωσης είναι γραμμικό με κλάδεμα διπλής αμολυτής και υποκείμενο 1103. Βρίσκεται σε υψόμετρο 300m, είναι αρδευόμενο και το έδαφος είναι ασβεστολιθικό αργιλώδες. Ο πειραματικός αμπελώνας του κτήματος φυτεύτηκε το 2005.

Αρχικά τα σταφύλια χωρίστηκαν σε σακουλάκια των 100 ραγών, ζυγίστηκαν και καταψύχθηκαν. Έπειτα ξεφλουδίστηκαν και ζυγίστηκαν οι νωποί φλοιοί ώστε να υπολογιστεί το πηλίκιο φλοιού/ράγας. Μέρος των νωπών φλοιών λυοφιλιώθηκε και έπειτα μέρος των λυοφιλιωμένων φλοιών κονιορτοποιήθηκε σε εργαστηριακό μύλο.

Σε περιέκτη με βιδωτό πώμα τοποθετήθηκε σκόνη από φλοιούς Μαλαγουζιάς βάρους 12,58g. Το βάρος αυτό των φλοιών επιλέχθηκε διότι από 5kg σταφύλια προέκυψε σκόνη βάρους 6,29g έτσι ώστε να προστεθεί στον πρότυπο μούστο διπλή ποσότητα πρόδρομων αρωματικών ενώσεων.

Στο δοχείο που περιείχε την σκόνη τοποθετήθηκαν διαδοχικά πέντε οργανικοί διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας ώστε να εκχυλιστούν σε κάθε διαλύτη διαφορετικής πολικότητας συστατικά. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Πεντάνιο
2. Πεντάνιο- Διαιθυλαιθέρας (1:1)
3. Διαιθυλαιθέρας
4. Διαιθυλαιθέρας- Μεθανόλη (1:1)
5. Μεθανόλη

Στο δοχείο που περιείχε τη σκόνη από τους φλοιούς προστέθηκαν αρχικά 200 ml πεντάνιο και το μείγμα αφέθηκε για 24 ώρες. Έπειτα έγινε ανάδευση του μείγματος σε μαγνητικό αναδευτήρα για 2 ώρες. Ακολούθησε διήθηση με διηθητικό χαρτί και το διήθημα συλλέχθηκε σε κωνική φιάλη. Η σκόνη που παρέμεινε στο χαρτί επιστράφηκε στο δοχείο και προστέθηκε ο επόμενος διαλύτης (100ml πεντάνιο και 100ml διαιθυλαιθέρα) και για τον οποίο ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία.

Το διήθημα εξατμίστηκε με την χρήση περιστροφικού εξατμιστή (rotary evaporator) ώστε να γίνει η απομάκρυνση του διαλύτη μέχρι ξηρού. Το κλάσμα που προέκυψε διαλύθηκε σε 2ml καθαρής αιθανόλης και έπειτα χωρίστηκε σε δύο μπουκάλια που το καθένα περιείχε 200ml πρότυπο μούστο και 1ml κλάσματος. Σε κάθε μπουκάλι προστέθηκε ζυμομύκητας UCLM S325 (0,05g) και αφέθηκαν ώστε να πραγματοποιηθεί η ζύμωση. Τα μπουκάλια ζυγίζονταν κάθε μέρα ώστε να διαπιστωθεί το τέλος της ζύμωσης μέσω της μικρής καθημερινής μείωσης του βάρους τους. Τέλος πραγματοποιήθηκε μέτρηση αναγόντων σακχάρων με την μέθοδο DNS ώστε να διαπιστωθεί το τέλος της ζύμωσης. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα κλάσματα που προέκυψαν από τον κάθε διαλύτη.

Δείγμα	Διαλύτης
M1 (μάρτυρας)	Πρότυπος μούστος χωρίς προσθήκη εκχυλίσματος από διαλύτη
M2 (μάρτυρας)	Πρότυπος μούστος χωρίς προσθήκη εκχυλίσματος από διαλύτη
A	Πεντάνιο
B	Πεντάνιο
Γ	Πεντάνιο- Διαιθυλαιθέρας
Δ	Πεντάνιο- Διαιθυλαιθέρας
E	Διαιθυλαιθέρας
ΣΤ	Διαιθυλαιθέρας

Z	Μεθανόλη
H	Μεθανόλη

Πίνακας 3: Ονομασίες δειγμάτων και διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθεται η μάζα του συνόλου των ουσιών που παρέσυρε ο κάθε διαλύτης.

Διαλύτης	Μάζα ουσιών που παρασύρθηκαν
Πεντάνιο	0,339g
Πεντάνιο- Διαιθυλαιθέρας (1:1)	0,257g
Διαιθυλαιθέρας	0,125g
Διαιθυλαιθέρας- Μεθανόλη (1:1)	Δεν ήταν δυνατή η απομάκρυνση των διαλυτών λόγω της κολλώδους μορφής που απέκτησε το εκχύλισμα με την χρήση του περιστροφικού εξάτμιστή.
Μεθανόλη	Η διάλυση έγινε με νερό και όχι αιθανόλη επομένως δεν έγινε εξάτμιση μέχρι ξηρού

Πίνακας 4: Μάζα ουσιών που παρασύρθηκε από κάθε διαλύτη.

Το κλάσμα του διαθυλαιθέρα- μεθανόλης είχε κολλώδη μορφή μετά την απομάκρυνση του διαλύτη και δεν ήταν εφικτή η συλλογή του από την φιάλη.

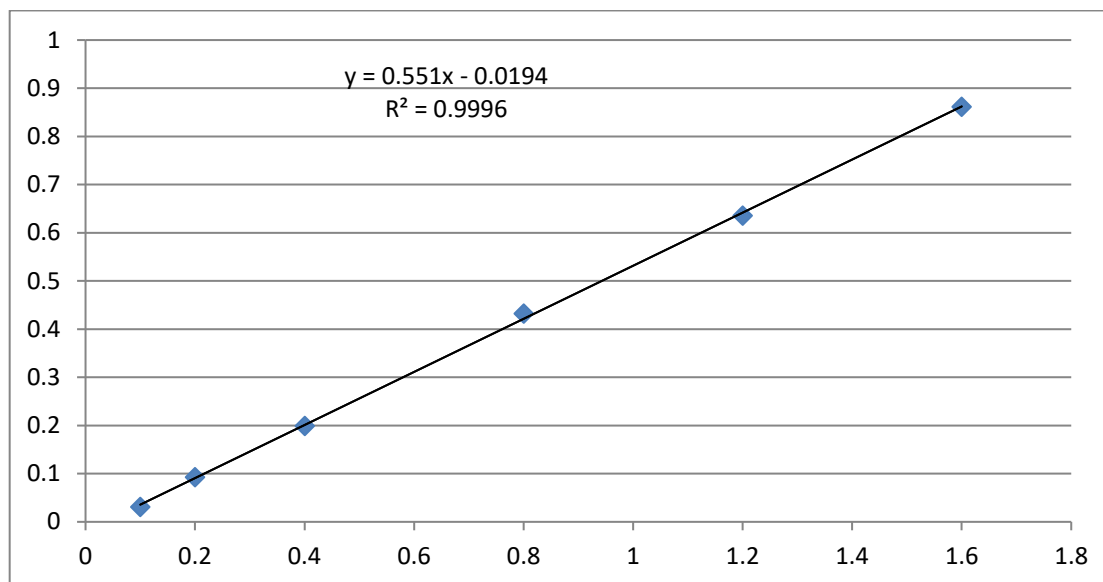
3.1.3. Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων με την μέθοδο DNS

Η μέθοδος DNS χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων. Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου DNS θερμαίνονται 400 ml νερού και σε αυτό προστίθενται 8 g NaOH. Στην συνέχεια σε αυτό διαλύονται με ανάδευση 5 g 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ και 150 g τρυγικό καλιονάτριο. Ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 500 ml.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 500 μl δείγματος και 500 μl αντιδραστηρίου DNS. Ακολουθεί ανάδευση του μείγματος και μεταφορά του σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 5 min. Μετά το πέρας των 5 min οι δοκιμαστικοί σωλήνες ψύχονται σε νερό βρύσης και σε αυτούς προστίθενται 5 ml νερό. Το φωτόμετρο μηδενίζεται με τον μάρτυρα (ο οποίος ακολουθεί την πορεία της αντίδρασης αλλά αντί για δείγμα περιέχει νερό) και μετριέται η απορρόφηση στα 540 nm.

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των αναγωγικών σακχάρων των δειγμάτων κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με διαλύματα γλυκόζης. Οι

συγκεντρώσεις των διαλυμάτων γλυκόζης που παρασκευάζονται για την καμπύλη αναφοράς είναι 0,1 g/l, 0,2 g/l, 0,4 g/l, 0,8 g/l, 1,2 g/l και 1,6 g/l. Σε erpendorf των 2 ml παρασκευάζονται οι παραπάνω συγκεντρώσεις διαλυμάτων γλυκόζης και ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού. Τέλος, μετράται η απορρόφηση τους στα 540 nm και κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς.



Γράφημα 1: Καμπύλη αναφοράς.

