



**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

Επίδραση καλλιεργητικών τεχνικών (ουρία, αμινοξέα) στο αρωματικό
προφίλ της ποικιλίας Ροδίτη σε σχέση με οινοποιήσεις θειολικής
και εστερικής κατεύθυνσης

Ευαγγελία Ι. Αμανατίδη

Επιβλέπων Καθηγητής:
Γεώργιος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2023**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση καλλιεργητικών τεχνικών (ουρία, αμινοξέα) στο αρωματικό
προφίλ της ποικιλίας Ροδίτη σε σχέση με οινοποιήσεις θειολικής
και εστερικής κατεύθυνσης

"Effect of different cultivation techniques (urea, amino acids)
on the aromatic profile of the Roditis variety in relation to thiol
and ester vinification"

Ευαγγελία Ι. Αμανατίδη

Εξεταστική Επιτροπή:

Γεώργιος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ
Σταματίνα Καλλίθρακα, Καθηγήτρια ΓΠΑ
Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ

Επίδραση καλλιεργητικών τεχνικών (ουρία, αμινοξέα) στο αρωματικό προφίλ της ποικιλίας Ροδίτη σε σχέση με οινοποιήσεις θειολικής και εστερικής κατεύθυνσης

*ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων i) Γαλακτοκομία ii) Οινολογία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Οινολογίας & Αλκοολούχων Ποτών*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός πτητικών ενώσεων, συγκεκριμένα θειολών, εστέρων και ανώτερων αλκοολών, σε πειραματικούς οίνους της ποικιλίας Ροδίτη. Οι συγκεκριμένοι οίνοι προέρχονται από σταφύλια στα οποία έχει εφαρμοστεί διαφυλλική λίπανση με ουρία και με θραύσματα αδρανοποιημένων ζυμομυκήτων.

Ο Ροδίτης αποτελεί τη δεύτερη πιο φυτεμένη ποικιλία στην Ελλάδα, ωστόσο ελάχιστες αναφορές έχουν γίνει στο δυναμικό της. Για την παρούσα μελέτη επιλέχθηκε ένα ορεινό αμπέλι στα 950μ., στην Φτέρη Αιγιαλείας, στο οποίο εφαρμόστηκε σε ένα μέρος του διαφυλλική λίπανση με ουρία και θειάφι (NS) και σε ένα άλλο με θραύσματα ανενεργών ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* (IY). Ένα κομμάτι του αμπελιού παρέμεινε χωρίς κάποια παρέμβαση (M). Τα σταφύλια συγκομίστηκαν ξεχωριστά, ανάλογα με την καλλιεργητική παρέμβαση και οινοποιήθηκαν με τρία διαφορετικά πρωτόκολλα: ένα με ουδέτερο σχετικά στέλεχος (NT116), ένα με στέλεχος που προάγει τις θειόλες (VIN7) και ένα με στέλεχος που προάγει τους εστέρες (VIN13). Στόχος ήταν να μελετηθεί το αν το αρωματικό προφίλ του Ροδίτη, που χαρακτηρίζεται από εσπεριδοειδή και λευκά άνθη μπορεί να έχει και άλλες προεκτάσεις και μεγαλύτερη πολυπλοκότητα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι εστέρες, στους οποίους οφείλεται το φρέσκο άρωμα φρούτων και λουλουδιών δεν επηρεάζεται από το είδος της λίπανσης, παρά μόνο από το διαφορετικό στέλεχος. Ιδιαίτερα το πρωτόκολλο VIN13 προάγει τη συγκέντρωση οξικών εστέρων και αιθυλεστέρων. Αντίθετα οι θειόλες επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από τον τύπο λίπανσης, με την ουρία να δείχνει σημαντική διαφορά στους οίνους που ζυμώθηκαν ιδιαίτερα με VIN7. Τέλος οι ανώτερες αλκοόλες εξαρτώνται από το πρωτόκολλο οινοποίησης που ακολουθήθηκε, με το VIN7 να οδηγεί σε υψηλότερη παραγωγή τους.

Επιστημονική περιοχή: Οινολογία

Λέξεις-κλειδιά: Ροδίτης, εστέρες, θειόλες, πτητικές ενώσεις, αέρια χρωματογραφία, φασματομετρία μαζών, ουρία, αδρανοποιημένοι ζυμομύκητες

Effect of different cultivation techniques (urea, amino acids) on the aromatic profile of the Roditis variety in relation to thiol and ester vinification

*MSc in Current Food Technology i) Dairy Science & Technology ii) Oenology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Oenology & Alcoholic Drinks*

ABSTRACT

The main cause of the present study was the identification of thiols, esters, and higher alcohols in experimental wines of Roditis variety. The wines were produced by grapes to which foliar fertilization with urea and inactivated yeasts had been applied.

Roditis is the second most planted variety in Greece, however few references have been made to its potential. For the present study, a mountainous vineyard was selected at a height of 950m, in Fteri Aigialeia. In one part of the vineyard foliar fertilization with urea and sulfur (NS) was applied and in another part with specific fractions of inactivated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* (IY). A part of the vine was left without any intervention (M). The grapes were harvested separately, depending on the cultivation intervention and vinified with three different protocols: one with neutral strain (NT116), one with thiol-promoting strain (VIN7) and one with esters-promoting strain (VIN13). The aim was to study whether the aromatic profile of Roditis, characterized by citrus and white flowers aromas, could have further extensions and greater complexity.

The results showed that the esters, to which the fresh aroma of fruits and flowers is due to, was affected by the strain and not by the type of fertilization. In particular, the VIN13 protocol promotes the concentration of acetates and ethyl esters. In contrast, thiols are significantly affected by the type of fertilization, with urea showing a significant difference in wines fermented especially with VIN7. Finally, the higher alcohols depend on the vinification protocol followed, with VIN7 leading to their higher production.

Scientific area: Oenology

Keywords: Roditis, esters, thiols, volatile compounds, gas chromatography, mass spectrometry, urea, inactivated yeasts

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν στην ολοκλήρωσή της.

Αρχικά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γ. Κοτσερίδη, για τη βοήθεια και την καθοδήγησή του τόσο κατά τη διάρκεια της εργασίας όσο και καθ' όλη τη διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Την κα. Annabelle Cottete και κ. Remi Schneider της εταιρείας OENOBRANDS, που αγκάλιασαν την προσπάθεια και το θέμα της εργασίας και προσφέρθηκαν αφιλοκερδώς να διεξάγουν μέρος των αναλύσεων στο εργαστήριό τους. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ και στον κ. Γιάννη Παπαϊωάννου της εταιρείας ELTON που μεσολάβησε για την επικοινωνία με την Oenobrand.

Την κα. Νίκη Προξενιά για την παντοτινή της στήριξη και υπομονή καθώς και τις Στεφανία Χριστοφή και Έλλη Γκουλιώτη για την βοήθεια που μου προσέφεραν στο εργαστήριο.

Τον αμπελουργό Παναγιώτη Αλεξανδρόπουλο, στο αμπέλι του οποίου έγιναν οι εφαρμογές που απαιτήθηκαν για την παρούσα μελέτη.

Τον μέντορα, συνεργάτη και φίλο Στέλιο Τσίρη, οινολόγο της Cavino, για την καθοδήγηση, την έμπνευση που μου δίνει καθώς και για όσα έμαθα και ακόμα μαθαίνω δίπλα του.

Τέλος τον αδερφό μου Σωτήρη, που με βοήθησε κατά την πρακτική του άσκηση στο πειραματικό κομμάτι που απαιτήθηκε στην παρούσα εργασία και ποτέ δεν παραπονέθηκε για όσα του ζήτησα να κάνει!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΡΟΔΙΤΗΣ	8
1.2 ΤΟ ΑΡΩΜΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ.....	9
1.2.1 Ποικιλιακό άρωμα.....	10
1.2.2 Άρωμα που συντίθεται από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση.....	14
1.2.3 Άρωμα που αναπτύσσεται κατά την παλαίωση των οίνων	18
1.3 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΟ ΑΜΠΕΛΙ.....	18
1.3.1 Χρήση διαφυλλικής ουρίας.....	19
1.3.2 Διαφυλλική χρήση αδρανοποιημένων ζυμομυκήτων στο αμπέλι	21
1.4 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	23
1.4.1 Απομόνωση πτητικών ενώσεων με εκχύλιση υγρού με υγρό.....	23
1.4.2 Αέρια Χρωματογραφία (GC).....	25
1.4.2.1 Οργανολογία Αέριας Χρωματογραφίας	25
1.4.3 Φασματομετρία μαζών (MS).....	31
1.4.3.1. Οργανολογία Φασματομετρίας Μαζών.....	32
1.4.4. Διασύνδεση Συστημάτων GC & MS.....	35
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	36
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	37
2.1.1 Επέμβαση στο αμπέλι.....	37
2.1.2 Οινοποίηση.....	38
2.1.3 Κωδικοποίηση δειγμάτων	40
2.1.4 Μεταζυμωτικές κατεργασίες.....	41
2.1.5 Βασικές οινολογικές αναλύσεις.....	41
2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	42
2.2.1 Ποσοτική Ταυτοποίηση Πτητικών Θειολών	42
2.2.2. Ποσοτική Ταυτοποίηση Εστέρων και Ανώτερων Αλκοολών	42

2.3	ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ.....	43
2.4	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	44
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
3.1	ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΑ ΓΛΕΥΚΗ.....	45
3.2	ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ.....	46
3.3	ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΑΡΩΜΑΤΟΣ ΟΙΝΩΝ.....	47
3.3.1	Πτητικές Θειόλες.....	47
3.3.2	Οξικοί Εστέρες.....	49
3.3.3	Αιθυλικοί εστέρες.....	51
3.3.4	Ανώτερες Αλκοόλες.....	53
3.4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ.....	55
3.4.1	Οργανοληπτική αξιολόγηση με βάση το πρωτόκολλο οινοποίησης.....	55
3.4.2	Οργανοληπτική αξιολόγηση με βάση την καλλιεργητική επέμβαση.....	57
3.5	ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	60
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	63
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΡΟΔΙΤΗΣ

Ο Ροδίτης, η πλέον διαδεδομένη λευκή ποικιλία στην Ελλάδα όσον αφορά στις φυτεύσεις και στην ποσότητα παραγωγής (ΣΕΟ), δίνει κρασιά διαφόρων επιπέδων ποιότητας. Παρά την προαναφερόμενη ποσότητα, ο Ροδίτης παραμένει ανεξερεύνητος και εκεί που μεγαλουργεί είναι τα ορεινά αμπελοτόπια, όπως αυτά της ορεινής Αιγιαλείας.

Ο αμπελώνας της ορεινής Αιγιαλείας έχει χαρακτηριστεί, από την Επίτιμο Πρόεδρο του Παγκόσμιου Οργανισμού Οίνου(ΟΙΥ) Σταυρούλα Κουράκου, ένας από τους ωραιότερους του κόσμου. Πέντε μεγάλα φαράγγια, που έχουν διαμορφωθεί από τους ποταμούς Φοίνικα, Μεγανίτη, Σελινούντα, Κερυνίτη, Βουραϊκό, Κριό και Κράθι, που διασχίζουν τις πλαγιές της Αιγιαλείας και εκβάλουν στον Κορινθιακό κόλπο, τέμνουν εγκάρσια τον ορεινό όγκο και διαμορφώνουν έναν βοτανικό παράδεισο που είναι χαρακτηρισμένος ως περιοχή Natura. Τα ημιορεινά και ορεινά αμπελοτόπια της Αιγιαλείας βρίσκονται κατά μέσο όρο σε υψόμετρο από 300 έως 850 μέτρα, ενώ τα εδάφη ποικίλλουν, από λευκά ασβεστολιθικά, μέχρι γόνιμα αμμοπηλώδη, με εξαιρετική στράγγιση εξαιτίας της μεγάλης κλίσης με μέση τιμή 33,5% (ΕΝΟΑΠ). Και ενώ η πλειοψηφία των ελληνικών αμπελώνων έχει δυτικό, ανατολικό ή νότιο προσανατολισμό, η Αιγιαλεία είναι από τις ελάχιστες περιπτώσεις αμπελώνα στην χώρα που έχει βορεινή έκθεση (Λαζαράκης, 2018). Αυτό σε συνδυασμό με το μεγάλο υψόμετρο, το έντονο ανάγλυφο, τη γειτνίαση με τη θάλασσα και τους δροσερούς ανέμους που πνέουν μέσα στα φαράγγια καθιστούν τις Πλαγιές Αιγιαλείας μια από τις πιο σπουδαίες αμπελουργικές ζώνες, όχι μόνο για τα δεδομένα της Ελλάδας αλλά και ολόκληρου του κόσμου, κυρίως όσον αφορά την παραγωγή λευκών κρασιών, συμπεριλαμβανομένου και του Ροδίτη (Λαζαράκης, 2018).

Ο Ροδίτης, παρότι συγκαταλέγεται στις λευκές ποικιλίες από την οποία παράγονται λευκοί οίνοι, έχει ερυθρωπό φλοιό. Από αμπελογραφική άποψη η σταφυλή του είναι μεγάλη προς πολύ μεγάλη, κωνική, πυκνόραγη έως αραιόραγη. Οι ράγες του είναι μετρίου μεγέθους, σφαιρικές, ενώ ο φλοιός τους ανάλογα με τον βαθμό ωρίμανσης, την απόδοση και την έκθεση στον ήλιο ποικίλει από ανοιχτό ρόδινο χρώμα έως ερυθρό. Το ανεπτυγμένο φύλλο του είναι μέτριο προς μεγάλο, κυρίως τρίκολπο, με τους ανώτερους κόλπους βαθείς σε σχήμα V και τον μισχικό κόλπο κλειστό με σχήμα V ή

U. Όσον αφορά τις ιδιότητές του και την καλλιεργητική του συμπεριφορά, ο Ροδίτης είναι μια ποικιλία πολύ ζωνηρή και παραγωγική. Ευδοκίμει σε εδάφη γόνιμα, δροσερά και αργιλοασβεστώδη. Πρόκειται για ποικιλία πολύ ευαίσθητη στον περονόσπορο και το ωίδιο (Σταυρακάκης, 2010).

Παρά τα όσα αναφέρθηκαν, αν ο Ροδίτης φυτευτεί σε αμπελώνες μέτριου προς υψηλού υψόμετρο, με τρόπο σωστό, περιορισμένη παραγωγή και σε εδάφη μέτριας γονιμότητας μπορεί να δώσει οίνους πολύ υψηλής ποιότητας. Ένας τέτοιος οίνος θα χαρακτηρίζεται από αρώματα εσπεριδοειδών, λεμονανθών, λευκόσαρκων φρούτων και νότες ορυκτότητας σε ορισμένες περιπτώσεις. Στο στόμα παρουσιάζει μέτριο όγκο και δροσερή οξύτητα. Ο Ροδίτης δίνει τους οίνους Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης ΠΟΠ Πάτρα, ΠΟΠ Πλαγιές Μελίτωνα και ΠΟΠ Αγκιάλος (Wines Of Greece), ενώ θεωρείται και η βασική ποικιλία της ρετσίνας. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω του ερυθρωπού φλοιού του αλλά και των φρέσκων αρωμάτων του δίνει και πολύ καλής ποιότητας ροζέ οίνους.

