



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
& ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
I) ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ II) ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη μεταβολισμού ζυμομύκητα σε δύο επίπεδα θρέψης
οργανικού αζώτου

Δέσποινα Γ. Λόλα

Επιβλέπων καθηγητής:
Γιώργος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ

**Αθήνα
2020**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
& ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη μεταβολισμού ζυμομύκητα σε δύο επίπεδα θρέψης
οργανικού αζώτου

"Study of the metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae*
under different nitrogen supplementation"

Δέσποινα Γ. Λόλα

Εξεταστική Επιτροπή:

Γιώργος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Μελέτη μεταβολισμού ζυμομύκητα σε δύο επίπεδα θρέψης οργανικού αζώτου

ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων. Ι) Γαλακτοκομία ΙΙ) Οινολογία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Οινολογίας & Αλκοολούχων Ποτών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ολοένα μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την κατανόηση του ρόλου του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, και ειδικά στο άρωμα του, με έμφαση κυρίως στην παρακολούθηση των ενζυματικών και μεταβολικών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη συμβολή αυτή. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής μελέτης είναι η παρακολούθηση του μεταβολισμού του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* σε δύο επίπεδα θρέψης οργανικού αζώτου και ο προσδιορισμός της σχέσης συγκεκριμένων μεταβολικών διεργασιών του ζυμομύκητα με την παραγωγή πτητικών συστατικών του αρώματος των οίνων.

Ειδικότερα, γλεύκος ποικιλίας Μοσχοφίλερο εμβολιάστηκε με εμπορικό στέλεχος ζυμομύκητα και πραγματοποιήθηκαν μικροοινοποιήσεις με πρωτόκολλο οινοποίησης που διαφέρει ως προς τη θρέψη οργανικού αζώτου, ώστε να προκύψουν δύο επίπεδα θρέψης, ένα χαμηλό και ένα υψηλό. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης μετρούταν η κατανάλωση σακχάρων, το αφομοιώσιμο άζωτο (YAN) και η βιομάζα του ζυμομύκητα. Σε τέσσερα σημεία της αλκοολικής ζύμωσης και συγκεκριμένα στον εμβολιασμό, 48 ώρες μετά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, στα 2/3 της αλκοολικής ζύμωσης και στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες γλεύκους και βιομάζας. Στα δείγματα γλεύκους προσδιορίστηκε το προφίλ των πτητικών ενώσεων με αέρια χρωματογραφία-φασματοφωτομετρία μάζας (SPE-GC-MS). Στη βιομάζα που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε εκχύλιση RNA με σκοπό να προσδιοριστεί με RT-PCR η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη απελευθέρωση τερπενίων και παραγωγή εστέρων, όπως *ATF1*, *ATF2*, *EEB1*, *EHT1*, *IAH1*, *BGL2*, *EXG1*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι οξικοί εστέρες, η λιναλοόλη και η νερόλη παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων θρέψης, γεγονός που επιβεβαιώνει την εξειδίκευση στην παραγωγή πτητικών ενώσεων μεταξύ διαφορετικών επιπέδων συγκέντρωσης αζώτου. Τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν ότι, τα γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή αιθυλικών και οξικών εστέρων είχαν, γενικά, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στην υψηλή προσθήκη αζώτου (300 mg/L YAN). Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων *BGL2* και *EXG1*, στην περίπτωση υψηλής περιεκτικότητας σε άζωτο που συσχετίζεται με τη συγκέντρωση τερπενολών.

Η παρούσα μελέτη έδειξε την επίδραση της αζωτούχας θρέψης στο πτητικό προφίλ των οίνων και στη σχετική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στη παραγωγή των πτητικών ενώσεων. Η μεταβολική ανάλυση επιλεγμένων πτητικών συστατικών του αρώματος σε συνδυασμό με μεταγραφικές αναλύσεις παρέχουν μια

εξαιρετική προσέγγιση για τον προσανατολισμό της διαδικασίας ζύμωσης προς ένα επιθυμητό αρωματικό προφίλ.

Επιστημονικό Πεδίο: Οινολογία

Λέξεις κλειδιά: μεταβολισμός ζυμομυκήτων, *Saccharomyces cerevisiae*, αζωτούχα θρέψη, πτητικές ενώσεις, έκφραση γονιδίων, αλκοολική ζύμωση

Study of the metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* under different nitrogen supplementation

MSc Current Food Technology. I) Dairy Science II) Oenology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Oenology & Alcoholic Drinks

ABSTRACT

Great interest has been developing in recent years in the impact of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma profile of wine, and the understanding of the enzymatic and metabolic mechanisms responsible for this contribution. The objective of this work is to study the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* at two levels of organic nitrogen supplementation and to investigate specific metabolic processes of the yeast that are directly related to the biosynthesis and the production of the volatile compounds of wine.

A commercial yeast strains was inoculated in Moschofilero grape must under two different concentrations of nitrogen, a low at 150 mg/L YAN and a high at 300 mg/L YAN. The fermentation was monitored by measuring the optical density and sugar consumption. Metabolic response was tested through real-time RT-PCR of genes implicated in aroma production of esters and terpenes such as *ATF1*, *ATF2*, *EEB1*, *EHT1*, *IAH1*, *BGL2*, *EXG1* and by determining the volatile composition (SPE/GC-MS) of the samples taken at four different time points of the fermentation.

In terms of the volatile characterization of the wines, acetate esters, linalool and nerol appeared to be clearly distinct between the different levels of YAN, which confirms the specialization in volatile compounds production among different nitrogen concentration levels. Real-time-PCR results revealed that, the genes involved in ethyl and acetate esters production recorded, in general, higher transcript levels under high nitrogen supplementation (300 mg/L YAN). In addition, an up-regulation of the *BGL2* and *EXG1* genes, corresponded well to the terpenols concentration found, was observed in case of high nitrogen content.

Our study revealed the impact of different nitrogen supplementations on the volatile compounds and the relative expression of specific genes. Metabolic analysis of selected volatile components of the wine aroma in conjunction with transcriptional analyses provide a great approach to orient the fermentation process towards a desirable wine aromatic profile.

Scientific area: Oenology

Keywords: yeast metabolism, *Saccharomyces cerevisiae*, nitrogen supplementation, volatile profile, gene expression, alcoholic fermentation

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οινολογίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Οινολογίας κ. Γεώργιο Κοτσερίδη για την ανάθεση και την επίβλεψη του θέματος, καθώς και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερος για την άμεση καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης καθώς και για τη γνώση που μου προσέφερε απλόχερα σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μανώλη Φλεμετάκη και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας κα. Χρυσάνθη Καλλονιάτη για την άριστη συνεργασία και τη πολύτιμη συμμετοχή τους στην εκπόνηση αυτής της μελέτης.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οινολογίας κα. Σταματίνα Καλλίθρακα για τη βοήθειά και τις χρήσιμες συμβουλές της κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και τη συμμετοχή στην Επιτροπή Εξέτασης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Οινολογίας για τη συμβολή του καθένα με τον δικό του τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Τους ευχαριστώ όλους θερμά για την υπομονή, τη συμπαράσταση και το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον που μου προσέφεραν. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στην κα. Νίκη Προξενιά που χωρίς την αμέριστη βοήθεια της, αλλά και τη ψυχολογική υποστήριξη που προσέφερε δεν θα ήταν εφικτή η εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Γιώργο και Σεβαστή και τη μικρή μου αδερφή Νάνσυ, που είναι πάντα δίπλα μου. Τους ευχαριστώ για την αγάπη και τη στήριξη που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1. Ποικιλία Μοσχοφίλερο.....	7
1.1.1. Αμπελογραφικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας.....	7
1.1.2. Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά.....	8
1.1.3. Το γλεύκος της ποικιλίας.....	8
1.2. Λευκή οينوποίηση.....	9
1.3. Στελέχη ζυμομυκήτων	11
1.4. Αζωτούχα θρέψη ζυμομυκήτων.....	13
1.4.1. Ανόργανο άζωτο	14
1.4.2. Οργανικό άζωτο	14
1.4.3. Αφομοιώσιμο άζωτο	15
1.4.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την αφομοίωση του αζώτου	17
1.5. Το άρωμα του οίνου.....	18
1.6. Πτητικές ενώσεις του οίνου.....	20
1.6.1. Ισοπρενοειδή (Τερπενοειδή και C13 Νορισοπρενοειδή).....	21
1.6.2. Εστέρες	22
1.6.3. Αλκοόλες	24
1.6.5. Λιπαρά οξέα.....	26
1.6.6. Πτητικές θειούχες ενώσεις.....	27
1.6.7. Καρβονυλικές ενώσεις.....	29
1.6.8. Φαινυλ-προπανοειδείς ενώσεις.....	29
1.6.9. Φουρανικά παράγωγα και Φουρανόνες	30
1.7. Μεταβολισμός ζυμομύκητα	30
1.7.1. Τερπένια.....	30
1.7.2. Εστέρες	32

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.1. Σκοπός και σχεδιασμός πειράματος.....	35
2.1.1. Πρωτόκολλο οινοποίησης.....	36
2.1.2. Πρωτόκολλο συλλογής βιομάζας	37
2.2. Αναλύσεις στο γλεύκος.....	38
2.2.1. Μέτρηση σακχάρων.....	38
2.2.2. Εκτίμηση βιομάζας	38
2.2.3. Προσδιορισμός αφομοιώσιμου αζώτου.....	39
2.2.3.1. Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου.....	39
2.2.3.2. Προσδιορισμός αζώτου βασικών αμινοξέων.....	39
2.2.4. Εκχύλιση πτητικών ενώσεων γλεύκους με τη μέθοδο εκχύλισης στερεής φάσης (Solid-Phase Extraction, SPE).....	40
2.2.5. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός πτητικών ενώσεων γλεύκους με GC-MS.....	42
2.3. Προσδιορισμός σχετικής έκφρασης γονιδίων.....	44
2.3.1. Απομόνωση ολικού RNA	44
2.3.2. Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA.....	45
2.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	45
2.3.3.1. Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της τεχνικής PCR.....	46
2.3.3.2. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR - QRT PCR).....	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
3.1. Ένδειξη βιομάζας.....	50
3.2. Αφομοιώσιμο άζωτο (YAN).....	51
3.3. Πτητικές ενώσεις	52
3.3.1. Εστέρες	52
3.3.2. Ανώτερες αλκοόλες	55
3.3.3 Τερπενόλες.....	56

3.3.4 Πτητικά οξέα.....	58
3.4. Σχετική έκφραση γονιδίων.....	59
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	65
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	77

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1: Ποικιλία Μοσχοφίλερο (www.oinoxoos.net)	7
Εικόνα 2: <i>S. cerevisiae</i> (https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae)...	11
Εικόνα 3: Δομή των τερπενολών λιναλόλη, γερανιόλη, νερόλη (www.waterhouse.ucdavis.edu).....	21
Εικόνα 4: Σύνθεση εστέρων από <i>S. cerevisiae</i> (Bisson & Karpel, 2010).....	22
Εικόνα 5: Σύνθεση ανώτερων αλκοολών (Bisson & Karpel, 2010).....	25
Εικόνα 6: Περιγραφικοί όροι των οργανοληπτικών χαρακτήρων των πυραζινών (www.winelandmagazine	26
Εικόνα 7: Περιγραφικοί όροι των οργανοληπτικών χαρακτήρων των θειολών (www.winefolly.com).....	28
Εικόνα 8: Καρβονυλική ένωση (https://el.wikipedia.org).....	29
Εικόνα 9: Απελευθέρωση τερπενίων από τις πρόδρομες μη πτητικές ενώσεις τους με τη δράση γλυκοσιδασών (Belda et al., 2017)	32
Εικόνα 10: Απεικόνιση των μεταβολικών μονοπατιών σύνθεσης εστέρων και των γονιδίων που εμπλέκονται (Belda et al., 2017).....	33
Εικόνα 11: Γονίδια εμπλεκόμενα στη παραγωγή πτητικών ενώσεων σε οίνους.....	34
Εικόνα 12: Στάδια εκχύλισης SPE.....	41
Εικόνα 13: Πορεία ανάπτυξης ζυμομύκητα κατά τη διάρκεια ζύμωσης με υψηλό και χαμηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης.....	50
Εικόνα 14: Πορεία YAN κατά τη διάρκεια ζύμωσης με υψηλό και χαμηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης.	52
Εικόνα 15: Οξικοί εστέρες στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη ± τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για	

κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης (($p < 0,05$, LSD test).....	53
Εικόνα 16: Αιθυλεστέρες στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης.....	54
Εικόνα 17: C ₆ αλκοόλες στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).	55
Εικόνα 18: Ισοαμυλική αλκοόλη και 2-φαινυλαιθανόλη στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).....	56
Εικόνα 19: Λιναλόλη και Νερόλη στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).	57
Εικόνα 20: Εξανοϊκό και ισοβαλερικό οξύ στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).	58
Εικόνα 21: Σχετική έκφραση των γονιδίων ATF1, ATF2 που εμπλέκονται στο σχηματισμό οξικών εστέρων κατά την αλκοολική ζύμωση με χαμηλό και υψηλό	

επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε τέσσερα σημεία της αλκοολικής ζύμωσης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).59

Εικόνα 22: Σχετική έκφραση των γονιδίων EEB1, EHT1 που εμπλέκονται στο σχηματισμό αυθυλεστέρων κατά την αλκοολική ζύμωση με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε τέσσερα σημεία της αλκοολικής ζύμωσης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).60

Εικόνα 23: Σχετική έκφραση του γονιδίου IAH1, που σχετίζεται με την υδρόλυση εστέρων κατά την αλκοολική ζύμωση με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε τέσσερα σημεία της αλκοολικής ζύμωσης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).62

Εικόνα 24: Σχετική έκφραση των γονιδίων BGL2 και EXG1 που σχετίζεται με την απελευθέρωση τερπενίων κατά την αλκοολική ζύμωση με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε τέσσερα σημεία της αλκοολικής ζύμωσης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).63

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ποικιλία Μοσχοφίλερο

Το Μοσχοφίλερο είναι μια από τις πιο διαδεδομένες ελληνικές ποικιλίες. Ανήκει σε μία ομάδα ποικιλιών με τη γενική ονομασία Φιλέρι και αποτελεί τη μοναδική ποικιλία με το μοσχάτο χαρακτήρα. Οι παραλλαγές Ασπροφίλερο και Ξανθοφίλερο είναι στενά συγγενείς με το Μοσχοφίλερο, υστερούν όμως σε αρωματικό δυναμικό (Σταύρακας, 2011). Το Μοσχοφίλερο καλλιεργείται κυρίως στην ευρύτερη περιοχή της Πελοποννήσου και ειδικότερα στον νομό Αρκαδίας και την περιοχή της Μαντινείας όπου μαζί με άλλες τοπικές ποικιλίες όπως οι Γλυκερύθρα και Ασπρούδια παρασκευάζουν λευκούς ξηρούς οίνους Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης με όνομα 'ΜΑΝΤΙΝΕΙΑ'. Εκεί, καταλαμβάνει με την καλλιέργεια της, εκτάσεις που φτάνουν τα 7.500 στρέμματα. Εκτός της Πελοποννήσου συνίσταται η καλλιέργειά του Μοσχοφίλερου και στον νομό Ευβοίας, ενώ επιτρέπεται και στους νομούς της Βοιωτίας και της Κεφαλληνίας. Είναι μια εξαιρετικά αρωματική ποικιλία ρόδινου χρωματισμού, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή εξαιρετων λευκών οίνων, ροζέ οίνων με ελαφρά μοσχάτα αρώματα καθώς και αφρωδών οίνων.



Εικόνα 1: Ποικιλία Μοσχοφίλερο (www.oinoxoo.net)

1.1.1. Αμπελογραφικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας

Αναλύοντας τα αμπελογραφικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας, η κορυφή του βλαστού είναι ανοιχτοπράσινη με πυκνό βαμβακώδης χνούδι, τα νεαρά φύλλα κιτρινοπράσινα με βαμβακώδης χνούδι επίσης και με μέσης έντασης ανθοκυανικό χρωματισμό. Συγχρόνως, ο βλαστός είναι ποώδης πράσινος με ερυθρές γραμμώσεις, αραιό χνούδι και μεγάλες έλικες. Τα αναπτυγμένα φύλλα είναι μεγάλα, πεντάλοβα με

το μεσαίο λοβό περισσότερο ανεπτυγμένο. Ο μισχικός κόλπος είναι σχήματος V. Οι νευρώσεις έντονες πράσινες και εξέχουν. Η σταφυλή είναι μεγάλη, κυλινδρική έως κυλινδροκωνική, μέσης έως μεγάλης πυκνότητας. Η ράγα επίσης μεγάλη, σφαιρική με ανοιχτόχρωμο ερυθρό φλοιό και πλούσια σε τανίνες. Η σάρκα είναι μαλακή, γλυκιά και χυμώδης με μοσχάτο άρωμα και άχρωμο χυμό. Τέλος, τα σταφύλια της ποικιλίας φέρονται σε ποδίσκο μέσου μήκους και αποσπώνται εύκολα από αυτόν (Νικολάου, 2012).

1.1.2. Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά

Πρόκειται για ποικιλία ζωνρή και αρκετά παραγωγική. Φέρει σε κάθε καρποφόρο βλαστό δύο σταφυλές από τον 3^ο έως τον 6^ο κόμβο. Στους παλαιότερους αμπελώνες επικρατεί η διαμόρφωσή του σε κυπελλωτά σχήματα, αλλά στους σύγχρονους η διαμόρφωσή του είναι το αμφίπλευρο γραμμικό Royat. Επιδέχεται βραχύ κλάδεμα καρποφορίας στους 2-3 οφθαλμούς, ανά παραγωγική μονάδα. Με τα κυριότερα υποκείμενα συμβιώνει αρμονικά. Συνδυάζεται πολύ καλά με τα 110 R , 41 B και δίνει εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα με τα υποκείμενα 1103P και 140 Ru (Σταύρακας, 2011). Προσαρμόζεται ευκολότερα σε εδάφη βαθιά μέσης σύστασης και γονιμότητας που έχουν τη δυνατότητα μερικής συγκράτησης υγρασίας ώστε να την αποδίδουν την κρίσιμη περίοδο ανάπτυξης των πρέμων. Οι στρεμματικές αποδόσεις στα παραπάνω εδάφη με ευνοϊκές συνθήκες καλλιέργειας συνήθως κυμαίνονται στα 1.000kg/στρ, μπορεί να φτάσουν βέβαια και τα 2.000kg/στρ. Είναι σχετικά ανθεκτική ποικιλία στον περονόσπορο και στο ωίδιο. Παρουσιάζει ευαισθησία στον βοτρυτή και σε ιώσεις, λόγω της μεγάλης πυκνότητας των σταφυλιών, σε περιόδους με πολλές βροχοπτώσεις. Επίσης είναι ευαίσθητη σε περιπτώσεις παρατεταμένης υγρασίας. Η εκβλάστηση πραγματοποιείται στις αρχές Απριλίου και η πλήρης βλάστηση στα μέσα του ίδιου μήνα. Η ανθοφορία εκδηλώνεται περί τα τέλη Μαΐου, γύρω στις 20-25 Μαΐου, και ο περκασμός παρατηρείται περίπου τέλη Ιουλίου. Τέλος, η ωρίμανση επέρχεται κατά το 3^ο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου έως και το 3^ο δεκαήμερο του Οκτώβρη ανάλογα με τον αμπελώνα και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του (Νικολάου, 2012).

1.1.3. Το γλεύκος της ποικιλίας

Όσον αφορά το γλεύκος της ποικιλίας χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (210-220 g/L), υψηλή ολική οξύτητα (5,4-6,8 g/L

τρυγικού οξύ) και σχετικά χαμηλό pH (3,3-3,5). Τα ιδιαίτερα αυτά χαρακτηριστικά έχουν σαν αποτέλεσμα να μπορούν να παραχθούν διαφορετικοί τύποι οίνων (λευκός ή ροζέ, ξηρός ή αφρώδης) από διαφορετικής χημικής σύστασης γλεύκη ανάλογα με τον τρυγητό στα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης.

Όσον αφορά το άρωμα πρόκειται για μια πολυδύναμη ποικιλία. Είναι ιδιαίτερα γνωστή για τα μοσχάτα αρώματα. Πιο συγκεκριμένα, οι οίνοι χαρακτηρίζονται από λεπτά αρώματα ροδοπέταλων, τριαντάφυλλου, εσπεριδοειδών, ενώ η ένταση των αρωμάτων ποικίλει ανάλογα με τον τρόπο οινοποίησης της ποικιλίας.

1.2. Λευκή οινοποίηση

Η κύρια διαφορά της λευκής οινοποίησης από την ερυθρή οινοποίηση είναι η απουσία επαφής στεμφύλων γλεύκους κατά την αλκοολική φάση και όχι το χρώμα του σταφυλιού. Λευκοί οίνοι μπορούν να παραχθούν και από ερυθρά σταφύλια, εφόσον οι συνθήκες πίεσης των σταφυλιών εμποδίζουν το χρωματισμό του γλεύκους από τις ανθοκυανες των φλοιών. Οι ενώσεις με τα χαρακτηριστικά ποικιλιακά αρώματα καθώς και οι πρόδρομες των αρωμάτων ενώσεις εντοπίζονται στο φλοιό των σταφυλιών ή στα υποκείμενα κυτταρικά στρώματα στις περισσότερες ποιοτικές ποικιλίες. Ταυτόχρονα όμως αυτές οι ζώνες είναι επίσης πλούσιες σε ενώσεις με χορτώδη αρώματα και πικρή γεύση, ειδικά όταν τα σταφύλια δεν έχουν ωριμάσει ή υφίστανται σήψη. Η ποιότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά λοιπόν ενός λευκού οίνου, από ένα δεδομένο σταφύλι, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες των διάφορων προζυμωτικών διαδικασιών και κυρίως από το χρόνο συγκομιδής, τη σύνθλιψη, τη πίεση και τη διαύγαση (Ridereau-Gayon et al., 2006).

Η διαδικασία της οινοποίησης ξεκινά με τη συγκομιδή. Ο κατάλληλος χρόνος συγκομιδής είναι μεγάλης σπουδαιότητας καθώς έχει μεγάλη επίδραση στη σύσταση των σταφυλιών. Ακολουθεί η αποβοστρίχωση και η θραύση, όπου τα σταφύλια συνθλίβονται, απελευθερώνεται ο χυμός και τους αποσπάται το κοτσάνι με τη χρήση θραυστήρα. Ο θραυστήρας αποτελείται από έναν διάτρητο κύλινδρο που περιέχει πτερύγια που περιστρέφονται. Τα σταφύλια καθώς συνθλίβονται πέφτουν μέσα από τις οπές του κυλίνδρου και οι περισσότεροι από τους μίσχους περνούν από το τέλος του. Στη σταφυλομάζα που προκύπτει, προστίθενται 1-2 g/hL SO₂, ανάλογα με την υγιεινή της κατάσταση. Προαιρετικά, για τον εμπλουτισμό του γλεύκους με

περισσότερα χαρακτηριστικά της ποικιλίας των σταφυλιών και την απελευθέρωση των αρωματικών συστατικών καθώς και πρόδρομων αρωματικών ακολουθεί η προζυμωτική κρυσταλλοποίηση (Ridereau-Gayon et al., 2006). Η σταφυλομάζα ψύχεται σε θερμοκρασία από 10-15°C, οι φλοιοί έρχονται σε επαφή με το γλεύκος και τα συστατικά που βρίσκονται στο φλοιό των ραγών εκχυλίζονται στο γλεύκος. Το χρονικό διάστημα επαφής γλεύκους και ραγών κυμαίνεται από 8-24 h, ανάλογα με την υγιεινή κατάσταση και την ωριμότητα των σταφυλών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός από τα στέμφυλα. Η σταφυλομάζα οδηγείται στο πιεστήριο. Το γλεύκος που προκύπτει χωρίς πίεση (από τη στράγγιση) αποτελεί τον πρόρωγο, αντιστοιχεί περίπου στο 60% του συνολικού γλεύκους και χρησιμοποιείται για την παραγωγή ποιοτικών οίνων. Το υπόλοιπο παραλαμβάνεται με πίεση. Έπειτα, το γλεύκος οδηγείται κατά κανόνα σε ανοξειδωτή δεξαμενή, όπου θα πραγματοποιηθεί η προζυμωτική απολάσπωση. Στόχος της απολάσπωσης είναι η παραλαβή όσον το δυνατόν πιο διαυγές γλεύκος. Μπορεί να είναι είτε στατική είτε δυναμική (φυγοκέντρηση, φίλτρο κενού, επίπλευση). Συχνότερη είναι η στατική απολάσπωση κατά την οποία το γλεύκος ψύχεται, προστίθενται θειώδης ανυδρίτης και πυκτινολυτικά ένζυμα και διαυγάζεται, μέσω της κατακάθισης των σωματιδίων που βρίσκονται σε αιώρηση. Διαρκεί συνήθως από 12 έως 24 ώρες και προβλέπει σε οίνους με καθαρότερο άρωμα, πιο σταθερό χρώμα και λιγότερη ευαισθησία σε οξειδώσεις.

Η λευκή οινοποίηση συνεχίζεται με το σημαντικότερο κομμάτι της, την αλκοολική ζύμωση, αφού ο καθαρός πλέον χυμός, μεταγγίζεται στη δεξαμενή ζύμωσης. Κατά την αλκοολική ζύμωση παράγεται αλκοόλη, CO₂ και δευτερογενείς μεταβολίτες όπως ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, αλδεΐδες, πτητικά από πρόδρομες του αρώματος ενώσεις. Η θερμοκρασία και το στέλεχος του ζυμομύκητα που θα πραγματοποιήσει τη ζύμωση παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση και τη διατήρηση του αρώματος των οίνων. Μετά το τέλος της ζύμωσης, ο οίνος μεταγγίζεται σε δεξαμενή, θειώνεται και ακολουθούν η πρωτεϊνική και τρυγική σταθεροποίηση του, ώστε να σταθεροποιηθεί η διαύγεια και τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Εάν είναι επιθυμητό, είναι δυνατή η μετάγγιση του οίνου μετά τη ζύμωση σε βαρέλια ώστε το κρασί να ωριμάσει, να εμπλουτισθεί με άρωμα και να αποκτήσει πιο πλούσιο σώμα. Τελικά στάδια αποτελούν η διαύγηση και η εμφιάλωση του οίνου.

1.3. Στελέχη ζυμομυκήτων

Το γένος ή είδος των ζυμών, αλλά και το στέλεχος κατέχει βασικό ρόλο στην τυποποίηση της ποιότητας του οίνου και μόνο ορισμένα είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αλκοολική ζύμωση.

Η χρήση εμπορικών στελεχών ζύμης, ειδικότερα του *Saccharomyces cerevisiae*, έχει φέρει επανάσταση στις προηγούμενες μεθόδους οινοποίησης, επιτρέποντας στους οινοπαραγωγούς να παράγουν οίνους με συγκρίσιμες οργανοληπτικές ιδιότητες (Hart et al., 2019; Pretorius, 2016). Η ζύμη *S. cerevisiae*, είτε πρόκειται για φυσικά προϊόντα απομόνωσης, είτε για υβρίδια, έχει ανυπέρβλητη ικανότητα ζύμωσης σε σύγκριση με ζύμες άλλων γενών. Κατά τη ζύμωση των οίνων, τα στελέχη του *S. cerevisiae* είναι υπεύθυνα για το μεγαλύτερο μέρος της κατανάλωσης των σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης και CO₂. Ωστόσο, η επιφάνεια των σταφυλιών περιέχει μεγάλη ποικιλία μυκήτων, βακτηρίων και ζυμών όπου τα στελέχη *S. cerevisiae* είναι λιγότερο παρόντα. Εντούτοις, στα γλεύκη σταφυλιών, υπάρχει μια τεράστια ποικιλία διαθέσιμων ζυμομυκήτων και οι πιο συχνά ευρισκόμενες σε αυτό το περιβάλλον είναι οι *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Pichia* και *Hanseniaspora*, *Torulasporea delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans* (Fleet, 2003; 2008). Τα παραπάνω *non Saccharomyces* είδη έχουν χαμηλή ανοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, σε υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων και σε χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου (Combina et al., 2005).