3.1.4. Απομόνωση πτητικών συστατικών

Μετά το τέλος της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των κλασμάτων με διχλωρομεθάνιο. Από κάθε μπουκάλι ελήφθησαν 28ml κρασιού, τα οποία χωρίστηκαν σε τέσσερις σωλήνες φυγοκέντρου και φυγοκεντρήθηκαν για 10min στις 4000rpm ώστε να γίνει απομάκρυνση στερεών σωματιδίων. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης ελήφθησαν τα 5ml υπερκείμενου από κάθε σωλήνα και τοποθετήθηκαν σε καθαρούς σωλήνες φυγοκέντρου. Σε αυτούς προστέθηκαν 50μl 3-οκτανόλης (συγκέντρωσης 0,1g/l) και 2ml διχλωρομεθάνιο (κρύο). Έπειτα ακολούθησε η ανάδευση των σωλήνων στο vortex για 1min και η τοποθέτησή τους σε πάγο. Μετά ακολούθησε φυγοκέντρωση των σωλήνων για 10min στις 4000rpm. Έπειτα συλλέχθηκε η οργανική φάση με σύριγγα και ακολούθησε φιλτράρισμα με ηθμό από fiberglass. Ο ηθμός προηγουμένως διαβράχθηκε με 1ml διχλωρομεθάνιο και σε αυτόν τοποθετήθηκε άνυδρο θειικό νάτριο (0,4g) το οποίο βράχθηκε εκ νέου με 1ml διχλωρομεθάνιο. Το άνυδρο θειικό νάτριο χρησιμοποιήθηκε ώστε να συγκρατήσει την υγρασία που μπορεί να υπήρχε στην οργανική φάση. Το διήθημα

συλλέχθηκε σε φιαλίδιο των 20ml και έπειτα τοποθετήθηκε στο ψυγείο. Τέλος τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν ως 1-1,5ml για την ανάλυση τους με GC-MS και GC-O.

3.1.5. Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας

Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για την Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας ήταν Agilent 597c VL msd με μη πολική στήλη DB-5 (μήκους 30m, πάχους 0,25μm, πλάτους 0,25mm). Το φέρον αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Ήλιο και η ροή του ήταν 1 ml/min. Ο όγκος κάθε δείγματος που εισάχθηκε ήταν 1 ml. Η θερμοκρασία εισαγωγής του δείγματος ορίστηκε στους 220° C. Η αρχική θερμοκρασία στον φούρνο ήταν 40° C και αυξανόταν με ρυθμό 3° C/min μέχρι να φτάσει τους 160° C. Η τελική της τιμή ήταν 240° C μετά από σταδιακή αύξηση με ρυθμό 10° C/min.

3.1.6. Αέρια Χρωματογραφία- Ολφακτομετρία

Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για την Αέρια Χρωματογραφία-Ολφακτομετρία ήταν το GC Focus Series 230 της Thermo Lab Electron Corporation με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και με Sniffer 9000, ενώ η στήλη ήταν DB-Wax (μήκους 30m, εσωτερική διάμετρο 0,32mm, πάχος εσωτερικής στιβάδας 0,25μm). Το φέρον αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ήλιο, με ροή 1μl/min. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ήταν 250°C και του εισαγωγέα 240°C. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με τεχνική Splitless για 5 min. Η αρχική θερμοκρασία στον φούρνο ήταν 40° C για 3 λεπτά και έπειτα αυξανόταν με ρυθμό 3° C/min μέχρι να φτάσει τους 160° C. Η τελική θερμοκρασία ήταν 240° C μετά από σταδιακή αύξηση με ρυθμό 10° C/min.

3.1.7. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την ανάλυση διακύμανσης για ένα παράγοντα (analysis of variance- ANOVA), με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.05$ του προγράμματος Statistica V.7 (Statsoft Inc., Tulsa, Ok). Η σύγκριση των δειγμάτων έγινε με το Tuckey's HSD (Honestly Significant Difference) test. Η στατιστική διαφορά των δειγμάτων περιγράφηκε με την χρήση λατινικών γραμμάτων (a,b,c κ.α). Δείγματα με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

3.1.8. Εκχύλιση Οίνου Μαλαγουζιάς με Διχλωρομεθάνιο

Σε κωνική φιάλη προστέθηκαν 400ml κρασί, 400ml 3-οκτανόλη συγκέντρωσης 1 g/l , 40g χλωριούχο νάτριο και 40ml διχλωρομεθάνιο και αναδεύτηκαν σε λεκάνη με πάγο για 30min. Έπειτα το μείγμα μπήκε σε διαχωριστική χοάνη και αφέθηκε σε ηρεμία για 15min ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των φάσεων. Η οργανική φάση συλλέχθηκε σε δοχείο με βιδωτό πώμα. Στην υδατική φάση προστέθηκαν άλλα 20 ml διχλωρομεθάνιο και αναδεύτηκε σε πάγο για ακόμα 15min. Έπειτα ακολούθησε διαχωρισμός των φάσεων με διαχωριστική χοάνη μετά από παραμονή για 15min και η οργανική φάση συλλέχθηκε στο ίδιο δοχείο. Τέλος ακολούθησε φυγοκέντριση της οργανικής φάσης που συλλέχθηκε (για 10min στις 4000rpm) και το διάλυμα φυλάχθηκε στην κατάψυξη. Η συνολική ποσότητα του κρασιού που εκχυλίστηκε ήταν 2400ml.

3.1.9. Κλασματοποίηση των εκχυλισμάτων οίνου Μαλαγουζιάς με MPLC

Αρχικά, για την απομάκρυνση της υγρασίας προστίθεται στο εκχύλισμα άνυδρο θειικό νάτριο σε ποσότητα ανάλογη με τον όγκο του εκχυλίσματος και αναδεύεται για 15min. Έπειτα ακολούθησε διήθηση και απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους του διαλύτη με rotary evaporator. Μετά ακολούθησε συμπύκνωση μέχρι τα 1,5-2 ml με άζωτο και φύλαξη του εκχυλίσματος στην κατάψυξη μέχρι την στιγμή της ανάλυσης. Πριν την εισαγωγή του εκχυλίσματος στην MPLC, αυτό συμπυκνώθηκε με άζωτο σε όγκο 100ml και έπειτα προστέθηκαν σε αυτό 100ml πεντανίου.

Τα συστήματα των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το πεντάνιο με τον διαιθυλαιθέρα και ο διαιθυλαιθέρας με την μεθανόλη (σταδιακή αύξηση της πολικότητας του διαλύτη). Στην αρχή της ανάλυσης με το πρώτο σύστημα διαλυτών η συγκέντρωση του πεντανίου ήταν 100% και του διαιθυλαιθέρα 0% και αυξανόταν σταδιακά μέχρι να φτάσει το 100% και αυτή του πεντανίου το 0%. Το ίδιο ισχύει και για το δεύτερο σύστημα διαλυτών όπου η συγκέντρωση του διαιθυλαιθέρα μειωνόταν σταδιακά με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της μεθανόλης. Η ροή των διαλυτών ήταν 12ml/min και η συλλογή των κλασμάτων έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους συλλέχθηκαν 22 ml κλάσματος στον καθέναν.

Μετά το πέρας της ανάλυσης ακολούθησε σύμπτυξη των εκχυλισμάτων με αποτέλεσμα να προκύψουν επτά κλάσματα. Το τέταρτο κλάσμα προέκυψε από συνένωση εκχυλισμάτων που προήλθαν από την αλλαγή διαλυτών. Η απομάκρυνση των διαλυτών έγινε με την χρήση περιστροφικού εξατμιστή και αερίου αζώτου. Τέλος, ακολούθησε GC-MS για την ποιοτική ανάλυση των αρωματικών συστατικών των κλασμάτων.

Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για την MPLC ήταν ISOLERA (Biotage Sweden AB) και η στήλη ήταν Biotage® SNAPKP-SIL 10g, 20/cs.



Εικόνα 7: ISOLERA (Biotage Sweden AB)

4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1. ΠΡΟΤΥΠΑ ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των χρωματογραφημάτων (GC-MS) χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα πρότυπων αρωματικών σε συγκεκριμένες και γνωστές συγκεντρώσεις. Τα πρότυπα αρωματικά που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το άρωμα τους αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πρότυπα	Αρωμα	Χαρακτηριστικό ιόν
Ισοαμυλική αλκοόλη (Isoamyl alcohol)	Ουίσκι , καμμένο	55, 70, 87
2-μέθυλο-1-βουτανόλη (2-methyl-1-butanol)	Κρεμμύδι	57, 70, 87
Ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας (ethyl isobutyrate)	Γλυκιά οσμή, λάστιχο	43, 71, 88
Οξικός ισοβουτυλεστέρας (Isobutyl acetate)	Φρούτο, μήλο, μπανάνα	56, 73, 116
Βουτυρικός αιθυλεστέρας (ethyl butyrate)	Μήλο	71, 88, 101
2- μέθυλο-βουτυρικός αιθυλεστέρας (ethyl-2-methyl butyrate)	Μήλο	57, 85, 102
1-εξανόλη (1-hexanol)	Ρητίνη, λουλούδι, πράσινο	56, 69, 84
cis-3-εξέν-1-όλη (cis-3-Hexen-1-ol)	Γρασίδι	55, 67, 82
Οξικός εστέρας της ισοαμυλικής αλκοόλης (Isoamylacetate)	Μπανάνα	43, 55, 87
cis-2-εξέν-1-όλη (cis-2-hexen-1-ol)	Φύλλο, πράσινο, φρούτο	57, 67, 82
Ισοβαλερικός αιθυλεστέρας (ethyl isovalerate)	Ζύμη, φρούτο	29, 57, 88
3-μέθυλ-θειολ-1-προπανόλη (3-(methylthio)-1-propanol)	Γλυκιά οσμή, πατάτα	67, 83, 96
3- οκτανόλη (3-octanol) (εσωτερικό πρότυπο)	Βρύα, μανιτάρι, ξηρός καρπός	59, 83, 101
Καπροϊικός αιθυλεστέρας (ethylcaproate)	Φρούτο, φλούδα μήλου	88, 99, 144
Οξικός εξυλεστέρας (Hexylacetate)	Φρούτο, βότανο	43, 56, 69

Λιναλοόλη (Linalool)	Λουλούδι, λεβάντα	71, 93, 121
2-φαίνυλο-αιθανόλη (2-phenyl ethanol)	Μέλι, μπαχαρικό, τριαντάφυλλο	91,, 92, 122
Καπρυλικός αιθυλεστέρας (ethyl caprylate)	Φρούτο, λίπος	88, 101, 127
Σιτρονελόλη (Citronellol)	Τριαντάφυλλο	69, 95, 123
Νερόλη (Nerol)	Γλυκιά οσμή	69, 93, 123
2-οξικός φαινυλεστέρας (2-phenyl-ethyl acetate)	Τριαντάφυλλο, μέλι, καπνός	43, 104, 121
Γερανιόλη (Geraniol)	Τριαντάφυλλο, γεράνι	69, 93, 123
β-Δαμασκηνονη (b-damascenone)	Μήλο, τριαντάφυλλο, μέλι	69, 121, 190
Δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (ethyl decanoate)	Σταφύλι	88, 101, 157
B-Ιονόνη (b-ionone)	Φύκια, βιολέτα, λουλούδι, βατόμουρο	121, 177, 192

Πίνακας 5: Άρωμα και χαρακτηριστικό ιόν των πρότυπων αρωματικών που χρησιμοποιήθηκαν.