1.2 ΤΟ ΑΡΩΜΑ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ

Η αντίληψη του αρώματος του οίνου είναι αποτέλεσμα πολλαπλών αντιδράσεων μεταξύ των χημικών ενώσεων που περιλαμβάνει και των αισθητήριων υποδοχέων του ανθρώπου. Οι ενώσεις δρουν είτε συνεργιστικά, με την παρουσία μια ένωσης να τονίζει την αντίληψη μιας άλλης, είτε ανταγωνιστικά, όταν μια ένωση μειώνει την αντίληψη μιας άλλης (Styger, 2011).

Το χημικό προφίλ του οίνου εξαρτάται κυρίως από το σταφύλι, τη ζυμωτική μικροχλωρίδα (και κυρίως του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*), τις δευτερεύουσες μικροβιακές ζυμώσεις που μπορεί να συμβούν, την παλαίωση και τις συνθήκες αποθήκευσης. Η σύσταση του σταφυλιού με τη σειρά της εξαρτάται από την ποικιλία, τον κλώνο του φυτού, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το *terroir* (Styger, 2011).

Οι μύκητες που είναι υπεύθυνοι για τη ζύμωση συμβάλλουν στο άρωμα του οίνου μέσω διαφόρων μηχανισμών: αρχικά χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα διάφορες ουσίες του γλεύκους που μετατρέπουν σε πτητικές ενώσεις, δεύτερον παράγοντας ένζυμα που μετατρέπουν ουδέτερες ουσίες του σταφυλιού σε ενεργά αρωματικές ενώσεις και τέλος συνθέτοντας πρωτογενείς (αιθανόλη, γλυκερόλη, οξικό οξύ και ακεταλδεΐδη) και

δευτερογενείς μεταβολίτες (εστέρες, ανώτερες αλκοόλες, λιπαρά οξέα κ.α.) (Styger, 2011).

Οι αρωματικές ενώσεις, όπως αναφέρθηκε, παράγονται στα σταφύλια και/ή μέσω της οινοποίησης και χωρίζονται, συνοπτικά, σύμφωνα με την περίοδο που σχηματίζονται σε:

- Ενώσεις του ποικιλιακού αρώματος: τα σταφύλια είναι φρούτα συνήθως χωρίς άρωμα, εκτός από ορισμένες ποικιλίες όπως το Μοσχάτο. Παρ' όλα αυτά μπορούν να δώσουν ποιοτικά κρασιά, λόγω της παρουσίας άοσμων πρόδρομων ενώσεων οι οποίες κατά την οινοποίηση μετατρέπονται σε αρωματικές ενώσεις χαρακτηριστικές διαφόρων ποικιλιών
- Αρώματα ζύμωσης: ενώσεις όπως οι αιθυλεστέρες και οι ανώτερες αλκοόλες, που είναι υποπροϊόντα του μεταβολισμού των ζυμών και είναι υπεύθυνες για το φρουτώδες άρωμα που συναντάμε συνήθως στους οίνους.
- Τριτογενές άρωμα: σε αυτό συμβάλλουν ουσίες που παράγονται κατά την παλαίωση των οίνων και αυξάνουν την πολυπλοκότητα του μπουκέτου.

1.2.1 Ποικιλιακό άρωμα

Παρ' ότι η σύσταση των περισσότερων σταφυλιών είναι σχεδόν η ίδια, υπάρχουν κάποιες βασικές διαφορές στο άρωμα της κάθε ποικιλίας. Αυτές οι διαφορές μπορούν ως επί το πλείστον να αποδοθούν σε σχετικά μικρές παραλλαγές στις αναλογίες των ενώσεων που αποτελούν το προφίλ αρώματος μιας ποικιλίας. Μόνο μερικές πτητικές ενώσεις έχουν συνδεθεί άμεσα με συγκεκριμένο ποικιλιακό άρωμα. Μερικές από αυτές φαίνονται στον Πίνακα 1. Και παρόλο που οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις συναντώνται στα σταφύλια και στον οίνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις, έχουν τεράστιο αντίκτυπο στο συνολικό αρωματικό προφίλ.(Styger, 2011).

Το ποικιλιακό ή πρωτογενές άρωμα με το οποίο ταυτίζεται η κάθε ποικιλία και η ποιότητα του οίνου, δεν εκφράζεται πάντα στο γλεύκος. Υπάρχουν γλεύκη με πλούσιο αρωματικό δυναμικό όπως για παράδειγμα του Μοσχάτου και γλεύκη άοσμα που δίνουν όμως πολύ αρωματικούς οίνους, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του Sauvignon Blanc. (Roland, A., 2011).

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικές οσμές και οι αντίστοιχες χημικές ενώσεις που συναντώνται σε ορισμένες ποικιλίες

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΗ ΟΣΜΗ	ΕΝΩΣΗ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ
Ανθικό άρωμα	Linalool	Μοσχάτο
Κιτρώδες, ανθικό	Geraniol	Μοσχάτο
Κηροζίνη, πετρέλαιο	1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene	Riesling
Πράσινη πιπεριά	3-isobutyl-2-methoxypyrazine	Sauv.Blanc
Grapefruit, φλούδα λεμονιού	3-Mercapto-1-hexanol (R ισομερές)	Sauv.Blanc
Passion fruit	3-Mercapto-1-hexanol (S ισομερές)	Sauv.Blanc
Μαύρο πιπέρι	Rotundone	Syrah

Τα βασικά συστατικά που συμβάλουν στο πρωτογενές άρωμα, βρίσκονται στον φλοιό των σταφυλιών και μπορούν να ομαδοποιηθούν σε:

1. **Μεθόξυ-πυραζίνες**, είναι εκείνα τα συστατικά που θα δώσουν στο τελικό προϊόν χορτώδες άρωμα (πιπεριά, φασόλι). Σημαντικότερες ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι η 2-methoxy-3-isopropylpyrazine, η 2-methoxy-3-sec-butylpyrazine και η 2-methoxy-3-isobutylpyrazine και προσδίδουν οσμές που θυμίζουν πράσινη πιπεριά και σπαράγγι . Οι ενώσεις αυτές ταυτοποιήθηκαν πρώτη φορά στα σταφύλια το 1975 από τους Bayonove et al. και πιο συγκεκριμένα στην ποικιλία Cabernet Sauvignon. Τις συναντάμε όμως και σε άλλες όπως Sauvignon Blanc, Cabernet Franc, Pinot Noir, το Merlot κ.α (Ribereau-Gayon, 2006). Αυτές οι ενώσεις του αρώματος είναι αζωτούχοι ετεροκυκλικοί δακτύλιοι που παράγονται από τον μεταβολισμό των αμινοξέων.

Η συγκέντρωση της 2-methoxy-3-isobutylpyrazine στο Sauvignon Blanc και στο Cabernet Sauvignon στο γλεύκος και στον οίνο ποικίλει από 0,5-50ng/l, ενώ σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά το άρωμα των οίνων.

2. **Θειόλες**, Οι ποικιλιακές θειόλες και κυρίως η 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP), η 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) και η 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) έχουν ταυτοποιηθεί ως μόρια-κλειδιά που συμβάλλουν στο άρωμα των νεαρών οίνων διαφόρων ποικιλιών. Οι ενώσεις αυτές ανήκουν στο ποικιλιακό άρωμα γιατί συναντάμε άοσμες πρόδρομες ουσίες τους στο γλεύκος που μετατρέπονται σε πτητικές ενώσεις μέσω της αλκοολικής ζύμωσης. Στον Πίνακα 2 αναφέρονται οι χαρακτηριστικές οσμές που προσδίδουν οι σημαντικότερες ενώσεις της ομάδας των θειολών

Πίνακας 2 Χαρακτηριστική οσμή των σημαντικότερων θειολικών ενώσεων (Roland, 2011)

ΘΕΙΟΛΗ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΗ ΟΣΜΗ	ΚΑΤΩΦΛΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ (ng/l)	ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (ng/l)
4-methyl-4-mercaptopentan-2-one (4MMP)	Box-tree, φραγκοστάφυλο, βλαστός	0.8	μέχρι 400
3-mercaptohexyl acetate (3MHA)	Box-tree	4.2 σε ρακεμικό μείγμα	μέχρι 2500
3-mercaptohexan-1-ol (3MH)	Γκρέιπφρουτ, passion fruit	60 σε ρακεμικό μείγμα	μέχρι 19000

Οι παραπάνω θειόλες συμβάλλουν και στο άρωμα των νεαρών οίνων Sauvignon blanc. Το κατώφλι αντίληψής τους είναι πολύ χαμηλό, σε επίπεδα ng/L, έτσι η συγκέντρωσή τους είναι πάντα πάνω από το κατώφλι αντίληψης και η συμβολή τους στον φρουτώδες χαρακτήρα των οίνων πολύ σημαντική.

Οι θειόλες στο γλεύκος συναντώνται σε άοσμη μορφή, ενωμένες με κυστεΐνη ή γλουταθειόνη. Κατά την αλκοολική ζύμωση όμως απελευθερώνονται και δίνουν οίνους με έντονο άρωμα, όπως το Sauvignon blanc. Το 2000, οι Peyrot des Gachons et al. μέτρησαν την εξέλιξη των πρόδρομων ενώσεων που περιείχαν κυστεΐνη (Cys3MH, Cys4MMP & Cys4MMPOH) στην ποικιλία Sauvignon Blanc από το Bordeaux, ένα μήνα πριν το τρύγο για δυο συνεχόμενες εσοδείες. Η σύγκριση έδειξε μεγάλη διαφορά στην ποσότητα των πρόδρομων, η οποία μάλλον οφείλεται στη σύνθεση του γλεύκους (πχ. αφομοιώσιμο άζωτο). Η ωρίμανση είχε άμεση επίδραση στη συγκέντρωση των πρόδρομων ενώσεων, αυξάνοντας την αρχική συνολική τους ποσότητα στις ράγες. Η συγκέντρωση των πρόδρομων θειολών με κυστεΐνη του Sauvignon blanc φαίνεται να επηρεάζεται και από την έλλειψη νερού (Chone, 2001). Η συγκέντρωση της Cys3MH είναι ανάλογη με την έλλειψη νερού, ενώ η Cys4MMP είναι αντιστρόφως ανάλογη με αυτή. Οι Tominaga, et al. (2006) έδειξαν πως σταφύλια Sauvignon blanc και Semillon προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea* περιείχαν υψηλότερη συγκέντρωση 3MH σε σχέση με υγιή σταφύλια.

Η συγκέντρωση των πρόδρομων θειολών φαίνεται να συνδέεται με τη σύσταση του γλεύκους. Το επίπεδο αζώτου στο φυτό επηρεάζει τις πρόδρομες ενώσεις με κυστεΐνη (Cys3MH, Cys4MMP και Cys4MMPOH) στο Sauvignon Blanc (Chone., 2006). Όσο περισσότερο άζωτο υπάρχει στο γλεύκος, τόσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση των πρόδρομων θειολών. Επίσης ο συνδυασμός προσθήκης διαφυλλικού αζώτου και θειαφιού σε σταφύλια Sauvignon blanc ενισχύει τη συγκέντρωση των ποικιλιακών θειολών (Lacroux, 2008).

3. **Τερπένια**, το μονοτερπένια (10 άτομα C) και τα σесκιτερπένια είναι οι δύο κατηγορίες από την ομάδα των τερπενίων που είναι οι πιο οσμηρές. Τα μονοτερπένια εμφανίζονται με τη μορφή απλών υδρογονανθράκων, αλδεϋδών, αλκοολών, οξέων ακόμα και εστέρων. Οι τερπενικές ενώσεις φαίνεται πως είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό άρωμα του Μοσχάτου, και κυρίως η λιναλοόλη, η α-τερπινεόλη και η γερανιόλη. Στο Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα σημαντικότερα μονοτερπένια με τη χαρακτηριστική οσμή που προσδίδουν (Ribereau-Gayon, 2006).

Πίνακας 3 Σημαντικότερα μονοτερπένια και η χαρακτηριστική οσμή που προσδίδουν

ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΙΟ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΗ ΟΣΜΗ
Linalol	Τριαντάφυλλο
α -Terpineol	Κρίνος
Citronellol	Σιτρονέλα
Nerol	Τριαντάφυλλο
Geraniol	Τριαντάφυλλο

Τα μονοτερπένια στα σταφύλια υπάρχουν τόσο σε ελεύθερη όσο και σε άοσμη γλυκοσιδιωμένη μορφή. Η αναλογία των μορφών που συναντάμε εν τέλει στο σταφύλι εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, με τα ώριμα σταφύλια να περιλαμβάνουν μεγαλύτερη ποσότητα των άοσμων μορφών. Κατά την αλκοολική ζύμωση απελευθερώνονται τα ένζυμα γλυκοζιδάσες, που απελευθερώνουν τα άοσμα, δεσμευμένα τερπένια τα οποία πλέον συμμετέχουν στο άρωμα των οίνων. Έρευνες επίσης έχουν δείξει πως η επαφή με τους φλοιούς αυξάνει τη συγκέντρωση τόσο των ελεύθερων όσο και των δεσμευμένων τερπενίων και άλλες πως υπάρχουν ζυμομύκητες που από μόνες τους μπορούν να συνθέσουν μονοτερπένια χωρίς την παρουσία κάποιας πρόδρομη ένωσης στο σταφύλι (Styger, 2011).

1.2.2 Άρωμα που συντίθεται από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση

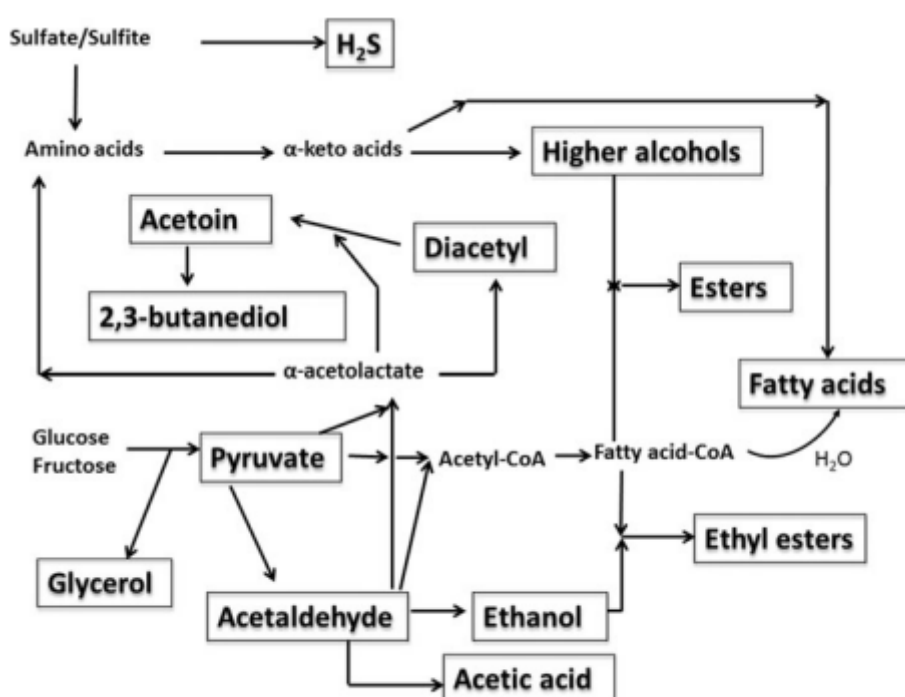
Οι ζύμες επηρεάζουν το άρωμα μέσω των παρακάτω μηχανισμών:

1. έλεγχος ή και περιορισμός της φυσικής μικροχλωρίδας
2. αλκοολική ζύμωση
3. σύνθεση αρωματικών ενώσεων κατά την αλκοολική ζύμωση
4. μετατροπή των ουδέτερων ή άοσμων ενώσεων του αρώματος στο σταφύλι σε ενεργές αρωματικές ενώσεις
5. επίδραση της αυτόλυσης των ζυμών στους νεαρούς οίνους
6. επιρροή που ασκούν τα γαλακτικά και άλλου είδους βακτήρια.