Εικόνα 2: *S. cerevisiae* (https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae)

Η κινητική, λοιπόν, μια αυθόρμητης ζύμωσης είναι αρκετά τυχαία. Η ταχύτητα και ο βαθμός ολοκλήρωσης της ποικίλλουν ανάλογα με το στέλεχος που επικρατεί από τις γηγενείς ζύμες. Μπορεί να προκύψει αργή ζύμωση λόγω χαμηλού

πληθυσμού. Στα αρχικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης κυριαρχούν *non Saccharomyces* είδη (Ridereau-Gayon et al., 2006). Έχουν βρεθεί τα είδη *H. uvarum* και *H. Guilliermondii* ως κύρια είδη αυθόρμητης ζύμωσης (Romano et al., 2003). Οι ζυμώσεις ξεκινούν από την ανάπτυξη διαφόρων ειδών *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia* και *Torulasporea*. Η ανάπτυξή τους είναι σημαντική και μπορεί να επηρεάσει τη χημική σύνθεση του οίνου (Pretorius, 2003). Ωστόσο, η ευαισθησία στην αιθανόλη περιορίζει την ανάπτυξή τους στις πρώτες 2-3 ημέρες της ζύμωσης και σε συγκεντρώσεις πάνω από 5-6% (v/v) αιθανόλη η ανάπτυξή τους μειώνεται ραγδαία. Ως συνέπεια λοιπόν, χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό του γλεύκους *S. cerevisiae* στελέχη που εμποδίζουν την ανάπτυξη της γηγενούς μικροχλωρίδας, καθώς ο *S. cerevisiae* καθίσταται κυρίαρχος και διατηρεί τη δραστηριότητά του μέχρι το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης (Testa et al., 2020).

Τα στελέχη ζυμομυκήτων παράγουν επίσης μια ολόκληρη σειρά μεταβολιτών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, που αναφέρονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού οίνου. Οι ενώσεις αυτές είναι μονοσακχαρίτες, οργανικά οξέα, λιπαρά οξέα, αμινοξέα, πτητικές θειόλες, εστέρες και ανώτερες αλκοόλες (Varela, 2016). Επομένως, ο οίνος μπορεί να θεωρηθεί ως το «μεταβολικό αποτύπωμα» του στελέχους ζυμομυκήτων που πραγματοποίησε τη ζύμωση (Hart et al., 2019). Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή των μεταβολιτών από ζυμομύκητες εξαρτάται από ένζυμα που εκφράζονται κατά την αλκοολική ζύμωση (Holt et al., 2011). Ως αποτέλεσμα, τα διάφορα στελέχη ζύμης παράγουν οίνους με διαφορετικές οργανοληπτικές ιδιότητες, δεδομένου ότι οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες θα επηρεάσουν την απελευθέρωση του μεταβολίτη που είναι υπεύθυνη για την οργανοληπτική ποιότητα του οίνου (Moreno-García et al., 2015). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα διάφορα στελέχη ζυμομύκητα εκφράζουν διαφορετικά τις πρωτεΐνες ακόμα κι αν καλλιεργήθηκαν στο ίδιο μέσον ανάπτυξης.

Σε πολλές έρευνες ισχυρίζεται ότι οι ζύμες *non Saccharomyces* που χρησιμοποιούνται είτε σε καθαρή είτε σε μικτή αρχική καλλιέργεια οδηγούν σε πιο έντονο και πιο περίπλοκο αρωματικό προφίλ (Romano et al., 2003; Fleet, 2003). Πράγματι, μερικές φορές η ποιότητα της μικροχλωρίδας του σταφυλιού μπορεί να παράγει αυθόρμητες ζυμώσεις με εξαιρετικά αποτελέσματα (Ridereau-Gayon et al., 2006). Τα τελευταία χρόνια, στα πλαίσια της προσπάθειας διαφοροποίησης αλλά και της προσπάθειας 'απομίμησης των συνθηκών αυθόρμητης ζύμωσης' ο ρόλος των

ζυμών *non Saccharomyces* λαμβάνει όλο και περισσότερη προσοχή στην παραγωγή οίνου με αποτέλεσμα να έχουν απομονωθεί και να έχουν επιλεγεί για τη ζύμωση οίνων κάποια από αυτά τα στελέχη. Σήμερα, ορισμένα στελέχη από *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* και *Lachancea thermotolerans* έχουν χαρακτηριστεί ικανά για τη διαφοροποίηση του αρώματος και διατίθενται για χρήση σε συνεμβολιασμό ή διαδοχικό εμβολιασμό με *S. cerevisiae*, ενώ ο τελευταίος είναι ακόμα απαραίτητος για να εξασφαλιστεί η ολοκλήρωση της ζύμωσης (Seguinot et al., 2020).

Πολλές ζύμες που ανήκουν στο γένος *S. cerevisiae*, είτε όχι, χρησιμοποιούνται σήμερα στη λευκή οινοποίηση. Έχουν επιλεγεί με βάση κριτήρια των οινολογικών τους ικανοτήτων σε διάφορες οινοποιητικές περιοχές του κόσμου. Τα κριτήρια αυτά είναι συνήθως η κινητική της ζύμωσης και η ανάπτυξη των ποικιλιών αρωμάτων. Οι Ridereau-Gayon et al. (2006) αναφέρουν ότι η πιο σημαντική ιδιότητα ενός στελέχους ζυμομύκητα που προορίζεται για λευκή οινοποίηση είναι η ικανότητα του να ολοκληρώνει τη ζύμωση γλεύκους με θολερότητα 100-200 NTU και σάκχαρα έως 220 g/L, χωρίς υπερβολική παραγωγή πτητικής οξύτητας. Για πολλούς, ένα καλό στέλεχος ζύμης επιτρέπει την έκφραση της πολυπλοκότητας του αρωματικού χαρακτήρα του σταφυλιού και δεν υποβαθμίζει ή καλύπτει αυτόν τον χαρακτήρα με τα αρώματα ζύμωσης. Συμπερασματικά, λοιπόν τα χαρακτηριστικά ενός 'ιδανικού' στελέχους είναι η γρήγορη επίτευξη της αλκοολικής ζύμωσης και η έκφραση του ποικιλιακού αρώματος.

1.4. Αζωτούχα θρέψη ζυμομυκήτων

Οι αζωτούχες ενώσεις είναι τα θρεπτικά συστατικά τα οποία ως επί το πλείστον αφομοιώνουν οι ζύμες, μετά τις ενώσεις άνθρακα, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Συμμετέχουν στον μεταβολισμό και την ανάπτυξη ζυμομυκήτων, εξασφαλίζοντας τη σωστή εξέλιξη της ζύμωσης και την παραγωγή των πτητικών ενώσεων (Fairbairn et al., 2017; González, et al., 2018).

Το γλεύκος περιέχει σχετικά υψηλή συγκέντρωση αζωτούχων ενώσεων, αν και αντιπροσωπεύει μόνο το ένα τέταρτο του συνολικού αζώτου των σταφυλιών. Η συγκέντρωση αζώτου στα σταφύλια εξαρτάται από την ποικιλία, το υποκείμενο, το περιβάλλον και τις συνθήκες καλλιέργειας - ιδίως την αζωτούχα λίπανση (Ridereau-Gayon et al. 2006). Η συγκέντρωσή τους στο γλεύκος εξαρτάται από την ωρίμανση,

τη ποικιλία, τη περιοχή, το χρόνο εκχύλισης, τη θερμοκρασία ζύμωσης και την οξύτητα του γλεύκους. Οι ερυθροί οίνοι περιέχουν διπλάσια συγκέντρωση αζώτου σε σχέση με τους λευκούς. Στην λευκή οινοποίηση έχει βρεθεί ότι η πίεση και η προζυμωτική κροεκχύλιση ευνοούν την εκχύλιση των συστατικών των φλοιών και αυξάνουν τη συγκέντρωσή των ενώσεων αζώτου και των πρωτεϊνών στο γλεύκος. (Dubourdieu et al., 1986).

Στα γλεύκη σταφυλιών, η σύνθεση αζώτου μπορεί να είναι πολύ μεταβλητή, τόσο σε συγκέντρωση όσο και στους τύπους των ενώσεων αζώτου που υπάρχουν. Τα κύρια συστατικά που συναντάμε στα γλεύκη περιλαμβάνουν το κατιόν αμμωνίου NH_4^+ (3-10% του συνολικού αζώτου), αμινοξέα (25-30%), πολυπεπίδια (25-40%) και πρωτεΐνες (5-10%). Μόνο μερικές από αυτές τις ενώσεις, μεταβολίζονται από το ζυμομύκητα και είναι γνωστές ως αφομοιώσιμο άζωτο YAN (Yeast Assimilable Nitrogen). Οι κύριες πηγές αφομοιώσιμου αζώτου YAN περιλαμβάνουν τα αμμωνιακά και τα αμινοξέα (εκτός προλίνης). Οι προτιμώμενες πηγές αζώτου, όπως η αμμωνία, η γλουταμίνη και η ασπαραγίνη, προάγουν την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων (Roca-Mesa et al., 2020). Τα πολυπεπίδια και οι πρωτεΐνες δεν συμμετέχουν στην ανάπτυξη του ζαχαρομύκητα καθώς δεν μπορεί να υδρολύσει αυτές τις ουσίες.

1.4.1. Ανόργανο άζωτο

Οι ανόργανες ενώσεις αζώτου βρίσκονται με την μορφή αμμωνιακών αλάτων $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$. Τα αμμωνιακά άλατα αποτελούν το 80% του αζώτου του σταφυλιού ενώ στην ωρίμανση αποτελούν το 10% του συνολικού αζώτου ως συνέπεια της δράσης τρανσαμινασών και της σύνθεσης οργανικών ενώσεων. Το NH_4^+ αποτελεί την περισσότερο αφομοιώσιμη μορφή αζώτου από τις ζύμες. Όταν είναι σε αφθονία, καταστέλλει τον καταβολισμό άλλων αζωτούχων ενώσεων. Αυτός ο μηχανισμός, ονομάζεται καταστολή του καταβολισμού του αζώτου (NCR-Nitrogen Catabolite Repression) (Beltran et al., 2004). Σύμφωνα με Gutiérrez et al. (2012) η προσθήκη αμμωνίου αναστέλλει την πρόσληψη αργινίνης και αλανίνης και ενεργοποιεί την κατανάλωση γλουταμίνης, και των διακλαδισμένης αλυσίδας αρωματικών αμινοξέων.

1.4.2. Οργανικό άζωτο

Η ζύμη δεν χρειάζεται αμινοξέα καθώς μπορεί να τα συνθέσει, αλλά η προσθήκη τους διεγείρει τις ζύμες περισσότερο από το αμμωνιακό άζωτο. Ένα μίγμα

αμινοξέων και αμμωνιακού αζώτου είναι ακόμα πιο αποτελεσματικό. Οι ζυμομύκητες χρησιμοποιούν αμινοξέα σύμφωνα με τρεις μηχανισμούς (Henschke & Jiranek, 1992):

1. Άμεση ενσωμάτωση τους.
2. Αποαμίνωση και χρήση της αμινομάδας για τη βιοσύνθεση διαφορετικών αμμωνιακών συστατικών. Το αντίστοιχο μόριο άνθρακα απεκκρίνεται. Μια τέτοια αντίδραση αποτελεί το μονοπάτι σχηματισμού ανώτερων αλκοολών από αμινοξέα.



Η ζύμη μπορεί να λάβει αμμωνιακό άζωτο από αμινοξέα μέσω άλλων οδών.

3. Τα αμινοξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα στις μεταβολικές αντιδράσεις. Ο ζυμομύκητας ανακτά ταυτόχρονα το αντίστοιχο αμμωνιακό άζωτο.

Η αφομοίωση διαφορετικών αμινοξέων εξαρτάται από τη λειτουργία των συστημάτων μεταφοράς και τη ρύθμιση των μεταβολικών συστημάτων. Η αφομοίωση των αμινοξέων από τις ζύμες δεν βελτιώνει πάντα την ανάπτυξη. Τα πιο εύκολα αφομοιωμένα αμινοξέα δεν είναι απαραίτητα τα πιο σημαντικά στην κυτταρική σύνθεση, αλλά είναι τα πιο εύκολα μεταβολιζόμενα από τις ζύμες (Ridereau-Gayon et al. 2006).

1.4.3. Αφομοιώσιμο άζωτο

Στα γλεύκη σταφυλιών η συγκέντρωση αφομοιώσιμου αζώτου κυμαίνεται από 60 έως 500 mg/L (Bely et al., 1990). Η διαθεσιμότητα αζώτου στα γλεύκη είναι ένας καθοριστικός παράγοντας του μέγιστου ποσοστού ζύμωσης και επηρεάζει επίσης το μέγεθος του συνολικού πληθυσμού κυττάρων ζύμης (Brice et al., 2014). Η ανεπάρκεια αζώτου είναι συχνά αιτία μιας αργής ή κολλημένης ζύμωσης (Bely et al., 1990; Brice et al., 2014; Roca-Mesa et al., 2020). Επιπλέον, χαμηλές αφομοιώσιμες συγκεντρώσεις αζώτου οδηγούν σε παραγωγή υδρόθειου μέσω της αποικοδόμησης της κυστεΐνης ή σερίνης προκειμένου να παραχθεί αμμωνία.

Προκειμένου να αποφευχθούν προβληματικές ζυμώσεις και να βελτιωθεί η κινητική της ζύμωσης η προσθήκη εξωτερικών θρεπτικών συστατικών σε γλεύκη που περιέχουν ανεπαρκή επίπεδα αζώτου είναι εξαιρετικά χρήσιμη (Roca-Mesa et al., 2020). Ωστόσο, η προσθήκη αφομοιώσιμου αζώτου δεν είναι πάντοτε επαρκής για

την επίλυση δύσκολων τελικών σταδίων της ζύμωσης, αν και επιταχύνει τη ζύμωση στα αρχικά στάδια.

Ορισμένες παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η υπερβολική αύξηση της περιεκτικότητας σε άζωτο μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στην κινητική της ζύμωσης. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει στην παρουσία υπολειμματικού αζώτου στο τέλος της ζύμωσης το οποίο πιθανά να έχει αρνητικό αντίκτυπο στη μικροβιολογική σταθερότητα του οίνου. Επιπλέον, μια περίσσεια αμμωνιακού αζώτου μπορεί επίσης να οδηγήσει σε τροποποίηση των αρωματικών χαρακτήρων του οίνου. Δεδομένου ότι ο ζυμομύκητας δεν χρειάζεται πλέον να αποαμινώσει τα αμινοξέα, σχηματίζει λιγότερα δευτερογενή προϊόντα (ανώτερες αλκοόλες και τους εστέρες τους). Τέλος, η παροχή αζώτου επηρεάζει την παραγωγή καρβαμικού αιθυλεστέρα (ουρεθάνη) που έχει καρκινογόνες ιδιότητες και ελέγχεται από τη νομοθεσία (Ridereau-Gayon et al., 2006).

Επομένως, είναι σκόπιμο να τροποποιηθούν οι προσθήκες του αζώτου ανάλογα με το αρχικό επίπεδο του γλεύκους σε άζωτο. Η αρχική συγκέντρωση κατιόντων αμμωνίου και αμινοξέων στο γλεύκος είναι ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία για τον προσδιορισμό της ανάγκης για προσθήκη συμπληρώματος. Σε γενικές γραμμές τα γλεύκη θεωρούνται περιορισμένα σε άζωτο όταν το YAN είναι κάτω από 150 mg/L (Brice et al., 2014). Είναι η ελάχιστη συγκέντρωση για να ολοκληρωθεί ομαλά η αλκοολική ζύμωση (Bell & Henschke, 2005; Bely et al., 1990; Dukes & Butzke, 1998). Συνήθως για την επίτευξη καλής κινητικής ζύμωσης το αφομοιώσιμο άζωτο κυμαίνεται σε συγκέντρωση 150-200 mg/L, ενώ για βέλτιστη απόδοση και πιο φρουτώδη χαρακτήρα προτιμώνται συγκεντρώσεις της τάξης 250-300 mgN/L.

Τα άλατα αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ή $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά για την αύξηση των συγκεντρώσεων αζώτου στο γλεύκος προκειμένου να ξεκινήσει γρήγορα η αλκοολική ζύμωση. Ωστόσο, η αποκλειστική προσθήκη αμμωνιακών αλλάζει την ισορροπία και τη φυσική αναλογία σύνθεσης ανόργανου/οργανικού αζώτου και επηρεάζει το πρότυπο πρόσληψης αμινοξέων (Beltran et al., 2005). Οι μεταβολές αυτές επηρεάζουν, κυρίως, την παραγωγή ανώτερων αλκοολών και υδρόθειου (Adams & Van Vuuren, 2010; Mendes-Ferreira et al., 2009; Torrea et al., 2011; Vilanova & Martínez, 2007).

1.4.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την αφομοίωση του αζώτου

Στέλεχος ζύμης

Οι απαιτήσεις αζώτου του *S. cerevisiae* ποικίλλουν από το ένα στέλεχος στο άλλο. Αυτή η μεταβλητότητα εκδηλώνεται λόγω διαφορών στην ικανότητα διατήρησης του ρυθμού ζύμωσης κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης και αποτελεί καλή δοκιμή για τη σύγκριση των απαιτήσεων αζώτου ζυμομυκήτων (Julien et al., 2000). Η περισσότερη αλκοολική ζύμωση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης και η ικανότητα έντονης ζύμωσης κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης έχει μεγάλη επίδραση στον συνολικό χρόνο ζύμωσης (Brice et al., 2014). Η δυνατότητα ζύμωσης υπό συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας αζώτου διαφέρει μεταξύ των στελεχών ζύμης και τα διάφορα στελέχη μπορούν να ταξινομηθούν σε στελέχη που απαιτούν υψηλή ή χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο (Brice et al., 2014).

Οι Gutiérrez et al. (2012) έδειξαν ότι τα διαφορετικά εμπορικά στελέχη *S. cerevisiae* είχαν διαφορετικές ανάγκες αζώτου και πρότειναν τη χρήση συμπληρωμάτων που περιέχουν πηγές οργανικού αζώτου. Επίσης, οι προτιμώμενες πηγές αζώτου ορισμένων ζυμών *non Saccharomyces* έχουν αναλυθεί, εστιάζοντας στην ικανότητά τους να αφομοιώνουν τις διαφορές ενώσεις, στον ρυθμό κατανάλωσης ή στην επίδρασή τους στην παραγωγή αρώματος (Gobert et al., 2017; Rollero et al., 2018; Su et al., 2019). Διάφορες μελέτες έχουν αναλύσει τον πιθανό ανταγωνισμό για τις θρεπτικές ουσίες μεταξύ των ζυμομυκήτων *Saccharomyces* και *non Saccharomyces* (Rollero et al., 2018; Taillandier, 2014; Roca-Mesa et al., 2020). Πράγματι, οι Rollero et al. (2018) παρατήρησαν διαφορετικά προφίλ κατανάλωσης αζώτου από στέλεχος *S. cerevisiae*, σε σχέση με *non Saccharomyces*, σε γλεύκος που έγινε διαδοχικός εμβολιασμός, υποδηλώνοντας τον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά. Επιπλέον, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι συνεμβολιασμός με ορισμένα είδη που δεν ανήκουν στα *Saccharomyces*, το *S. cerevisiae* εντείνει τον καταβολισμό του αζώτου και της γλυκόζης, προκειμένου να μειωθεί η διαθεσιμότητά τους για άλλα είδη ζύμης (Taillandier, 2014). Η παρουσία άλλων ειδών *Saccharomyces*, όπως το *Saccharomyces kudriavzevii*, μπορεί επίσης να αυξήσει τη μεταβολική δραστηριότητα του *S. cerevisiae* (Roca-Mesa et al., 2020).

Σάκχαρα

Η συγκέντρωση σακχάρου επίσης επηρεάζει την αφομοίωση αζώτου και τη κινητική της ζύμωσης, ιδιαίτερα την επιτυχή ολοκλήρωση της. Για τις μέτριες

συγκεντρώσεις σακχάρων (κάτω από 200 g/L), η προσθήκη αζώτου αυξάνει τη βιομάζα της ζύμης και συνεπώς την ταχύτητα ζύμωσης. Για τις υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων, η ζύμωση επιταχύνεται στην αρχή με προσθήκη αζώτου, αλλά συνεχίζει με σταθερό ρυθμό (Ridereau-Gayon et al., 2006)

Οξυγόνο

Το οξυγόνο, ωστόσο, έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην αφομοίωση του αζώτου. Οι ζυμομύκητες χρησιμοποιούν πολύ περισσότερο άζωτο παρουσία οξυγόνου (Julien et al., 2000). Έχει παρατηρηθεί ότι οι ζυμομύκητες σε πλήρη απουσία οξυγόνου αφομοιώνουν 200 mgN/L. Όταν αναπτύσσονται παρουσία οξυγόνου, η αφομοίωση τους αυξάνεται στα 300 mg/L. Σε αναερόβιες συνθήκες, μπορούν να αφομοιώσουν έως και 735 mg/L χωρίς αναλογική αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού. Η προσθήκη οξυγόνου στην αρχή της ζύμωσης όταν ο πληθυσμός της ζύμης βρίσκεται στη φάση ανάπτυξης, εξακολουθεί να είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος επιτάχυνσης της ζύμωσης και πρόληψης των πρόωρων διακοπών.

Χρονική στιγμή προσθήκης

Οι απόψεις αποκλίνουν στο σωστό χρόνο προσθήκης αλάτων αμμωνίου, που κυμαίνονται από την αρχή της ζύμωσης μέχρι τη μέση. Σε κάθε περίπτωση, τα συμπληρώματα αζώτου είναι πιο αποτελεσματικά για την επιτάχυνση της ζύμωσης παρά στην αποτροπή της να κολλήσει. Οι Ridereau-Gayon et al (1975α) είχαν προτείνει την προσθήκη τους σε γλεύκος πριν από την έναρξη της ζύμωσης. Οι ζύμες αντιδρούν καλύτερα στα ερεθίσματα κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης σε ένα μέσο που περιέχει μικρή ποσότητα αιθανόλης.

1.5. Το άρωμα του οίνου

Το άρωμα και η γεύση του οίνου συγκαταλέγονται στα κύρια χαρακτηριστικά που καθορίζουν την ποιότητα και την αξία του (Swiegers et al., 2005). Είναι ένα μοναδικό μείγμα πτητικών ενώσεων που προέρχονται είτε από το ίδιο το σταφύλι (ποικιλιακά αρώματα), είτε είναι δευτερογενή προϊόντα που σχηματίζονται κατά τη ζύμωση του (αρώματα ζύμωσης) και από τις οξειδωτικές ή αναγωγικές αντιδράσεις κατά την παλαίωση του οίνου (Lambrechts & Pretorius, 2000). Με άλλα λόγια, οι πτητικές ενώσεις μπορούν να συντίθενται ή να εκχυλίζονται απευθείας από τη ράγα ή

να υπάρχουν υπό τη μορφή ενός μη πτητικού προδρόμου που απαιτεί χημική ή βιοχημική δραστηριότητα για την απελευθέρωση του οσμηνά δραστικού συστατικού (Bisson & Karpen, 2010).

Η φύση και η ποσότητα των πτητικών ενώσεων που συντίθεται εξαρτάται από πολλαπλούς παράγοντες, όπως η περιεκτικότητα του γλεύκους σε άζωτο, η θερμοκρασία ζύμωσης, το στέλεχος ζύμης (Lambrechts & Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005; Molina et al., 2007) και οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι παραγωγής (Moreno-Pérez et al., 2013).

Η συμβολή των πτητικών ενώσεων στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τον τύπο τους καθώς και από την συνεργιστική ή ανταγωνιστική αλληλεπίδραση των πτητικών ή μη πτητικών συστατικών του οίνου. Ταυτόχρονα προϋπόθεση αποτελεί η πτητικότητα των συγκεκριμένων ενώσεων, η οποία επηρεάζεται από τη συγκέντρωση των σακχάρων, τον αλκοολικό τίτλο και τη θερμοκρασία (Ταραντίλης, 2019). Συστατικά που βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις της τάξης $\mu\text{g/L}$, ng/L μπορεί να έχουν καθοριστικό ρόλο στο αρωματικό δυναμικό του οίνου, σε αντίθεση με άλλες που είναι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (Ταραντίλης, 2019). Αυτό το φαινόμενο εξηγείται σύμφωνα με το κατώφλι αντίληψης κάθε ουσίας, την μικρότερη δηλαδή συγκέντρωση στην οποία μπορεί να αναγνωριστεί από το 50% του συνόλου των δοκιμαστών.

Η πολυπλοκότητα του αρώματος αυξάνεται δραματικά καθ' όλη τη διάρκεια της λευκής οινοποίησης ως αποτέλεσμα των διαφορετικών μηχανισμών, που λαμβάνουν χώρα, συνεπάγοντας το σχηματισμό των πτητικών ενώσεων (Swiegers et al., 2005). Οι κύριοι μηχανισμοί είναι:

- Οι μεταβολικές διεργασίες που πραγματοποιούνται στα σταφύλια, και εξαρτώνται από την ποικιλία, το έδαφος, τις κλιματολογικές συνθήκες και τις καλλιεργητικές τεχνικές.
- Ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών και των ζυμών κατά την αλκοολική και τη μηλογαλακτική ζύμωση.
- Τα βιοχημικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα πριν τη ζύμωση, όπως οξειδώσεις και υδρολύσεις.
- Χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις που συμβαίνουν μετά το τέλος της ζύμωσης και κατά τη παλαίωση του οίνου σε βαρέλι ή στη φιάλη (Ridereau-Gayon et al., 2006).

Οι πτητικές ενώσεις των σταφυλιών συνδέονται με το ποικιλιακό ή πρωτογενές άρωμα του οίνου. Βρίσκονται είτε σε ελεύθερη μορφή και εκχυλίζονται στο γλεύκος, είτε σε διαλυτή μορφή λόγω του δεσμού με κάποιο σάκχαρο ή με κυστεΐνη και ακολουθεί απελευθέρωση του αρωματικού συστατικού μέσω της δράσης γλυκοσιδασών ή πεπτιδασών. Οι ίδιες πτητικές ενώσεις εντοπίζονται σε όλες τις διαφορετικές ποικιλίες, ενώ υπεύθυνος για το χαρακτηριστικό άρωμα κάθε ποικιλίας είναι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις τους και οι διαφορετικοί συνδυασμοί τους (Ridereau-Gayon et al., 2006).

Το δευτερογενές άρωμα των οίνων είναι αποτέλεσμα του μεγάλου αριθμού πτητικών δευτερογενών μεταβολιτών λόγω της δράσης των ζυμομυκήτων και των μικροοργανισμών κατά την ζύμωση. Εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες που επικρατούν κατά την αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση (Lambrechts & Pretorius, 2000). Η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα του γλεύκους σε άζωτο και το στέλεχος του ζυμομύκητα έχουν το πιο καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση του αρώματος των οίνων. Επίσης τα επίπεδα του SO₂ και του οξυγόνου, το pH, η σύσταση του μούστου, επηρεάζουν άμεσα το μεταβολισμό των μικροοργανισμών και κατ' επέκταση το είδος και τις ποσότητες των πτητικών ενώσεων που σχηματίζονται.

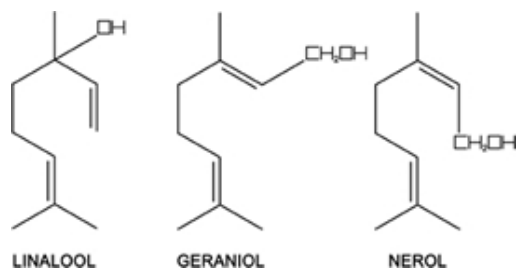
Το τριτογενές άρωμα του οίνου που συχνά χρησιμοποιείται ο όρος μπουκέτο για την περιγραφή του είναι το αποτέλεσμα διάφορων χημικών και ενζυμικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την ωρίμανση και παλαίωση των οίνων και προκαλούν σημαντικές διαφοροποιήσεις στο άρωμα τους (Ταραντίλης, 2019). Το είδος των πτητικών ενώσεων διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες παλαίωσης. Στην περίπτωση παραμονής του οίνου σε βαρέλι οι πτητικές ενώσεις είναι το προϊόν οξειδωτικών αντιδράσεων, ενώ ταυτόχρονα από το ξύλο του βαρελιού εκχυλίζονται και άλλα πτητικά συστατικά. Αντίθετα, η ωρίμανση και παλαίωση του οίνου σε φιάλη είναι υπεύθυνη για την παρουσία άλλων πτητικών συστατικών που σχηματίζονται από τις αναγωγικές συνθήκες.

1.6. Πτητικές ενώσεις του οίνου

Οι κύριες κατηγορίες ενώσεων που συμβάλουν στο άρωμα των οίνων είναι τα μονοτερπένια, τα νορισοπρενοειδή, οι ανώτερες αλκοόλες, οι εστέρες, οι φαινυλ-

προπανοειδείς ενώσεις, οι μεθοξυπυραζίνες και οι πτητικές θειούχες ενώσεις (Francis & Newton 2005).