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφεται το εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των πρότυπων αρωματικών καθώς και οι καμπύλες αναφοράς που προέκυψαν από την ανάλυση των χρωματογραφημάτων τους.

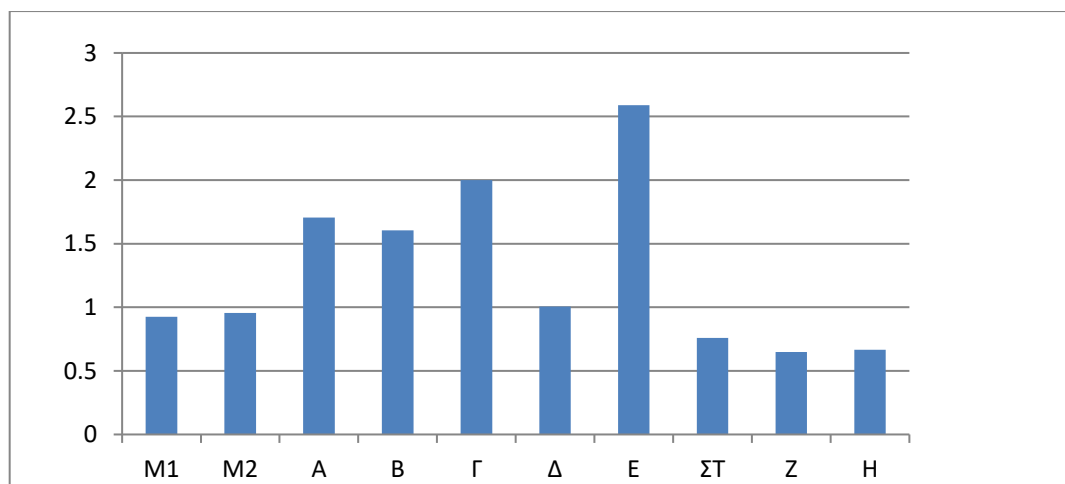
Πρότυπα	Εύρος συγκεντρώσεων (mg/l)	Καμπύλη αναφοράς
Ισοαμυλική αλκοόλη (Isoamylalcohol)	0,12-1,92	$y = 0,019x + 0,002$
2-μέθυλο-1-βουτανόλη(2-methyl-1-butanol)	0,12-1,92	$y = 0,539x - 0,007$
Ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας (ethylisobutyrate)	0,12-1,92	$y = 1,010x + 0,019$
Οξικός ισοβουτυλεστέρας (Isobutylacetate)	0,12-1,92	$y = 1,157x + 0,021$
Βουτυρικός αιθυλεστέρας (ethylbutyrate)	0,12-1,92	$y = 0,464x - 0,000$
2- μέθυλο-βουτυρικός αιθυλεστέρας (ethyl-2-methyl butyrate)	0,12-1,92	$y = 0,558x + 0,001$
cis-3-εξέν-1-όλη (cis-3-Hexen-1-ol)	0,12-1,92	$y = 0,808x - 0,048$
Οξικός εστέρας της ισοαμυλικής αλκοόλης (Isoamylacetate)	0,5-8	$y = 1,016x - 0,282$
cis-2-εξέν-1-όλη(cis-2-	0,12-1,92	$y = 0,744x - 0,041$

hexen-1-ol)		
3-μέθυλ-θειολ-1-προπανόλη (3-(methylthio)-1-propanol)	0,12-1,92	$y = 0,260x - 0,058$
Καπροϊκόξαιθυλεστέρας (ethylcaproate)	0,12-1,92	$y = 0,456x + 0,000$
Οξικός εξυλεστέρας (Hexylacetate)	0,12-1,92	$y = 1,050x - 0,003$
Λιναλόλη (Linalool)	0,04-0,36	$y = 0,482x - 0,011$
2-φαίνυλο-αιθανόλη (2-phenyl ethanol)	2-32	$y = 8,510x - 23,41$
Καπριλικόξαιθυλεστέρας (ethylcaprylate)	0,12-1,92	$y = 0,612x - 0,015$
Σιτρονελόλη (Citronellol)	0,04-0,36	$y = 1,191x - 0,040$
Νερόλη (Nerol)	0,04-0,36	$y = 1,191x - 0,040$
2-οξικός φαίνυλεστέρας (2-phenyl-ethyl acetate)	0,12-1,92	$y = 2,834x - 0,083$
Δεκανοϊκόξαιθυλεστέρας (ethyldecanoate)	0,12-1,92	$y = 0,813x - 0,033$
B-ιονόνη (b-ionone)	0,04-0,36	$y = 0,813x - 0,025$

Πίνακας 6: Εύρος συγκεντρώσεων και καμπύλες αναφοράς των πρότυπων αρωματικών.

4.2. ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΕΛΟΥΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΜΕ ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΑΓΟΝΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ (ΜΕΘΟΔΟΣ DNS)

Το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την εκχύλιση των λυοφιλιωμένων φλοιών με τους διαφορετικούς διαλύτες (πεντάνιο, πεντάνιο- διαιθυλαιθέρας, διαιθυλαιθέρας, μεθανόλη) καθώς και του μάρτυρα (πρότυπο χωρίς διαλύτη), διαπιστώθηκε με την μέτρηση των αναγόντων σακχάρων με την μέθοδο DNS. Στο παρακάτω γράφημα εμφανίζονται οι συγκεντρώσεις των σακχάρων στα δείγματα.



Γράφημα 2: Ανάγοντα σάκχαρα (g/l) των δειγμάτων των μικροζυμώσεων.

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται ότι σε όλα τα δείγματα η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων είναι μικρότερη ή ίση με 2 g/l, εκτός από το E (κλάσμα με διαιθυλαιθέρα) στο οποίο η ζύμωση ήταν πιο αργή από τα υπόλοιπα δείγματα (πολύ μικρή καθημερινή μείωση του βάρους του).

4.3. ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΜΕΤΑ ΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

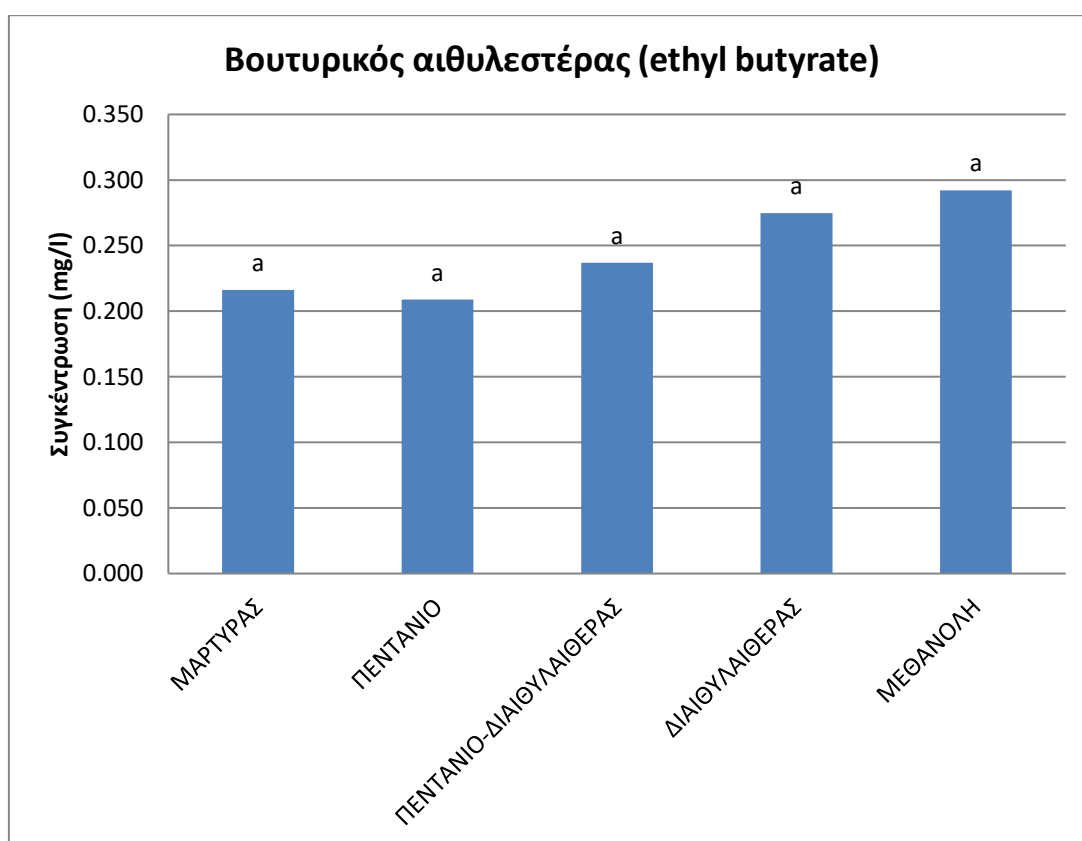
Μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης των μούστων που περιείχαν τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση των λυοφιλιωμένων φλοιών με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας, ακολούθησε ανάλυση με GC-MS. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας, ήταν πεντάνιο, πεντάνιο- διαιθυλεθέρας, διαιθυλεθέρας και μεθανόλη. Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις (mg/l) των αρωματικών ενώσεων που εντοπίστηκαν στα δείγματα που προέκυψαν μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης των πρότυπων μούστων που περιείχαν τα εκχυλίσματα των διαλυτών (πεντάνιο, πεντάνιο- διαιθυλαιθέρας, διαιθυλαιθέρας, μεθανόλη) . Στα γραφήματα αυτά γίνεται στατιστική σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων της κάθε ένωσης στους διαφορετικούς διαλύτες. Οι τιμές που αναγράφονται με διαφορετικά γράμματα (a,b,c,d) είναι σημαντικά διαφορετικές ,κατά το Tuckey's HSD test ($p < 0.05$).