Από τα παραπάνω η σύνθεση αρωματικών ενώσεων κατά την αλκοολική ζύμωση ίσως είναι ο σημαντικότερος μηχανισμός, καθώς οι ενώσεις αυτές είναι που βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους οίνους και επηρεάζουν το άρωμά τους (Styger, 2011).

Το άρωμα που αναπτύσσεται κατά την αλκοολική ζύμωση ή δευτερογενές άρωμα είναι ιδιαίτερα πλούσιο και πολύπλοκο στους νεαρούς οίνους. Χαρακτηρίζεται κυρίως από αρώματα φρούτων αλλά μπορεί να έχει και δυσάρεστη επίδραση, όπως συμβαίνει στην περίπτωση παραγωγής υψηλής συγκέντρωσης οξικού οξέος ή της ακεταλδεΐδης (Styger, 2011).

Μερικοί από τους πτητικούς μεταβολίτες των ζυμών που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση ανήκουν στις κατηγορίες των ανώτερων αλκοολών, των εστέρων, των καρβονυλικών ενώσεων, των πτητικών οξέων, των θειούχων ενώσεων κ.α. (Εικόνα 1).



Εικόνα 1 Μερικές από τις σημαντικότερες κατηγορίες αρωματικών ενώσεων που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση (Styger, 2011)

1. **Ανώτερες Αλκοόλες:** οι αλκοόλες που συναντώνται σε αφθονία στο κρασί, εκτός από την αιθανόλη και τη γλυκερόλη, είναι οι ανώτερες αλκοόλες. Η αιθανόλη συμβάλλει στη διαμόρφωση ιξώδους, εξισορροπεί τη γεύση και σταθεροποιεί τις οσμές ενώ η ανώτερες αλκοόλες και η γλυκερόλη συμβάλλουν έντονα στην πολυπλοκότητα του αρώματος του κρασιού και στην συνολική αίσθηση που αφήνει στο στόμα (Carpena, 2021).

Οι ανώτερες αλκοόλες είναι αποτέλεσμα του καταβολισμού των αμινοξέων μέσω της αντίδρασης Ehrlich, που επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα τη σύνθεση πτητικών ενώσεων (Carpena, 2021). Τα βασικά αμινοξέα που οδηγούν στον σχηματισμό των ανώτερων αλκοολών είναι η βαλίνη, η λευκίνη και η ισολευκίνη (Stryger, 2011). Οι ανώτερες αλκοόλες λειτουργούν και ως πρόδρομες ενώσεις των εστέρων.

Οι βασικότερες ουσίες της κατηγορίας αυτής είναι η 1-propanol, η isobutanol και η isoamyl alcohol. Σε συγκέντρωση μέχρι 500-600mg/L οι ανώτερες αλκοόλες προσφέρουν πολύπλοκο άρωμα με φρουτώδη χαρακτηριστικά, ενώ σε συγκεντρώσεις άνω των 600 mg/L προσδίδουν έντονη, βαριά οσμή (Bertrand, 1981). Ωστόσο σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις συνεισφέρουν θετικά στο μπουκέτο και στην ένταση του αρώματος (Rapp, 1991). Η 1-propanol που συναντάται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις έχει ουδέτερη οσμή και έτσι δεν συμβάλλει σημαντικά στο άρωμα του οίνου. Η 1-hexanol δίνει στο κρασί χορτώδη οσμή, ενώ η 2-phenyl-ethanol έχει οσμή τριαντάφυλλου και επιδρά θετικά στον αρωματικό χαρακτήρα του οίνου (Σουφλερός, 2015).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν περισσότερο τη συγκέντρωση των αλκοολών στο κρασί είναι κυρίως το στέλεχος του ζυμομύκητα και στη συνέχεια η θερμοκρασία, το pH, το οξυγόνο και η σύσταση του γλεύκους (Carpena, 2021).

2. **Εστέρες:** πολύ σημαντική ομάδα ενώσεων που συμβάλλει στην πολυπλοκότητα του αρώματος των οίνων. Χωρίζονται σε αιθυλεστέρες και οξικούς εστέρες. Στην πρώτη κατηγορία ξεχωρίζουν οι ethyl hexanoate, ethyl octanoate και ethyl decanoate, με την αιθανόλη να συμβάλλει σημαντικά στον σχηματισμό τους. Στην δεύτερη κατηγορία οι ανώτερες αλκοόλες είναι εκείνες που δρουν ως πρόδρομες και βοηθούν τον σχηματισμό των οξικών εστέρων και σημαντικότερες ενώσεις είναι ο isoamyl acetate, ο 2-phenylethyl acetate (2PA), ο hexyl acetate, ο isobutyl acetate κ.α. (Carpena, 2021).

Το επίπεδο των εστέρων στους οίνους εξαρτάται από το στέλεχος του ζυμομύκητα, από την ποικιλία του σταφυλιού, την θερμοκρασία της ζύμωσης, τη σύσταση και το pH του γλεύκους κ.α. Ο αερισμός ωστόσο κατά την αλκοολική ζύμωση έχει δυσμενή επίδραση στον σχηματισμό τους.

Στον Πίνακα 4 εμφανίζονται οι σημαντικότεροι εστέρες και η επίδραση που έχουν στο άρωμα του οίνου (Carpena, 2021).

Πίνακας 4 Σημαντικότεροι εστέρες και η επίδρασή τους στο άρωμα των οίνων

ΕΣΤΕΡΑΣ	ΘΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ
Ethyl acetate	Φρουτώδεις
Isoamyl acetate	Μπανάνα, αχλάδι
Isobutyl acetate	Μπανάνα, φρουτώδεις
2-phenylethyl acetate	Άνθη, φρουτώδεις
Hexyl acetate	Γλυκό, βλαστό
Ethyl hexanoate	Πράσινο Μήλο
Ethyl octanoate	Γλυκό
Ethyl decanoate	Άνθη

3. **Καρβονυλικές ενώσεις:** Η σημαντικότερη καρβονυλική ένωση που παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση είναι η ακεταλδεΐδη, με χαρακτηριστική οσμή «χτυπημένου», ώριμου μήλου ή καρυδιού. Το κατώφλι αντίληψής της είναι στα 100mg/L , αλλά στον οίνο συναντάται συνήθως στα 10-75mg/L. Με την πάροδο του χρόνου η συγκέντρωσή της αυξάνεται λόγω οξείδωσης. Στους λευκούς οίνους η ύπαρξή της σε συγκέντρωση πάνω από 100mg/L είναι σημάδι οξείδωσης (Σουφλερός, 2015).

Στην κατηγορία των καρβονυλικών ενώσεων ανήκει και το διακετύλιο που δίνει χαρακτηριστική οσμή βουτύρου ή καραμέλας. Το κατώφλι αντίληψής τους είναι 0,2mg/L στους λευκούς οίνους και 2,8mg/L στους ερυθρούς. Πάνω από 5 mg/L έχει αρνητική επίδραση στο άρωμα καθώς προσομοιάζει με χαλασμένο βούτυρο. Παράγεται κυρίως από τα γαλακτικά βακτήρια κατά την μηλογαλακτική ζύμωση (Σουφλερός, 2015).

4. **Θειούχες ενώσεις:** Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι μερκαπτάνες και διάφορα σουλφίδια που παράγονται από τις ζύμες μέσω της αποικοδόμησης θειούχων αμινοξέων. Η σημαντικότερη ουσία της συγκεκριμένης κατηγορίας είναι το υδρόθειο (H₂S) που δίνει οσμή «κλούβιου αυγού» και έχει κατώφλι αντίληψης 10-80mg/L. Το H₂S παράγεται από τις ζύμες από οργανικές και ανόργανες θειούχες ενώσεις. Η ποσότητα που παράγεται ποικίλει ανάλογα με τη περιεκτικότητα του μέσου σε θειούχες ενώσεις, το στέλεχος της ζύμης, τις συνθήκες ζύμωσης αλλά και την ύπαρξη άλλων θρεπτικών συστατικών που

χρειάζονται για την ανάπτυξή τους. Στους λευκούς οίνους η περιεκτικότητα του H_2S είναι αντιστρόφως ανάλογη με την αρχική ποσότητα N_2 και γλουταθειόνης στο μέσο ανάπτυξης. Τέλος σταφύλια πλούσια σε οργανικό θείο μπορεί να ευνοήσουν την παραγωγή του. Όταν το H_2S αντιδράσει με αιθανόλη ή ακεταλδεΐδη, παράγονται οι μερκαπτάνες. Οι επιπτώσεις τους στο άρωμα των οίνων είναι αρνητικές και μπορεί να προσδώσουν οσμές κρεμμυδιού, καουτσούκ, μαγειρεμένο λάχανο κ.α. (Swiegers, 2005)

1.2.3 Άρωμα που αναπτύσσεται κατά την παλαίωση των οίνων

Η παλαίωση του οίνου, είτε στη φιάλη είτε σε βαρέλι, οδηγεί σε μείωση του χαρακτηριστικού αρώματος που συνδέεται με την ποικιλία και τη ζυμωτική διαδικασία και σε σύνθεση νέων αρωμάτων. Πιο συγκεκριμένα η συγκέντρωση των αιθυλεστέρων μεταβάλλεται κατά την παλαίωση και η ωρίμανση των οίνων μαζί με τις λεπτές τους λάσπες φαίνεται να μειώνει το φρουτώδες άρωμα και να αυξάνει τις αλκοόλες μακράς αλυσίδας και τα λιπαρά οξέα. Επίσης έχει βρεθεί πως η παραμονή με τις λεπτές λάσπες μπορεί να απομακρύνει δυσάρεστες οσμές (Styger, 2011).

Όταν η παλαίωση γίνεται σε καινούρια βαρέλια παρατηρείται εκχύλιση διαφόρων ουσιών από το ξύλο όπως είναι η βανιλίνη, η λιγνίνη και διάφορες τανίνες. Τα δομικά χαρακτηριστικά του βαρελιού, δηλαδή το είδος του ξύλου, το πορώδες και η διαπερατότητα και η χημική του σύνθεση συμπεριλαμβανομένων των πολυφαινόλων, των τανινών και των πτητικών ενώσεων, μπορούν να επηρεάσουν την οξειδωτική παλαίωση του οίνου στα βαρέλια, αλλάζοντας τη σύνθεσή του και βοηθώντας στη σταθεροποίησή του. Επίσης στην χρήση δρύνων βαρελιών οφείλεται η παρουσία στον οίνο λακτονών που δίνουν οσμή ξύλου και καρύδας και προσθέτουν πολυπλοκότητα στο άρωμα και τη γεύση των οίνων (Styger, 2011).

1.3 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΟ ΑΜΠΕΛΙ

Το άζωτο αποτελεί το 1-4% ή ακόμα λιγότερο της συνολικής στερεής μάζας του σταφυλιού, παίζει όμως σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού, καθώς αποτελεί συστατικό των πρωτεϊνών, του DNA και της χλωροφύλλης (Verdenal, 2016). Έλλειψη αζώτου στα σταφύλια μπορεί να επηρεάσει διάφορες μεταβολικές διεργασίες και να καθυστερήσει την ανάπτυξη και την διαμόρφωση των βλαστών (Keller, 2020).

Το αμπέλι απαιτεί την προσθήκη λιπασμάτων, ιδιαίτερα αζωτούχων, ώστε να αναπτυχθεί αλλά και για να διασφαλιστεί η επαρκής περιεκτικότητα σε άζωτο στα σταφύλια. Η ικανοποιητική περιεκτικότητα αζώτου στα σταφύλια, άρα και στο γλεύκος, εξασφαλίζει τη σωστή έκβαση της αλκοολικής ζύμωσης. Επίσης έλλειψη αζώτου στο γλεύκος μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών της αλκοολικής ζύμωσης όπως είναι ενώσεις που συμβάλλουν στο άρωμα των παραγόμενων οίνων.

Παραδοσιακά, η λίπανση του αμπελώνα γίνεται προσθέτοντας λιπάσματα στο έδαφος ώστε να απορροφηθούν από τις ρίζες. Ωστόσο, λόγω του ότι η υπερβολική χρήση λιπασμάτων οδηγεί σε μόλυνση του εδαφικού ορίζοντα, αρχίζουν και εφαρμόζονται στα φυτά νέες τεχνικές λίπανσης. Μια από αυτές τις τεχνικές είναι η διαφυλλική εφαρμογή.

1.3.1 Χρήση διαφυλλικής ουρίας

Η λίπανση των αμπελιών με άζωτο παραδοσιακά γίνεται με προσθήκη θρεπτικών στο έδαφος ώστε να απορροφηθούν από τις ρίζες. Λόγω όμως των προβλημάτων μόλυνσης από την υπερβολική χρήση αζωτούχων λιπασμάτων, πλέον επιλέγεται η διαφυλλική λίπανση. Παρότι η τεχνική αυτή δεν αντικαθιστά πλήρως την εδαφική εφαρμογή, καθώς η ποσότητα αζώτου που απαιτεί το φυτό δεν μπορεί να διοχετευτεί εντελώς από τα φύλλα, δεδομένου ότι δεν είναι οι βασικές δομές του φυτού για την απορρόφηση μακροστοιχείων, μπορεί να βελτιώσει την αποδοτικότητα των θρεπτικών που προστίθενται. (Lasa, 2012).

Η ουρία είναι λίπασμα που χρησιμοποιείται ευρέως ως πηγή αζώτου καθώς είναι οικονομική και αφομοιώνεται γρήγορα και αποτελεσματικά από τα φυτά. Μελέτες έχουν δείξει ότι η διαφυλλική εφαρμογή της ουρίας στα αμπέλια μπορεί να επηρεάσει την γονιμότητα των οφθαλμών βάσης, τις αποθήκες αζώτου, τη συγκέντρωση των σταφυλιών σε αμινοξέα, την χλωροφύλλη, τις πτητικές και φαινολικές ενώσεις κ.α. (Verdenal, 2016, Baldi, 2017, Portu, 2017,2018). Έχει επίσης δειχθεί ότι η διαφυλλική εφαρμογή αζώτου στο αμπέλι αυξάνει το αφομοιώσιμο άζωτο (YAN) στο γλεύκος (Moss, 2016).