1.6.1. Ισοπρενοειδή (Τερπενοειδή και C13 Νορισοπρενοειδή)



Εικόνα 3: Δομή των τερπενολών λιναλόλη, γερανιόλη, νερόλη
(www.waterhouse.ucdavis.edu)

Τα τερπένια αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια ενώσεων που προέρχονται από το σταφύλι και σχηματίζονται από μονάδες ισοπρενίου. Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς χαρακτηρίζονται από χαμηλό κατώφλι αντίληψης. Συνεισφέρουν στο άρωμα των οίνων προσδίδοντας αρώματα φρούτων και λουλουδιών. Οι

τερπενικές ενώσεις ανήκουν στα δευτερεύοντα συστατικά του φυτού και βιοσυντίθενται από ακετυλο-CoA, συμμετέχοντας ως ενδιάμεσα το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο και το ισομερές του, διφωσφορικό διμεθυλαλλυλιο (Maicas & Mateo, 2005; Carrua et al., 2008). Υπάρχουν ως υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες και μπορεί να είναι σε ελεύθερη μορφή ή με την μορφή γλυκοζιτών.

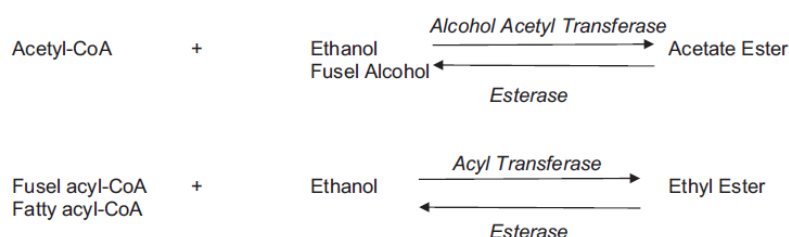
Τα μονοτερπένια, ιδιαίτερα οι μονοτερπενικές αλκοόλες λιναλόλη, γερανιόλη και η νερόλη, είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό ανθικό άρωμα σε σταφύλια και σε οίνους μοσχατίζουσων ποικιλιών όπως Μοσχάτο Αλεξανδρείας, Μοσχάτο Αμβούργου καθώς και μη-μοσχατίζουσων, όπως Gewürztraminer και Riesling (Carrua et al., 2008; Campo et al., 2005). Κυρίως οι λευκές ποικιλίες χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα τερπενίων, ωστόσο έχουν βρεθεί σε χαμηλές βέβαια συγκεντρώσεις λιναλόλη, κιτρονελόλη, νερόλη και γερανιόλη και σε ερυθρές ποικιλίες (Stitt et al., 2010). Τα σесκιτερπένια σε σταφύλια και οίνους δεν έχουν μελετηθεί αρκετά. Το σесκιτερπένιο ροτουτόνη έχει ταυτοποιηθεί στους οίνους Syrah της Αυστραλίας, συμβάλει στο άρωμα των οίνων και είναι υπεύθυνο για το άρωμα του μαύρου πιπεριού όπως και σε πολλά άλλα φυτά συμπεριλαμβανομένων του μαύρου πιπεριού (*Piper nigrum*), της ρίγανης (*Origanum vulgare*), του δεντρολίβανου (*Rosmarinus officinalis*), του βασιλικού (*Ocimum basilicum*) και του θυμαριού (*Thymus vulgaris*) (Wood et al., 2008).

Τα νορισοπρενοειδή προέρχονται από καροτενοειδή των σταφυλιών. Είναι παρόντα σε πολλές ποικιλίες σταφυλιών και παίζουν σημαντικό ρόλο στο άρωμα οίνων από ποικιλίες Semillon, Sauvignon Blanc, Chardonnay, Merlot, Syrah και

Cabernet Sauvignon (Schneider et al., 2001). Ιδιαίτερης σημασίας νορισοπρενοειδή, είναι η β-ιονόνη και η β-δαμασκηνόνη με πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης, καθώς και οι ενώσεις 1,1,6-τριμεθυλο-1,2-διϋδروναφθαλίνη (TDN), (E)-1-(2,3,6-τριμέθυλ-φαίνυλ) βουτα-1,3-διένιο (TPB), που σχετίζονται αντίστοιχα με το χαρακτηριστικό άρωμα κηροζίνης σε παλαιωμένα Riesling (Simpson, 1979) και με το χαρακτήρα γερανίου και καπνού σε παλαιωμένους οίνους ποικιλίας Semillon (Cox et al., 2005).

1.6.2. Εστέρες

Οι εστέρες σχηματίζονται κατά την αλκοολική ζύμωση, τη μηλογαλακτική ζύμωση και τη παλαιώση από την αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ αλκοόλης και ακυλομάδας (οξύ) που φέρει το συνένζυμο A (Εικόνα 4). Αποτελούν σημαντική ομάδα πτητικών ενώσεων του οίνου διότι προσδίδουν οσμές φρούτων και λουλουδιών. Υπάρχουν σε μικρές ποσότητες (της τάξης των mg/L) ενισχύοντας τη φρουτώδη οσμή και τον αρωματικό χαρακτήρα της ποικιλίας. Ωστόσο, εάν υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να καλύψουν τα αρώματα της ποικιλίας, μειώνοντας την πολυπλοκότητα του οίνου (άρωμα τριαντάφυλλου του 2-φαινυλαιθυλεστέρα) ή ακόμη να προσδώσουν δυσάρεστες οσμές (οσμή διαλύτη του οξικού αιθυλεστέρα). Οι πιο σημαντικοί εστέρες του οίνου θεωρούνται οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων και οι οξικοί εστέρες των ανώτερων αλκοολών.



Εικόνα 4: Σύνθεση εστέρων από *S. cerevisiae* (Bisson & Karpel, 2010)

Η αιθανόλη χρησιμεύει ως το αντιδραστήριο αλκοόλης για τους αιθυλεστέρες. Το τμήμα ακυλίου των αιθυλεστέρων μπορεί να προέρχεται από μεταβολισμό άνθρακα ή αζώτου, αλλά οι πιο σημαντικοί αιθυλεστέρες δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων. Παράγοντες που διεγείρουν τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων διεγείρουν επίσης το σχηματισμό εστέρων λιπαρών οξέων (Lilly et al. 2006a, b; Saerens et al., 2009). Παράγοντες που εμποδίζουν τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, επίσης μπλοκάρουν το σχηματισμό εστέρων. Αυτό υποδηλώνει ότι οι εστέρες

προέρχονται από βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και όχι από αποικοδόμηση (Saerens et al., 2009). Οι εστέρες λιπαρών οξέων μακράς αλύσου (C16, C18) σχετίζονται με δυσάρεστες οσμές που θυμίζουν κερί ή σαπούνι ή διαλύτη. Υπεύθυνοι για το φρουτώδες άρωμα είναι οι εστέρες λιπαρών οξέων μικρής αλύσου (C2-C7) όπως ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας με άρωμα πράσινο μήλο και ανανά, ο ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας με άρωμα μπανάνα.

Το Acetyl-CoA χρησιμεύει ως ο δότης ακυλίου για τους οξικούς εστέρες (Εικόνα 4). Το βασικό αντιδραστήριο αλκοόλης μπορεί να είναι εκτός από την αιθανόλη, αλκοόλες που προέρχονται από την αποικοδόμηση των αμινοξέων μέσω της οδού Ehrlich ή από οποιαδήποτε άλλη διαδικασία αναγωγής αλδεϋδης. Οι κύριοι για το άρωμα οξικοί εστέρες που βρίσκονται στους οίνους προέρχονται από αντιδράσεις είτε με αιθανόλη είτε με ανώτερες αλκοόλες. Οι πιο σημαντικοί είναι ο οξικός ισοβουτυλεστέρας (φρουτώδες άρωμα), ο οξικός ισοαμυλεστέρας (μπανάνα, αχλάδι) και οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας (άνθη, τριαντάφυλλο), που προκύπτουν από την εστεροποίηση των αντίστοιχων ανώτερων αλκοολών τους: ισοβουτανόλη (προέρχεται από το αμινοξύ βαλίνη), ισοαμυλική αλκοόλη (προέρχεται από λευκίνη) και 2-φαινυλαιθανόλη (προέρχεται από φαινυλαλανίνη) (Belda et al., 2017).

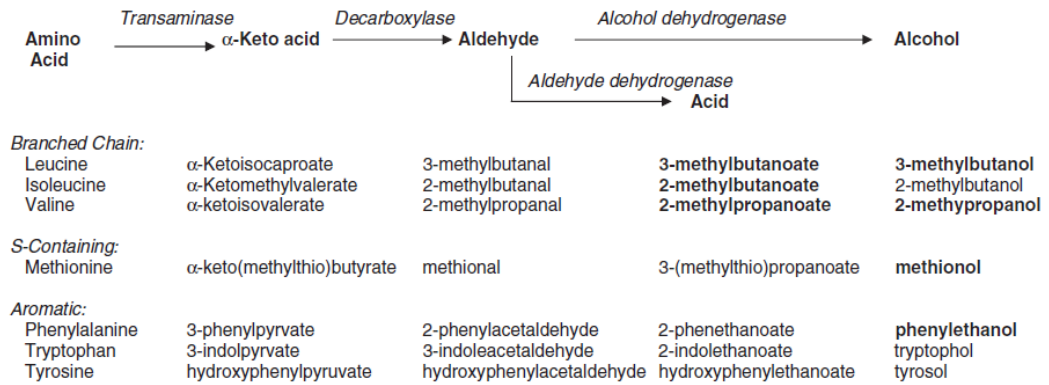
Γενικά, οι περισσότεροι από τους αιθυλεστέρες και τους οξικούς εστέρες είναι παρόντες σε παρόμοιες ή υψηλότερες συγκεντρώσεις στους λευκούς οίνους σε σύγκριση με τους ερυθρούς (Ferreira et al., 2000; Francis & Newton, 2005). Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τους τύπους και τις ποσότητες των εστέρων που συντίθεται. Οι σημαντικότεροι εστέρες για το άρωμα του οίνου είναι αυτοί που συντίθενται από ζύμες και η μέγιστη συγκέντρωσή τους επιτυγχάνεται στη στατική φάση ανάπτυξης των ζυμομυκήτων (μέση ζύμωσης) (Belda et al., 2017). Ο σχηματισμός εστέρων είναι αρκετά μεταβλητός μεταξύ των στελεχών ζύμης και των συνθηκών καλλιέργειας (Carrau et al., 2008; Molina et al., 2007; Romano et al., 2003; Saerens et al., 2009). Τα επίπεδα αζώτου επηρεάζουν επίσης το σχηματισμό εστέρων. Παράγοντες που αναστέλλουν την οδό Ehrlich μειώνουν το σχηματισμό εστέρων, επιβεβαιώνοντας και πάλι ότι η διαδικασία βασίζεται στο υπόστρωμα. Η συγκέντρωση πρόδρομων λιπαρών οξέων στον οίνο σχετίζεται άμεσα με την παρουσία αιθυλεστέρων στον οίνο και αποτελεί τον κύριο παράγοντα που επηρεάζει την παραγωγή τους. Η θερμοκρασία της ζύμωσης έχει εντυπωσιακή επίδραση στο σχηματισμό εστέρων. Οι ζυμώσεις χαμηλότερης θερμοκρασίας τείνουν να έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε εστέρες καθώς μειώνονται οι απώλειες λόγω

υδρόλυσης και εξάτμισης (Saerens et al. 2009). Έρευνα έδειξε ότι αυτό το αποτέλεσμα οφείλεται και στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (Beltran et al., 2006, Molina et al., 2007).

1.6.3. Αλκοόλες

Τα στελέχη *Saccharomyces* παράγουν αρκετές αλκοόλες που μπορούν να επηρεάσουν το άρωμα και τη γεύση του οίνου. Η αιθανόλη, το κύριο τελικό προϊόν του καταβολισμού των σακχάρων, παίζει διάφορους ρόλους στο οργανοληπτικό προφίλ. Εκτός από την αιθανόλη, απαντώνται και άλλες αλκοόλες στους οίνους που συμβάλλουν στο άρωμα του οίνου. Αυτές οι αλκοόλες αναφέρονται συνήθως ως ανώτερες αλκοόλες για να υποδηλώσουν ότι περιέχουν περισσότερα από δύο άτομα άνθρακα. Προέρχονται από τον μεταβολισμό των σακχάρων ή από το καταβολισμό των αμινοξέων από τους ζυμομύκητες. Στην πρώτη περίπτωση παράγονται πρόδρομα α-κετοξέα από πυροσταφυλικό οξύ και ακετυλο-CoA, μέσω του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) (Bell and Henschke, 2005; Swiegers et al., 2005). Στη δεύτερη περίπτωση πρόκειται για το μονοπάτι Ehrlich (Bell and Henschke, 2005; Swiegers et al., 2005). Τα αμινοξέα αποαμιμώνονται πρώτα από συγκεκριμένες τρανσαμινάσες για να σχηματίσουν ένα α-κετοξύ, το οποίο στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται για να σχηματίσει μια αλδεΐδη. Η αλδεΐδη μπορεί είτε να αναθεί σε αλκοόλη, είτε να οξειδωθεί σε οξύ. Μέσω αυτής της οδού, τα αμινοξέα καταναλώνονται κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης ανάπτυξης των ζυμών, με αποτέλεσμα την παραγωγή των αντίστοιχων ανώτερων αλκοολών αργότερα κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης (Bell and Henschke, 2005; Bisson & Karpel, 2010).

Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες ανώτερων αλκοολών που προέρχονται από αμινοξέα: οι διακλαδισμένης αλυσίδας ή αλειφατικές, αυτές που περιέχουν θείο και οι αρωματικές (με αρωματικό δακτύλιο) (Εικόνα 1). Οι ανώτερες αλκοόλες διακλαδισμένης αλυσίδας, συμπεριλαμβανομένης της ισοαμυλικής αλκοόλης και της ισοβουτυλικής αλκοόλης, συντίθενται από αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας και προσδίδουν στον οίνο αρώματα διαλύτη και βύνης η πρώτη, καμένου και «πικρά» αρώματα η δεύτερη (Francis & Newton, 2005). Τα αρωματικά αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένης της φαινυλαλανίνης και της τυροσίνης, παράγουν αρωματικές αλκοόλες, όπως η φαινυλαιθανόλη, με χαρακτηριστικό άρωμα μελιού και τριαντάφυλλου (Francis & Newton, 2005).



Εικόνα 5: Σύνθεση ανώτερων αλκοολών (Bisson & Karpel, 2010)

Η συνολική συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών κυμαίνεται μεταξύ 140 έως 420 mg/L (Ebeler, 2001). Σε συγκεντρώσεις κάτω των 300 mg/L συνεισφέρουν θετικά στο άρωμα του οίνου προσθέτοντας ένα επιθυμητό επίπεδο πολυπλοκότητας, ενώ σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν αυτό το επίπεδο μπορεί να έχουν αρνητικές επιπτώσεις προσδίδοντας ‘βαριές’, ‘καυστικές’ οσμές (Tao et al., 2008). Ποσοτικά, οι κύριες ανώτερες αλκοόλες των οίνων είναι η ισοβουτανόλη (9,2 mg/L), η φαινυλαιθανόλη (6,1 mg/L) και η ισοαμυλική αλκοόλη (1,41 mg/L) (Tao et al., 2008), ενώ οι άλλες ενώσεις συνήθως υπάρχουν σε συγκεντρώσεις κάτω από το κατώφλι αντίληψης.

Παράγοντες που αυξάνουν τον ρυθμό ζύμωσης αυξάνουν και τον σχηματισμό των ανώτερων αλκοολών. Επίσης, η χρήση διαφορετικών στελεχών ζυμομυκήτων συμβάλλει σε σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των αλκοολών στον οίνο. Ακόμη, η συγκέντρωση των αμινοξέων στο γλεύκος, ως πρόδρομοι ανώτερων αλκοολών επηρεάζουν την παραγωγή τους, με αύξηση της παραγωγής αλκοολών, όταν αυξάνονται οι συγκεντρώσεις των αντίστοιχων αμινοξέων (Belda et al., 2017). Συμπερασματικά, η χρήση μικτών ή διαδοχικών εμβολιασμών θα μπορούσε να αλλάξει το προφίλ των ανώτερων αλκοολών των οίνων, ανάλογα με το στέλεχος που χρησιμοποιείται και το πρωτόκολλο εμβολιασμού που εφαρμόζεται.



Εικόνα 6: Περιγραφικοί όροι των οργανοληπτικών χαρακτήρων των πυραζινών (www.winelandmagazine.com)

1.6.4. Πυραζίνες

Οι ενώσεις αυτές δεν έχουν μικροβιακή προέλευση, αλλά προέρχονται από το σταφύλι συμβάλλοντας στο ποικιλιακό άρωμα του οίνου. Επομένως, οι περισσότερες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη διαχείριση των πυραζινών μέσω αμπελουργικών τεχνικών. Οι μεθοξυπυραζίνες χαρακτηρίζονται από χορτώδη αρώματα. Συγκεκριμένα οι 3-ισοβουτυλο-2-μεθοξυπυραζίνη (IBMP), 3-ισοπροπυλο-2-μεθοξυπυραζίνη (IPMP) και η δευτεροταγής βουτυλο-2-μεθοξυπυραζίνη (SBMP) προσδίδουν αρώματα πράσινης πιπεριάς, μπιζελιού και σπαραγγιού αντίστοιχα. Έχουν κατώφλι αντίληψης της τάξης των ng/L (Kotseridis Y., et al., 1998). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις και για ορισμένα στυλ οίνων είναι ιδιαίτερα επιθυμητές. Παίζουν σημαντικό ρόλο στο άρωμα τόσο του γλεύκους όσο και του οίνου των ποικιλιών Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon, Cabernet franc, Merlot, και Carmenere (Robinson et al., 2014). Ωστόσο, σε υψηλές συγκεντρώσεις θεωρούνται γενικά ανεπιθύμητες (>25 ng/L).

1.6.5. Λιπαρά οξέα

Από το μεταβολισμό των ζυμών και των βακτηρίων παράγονται λιπαρά οξέα βραχείας (<6 άνθρακες), μεσαίας (6 έως 12 άνθρακες) και μακράς αλυσίδας (>12 άνθρακες) με τις δύο πρώτες κατηγορίες να αποτελούν τα κύρια πτητικά λιπαρά οξέα. Το οξικό οξύ αντιπροσωπεύει >90% των πτητικών λιπαρών οξέων στους οίνους και είναι ενδιάμεσος μεταβολίτης στη σύνθεση του ακετυλο-CoA από πυροσταφυλικό οξύ (Bell & Henschke, 2005). Παράγεται από *S. cerevisiae* και από άλλα στελέχη σε διάφορες συγκεντρώσεις. Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποβαθμίζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και προσδίδει οσμή και γεύση ξυδιού. Άλλα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας είναι τα βουτυρικό, προπανοϊκό, ισοβουτυρικό και ισοβαλερικό και χαρακτηρίζονται από αρώματα τυριού (Francis & Newton, 2005).

Τα μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα, εξανοϊκό (C6), οκτανοϊκό (C8) και δεκανοϊκό (C10), συμβάλλουν επίσης στο άρωμα των οίνων και σχετίζονται με αργές ή και κολλημένες ζυμώσεις (Francis & Newton, 2005). Διακόπτεται η κυτταρική ανάπτυξη, είτε λόγω της ανασταλτικής δράσης των λιπαρών οξέων στο *S. cerevisiae* και σε κάποια βακτήρια, είτε λόγω της παρεμπόδισης βιοσύνθεσης των λιπαρών

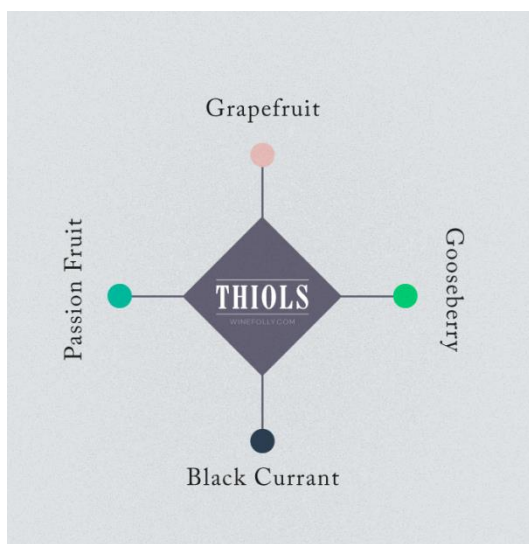
οξέων απουσία οξυγόνου. Οι συγκεντρώσεις τους εξαρτώνται από τη σύνθεση του γλεύκους, τη ποικιλία, το στέλεχος της ζύμης, τις συνθήκες ανάπτυξης, τη θερμοκρασία ζύμωσης και τις οινοποιητικές πρακτικές (Robinson et al., 2014).

1.6.6. Πτητικές θειούχες ενώσεις

Μεταξύ των πτητικών μεταβολιτών που απελευθερώνονται από τις ζύμες και εμπλέκονται στο άρωμα του οίνου, οι θειούχες ενώσεις προκαλούν ισχυρή, άλλοτε θετική, άλλοτε αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, λόγω των πολύ χαμηλών ορίων ανίχνευσής τους.

Οι σημαντικότερες ενώσεις θείου που συνδέονται με δυσάρεστες οσμές είναι: υδρόθειο, μεθανοθειόλη, αιθανοθειόλη και διμεθυλοσουλφίδιο (Smith et al., 2015). Η παρουσία H_2S αποτελεί σημαντικό πρόβλημα διότι προσδίδει αρώματα κλούβιου αυγού (αναγωγικά), και έχει χαμηλό όριο αντίληψης (10-80 $\mu g/L$) (Rauhut, 2009). Το υδρόθειο μπορεί να παραχθεί από το *S. cerevisiae* μέσω της αποικοδόμησης των αμινοξέων που περιέχουν θείο (κυστεΐνη και γλουταθειόνη), από αναγωγή του στοιχειακού θείου, ή την αναγωγή θειώδους ή θειικού άλατος (Rauhut, 2009). Επιπλέον αυτών των πηγών, παραγωγή H_2S συμβαίνει κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης των αμινοξέων που περιέχουν θείο, μεθειονίνη και κυστεΐνη, από ανόργανες ή οργανικές πηγές θείου (Swiegers & Pretorius, 2005). Παράγεται στα αρχικά με μεσαία στάδια της ζύμωσης. Το H_2S είναι χημικά ενεργό και μπορεί να αντιδράσει με ακεταλδεΐδη ή αιθανόλη σχηματίζοντας αιθανοδιθειόλη, η οποία έχει ισχυρή οσμή λάστιχου (Rauhut, 2009).

Το διμεθυλοσουλφίδιο χαρακτηρίζεται από αρώματα σπαραγγιού, καλαμποκιού, μελάσας, αν και σε χαμηλές συγκεντρώσεις περιγράφεται ότι έχει αρώματα φραγκοστάφυλου, κόκκινων φρούτων και τρούφας και ανάλογα με τη συγκέντρωση και την ποικιλία (Robinson et al., 2014). Η μεθανοθειόλη (ή μεθυλομερκαπτάνη) χαρακτηρίζεται από οσμές λάστιχου και καουτσούκ. Το όριο αντίληψής είναι 0,3 $\mu g/L$ και μπορεί να βρεθεί σε συγκεντρώσεις από 0,7 $\mu g/L$ έως 2,1 σε προβληματικούς οίνους (Swiegers & Pretorius, 2005). Παράγεται κατά τα πρώτα στάδια της ζύμωσης, όταν οι ζύμες αφομοιώνουν θρεπτικά συστατικά που περιέχουν θείο. Η αιθανοθειόλη και η μεθανοθειόλη είναι μεταβολίτες που πιστεύεται ότι προέρχονται από την αποικοδόμηση της μεθειονίνης από τους ζυμομύκητες (Robinson et al., 2014).



Εικόνα 7: Περιγραφικοί όροι των οργανοληπτικών χαρακτήρων των θειολών (www.winefolly.com)

Αν και οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις θείου συμβάλλουν αρνητικά στην ποιότητα του οίνου, ορισμένες από αυτές έχουν θετική επίδραση. Μεταξύ αυτών, υπάρχουν ενώσεις που ονομάζονται «πολύ-λειτουργικές θειόλες». Οι 4-μερκαπτο-4-μεθυλοπενταν-2-όνη (4-MMP), 3-μερκαπτο-εξανόλη (3-MH) και ο οξικός εστέρας της 3-μερκαπτοεξανόλης (3-MHA) αποτελούν τις σημαντικότερες ενώσεις θείου που συμβάλουν στο ποικιλιακό άρωμα, με κατώφλι αντίληψης 3 ng/L, 60 ng/L και 4 ng/L, αντίστοιχα (Darriet et al., 1995; Francis & Newton 2005; Swiegers

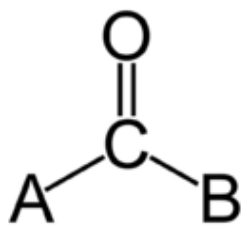
et al., 2005; Dubourdieu & Tominaga, 2009). Σχετίζονται με ευχάριστα ποώδη και φρουτώδη αρώματα σε οίνους από διάφορες ποικιλίες όπως, Scheurebe, Sauvignon Blanc, Gewürztraminer, Riesling, Colombard, Petit Manseng, Semillon, Cabernet Sauvignon, and Merlot (Darriet et al., 1995). Άλλες επιθυμητές πτητικές θειόλες είναι τα φουράνια που περιέχουν θείο. Οι 2-μεθυλ-3-φουρανθιόλη και 2-φουρανμεθανοθειόλη εκχυλίζονται από το ξύλο της δρυός των βαρελιών και μπορούν να συμβάλουν στο άρωμα καβουρδισμένου καφέ των οίνων Sauvignon Blanc, Chardonnay, Merlot, Cabernet Franc και Cabernet Sauvignon που ωριμάζουν σε αυτά (Dubourdieu & Tominaga, 2009).

Ενώ συμβάλουν στο ποικιλιακό άρωμα, τα αρώματα των θειολών δεν εκφράζονται στα σταφύλια, αλλά αναπτύσσονται κατά τη αλκοολική ζύμωση (Dubourdieu et al., 2006; Swiegers & Pretorius, 2005). Έχει αποδειχθεί ότι οι 4-MMP και 3-MH υπάρχουν στα σταφύλια με τις μη πτητικές πρόδρομες μορφές τους, συζευγμένες με κυστεΐνη ή γλουταθειόνη. Τα ένζυμα β-λυάσης είναι απαραίτητα για τη διάσπαση του συζευγμένου προδρόμου κυστεΐνης/γλουταθειόνης, απελευθερώνοντας τις αντίστοιχες πτητικές θειόλες. Οι κυστενυλιωμένες μορφές είναι γενικά πιο άφθονες από τις γλουταθειονυλιωμένες μορφές στο γλεύκος (Roland, et al., 2011).

Η επιλογή του στελέχους ζυμομύκητα είναι καθοριστικός παράγοντας για την απελευθέρωση και τη ρύθμιση του τελικού περιεχομένου θειολών στον οίνο

(Dubourdieu et al., 2006; Holt et al., 2011). Μετά την αλκοολική ζύμωση, οι θειόλες είναι χημικά ασταθείς παρουσία οξυγόνου, επομένως οι συνθήκες αποθήκευσης και παλαίωσης είναι σημαντικές για τη διατήρηση του αρώματος (Dubourdieu & Tominaga, 2009; Roland, et al., 2011).

1.6.7. Καρβονυλικές ενώσεις



Εικόνα 6: Καρβονυλική ένωση

(<https://el.wikipedia.org>)

Σημαντική ένωση της συγκεκριμένης κατηγορίας είναι η ακεταλδεΐδη. Αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της ζύμωσης, παράγεται από την οξείδωση της αιθανόλης και έχει άμεσο αντίκτυπο στο άρωμα του οίνου. Η συγκέντρωσή της αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Συνδέεται με οσμή σαπισμένου μήλου και αποτελεί ένδειξη οξείδωσης σε λευκούς κυρίως οίνους. Θεωρείται ελάττωμα σε υψηλές συγκεντρώσεις (Clarke & Bakker, 2004). Από τις ενώσεις που φέρουν κετονική ομάδα πιο σημαντικές είναι το διακετύλιο και η ακετοΐνη. Το διακετύλιο σε χαμηλές συγκεντρώσεις (2-3 mg/L για λευκούς οίνους και περίπου 5 mg/L για ερυθρούς) χαρακτηρίζεται από άρωμα βούτυρου ή καραμέλας, ενώ σε συγκεντρώσεις από 5 mg/L και άνω προσδίδει έντονη οσμή βουτύρου και είναι δυσάρεστο. Σημαντική παραγωγή διακετυλίου παρατηρείται κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Οι συνθήκες ζύμωσης, η ποσότητα του κιτρικού οξέος που αποικοδομείται και το είδος του *O. oeni* που εμπλέκεται καθορίζει την ποσότητα του διακετυλίου που παράγεται.