4.3.1. Εστέρες

Βουτυρικός αιθυλεστέρας (ethyl butyrate)

Ο βουτυρικός αιθυλεστέρας στο κρασί παράγεται από την αντίδραση εστεροποίησης της αιθανόλης με το βουτυρικό οξύ. Το βουτυρικό οξύ είναι μια πολική ένωση που υπάρχει στο φλοιό του σταφυλιού.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η συγκέντρωση του βουτυρικού αιθυλεστέρα στους οίνους που προέκυψαν μετά τις μικροζυμώσεις των πρότυπων μούστων που περιείχαν τα κλάσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση των λυοφιλιωμένων φλοιών με τους διάφορους διαλύτες.



Γράφημα 3: Συγκεντρώσεις (mg/l) του βουτυρικού αιθυλεστέρα στα δείγματα των διάφορων διαλυτών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα(a,b,c,d...) είναι σημαντικά διαφορετικές, Tuckey's HSD test, $p < 0.05$.

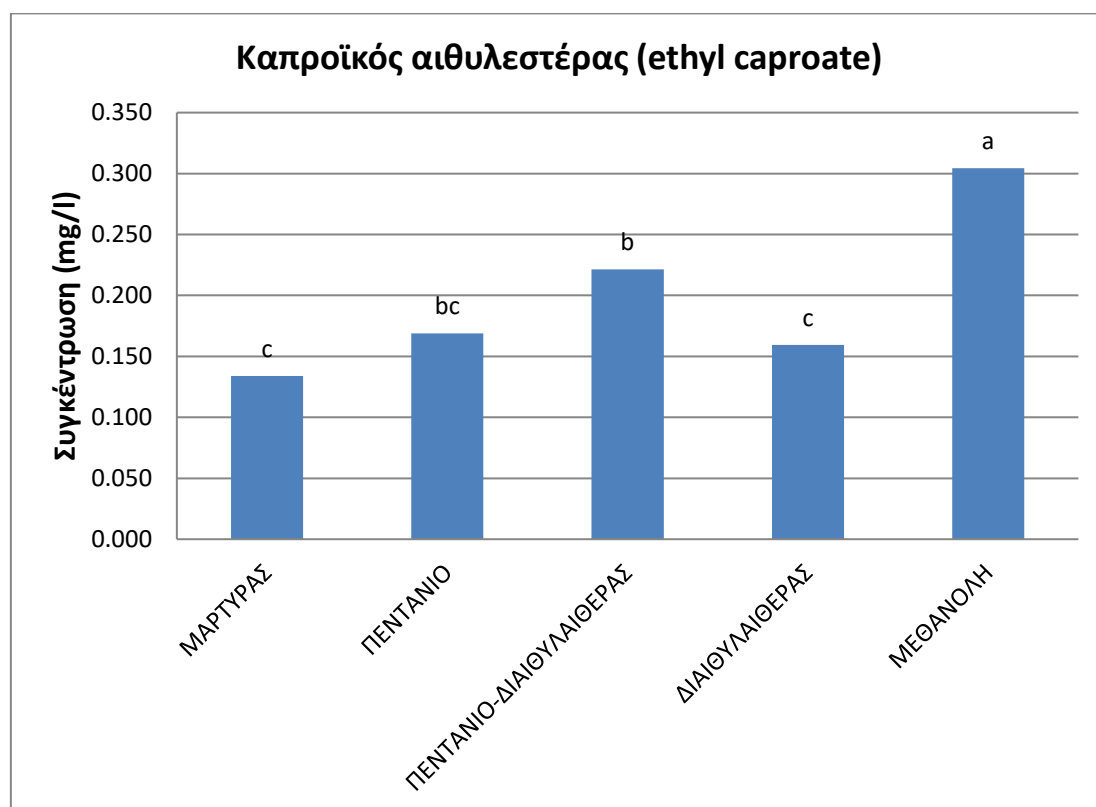
Στο παραπάνω γράφημα παρατηρείται ότι ο οίνος που περιείχε την μεγαλύτερη συγκέντρωση βουτυρικού αιθυλεστέρα είναι εκείνος με το εκχύλισμα της μεθανόλης, λόγω της μεγάλης πολικότητας αυτής καθώς και του βουτυρικού

οξέος. Οι συγκεντρώσεις του βουτυρικού αιθυλεστέρα στους οίνους που περιείχαν τα εκχυλίσματα των διάφορων διαλυτών δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

Καπροϊκός αιθυλεστέρας (ethyl caproate)

Ο καπροϊκός αιθυλεστέρας στο κρασί δημιουργείται από την αντίδραση εστεροποίησης της αιθανόλης με το καπροϊκό οξύ. Το καπροϊκό οξύ είναι πολική ένωση και υπάρχει στο φλοιό του σταφυλιού.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η συγκέντρωση του καπροϊκού αιθυλεστέρα στους οίνους που προέκυψαν μετά τις μικροζυμώσεις των πρότυπων μούστων που περιείχαν τα κλάσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση των λυοφιλιωμένων φλοιών με τους διάφορους διαλύτες.



Γράφημα 4: Συγκεντρώσεις (mg/l) του καπροϊκού αιθυλεστέρα στα δείγματα των διάφορων διαλυτών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b,c,d...) είναι σημαντικά διαφορετικές, Tuckey's HSD test, $p < 0.05$.

Στο παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ότι ο οίνος που περιείχε την μεγαλύτερη συγκέντρωση καπροϊκού αιθυλεστέρα είναι εκείνος με το κλάσμα της

μεθανόλης, λόγω της μεγάλης πολικότητας αυτής καθώς και του καπροϊκού οξέος. Η συγκέντρωση του καπροϊκού αιθυλεστέρα σε αυτόν τον οίνο διαφέρει σημαντικά από όλους τους άλλους οίνους. Έπειτα ακολουθούν οι οίνοι με τα κλάσματα του πεντανίου- διαιθυλαιθέρα, πεντανίου, διαιθυλαιθέρα καθώς και ο μάρτυρας στους οποίους οι συγκεντρώσεις του καπροϊκού αιθυλεστέρα δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

Καπριλικός αιθυλεστέρας (ethyl caprylate)

Ο καπριλικός αιθυλεστέρας στο κρασί δημιουργείται από την αντίδραση εστεροποίησης της αιθανόλης με το καπριλικό οξύ. Το καπριλικό οξύ είναι πολική ένωση που υπάρχει στο φλοιούς του σταφυλιού και εκχυλίστηκε από αυτούς με τους διάφορους διαλύτες.