Εξασφαλίζοντας λοιπόν ικανοποιητικά επίπεδα αζώτου στο γλεύκος αποφεύγεται τυχόν αργή αλκοολική ζύμωση ή ακόμα και τερματισμός της. Η ποσότητα

αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου (YAN) που θεωρείται ικανοποιητική στο γλεύκος είναι 60-140mgN/L (Schreiner, 2014, Tahim and Mansfield, 2019). Οι Ancin-Azpillicuea et al. (2018) έδειξαν ότι η διαφυλλική εφαρμογή ουρίας στην ποικιλία Tempranillo αύξησε το YAN στο γλεύκος σταφυλιών που εφαρμόστηκαν 2kg N/ha κατά 29% και 107% όταν αυξήθηκε η ποσότητα σε 4kg N/ha.

Το άζωτο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο και στην παραγωγή πτητικών ενώσεων όπως είναι οι εστέρες, οι ανώτερες αλκοόλες και οι θειόλες στους οίνους. Η παραγωγή αυτή πραγματοποιείται κατά την αλκοολική ζύμωση μέσω της ενζυματικής δράσης των ζυμών (Bell and Henschke 2005). Οι θειόλες στο φυτό εμφανίζονται ως πρόδρομες ενώσεις S-κυστεΐνης. Η εφαρμογή ουρίας (10,15 και 20 kg N/ha) μαζί με θειάφι (5-10 kg S/ha) σε σταφύλια Sauv.blanc, Colombard, Gros manseng και Negrette αύξησε τη συγκέντρωση της 3-mercaptohexan-1-ol(3MH) και της 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) χωρίς να επηρεάζει την απόδοση, την ωρίμανση και την υγιεινή των σταφυλιών (Dufourcq, 2007). Οι Lacroux et al. (2008) έδειξαν ότι η διαφυλλική εφαρμογή της ουρίας(10kg N/ha) πριν τον περκασμό σε ποικιλία Sauvignon blanc, αύξησε τη συγκέντρωση της 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one (4MMP) σε σχέση με σταφύλια στα οποία δεν έγινε λίπανση με ουρία, ενώ η 3MH και η 3MHA δεν επηρεάστηκαν. Επίσης έδειξαν πως η εφαρμογή διαφυλλικής ουρίας μαζί με 5 kg S/ha θειάφι βελτίωσε τη συγκέντρωση γλουταθειόνης, 3MH, 3MHA και 3MMP στους οίνους σε σχέση με τον μάρτυρα.

Οι Ancin-Azpillicueta et al. (2011) και Gutierrez-Gamboa et al. (2018) ανέφεραν πως η εφαρμογή ουρίας (2 και 4 kg N/ha) και ουρίας (2kg N/ha) με θειάφι (0,5kg N/ha) αύξησαν τη συγκέντρωση αιθυλεστέρων όπως ο εξανοϊκός, ο οκτανοϊκός και ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να οφείλονται στο θετικό αντίκτυπο που έφεραν οι συγκεκριμένες εφαρμογές στη συγκέντρωση του αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου στο γλεύκος.

Η λίπανση του αμπελώνα με διαφυλλική ουρία όπως αναφέρθηκε δίνει τη δυνατότητα να τροποποιηθούν οι πτητικές ενώσεις των σταφυλιών και των οίνων. (Bell and Henschke 2005, Verdenal, 2015). Μερικές μελέτες δείχνουν ότι η καταλληλότερη περίοδος να εφαρμοστεί η ουρία στον αμπελώνα για να έχει αυτά τα αποτελέσματα είναι ο περκασμός (Lasa, 2012). Οι Spring and Lorenzini (2006) έδειξαν ότι προσθήκη μειωμένης ποσότητας N (20kg/ha) στα φύλλα την περίοδο του περκασμού απέδωσε

περίπου την ίδια ποσότητα αζώτου στο γλεύκος με την προσθήκη στο έδαφος μεγαλύτερης ποσότητας N (50kg/ha) την άνοιξη. Οι Lasa et al. (2012) απέδειξαν ότι εφαρμογή αζώου μέσω διαφυλλικής ουρίας σε Sauvignon blanc είχε καλύτερα αποτελέσματα όταν έγινε τρεις εβδομάδες μετά τον περκασμό ενώ στο Merlot κατά τον περκασμό. Επίσης περιέγραψαν αυξημένο YAN σε γλεύκη σταφυλιών στα οποία η διαφυλλική ουρία εφαρμόστηκε στον περκασμό απ' ότι στην άνθηση. Συμπερασματικά η διαφυλλική εφαρμογή της ουρίας στον πλήρη περκασμό οδηγεί σε πιο αποτελεσματική και πιο εύκολη απορρόφησή της από τα φύλλα σε σχέση με εφαρμογή της στην έναρξη του περκασμού ή με το πέρας του.

1.3.2 Διαφυλλική χρήση αδρανοποιημένων ζυμομυκήτων στο αμπέλι

Τα φυτά υπόκεινται σε διάφορες απειλές όπως επιθέσεις παθογόνων (μύκητες, ιοί, έντομα, νηματώδεις) και αντίξοες συνθήκες (ξηρασία, αλατότητα, θερμοκρασία, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία). Βέβαια, έχουν υποδοχείς και αισθητήρες για να αναγνωρίζουν μια απειλή ή αλλιώς διεγέρτες που ενεργοποιούν αμυντικές αντιδράσεις για να σταθεροποιηθούν έναντι αυτών των απειλών (Valadas,2019).

Αυτές οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών. Στο φυτό της αμπέλου, δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται και συσσωρεύονται στις ράγες του σταφυλιού και περιλαμβάνουν: πτητικές ενώσεις, φλαβονοειδή και τανίνες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι απαραίτητοι για την προστασία των φυτών από έντομα, παράσιτα, φυτοφάγα, φυτοπαθογόνα και την προσαρμογή των φυτών στο περιβάλλον ακόμη και αν και δεν έχουν ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση των ζωτικών διαδικασιών των φυτών (Valadas, 2019).

Πιο συγκεκριμένα και σύμφωνα με τους Radman et al. (2003) ως διεγέρτης μπορεί να οριστεί μια ουσία που προκαλεί ή αυξάνει τη βιοσύνθεση συγκεκριμένης ένωσης προκειμένου να προσαρμοστούν τα φυτά σε στρεσογόνες συνθήκες. Οι βιοτικοί διεγέρτες είναι ουσίες βιολογικής προέλευσης, μέρη ζωντανών οργανισμών, είτε από παθογόνα είτε από το ίδιο το φυτό (Patel & Krishnamurthy, 2013). Οι διεγέρτες μπορεί να είναι: μύκητες, βακτήρια, θραύσματα φυτικού κυτταρικού τοιχώματος και χημικές ουσίες που απελευθερώνονται στο σημείο επίθεσης, όταν ένα φυτό βρίσκεται εκτεθειμένο.

Μεταξύ των βιολογικών διεγερτών, τα υπολείμματα ζυμών περιλαμβάνουν ενώσεις (ενεργοποιητές διαφόρων λειτουργιών άμυνας των φυτών) που μπορούν να λειτουργήσουν ως διεγέρτες. Τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών αποτελούνται από μανοπρωτεΐνες, γλουκάνες και χιτίνη, ενώ η πλασματική τους μεμβράνη από λιπίδια, στερόλες και πρωτεΐνες. Τα υπολείμματα των ζυμών έχουν χρησιμοποιηθεί στην καλλιέργεια φυτικών ιστών λόγω της ικανότητάς του να ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών.

Πρόσφατα, κατά την οινοποίηση, έχουν χρησιμοποιηθεί αδρανοποιημένες ζύμες, που είναι παράγωγα του *Saccharomyces cerevisiae*, με σκοπό να βελτιώσουν ή να διατηρήσουν την αρωματική σύνθεση των οίνων ή ακόμα και για να βελτιώσουν την αίσθηση στο στόμα. Και παρότι οι ιδιότητές τους είναι γνωστές τόσο στον κλάδο της οιнологίας όσο και της αμπελουργίας, ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει για τη χρήση των απενεργοποιημένων ζυμών στο πρέμνο σε συνθήκες αμπελώνα.

Οι αδρανοποιημένες ζύμες μπορούν να θεωρηθούν διεγέρτες, καθώς αλλάζουν τη φαινολική σύσταση των σταφυλιών, μέσω της αλληλεπίδρασης φυτού-παθογόνου. Οι ζύμες αναγνωρίζονται από το φυτό ως παθογόνα με αποτέλεσμα να ενεργοποιούν στο φυτό αμυντικούς μηχανισμούς και να ενισχύουν τον δευτερογενή μεταβολισμό στον ώριμο καρπό.

1.3.2.1 Πλεονεκτήματα στην αμπελουργία

Η διαδικασία της οινοποίησης ξεκινάει από τον αμπελώνα, άρα οι παρεμβάσεις που γίνονται στο φυτό είναι πολύ σημαντικές. Η διαφυλλική εφαρμογή αδρανοποιημένων ζυμομυκήτων έχει σημαντικά πλεονεκτήματα που αφορούν την προστασία του σταφυλιού, την ασφαλή ανάπτυξη του φυτού και την ομοιογένεια στην ωρίμανση.

Η προστασία του φυτού βελτιώνεται λόγω της αύξησης του πάχους του φλοιού. Επιπλέον ο φλοιός αποτελεί άμυνα εναντίον καταστροφών από φυσικούς τραυματισμούς ή επίθεση από παθογόνα (Negri, 2008), επομένως μετά την εφαρμογή θα υπάρχει λιγότερη ζημιά σε περίπτωση μηχανικού τρύγου και μικρότερη επίδραση από έντομα και παθογόνα, τα οποία λόγω της κλιματικής αλλαγής εμφανίζονται συχνότερα (Lallemand, 2018).

Επιπλέον, εφαρμόζοντας αδρανοποιημένους ζυμομύκητες παρατηρείται η προαγωγή της φαινολικής ωριμότητας και της σύνθεσης αρωματικών πρόδρομων ενώσεων ,

επιφέροντας έτσι ισορροπία μεταξύ της φαινολικής και τεχνολογικής ωρίμανσης. Αυτή η προαγωγή της φαινολικής ωριμότητας μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα έναν πιο πρώιμο τρύγο μειώνοντας τους κινδύνους μιας καθυστερημένης συγκομιδής (βροχές, παγετός, επιθέσεις ζώων που αναζητούν τα υπερώριμα σταφύλια) (Lallemand, 2018).

1.3.2.2 Πλεονεκτήματα στην οινολογία

Παρ' ότι η εφαρμογή των αδρανοποιημένων ζυμών γίνεται στο αμπέλι, έχει θετική επίπτωση στο τελικό προϊόν, τον οίνο. Αυξάνεται και βελτιώνεται η συγκέντρωση συγκεκριμένων ενώσεων, μειώνονται ανεπιθύμητες οσμές και επιθετικά χαρακτηριστικά, μειώνεται η ανάγκη προσθήκης οινολογικών προϊόντων, διευκολύνονται διάφορες διαδικασίες, βελτιώνεται η αίσθηση στο στόμα και αυξάνεται η διάρκεια ζωής του προϊόντος.

Η εφαρμογή τους βελτιώνει την ισορροπία στο σταφύλι, καθώς ενώσεις του φλοιού όπως οι αρωματικές πρόδρομες ενώσεις και η γλουταθειόνη αυξάνονται και βελτιώνονται. Αντί να προστεθεί γλουταθειόνη στο γλεύκος, προκειμένου να αποφευχθεί το καφέτιασμα, να αυξηθεί η παραγωγή κάποιων πτητικών θειολών κατά την ζύμωση και να μειωθεί η απώλεια τερπενίων, εστέρων και θειολών κατά την παλαίωση, η χρήση αδρανοποιημένων ζυμών στο αμπέλι μπορεί να ενισχύσει την ένωση αυτή στα σταφύλια. Τέλος αυξάνονται οι πρόδρομες αρωματικές ενώσεις και ενισχύονται τα ποικιλιακά αρώματα (Lallemand, 2018).

Μαζί με τις βελτιώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, αντίστοιχα προϊόντα απλοποιούν κάποιες διαδικασίες. Σύμφωνα με την Lallemand (2018), λόγω της αύξησης του φλοιού, διευκολύνεται η εκχύλιση και μειώνονται οι κίνδυνοι που μπορεί να προκύψουν κατά τη ζύμωση λόγω υπερώριμων σταφυλιών.

Συνολικά, ο οίνος βελτιώνεται, καθώς αποκτά πιο ισορροπημένο και πολύπλοκο χαρακτήρα και ενισχύεται τυχόν διαφοροποίηση που μπορεί να υπάρχει λόγω π.χ. διαφορετικού αμπελοτεμαχίου, δίνοντας στο κρασί χαρακτήρα και σταθερότητα αρωμάτων (Lallemand, 2018).

1.4 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

1.4.1 Απομόνωση πτητικών ενώσεων με εκχύλιση υγρού με υγρό.

Η εκχύλιση είναι μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές διαχωρισμού και βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων. Η συνήθης περίπτωση

διαχωρισμού με εκχύλιση είναι η υγρού με υγρό, δηλαδή η εκχύλιση ενός διαλύματος ουσιών με ένα υγρό. Η εκχύλιση αυτή με υγρούς διαλύτες βασίζεται στην κατανομή μιας διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο υγρών, τα οποία πρακτικώς δεν αναμειγνύονται μεταξύ τους.

Συνήθως στην εκχύλιση υγρού με υγρό η μια από τις δύο φάσεις είναι ένα υδατικό διάλυμα, ενώ η άλλη ένας οργανικός διαλύτης, οπότε τα μιν ανόργανα ιόντα και οι πολικές οργανικές ουσίες βρίσκονται κατά κύριο λόγο στην υδατική φάση, ενώ οι μη πολικές οργανικές ενώσεις στην οργανική φάση.

Όταν μια υγρή ουσία Α κατανέμεται μεταξύ δύο διαλυτών 1 και 2, στην κατάσταση ισορροπίας ισχύει η σχέση

$$K_D = A_2/A_1$$

όπου A_1 και A_2 είναι οι ενεργότητες της ουσίας στην φάση 1 και 2. Η σταθερά K_D είναι γνωστή ως συντελεστής κατανομής και για δεδομένο σύστημα διαλυτών εξαρτάται μόνο από την θερμοκρασία (Χατζηιωάννου, 2015).

Συνήθως κατά την εκχύλιση υγρού με υγρό, ορισμένος όγκος του προς εκχύλιση διαλύματος φέρεται σε επαφή με δεδομένο όγκο εκχυλιστικού μέσου μέσα σε διαχωριστική χοάνη και αναταράσσεται μέχρις ότου αποκατασταθεί ισορροπία. Μετά την αποκατάσταση ισορροπίας οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Για να θεωρηθεί επιτυχής ο διαχωρισμός ένας πάρα πολύ σημαντικός παράγοντας είναι η σωστή επιλογή του διαλύτη. Αυτός θα πρέπει να μην αντιδρά με την εκχυλιζόμενη υδατική φάση. Επίσης μετά την έντονη ανάδευση του διαλύτη με το υδατικό διάλυμα, οι δύο στιβάδες θα πρέπει να διαχωρίζονται εύκολα και γρήγορα. Για τον σκοπό αυτό η πυκνότητα d του διαλύτη θα πρέπει να είναι σημαντικά μεγαλύτερη ή σημαντικά μικρότερη από την πυκνότητα της υδατικής φάσης. Το διχλωρομεθάνιο και ο αιθέρας είναι δύο οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται ευρέως. Η πυκνότητα του διχλωρομεθανίου είναι μεγαλύτερη του ύδατος και έτσι στο διαχωρισμό κατευθύνεται προς το κάτω μέρος της χοάνης, ενώ με τον αιθέρα συμβαίνει το αντίθετο καθώς έχει πυκνότητα μικρότερη του ύδατος. Υπάρχουν χοάνες που επιτρέπουν την απομάκρυνση είτε της κατώτερης στιβάδας, είτε της υπερκείμενης (Χατζηιωάννου, 2015).