1.6.8. Φαινυλ-προπανοειδείς ενώσεις

Πρόκειται για μια διαφορετική ομάδα πτητικών ενώσεων με πολλές διαφορετικές προελεύσεις που μπορούν να συμβάλουν σημαντικά στο άρωμα. Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα πτητικά φαινυλοπροπανοειδή που προέρχονται από σταφύλι είναι το ανθρανιλικό μεθύλιο (foxy), το οποίο θεωρείται υπεύθυνο για το έντονο άρωμα του σταφυλιού (Robinson et al., 2014). Η συγκέντρωσή τους αυξάνεται κατά τη ζύμωση ή την ωρίμανσή των οίνων σε δρύινα βαρέλια εξαιτίας της εκχύλισης τους από τη δρυ (Prida & Chatonnet, 2010). Ο ζυμομύκητας μεταβολίζει τα αρωματικά αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένης της φαινυλαλανίνης και της τυροσίνης, για την παραγωγή φαινυλοπροπανοειδών, όπως η 2-φαινυλαιθανόλη και ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας. Επίσης, το στέλεχος *Brettanomyces Dekkera* έχει αναγνωρισθεί

για τη συμβολή στην περιεκτικότητα πτητικών φαινυλοπροπανοειδών των οίνων, με διάσπαση των υδροξυκιναμικών οξέων σε βινυλ-φαινόλες και στη συνέχεια σε αιθυλ-φαινόλες. Οι τελευταίες συχνά δεν είναι επιθυμητές στους καταναλωτές, συμβάλλοντας στους χαρακτήρες τους δέρματος και σέλας αλόγου (Prida & Chatonnet, 2010).

1.6.9. Φουρανικά παράγωγα και Φουρανόνες

Έχουν σημαντική επίδραση στο συνολικό αρωματικό προφίλ του οίνου και προέρχονται είτε από το ξύλο της δρυός είτε από την πρώτη ύλη. Μία από τις πιο σημαντικές ενώσεις, η φουρανεόλη έχει ταυτοποιηθεί σε υβριδικές ποικιλίες *V. lambrusca* (Noah και Isabella), και στις *V. vinifera* ποικιλίες, Carignan και Gewürztraminer (Robison et al., 2014). Επίσης, συμβάλει στο άρωμα των ιταλικών οίνων Refosco και Primitivo (Genovese et al., 2005). Τόσο η φουρανεόλη όσο και η ομοφουρανόλη έχουν χαμηλό κατώφλι αντίληψης, 5 μg/L και 125 μg/L, αντίστοιχα, και έχουν πρόσθετο ή/και συνεργιστικό ρόλο στο φρουτώδες χαρακτήρα των οίνων, προσδίδοντας αρώματα φράουλας και καραμέλας (Masson & Schneider, 2009). Η σοτολόνη (3-υδροξυ-4,5-διμεθυλφουραν-2(5H)-όνη), ενισχύει το χαρακτήρα παλαιώσης των οίνων, προσδίδοντας αρώματα καρυδιού, καραμέλας και καβουρδισμένης ζάχαρης. Περιέχεται σε σταφύλια που έχουν προσβληθεί από *Botrytis cinerea*. Επίσης, μπορεί να σχηματιστεί κατά την αλκοολική ζύμωση ή μέσω οξειδωτικής αποικοδόμησης του ασκορβικού οξέος που μπορεί να προστεθεί ως αντιοξειδωτικό σε ορισμένους οίνους πριν από τη παλαίωση (Pons et al., 2010). Οι αλδεΐδες φουρφουράλη και 5-μεθυλφουρφουράλη, εκχυλίζονται από το ξύλο των βαρελιών στους οίνους που αποθηκεύονται και ωριμάζουν σε αυτά ή σχηματίζονται από αντιδράσεις Maillard κατά τη θέρμανση σταφυλιών και του οίνου. Προσδίδουν αρώματα φρυγανισμένου ψωμιού, καβουρδισμένου και καραμέλας στους οίνους.

1.7. Μεταβολισμός ζυμομύκητα

1.7.1. Τερπένια

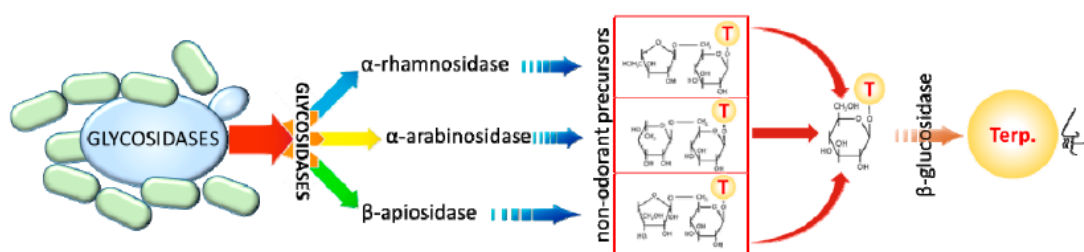
Στα σταφύλια, τα τερπενοειδή και τα C13-νορισοπρενοειδή υπάρχουν τόσο ελεύθερα όσο και ως γλυκοζίτες που απελευθερώνονται είτε χημικά μέσω της όξινης υδρόλυσης, είτε μέσω της δράσης του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης του σταφυλιού ή των ζυμών και βακτηρίων κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (Swiegers et al., 2005;

Carrua et al., 2008). Τα στελέχη *S. cerevisiae* στερούνται των ενζύμων-συνθασών μονοτερπενίων, επομένως δεν μπορούν να παράγουν μονοτερπένια αποτελεσματικά. Μόνο κάποια στελέχη *non Saccharomyces* είναι σε θέση να συνθέσουν μικρές ποσότητες μονοτερπενίων (Carrua et al., 2008). Σε γενικές γραμμές, τα περισσότερα μονοτερπένια είναι σε γλυκοσιδική μορφή, και μόνο ένα μικρό μέρος μπορεί να βρεθεί σε ελεύθερη μορφή (Maicas & Mateo, 2005). Ωστόσο, αυτή η κατανομή μπορεί να διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών.

Έτσι, λοιπόν, οι ενδογενείς γλυκοσιδάσες που προέρχονται από το σταφύλι (Günata et al., 1990), εξωγενείς γλυκοσιδάσες που προέρχονται από τους ζυμομύκητες (Ugliano et al., 2006) και βακτηριακές γλυκοσιδάσες (Grimaldi et al., 2005a, 2005b) παίζουν σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση αυτών των προδρόμων ενώσεων του αρώματος στον οίνο. Οι ενδογενείς γλυκοσιδάσες έχουν χαμηλή σταθερότητα στο γλεύκος λόγω του χαμηλού pH και η ικανότητά τους να απελευθερώνουν τις συζευγμένες ενώσεις του αρώματος αναστέλλεται σημαντικά από τις συγκεντρώσεις αιθανόλης που βρίσκονται στον οίνο. Αντίθετα, οι εξωγενείς γλυκοσιδάσες είναι πιο σταθερές στο pH και η δράση τους αναστέλλεται από την αιθανόλη και τη γλυκόζη, αλλά, σε μικρότερο βαθμό (Robinson et al., 2014). Η δραστηριότητα των προερχόμενων από *Saccharomyces* γλυκοσιδάσων αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των ζυμομυκήτων (πρώτες 24 ώρες ζύμωσης) και μειώνεται γρήγορα τις επόμενες τρεις ημέρες (Delcroix et al., 1994). Όσον αφορά τη δράση της β-γλυκοσιδάσης, έχουν αναφερθεί αντιφατικά αποτελέσματα, γεγονός που υποδηλώνει μια συμπεριφορά που εξαρτάται επίσης από το στέλεχος (Maicas & Mateo, 2016).

Η πιο απλή κατηγορία γλυκοσυλιωμένων ενώσεων είναι οι γλυκοζίτες μονοσακχαριτών που περιέχουν μονάδα β-D-γλυκόζης. Οι τύποι γλυκοζιτών δισακχαρίτη περιέχουν επιπλέον της μονάδας β-D-γλυκόζης μια αραβινόζη, ραμνόζη, ξυλόζη ή απιόζη (Maicas & Mateo 2005). Ο μηχανισμός για την απελευθέρωση των τερπενίων/C13 νορισοπρενοειδών εμφανίζεται σε δύο διαδοχικά στάδια: πρώτον, τα ένζυμα α-L-ραμνοσιδάση, α-L-αραβινοφουρανοσιδάση, β-D-ξυλοσιδάση ή β-D-απιοσιδάση διασπών το δεσμό μεταξύ του τελικού σακχάρου και της ραμνόζης, αραβινόζης, ξυλόζης ή απιόζης αντίστοιχα. Στη συνέχεια, το ένζυμο β-D-γλυκοσιδάσης απελευθερώνει το αντίστοιχο τερπένιο/τερπενόλη/νορισοπρενοειδές (Σχήμα 6). Η β- D-γλυκοσιδάση παρουσιάζει ευρεία δραστηριότητα μεταξύ των στελεχών των ζυμών. Στην περίπτωση του *S. cerevisiae*, έχει αναφερθεί μικρή έως

καθόλου παραγωγή ενζύμων α -L-ραμνοσιδάσης, α -L-αραβινοφουρανοσιδάσης, β -D-ξυλοσιδάσης και β -D-απιοσιδάσης με αποτέλεσμα να είναι εφικτή μόνο η απελευθέρωση ενώσεων από μονογλυκοζίτες (Delcroix et al., 1994). Η ύπαρξη ενός γονιδίου στο *S. cerevisiae* που κωδικοποιεί τη λειτουργία της β -γλυκοσιδάσης δεν είναι σαφής. Φαίνεται ωστόσο, ότι σε μερικά στελέχη η παραγωγή και απελευθέρωση τερπενίων οφείλεται σε γονίδια της οικογένειας BGL (Mateo & di Stefano, 1997; Quatrini, et al., 2008).



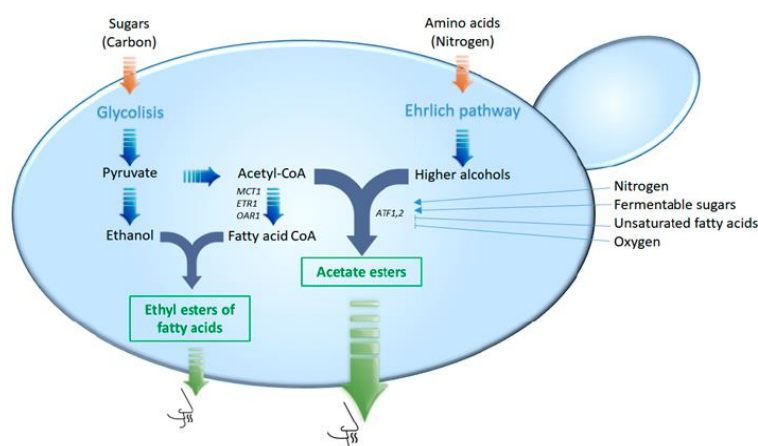
Εικόνα 9: Απελευθέρωση τερπενίων από τις πρόδρομες μη πτητικές ενώσεις τους με τη δράση γλυκοσιδασών (Belda et al., 2017)

Όσον αφορά τα είδη που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*, πολλά από αυτά είναι σε θέση να παράγουν όχι μόνο β -D γλυκοσιδάση, αλλά και υψηλά επίπεδα β -D-ξυλοσιδάσης (*T. Delbrueckii*, *Z. Bailii*) και α -L-αραβινοφουρανοσιδάσης. Ορισμένα στελέχη του γένους *Hanseniaspora* (*H. Uvarum*) παρουσιάζουν μεγάλη δράση της β -D-γλυκοσιδάσης χωρίς καταστολή από γλυκόζη και χαμηλές τιμές pH. Τέλος, σε έλεγχο 370 στελεγχών που ανήκαν σε 20 είδη ζυμομύκητα, όλα τα στελέχη του είδους *Debaryomyces castellii*, *D. hansenii*, *D. polymorphus*, *Kloeckera apiculata* και *Hansenula anomala* έδειξαν δράση της β -γλυκοσιδάσης (Belda et al., 2017; Maicas & Mateo, 2016).

1.7.2. Εστέρες

Αρκετά διαφορετικά ένζυμα και γονίδια εμπλέκονται στο σχηματισμό εστέρων και έχουν προσδιοριστεί (Εικόνα 10). Τα πιο χαρακτηριστικά ένζυμα για το σχηματισμό οξικών εστέρων είναι οι αλκοόλο-ακετυλοτρανσφεράσες I και II (AATase I και II), οι οποίες καταλύουν την αντίδραση μιας αλκοόλης και ενός ακετυλο-CoA, και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *ATF1* και *ATF2* (Beltran et al., 2006; Saerens et al., 2010, Verstrepen et al., 2003; Lilly et al., 2006a, b). Αυτά τα ένζυμα μεταφέρουν την ακυλομάδα (ομάδα οξέος) ενός συζευγμένου ακετυλ-CoA σε έναν υποδοχέα ανώτερης αλκοόλης (Εικόνα 10). Αν και οι συγκεντρώσεις των

υποστρωμάτων είναι σημαντικές για το σχηματισμό οξικών εστέρων, έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης των *ATF1* και *ATF2* είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για τον προσδιορισμό των επιπέδων οξικών εστέρων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Verstrepen et al., 2003b). Τα ένζυμα *Atf1*, *Atf2* που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά είναι εν μέρει υπεύθυνα για την παραγωγή οξικού ισοαμυλεστέρα και οξικού αιθυλεστέρα. Διαφορές που βρέθηκαν μεταξύ τριών ειδών *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* και *S. uvarum*) κατά τη διάρκεια του σχηματισμού οξικών εστέρων έχουν αποδειχθεί ότι οφείλονται, σε κάποιο βαθμό, στις διακριτές ιδιότητες των ενζύμων *Atf* (Belda et al., 2017).



Εικόνα 10: Απεικόνιση των μεταβολικών μονοπατιών σύνθεσης εστέρων και των γονιδίων που εμπλέκονται (Belda et al., 2017)

Οι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας είναι το προϊόν μιας αντίδρασης συμπύκνωσης που καταλύεται από ένζυμο μεταξύ ενός ακυλ-CoA και αιθανόλης (Saerens et al., 2010). Ο σχηματισμός αιθυλεστέρα καταλύεται από ακυλο-CoA: αιθανόλ Ο-ακυλτρανσφεράσες (AEATases), που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *YMK210W*, *EEB1* και *EHT1* (Saerens et al., 2006, 2010; Lilly et al. 2006a, b; Bisson & Karpel, 2010). Για τους αιθυλεστέρες έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα των προδρόμων λιπαρών οξέων είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή και όχι η δραστηριότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων, όπως στην περίπτωση των οξικών εστέρων, υποδηλώνοντας για ακόμη μία φορά ότι η βιοσύνθεση αιθυλεστέρων είναι καθοδηγούμενη από το υπόστρωμα (Saerens et al., 2008). Τα στελέχη *Saccharomyces* διαθέτουν επίσης εστερικές υδρολάσες. Η κύρια υδρολάση κωδικοποιείται από το γονίδιο *IAH1*. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11 τα γονίδια *EEB1* και *EHT1* έχουν επίσης δραστηριότητα εστεράσης.

Class of compound	Enzymatic activity	Genes identified
Fusel oil (higher alcohol)	Branched chain amino acid transferase	<i>BAT1, BAT2</i>
	Aromatic amino acid transferase	<i>ARO8, ARO9</i>
	Decarboxylase	<i>ARO10, PDC1, PDC5, PDC6, TH3</i>
	Alcohol dehydrogenase	<i>ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7, SFA1</i>
Volatile organic acids	Aldehyde dehydrogenase	<i>ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6</i>
	Fusel acid transport	<i>PDR12</i>
Esters	Alcohol acetyl transferase	<i>ATF1, ATF2</i>
	Acyl transferase	<i>EEB1, EHT1, YMR210W</i>
	Esterase	<i>LAH2, EEB1, EHT1</i>
Sulfur-containing volatiles	Sulfur amino acid biosynthesis	<i>CYS3, CYS4, MET5, MET6, MET8, MET10, MET17, STR2, STR3</i>
	Cysteine degradation	<i>CYS3</i>
	Glutathione degradation	<i>DUG1, DUG2, DUG3, ECM38</i>
Carbonyl compounds	Aryl alcohol dehydrogenase	<i>AAD3, AAD4, AAD6, AAD10, AAD14, AAD15, AAD16</i>
	Acetolactate synthetase	<i>ILV2</i>
	Butanediol dehydrogenase	<i>BDH1, BDH2</i>
Volatile aglycones	β -glucosidase	<i>BGL2, EXG1, EXG2</i>
Cys-conjugates	Cyseinyl lyase	<i>BN43, CYS3, GLO1, STR3, ICR7</i>
Transcriptome analysis		<i>ACSI</i>

Εικόνα 11: Γονίδια εμπλεκόμενα στη παραγωγή πηκτικών ενώσεων σε οίνους (Bisson & Karpel, 2010)

Δεδομένου ότι έχουν περιγραφεί διαφορές στα ένζυμα που σχετίζονται με τη παραγωγή εστέρων μεταξύ των ειδών *Saccharomyces*, αναμένεται σημαντική ποικιλομορφία σε στελέχη *non Saccharomyces*, που θεωρούνται χρήσιμα εργαλεία για την αύξηση της συγκέντρωσης των εστέρων στους οίνους (Lambrechts & Pretorius, 2000). Ως παράδειγμα αυτής της συμβολής, είναι η ικανότητα των *Hanseniaspora guilliermondii* και *H. vineae* να παράγουν 2-φαινυλαιθανόλη και οξικό 2-φαινυλαιθυλεστέρα (σχετίζονται με αρώματα τριαντάφυλλου, λουλουδιού και μελιού), σε μονό εμβολιασμό ή συν-εμβολιασμό με *S. cerevisiae* (Swiegers & Pretorius, 2005; Lleixà et al., 2016). Άλλο παράδειγμα είναι η μεγάλη ικανότητα του *M. pulcherrima* να παράγει υψηλές συγκεντρώσεις οκτανόϊκού αιθυλεστέρα (άρωμα αχλάδι), σε συν-εμβολιασμό με το *S. cerevisiae* (Sadoudi et al., 2012). Ακόμη, μικτή καλλιέργεια στελεχών (*S. cerevisiae*, *S. bayanus* και *S. Japonicus*) οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα εστέρων σε σύγκριση με τις ζυμώσεις καθαρής καλλιέργειας *S. cerevisiae* (Lambrechts & Pretorius, 2000). Επομένως, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον να μελετηθούν οι λόγοι της αυξημένης/μειωμένης απελευθέρωσης εστέρα, εστιάζοντας στη γονιδιακή δομή, τη μεταγραφική ρύθμιση και την κινητική των ενζύμων στις συνθήκες ζύμωσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Σκοπός και σχεδιασμός πειράματος

Σκοπός της διεξαγόμενης μελέτης είναι η παρακολούθηση του μεταβολισμού του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις αζωτούχας θρέψης και ο προσδιορισμός της σχέσης συγκεκριμένων μεταβολικών διεργασιών του ζυμομύκητα με την παραγωγή συγκεκριμένων πτητικών συστατικών του αρώματος των οίνων. Για το σκοπό αυτό σε διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης θα πραγματοποιηθούν δειγματοληψίες στο γλεύκος και θα ληφθεί βιομάζα ζαχαρομύκητα. Μέσω χημικών αναλύσεων των πτητικών του γλεύκους και μεταγραφικών αναλύσεων στη βιομάζα του ζυμομύκητα, στα σημεία της δειγματοληψίας, θα μελετηθούν κάποια γονίδια (*ATF1*, *ATF2*, *EEB1*, *EHT1*, *IAH1*, *BGL2*, *EXG1*) του ζυμομύκητα που σχετίζονται άμεσα με τη σύνθεση εστέρων και παραγωγή τερπενίων στους οίνους.

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε γλεύκος ποικιλίας Μοσχοφίλερο που προήλθε από το τρύγο του 2019, από τη περιοχή της Τρίπολης. Το γλεύκος χωρίστηκε σε ισόχωρες δεξαμενές των 10 L. Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό στέλεχος SafEno™ CKS 102 (*S. cerevisiae*). Πραγματοποιήθηκαν δύο επίπεδα θρέψης οργανικού αζώτου:

- A. χαμηλό (προσθήκη 200 g/tn SpringFerm™, Fermentis)
- B. υψηλό (προσθήκη 400 g/tn SpringFerm™, Fermentis)

Επομένως, έλαβαν χώρα εις διπλούν 2 οινοποιήσεις, συνολικά 4 στο Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με κοινό πρωτόκολλα οινοποίησης, με μοναδική διαφορά το επίπεδο αζωτούχας θρέψης.

Η μεταγραφωμική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκε και απομονώθηκε βιομάζα σε τέσσερα σημεία της ζύμωσης με κοινό πρωτόκολλο δειγματοληψίας.

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων βασίστηκε, στις αναλύσεις των πτητικών ενώσεων, σε σύγκριση με τις μοριακές αναλύσεις και το επίπεδο αζώτου των ζυμώνσεων. Repeated Measures ANOVA και LSD post hoc τεστ χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική ανάλυση (α) των πτητικών ενώσεων και (β) των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων, για κάθε περίπτωση ζύμωσης και χρονικό σημείο,

αξιολογώντας την επίδραση των παραγόντων που μελετήθηκαν (περιεκτικότητα σε άζωτο, χρόνος ζύμωσης και αλληλεπίδρασή τους) σε κάθε μεταβλητή. Σημαντικές διαφορές λήφθηκαν με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πακέτο PASW 18.0.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την παρούσα μελέτη επιτρέπουν τη κατανόηση της διεργασίας της ζύμωσης με παρακολούθηση και σε μεταγραφωμικό επίπεδο και συνδέει τα ιδιαίτερα γενετικά χαρακτηριστικά του στελέχους σακχαρομύκητα με τις ποιοτικές του επιδόσεις.

2.1.1. Πρωτόκολλο οινοποίησης

Η παραγωγή των οίνων πραγματοποιήθηκε με μικροοινοποιήσεις γλεύκους ποικιλίας Μοσχοφύλερο. Η προετοιμασία του γλεύκους έλαβε χώρα στο οινοποιείο Κοτρώτσος, ενώ στη συνέχεια οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο υπόγειο του κτιρίου Χασιώτη. Αρχικά, τα σταφύλια μεταφέρθηκαν σε θλιπτήριο για εκραγισμό. Πραγματοποιήθηκε θείωση της σταφυλομάζας με προσθήκη θειώδη ανυδρίτη (4 g/hL potassium metabisulfite) και προστέθηκαν εκχυλιστικά ένζυμα (Safizym®Pres, Fermentis) σε συγκέντρωση 3 g/hL και πηκτολυτικά ένζυμα (Zymolyse clar fast I, Dolmar) σε συγκέντρωση 2 ml/hL. Μετά το σπάσιμο και την παραλαβή του γλεύκους προστέθηκαν 20 g/hL Polycel Plus (30% PVPP), Dolmar. Ακολούθησε στατική απολάσπωση με ψύξη, στους 10 °C. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε μετάγγιση του γλεύκους και προσθήκη 10 g/hL SpringArom™, Fermentis, σκεύασμα που περιέχει κύτταρα απενεργοποιημένων ζυμομυκήτων πλούσιων σε γλουταθειόνη και προσφέρει αντιοξειδωτική προστασία. Στη συνέχεια, στο Εργαστήριο Οινολογίας, ακολούθησε η διαίρεσή του γλεύκους σε 4 ισόχωρες δεξαμενές των 10 L, στις οποίες τοποθετήθηκαν 9 L γλεύκους στην καθεμία. Ακολούθως, έγινε ο εμβολιασμός με το στέλεχος SafEno™ CK S102, Fermentis (*S cerevisiae*) σε συγκέντρωση 20 g/hL. Για τον εμβολιασμό, προηγήθηκε η διασπορά της ζύμης σε δεκαπλάσια ποσότητα γλεύκους. Η ζύμη αφέθηκε για 10 λεπτά σε ηρεμία και ακολούθησε ήπια ανάδευση και προσθήκη του εμβολίου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αζωτούχος θρέψη οργανικού αζώτου με SpringFerm™, Fermentis που αποτελείται από μερικώς αυτολυμένα κύτταρα ζυμών, πλούσια σε αφομοιώσιμο άζωτο. Χρησιμοποιήθηκαν δύο επίπεδα θρέψης οργανικού αζώτου (χαμηλό και υψηλό). Έτσι, σε δύο δεξαμενές έγινε προσθήκη σε συγκέντρωση 20 g/hL (χαμηλό

επίπεδο θρέψης), ενώ σε άλλες δύο προστέθηκαν 40 g/ hL (υψηλό επίπεδο θρέψης). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, στο 1/3 από την έναρξη της, πραγματοποιήθηκε δεύτερη θρέψη οργανικού και ανόργανου αζώτου, κοινή για όλα τα γλεύκη, με προσθήκη 40 g/HI, σύνολο SpringFerm™, Fermentis και DAP σε αναλογία 1:1.

Καθημερινός έλεγχος της πορείας της ζύμωσης πραγματοποιούνταν με μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας (°Brix) και θερμοκρασίας σε όλη τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε σε διάστημα 16 ημερών. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης κυμαίνονταν από 18,5 έως 22°C. Επίσης, καθημερινά κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης μετρούταν το αφομοιώσιμο άζωτο (YAN) και η ένδειξη βιομάζας του ζυμομύκητα. Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, οι οίνοι μεταγγίστηκαν σε περιέκτες των 8 L και πραγματοποιήθηκε θείωση με προσθήκη 10 g/hL potassium metabisulfite. Οι περιέκτες τοποθετήθηκαν σε ψύξη στους 4°C και ακολούθησε πρωτεϊνική και τρυγική σταθεροποίηση των οίνων. Τέλος, οι οίνοι εμφιαλώθηκαν.

2.1.2. Πρωτόκολλο συλλογής βιομάζας

Κατά τη διάρκεια των αλκοολικών ζυμώσεων, οι δειγματοληψίες για τη συλλογή βιομάζας και για την εκχύλιση RNA στο Εργαστήριο της Μοριακής Βιολογίας του ΓΠΑ έγιναν σε τέσσερα στάδια:

- i. στον εμβολιασμό
- ii. 48 ώρες μετά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης (έναρξη ορίστηκε η πτώση 2 °Brix)
- iii. στα 2/3 της αλκοολικής ζύμωσης και
- iv. αμέσως μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης (<4 g/L συγκέντρωση ζάχαρων).

Για τη συλλογή βιομάζας σε κάθε στάδιο ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Φυγοκέντρηση δείγματος 50 mL (4000 rpm, 15 λεπτά, 4° C).
2. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και έκπλυση/επαναιώρηση των κυττάρων σε 20 ml απιονισμένου νερού ddH₂O.
3. Φυγοκέντρηση (4000 rpm, 15 λεπτά, 4° C).
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και έκπλυση/επαναιώρηση των κυττάρων σε 2 ml απιονισμένου νερού ddH₂O.

5. Μεταφορά σε σωλήνες Eppendorf των 1,5 ml και συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση (4000 rpm, 5 λεπτά, 20° C).
6. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Ψύξη με υγρό άζωτο και αποθήκευση των κυττάρων στους -80°C μέχρι την απομόνωση του RNA.

2.2. Αναλύσεις στο γλεύκος

2.2.1. Μέτρηση σακχάρων

Η μέτρηση των σακχάρων και η παρακολούθηση της πορείας ζύμωσης έγινε με διαθλασιμετρία και αραιομετρία. Για τον προσδιορισμό των βαθμών °Brix χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό διαθλασίμετρο με θερμοκρασία βαθμονόμησης 20 °C το οποίο ρυθμίζεται με μερικές σταγόνες απιονισμένου νερού. Ακολουθεί η μέτρηση των δειγμάτων και η σημείωση της ένδειξης του διαθλασίμετρου. Για τον προσδιορισμό των σακχάρων στο γλεύκος με αραιόμετρο (βαθμονομημένο στους 20 °C) χρησιμοποιείται 200 mL δείγματος και τοποθετούνται σε ογκομετρικό κύλινδρο 250 mL. Βυθίζεται το αραιόμετρο και αφήνεται να ισορροπήσει, ενώ σημειώνεται η θερμοκρασία του γλεύκους. Λαμβάνεται η τιμή του αραιομέτρου, που μετράει το ειδικό βάρος, και διορθώνεται σύμφωνα με τους κατάλληλους πίνακες.