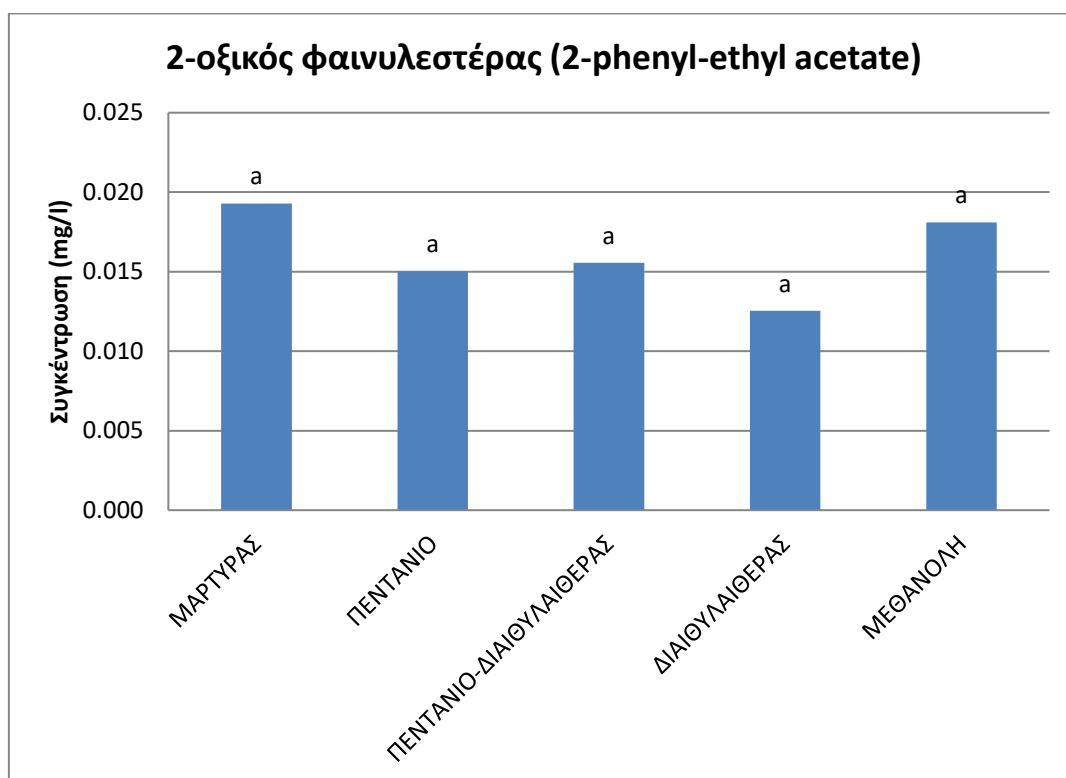


Γράφημα 5: Συγκεντρώσεις (mg/l) του καπριλικού αιθυλεστέρα στα δείγματα των διάφορων διαλυτών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b,c,d...) είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω γράφημα ο οίνος με την μεγαλύτερη συγκέντρωση καρπυλικού αιθυλεστέρα είναι αυτός που περιείχε το κλάσμα της μεθανόλης, λόγω της πολικότητας αυτής καθώς και του καρπυλικού οξέος. Οι συγκεντρώσεις του καρπυλικού αιθυλεστέρα στους υπόλοιπους οίνους είναι αρκετά μικρότερες και δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

2-οξικός φαινυλεστέρας (2-phenyl-ethyl acetate)

Ο 2-οξικός φαινυλεστέρας παράγεται από την αντίδραση εστεροποίησης της 2-φαινυλ-αιθανόλης με το οξικό οξύ.



Γράφημα 6: Συγκεντρώσεις (mg/l) του 2-οξικού φαινυλεστέρα στα δείγματα των διάφορων διαλυτών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b,c,d...) είναι σημαντικά διαφορετικές, Tuckey's HSD test, $p < 0.05$.

Στο παραπάνω γράφημα παρατηρείται ότι τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του 2-οξικού φαινυλεστέρα τις έχουν ο μάρτυρας και ο οίνος με το κλάσμα της μεθανόλης. Οι συγκεντρώσεις του 2-οξικού φαινυλεστέρα δεν διαφέρουν στατιστικά στα πέντε δείγματα.

Δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (ethyl decanoate)

Ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας σχηματίζεται από την αντίδραση του δεκανοϊκού οξέος με την αιθανόλη. Το δεκανοϊκό οξύ είναι πολική ένωση που υπάρχει στο φλοιούς του σταφυλιού και εκχυλίστηκε από αυτούς με τους διάφορους διαλύτες.

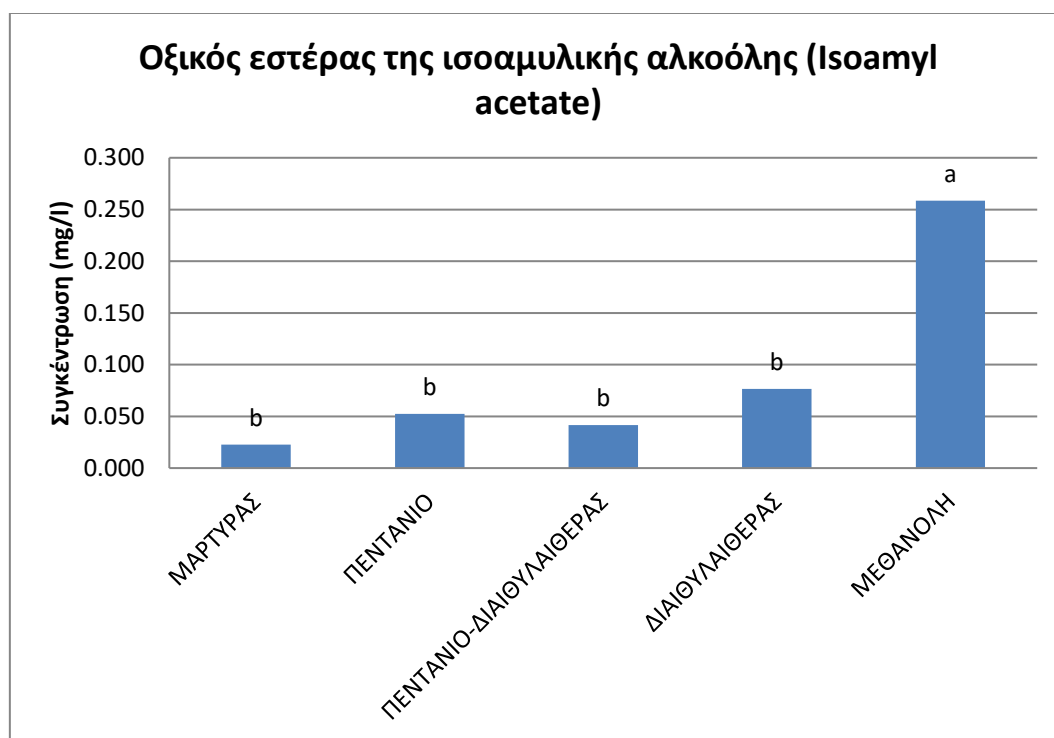


Γράφημα 7: Συγκεντρώσεις (mg/l) του δεκανοϊκού αιθυλεστέρα στα δείγματα των διάφορων διαλυτών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b,c,d...) είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$.

Ο οίνος με την μεγαλύτερη συγκέντρωση δεκανοϊκού αιθυλεστέρα είναι εκείνος που δεν περιείχε κανένα κλάσμα, δηλαδή ο μάρτυρας. Οι συγκεντρώσεις του δεκανοϊκού αιθυλεστέρα στα πέντε δείγματα δεν διαφέρουν στατιστικά.

Οξικός εστέρας της ισοαμυλικής αλκοόλης (Isoamylacetate)

Ο οξικός εστέρας της ισοαμυλικής αλκοόλης παράγεται από την αντίδραση εστεροποίησης της ισοαμυλικής αλκοόλης με το οξικό οξύ.



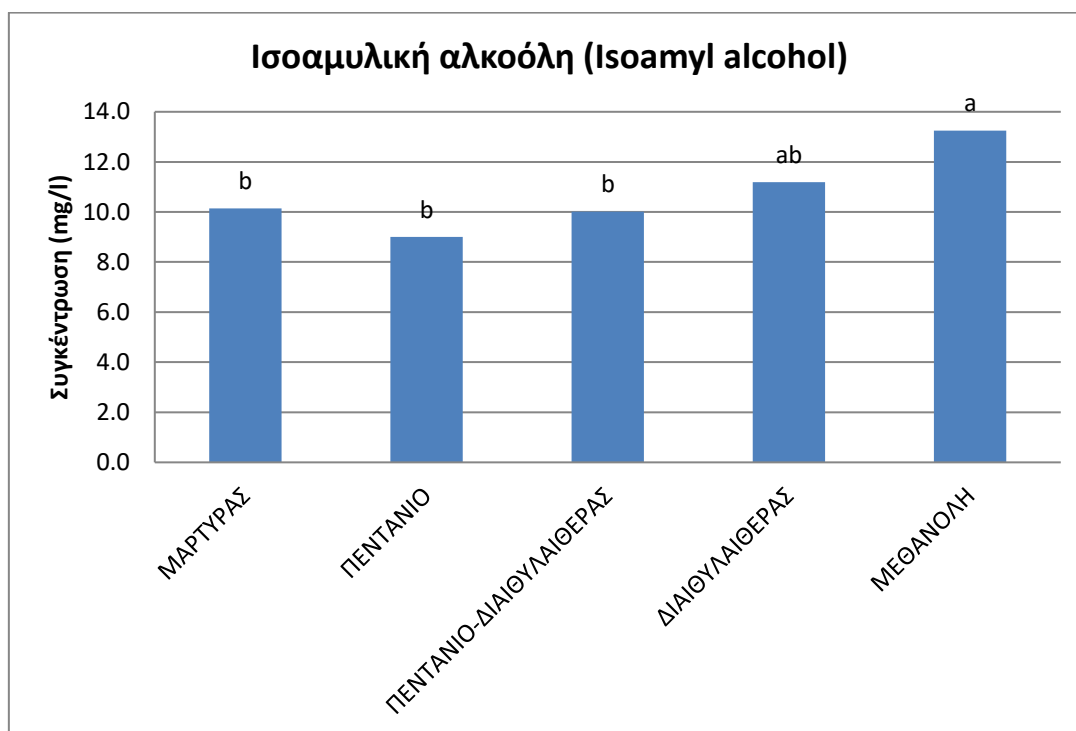
Γράφημα 8: Συγκεντρώσεις (mg/l) του οξικού εστέρα της ισοαμυλικής αλκοόλης στα δείγματα των διάφορων διαλυτών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b,c,d...) είναι σημαντικά διαφορετικές, Tuckey's HSD test, $p < 0.05$.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω γράφημα η συγκέντρωση του οξικού εστέρα της ισοαμυλικής αλκοόλης στον οίνο που περιείχε το κλάσμα της μεθανόλης είναι πολύ μεγαλύτερη από τις συγκεντρώσεις στους υπόλοιπους τέσσερις οίνους και διαφέρει στατιστικά από αυτές, λόγω της ικανότητας της να εκχυλίσει περισσότερο πρόδρομα αρωματικά συστατικά από τους φλοιούς. Τέτοιο συστατικό είναι το αμινοξύ λευκίνη το οποίο λειτουργεί ως υπόστρωμα για την παραγωγή ισοαμυλικής αλκοόλης. Οι οίνοι που περιείχαν τα κλάσματα των υπόλοιπων τριών διαλυτών καθώς και ο μάρτυρας δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους.