Άλλος ένας σημαντικός παράγοντας που θα επηρεάσει την επιλογή του διαλύτη είναι η ευκολία με την οποία οι ουσίες που εκχυλίζονται μπορούν να ανακτηθούν από το εκχυλιστικό μέσο. Αυτό πρέπει να μπορεί να γίνεται είτε με βρασμό είτε με επανεκχύλιση. Επίσης οι δύο φάσεις πρέπει να μην εμφανίζουν τάση σχηματισμού γαλακτωμάτων. Τέλος ο διαλύτης θα πρέπει να μην είναι τοξικός ή εύφλεκτος και να είναι οπτικά διαφανής.

1.4.2 Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Στην αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται αέρια κινητή φάση με στερεή ή υγρή στατική φάση. Σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους χρωματογραφίας, η κινητή φάση δεν αλληλοεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Ο ρόλος της είναι η μεταφορά των προς εξέταση ουσιών κατά μήκος μιας διαχωριστικής στήλης. Υπάρχουν δύο τύποι αέριας χρωματογραφίας: η χρωματογραφία αερίου-στερεού (GSC) και η χρωματογραφία αερίου-υγρού (GLC), με τη δεύτερη να είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη (Scoog, 2005). Η GLC βασίζεται στην κατανομή των πτητικών συστατικών μεταξύ ενός πτητικού υγρού (στατική φάση), καθηλωμένου σε στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών, κι ενός αερίου (κινητή φάση, φέρον αέριο). Ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών μέσα από τη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες, που εξαρτώνται από τις τάσεις ατμών των ατμών και τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση.

1.4.2.1 Οργανολογία Αέριας Χρωματογραφίας

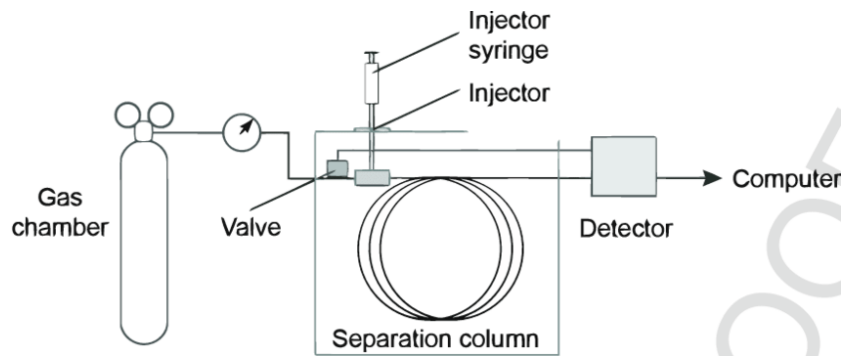
Τα βασικά σημεία στην διάταξη μιας Αέριας Χρωματογραφίας είναι τα ακόλουθα (Εικόνα 2):

1.Φέρον αέριο: Στα φέροντα αέρια, τα οποία πρέπει να είναι χημικώς αδρανή, περιλαμβάνονται το ήλιο, το άζωτο, το αργό και το υδρογόνο. Η επιλογή του φέροντος αερίου γίνεται με βάση τον τύπο ανιχνευτή που βρίσκεται στο τέλος της διαχωριστικής στήλης, γιατί το φέρον αέριο πρέπει να διαφέρει σημαντικά από τις διαχωριζόμενες ουσίες ως προς μια ιδιότητα πχ. θερμική αγωγιμότητα, πυκνότητα κλπ. , στην οποία βασίζεται η λειτουργία του ανιχνευτή. Το σύστημα παροχής του αερίου περιλαμβάνει ρυθμιστές πίεσης, μανόμετρα και ροόμετρα. Επιπλέον μπορεί να περιλαμβάνει «παγίδες» ή φίλτρα για απομάκρυνση υδρατμών ή άλλων ρύπων (Scoog, 2005).

Το φέρον αέριο από τη φιάλη που βρίσκεται σε υψηλή πίεση 100-200 atm. διαβιβάζεται μέσω ρυθμιστή (μειωτήρα) πίεσης, ο οποίος με σύστημα βαλβίδων μειώνει δραστικά την πίεση (συνήθως σε 1-2 atm πάνω από την ατμοσφαιρική πίεση) και στη συνέχεια μέσα από ροόμετρο με το οποίο μετρείται με ακρίβεια η ταχύτητά του. Η πολύ ακριβής μέτρηση της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου είναι απαραίτητη, ιδίως στην ταυτοποίηση ενώσεων, επειδή οι χρόνοι συγκράτησης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα. Οι ταχύτητες ροής μπορούν να μετρηθούν με απλό ροόμετρο σαπωνοδιαλύματος στην κεφαλή της στήλης. Με πίεση ελαστικής φούσκας σταγονόμετρου, που περιέχει διάλυμα απορρυπαντικού, σχηματίζεται ένα υμένιο σαπωνοδιαλύματος. Μετρείται ο χρόνος που απαιτείται για να κινηθεί το υμένιο μεταξύ δύο ενδείξεων ενός βαθμονομημένου ογκομετρικού σωλήνα και υπολογίζεται η ογκομετρική ταχύτητα ροής (Schoog, 2005).

2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος: Το δείγμα εισάγεται με μικροσύριγγα στην αρχή της στήλης, μέσα από κατάλληλο στόμιο εισαγωγής, που φράσσεται με παχύ διάφραγμα από θερμοανθεκτικό ελαστικό (septum), το οποίο δρα ως βαλβίδα, επιτρέποντας μόνο την είσοδο αλλά όχι την έξοδο του δείγματος ή του φέροντος αερίου. Για την επίτευξη καλών διαχωρισμών πρέπει: 1) η εισαγωγή του δείγματος να είναι ακαριαία, 2) ο όγκος του δείγματος να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος καθώς η διαχωριστικότητα ελαττώνεται όταν η ποσότητα του δείγματος αυξάνεται, 3) ο χώρος εισαγωγής να θερμαίνεται υψηλότερα από τη θερμοκρασία της στήλης (συνήθως 50°C πάνω από το σημείο βρασμού του λιγότερο πτητικού συστατικού του δείγματος), ώστε να επιτυγχάνεται άμεση εξαέρωση του δείγματος και παραλαβή ατμών από το φέρον αέριο (Χατζηιωάννου, 2015).

Ο όγκος του δείγματος προς ανάλυση είναι περίπου 0,5-2 mL αν πρόκειται για αέρια και 1-10 μ L αν πρόκειται για υγρά. Το μέγεθος του δείγματος καθορίζεται από τη διαθέσιμη ποσότητα, τη χωρητικότητα της στήλης (στις τριχοειδείς στήλες η χωρητικότητα είναι μικρότερη), την ευαισθησία του ανιχνευτή και από το είδος της στήλης (Χατζηιωάννου, 2015).



Εικόνα 2 Οργανολογία GC [https://www.researchgate.net/figure/Schemes-of-fibre-application-on-GC-MS_fig3_226435896, 22-5-2022]

3. Θερμοστατούμενος κλίβανος: Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος και η στήλη, και σε πολλούς αέριους χρωματογράφους και ο ανιχνευτής, θερμοστατούνται συνήθως στην περιοχή 50-300 °C, είτε όλα μαζί είτε χωριστά. Η διαχωριστικότητα αυξάνεται, όταν η θερμοκρασία μειώνεται. Όταν η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης (ισόθερμη ανάλυση), ο πλήρης διαχωρισμός και η ανίχνευση των συστατικών ενός μείγματος είναι πολύ δύσκολη, ειδικά όταν αυτά είναι πολυάριθμα ή τα σημεία ζέσεως τους ή /και οι πολικότητές τους καλύπτουν ευρείες περιοχές. Αυτό συμβαίνει γιατί οι κορυφές των πτητικότερων συστατικών (με χαμηλότερα σημεία ζέσεως) εμφανίζονται η μία κοντά στην άλλη ή αλληλοκαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό (μικρή διαχωριστικότητα), ενώ οι κορυφές των λιγότερο πτητικών συστατικών (με υψηλά σημεία ζέσεως) είναι μικρού ύψους, πλατιές και ορισμένες φορές απέχουν μεταξύ του (υπέμετρη διαχωριστικότητα) (Χατζηγιάννου, 2015).

Τα παραπάνω μειονεκτήματα της ισόθερμης λειτουργίας της στήλης αίρονται με την θερμοπρογραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία, στην οποία η θερμοκρασία της στήλης μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, με βάση προκαθορισμένο πρόγραμμα. Υπάρχει ποικιλία προγραμμάτων θέρμανσης και μεταβολής της θερμοκρασίας της στήλης, όπως γραμμική αύξηση της θερμοκρασίας, με σταθερή ταχύτητα αύξησης της θερμοκρασίας σε ολόκληρη τη χρησιμοποιούμενη περιοχή θερμοκρασιών ή με διαφορετική ταχύτητα αύξησης σε διάφορα τμήματα της περιοχής θερμοκρασιών κλπ. Στην περίπτωση της θερμοπρογραμματιζόμενης ανάλυσης εμφανίζονται διακριτές κορυφές για ενώσεις των οποίων τα σημεία ζέσεως βρίσκονται σε ευρεία περιοχή θερμοκρασιών, και μάλιστα σε μικρότερο χρόνο από ότι στην

ισόθερμη λειτουργία της στήλης. Επιπλέον οι κορυφές είναι οξύτερες και περισσότερο ομοιόμορφες (Χατζηιωάννου, 2015).

4. Στήλες (Χατζηιωάννου, 2015): Η στήλη αποτελεί το σπουδαιότερο τμήμα του αέριο χρωματογράφου και εκεί είναι που πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος. Τα κύρια χαρακτηριστικά μιας στήλης είναι 1) ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, 2) η διαχωριστικότητα, 3) η χωρητικότητα και 4) ο απαιτούμενος χρόνος για την ανάλυση. Υπάρχουν δύο είδη στηλών, οι πληρωμένες και οι τριχοειδείς. Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα σε μορφή σπειράματος ή U, ώστε να καταλαμβάνει όσο το δυνατόν λιγότερο χώρο. Κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, γυαλί αλλά πλέον πιο σύνηθες είναι πλαστικό υψηλής αντοχής στην θερμοκρασία. Οι πληρωμένες στήλες έχουν συνήθως μήκος 1-2 μ. και διάμετρο 3-10 mm ενώ οι τριχοειδείς έχουν μήκος 10-50 μ. και διάμετρο 0,2-1,2 mm.

Οι πληρωμένες στήλες περιέχουν στερεό υπόστρωμα, συνήθως από γη διατόμων ή κονιοποιημένο πυρίμαχο υλικό ή πορώδη οργανικά πολυμερή, διαποτισμένο με κατάλληλο υγρό, το οποίο αποτελεί την υγρή στατική φάση. Το στερεό υπόστρωμα πρέπει να είναι χημικώς αδρανές, να παρουσιάζει μεγάλη επιφάνεια και η κοκκομετρική σύστασή του να καλύπτει στενή περιοχή.

Οι τριχοειδείς στήλες συνήθως δεν έχουν στερεό υπόστρωμα (η υγρή στατική φάση συγκρατείται απ' ευθείας στα τοιχώματα του σωλήνα, με την μορφή λεπτού υμενίου) και γι' αυτό η χωρητικότητά τους είναι πολύ μικρή. Εξαιτίας της μικρής αντίστασής τους στη ροή του φέροντος αερίου και της μικρής πτώσης πίεσης κατά μήκος τους, είναι δυνατή η λειτουργία τριχοειδών στηλών μήκους μεγαλύτερου από 1.000μ. Βασικά πλεονεκτήματα των συγκεκριμένων στηλών είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησης εξαιρετικά μικρού δείγματος (1μg) και η υψηλή διαχωριστική ικανότητα, που οφείλεται στον πολύ μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών.

Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για την υγρή στατική φάση, διαφέρουν κυρίως ως προς τον βαθμό πολικότητας και την περιοχή θερμοκρασιών στην οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Η υγρή φάση πρέπει να έχει τις εξής ιδιότητες: 1) να είναι σταθερή και να έχει αμελητέα τάση ατμών στην θερμοκρασία που θα χρησιμοποιηθεί, 2) να είναι αδρανής έναντι των διαχωριζόμενων ενώσεων και του φέροντος αερίου, το οποίο πρέπει να είναι αδιάλυτο στην υγρή φάση, 3) να είναι καλός διαλύτης για τα συστατικά

του δείγματος, 4) να είναι αρκετά ρευστή στην περιοχή των θερμοκρασιών που χρησιμοποιείται και 5) να διατίθεται στο εμπόριο σε τυποποιημένη μορφή, κατά προτίμηση ως μια καθαρή ένωση γνωστού μοριακού βάρους.

Οι στατικές φάσεις χαρακτηρίζονται συνήθως ως μη πολικές, μέσης πολικότητας, πολικές και υψηλής πολικότητας, ανάλογα με τη δομή και τη διαχωριστική τους ικανότητα. Κατά κανόνα, η καταλληλότερη στατική φάση για δεδομένο δείγμα είναι εκείνη η οποία είναι ίδιας πολικότητας με αυτό. Όταν το δείγμα περιέχει άγνωστες ουσίες ή ενώσεις διαφορετικής πολικότητας επιλέγεται συμβιβαστική λύση και η κατάλληλη στατική φάση βρίσκεται με δοκιμές. Για ενώσεις όπως είναι οι κετόνες, οι αλδεΐδες, οι εστέρες κατάλληλες είναι οι στήλες μέσης πολικότητας. Για ενώσεις όπως οι ανώτερες αλκοόλες, τα καρβονυλικά οξέα, οι φαινόλες κατάλληλες είναι πολικές στήλες.

5. Ανιχνευτές (Χατζηιωάννου, 2015): Με τον ανιχνευτή γίνεται φανερή η παρουσία καθενός συστατικού του μείγματος τα οποία εξέρχονται από τη στήλη και μετριέται η ποσότητα ή η συγκέντρωσή τους μέσα στο φέρον αέριο. Υπάρχουν πολλοί ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία και ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το εάν αυτοί αποκρίνονται στη συγκέντρωση της εκλουόμενης ουσίας X μέσα στο φέρον αέριο ή στην ταχύτητα ροής μάζας της X. Οι ανιχνευτές επίσης μπορούν να ταξινομηθούν σε ανιχνευτές ολοκληρώσεως και διαφορικούς ανιχνευτές, αναλόγως του αν στο χρωματογράφημα παρουσιάζεται αθροιστικά σε κάθε στιγμή η ποσότητα της ουσίας X που έχει διέλθει (το χρωματογράφημα αποτελείται από βαθμίδες) ή η διερχόμενη ποσότητα ή συγκέντρωση της X (το χρωματογράφημα αποτελείται από κορυφές).