2.2.2. Εκτίμηση βιομάζας

Η οπτική πυκνότητα στα 600 nm χρησιμοποιήθηκε ως εκτίμηση της ανάπτυξης των κυττάρων ζύμης (συγκέντρωση βιομάζας). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στα διαφορετικά φάσματα φωτός τα οποία εκπέμπονται, και καταγράφει τις διάφορες τιμές σκέδασης του φωτός ανάλογα με το μήκος κύματός του. Με το φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους (αφού πρώτα έχει προηγηθεί μηδενισμός του με απιονισμένο νερό) μετράται η απορρόφηση δειγμάτων γλεύκους. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση (5000 rpm, 10 λεπτά) προκειμένου να διαχωριστεί η βιομάζα από το βιομέσο (γλεύκος) και μετράται πάλι η απορρόφηση στα 600 nm του υπερκείμενου υγρού. Η διαφορά των δύο απορροφήσεων αποδίδει μία εκτίμηση της συγκέντρωσης της βιομάζας. Στις περιπτώσεις όπου η αρχική απορρόφηση είναι μεγαλύτερη από 1, το υπό μέτρηση δείγμα αραιώνεται κατάλληλα για την αποφυγή σφαλμάτων και συνυπολογίζεται στο τελικό αποτέλεσμα η αραιώση. Με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας επιτυγχάνεται η παρακολούθηση της αύξησης της βιομάζας με μικρή απαίτηση όγκου δείγματος και χρόνου.

2.2.3. Προσδιορισμός αφομοιώσιμου αζώτου.

Το άζωτο αποτελεί βασικό θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και επηρεάζει άμεσα την εξέλιξη και την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Επηρεάζει, ακόμη, τη συγκέντρωση πολλών πτητικών και μη πτητικών μεταβολιτών διαμορφώνοντας τις χημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες και το στυλ του οίνου. Το αφομοιώσιμο άζωτο των σταφυλιών (YAN) προσδιορίζεται με τον ανεξάρτητο προσδιορισμό της αμμωνίας και του αζώτου των αμινοξέων. Στη συνέχεια αυτά εκφράζονται ως προς άζωτο και προστίθενται.

2.2.3.1. Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αμμωνιακού αζώτου βασίζεται στην αντίδραση της αμμωνίας με αλκαλικό διάλυμα υποχλωριώδους και φαινόλης παρουσία καταλύτη, sodium nitroprusside [$\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$] για να σχηματιστεί ινδοφαινόλη η οποία έχει μπλε χρώμα. Η συγκέντρωση της ινδοφαινόλης υπολογίζεται φωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 635 nm και είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης αμμωνιακών στο γλεύκος. Συγκεκριμένα, σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται κατά σειρά 100μL οίνος, 4 mL απιονισμένο νερό, 2mL φαινολικό διάλυμα καταλύτη και 3mL αλκαλικό διάλυμα υποχλωριώδους. Για το μηδενισμό του φωτομέτρου παρασκευάζεται τυφλό δείγμα, όπου αντί για οίνο χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Μετά από την παραμονή των σωλήνων για 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τον σχηματισμό του χρωμοφόρου (ινδοφαινόλη) γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 635 nm. Η συγκέντρωση του αζώτου δίνεται σε mg αζώτου (N) ανά L και υπολογίζεται από την κατασκευή πρότυπης καμπύλης απορρόφησης - συγκέντρωσης αζώτου. Για την πρότυπη καμπύλη προσδιορίστηκε η απορρόφηση γνωστών συγκεντρώσεων θειικού αμμωνίου με την ίδια μέθοδο. Από το θειικό αμμώνιο υπολογίζεται κατευθείαν η συγκέντρωση του αζώτου σε mg N/L και δημιουργείται η καμπύλη αναφοράς (Scheiner, 1976).

2.2.3.2. Προσδιορισμός αζώτου βασικών αμινοξέων

Βασική αρχή της μεθόδου είναι η παραγωγοποίηση των πρωτοταγών αμινομάδων των αμινοξέων με το αντιδραστήριο o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine (OPA/NAC). Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι σταθερά παράγωγα ισοϊνδολης που παρουσιάζουν απορρόφηση στο υπεριώδες φως με αποτέλεσμα να

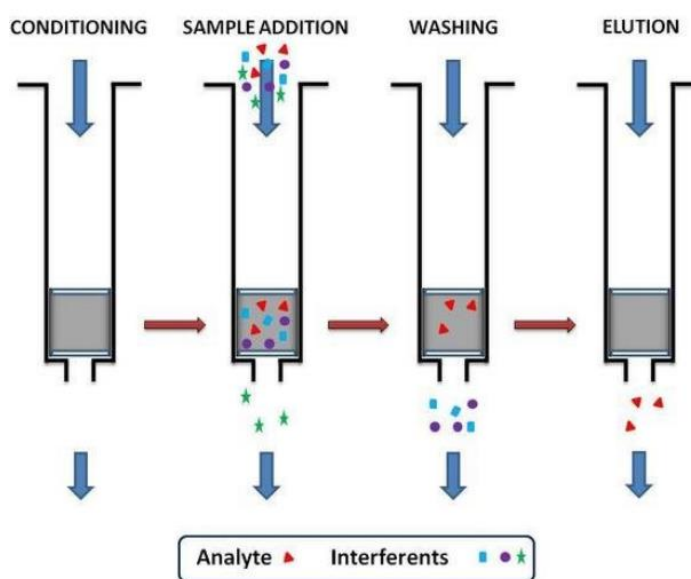
είναι εφικτός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του φωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 335nm. Η ποσότητα των σχηματιζόμενων ισοϊνδολικών παραγώγων είναι ανάλογη της ποσότητας των αμινοξέων. Η μέθοδος δεν παρουσιάζει ευαισθησία στην προλίνη, καθώς περιέχει μια δευτεροταγή αμινομάδα, ωστόσο είναι αποτελεσματική στον υπολογισμό των αφομοιώσιμων από τις ζύμες αμινοξέων. Συγκεκριμένα, σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται κατά σειρά 50 μ L δείγμα οίνου και 3mL διάλυμα OPA-NAC. Στη μέθοδο χρησιμοποιείται μάρτυρας που περιέχει 50 μ L δείγμα και 3 mL διάλυμα NAC για να μετρηθεί και να ληφθεί υπόψη στους υπολογισμούς η απορρόφηση των μη παραγώγων ενώσεων που υπάρχουν στο γλεύκος, όπως οι φαινολικές ενώσεις. Οι σωλήνες αφήνονται σε ηρεμία για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν μετριέται η απορρόφηση στα 335 nm. Η συγκέντρωση του αζώτου δίνεται σε mg ανά L και υπολογίζεται από την καμπύλης αναφοράς απορρόφησης – συγκέντρωσης αζώτου. Για την πρότυπη καμπύλη προσδιορίστηκε η απορρόφηση γνωστών συγκεντρώσεων ισολευκίνης με την ίδια μέθοδο. Από την ισολευκίνη υπολογίζεται κατευθείαν η συγκέντρωση του αζώτου σε mg N/L και δημιουργείται η καμπύλη αναφοράς (Dukes & Butzke, 1998).

2.2.4. Εκχύλιση πτητικών ενώσεων γλεύκους με τη μέθοδο εκχύλισης στερεής φάσης (Solid-Phase Extraction, SPE)

Αποτελεί μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη σύγχρονη τεχνική προετοιμασίας του προς ανάλυση δείγματος. Η SPE αντικαθιστά αποτελεσματικά την εκχύλιση υγρού με υγρό. Βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η υψηλή επαναληψιμότητα και εκλεκτικότητα της εκχύλισης καθώς και δυνατότητα συνύπαρξης δύο και περισσότερων μηχανισμών στη διαδικασία εκχύλισης (McDonald & Bouvier, 2001). Η αρχή της SPE περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών ανάμεσα σε 2 φάσεις: τη στερεή φάση που αποτελεί το προσροφητικό υλικό και την υγρή που αποτελεί το υπόστρωμα. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις πρέπει να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις ομάδες της στερεής φάσης, έτσι ώστε να διαχωριστούν. Η παραλαβή των ενώσεων από το στερεό υπόστρωμα γίνεται με την επιλογή κατάλληλων διαλυτών. Οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των προσδιοριζόμενων συστατικών, των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και της υγρής φάσης του υποστρώματος του δείγματος ή του

διαλύτη, είναι υπεύθυνες για τους διάφορους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλυσης των ενώσεων. Τα στάδια της SPE είναι:

- ενεργοποίηση του προσροφητικού,
- φόρτωση του δείγματος,
- έκπλυση για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων συστατικών του υποστρώματος,
- έκλυση του δείγματος με τον κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών.



Εικόνα 12: Στάδια εκχύλισης SPE

Οι συνηθέστερες μορφές με τις οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμη η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι:

1. Μικροστήλες σύριγγας (syringe barrel columns)
2. Μεμβράνες σε μορφή δίσκων
3. Συσκευές κενού για πολλαπλή κατεργασία δέκα, δώδεκα, είκοσι και είκοσι τεσσάρων μικροστηλών.

Οι μηχανισμοί διαχωρισμού περιλαμβάνουν ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσης, SPE κανονικής φάσης και SPE αντίστροφης φάσης. Ο διαχωρισμός στην SPE κανονικής φάσης βασίζεται στη κατακράτηση πολικών ή μετρίως πολικών ενώσεων από τη στατική φάση που περιέχει πολικές ομάδες και στη συνέχεια την έκλυση των ενώσεων αυτήν με χρήση πολικών διαλυτών. Στηρίζεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου των πολικών ομάδων με το προσροφητικό υλικό. Ο διαχωρισμός SPE αντίστροφης φάσης χρησιμοποιείται για μη πολικές ενώσεις με χρήση μη πολικού προσροφητικού υλικού και τη παραλαβή στη συνέχεια της επιθυμητής ένωσης γίνεται

με χρήση κατάλληλου διαλύτη. Ο διαχωρισμός στην SPE αντίστροφης φάσης βασίζεται σε ελκτικές δυνάμεις van der Waals ή δυνάμεις διασποράς (Lopez et al., 2002).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την παραλαβή των πτητικών ενώσεων περιλαμβάνει στήλες εκχύλισης στερεάς φάσης C18 (500mg, 3mL), τοποθετημένες σε συσκευή ταυτόχρονου χειρισμού πολλών δειγμάτων. Το σύστημα συνδέεται με την αντλία κενού. Προβλέπει αρχικά την ενεργοποίηση της στήλης με έκπλυση 2 mL πεντάνιο-διχλωρομεθάνιο σε αναλογία 2:1 και ακολούθως έκπλυση με 2 mL μεθανόλη. Στη συνέχεια εισάγεται το δείγμα, το οποίο αποτελείται από 25 mL φυγοκεντρημένο γλεύκος, 25 mL νερό και 500 μ L διαλύματος εσωτερικών προτύπων 1-βουτανόλης d10 (10 mg/L), 3-οκτανόλης (10 mg/L), επτανοϊκού αιθυλεστέρα (10 mg/L), επτανοϊκού οξέος (10 mg/L), οξικού οξέος d4 (50 mg/L) και βουτυρικού αιθυλεστέρα d3 (1 mg/L). Η ροή ρυθμίζεται με τη βοήθεια της αντλίας στα 1-1,5 mL/min. Για την απομάκρυνση των πολικών ενώσεων ακολουθεί έκπλυση με 25 mL H₂O. Οι πτητικές ενώσεις λαμβάνονται σε vials των 45 mL μετά από έκλυση με 15mL πεντάνιο-διχλωρομεθάνιο σε αναλογία 2:1. Για την πλήρη αφύγρανση προστίθεται στο vial που έχει συλλεχθεί το εκχύλισμα περίπου 0,5g θεικού νατρίου και αναδεύεται ήπια. Το εκχύλισμα διηθείται, συλλέγεται σε καθαρό γυάλινο φιαλίδιο και συμπυκνώνεται με αέριο άζωτο υπό ροή στα 500 μ L. Μεταφέρεται σε γυάλινο φιαλίδιο των 2 mL και αποθηκεύεται στην κατάψυξη μέχρι την έγχυσή του στο GC-MS.

2.2.5. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός πτητικών ενώσεων γλεύκους με GC-MS

Ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας (GC) και φασματομετρίας μάζας (MS) χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό, ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των πτητικών ενώσεων σε οίνους. Αποτελούν ισχυρές αναλυτικές τεχνικές, όπου η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών ενός διαλύματος, ενώ με τη φασματομετρία μάζας επιτυγχάνεται η ταυτοποίησή τους.

Ο διαχωρισμός σε αέριο χρωματογράφο καθορίζεται από την κατανομή των προς μελέτη συστατικών ενός δείγματος μεταξύ μίας στατικής (υγρό ή στερεό) και μίας κινητής φάσης (φέρων αέριο). Τα προς ανάλυση συστατικά θα πρέπει να είναι πτητικά ή να μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα ύστερα από την εφαρμογή κατάλληλων αντιδραστηρίων. Ο εξοπλισμός ενός αέριου χρωματογράφου-

φασματογράφου μάζας (GC-MS) αποτελείται από μια είσοδο για το δείγμα, μια στήλη στην οποία το δείγμα διαχωρίζεται και ένα μέσο ανίχνευσης των πτητικών ενώσεων. Η επιλογή της στήλης αποτελεί σημαντικό μέρος του εξοπλισμού με τις τριχοειδείς στήλες να θεωρούνται απαραίτητες και κατάλληλες για αποτελεσματικό διαχωρισμό. Χρησιμοποιείται ελεγχόμενη ροή αερίου (κινητή φάση) μέσω της στήλης και βαθμιαία αυξανόμενη θερμοκρασία για τον διαχωρισμό των πτητικών ενώσεων. Τα συστατικά διαχωρίζονται με διαφορετικές ταχύτητες και εξαρτάται από τις διαφορετικές τάσεις ατμών των συστατικών, από τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις που έχουν αυτά με την εκάστοτε στατική φάση και από τη θερμοκρασία. Τα κύρια λειτουργικά μέρη του ανιχνευτή φασματομέτρου μάζας είναι η πηγή ιονισμού και ο αναλυτής. Η πηγή ιονισμού επιφέρει τον ιονισμό των μορίων της προς ανάλυσης ένωσης, και συνήθως χρησιμοποιείται η τεχνική ιονισμού ηλεκτρονίων EI με κρούση ηλεκτρονίων ή η τεχνική του χημικού ιονισμού CI. Η ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων, γίνεται με αντιστοίχιση του θραύσματός και του μοριακού ιόντος που λαμβάνεται με εξειδικευμένες βιβλιοθήκες γνωστών φασμάτων μάζας χρησιμοποιώντας υπολογιστή. Εντοπίζονται και ολοκληρώνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στις ενώσεις για τις οποίες υπάρχουν πρότυπες καμπύλες και για τα εσωτερικά πρότυπα. Μεταφέρονται τα δεδομένα (peak area) σε αρχείο excel και υπολογίζονται οι λόγοι των ενώσεων με το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο (οι ανώτερες αλκοόλες με 3-octanol, οι εστέρες με ethyl-heptanoate και τα πτητικά λιπαρά οξέα με το heptanoic acid). Ο λόγος χρησιμοποιείται ως y στις εξισώσεις των πρότυπων καμπυλών και λύνονται ως προς x , το οποίο αντιστοιχεί στην συγκέντρωση της πτητικής ένωσης σε mg/L.

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με αέριο χρωματογράφο Clarus 5090, Perkin Elmers GC, εξοπλισμένο με έναν ανιχνευτή MS Clarus 5Q8S. Οι ενώσεις διαχωρίστηκαν σε τριχοειδή στήλη GC Agilent J&W (DB 5MS UI) (50 m×0,25 mm και πάχος 0,25 μm). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα περιλαμβάνει την αρχική παραμονή στους 40° C για 2 λεπτά, την αύξηση με βήμα 5° C ανά λεπτό μέχρι τους 240° C, όπου παραμένει για 20 λεπτά. Θερμοκρασία injector και ανιχνευτή στους 250 °C και 240 °C, αντίστοιχα. Η πίεση της κεφαλής της στήλης ήταν 47 psi και ο ρυθμός ροής ηλίου ορίστηκε σε 1,96 mL/min.

Ο προσδιορισμός και ποσοτική ανάλυση των πτητικών ενώσεων στα γλεύκη πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Συγκεκριμένα για κάθε περίπτωση ζύμωσης (συμπεριλαμβανομένων και των βιολογικών επαναλήψεων)

λήφθηκαν 50 mL γλεύκους i) στον εμβολιασμό, ii) 48 ώρες μετά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, iii) στα 2/3 της αλκοολικής ζύμωσης και iv) αμέσως μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης (<4 g/L συγκέντρωση ζάχαρων). Ακολούθησε εκχύλιση των πτητικών ενώσεων σύμφωνα με τα παραπάνω πρωτόκολλα (2.2.4), ανάλυση του δείγματος στο GC-MS και ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών συστατικών όπως περιγράφεται παραπάνω.

2.3. Προσδιορισμός σχετικής έκφρασης γονιδίων

Στη παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η σχετική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων του *S. cerevisiae* υπεύθυνα για το σχηματισμό των ενώσεων του αρώματος στους οίνους. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ATF1*, *ATF2*, *EEB1*, *EHT1*, *IAH1* που εμπλέκονται στο σχηματισμό των εστέρων και των γονιδίων *BGL2*, *EXG1* που σχετίζονται με την απελευθέρωση των τερπενίων κατά την αλκοολική ζύμωση. Από κάθε περίπτωση ζύμωσης συλλέχθηκε σε τέσσερα στάδια βιομάζα σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε, απομονώθηκε το RNA με σκοπό τη παραγωγή cDNA και τελικά την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης των παραπάνω γονιδίων με RT-PCR. Παρακάτω ακολουθούν αναλυτικά όλα τα βήματα μέχρι την Real-Time PCR ανάλυση.

2.3.1. Απομόνωση ολικού RNA

Σύμφωνα με τη μέθοδο Brusslan & Tobin (1992) ζυγίστηκε κατάλληλη ποσότητα βιομάζας (50mg) από κάθε περίπτωση ζύμωσης και ομογενοποιήθηκε σε γουδί λειοτριβήσεως παρουσία υγρού αζώτου. Το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf και προστίθεται 500μL Nucleozol και 300 μL ddH₂O. Ακολουθεί καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 δεύτερα, αναμονή 15 λεπτά και το δείγμα φυγοκεντρείται (13.000 rpm, 15 λεπτά, 20°C). Ακολουθεί η κατακρήμνιση των νουκλεικών οξέων με προσθήκη 500μL ισοπροπανόλης, αναμονή 10 λεπτά και φυγοκέντρωση (13.000 rpm, 10 λεπτά, 20°C). Το ίζημα ξεπλένεται με 150μL 75% v/v αιθανόλη και φυγοκεντρείται (13.000 rpm, 5 λεπτά, 20°C). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές και στη συνέχεια το ίζημα στεγνώνεται. Η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά, ενώ η ακεραιότητα του RNA διαπιστώνεται με ανάλυση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης.

2.3.2. Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA

Κατά την απομόνωση ολικού RNA, ενδέχεται να περιέχεται στο δείγμα και γονιδιωματικό DNA. Για να αποφευχθεί η λήψη λανθασμένων αποτελεσμάτων, κατά την μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων, απαιτείται ο καθαρισμός του RNA από το γονιδιωματικό DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση του ενζύμου DNase I (Καλλονιάτη, 2016). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής. Σε αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf προστίθενται δείγμα ολικού RNA (200 µg/ µL), DNase I (1 unit/ µL), RNase Out (40 units/ µL), 10X ρυθμιστικό διάλυμα DNase, ddH₂O. Η DNase I είναι απαλλαγμένη από πιθανή δράση RNάσης, ενώ η παρουσία RNase Out (παρεμποδιστής δράσης RNασών) είναι απαραίτητη για την διαφύλαξη της ακεραιότητας του RNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Τα δείγματα επωάζονται για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά στους 37°C. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθενται στο δείγμα 100 µL ddH₂O και 150 µL μίγματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1 PIC pH 8,3. Ακολουθεί καλή ανάδευση με χρήση μηχανικού αναδευτήρα (vortex) για 30 δεύτερα και το δείγμα φυγοκεντρείται (13.000 rpm, 5 λεπτά, 20°C). Η υδάτινη φάση μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθενται στο δείγμα 150 µL χλωροφόρμιο. Αφού προηγηθεί φυγοκέντρωση (13.000 rpm, 5 λεπτά, 20°C) η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη 1/10 όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και 2,5 όγκων αιθανόλης. Τα δείγματα επωάζονται στους -20°C για περίπου 16 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρονται για 30 λεπτά στους -80°C. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις (13.000 rpm, 30 λεπτά, 4°C). Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με 70 % v/v αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο ddH₂O. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζονται φωτομετρικά, ενώ η ακεραιότητα του RNA διαπιστώνεται με ανάλυση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης. Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης πραγματοποιείται αντίδραση PCR στο καθαρό πλέον RNA και η μη παρουσία ενισχυμένου προϊόντος επιβεβαιώνει την επιτυχία της απομάκρυνσης του DNA.

2.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενισχύσεως ακολουθιών DNA και RNA, in vitro ή και in situ. Η αντίδραση προϋποθέτει την ύπαρξη δύο ολιγονουκλεοτιδίων, που

έχουν την ικανότητα να υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA ή cDNA, τα οποία δρουν ως εκκινητές της σύνθεσης της αλυσίδας του DNA. Η σχεδίαση των εκκινητών είναι τέτοια, ώστε η σύνθεση της αλυσίδας του DNA να γίνεται προς την κατεύθυνση του άλλου. Η σύνθεση γίνεται με τη δράση μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, παρουσία των απαραίτητων νουκλεοτιδίων καθώς και ιόντων Mg^{+2} . Κατά τη διάρκεια μίας τυπικής αντίδρασης, πρώτο στάδιο αποτελεί η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, με τη θέρμανση του δείγματος. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων γίνεται με θέρμανση του δείγματος στη βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η όλη διαδικασία αποδιάταξης, υβριδισμού των εκκινητών και σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας επαναλαμβάνεται για ένα αριθμό κύκλων (συνήθως 20-35). Κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων και εφόσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες όπως έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών ή παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης, η συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό (Καλλονιάτη, 2016).

Πέρα από την τυπική αντίδραση ενισχύσεως δίκλωνων τμημάτων DNA, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μια σειρά από παραλλαγές της βασικής διαδικασίας που περιγράφηκε παραπάνω. Μία από τις παραλλαγές επιτρέπει τη χρησιμοποίηση, ως αρχικής μήτρας για την αντίδραση ενισχύσεως μορίων RNA (RT-PCR), τα οποία αρχικά μεταγράφονται σε cDNA με τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase). Επιπλέον, είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης με την χρήση της τεχνικής της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRealTime PCR). Οι δύο παραπάνω τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης και θα παρουσιαστούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια.

2.3.3.1. Ενίσχυση ακολουθιών DNA με την χρήση της τεχνικής PCR

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μίας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Συγκεκριμένα, η ποσότητα του DNA που προστίθεται ως μήτρα εξαρτάται από το είδος του. Επίσης η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεως (T_m) τους (Καλλονιάτη, 2016). Στο συγκεκριμένο πείραμα όπου υπάρχει μήτρα RNA (που απομονώθηκε από τη βιομάζα των

ζυμώσεων) χρησιμοποιήθηκε η PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) για την παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA) από RNA. Εδώ χρησιμοποιείται μια RNA εξαρτώμενη πολυμεράση, η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιεί ως μήτρα RNA. Ως εκκινητής χρησιμοποιήθηκαν 12 – 18μερή ολιγο (dT). Σε ειδικό σωλήνα eppendorf προστίθενται: μήτρα RNA, εκκινητής ολιγο (dT)12 – 18μερή, μίγμα dNTPs , ddH₂O. Το RNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά, ώστε να επιτραπεί ο υβριδισμός εκκινητή – RNA. Το δείγμα μεταφέρεται αμέσως σε πάγο για να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρωση και προσθήκη 5X ρυθμιστικό διάλυμα First-Strand, RNaseOUT, DTT. Το δείγμα προθερμαίνεται στους 42°C για 2 λεπτά πριν την προσθήκη της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II. Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 42°C για 50 λεπτά. Η αντίδραση σταματά με θέρμανση του δείγματος στους 70°C για 15 λεπτά.

2.3.3.2. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR -QRT PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της προόδου μιας αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο. Επίσης, είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση μιας πολύ μικρής ποσότητας προϊόντος PCR (DNA, cDNA ή RNA) με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Βασίζεται στην ανίχνευση του φθορισμού, ο οποίος εκπέμπεται όταν κάποιο μόριο αναφοράς (SYBR ® Green) προσδεθεί στη μικρή αύλακα της δίκλωνης έλικας ενός μορίου DNA (προϊόντος της PCR). Τα προϊόντα της PCR συσσωρεύονται μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης των ακολουθιών, γι' αυτό με την πρόοδο της αντίδρασης ο φθορισμός που παράγεται από το μόριο αναφοράς αυξάνει. Με αυτό τον τρόπο διευκολύνεται η παρακολούθηση της αντίδρασης ενώ αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη (http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/real_time_PCR.html). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η SYBR Green παράγει φθορισμό όταν προσδέεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως διμερή εκκινητών ή ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR. Λόγω αυτού του φαινομένου ο προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητών και οι προσεκτικοί χειρισμοί κατά την διάρκεια των πειραμάτων είναι αναγκαίοι για την αποφυγή μολύνσεων και κατ' έκταση την παραλαβή εσφαλμένων μετρήσεων φθορισμού.

Η PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Στα πλεονεκτήματά της ανήκουν η ικανότητά της να μετρά τις συγκεντρώσεις των νουκλεϊνικών οξέων σε ένα άπειρο δυναμικό εύρος, η υψηλή ευαισθησία της και η ικανότητα να επεξεργάζεται πολλά δείγματα ταυτόχρονα (Καλλονιάτη, 2016). Επιπλέον, η PCR πραγματικού χρόνου επιτρέπει την ανίχνευση των προϊόντων της PCR κατά τα πρώτα στάδια της αντίδρασης. Αυτή η ικανότητά της να μετρά την κινητική της αντίδρασης σε αυτά τα αρχικά στάδια της PCR παρέχει ένα συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι της παραδοσιακής PCR που περιγράφηκε νωρίτερα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η iTaq Fast SYBR GreenI Supermix με ROX (BioRad). Η ROX χρησιμοποιείται ως χρωστική αναφοράς για την εξομάλυνση μικροδιαφορών μεταξύ των διαφορετικών αντιδράσεων. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων qRT-PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Mx3005P (Stratagene). Για μία τυπική αντίδραση τελικού όγκου 10 μL αναμειγνύονται: μήτρα cDNA 1 μL , iTaq Fast SYBR GreenI Supermix με ROX (BioRad) 5 μL , Εκκινητής 1 (0,5 μM) 2 μL , Εκκινητής 2 (0,5 μM) 2 μL .

Η αντίδραση ξεκινά με αρχική ενεργοποίηση της πολυμεράσης στους 95°C για 10 λεπτά, ακολουθούν 40 κύκλοι με το στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα και ένα στάδιο υβριδισμού και επιμήκυνσης στου 60°C για 1 λεπτό. Στο τέλος κάθε κύκλου λαμβάνονται οι τιμές απορρόφησης για τις χρωστικές SYBR Green και ROX. Όταν ολοκληρωθούν οι 40 κύκλοι τα ενισχυμένα τμήματα αποδιατάσσονται σταδιακά με αύξηση της θερμοκρασίας κάθε 30 δευτερόλεπτα κατά 0,5°C από τους 60°C έως τους 95°C και λαμβάνεται η καμπύλη τήξης του καθενός με σκοπό τον έλεγχο της εξειδίκευσης των εκκινητών. Όταν ενισχύεται ένα μόνο προϊόν η καμπύλη έχει μια κορυφή. Επιπλέον τα δείγματα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης 4 % (w/v) για την επιβεβαίωση της παρουσίας μοναδικού προϊόντος και κατά συνέπεια της καταλληλότητας των εκκινητών. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τη χρήση του εξειδικευμένου λογισμικού Primer Express (Applied Biosystems) και το μέγεθος της ενισχυόμενης περιοχής κυμαίνεται από 70 έως 150 ζεύγη βάσεων.