4.3.2. Αλκοόλες

Ισοαμυλική αλκοόλη (Isoamyl alcohol)

Η ισοαμυλική αλκοόλη στο κρασί παράγεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

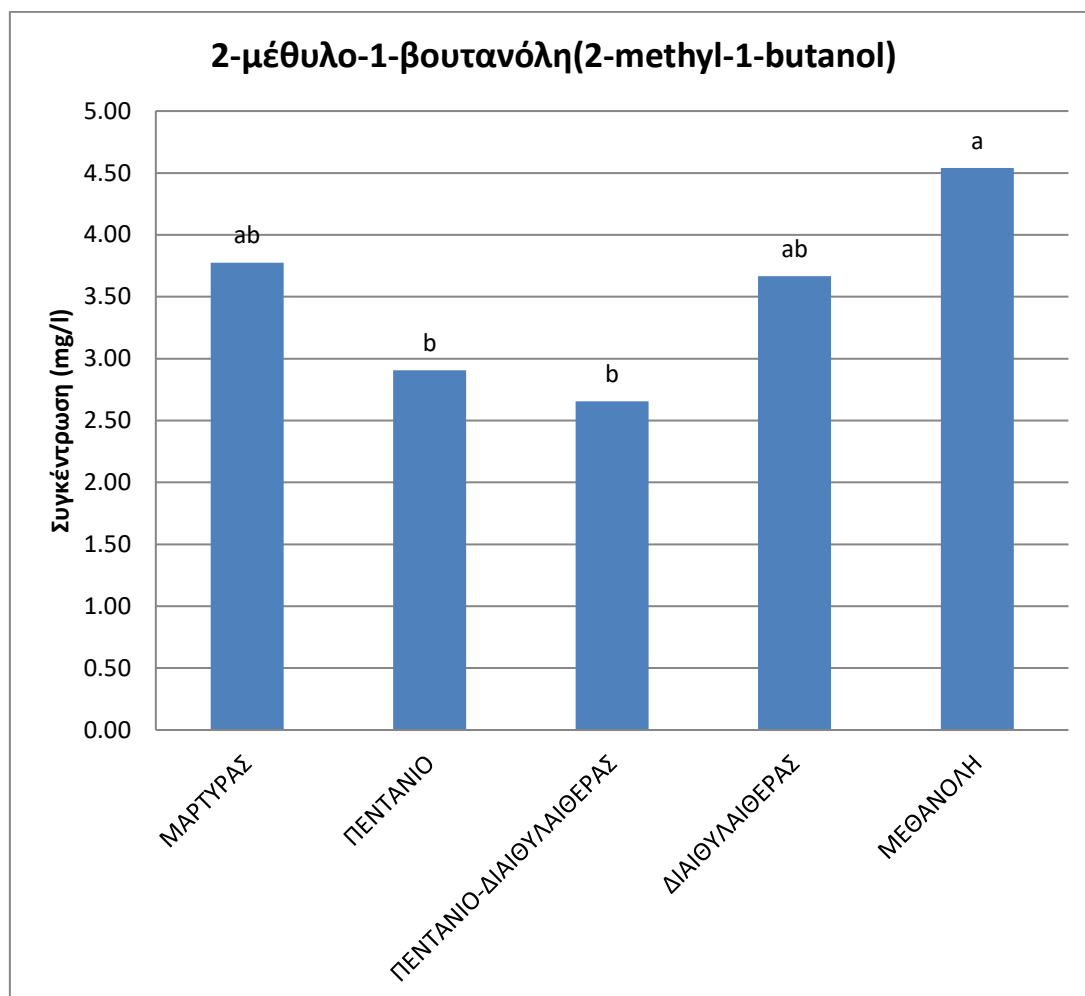


Γράφημα 9: Συγκεντρώσεις (mg/l) της ισοαμυλικής αλκοόλης στα δείγματα των διάφορων διαλυτών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b,c,d...) είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$.

Στο παραπάνω γράφημα, η μεγαλύτερη συγκέντρωση της ισοαμυλικής αλκοόλης παρατηρείται στο δείγμα που περιείχε το κλάσμα της μεθανόλης και δεν διαφέρει στατιστικά από τον οίνο με το κλάσμα του διαιθυλαιθέρα. Οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων τεσσάρων οίνων εκτός αυτού με το κλάσμα της μεθανόλης δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

2-μέθυλο-1-βουτανόλη (2-methyl-1-butanol)

Η 2-μέθυλο-1-βουτανόλη παράγεται στο κρασί κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

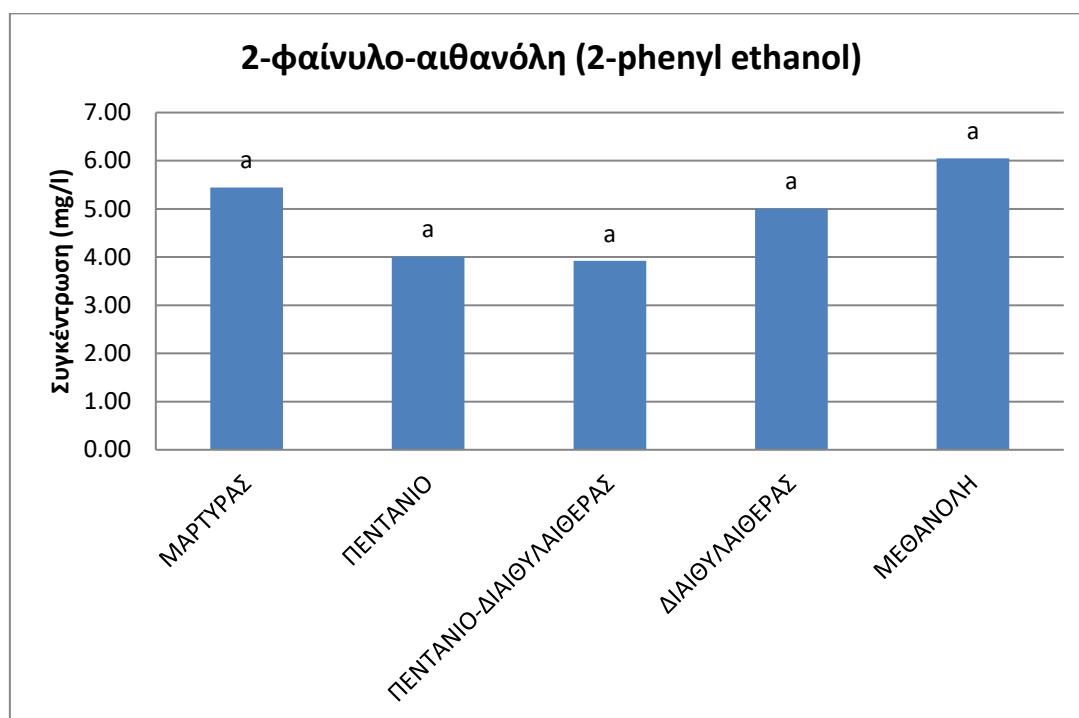


Γράφημα 10: Συγκεντρώσεις (mg/l) της 2-μέθυλο-1-βουτανόλης στα δείγματα των διάφορων διαλυτών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a, b, c, d...) είναι σημαντικά διαφορετικές, Tuckey's HSD test, $p < 0.05$.

Στο παραπάνω γράφημα, η μεγαλύτερη συγκέντρωση της 2-μέθυλο-1-βουτανόλης παρατηρείται στον οίνο που περιείχε το κλάσμα της μεθανόλης και δεν διαφέρει στατιστικά από αυτόν που περιείχε το κλάσμα του διαιθυλαιθέρα και τον μάρτυρα. Οι συγκεντρώσεις της 2-μέθυλο-1-βουτανόλης στους οίνους με τα κλάσματα του πεντανίου και πεντανίου-διαιθυλαιθέρα δεν διαφέρουν στατιστικά με αυτόν που περιείχε το κλάσμα του διαιθυλαιθέρα και τον μάρτυρα.

2-φαίνυλο-αιθανόλη (2-phenyl ethanol)

Η 2-φαίνυλο-αιθανόλη βρίσκεται στον φλοιό του σταφυλιού και με την διαδικασία της υγρής εκχύλισης πέρασε στα εκχυλίσματα των διάφορων διαλυτών.



Γράφημα 11: Συγκεντρώσεις (mg/l) της 2-φαίνυλο-αιθανόλης στα δείγματα των διάφορων διαλυτών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a, b, c, d...) είναι σημαντικά διαφορετικές, Tuckey's HSD test, $p < 0.05$.

Στο παραπάνω γράφημα, η μεγαλύτερη συγκέντρωση της 2-φαίνυλο-αιθανόλης παρατηρείται στον οίνο που περιείχε το κλάσμα της μεθανόλης και δεν διαφέρει στατιστικά από τις συγκεντρώσεις της στα υπόλοιπα τέσσερα δείγματα.

4.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑΣ (GC-O)

Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται τα αρώματα που έγιναν αντιληπτά από τους ερευνητές καθώς και οι χρόνοι στους οποίους αυτά ανιχνεύθηκαν. Τα δείγματα που αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία-ολφασκτομετρία προέκυψαν μετά από εκχύλιση των αρωματικών συστατικών των

φλοιών σε διάφορους διαλύτες (απουσία διαλύτη, πεντάνιο, πεντάνιο-δισουλφίδιο, διαιθυλεθέρας, μεθανόλη). Η ανάλυση έγινε μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης κι στο κάθε δείγμα έγιναν τέσσερις επαναλήψεις.