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά που καθορίζουν την ποιότητα ενός ανιχνευτή είναι: 1) η ευαισθησία του ανιχνευτή ως συνάρτηση της μετρούμενης ποσότητας της ουσίας, 2) η σταθερότητα, 3) η περιοχή γραμμικότητας ή γραμμική δυναμική περιοχή, δηλαδή ο λόγος του μέγιστου προς ελάχιστο σήμα για το οποίο η απόκριση είναι ανάλογη του μεγέθους του δείγματος, 4) ο χρόνος απόκρισης και 5) η χημική δραστηριότητα.

Επειδή η ευαισθησία ενός ανιχνευτή ποικίλει ευρέως για διάφορες κατηγορίες ενώσεων, πολλοί αέριοι χρωματογράφοι διαθέτουν δύο ή περισσότερους ανιχνευτές για την ανίχνευση περισσότερων ουσιών στην έξοδο της ίδιας στήλης.

Παρακάτω περιγράφονται οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές:

- *Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας:*

Ένας από τους πρώτους ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στην αέρια χρωματογραφία. Βασίζεται στις μεταβολές θερμικής αγωγιμότητας που προκαλεί η παρουσία μορίων της ουσίας στο φέρον αέριο. Συχνά ο αισθητήρας αυτός αναφέρεται και ως καθαρόμετρο.

Η κεφαλή ενός ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας αποτελείται από δύο αντιστάσεις. Η μια περιβάλλεται από μείγμα του φέροντος αερίου και του συστατικού που εξέρχεται κάθε φορά από τη στήλη και η άλλη περιβάλλεται μόνο από φέρον αέριο και χρησιμεύει ως αντίσταση αναφοράς. Όταν από τον ανιχνευτή διέρχεται μόνο το φέρον αέριο, η θερμική απώλεια είναι σταθερή και γι' αυτό η θερμοκρασία των δύο αντιστάσεων παραμένει σταθερή. Όταν όμως η σύσταση του φέροντος αερίου μεταβάλλεται (λόγω παρουσίας συστατικών του μείγματος) η θερμική αγωγιμότητά του μειώνεται, εξαιτίας της υψηλότερης θερμικής αγωγιμότητας του φέροντος αερίου σε σχέση με τις αέριες ουσίες που εκλούνται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ των δύο αντιστάσεων. Το ρεύμα που απαιτείται για την αποκατάσταση της ισορροπίας μετριέται από τον καταγραφέα. Όσο μεγαλύτερη είναι η θερμική αγωγιμότητα του φέροντος αερίου και όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του ρεύματος, τόσο περισσότερο ευαίσθητος είναι ο ανιχνευτής. ως φέρον αέριο προτιμάται το He ή το H_2 , εξαιτίας της υψηλής θερμικής αγωγιμότητάς τους.

- *Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID)*

Η λειτουργία όλων των ανιχνευτών ιονισμού φλόγας βασίζεται στο γεγονός ότι η ηλεκτρική αγωγιμότητα ενός αερίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φορτισμένων σωματιδίων μέσα σε αυτό. Ο ιονισμός του αερίου μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Στον ανιχνευτή ιονισμού φλόγας το εκλουόμενο από τη στήλη αέριο αναμειγνύεται με υδρογόνο και καίγεται στον αέρα. Η φλόγα βρίσκεται σε χώρο όπου εφαρμόζεται τάση της τάξης των 100V. Εφ' όσον το φέρον αέριο δεν περιέχει καύσιμες ενώσεις, μετά το άναμμα της φλόγας παρατηρείται ασθενές ηλεκτρικό ρεύμα εξαιτίας των ιόντων που σχηματίζονται κατά την καύση του υδρογόνου. Όταν όμως το καιόμενο αέριο περιέχει και οργανικές ουσίες, παρατηρείται σημαντική αύξηση της έντασης του ρεύματος, το οποίο ενισχύεται συνεχώς και καταγράφεται.

- *Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων(ECD)*

Η λειτουργία του βασίζεται στη μεταβολή της αγωγιμότητας του αερίου που διέρχεται από αυτόν, εξαιτίας των ιόντων που δημιουργούνται από ραδιενεργή πηγή εντός του ανιχνευτή. Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής αποκρίνεται στη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Στον ανιχνευτή αυτόν το έκλουσμα από τη στήλη εισάγεται σε θάλαμο, όπου υπάρχουν δύο μεταλλικοί οπλισμοί, συνδεδεμένοι με πηγή σταθερής τάσης. Η αγωγιμότητα μεταξύ των οπλισμών αποκαθίσταται με τη βοήθεια μιας σταθερής ροής ηλεκτρονίων που προέρχεται από ραδιενεργή πηγή ακτίνων β. Όταν το έκλουσμα περιέχει μόρια οργανικών ενώσεων, προκαλείται ελάττωση της αγωγιμότητας του χώρου μεταξύ των οπλισμών, εξαιτίας της σύλληψης ηλεκτρονίων από αυτά και μείωση του ρεύματος. Πρόκειται για πολύ ανιχνευτή μεγάλης ευαισθησίας.

1.4.3 Φασματομετρία μαζών (MS)

Όταν ηλεκτρόνια, σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης, προσκρούσουν σε μόρια μιας ένωσης, που βρίσκεται σε αέρια φάση και σε συνθήκες υψηλού κενού, τα μόρια της ένωσης μετατρέπονται σε ιόντα με θετικό συνήθως φορτίο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων, τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα/ηλεκτρικό φορτίο (m/z), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα, που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z (Χατζηιωάννου, 2015).

Το διάγραμμα που δείχνει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος, ως συνάρτηση του λόγου m/z ονομάζεται φάσμα μαζών της ουσίας. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα ένα φορτίο, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος (Χατζηιωάννου, 2015).

Η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αρχικής ουσίας από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της, ονομάζεται φασματομετρία μαζών. Η μορφή του φάσματος μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ουσίας και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της. Η φασματομετρία μαζών συνδυάζεται συχνά με την αέρια

χρωματογραφία ώστε ο αναλυτής να αποκτήσει ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μειγμάτων οργανικών ενώσεων (Χατζηιωάννου, 2015).

Τα κύρια πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών είναι η αυξημένη ευαισθησία της, σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές μεθόδους, και η υψηλή εξειδίκευσή της κατά την ταυτοποίηση ουσιών. Ως μειονεκτήματα μπορούν να θεωρηθούν το συγκριτικά μεγάλο κόστος των απαιτούμενων οργάνων, το μεγάλο κόστος λειτουργίας και συντήρησής τους, και ο μεγάλος βαθμός εξειδίκευσης του χρήστη στον χειρισμό των σχετικών συσκευών και την ορθή ερμηνεία των φασμάτων μαζών (Χατζηιωάννου, 2015).

1.4.3.1. Οργανολογία Φασματομετρίας Μαζών

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από τα ακόλουθα κοινά και διακριτά τμήματα: α) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, β) την πηγή ιόντων, γ) τον αναλυτή μαζών και δ) τον ανιχνευτή. Εκτός από αυτά τα τμήματα, κάθε φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνει και σύστημα δημιουργίας υψηλού κενού και ηλεκτρονικό υπολογιστή που αφενός για τον κεντρικό έλεγχο της λειτουργίας του, όσο και για την ταχεία επεξεργασία, παρουσίαση και ερμηνεία του φάσματος (Χατζηιωάννου, 2015).

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος: Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η προετοιμασία του δείγματος για εισαγωγή του στο χώρο ιονισμού (πηγή ιόντων), κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια πάντοτε κατάσταση. Το δοχείο δείγματος έχει όγκο 1 έως 5 μL και η πίεση που επικρατεί σε αυτό είναι της τάξεως του 10^{-2} Torr. Με κατάλληλο στόμιο εισαγωγής, το αέριο δείγμα εισάγεται σε ενδιάμεσο χώρο με ακόμα μικρότερη πίεση, απ' όπου, με σταθερή παροχή, εισάγεται στο χώρο ιονισμού όπου επικρατεί ακόμα μικρότερη πίεση ώστε να αποφεύγονται οι συγκρούσεις μεταξύ των ιόντων.

Στην περίπτωση όπου ο φασματογράφος μαζών χρησιμοποιείται συνδυαστικά με αέρια χρωματογραφία, το έκλουσμα της χρωματογραφικής στήλης οδηγείται στην πηγή ιόντων, αφού προηγουμένως απαλλαγεί από τη μεγαλύτερη από τη μεγαλύτερη ποσότητα φέροντος αερίου.

2. Πηγές ιονισμού: Η παραγωγή ιόντων χαρακτηριστικών της υπό προσδιορισμό ουσίας πραγματοποιείται στην πηγή ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων ή με χημικό ιονισμό.

Πηγή ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων. Το ρεύμα των μορίων της ένωσης M, που εισάγεται στην πηγή ιονισμού βομβαρδίζεται με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης κινητικής ενέργειας. Κατά την πορεία τους, τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με μερικά όρια της ένωσης M, οπότε παράγονται θετικά μοριακά ιόντα. Αρχικά όλα τα παραγόμενα ιόντα έχουν τυχαίες κατευθύνσεις, το ισχυρό όμως ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί σύγκλιση των ιόντων σε μία λεπτή ταινιωτή δέσμη με ελάχιστη απόκλιση.

Το ιόν M^+ ονομάζεται μοριακό ιόν της ένωσης M. Τα μοριακά ιόντα περιέχουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και συνεπώς είναι ιόντα -ρίζες. Όταν η ενέργεια ιονισμού είναι χαμηλή, πετυχαίνεται σχεδόν αποκλειστική παραγωγή μοριακών ιόντων. Τα φάσματα μαζών που προκύπτουν κάτω από αυτές τις συνθήκες παρουσιάζουν έντονη κορυφή του ιόντος M^+ και χρησιμεύουν για τον ακριβή υπολογισμό του μοριακού βάρους της ένωσης.

Από τη συνολική ποσότητα της ένωσης που θα εισέλθει στην πηγή ιόντων, μόνο ένα μικρό ποσοστό της μετατρέπεται σε ιόντα. Το ποιος αντιδράσεις θα πραγματοποιηθούν και σε ποιο ποσοστό εξαρτάται από τη φύση της ένωσης και τον ενέργεια ιονισμού. Όσο μεγαλύτερο είναι το μόριο της ένωσης, τόσο μεγαλύτερη ποικιλία ιόντων-θραυσμάτων αναμένεται.

Πηγή χημικού ιονισμού. Η πηγή περιέχει ένα «αντιδραστήριο αέριο», συνήθως μεθάνιο, με μεγάλη σχετικά πίεση. Η παραγωγή ιόντων γίνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, το «αντιδραστήριο αέριο», που βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα σε σχέση με τη μετρούμενη ένωση M, αντιδρά με τα ηλεκτρόνια και παράγει ιόντα. Στο δεύτερο στάδιο, πολλά από τα παραγόμενα ιόντα, που είναι ισχυροί δότες πρωτονίων, αντιδρούν με μόρια BH, που περιέχουν πυρηνόφιλα κέντρα (συνήθως αζωτούχες και οξυγονούχες ομάδες), με αντίστοιχη εμφάνιση κορυφών $M+1$.

Οι πηγές χημικού ιονισμού προκαλούν μικρότερη σε ποσοστό θραύση στα μόρια, δίνοντας κυρίως κορυφές ιόντων $M+1$. Το μικρότερο ποσοστό θραύσης συνεπάγεται μεγαλύτερη ευαισθησία, γιατί η διαδικασία ιονισμού επικεντρώνεται κυρίως στο μοριακό ιόν. Τα φάσματα χημικού ιονισμού παρέχουν άμεση πληροφόρηση για το μοριακό βάρος της ουσίας και είναι περισσότερο χρήσιμα για την ανάλυση μειγμάτων ουσιών.

3. Αναλυτής μαζών: Η βασική λειτουργία είναι να διαχωρίσει τα ιόντα που παράγονται στην πηγή ιόντων, ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές των λόγων m/z . Ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος ώστε το μετρούμενο ιονικό ρεύμα στον ανιχνευτή ιόντων να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z .

Από τον τύπο του αναλυτή μαζών εξαρτάται η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου, που είναι το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό ενός φασματογράφου μαζών. Η διαχωριστική ικανότητα (R) ορίζεται από τη σχέση

$$R = m/\Delta m$$

όπου m και $m+\Delta m$ αντιστοιχούν σε λόγους m/z με κορυφές ικανοποιητικά διαχωρισμένες. Κατά συνθήκη, ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται ότι πετυχαίνεται όταν οι περίπου ισοϋψείς κορυφές επικαλύπτονται σε ύψος που δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους των κορυφών.

Τα φασματομέτρα μαζών διακρίνονται σε χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Στα πρώτα, τα διάφορα ιόντα διακρίνονται με βάση την ονομαστική μάζα που αντιστοιχεί στην πλησιέστερη ακέραιη τιμή προς το μοριακό βάρος. Με τα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας όμως μπορούν να διαχωριστούν ιόντα με ίδια ονομαστική μάζα, αλλά με διαφορετικές τιμές ακριβούς μάζας., που διαφέρουν στο τρίτο ή και στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο

4. Ανιχνευτής ιόντων: Ο ανιχνευτής ιόντων παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού των ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδό του στη μονάδα του χρόνου. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ανιχνευτών όπως το φαρανταϊκό κύπελλο (η λειτουργία του βασίζεται στην πρόσκρουση των ιόντων πάνω στο κύπελλο, τον εκφορτισμό τους και την παραγωγή ωμικής τάσης στα άκρα μιας αντίστασης), ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (όπου η δέσμη ιόντων προσπίπτει σε μία δίοδο και προκαλεί εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων, που προσπίπτουν σε επόμενη δίοδο κ.ο.κ.) και η φωτογραφική πλάκα.

5. Σύστημα παραγωγής κενού: Η λειτουργία των φασματομέτρων μαζών προϋποθέτει τη συνεχή λειτουργία συστήματος παραγωγής υψηλού κενού στην περιοχή $10^{-6} - 10^{-7}$ Torr, οπότε δημιουργείται επαρκής ποσότητα ατμών για τη λήψη φάσματος. Η παραμικρή διαρροή ατμοσφαιρικού αέρα πχ. στην πηγή ιόντων, θα έχει

ως αποτέλεσμα τη μείωση παραγωγής ιόντων της εξεταζόμενης ένωσης και της εμφάνισης σημάτων που αντιστοιχούν στον ιονισμό των συστατικών της ατμόσφαιρας.

1.4.4. Διασύνδεση Συστημάτων GC & MS

Το φασματόμετρο μαζών δρα ως ανιχνευτής εξαιρετικής εκλεκτικότητας για το χρωματογραφικό σύστημα. Ο αναλυτής μαζών του φασματομέτρου μαζών ρυθμίζεται έτσι, ώστε να επιτρέπει την ανίχνευση ιόντος με προκαθορισμένη τιμή m/z , οπότε πλέον το χρωματογράφημα παρέχει χρωματογραφικές κορυφές μόνο για ουσίες που παρέχουν το συγκεκριμένο ιόν.