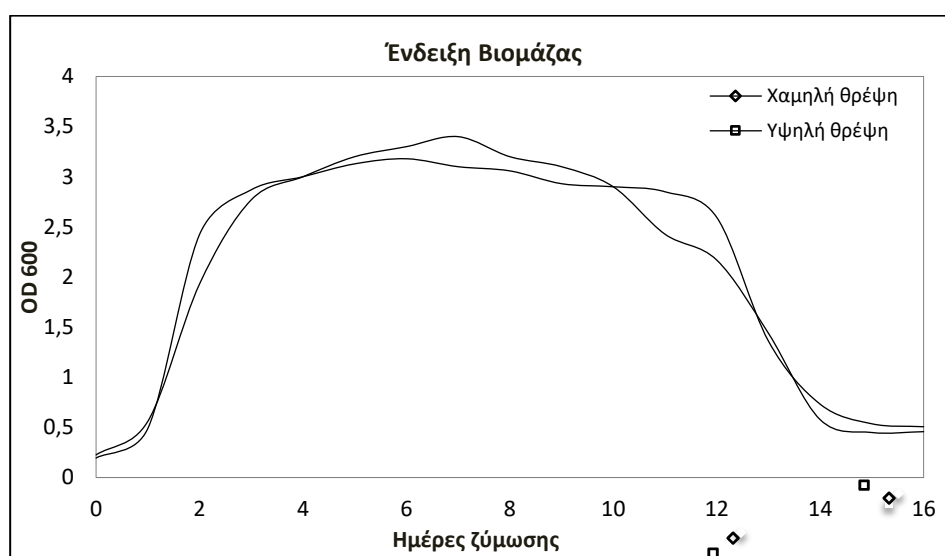
Για την κανονικοποίηση μικρών διαφορών μεταξύ των ποσοτήτων των μητρών του cDNA χρησιμοποιούνται ως εσωτερικοί μάρτυρες τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς της ουβικιτίνης του *S. cerevisiae*. Για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιείται μια τροποποιημένη μορφή της μεθόδου σύγκρισης των κύκλων όπου εμφανίζεται το κατώφλι (threshold)

της αντίδρασης PCR . Αναλυτικότερα, τα σχετικά επίπεδα των μεταγράφων του υπό μελέτη γονιδίου (X) υπολογίζονται ως ένα ποσοστό των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς της ουβικιτίνης (U), και συγκεκριμένα, ως $(1+E)^{-\Delta Ct}$, όπου το ΔCt ισούται με $Ct^X - Ct^U$ και E είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR (PCR efficiency). Η E για κάθε ένα από τα γονίδια που ενισχύονται υπολογίζεται από το λογισμικό LinRegPCR (Ramakers et al., 2003), το οποίο εφαρμόζει τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης στο λογάριθμο των τιμών του φθορισμού που δίνονται ανά κύκλο της αντίδρασης. Όλες οι αντιδράσεις qRT-PCR πραγματοποιούνται σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ένδειξη βιομάζας

Η ένδειξη βιομάζας αφορά την ποσότητα των μικροοργανισμών, κυρίως του στελέχους ζυμομύκητα που εμβολιάστηκε το γλεύκος, καθώς βρίσκεται σε μεγαλύτερο πληθυσμό και επικρατεί των υπολοίπων μικροοργανισμών. Η βιομάζα επηρεάζει τη ταχύτητα ζύμωσης και την ολοκλήρωση της. Όσο μεγαλύτερος ο πληθυσμός, τόσο μεγαλύτερος ο ρυθμός ζύμωσης των σακχάρων.



Εικόνα 13: Πορεία ανάπτυξης ζυμομύκητα κατά τη διάρκεια ζύμωσης με υψηλό και χαμηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης

Από το διάγραμμα φαίνονται όλες οι φάσεις ανάπτυξης του *Saccharomyces cerevisiae*, λανθάνουσα, εκθετική, στατική και φάση θανάτου και η διάρκεια τους είναι όμοια και για τις δύο περιπτώσεις θρέψης. Η φάση υστέρησης παρατηρείται το πρώτο εικοσιτετράωρο της ζύμωσης και ακολουθεί η εκθετική αύξηση πληθυσμού μέχρι την 3^η ημέρα. Παρατηρείται μεγάλη στατική φάση που διαρκεί συνολικά 7 ημέρες για την περίπτωση της υψηλής θρέψης αζώτου και 9 ημέρες για την ζύμωση με χαμηλή συγκέντρωση αζώτου. Για αυτές τις ημέρες ο ρυθμός αύξησης είναι ίδιος με το ρυθμό αυτόλυσης των κυττάρων της ζύμης. Τέλος ακολουθεί η φάση θανάτου για τις επόμενες 5 ημέρες της ζύμωσης.

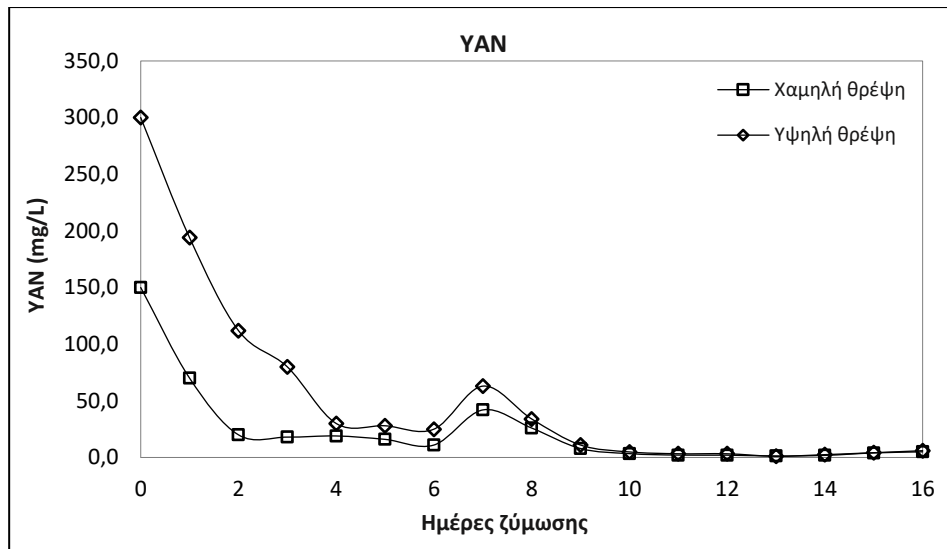
Όσον αφορά τη θρέψη αζώτου, φαίνεται ότι υψηλότερες τιμές βιομάζας παρουσίασε η ζύμωση με την υψηλή θρέψη αζώτου ειδικότερα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (στατική φάση). Η χαμηλή προσθήκη αζώτου σχετίζεται με μεγαλύτερες τιμές ένδειξης βιομάζας σε σχέση με την υψηλή στην αρχή και στο τέλος της ζύμωσης. Η αυξημένη απόδοση βιομάζας ζυμομύκητα ως απόκριση στην

προσθήκη αζώτου στη στατική φάση είναι σύμφωνη με προηγούμενα αποτελέσματα που δείχνουν ότι η προσθήκη αμμωνιακού αζώτου ή αμινοξέων οδήγησε σε αυξημένη ανάπτυξη ζυμομύκητα και ρυθμό ζύμωσης (Vilanova et al. 2007, Torrea et al. 2011).

3.2. Αφομοιώσιμο άζωτο (YAN)

Το ολικό αφομοιώσιμο άζωτο προκύπτει από το άθροισμα του αμμωνιακού και οργανικού αζώτου. Το αμμωνιακό άζωτο αποτελεί την πιο αφομοιώσιμη και επομένως επιθυμητή μορφή αζώτου από τους ζυμομύκητες. Κατά την έναρξη της ζύμωσης έγινε προσθήκη μόνο οργανικού αζώτου. Η θρέψη με αμμωνιακό άζωτο (DAP) πραγματοποιήθηκε την 3η μέρα της αλκοολικής ζύμωσης. Στην αρχή της ζύμωσης καθώς και στο 1/3 αυτής πραγματοποιήθηκε θρέψη οργανικού αζώτου. Οι ζυμομύκητες χρησιμοποιούν άζωτο και σχηματίζουν αμινοξέα, τα οποία συγκαταλέγονται στο οργανικό άζωτο. Τα αποτελέσματα για το αμμωνιακό άζωτο προκύπτουν με βάση την γραμμική εξίσωση της πρότυπης καμπύλης ($y=0,0215x-0,0007$), όπου x η ποσότητα του αμμωνιακού αζώτου mg/L και y η απορρόφηση. Τα αποτελέσματα για το οργανικό άζωτο προκύπτουν με βάση την γραμμική εξίσωση της πρότυπης καμπύλης ($y=0,0066x+0,0159$), όπου x η ποσότητα του οργανικού αζώτου mg/L και y η απορρόφηση. Στο διάγραμμα φαίνεται το άθροισμά τους για κάθε μέρα της ζύμωσης που αντιστοιχεί στο ολικό αφομοιώσιμο άζωτο (YAN). Όσο μεγαλύτερη η κλίση των ευθειών, τόσο πιο γρήγορα πραγματοποιείται η κατανάλωση.

Με βάση το διάγραμμα, την 1^η μέρα φαίνεται ότι λόγω της προσθήκης οργανικού αζώτου, η συνολική συγκέντρωση αφομοιώσιμου αζώτου στο γλεύκος είναι για την περίπτωση της υψηλής θρέψης 300 mg/L YAN και για τη περίπτωση της χαμηλής θρέψης 150 mg/L YAN. Η κατανάλωση του αζώτου είναι ταχύτερη στη περίπτωση της χαμηλής θρέψης όπου από τη 2^η μέρα ζύμωσης έφτασε στα 20 mg/L YAN. Στο 1/3 της ζύμωσης, την 6^η μέρα πραγματοποιήθηκε δεύτερη αζωτούχα θρέψη και προκύπτει, αύξηση του YAN και για τις δύο περιπτώσεις ζύμωσης (63 mg/L και 42 mg/L για το υψηλό και χαμηλό επίπεδο θρέψης αντίστοιχα). Από την 8^η μέρα και μετά ακολουθείται ίδια πορεία κατανάλωσης αζώτου για όλες τις ζυμώσεις, ανεξαρτήτου επιπέδου θρέψης, το οποίο ουσιαστικά καταναλώνεται πλήρως μετά την 10^η ημέρα ζύμωσης, χωρίς να εντοπίζονται ουσιαστικές διαφορές.



Εικόνα 14: Πορεία YAN κατά τη διάρκεια ζύμωσης με υψηλό και χαμηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης.

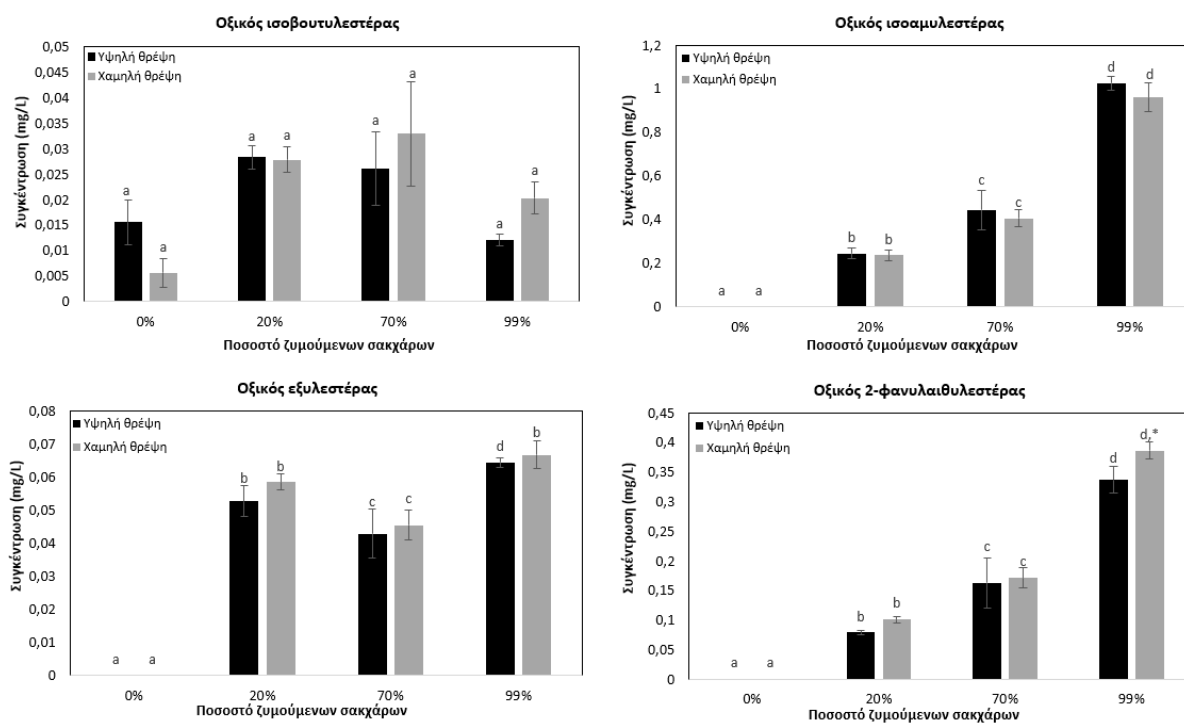
3.3. Πτητικές ενώσεις

Η επίδραση της περιεκτικότητας αζώτου στο πτητικό προφίλ των ζυμώσεων αξιολογήθηκε με ανάλυση των πτητικών μεταβολιτών μέσω GC-MS όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Λήφθηκαν δείγματα i) τη στιγμή του εμβολιασμού (0% ζυμούμενων σακχάρων), ii) μετά από 48 ώρες (20% ζυμούμενων σακχάρων), iii) όταν τα δύο τρίτα των σακχάρων είχαν εξαντληθεί (70% ζυμούμενων σακχάρων) και iv) στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης (≤ 2 g/L υπολειμματικά σάκχαρα, 99% ζυμούμενων σακχάρων). Αναλύθηκαν συνολικά 15 μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένων τεσσάρων ανώτερων αλκοολών, επτά εστέρων, δύο πτητικών λιπαρών οξέων και δύο τερπενολών.

3.3.1. Εστέρες

Τόσο οι οξικοί εστέρες όσο και οι αιθυλεστέρες, είναι σημαντικές πτητικές ενώσεις του αρώματος των οίνων που συμβάλλουν στα φρουτώδη αρώματα (Swiegers et al. 2005). Οι οξικοί εστέρες που ανιχνεύθηκαν είναι ο οξικός ισοβουτυλεστέρας, οξικός ισοαμυλεστέρας, ο οξικός εξύλεστέρας και οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας. Όπως προκύπτει από την Εικόνα 15 ο οξικός ισοβουτυλεστέρας, ο οξικός ισοαμυλεστέρας και ο οξικός εξυλεστέρας είχαν σχετική μικρή ανταπόκριση στη προσθήκη αζώτου στο γλεύκος, χωρίς να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ζύμωσης με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Αντίθετα, η συγκέντρωση του οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα είναι μεγαλύτερη ($p < 0,05$) στη περίπτωση της χαμηλής αζωτούχας θρέψης (150 mg/L

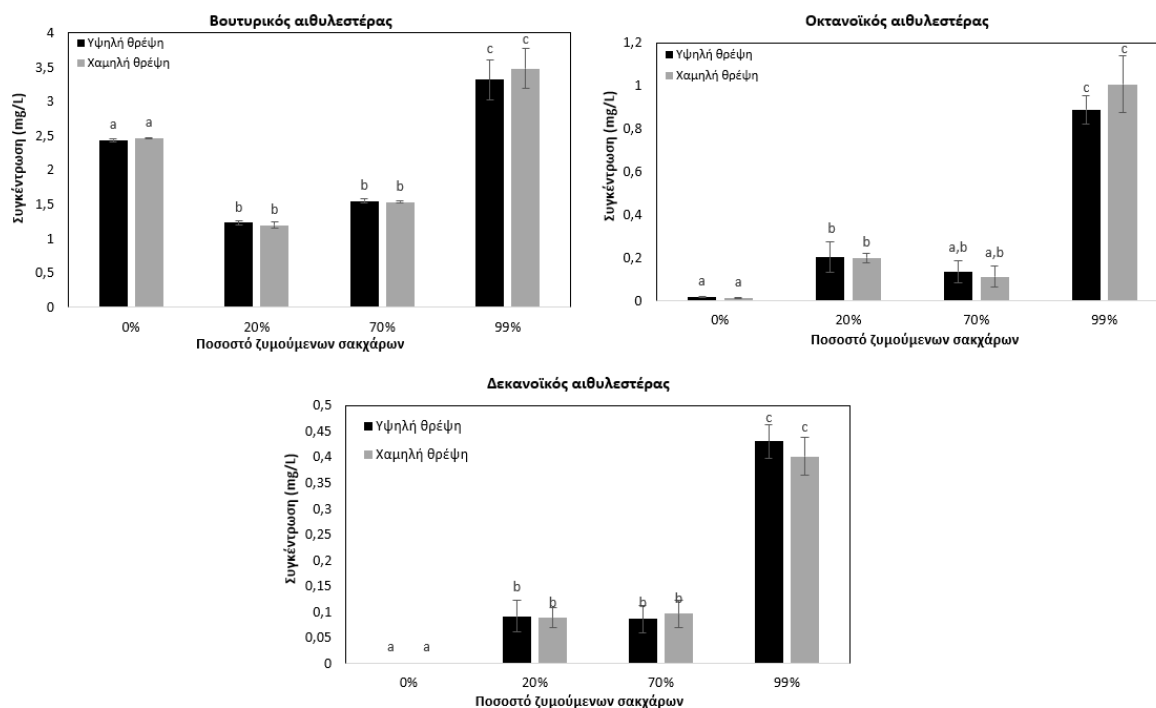
YAN) σε σύγκριση με εκείνη της υψηλής. Η μη γραμμική απόκριση του οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα στη συγκέντρωση αζώτου αποδείχθηκε επίσης από τους Torrea et al. (2011), ενώ η περιορισμένη παραγωγή οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα σε ζυμώσεις με πολύ υψηλά επίπεδα YAN υποδείχθηκε από τους Martínez-Moreno et al. (2014). Η κινητική των οξικών εστέρων φαίνεται να είναι παρόμοια και για τα δύο επίπεδα αζώτου. Ο οξικός ισοβουτυλεστέρας και οξικός εξυλεστέρας σχηματίστηκαν κυρίως μέχρι την κατανάλωση του 20% των σακχάρων. Αντίθετα, η συγκέντρωση του οξικού ισοαμυλεστέρα και οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα αυξανόταν σημαντικά μέχρι το τέλος των ζυμώσεων. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στην έκφραση των γονιδίων *ATF1* και *ATF2* και για τα δύο σχήματα ζύμωσης (υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση αζώτου).



Εικόνα 15: Οξικοί εστέρες στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).

Οι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων που προσδιορίστηκαν είναι ο βουτυρικός αιθυλεστέρας, ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας και ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (Εικόνα 16). Ο βουτυρικός αιθυλεστέρας και ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας μειώθηκαν με τη

συμπλήρωση αζώτου στα 300 mg/L YAN, αν και δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των αιθυλεστέρων σε σχέση με το επίπεδο αζωτούχας θρέψης των ζυμώσεων. Επιπλέον, και για τις δύο συνθήκες αζώτου ο σχηματισμός των αιθυλεστέρων πραγματοποιήθηκε κυρίως μετά την κατανάλωση του 70% των σακχάρων αφού ο σχηματισμός τους αναστέλλεται από την παρουσία οξυγόνου (Jackson, 1994).

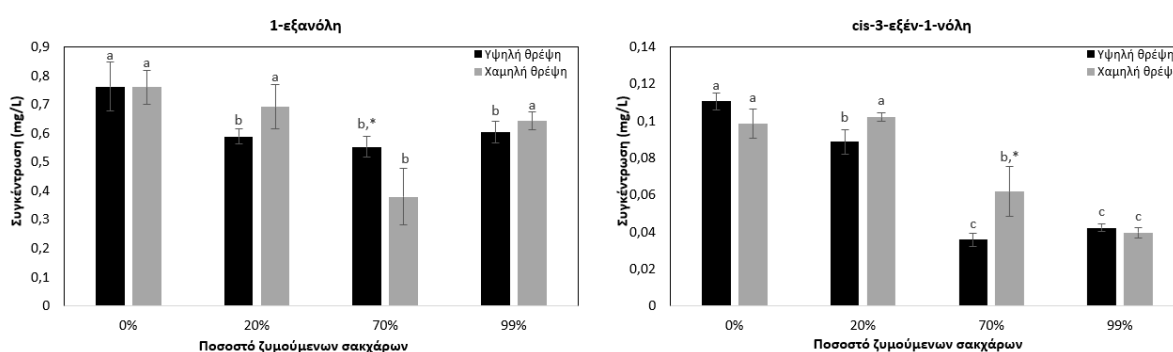


Εικόνα 16: Αιθυλεστέρες στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης.

Η μικρή επίδραση της προσθήκης αζώτου στην παραγωγή αιθυλεστέρων είναι πιθανό να οφείλεται στην απουσία αλληλεπίδρασης μεταξύ των μεταβολικών οδών της σύνθεσης αιθυλεστέρων και του μεταβολισμού του αζώτου (Seguinot et al., 2018). Ωστόσο, η διαθεσιμότητα αζώτου, η οποία προκαλεί αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου, θα μπορούσε να τροποποιήσει το ενδοκυτταρικό επίπεδο των προδρόμων ουσιών, ιδιαίτερα του ακετυλο-CoA και περαιτέρω παράγωγα ακυλο-CoA (Bloem et al., 2016) ή τη σύνθεση λιπιδίων λόγω της αύξησης της βιομάζας μετά την προσθήκη αζώτου (Daum et al., 1998).

3.3.2. Ανώτερες αλκοόλες

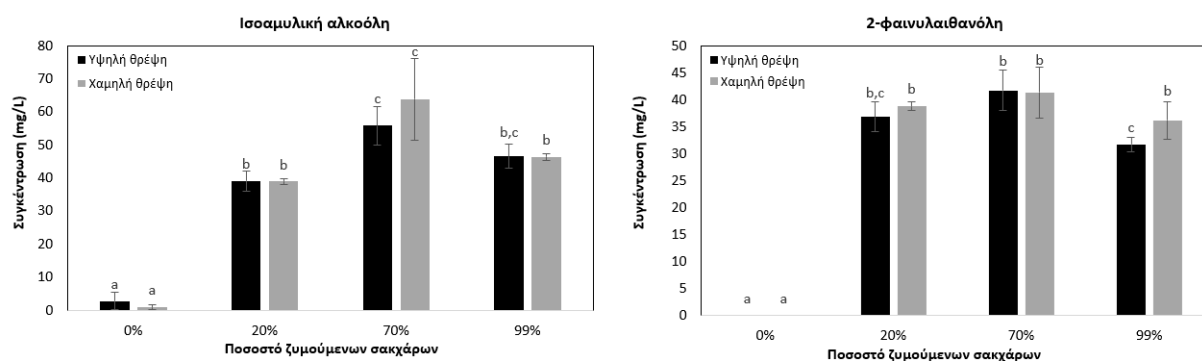
Οι ανώτερες αλκοόλες είναι οι κύριες ενώσεις του αρώματος που προέρχονται από το μεταβολισμό του ζυμομύκητα (Hazelwood et al., 2008). Με βάση τα αποτελέσματά της παρούσας εργασίας, η σύνθεση των περισσότερων από τις ανώτερες αλκοόλες πραγματοποιήθηκε μέχρι το 70% των ζυμωμένων σακχάρων και για τις δύο περιπτώσεις αζωτούχας θρέψης. Στην Εικόνα 18 φαίνεται ότι η ισοαμυλική αλκοόλη και η 2-φαινυλαιθανόλη παρουσίασαν τη μέγιστη συγκέντρωσή τους στο 70% των ζυμωμένων σακχάρων και ακολούθησε μια μείωση της συγκέντρωσής τους στο τέλος των ζυμώσεων. Οι συγκεντρώσεις της 1-εξανόλης και της cis-3-εξεν-1-όλης μειώθηκαν κατά τη διάρκεια και των δύο περιπτώσεων ζύμωσης μέχρι να καταναλωθεί το 70% των ζυμωμένων σακχάρων (Εικόνα 17). Αυτό πιθανότατα αντανακλά μια διαφορετική διαχείριση των διαθέσιμων πόρων αζώτου ανάλογα με το χρονοδιάγραμμα της προσθήκης.



Εικόνα 17: C₆ αλκοόλες στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).

Επιπλέον, στατιστικά σημαντικές διαφορές, μεταξύ των δύο σχημάτων ζύμωσης (υψηλή και χαμηλή θρέψη αζώτου), βρέθηκαν για τις συγκεντρώσεις της 1-εξανόλης και cis-3-εξεν-1-όλης στα 2/3 της αλκοολικής ζύμωσης (70% των ζυμωμένων σακχάρων). Συγκεκριμένα, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του επιπέδου αζώτου και του χρόνου που σημαίνει ότι η επίδραση του επιπέδου αζώτου στις συγκεντρώσεις της 1-εξανόλης και της cis-3-εξεν-1-όλης εξαρτάται από το χρόνο. Για παράδειγμα, στο 20% και στο 99% των ζυμωμένων σακχάρων, το χαμηλό επίπεδο

αζώτου οδηγεί σε υψηλότερη τιμή 1-εξανόλης σε σύγκριση με το υψηλό επίπεδο αζώτου, ενώ το αντίθετο παρατηρείται σε ποσοστό 70%.



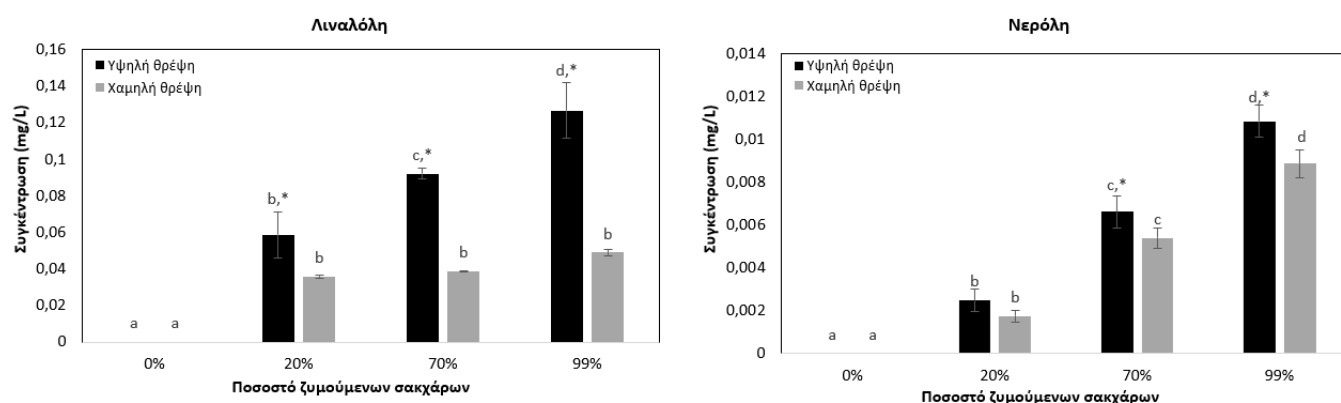
Εικόνα 18: Ισοαμυλική αλκοόλη και 2-φαινυλαιθανόλη στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).

Γενικά, οι συγκεντρώσεις όλων των αλκοολών στους τελικούς οίνους ήταν παρόμοιες και στις δύο περιπτώσεις αζωτούχας θρέψης, υποδεικνύοντας ότι η επιπλέον συμπλήρωση του γλεύκους με άζωτο έχει μέτρια επίδραση στην παραγωγή των ανώτερων αλκοολών. Προηγούμενες μελέτες έχουν συσχετίσει τον τύπο αζώτου με τη παραγωγή ανώτερων αλκοολών (Torrea et al., 2011; Vilanova et al., 2012; Liu et al., 2018). Για παράδειγμα, η προσθήκη αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας σε ένα συνθετικό γλεύκος κατά τη ζύμωση με *S. cerevisiae* αύξησε την παραγωγή ανώτερων αλκοολών (Liu et al., 2018). Ωστόσο, οι Vilanova et al. (2012) που μελέτησαν την επίδραση της προσθήκης αμμωνιακού αζώτου στις πτητικές ενώσεις των οίνων Albariño ανέφεραν ότι η παραγωγή ανώτερων αλκοολών σχετίζεται με μέτριες συγκεντρώσεις αζώτου (350 mg/L YAN).

3.3.3 Τερπενόλες

Τα τερπενοειδή βρίσκονται στα γλεύκη τόσο σε ελεύθερη όσο και σε δεσμευμένη μορφή, με τη δεύτερη να είναι πιο διαδεδομένη (Swiegers and Pretorius, 2005). Τα ένζυμα γλυκοσιδάσης του ζυμομύκητα απελευθερώνουν τις πτητικές μορφές κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Εικόνα 9) (Gunata et al., 1988). Η ενζυμική απελευθέρωση μονοτερπενίων είναι μια διαδικασία ενός ή δύο σταδίων, ανάλογα με το σάκχαρο που είναι δεσμευμένο στον πρόδρομο γλυκοζίτη (δηλαδή, έναν μονο- ή

δισακχαρίτη) (Gunata et al., 1988). Τα στελέχη ζυμομυκήτων που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Exg1p παράγουν αυξημένα επίπεδα τερπενίων τόσο στα γλεύκη σταφυλιών όσο και στους οίνους (Gil et al., 2005).