ΧΡΟΝΟΣ	ΑΡΩΜΑ	ΧΩΡΙΣ ΔΙΑΛΥΤΗ	ΠΕΝΤΑΝΙΟ	ΠΕΝΤΑΝΙΟ-ΔΙΑΙΘΥΛΛΑΙΘΕΡΑΣ	ΔΙΑΙΘΥΛΛΑΙΘΕΡΑΣ	ΜΕΘΑΝΟΛΗ
8.28	ΨΗΜΕΝΟ				×	
10.4	ΛΟΥΛΟΥΔΙ		×			
10.44	ΑΣΧΗΜΟ					×
11.45	ΙΔΡΩΤΑΣ	×				
14.95	ΠΡΑΣΙΝΙΛΑ				×	
15.01	ΙΔΡΩΤΑΣ		×	×	×	×
15.4	ΛΟΥΛΟΥΔΙ	×				
15.77	ΤΥΡΙ		×			
16.08	ΠΡΑΣΙΝΙΛΑ	×				
17.05-17.85	ΠΡΑΣΙΝΙΛΑ				×	
17.86	ΦΡΟΥΤΟ					×
17.9	ΠΡΑΣΙΝΙΛΑ			×		
19.91	ΚΑΜΕΝΟ				×	
22.64	ΛΟΥΛΟΥΔΙ				×	
24.02	ΠΡΑΣΙΝΙΛΑ		×	×		
24.69	ΛΟΥΛΟΥΔΙ					×
29.35	ΤΥΡΙ			×		
29.55	ΛΟΥΛΟΥΔΙ			×		
28.6	ΠΡΑΣΙΝΙΛΑ		×			
31.61	ΖΥΜΗ/ ΨΩΜΙ					×
31.82-31.95	ΛΟΥΛΟΥΔΙ					

41.4	ΚΑΜΜΕΝΟ/ ΨΗΜΜΕΝΟ				×	
41.44	ΠΡΑΣΙΝΙΛΑ		×	×		
42.67	ΚΑΜΜΕΝΟ	×				
45.5	ΛΟΥΛΟΥΔΙ	×	×			

Πίνακας 7: Άρωμα που ανιχνεύθηκε και χρόνος ανίχνευσής του στα δείγματα.

4.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕΤΡΙΑΣ ΠΙΕΣΗΣ (MPLC)

Τα συστήματα των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην Υγρή Χρωματογραφία Μέτριας Πίεσης ήταν το πεντάνιο με τον διαιθυλαιθέρα και ο διαιθυλαιθέρας με την μεθανόλη (σταδιακή αύξηση της πολικότητας του διαλύτη). Στην αρχή της ανάλυσης με το πρώτο σύστημα διαλυτών η συγκέντρωση του πεντανίου ήταν 100% και του διαιθυλαιθέρα 0% και αυξανόταν σταδιακά μέχρι να φτάσει το 100% και αυτή του πεντανίου το 0%. Το ίδιο ισχύει και για το δεύτερο σύστημα διαλυτών όπου η συγκέντρωση του διαιθυλαιθέρα μειωνόταν σταδιακά με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της μεθανόλης. Μετά το πέρας της ανάλυσης ακολούθησε σύμπτυξη των εκχυλισμάτων με αποτέλεσμα να προκύψουν επτά κλάσματα. Το τέταρτο κλάσμα προέκυψε από συνένωση εκχυλισμάτων που προήλθαν από την αλλαγή διαλυτών. Η ανάλυση των κλασμάτων έγινε με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (GC-MS). Στους παρακάτω πίνακες αναγράφονται οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν ποιοτικά από τα χρωματογραφήματα καθώς και ο χρόνος εμφάνισής τους.

1^ο κλάσμα (Πεντάνιο- Διαιθυλαιθέρας)

Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν	Χρόνος ανίχνευσης
Επτάνιο	3.08
Οκτάνιο	7.68
Ναφθαλίνη	22.42
Βενζόλιο	25.94

Πίνακας 18: Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και χρόνος ανίχνευσης τους στο 1^ο κλάσμα.

2^ο κλάσμα (Πεντάνιο- Διαιθυλαιθέρας)

Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν	Χρόνος ανίχνευσης
1-βουτανόλη	3.77
Προπανοϊκό οξύ	5.30
Βουτανοϊκό οξύ	9.33
3-οκτανόλη	13.87
Οξικός εθυλεστέρας	14.63
Εξανοϊκό οξύ	15.04
Διοξικός εστέρας της 1,3-προπανοδιόλης	19.26
Διαιθυλεστέρας ηλεκτρικού οξέος	22.83
Οκτανοϊκό οξύ	27.38
Δεκανοϊκός αιθυλεστέρας	33.91
Δωδεκανοϊκό οξύ	39.52
Ηλεκτρικός αιθυλεστέρας	39.96

Πίνακας 19: Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και χρόνος ανίχνευσης τους στο 2^ο κλάσμα.

3^ο κλάσμα (Πεντάνιο- Διαιθυλαιθέρας)

Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν	Χρόνος ανίχνευσης
3-μέθυλ-1-βουτανόλη	4.04
Ισοβουτυρικό οξύ	5.48
Βουτυρικό οξύ	7.12
Ισοβαλερικό οξύ	8.58
Β-υδροξυβουτυρικός αιθυλεστέρας	10.87
3-μεθυλ-θείο-1-προπανόλη	13.00
3-οκτανόλη	13.86
Εξανοϊκό οξύ	17.67
2-φαίνυλο-αιθανόλη	20.26
Καπριλικός αιθυλεστέρας	23.61
Οκτανοϊκό οξύ	24.68
n- Δεκανοϊκό οξύ	32.88
Δωδεκανοϊκό οξύ	39.40
Αιθυλεστέρας του p- υδροξυκιναμικού οξέος	44.59

Πίνακας 20: Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και χρόνος ανίχνευσης τους στο 3^ο κλάσμα.

**4^ο κλάσμα (Πεντάνιο- Διαιθυλαιθέρας και Διαιθυλαιθέρας-
Μεθανόλη)**

Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν	Χρόνος ανίχνευσης
1-βουτανόλη	3.84
3-αιθοξυ-προπανόλη	6.89
1-εξανόλη	8.03
B-υδροξυβουτυρικός αιθυλεστέρας	10.82
3-μεθυλ-θείο-1-προπανόλη	12.90
3-οκτανόλη	13.73
Εξανοϊκό οξύ	14,29
2-φαίνυλο-αιθανόλη	19.70
Οκτανοϊκό οξύ	24,13
Διαιθυλεστέρας μηλικού οξέος	26.86
Αιθυλεστέρας του p- υδροξυκιναμικού οξέος	46.77

Πίνακας 21: Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και χρόνος ανίχνευσης τους στο 4^ο κλάσμα.

5^ο κλάσμα (Διαιθυλαιθέρας- Μεθανόλη)

Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν	Χρόνος ανίχνευσης
Οξικό οξύ	3.44
3-μέθυλ-1-βουτανόλη	3.97
Διυδροξυ-διμεθυλο-σιλανιο	5.12
Αιθυλακεταμίδιο	9.62
2-φαίνυλο-αιθανόλη	19.39
Οκτανοϊκό οξύ	22.69
Μεβαλολακτόνη	26.56
3,7-διμέθυλ-1,7-οκτανεδιόλη	30.87

Πίνακας 22: Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και χρόνος ανίχνευσης τους στο 5^ο κλάσμα.

6^ο κλάσμα (Διαιθυλαιθέρας- Μεθανόλη)

Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν	Χρόνος ανίχνευσης
3-μέθυλ-1-βουτανόλη	4.11
Αιθυλακεταμίδιο	9.07
Γλυκερίνη	17.30
2-φαίνυλο-αιθανόλη	19.36
Διαιθυλεστέραςιτακονικού οξέος	25.21
n- Δεκανοϊκό οξύ	31.58
Βουτυλικόυδροξυτολουένιο	37.03

Πίνακας 23: Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και χρόνος ανίχνευσης τους στο 6^ο κλάσμα.

7^ο κλάσμα (Διαιθυλαιθέρας- Μεθανόλη)

Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν	Χρόνος ανίχνευσης
2-φαίνυλο-αιθανόλη	19.32
Οκτανοϊκό οξύ	22.54
n- Δεκανοϊκό οξύ	31.35
Βουτυλικό υδροξυτολουένιο	36.98
Δωδεκαναμίδιο	45,50

Πίνακας 24: Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και χρόνος ανίχνευσης τους στο 7^ο κλάσμα.

5. Συμπεράσματα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι εστέρες και οι αλκοόλες είναι βασικά πτητικά αρωματικά συστατικά των οίνων λόγω του αρώματος φρούτων και λουλουδιών που δίνουν στους οίνους στους οποίους περιέχονται.