Το κύριο πρόβλημα στα διασυνδεδεμένα συστήματα ανάλυσης είναι ότι οι συνθήκες άριστου χρωματογραφικού διαχωρισμού μπορεί να μη συμβαδίζουν με τις απαιτούμενες συνθήκες για τον ικανοποιητικό ιονισμό των ενώσεων που εκλύονται από την χρωματογραφική στήλη.

Η συνδυασμένες τεχνικές GC/MS γίνονται περισσότερο αποδοτικές όταν η όλη διάταξη ελέγχεται από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στην περίπτωση αυτή ο αναλυτής μαζών δε ρυθμίζεται σε μια μόνο τιμή m/z , αλλά προγραμματίζεται να αλλάξει ταχύτατα διαδοχικές τιμές m/z . Σε κάθε νέα τιμή ο υπολογιστής καταχωρεί το αντίστοιχο σήμα από τον ανιχνευτή, που αντιστοιχεί σε δεδομένο χρόνο κατακράτησης. Μετά την πλήρη έκλυση των συστατικών του αναλυόμενου μείγματος, ο χρήστης μπορεί να ζητήσει από τον υπολογιστή να αναπαραγάγει το χρωματογράφημα που αντιστοιχεί σε κάθε τιμή m/z .

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ποικιλία Ροδίτης συνήθως δίνει οίνους που αρωματικά χαρακτηρίζονται από εσπεριδοειδή, λευκά άνθη και ήπια ορυκτότητα. Πέρα από την κλασική έκφραση όμως και ανάλογα με την κατεύθυνση που οδηγεί η διαφορετική αξιοποίησή του, ο Ροδίτης μπορεί να δώσει οίνους με διαφορετικό χαρακτήρα.

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση του αρωματικού προφίλ οίνων που προέρχονται από την ποικιλία Ροδίτης και ο χειρισμός του πτητικού κλάσματος με τη βοήθεια διαφορετικών επεμβάσεων στο αμπέλι και διαφορετικών στελεχών ζυμομυκήτων. Τέτοιοι οίνοι θα μπορούσαν να είναι εργαλείο στα χέρια ενός οινοποιού δίνοντάς του τη δυνατότητα να τους χρησιμοποιεί σε διαφορετικές ετικέτες ή blends προσδίδοντας συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Προκειμένου να μελετηθεί το αρωματικό προφίλ οίνων που προέρχονται από την ποικιλία Ροδίτη, σε σχέση με την διαφορετική καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε στο αμπέλι, πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μικρο-οινοποιήσεις σε γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια στα οποία δεν έχει εφαρμοστεί κάποια καλλιεργητική τεχνική και από σταφύλια στα οποία έχουν εφαρμοστεί θραύσματα αδρανοποιημένων ζυμών και ουρία σε συνδυασμό με θειάφι.

2.1.1 Επέμβαση στο αμπέλι

Για το συγκεκριμένο πειραματικό επιλέχθηκε ένα αμπελοτεμάχιο στην ορεινή Αιγιάλεια και συγκεκριμένα στην περιοχή Φτέρη, σε υψόμετρο 950μ. Πρόκειται για αμπελοτεμάχιο 15 στρεμμάτων, φυτεμένο γραμμικά, επικλινές (30% κλίση) και μη αρδευόμενο. Το έδαφος του είναι αμμοαργιλώδες, με αρκετά καλή δυνατότητα στράγγισης. Είναι φυτεμένο με την ποικιλία Ροδίτης Αλεπού, με πυκνότητα φύτευσης 400 φυτά ανά στρέμμα .

Για το πείραμα της παρούσας μελέτης επιλέχθηκαν τρεις γραμμές φύτευσης στις οποίες δεν έγινε καμία εφαρμογή και λειτούργησαν ως μάρτυρας (M). Σε άλλες τρεις γραμμές φύτευσης έγινε εφαρμογή διαφυλλικής ουρίας μαζί με θειάφι (NS) (22,5kg/στρ.) και τέλος σε τρεις ακόμα έγινε διαφυλλική λίπανση με θραύσματα αδρανοποιημένων ζυμομυκήτων *Saccharomyces cerevisiae*, 3kg/ ha (IY) (Lallemand, 2018). Η ουρία που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας ΓΕΩΛΙΧ, έχει την εμπορική ονομασία Urea Technica και η περιεκτικότητά της σε άζωτο είναι 46%. Το παρασκεύασμα θραυσμάτων αδρανοποιημένων ζυμών που χρησιμοποιήθηκε έχουν εμπορικό όνομα LalVigne® AROMA, και πρόκειται για πατέντα της εταιρείας Lallemand. Η επίδραση που η κάθε λίπανση ενδέχεται να έχει στο φυτό αναλύθηκε εκτενώς στην προηγούμενη ενότητα.

Οι διαφυλλικοί ψεκασμοί πραγματοποιήθηκαν την περίοδο του περκασμού. Οι Lasa et al. (2012) υπέδειξαν τη συγκεκριμένη περίοδο ως καταλληλότερη για εφαρμογή της ουρίας ώστε να υπάρχει αντίκτυπο στο αρωματικό προφίλ του παραγόμενου οίνου. Όσον αφορά στα θραύσματα αδρανοποιημένων ζυμών, η Lallemand (2018) προτείνει

δύο ψεκασμούς, ένας την περίοδο του περκασμού και έναν 7-14 μέρες μετά την πρώτη εφαρμογή. Στο παρόν πείραμα πραγματοποιήθηκε μόνο ο πρώτος ψεκασμός.

Σύμφωνα με τους Ramsey et al. (2005) η υψηλή θερμοκρασία επιταχύνει την εξάτμιση των ουσιών που έχουν τοποθετηθεί πάνω στα φύλλα με ψεκασμό, ενώ η σχετική υγρασία μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα πρόσληψης αυξάνοντας την ενυδάτωση της επιδερμίδας και καθυστερώντας το στέγνωμα των σταγονιδίων. Επομένως, εκτός του σταδίου του βλαστικού κύκλου, είναι πολύ σημαντικές και οι συνθήκες που θα επικρατούν κατά τον περκασμό. Στην Αιγιάλεια την περίοδο του περκασμού για το παρόν πειραματικό, οι θερμοκρασίες ήταν ιδιαίτερα υψηλές για την εποχή (μ.ο : 35°C), ενώ η υγρασία στην περιοχή είναι παραδοσιακά μέτρια προς χαμηλή. Ο τρύγος των σταφυλιών πραγματοποιήθηκε στις 28 Σεπτεμβρίου. Ανάλογα με την καλλιεργητική παρέμβαση, τα σταφύλια τρυγήθηκαν ξεχωριστά και οδηγήθηκαν στο οινοποιείο για επεξεργασία.

2.1.2 Οινοποίηση

Στα σταφύλια πραγματοποιήθηκε εκραγισμός με εκραγιστήριο Della Toffola. Κατά τον εκραγισμό προστέθηκε αντιοξειδωτική τανίνη (100ppm, *Infinity Blue-Dalcin*) και ένζυμο εκχύλισης (30ppm *Ultrasi 4Skin-Dalcin*). Σύμφωνα με την Dalcin (2021), το *Infinity Blue* προλαμβάνει αντιδράσεις οξειδωσης στο γλεύκος. Δρα είτε δεσμεύοντας μόρια οξυγόνου πριν αντιδράσουν με πολυφαινόλες ή απενεργοποιώντας ένζυμο, όπως η λακκάση ή η πολυφαινολοοξειδάση, που ευθύνονται για την γρήγορη υποβάθμιση του χρώματος κυρίως σε γλεύκη προσβεβλημένα με σήψη. Αντίστοιχα το *Ultrasi 4Skin*, πάλι σύμφωνα με την Dalcin (2021), ενισχύει την εκχύλιση των ποικιλιακών αρωματικών προδρόμων ενώσεων και των ελεύθερων αρωμάτων και ανάλογα με την ποικιλία σταφυλιού, προωθεί την εκχύλιση θειολών, τερπενίων και πρόδρομων ουσιών νορισοπρενοειδών.

Στη συνέχεια τα σταφύλια, πάντα διαχωρισμένα ανάλογα με την καλλιεργητική τεχνική, οδηγήθηκαν σε πνευματικό πιεστήριο Willmes από όπου παραλήφθηκε μόνο ο πρόρογος. Η απολάσπωση έγινε με επίπλευση και τα διαυγασμένα γλεύκη γέμισαν πλαστικούς περιέκτες των 10L, σε δύο επαναλήψεις ανά περίπτωση.

Η σήμανσή τους έγινε ως εξής:

- **M:** ΠΡΟΡΟΓΟΣ ΑΠΟ ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΧΩΡΙΣ ΚΑΜΙΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗ (ΜΑΡΤΥΡΑΣ)
- **IY:** ΠΡΟΡΟΓΟΣ ΑΠΟ ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΜΕ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ ΖΥΜΩΝ
- **NS:** ΠΡΟΡΟΓΟΣ ΑΠΟ ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΜΕ ΟΥΡΙΑ ΚΑΙ ΘΕΙΑΦΙ

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των διαυγασμένων γλευκών με πολυαναλυτή FTIR WineScan της εταιρείας FOSS.

Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν εμβολιασμοί στα γλεύκη. Επιλέχθηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα οινοποίησης, με την κωδικοποίηση NT116, VIN13, VIN7. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικότερα τα στελέχη και η θρέψη που εφαρμόστηκαν ανά πρωτόκολλο:

1. **NT116:** ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* με εμπορικό όνομα *Legacy NT116* της Anchor Yeasts (200ppm) μαζί με το θρεπτικό *Maxaferm* της OENOBRANDS SAS (200ppm). Σύμφωνα με την Anchor (2021), ο ζυμομύκητας NT116 ενισχύει τις πτητικές θειόλες, παράγει οξικούς εστέρες και ενισχύει ιδιαίτερα τα κιτρώδη αρώματα στα κρασιά. Το Maxaferm αντίστοιχα, σύμφωνα με την Oenobrand (2022), αποτελείται κατά 60% από κελύφη ζυμών, 39,96% φωσφορικό διαμμώνιο και 0,04% θειαμίνη και πέραν του ότι βοηθά τους ζυμομύκητες να ολοκληρώσουν χωρίς πρόβλημα την αλκοολική ζύμωση, βοηθά και την παραγωγή οίνων με καθαρά αρώματα.
2. **VIN13:** ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* με εμπορικό όνομα *Legacy VIN13* της Anchor Yeasts (200ppm) μαζί με το θρεπτικό *Natuferm Pure* της OENOBRANDS SAS (400ppm). Σύμφωνα με την Anchor (2021), ο ζυμομύκητας VIN13 ενισχύει τις πτητικές θειόλες αλλά κυρίως παράγει εστέρες. Το συγκεκριμένο στέλεχος προτείνεται να συνδυάζεται με το θρεπτικό *Natuferm Pure*, το οποίο αποτελείται από 100% αυτολυμένους ζυμομύκητες *Saccharomyces cerevisiae* και αυξάνει την παραγωγή αρωματικών εστέρων κατά τη ζύμωση (Oenobrand, 2022)
3. **VIN7:** ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* με εμπορικό όνομα *Legacy VIN7* της Anchor Yeasts (200ppm) μαζί με το θρεπτικό *Natuferm Bright* της OENOBRANDS SAS (400ppm). Σύμφωνα με την Anchor (2021), ο ζυμομύκητας VIN7 απελευθερώνει αρώματα passion fruit, γκρέιπφρουτ,

γκουάβα και εκείνα που είναι δεσμευμένα σε μη αρωματικές πρόδρομες ενώσεις. Το συγκεκριμένο στέλεχος προτείνεται να συνδυάζεται με το θρεπτικό *Natuferm Brght*, το οποίο αποτελείται από 100% αυτολυμένους ζυμομύκητες *Saccharomyces cerevisiae* και βοηθά την απελευθέρωση θειολών κατά τη ζύμωση (Oenobrand, 2022).

Σε όλα τα πρωτόκολλα πριν τον εμβολιασμό, έγινε προσθήκη 500ppm προϊόντος πλούσιο σε γλουταθειόνη (ORIGIN SH, Martin Vialatte). Η γλουταθειόνη είναι σημαντικό αντιοξειδωτικό που αποτρέπει το καφέτιασμα, αυξάνει τη συγκέντρωση κάποιων πτητικών θειολών κατά την αλκοολική ζύμωση και προστατεύει από την απώλεια κάποιων τερπενίων, εστέρων και θειολών κατά την παλαίωση (Makhotkina., 2014). Πιο συγκεκριμένα, το Origin SH διατηρεί το αρωματικό δυναμικό των σταφυλιών και προστατεύει τα αρώματα του κρασιού από οξείδωση απελευθερώνοντας αναγωγικές ενώσεις (Martin Vialatte, 2018)

Έξι μέρες μετά την πρώτη προσθήκη θρεπτικών έγινε συμπληρωματική θρέψη με Maxaferm. Σε όσα, κατά την πρώτη θρέψη, είχαν χρησιμοποιηθεί 200ppm Maxaferm προστέθηκαν άλλα 400ppm, ενώ σε όσα είχαν χρησιμοποιηθεί 100% οργανικά θρεπτικά προστέθηκαν άλλα 200ppm Maxaferm.

Οι ζυμώσεις παρακολουθούνταν καθημερινά με πολυαναλυτή FTIR WineScan και ολοκληρώθηκαν μέχρι τις 24 Οκτωβρίου. Ακολούθησε θείωση με Metabisulfite (50ppm SO₂).

2.1.3 Κωδικοποίηση δειγμάτων

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) παρουσιάζονται όλες οι περιπτώσεις που προέκυψαν με τις αντίστοιχες κωδικοποιήσεις. Για κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις.

Πίνακας 5 Κωδικοποίηση δειγμάτων

ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΜΕ NT116	M-NT116
ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΜΕ VIN13	M-VIN13
ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΜΕ VIN7	M-VIN7
ΘΡΑΥΣΜΑΤΑ ΖΥΜΩΝ ΜΕ NT116	IY-NT116
ΘΡΑΥΣΜΑΤΑ ΖΥΜΩΝ ΜΕ VIN13	IY-VIN13
ΘΡΑΥΣΜΑΤΑ ΖΥΜΩΝ Α ΜΕ VIN7	IY-VIN7
ΟΥΡΙΑ ΜΕ ΘΕΙΑΦΙ ΜΕ NT116	NS-NT116
ΟΥΡΙΑ ΜΕ ΘΕΙΑΦΙ ΜΕ VIN13	NS-VIN13
ΟΥΡΙΑ ΜΕ ΘΕΙΑΦΙ ΜΕ VIN7	NS-VIN7

2.1.4 Μεταζυμωτικές κατεργασίες

Ακολούθησε κολλάρισμα με 400ppm PVPP και 20ppm ιχθυόκολλα (Cristaline, Martin Vialatte). Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν για τρυγική σταθεροποίηση σε ψυκτικό θάλαμο, για 10 περίπου ημέρες. Τέλος, τα δείγματα μεταγγίστηκαν με απολάσπωση σε άλλους περιέκτες των 10L και μέσω φίλτρου εμφιαλώθηκαν σε φιάλες των 750mL. Η συντήρησή τους πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες κάβας (14°C και υγρασία ~80%).