Εικόνα 19: Λιναλόλη και Νερόλη στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).

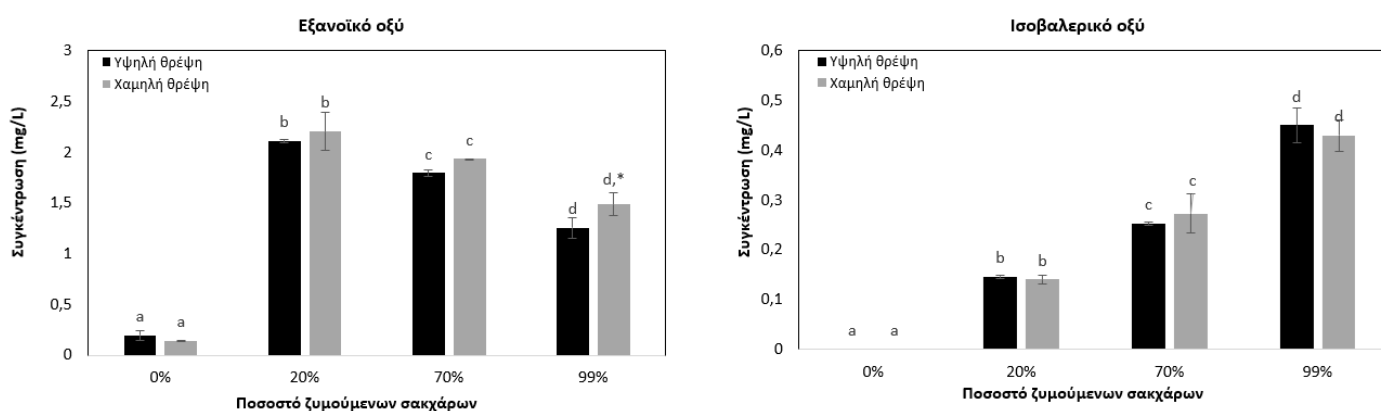
Η συγκέντρωση των τερπενίων αυξήθηκε σημαντικά ($p < 0,05$) στην υψηλή θρέψη αζώτου σε σύγκριση με τις ζυμώσεις με χαμηλά επίπεδα αζωτούχας θρέψης (150 mg/L). Ιδιαίτερα η συγκέντρωση της λιναλόλης κυμάνθηκε σε σχεδόν διπλάσια επίπεδα στην περίπτωση της υψηλής θρέψης αζώτου. Επιπλέον, η νερόλη παρουσίασε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στη περίπτωση της υψηλής περιεκτικότητας σε άζωτο ($p < 0,05$), υποδηλώνοντας ότι η αύξηση της συγκέντρωσης YAN στο γλεύκος είναι ευνοϊκή για την απελευθέρωση των μονοτερπενολών. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, η προσθήκη αζώτου είχε σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση των τερπενικών ενώσεων (Carrau et al., 2010; Vilanova et al., 2012). Τα αποτελέσματα των Vilanova et al. (2012) έδειξαν υψηλότερες συγκεντρώσεις λιναλοόλης, α -τερπινεόλης και γερανιόλης σε συγκεντρώσεις DAP 350 mg N/L. Η θετική συσχέτιση των μονοτερπενολών με την περιεκτικότητα σε άζωτο υποδείχθηκε επίσης από προηγούμενες έρευνες (Carrau et al., 2008; Carrau et al., 2010).

Όσον αφορά την κινητική της απελευθέρωσης των τερπενίων, με εξαίρεση τη λιναλοόλη στην περίπτωση της χαμηλής θρέψης η συγκέντρωση της οποίας παραμένει σταθερή στο πρώτο στάδιο της ζύμωσης ακολουθούμενη από μία μικρή αύξηση, η συγκέντρωση της λιναλοόλης και της νεροόλης φαίνεται να αυξάνεται

μέχρι το τέλος των ζυμώσεων με μέγιστο ρυθμό αύξησης μεταξύ 70% και 99% των ζυμωμένων σακχάρων.

3.3.4 Πτητικά οξέα

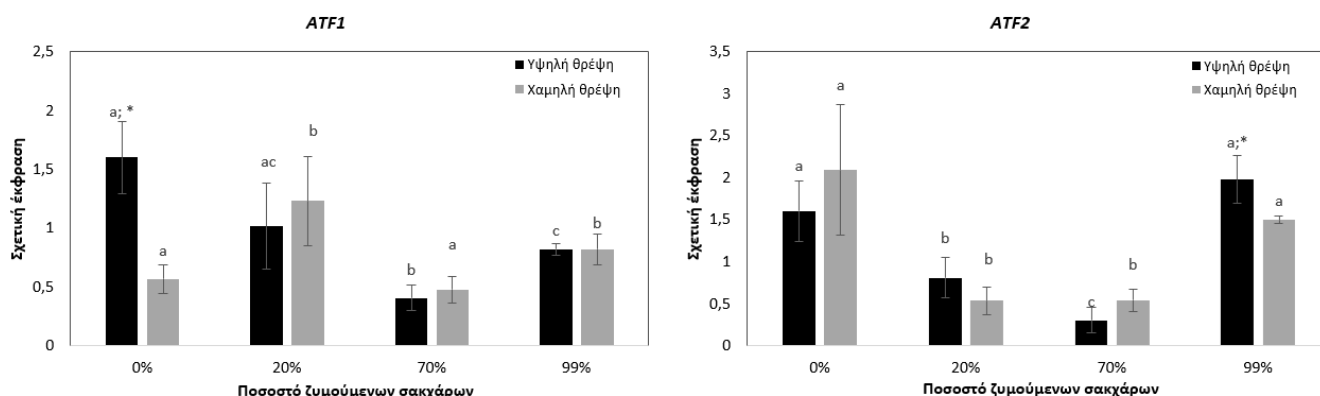
Η συγκέντρωση των πτητικών οξέων μειώθηκε με αύξηση της περιεκτικότητας σε άζωτο. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του εξανοϊκού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p < 0,05$) στη περίπτωση της χαμηλής θρέψης αζώτου. Σύμφωνα με προηγούμενα ευρήματα, η προσθήκη αζώτου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των οξέων διακλαδισμένης και μέσης αλυσίδας (Ugliano et al., 2008; Vilanova et al., 2007; Torrea et al., 2011). Σχετικά με τη κινητική της παραγωγής εξανοϊκού οξέος, παρουσίασε τη μέγιστη συγκέντρωση έως ότου καταναλώθηκε το 20% των αρχικών σακχάρων και στη συνέχεια μειώθηκε. Ο σχηματισμός του ισοβαλερικού οξέος πραγματοποιήθηκε σε όλη τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ανεξαρτήτου επιπέδου θρέψης και είχε όμοιες τελικές συγκεντρώσεις σε όλα τα δείγματα.



Εικόνα 20: Εξανοϊκό και ισοβαλερικό οξύ στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας των αλκοολικών ζυμώσεων με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).

3.4. Σχετική έκφραση γονιδίων

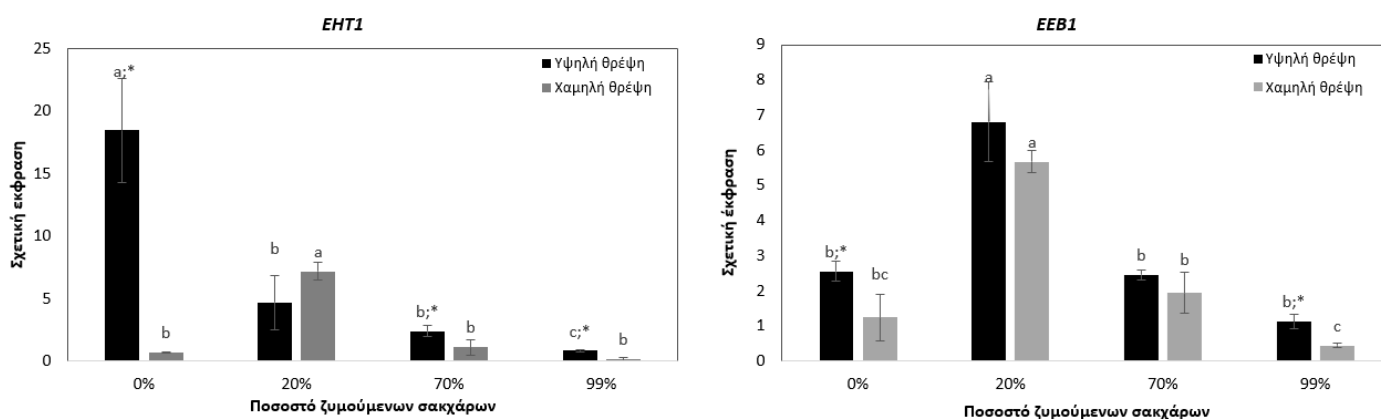
Προκειμένου να μελετηθεί η μεταβολική απόκριση του στελέχους *S. cerevisiae* SafOeno™ CK S102 κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, παρουσιάστηκε το μεταγραφικό προφίλ γονιδίων του ζυμομύκητα που εμπλέκονται στην παραγωγή οξικών εστέρων και αιθυλεστέρων και στην απελευθέρωση τερπενίων. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του *S. cerevisiae* που εμπλέκονται στην παραγωγή εστέρων και τερπενίων στα διαφορετικά χρονικά σημεία ζύμωσης (0% ζυμούμενων σακχάρων-εμβολιασμός, 20% ζυμούμενων σακχάρων - 48h μετά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, 70% ζυμούμενων σακχάρων - 2/3 της αλκοολικής ζύμωσης, 99% ζυμούμενων σακχάρων - τέλος ζύμωσης) για κάθε περίπτωση θρέψης παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 21: Σχετική έκφραση των γονιδίων *ATF1*, *ATF2* που εμπλέκονται στο σχηματισμό οξικών εστέρων κατά την αλκοολική ζύμωση με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε τέσσερα σημεία της αλκοολικής ζύμωσης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, *LSD test*) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, *LSD test*).

Σχετικά με τη βιοσύνθεση των οξικών εστέρων, η έκφραση δύο αλκοολο-ακετυλοτρανσφερασών, *ATF1* και *ATF2*, αναλύθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης κάτω από διαφορετικά επίπεδα θρέψης αζώτου. Στη περίπτωση της υψηλής αζωτούχας θρέψης, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *ATF1* ήταν υψηλότερα στο 0% των ζυμούμενων σακχάρων και ακολούθησε σταδιακή μείωση κατά την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης. Στη περίπτωση της ζύμωσης με χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο, τα επίπεδα mRNA του *ATF1* ήταν ελαφρώς υψηλότερα στο 20% των ζυμούμενων σακχάρων σε σύγκριση με τα άλλα χρονικά σημεία ζύμωσης. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του *ATF1* στον εμβολιασμό (0% των ζυμούμενων σακχάρων) ήταν

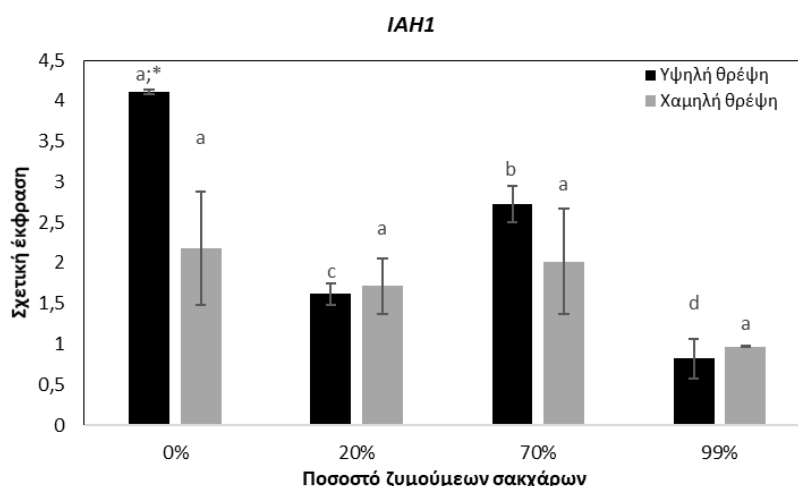
τρεις φορές υψηλότερα στη ζύμωση με υψηλή συγκέντρωση αζώτου σε σύγκριση με το αντίστοιχο χρονικό σημείο ζύμωσης κατά τη χαμηλή περίπτωση αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$). Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ATF2* ήταν υψηλότερα στο 0% και στο 99% των ζυμούμενων σακχάρων σε σύγκριση με τα άλλα δύο χρονικά σημεία δειγματοληψίας και στις δύο συνθήκες αζώτου. Επιπλέον, η διαφορά της ποσότητας αφομοιώσιμου αζώτου των ζυμώσεων δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα μεταγραφής mRNA του γονιδίου *ATF2* κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το γονίδιο *ATF2* παίζει μικρότερο ρόλο στην παραγωγή οξικών εστέρων κατά τη ζύμωση σε σύγκριση με το *ATF1* (Lilly et al. 2006a; Holt et al., 2019). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η επίδραση της προσθήκης αζωτούχας θρέψης κατά την αλκοολική ζύμωση παρουσιάζεται στο κύριο ένζυμο της ομάδας των αλκοολο-ακετυλοτρανσφερασών (*Atf1p*) που καταλύει τη μετατροπή ανώτερων αλκοολών σε οξικούς εστέρες (Verstrepen et al., 2003; Seguinot et al., 2018).



Εικόνα 22: Σχετική έκφραση των γονιδίων *EEB1*, *EHT1* που εμπλέκονται στο σχηματισμό αιθυλεστέρων κατά την αλκοολική ζύμωση με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε τέσσερα σημεία της αλκοολικής ζύμωσης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, *LSD test*) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, *LSD test*).

Όσον αφορά τη βιοσύνθεση των αιθυλεστέρων, το γονίδιο *EHT1* που κωδικοποιεί μια ακυλοτρανσφεράση/εστεράση αιθανόλης έδειξε σημαντικά ενισχυμένα επίπεδα έκφρασης στο 0% των ζυμούμενων σακχάρων για την υψηλή περίπτωση θρέψης αζώτου σε σύγκριση με τη ζύμωση υπό χαμηλή αζωτούχα θρέψη. Συγκεκριμένα, η σχετική έκφραση του γονιδίου *EHT1* στο 0% της ζύμωσης ήταν 27

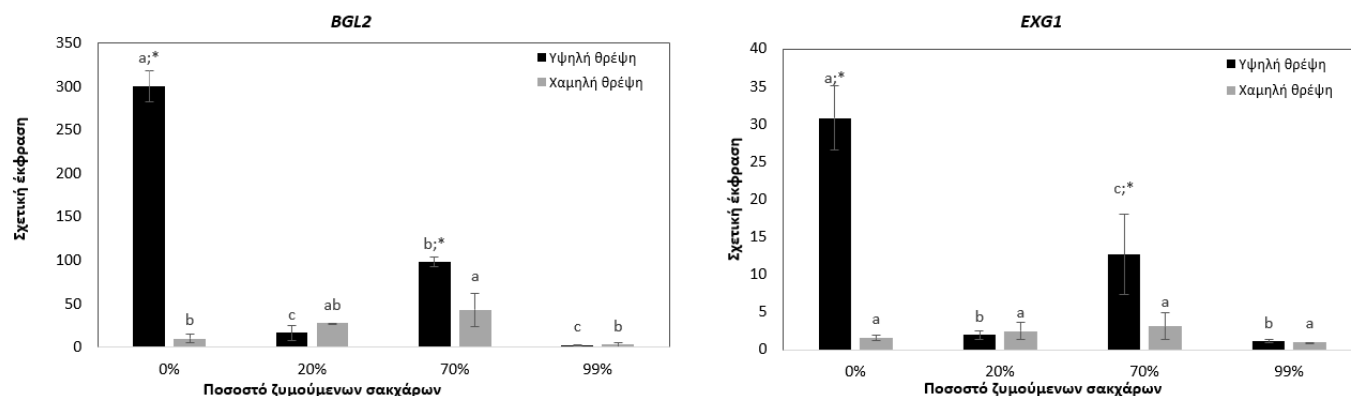
φορές υψηλότερη στη ζύμωση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αζώτου. Επιπλέον, τα επίπεδα μεταγραφής mRNA στο 0% της ζύμωσης ήταν 4, 8 και 22 φορές υψηλότερα από ό,τι στο 20%, 70% και 99% της ζύμωσης, αντίστοιχα, για την υψηλή προσθήκη οργανικού αζώτου. Για τη περίπτωση της χαμηλής αζωτούχας θρέψης, μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου *EHT1* παρουσιάστηκε στο 20% των ζυμούμενων σακχάρων σε σύγκριση με όλα τα άλλα σημεία ζύμωσης που έδειξαν παρόμοια επίπεδα σχετικής έκφρασης. Τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου *EEB1* που κωδικοποιεί μια ακυλοτρανσφεράση/εστεράση αιθανόλης ήταν υψηλότερα στο 20% της ζύμωσης και για τις δύο συνθήκες αζώτου. Επιπλέον, τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *EEB1* ήταν σημαντικά υψηλότερα στο 0% και στο 99% των ζυμούμενων σακχάρων στην περίπτωση της υψηλής θρέψης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα χρονικά σημεία της ζύμωσης με χαμηλή θρέψη αζώτου. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα δεν υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της σχετικής έκφρασης των *EHT1* και *EEB1* με τις τελικές συγκεντρώσεις του βουτυρικού αιθυλεστέρα, του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα και του δεκανοϊκού αιθυλεστέρα. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι ο μηχανισμός σύνθεσης των αιθυλεστέρων είναι πιο περίπλοκος από τους οξικούς εστέρες (Saerens et al., 2006; Liu et al., 2020). Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη (Saerens et al., 2006) τα επίπεδα υποστρώματος είναι ο περιοριστικός παράγοντας για τη σύνθεση αιθυλεστέρων λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας. Λόγω της απουσίας λιπαρών οξέων, η υπερέκφραση του *EEB1* δεν είναι ικανή να αυξήσει την παραγωγή αιθυλεστέρων. Ωστόσο, οι Liu et al. (2020) απέκλεισαν αυτή την πιθανότητα και συμπέραναν ότι μπορεί να υπάρχουν άλλα γονίδια, εκτός από το *EEB1*, υπεύθυνα για τη δημιουργία ή την υδρόλυση αιθυλεστέρων. Ο λεπτομερής μηχανισμός της σύνθεσης αιθυλεστέρων πρέπει να διερευνηθεί εκτενώς.



Εικόνα 23: Σχετική έκφραση του γονιδίου IAH1, που σχετίζεται με την υδρόλυση εστέρων κατά την αλκοολική ζύμωση με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε τέσσερα σημεία της αλκοολικής ζύμωσης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος () υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).*

Το γονίδιο *IAH1* που κωδικοποιεί μια εστεράση οξικού εστέρα παρουσίασε τα υψηλότερα επίπεδα μεταγραφής στο 0% των ζυμούμεων σακχάρων για τη συνθήκη της υψηλής αζωτούχας θρέψης και το επίπεδο έκφρασης ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με το αντίστοιχο χρονικό σημείο ζύμωσης στη συνθήκη της χαμηλής θρέψης αζώτου ($p < 0,05$). Η σχετική έκφρασή του συγκεκριμένου γονιδίου μειώθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με υψηλή προσθήκη αζώτου σε ποσοστό 60%, 34% και 80% στο 20%, 70% και 99% των ζυμούμεων σακχάρων, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους Lilly et al. (2006) το γονίδιο *IAH1* κωδικοποιεί μια εστεράση που υδρολύει τον οξικό ισοαμυλεστέρα. Σε αυτή τη μελέτη, τα υψηλότερα επίπεδα μεταγραφής αυτού του γονιδίου υπό υψηλή αζωτούχα θρέψη μπορεί εν μέρει να εξηγούν την μικρή αύξηση του οξικού ισοβουτυλεστέρα, του οξικού ισοαμυλεστέρα και του οξικού εξυλεστέρα και τις μειωμένες τιμές του οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα στους οίνους που παράγονται από τις ζυμώσεις με την υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο, λόγω της αυξημένης υδρόλυσης των οξικών εστέρων που προκαλείται από την αυξημένη έκφραση του *IAH1*. Σε προηγούμενη έρευνα, η υπερέκφραση του γονιδίου *IAH1* οδήγησε σε μείωση του οξικού εξυλεστέρα, του οξικού ισοαμυλεστέρα και του οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα (Lilly et al., 2006). Συνεπώς, φαίνεται ότι η ισορροπία μεταξύ της δράσης της των ενζύμων αλκοολο-ακετυλτρανσφεράσης και της

εστεράσης καθορίζει το τελικό επίπεδο των οξικών εστέρων που παράγονται από τους ζυμομύκητες (Liu et al., 2018; Holt et al., 2019).



Εικόνα 24: Σχετική έκφραση των γονιδίων *BGL2* και *EXG1* που σχετίζεται με την απελευθέρωση τερπενίων κατά την αλκοολική ζύμωση με χαμηλό και υψηλό επίπεδο αζωτούχας θρέψης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε τέσσερα σημεία της αλκοολικής ζύμωσης. Οι μπάρες δείχνουν τη \pm τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη πορεία ζύμωσης ($p < 0,05$, LSD test) για κάθε επίπεδο θρέψης. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των επιπέδων αζωτούχας θρέψης ($p < 0,05$, LSD test).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24 η απελευθέρωση των τερπενοειδών ενισχύθηκε σε πολλά χρονικά σημεία στη ζύμωση με την υψηλή προσθήκη αζώτου. Το γονίδιο *BGL2* που κωδικοποιεί μια β-γλυκοσιδάση η οποία εμπλέκεται στην υδρόλυση των β-D γλυκοσιδίων των πτητικών ενώσεων είχε τα υψηλότερα επίπεδα μεταγραφής στην αρχή της ζύμωσης (0% των ζυμούμενων σακχάρων – εμβολιασμός) με υψηλή συγκέντρωση αζώτου σε σύγκριση με όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν ($p < 0,05$). Τα σχετικά επίπεδα μεταγραφής του *BGL2* στη ζύμωση με υψηλή αζωτούχα θρέψη ήταν 18, 3 και 106 φορές χαμηλότερά στο 20%, στο 70% και στο 99% των ζυμούμενων σακχάρων σε σύγκριση με το σημείο εμβολιασμού (0%), αντίστοιχα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν τα σημαντικά ενισχυμένα επίπεδα μεταγραφής του *BGL2* στο 0%. και στο 70% των ζυμούμενων σακχάρων στην περίπτωση της υψηλής θρέψης, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα σημεία της ζύμωσης με χαμηλή θρέψη αζώτου ($p < 0,05$). Συγκεκριμένα ήταν 30 φορές και 2,3 φορές πιο υψηλά αντίστοιχα. Όσον αφορά τη περίπτωση της χαμηλής αζωτούχας θρέψης, το γονίδιο *BGL2* σημείωσε 4,2, 1,5 και 14,5 φορές μεγαλύτερη έκφραση στο 70% της ζύμωσης σε σύγκριση με το 0%, 20% και 99%, αντίστοιχα. Το γονίδιο *EXG1* που κωδικοποιεί μια εξω-(1,3)-β-γλυκανάση με δράση β-γλυκοσιδάσης που εμπλέκεται

στην απελευθέρωση τερπενοειδών είχε παρόμοιο τρόπο έκφρασης με το γονίδιο *BGL2*. Τα υψηλότερα σχετικά επίπεδα μεταγραφής του *EXG1* βρέθηκαν στο σημείο εμβολιασμού (0%) στην υψηλή συγκέντρωση αζώτου, ομοίως με το *BGL2*. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης του *EXG1* ήταν 15,8, 2,4 και 28,5 φορές υψηλότερα στο 0% των ζυμούμενων σακχάρων σε σχέση με το 20%, 70% και 99% αντίστοιχα, για την περίπτωση της υψηλής θρέψης αζώτου. Επιπλέον, το *EXG1* είχε 20 και 4 φορές μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στο 0% και στο 70% της ζύμωσης, αντίστοιχα, στην υψηλή προσθήκη αζώτου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες χρονικές στιγμές της ζύμωσης με χαμηλό περιεχόμενο αζώτου. Ακόμη, στη πορεία της ζύμωσης με χαμηλή αζωτούχα θρέψη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα μεταγραφής του *EXG1*. Η σχετική έκφραση των γονιδίων *BGL2* και *EXG1* στην περίπτωση της υψηλής αζωτούχας θρέψης συσχετίζεται σημαντικά (θετική συσχέτιση) με τα αυξημένα επίπεδα λιναλόλης και νερόλης στους αντίστοιχους οίνους. Γενικά, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα σχετικά με τις δράσεις της γλυκοσιδάσης των οινολογικών στελεχών ζυμομύκητα υπό διαφορετικές συνθήκες αζώτου. Ωστόσο, η υπερέκφραση του γονιδίου *EXG1* σε ένα στέλεχος *Saccharomyces* επέτρεψε την απελευθέρωση σημαντικά υψηλότερων επιπέδων τερπενοειδών σε ζυμώσεις Μοσχάτου (Gil et al., 2005). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν καταγραφεί και για την οικογένεια γονιδίων BGL (Quatrini et al., 2008; Belda et al., 2017). Τα αποτελέσματα από τους van Rensburg et al. (2005) υποδεικνύουν ότι το στέλεχος VIN13 (*S. cerevisiae*) που μετασηματίστηκε με τα γονίδια *BGL1* και *BGL2* του *S. fibuligera* εκκρίνει βιολογικά ενεργές β-γλυκοσιδάσες υπό συνθήκες οινοποίησης. Οι γενετικά τροποποιημένες ζυμομύκητες φαίνεται να προάγουν τις δράσεις της γλυκοσιδάσης και αυτό οδήγησε στην απελευθέρωση πτητικών ενώσεων από τις γλυκοσυλιωμένες πρόδρομες αυτών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης Chenin blanc, Gewürtztraminer και Pinotage.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι να εξετάσει την επίδραση της περιεκτικότητας του γλεύκους σε άζωτο στις πτητικές ενώσεις που παράγονται κατά τη διάρκεια της οινοποίησης και στην έκφραση γονιδίων (*ATF1*, *ATF2*, *EEB1*, *EHT1*, *IAH1*, *BGL2*, *EXG1*) που εμπλέκονται στο σχηματισμό τους. Συγκεκριμένα, απώτερος σκοπός είναι να διερευνηθεί η μεταβολική απόκριση εμπορικού στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* σε δύο διαφορετικά υποστρώματα αζώτου με 150 mg/L YAN και 300 mg/L YAN.

Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας έδειξαν ότι η συγκέντρωση του YAN στο γλεύκος επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την έκφραση των γονιδίων *BGL2* και *EXG1* και τον σχηματισμό των μονοτερπενολών. Η υψηλή θρέψη αζώτου μπορεί να προάγει την απελευθέρωση των γλυκοσυλιωμένων τερπενολών, και ιδιαίτερα της λιναλόλης, λόγω της αύξησης της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα με δραστηριότητα γλυκοσιδάσης. Επιπλέον, η προσθήκη αζώτου μπορεί να αυξήσει την ανάπτυξη του ζυμομύκητα, χωρίς ωστόσο, να επηρεάζει τη διάρκεια της ζύμωσης. Όσον αφορά τις πτητικές ενώσεις της ζύμωσης, όπως οι ανώτερες αλκοόλες, οι εστέρες και τα οξέα, η διαφορετική συνθήκη αζώτου επηρέασε ελαφρώς την παραγωγή τους. Για τις ενώσεις 1-εξανόλη και *cis*-3-εξεν1-όλη υποδείχθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ του επιπέδου αζώτου και του χρόνου ζύμωσης. Τα γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή οξικών εστέρων και αιθυλεστέρων σημείωσαν, γενικά, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στην υψηλή θρέψη αζώτου. Ειδικότερα, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης στην αρχή των ζυμώσεων (0% και 20% των ζυμούμενων σακχάρων) δικαιολογούν και τις έντονα φρουτώδεις οσμές που παρατηρούνται στις δεξαμενές ζύμωσης των οινοποιείων κατά τις πρώτες μέρες της αλκοολικής ζύμωσης.

Στο μέλλον, θα ήταν ενδιαφέρον να επιβεβαιωθεί η επίδραση του αζώτου και στο μεταβολισμό άλλων στελεχών για να αξιολογηθεί σε γενικό πλαίσιο η μεταβολική απόκριση των ζυμομυκήτων σε διαφορετικές συνθήκες οινοποίησης. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ανοίγουν νέες προοπτικές για την ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών που στοχεύουν στη μεγιστοποίηση της παραγωγής επιθυμητών αρωμάτων και στη ρύθμιση του οργανοληπτικού προφίλ των οίνων μέσω της διαχείρισης αζώτου. Τέλος, περαιτέρω μελέτες με συνδυασμό των παραμέτρων περιεκτικότητα σε αζώτου και επίπεδα οξυγόνου βρίσκονται σε εξέλιξη.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams, C., Van Vuuren, H.J.J. (2010). Effect of timing of diammonium phosphate addition to fermenting grape must on the production of ethyl carbamate in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 61, 125-129.

Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Moreno-Arribas, M.V. (2017). Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules*, 22-189.

Bell, S.J., Henschke, P.A. (2005). Implication of nitrogen nutrition for grapes fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242-295.

Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Res.*, 6, 625-632.

Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D. (2006). Integration of transcriptomic and metabolic analysis for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Res.*, 6, 1167-83.

Bely, M., Sablayrolles, J.M., Barre, P. (1990). Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *Am. J. Enol. Vitic.*, 159, 25-32.

Bisson, F.L., Karpel, E.J. (2010). Genetics of Yeast Impacting Wine Quality. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 139-62.

Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C. (2016). Metabolic impact of redox cofactor perturbations on the formation of aroma compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Cullen, D. (Ed.), *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 82, 174-183.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 25-30.

Brice, C., Sanchez, I., Tesnière, C., Blondin, B. (2014) Assessing the mechanisms responsible for differences between nitrogen requirements of *saccharomyces cerevisiae* wine yeasts in alcoholic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1330-9.

Brusslan, J.A., Tobin, E.M. (1992). Light-independent developmental regulation of cab gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89, 7791–7795.

Butzke, E. C. (2010). *Winemaking Problems Solved*, 1st Edition, Elsevier

Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Cacho, J. (2005) Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic headspace gas chromatography-olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5682-5690.

Carrau, F.M., Boidoa, E., Dellacassa, E. (2008). Terpenoids in Grapes and Wines: Origin and Micrometabolism during the Vinification Process. *Natural product communications*, 3 (4), 577 -592.

Carrau, F., Medina, K., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E. (2010). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 81–85.

Clarke, R.J., Bakker, J. (2004). *Wine Flavour Chemistry*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, United Kingdom.

Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 237–243.

Cox, A., Capone, D.L., Elsey, G.M., Perkins, M.V., Sefton, M.A. (2005). Quantitative analysis, occurrence, and stability of (*E*)- 1-(2,3,6-trimethylphenyl) buta-1,3-diene in wine. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3584-3591.

Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J.N. Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. Var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Frag. J.*, 10, 385–392.

Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1471-1510.

Delcroix, A., Günata, Z., Sapis, J.C., Salmon, J.M., Bayonove., C. (1994). Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: Effect on the terpenol content of Muscat wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 291-296.

Dubourdieu, D., Ollivier, C., Boidron J.N. (1986) *Conn. Vigne Vin*, 20, 1, 53.

Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., des Gachons, C.P. Murat, M.L. (2006). The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: The example of Sauvignon Blanc. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 81–88.

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

Dukes, B.C., Butzke, C. (1998). Rapid determination of primary amino acids in must using an OPA/NAC spectrophotometric assay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 125-134.

Ebeler, S.E. (2001) Analytical chemistry: Unlocking the secrets of wine flavor. *Food. Rev. Int.*, 17, 45–64.

Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H.T., Ferreira, A.C., Bauer, F.F. (2017). The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Front. Microbiol.*, 2554.

Ferreira, V., López, R., Cacho, J.F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1659-1667.

Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 11-22.

Fleet, G.H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.*, 8, 979-995.

Francis, I.L., Newton, J.L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 11:114-126.

Gamero, A., Quintilla, R., Groenewald, M., Alkema, W., Boekhout, T., Hazelwood, L. (2016). High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiol.*, 60, 147-159.

Genovese, A., Piombino, P., Lisanti, M.T., Moio, L. (2005). Determination of furaneol (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone) in some wines from Italian native grapes by gas-chromatography-sim/ mass spectrometry. *Ann. Chim.*, 95, 415-419.

Gil, J.V., Manzanares, P., Genovés, S., Vallés, S., González-Candelas, L. (2005). Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 57-68.

Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Alexandre, H. (2017). Non-Saccharomyces Yeasts nitrogen source preferences: Impact on sequential fermentation and wine volatile compounds profile. *Front. Microbiol.*, 8, 2175.

González, B., Vázquez, J., Morcillo-Parra, M.A., Mas, A., Torija, M.J., Beltran, G. (2018). The production of aromatic alcohols in non-Saccharomyces wine yeast is modulated by nutrient availability. *Food Microbiol*, 74, 64-74

Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V. (2005a). Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J. Appl. Microbiol.*, 99, 1061-1069.

Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V. (2005b). A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.*, 105, 233-244.

Günata, Y.Z., Bayonove, C.L., Tapiero, C., Cordonnier, R.E. (1990). Hydrolysis of grape monoterpenyl β -d-glucosides by various β -glucosidases. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1232-1236.

Gunata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J.M., Bayonove, C. Cordonnier, R. (1988). Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydrate Research*, 184, 139–149.

Gutiérrez, A., Chiva, R., Sancho, M., Beltran, G., Arroyo-López, F.N., Guillamon, J.M. (2012). Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiology*, 1, 25-32.

Hart, R.S., Jolly, N.P., Ndimba, B.K. (2019). Characterisation of hybrid yeasts for the production of varietal Sauvignon blanc wine - A review. *Journal of Microbiological Methods*, 165, 105699.

Hazelwood, L.A., Darán, J.M., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., Dickinson, J.R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 2259-66.

Henschke, P.A., Jiranek, V. (1992). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds in Wine Microbiology and Biotechnology, The Australian Wine Research Institute, PO Box 197, Glen Osmond, South Australia 5064, Australia

Holt, S., Cordente, A.G., Williams, S.J., Capone, D.L., Jitjaroen, W., Menz, I.R., Curtin, C., Anderson, P.A. (2011). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* to release 3-mercaptohexan-1-ol during fermentation through overexpression of an

S.cerevisiae gene, STR3, for improvement of wine aroma. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 3626–3632.

Julien, A., Roustan, J.L., Dulau, L., Sablayrolles, J.M. (2000). Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: technological consequences. *Am. J. Enol. Vitic.*, 51, 215-222.

Kotseridis, Y., Anocibar, A., Beloqui, A., Bertrand, A., Doazan, J.P. (1998). An analytical method for studying the volatile compounds of Merlot noir clone wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 44-48.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma - a review. *S Afr J Enol Vitic*, 21(Special Issue), 97-129.

Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D. et al. (2006a). The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, 23, 641-59.

Lilly, M., Bauer, F.F., Styger, G., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2006b). The effect of increased branch-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Res.*, 6, 726-43.

Liu, P., Wang, Y., Ye, D., Duan, L., Duan, C., Yan, G. (2018). Effect of the addition of branched-chain amino acids to non-limited nitrogen synthetic grape must on volatile compounds and global gene expression during alcoholic fermentation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 24, 197-205.

Liu, P. T., Zhang, B. Q., Duan, C. Q., Yan, G. L. (2020). Pre-fermentative supplementation of unsaturated fatty acids alters the effect of overexpressing ATF1 and EEB1 on esters biosynthesis in red wine. *Food Science and Technology*, 120, 108925.

Lleixà, J., Martín, V., Portillo, M.d.C., Carrau, F., Beltran, G., Mas, A. (2016). Comparison of fermentation and wines produced by inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.*, 7, 338.

Lopez, R., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira V. (2002). Determination of minor trace volatile compounds in wine by solid - phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 966, 167-177.

Luo, Z., Walkey, C.J., Madilao, L.L., Measday, V., Van Vuuren, H.J.J. (2013). Functional improvement of *Saccharomyces cerevisiae* to reduce volatile acidity in wine. *FEMS Yeast Res.* 13, 485-494.

Maicas, S.; Mateo, J.J. (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 322-335.

Maicas, S., Mateo, J.J. (2016). *Microbial Glycosidases for Wine Production, Beverages*, 2, 20.

Marais, J., Pool, H. (1980). Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis*, 19, 151-164.

Martínez-Moreno, R., Quirós, M., Morales, P., González, R. (2014). New insights into the advantages of ammonium as a winemaking nutrient. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 128–135.

Masson, G., Schneider, R. (2009). Key compounds of Provence rosé wine flavor. *Am. J. Enol. Vitic.*, 60, 116-122.

Mateo, J.J., di Stefano, R. (1977). Description of the B-glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiol.*, 14, 583-591.

McDonald, P.D., Bouvier, E.S.P. (2001). *A Sample Preparation Primer and Guide to Solid-Phase Extraction, Methods Development*, Waters, Search for WA20300 on waters.com.

Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Falco, V., Leão, C., Mendes-Faia, A. (2009). The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 571-583.

Molina, A.M., Swiegers, J.H., Varela, C., Pretorius, I.S., Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 675-687.

Moreno-García, J., García-Martínez, T., Millán, M.C., Mauricio, J.C., Moreno, J. (2015). Proteins involved in wine aroma compounds metabolism by a *Saccharomyces cerevisiae* flor-velum yeast strain grown in two conditions. *Food Microbiol.*, 51, 1-9.

Moreno-Pérez, A., Vila-López, Fernández-Fernández, J., Martínez-Cutillas, A., Gil-Muñoz, R. (2013). Influence of cold pre-fermentation treatments on the major volatile compounds of three wine varieties. *Food Chemistry*, 139, 770-776.

Piljac-Žegaraca, J., Martinez, S., Valek, L., Stipčević, T., Kovačević-Ganić, K. (2007). Correlation between the Phenolic Content and DPPH radical scavenging activity of selected Croatian wines, *Acta Alimentaria*, 36 (2), 185-193.

Pons, A., Lavigne, V.R., Landais, Y., Darriet, P., Dubourdiou, D. (2010). Identification of a sotolon pathway in dry white wines. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 7273-7279.

Pretorius, I.S. (2003). The genetic analysis and tailoring of wine yeasts. In *Topics in Current Genetics*; de Winde, J.H., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany; Volume 2, pp. 99–141.

Pretorius, I.S. (2016). Conducting wine symphonics with the aid of yeast genomics. *Beverages*, 2, 36–63.

Prida, A., Chatonnet, P. (2010). Impact of oak-derived compounds on the olfactory perception of barrel-aged wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 61, 408-413.

Quatrini, P., Marineo, S., Puglia, A.M., Restuccia, C., Caggia, C., Randazzo, C.L., Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Giudici, P. (2008). Partial sequencing of the β -glucosidase-encoding gene of yeast strains isolated from musts and wines. *Ann. Microbiol.*, 58, 503-508.

Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., Moorman, A.F.M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339, 62-66.

Rauhut, D. (2009). Usage and formation of sulphur compounds. See König et al. 2009, pp. 181–208.

Ridereau-Gayon, P., Glories, Y., Dubourdiou, D., Rychlewski, C. (2006), *Handbook of Enology, The chemistry of wine. Stabilization and treatments*, 2nd edition, vol. 6.4.5.

Ridereau-Gayon, P., Dubourdiou, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications* 2nd Edition, John Wiley & Sons, Ltd ISBN: 0-470-01034-7

Robinson, A., Boss, P., Solomon, P., Trengove, R., Heymann, H., Ebeler, S. (2014). Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts, *American Journal of Enology and Viticulture*, 65, 1.

Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Cavelier, F. (2011). Varietal thiols in wine: Discovery, analysis and applications. *Chem. Rev.*, 111, 7355-7376.

Roca-Mesa, H., Sendra, S., Mas, A., Beltran, G., Torija, M.J. (2020). Nitrogen Preferences during Alcoholic Fermentation of Different Non-Saccharomyces Yeasts of Oenological Interest. *Microorganisms.*, 22, 8 (2), 157.

Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Divol, B. (2018). Fermentation performances and aroma production of non-conventional wine yeasts are influenced by nitrogen preferences. *FEMS Yeast Res.*, 18, 055.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavor. *Int J Food Microbiol*, 86, 169-180.

Sadoudi, M., Tourdot-Marechal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacon, J.J., Ballester, J., Vichi, S., Guerin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H. (2012) Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiol.*, 32, 243-253.

Saerens, S.M.G., Verstrepen, K.J., Van Laere, S.M.D., Voet, A.R.D., Van Dijck, P., Delvaux, F.R., Thevelein, J.M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J. Biol. Chem.*, 281, 4446-4456.

Saerens, S.M.G., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 454-461.

Saerens, S.M., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M. (2009). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Biotechnol.*, In press.

Saerens, S.M., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotech.*, 3, 165-177.

Scheiner, D. (1976). Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method. *Water Research*, 10, 31-36.

Schneider, R., Razungles, A., Augier, C., Baumes, R. (2001). Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines. *J. Chromatogr.*, 936, 145-157.

Seguinot, P., Rollero, S., Sanchez, I., Sablayrolles, J.M., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Mouret, J.-R. (2018). Impact of the timing and the nature of nitrogen additions on the production kinetics of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking fermentation in synthetic media. *Food Microbiology*, 76, 29–39.

Seguinot, P., Bloem, A., Brial, P., Meudec, E., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C. (2020). Analysing the impact of the nature of the nitrogen source on the formation of volatile compounds to unravel the aroma metabolism of two non-Saccharomyces strains. *International Journal of Food Microbiology*, 316, 108441.

Simpson, R. (1979). Aroma composition of bottle aged white wine. *Vitis* 18, 148-154.

Singleton, V.L., Kramling, T.E. (1976). Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27, 157-160.

Sioumis, N., Kallithraka, S., Makris, D., Kefalas, P. (2006). Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chemistry*, 94, 1, 98-104.

Smith, M., Bekker, M., Smith, P., Wilkes, E. (2015). Sources of volatile sulfur compounds in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 21, 705-712.

Stitt, M., Sulpice, R., Keurentjes, J. (2010). Metabolic networks: How to identify key components in the regulation of metabolism and growth? *Plant Physiol.*, 152, 428-444.

Su, Y., Origone, A.C., Rodríguez, M.E., Querol, A., Guillamón, J.M., Lopes, C.A. (2019). Fermentative behaviour and competition capacity of cryotolerant *Saccharomyces* species in different nitrogen conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 111-120.

Swiegers, J.H., Pretorius, I.S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Adv. Appl. Microbiol*, 57, 131-175.

Swiegers, J.H., Bartowksy, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res*, 11, 127-138.

Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: Influence of inoculation and nitrogen content. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 1959-1967.

Testa, B., Lombardi, S.J., Iorizzo, M., Letizia, F., Di Martino, C., Di Renzo, M., Strollo, D., Tremonte, P., Pannella, G., Ianiro, M., Sorrentino, E., Succi, M., Coppola, R. (2020). Use of strain *Hanseniaspora guilliermondii* BF1 for winemaking

process of white grapes *Vitis vinifera* cv Fiano. European Food Research and Technology, 246, 549–561.

Tao, Y., Li, H., Wang, H., Zhang, L. (2008) Volatile compounds of young cabernet sauvignon red wine from Changli county (China). J. Food Compos. Anal., 21, 689-694.

Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S.D. (2007), Fatty acid synthesis and elongation in yeast. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1771, 255-270.

Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Francis, I.L., Henschke, P.A. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice e effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Food Chem., 127, 1072-1083.

Treu, L., Campanaro, S., Nadai, C., Toniolo, C., Nardi, T., Giacomini, A., Valle, G., Blondin, B., Corich, V. (2014). Oxidative stress response and nitrogen utilization are strongly variable in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains with different fermentation performances. Appl. Microbiol. Biotechnol., 98, 4119-4135.

Ugliano, M., Bartowsky, E.J., McCarthy, J., Moio, L., Henschke, P.A. (2006). Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. J. Agric. Food Chem., 54, 6322-6331.

Ugliano, M., Henschke, P. (2009). Yeasts and wine flavour. See Moreno-Arribas 2009, pp. 313-392.

Van Rensburg, P., Stidwell, T., Lambrechts, M.G., Cordero Otero, R., Pretorius, I.S. (2005). Development and assessment of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast producing two aroma-enhancing β -glucosidases encoded by the *Saccharomycopsis fibuligera* *BGL1* and *BGL2* genes. Annals of Microbiology, 55, 33-42.

Varela, C. (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. Appl. Microbiol. Biotechnol., 100, 9861-9874.

Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Pretorius, I.S., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R. (2003a). The *cerevisiae* alcohol acetyl transferase gene *ATF1* is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. FEMS Yeast Res., 4, 285-296.

Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Vanderhaegen, B.M.P, Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R. (2003b). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, *Lg-ATF1*, and *ATF2* control the formation of a broad range of volatile esters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5228-5237.

Vilanova, M., Martínez, C. (2007). First study of determination of aromatic compounds of red wine from *Vitis vinifera* cv. Castañal grown in Galicia (NW Spain). *Eur. Food Res. Technol.*, 224, 431-436.

Wood, C., et al. (2008). From wine to pepper: Rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3738-3744.

Καλλονιάτη, Χ. (2016). Αναπρογραμματισμός του μεταβολισμού του *Lotus japonicus* σε μεταγραφικό, βιοχημικό και μεταβολομικό επίπεδο κατά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Νικολάου, Ν.Α. (2011). Αμπελουργία. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία. Β΄ Έκδοση, Θεσσαλονίκη.

Νικολάου, Ν.Α. (2012). Αμπελογραφία. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.

Σταύρακας, Δ. Ε., (2011), Αμπελογραφία, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Συγκέντρωση σακχάρων (g/L) κατά τη πορεία ζύμωσης με χαμηλή και υψηλή αζωτούχα θρέψη.

Ημέρες	Σάκχαρο (g/L) Χαμηλή αζωτούχα θρέψη	Σάκχαρο (g/L) Υψηλή αζωτούχα θρέψη
0	220±0	220±0
1	215,5±0,4	208±3,3
2	190,5±1,2	189±0
3	169±0	164±0
4	152±0	144,5±1,2
5	130,5±2,0	124,5±0,4
6	112,5±0,4	103,5±2,1
7	94,5±0,4	87±0
8	65±0,8	59,5±1,2
9	49±2,4	38,5±0,4
10	32,5±1,2	30±0,8
11	25±0,0	23±0,8
12	16±1,6	19,5±1,2
13	10±0,8	12±0,8
14	5±0	6±0,8
15	3,2±0,2	3,75±0,2
16	1,3±0,1	1,35±0

Πίνακας 2: Ένδειξη βιομάζας κατά τη διάρκεια ζύμωσης με χαμηλή και υψηλή αζωτούχα θρέψη.

Ημέρες	Ένδειξη βιομάζας (AU) Χαμηλή αζωτούχα θρέψη	Ένδειξη βιομάζας (AU) Υψηλή αζωτούχα θρέψη
0	0,1945±0,0085	0,2262±0,0051
1	0,4880±0,0370	0,5632±0
2	2,4235±0,0635	1,9343±0,0922
3	2,7700±0,0200	2,7695±0,1205
4	2,6835±0,0815	2,2045±0,0575
5	3,1285±0,1715	2,9312±0
6	2,6795±0,2165	3,1915±0,0065
7	2,5490±0,1251	2,9544±0,0663
8	3,0585±0,1265	3,4375±0,1115
9	2,9305±0,0035	2,7745±0,0665
10	3,4994±0,1262	3,5075±0,0245
11	2,9785±0,2235	2,4271±0,1541
12	2,5953±0,1461	2,1691±0,02154
13	1,3605±0,0305	1,4385±0,1885
14	0,7315±0,0875	0,5774±0,0590
15	0,5362±0,0981	0,4493±0,0390
16	0,6665±0,1475	0,7575±0,0275

Πίνακας 3: Συγκέντρωση YAN (mg/L) κατά τη διάρκεια ζύμωσης με χαμηλή και υψηλή αζωτούχα θρέψη.

Ημέρες	YAN (mg/L) Χαμηλή αζωτούχα θρέψη	YAN (mg/L) Υψηλή αζωτούχα θρέψη
0	150,0±5	300,0±5
1	70,0±5	194,0±5
2	20,0±1	112,0±5
3	18,0±3	80,0±4
4	19,0±4	30,0±5
5	16,0±2	28,0±2
6	11,0±0	25,0±1
6	42,0±1	63,0±1
7	26,0±2	34,0±3
8	7,9±0,3	11,0±1
9	3,4±0,1	4,9±0,1
10	2,1±0,3	3,3±0,2
11	2,1±0,1	3,3±0,2
12	1,3±0,1	1,1±0
13	1,9±0,1	2,5±0
14	4,0±0,2	4,2±0,1
15	5,0±0	6,0±0
16	8,0±0	9,1±0,5

Πίνακας 4: Συγκέντρωση εστέρων (mg/L) στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας (0% ζυμούμενων σακχάρων, 20% ζυμούμενων σακχάρων, 70% ζυμούμενων σακχάρων, 99% ζυμούμενων σακχάρων) των ζυμώσεων με χαμηλή και υψηλή αζωτούχα θρέψη.

Εστέρες (mg/L)	Χαμηλή αζωτούχα θρέψη				Υψηλή αζωτούχα θρέψη			
	0% ζ.σ.	20% ζ.σ.	70% ζ.σ.	99% ζ.σ.	0% ζ.σ.	20% ζ.σ.	70% ζ.σ.	99% ζ.σ.
Οξικός ισοβουτυλε στέρας	0,01 ±0a	0,03 ±0a	0,03 ±0,01a	0,02 ±0a	0,02 ±0,01a	0,03 ±0a	0,03 ±0,01a	0,03 ±0a
Οξικός ισοαμυλεστ έρας	nd	0,23 ±0,03b	0,40 ±0,04c	0,96 ±0,08d	nd	0,24 ±0,03b	0,44 ±0,11c	1,03 ±0,03d
Οξικός εξυλεστέρας	nd	0,06 ±0b	0,05 ±0,01c	0,07 ±0,01b	nd	0,05 ±0,01b	0,04 ±0,01c	0,06 ±0d
Οξικός 2- φαινυλαιθυ λεστέρας	nd	0,10 ±0,01b	0,17 ±0,02c	0,39 ±0,02d*	nd	0,08 ±0b	0,16 ±0,05c	0,34 ±0,03d
Βουτυτικός αιθυλεστέρ ας	2,47 ±0a	1,19 ±0,06b	1,53 ±0,02b	3,48 ±0,36c	2,44 ±0,04a	1,23 ±0,04b	1,54 ±0,04b	3,31 ±0,35c
Οκτανοϊκός αιθυλεστέρ ας	0,01 ±0a	0,20 ±0,03b	0,11 ±0,06ab	1,01 ±0,06c	0,02 ±0a	0,20 ±0,09b	0,13 ±0,06ab	0,89 ±0,08c
Δεκανοϊκός αιθυλεστέρ ας	nd	0,09 ±0,02b	0,10 ±0,03b	0,40 ±0,04c	nd	0,09 ±0,04b	0,09 ±0,03b	0,43 ±0,04c

Πίνακας 5: Συγκέντρωση αλκοολών (mg/L) στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας (0% ζυμούμενων σακχάρων, 20% ζυμούμενων σακχάρων, 70% ζυμούμενων σακχάρων, 99% ζυμούμενων σακχάρων) των ζυμώσεων με χαμηλή και υψηλή αζωτούχα θρέψη.

Αλκοόλες (mg/L)	Χαμηλή αζωτούχα θρέψη				Υψηλή αζωτούχα θρέψη			
	0% ζ.σ.	20% ζ.σ.	70% ζ.σ.	99% ζ.σ.	0% ζ.σ.	20% ζ.σ.	70% ζ.σ.	99% ζ.σ.
Ισοαμυλική αλκοόλη	0,92 ±0,15a	38,95 ±1,12b	63,82 ±5,02c	46,46 ±4,79d	2,83 ±0,10a	39,10 ±3,80b	55,84 ±7,01c	46,61 ±5,84bc
2-φαινυλαιθανόλη	nd	38,78 ±1,04b	41,33 ±5,79b	36,20 ±4,25b	nd	36,84 ±3,40bc	41,76 ±4,66b	31,76 ±1,64c
1-εξανόλη	0,76 ±0,07a	0,69 ±0,09a	0,38 ±0,02b	0,64 ±0,05a	0,76 ±0,10a	0,59 ±0,03b	0,55 ±0,04b*	0,60 ±0,05b
cis-3-εξέν-1-όλη	0,10 ±0,01a	0,10 ±0a	0,06 ±0,02b*	0,04 ±0c	0,11 ±0,01a	0,09 ±0,01b	0,04 ±0c	0,04 ±0c

Πίνακας 6: Συγκέντρωση τερπενολών (μg/L) στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας (0% ζυμούμενων σακχάρων, 20% ζυμούμενων σακχάρων, 70% ζυμούμενων σακχάρων, 99% ζυμούμενων σακχάρων) των ζυμώσεων με χαμηλή και υψηλή αζωτούχα θρέψη.

Τερπενόλες (μg/L)	Χαμηλή αζωτούχα θρέψη				Υψηλή αζωτούχα θρέψη			
	0% ζ.σ.	20% ζ.σ.	70% ζ.σ.	99% ζ.σ.	0% ζ.σ.	20% ζ.σ.	70% ζ.σ.	99% ζ.σ.
Λιναλόλη	nd	35,94 ±0,99b	38,66 ±0,49b	49,03 ±2,10b	nd	58,63 ±2,55b*	92,11 ±3,56c*	126,78 ±18,66d*
Νερόλη	nd	1,74 ±0,32b	5,40 ±0,58c	8,86 ±0,80d	nd	2,47 ±0,65b	6,62 ±0,91c*	10,84 ±0,92d*

Πίνακας 7: Συγκέντρωση πτητικών οξέων (mg/L) στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας (0% ζυμούμενων σακχάρων, 20% ζυμούμενων σακχάρων, 70% ζυμούμενων σακχάρων, 99% ζυμούμενων σακχάρων) των ζυμώσεων με χαμηλή και υψηλή αζωτούχα θρέψη.

Οξέα (mg/L)	Χαμηλή αζωτούχα θρέψη				Υψηλή αζωτούχα θρέψη			
	0% ζ.σ.	20% ζ.σ.	70% ζ.σ.	99% ζ.σ.	0% ζ.σ.	20% ζ.σ.	70% ζ.σ.	99% ζ.σ.
Ισοβαλερικό οξύ	nd	0,14 ±0,01b	0,27 ±0,05c	0,43 ±0,04d	nd	0,15 ±0b	0,25 ±0,01c	0,45 ±0,04d
Εξανοϊκό οξύ	0,15 ±0a	2,21 ±0,23b	1,93 ±0c	1,49 ±0,14d*	0,20 ±0,06a	2,11 ±0,02b	1,80 ±0,04c	1,26 ±0,13d

Πίνακας 8: Σχετική έκφραση γονιδίων στα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας (0% ζυμούμενων σακχάρων, 20% ζυμούμενων σακχάρων, 70% ζυμούμενων σακχάρων, 99% ζυμούμενων σακχάρων) των ζυμώσεων με χαμηλή και υψηλή αζωτούχα θρέψη.

Γονίδια	Χαμηλή αζωτούχα θρέψη				Υψηλή αζωτούχα θρέψη			
	0% ζ.σ.	20% ζ.σ.	70% ζ.σ.	99% ζ.σ.	0% ζ.σ.	20% ζ.σ.	70% ζ.σ.	99% ζ.σ.
ATF1	0,56 ±0,12a	1,23 ±0,38b	0,47 ±0,10a	0,82 ±0,13b	1,60 ±0,30a*	1,01 ±0,36ac	0,40 ±0,10b	0,82 ±0,05c
ATF2	2,09 ±0,78a	0,53 ±0,16b	0,54 ±0,13b	1,50 ±0,05a	1,60 ±0,35a	0,81 ±0,23b	0,30 ±0,15c	1,97 ±0,29a*
EEB1	1,24 ±0,66bc	5,67 ±0,32a	1,93 ±0,58b	0,45 ±0,07c	2,55 ±0,29b*	6,80 ±1,12a	2,45 ±0,12b	1,12 ±0,19b*
EHT1	0,69 ±0,02b	7,19 ±0,68a	1,12 ±0,63b	0,15 ±0,14b	18,46 ±4,19a*	4,70 ±2,16b	2,40 ±0,44b*	0,83 ±0,07c*
IAH1	2,18 ±0,70a	1,71 ±0,35a	2,01 ±0,65a	0,97 ±0,01b	4,11 ±0,03a*	1,62 ±0,13c	2,73 ±0,22b	0,82 ±0,25d
BGL2	10,19 ±4,73b	27,71 ±0,25ab	43,10 ±19,13a	2,96 ±2,10b	300,59 ±17,70a*	16,48 ±8,33c	97,95 ±5,46b*	2,82 ±0,27c
EXG1	1,55 ±0,35a	2,44 ±1,13a	3,14 ±1,84a	0,97 ±0,02a	30,83 ±4,23a*	1,95 ±0,59b	12,67 ±5,36c*	1,08 ±0,21b