Οι εστέρες που ανιχνεύθηκαν με GC-MS στους οίνους που παράχθηκαν από την αλκοολική ζύμωση πρότυπων μούστων που περιείχαν τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση των λυοφιλιωμένων φλοιών με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας (πεντάνιο, πεντάνιο- διαιθυλαιθέρας, διαιθυλαιθέρας,

μεθανόλη) ήταν ο βουτυρικός αιθυλεστέρας (μήλο), ο καπρικόος αιθυλεστέρας (φρούτο), ο καπρικόος αιθυλεστέρας (φρούτο, λίπος), ο 2-οξικός φαιθυλεστέρας (τριαντάφυλλο, μέλι), ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (σταφύλι) και ο οξικός εστέρας της ισοαμυλικής αλκοόλης (μπανάνα). Οι αλκοόλες που ανιχνεύθηκαν στα ίδια δείγματα ήταν η ισοαμυλική αλκοόλη (καμένο), η 2-μέθυλο-1-βουτανόλη (κρεμμύδι) και η 2-φαίνυλο αιθανόλη (τριαντάφυλλο, μέλι, μπαχαρικά). Οι οίνοι που περιείχαν το εκχύλισμα της μεθανόλης ήταν αυτοί που περιείχαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εστέρων, με εξαίρεση των δεκανοϊκό αιθυλεστέρα του οποίου η συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη στον οίνο που δεν περιείχε εκχύλισμα (μάρτυρας). Η μεθανόλη δηλαδή είχε την ικανότητα να εκχυλίσει μεγαλύτερες ποσότητες οξέων (βουτυρικό, καπρικό, καπρικό) από τους λυοφιλιωμένους φλοιούς και έτσι παράχθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες των αντίστοιχων εστέρων κατά την αλκοολική ζύμωση. Οι οίνοι που περιείχαν τα εκχυλίσματα της μεθανόλης εμφάνισαν και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλκοολών. Στην περίπτωση της ισοαμυλικής αλκοόλης η οποία παράγεται με υπόστρωμα το αμινοξύ λευκίνη κατά την αλκοολική ζύμωση φάνηκε ότι η μεθανόλη ήταν ο κατάλληλος διαλύτης για να εκχυλίσει το συγκεκριμένο αμινοξύ. Τέλος, στα δείγματα δεν ανιχνεύθηκε κανένα τερπένιο, καθώς κανένας διαλύτης δεν ήταν ικανός να εκχυλίσει αυτές τις ενώσεις από τους λυοφιλιωμένους φλοιούς.

Τα αρώματα που ανιχνεύθηκαν με την Αέρια χρωματογραφία-Ολφακτομετρία συμφωνούν με τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των χρωματογραφημάτων του GC-MS, καθώς εντοπίστηκαν αρώματα φρούτων, λουλουδιών και καμένου που οφείλονται στους εστέρες και τις αλκοόλες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Παρ' όλα αυτά με την Ολφακτομετρία δεν εντοπίστηκαν αρώματα μελιού (2- φαίνυλο αιθανόλη) και κρεμμυδιού (2- μέθυλο-1-βουτανόλη).

Από την ανάλυση των χρωματογραφημάτων του GC-MS του οίνου Μαλαγουζιάς μετά την κλασματοποίηση του με MPLC παρατηρείται ότι οι περισσότερες ενώσεις ανιχνεύθηκαν στο 2^ο και 3^ο κλάσμα στα οποία το σύστημα διαλυτών ήταν το πεντάνιο- διαιθυλαιθέρας όσο αυξανόταν σταδιακά η συγκέντρωση του διαιθυλαιθέρα. Έτσι, φαίνεται ότι αυτό το σύστημα διαλυτών (πεντάνιο- μικρής πολικότητας και ο διαιθυλαιθέρας- μεσαίας πολικότητας) ήταν καταλληλότερο για την εκχύλιση πτητικών συστατικών.

Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ικανοί να εκχυλίσουν αρκετές πρόδρομες ενώσεις αρώματος από τους φλοιούς ώστε κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης να παραχθούν οι αντίστοιχοι εστέρες και αλκοόλες που ανιχνεύθηκαν στα χρωματογραφήματα του GC-MS. Ο διαλύτης που εκχύλισε μεγαλύτερες ποσότητες πρόδρομων συστατικών αρώματος από τους φλοιούς ήταν

η μεθανόλη λόγω της μεγάλης πολικότητας της. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι με την αέρια χρωματογραφία δεν ανιχνεύθηκαν τερπένια, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην αδυναμία των διαλυτών να εκχυλίσουν τις ενώσεις αυτές από τους φλοιούς.

Τα αρώματα που ανιχνεύθηκαν με την Αέρια Χρωματογραφία-Ολφακτομετρία συμφωνούν κατά κύριο λόγο με την ανάλυση των χρωματογραφημάτων του GC-MS, καθώς εντοπίστηκαν αρώματα φρούτων και λουλουδιών που οφείλονται στους εστέρες και τις αλκοόλες που ταυτοποιήθηκαν από το GC-MS. Τέλος ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι ενώ ο 2-οξικός φαινυλεστέρας και η 2 μέθυλο-1-βουτανόλη ανιχνεύθηκαν χρωματογραφικά με GC-MS δεν ήταν δυνατός ο εντοπισμός αρωμάτων/οσμών μελιού και κρεμμυδιού (που οφείλονται σε αυτές τις ενώσεις) από τους ερευνητές.

Σε σχέση με την ανάλυση του οίνου Μαλαγουζιάς, παρατηρήθηκε ότι το ιδανικότερο σύστημα διαλυτών για την εκχύλιση και τον διαχωρισμό των πτητικών συστατικών του ήταν μέτριας πολικότητας.

6. Βιβλιογραφία

1. Brattoli, Cisternino, Dambryoso, Gianluigi de Gennaro, Giungato, Mazzone, Palmisani, Tutino (2013). Gas Chromatography Analysis with Olfactometric Detection (GC-O) as a Useful Methodology for Chemical Characterization of Odorous Compounds. PubMed Central.
2. Bravdo B. and Hepner Y. (1986). Irrigation management and fertigation to optimize grape composition and vine performance. HortScience 21(3) Abstract No 1600.
3. Darriet Ph. (1993). L'arome et les precurseursd'arome du Sauvignon. These de Doctorat, Universit'e de Bordeaux II.
4. Fulton G. Kitson, Barbara S. Larsen, Charles n. McEwen (2000). Gas Chromatography and Mass Spectrometry : A Practical Guide.
5. Gambetta J., Bastian S., Cozzolino D., and Jeffery D. (2014). Factors Influencing the Aroma Composition of Chardonnay Wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry
6. Hostettmann K., Terreaux C. (2000). MEDIUM-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY. University of Lausanne.
7. Jackson D.I., Lombard P.B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality- A review. American Society for Enology and Viticulture Vol 44, No 4.
8. Kotseridis Y. and Baumes R. (2000). J. Agric. Food Chem., 48, 400–406.
9. Louw, L.; Tredoux, A. G. J.; Van Rensburg, P.; Kidd, M.; Naes, T.; Nieuwoudt, H. H. Fermentation-derived aroma compounds in varietal young wines from South Africa. S. Afr. J. Enol. Vitic., 2010, 31, 213-225.
10. Marais J. (1983). Terpenes in the Aroma of Grapes and Wines: A Review. S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 4. No. 2.

11. Matthews M.A, Anderson M.W (1988). Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: responses to seasonal water deficits. *Am. J. Enol. Vitic.* 39:313-20
12. McCarthy M.G. and Coombe B.G. (1984). Water status and winegrape quality. *Acta Horticulture* 171: 447-56.
13. Reynolds, A.; Lowrey, W.; Tomek, L.; Hakimi, J.; De Savigny, C. Influence of irrigation on vine performance, fruit composition, and wine quality of Chardonnay in a cool, humid climate. *Am.J. Enol. Vitic.*, 2007, 58, 217-228.
14. Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006). *Handbook of Enology Volume 2 : The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. England: JohnWiley&SonsLtd.
15. Roland A., Schneider P., RazunglesA.,Cavelier F. (2011). Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. *Chemical Reviews* (111): 7355-7376
16. Smart R.E., Coombe B.G. (1983). Water relations of grapevines. In: *Water Deficits and Plant Growth. Vol VII. Additional Woody Crop Plants*. T. T. Kozlowski (Ed.) pp 137-96 Academic Press. New York.
17. Spiropoulos A, Tanaka J, Flerianos I, Bisson LF (2000) Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*. *Am J Enol Vitic* 51:233–248
18. Swiegers JH, Pretorius IS (2005) Yeast modulation of wine flavour. *Adv Appl Microbiol* 57:131–175
19. Swiegers J. H., Pretorius I.S. (2007). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:954–960
20. Tominaga T., Peyrot des Gachons C. and Dubourdieu D. (1998), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5215– 5219.
21. Καψημάλη Δ. (2008). Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου μορφοειδικού προσδιορισμού μονομέθυλο- και ανόργανου υδραργύρου σε βιολογικά υγρά με μικροεκχύλιση στερεής φάσης από υπερκείμενη αέρια φάση (HS-SPME) και αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομέτρο μάζας (GC-MS). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

22. ΚοντογιάννηςΧ. (2015). Αέρια Χρωματογραφία. Πανεπιστήμιο Πατρών.
23. Κουράκου Σταυρούλα (2016). ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ: η Σταχτοπούτα των ελληνικών κρασοστάφυλων. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΤΟΥ ΦΟΙΝΙΚΑ.
24. Παππαδογιάννης Ι., Σαμανίδου Β. (2001).ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ. Θεσσαλονίκη: ΠΗΓΑΣΟΣ.
25. Σουφλερός Ε. (2015). Οινολογία: Επιστήμη & Τεχνογνωσία. Θεσσαλονίκη: Ευάγγελος Ηρ. Σουφλερός.
26. Σταυρακάκης Μ. (2010). Αμπελογραφία. Αθήνα: ΤΡΟΠΗ και Μανόλης Ν. Σταυρακάκης.
27. Τσακίρης Α. (2014). Οινολογία: Από το σταφύλι στο κρασί. Αθήνα: ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΨΥΧΑΛΟΥ
28. <http://www.flavornet.org/>
29. <http://www.chem.auth.gr/>
30. <https://eclass.uoa.gr/>
31. <http://eclass.uth.gr/>