2.1.5 Βασικές οινολογικές αναλύσεις

Με το πέρας της εμφιάλωσης πραγματοποιήθηκαν βασικές οινολογικές αναλύσεις στους έτοιμους οίνους με πολυαναλυτή FTIR WineScan. Πιο συγκεκριμένα ελέγχθηκαν η αιθυλική αλκοόλη (%vol) που επηρεάζει και οργανοληπτικά τον οίνο, το pH, η ολική και πτητική οξύτητα που είναι και οι δύο δείκτες ποιότητας ενώ η δεύτερη μπορεί να εμφανίσει τυχόν πρόβλημα κατά την αλκοολική ζύμωση, καθώς και το μηλικό και γαλακτικό οξύ τα οποία μπορεί να δείξουν τυχόν έναρξη μηλογαλακτικής ζύμωσης. Επιπλέον αξιολογήθηκαν η πυκνότητα και τα ανάγοντα σάκχαρα τα οποία και φανέρωσαν το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Για κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις.

2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Προκειμένου να αξιολογηθεί τόσο η επίδραση των καλλιεργητικών τεχνικών, όσο και των πρωτοκόλλων οινοποίησης, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων και συγκεκριμένα των θειολών, ανώτερων αλκοολών και διαφόρων εστέρων.

2.2.1 Ποσοτική Ταυτοποίηση Πτητικών Θειολών

Η ανάλυση των θειολών δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τον λόγο αυτό δείγματα στάλθηκαν στην Γαλλία, στα εργαστήρια της εταιρείας OENOBRANDS. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ωστόσο περιγράφεται στο άρθρο των Tonidandel, L., et al. (2021).

2.2.2. Ποσοτική Ταυτοποίηση Εστέρων και Ανώτερων Αλκοολών

Η αναλυτική διαδικασία για τον προσδιορισμό των πτητικών ουσιών έγινε με τροποποίηση της μεθόδου που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και αρχικά περιγράφηκε από τον Petropoulos (2012), προσαρμοσμένη σε λευκό οίνο. Για την απομόνωση των πτητικών ουσιών από τα δείγματα του οίνου πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υγρού-υγρού.

Έτσι, σε ογκομετρική φιάλη των 50mL προστέθηκαν 40mL οίνου και τρία πρότυπα διαλύματα (3-octanol, ethyl heptanoate και heptanoic acid) ώστε η τελική του συγκέντρωση του καθενός να φτάσει τα 10mg/L. Ο όγκος συμπληρώθηκε στα 50mL και μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη των 100mL με εσφυρισμένο πόμα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην κωνική φιάλη 5mL διχλωρομεθάνιο και ακολούθησε συνεχόμενη ανάδευση για 15min σε μαγνητικό αναδευτήρα. Κατόπιν, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 4000 στροφές για 10min, σε θερμοκρασία 4°C. Μόλις οι δύο φάσεις διαχωρίστηκαν, η φάση με το διχλωρομεθάνιο συλλέχθηκε και η διαδικασία της εκχύλισης επαναλήφθηκε. Στη συνέχεια, αφού έγινε αφύγρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο θειικό νάτριο, αυτή συμπυκνώθηκε μέσω ρεύματος αζώτου περίπου στα 500 μ L, από όπου όγκος 1 μ L εγχύθηκε σε σύστημα GC-MS. Όλες οι εκχυλίσεις έγιναν 3 φορές.

Η ανάλυση των πτητικών ενώσεων έγινε χρησιμοποιώντας στο Clarus SQ8S (Perkin Elmer) φασματόμετρο μαζών συνδυασμένο με Clarus 590 αέριο χρωματογράφο (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Η πολική τριχοειδής στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η DB-WAX από την Agilent (ID: 0.20 mm, πάχος: 0.20 μ m, και μήκος: 50 m).

Κατά την ανάλυση ίσχυσαν οι εξής παράμετροι: η θερμοκρασία έγχυσης ήταν 250°C, στην πηγή της MS 250°C και η ενέργεια κρούσης 70 eV. Η αρχική θερμοκρασία ήταν 40°C για 2min και στη συνέχεια αυξήθηκε στους 240°C με ρυθμό 5°C /min. Το φέρον αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ήλιο (He) με ροή 1.0 mL/min . Η έγχυση των δειγμάτων έγινε με σύστημα split/splitless. Ένα εύρος μαζών 40–400 m/z αποκτήθηκε με μία σάρωση ανά δευτερόλεπτο. Η ποσοτική και η ποιοτική ταυτοποίηση έγινε με χρήση εμπορικών διαλυμάτων με τη δημιουργία καμπυλών αναφοράς.

2.3 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η οργανοληπτική εκτίμηση πραγματοποιήθηκε από γκρουπ 7 εκπαιδευμένων και έμπειρων δοκιμαστών. Από τους δοκιμαστές ζητήθηκε να αξιολογήσουν την ένταση του και την κατηγορία (λευκά άνθη, λεμόνι, γκρέιπφρουτ, τροπικά φρούτα, πυρηνόκαρπα, μπανάνα, βοτανικότητα) του αρώματος καθώς και τη συνολική εκτίμησή του.

Η αξιολόγηση των δειγμάτων έγινε σε δύο συνεδρίες με διαφορά 8 ωρών. Μεταξύ του κάθε δείγματος που δοκιμάστηκε υπήρξε παύση ενός λεπτού. Οι δοκιμές διεξήχθησαν σε θαλάμους γευσιγνωσίας και τα δείγματα ήταν σε τυχαία σειρά. Τα δείγματα σερβιρίστηκαν σε ποτήρια γευσιγνωσίας οίνου ISO, σε ποσότητα 30mL και σε θερμοκρασία δωματίου (18-20° C). Τα δείγματα παρουσιάστηκαν με τριψήφιους αριθμούς σε μοναδική ακολουθία. Η ένταση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που εξετάστηκαν, αξιολογήθηκε σε κλίμακα 1 (πολύ χαμηλή) έως 5 (πολύ υψηλή). Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται το φύλλο γευσιγνωσίας που χρησιμοποιήθηκε.

Οσφρητική αξιολόγηση οίνων Ροδίτη									
Δοκιμαστής:							Κλίμακα: 1-5		
Δείγματα									
Ένταση αρώματος (άτονο-μέτριο-έντονο)									
Λευκά άνθη (λίγα-μέτρια-πολλά)									
Λεμόνι (λίγα-μέτριο-πολύ)									
Γκρέιπφρουτ (λίγα-μέτριο-πολύ)									
Τροπικά φρούτα (λίγα-μέτρια-πολλά)									
Πυρηνόκαρπα (λίγα-μέτρια-πολλά)									
Βοτανικό (λίγα-μέτριο-πολύ)									
Μπανάνα (λίγο-μέτριο-πολύ)									
Συνολική εκτίμηση (χαμηλή-μέτρια-υψηλή)									

Εικόνα 3 Φύλλο γευσιγνωσίας που χρησιμοποιήθηκε κατά την οσφρητική αξιολόγηση

2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όλες οι μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν σε δύο επαναλήψεις. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν, ακολούθησε στατιστική ανάλυση, με το πακέτο JMP Pro (εκδ. 13.2.1). Επιλέχθηκε η Ανάλυση Διασποράς με έναν Παράγοντα (OneWay ANOVA), με έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων κατά Tukey HSD test (Honesty Significant Difference). Η στατιστική διαφορά των δειγμάτων, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, περιγράφηκε με την χρήση λατινικών γραμμάτων (a,b,c κ.α). Δείγματα με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

Με το ίδιο λογισμικό, έγινε πολυπαραγοντική ανάλυση των μέσων όρων των αναλύσεων των πτητικών συστατικών και της οργανολυπτικής αξιολόγησης. Με την βοήθεια της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών βρέθηκε η συσχέτιση των μεταβλητών που εξετάστηκαν με τις επεμβάσεις στο αμπέλι και τα διαφορετικά οινοποιητικά πρωτόκολλα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΑ ΓΛΕΥΚΗ

Στα γλεύκη πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 6 ως μέσοι όροι των επαναλήψεων μαζί με την τυπική τους απόκλιση. Οι αναλύσεις πυκνότητας και η σακχαροπεριεκτικότητα (Brix) κυμάνθηκαν από 1,0819 έως 1,0825 και 19,8 έως 19,9 αντίστοιχα. Το pH και η ολική οξύτητα των γλευκών δίνουν εκτίμηση για την οξύτητα που θα έχει εν δυνάμει ο οίνος που θα παραχθεί, τα Brix και τα Ανάγοντα Σάκχαρα δίνουν εκτίμηση για τον Δυναμικό Αλκοολικό Τίτλο (ΔΑΤ), ενώ το YAN εκφράζουν την ποσότητα του αφομοιώσιμου από της ζύμες αζώτου.

Πίνακας 6 Αποτελέσματα βασικών αναλύσεων στα γλεύκη

	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	IY	NS
pH	3,26±0.003	3,32±0.004	3,33±0.015
Ολική Οξύτητα (g/l)	6,8±0.01	5,8±0.01	5,6±0.02
Πυκνότητα	1,0822±0.00022	1.0809±0.00008	1.0882±0.00010
Brix	19,8±0.05	19,5±0.01	21,0±0.01
Αναγ. Σάκχαρα (g/l)	193,7±0.33	193,2±0.41	211.5±0.16
Μηλικό Οξύ (g/l)	1,6±0.04	1,6±0.03	1,9±0.05
YAN	110±2	95±2	94±2

Ο παρασκευαστής του σκευάσματος αδρανοποιημένων ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν ως διαφυλλικό λίπασμα υποστηρίζει πως δεν διαφοροποιεί τη σύσταση των γλευκών που προκύπτουν. Ωστόσο κατά την παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε πως τα γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια στα οποία έχουν εφαρμοστεί αδρανοποιημένοι ζυμομύκητες έχουν χαμηλότερη οξύτητα και υψηλότερο pH σε σχέση με τον μάρτυρα.

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων προκύπτει επίσης ότι υπάρχουν κάποιες σημαντικές διαφορές στα γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια στα οποία έχει εφαρμοστεί ουρία και θειάφι, σε σχέση με τον μάρτυρα. Παρατηρήθηκε λοιπόν πως τα γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια χωρίς λίπανση η ολική οξύτητα είναι αυξημένη κατά 1g/l τρυγικού οξέος και το pH χαμηλότερο. Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και από τους Lasa et al. (2012) και από τους Ancin-Azpilicueta et al. (2012), που

έδειξαν πως γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια της ποικιλίας Merlot και Tempranillo αντίστοιχα και στα οποία έχει εφαρμοστεί ουρία, παρουσιάζουν μειωμένη οξύτητα. Επίσης στα γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια στα οποία εφαρμόστηκε ουρία και θειάφι τα σάκχαρα είναι αυξημένα περίπου κατά 18g/l. Οι Lasa et al. (2012) επίσης έδειξαν πως σε γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια της ποικιλίας Merlot και στα οποία έχει εφαρμοστεί ουρία, ο δυναμικός αλκοολικός τίτλος (ΔΑΤ) είναι υψηλότερος. Τέλος σχετικά με το μηλικό οξύ, εμφανίζεται ελαφρώς αυξημένο στα γλεύκη από σταφύλια στα οποία έχει εφαρμοστεί η ουρία. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και οι Garde-Cerdan et al. (2014), σε γλεύκη από σταφύλια Tempranillo στα οποία είχε εφαρμοστεί ουρία.

Για τα αποτελέσματα των βασικών αναλύσεων σε γλεύκη πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με το πακέτο JMP Pro (εκδ. 13.2.1), ωστόσο δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καμία σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των επαναλήψεων.

3.2 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και για την αξιολόγηση της πορείας της, αξιολογούνταν καθημερινά η πυκνότητα, τα ανάγοντα σάκχαρα, η πτητική οξύτητα και το μηλικό οξύ, με πολυαναλυτή FTIR WineScan (FOSS). Μετά το τέλος της ζύμωσης, και αφού προηγήθηκαν οι μεταζυμωτικές κατεργασίες, πραγματοποιήθηκαν βασικές αναλύσεις στους τελικούς οίνους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 7.

Στους οίνους, δόθηκε έμφαση στον αλκοολικό τίτλο, στην πυκνότητα, στην ολική και πτητική οξύτητα, στο pH, στα ανάγοντα σάκχαρα, στο μηλικό και στο γαλακτικό οξύ. Για τα αποτελέσματα των βασικών αναλύσεων στους οίνους πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με το πακέτο JMP Pro (εκδ. 13.2.1), ωστόσο δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επαναλήψεων.

Η διεξαγωγή αναλύσεων καθημερινά, πέραν του ότι εξυπηρέτησε στην αξιολόγηση της εξέλιξης της αλκοολικής ζύμωσης μέχρι τον τερματισμό της, βοήθησε στο να εντοπιστούν και οργανοληπτικά ελαττώματα που μπορεί να οφείλονται σε πρόβλημα κατά τη ζύμωση. Όντως, στα γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια με προσθήκη ουρίας και θειαφιού, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα και αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την

αύξηση παραγωγής του οξικού οξέος (Lasik-Kurdys, 2018) και άρα της πτητικής οξύτητας (Celik, 2019).

Πίνακας 7 Αποτελέσματα βασικών οινολογικών αναλύσεων στους οίνους.

SAMPLE	Vol%	Πυκνότητα	pH	Ολική Οξύτητα (g/l)	Πτητική Οξύτητα (g/l)	Αναγ. Σάκχαρα (g/l)	Μηλικό Οξύ (g/l)	Γαλακτικό οξύ (g/l)
M-NT116	12,73±0.006	0,9884±0	3,12±0.001	5,8±0.02	0,25±0.006	0,8±0.13	1,8±0,01	0±0
M-VIN13	12,78±0.010	0,9877±0	3,18±0.002	5,6±0.01	0,25±0.005	0,7±0.04	1,8±0,01	0±0
M-VIN7	12,71±0.003	0,9880±0.00001	3,18±0.001	5,8±0	0,46±0.005	0,6±0.05	1,8±0.01	0±0
IY-NT116	11,96±0.013	0,9887±0.00004	3,19±0.002	5,2±0.01	0,22±0.001	0,9±0.05	1,7±0.01	0±0
IY-VIN13	11,95±0.008	0,9887±0.00003	3,19±0	5,2±0	0,21±0.009	0,9±0.12	1,9±0	0±0
IY-VIN7	11,99±0.009	0,9887±0.00002	3,26±0.001	5,4±0	0,51±0	0,7±0.09	1,7±0	0±0
NS-NT116	12,85±0.008	0,9881±0.00002	3,34±0.004	4,8±0.001	0,27±0.001	1,5±0.06	0,45±0.01	0,9±0.01
NS-VIN13	12,82±0.007	0,9878±0.00001	3,34±0.002	4,6±0	0,29±0.002	1,3±0.06	0,4±0.01	0,8±0
NS-VIN7	12,84±0.012	0,9877±0.00001	3,43±0.003	5,0±0	0,90±0.002	1,0±0.06	0,5±0.03	0,7±0.01

Αξίζει να σημειωθεί πως κυρίως τα γλεύκη που προέρχονται από λίπανση με ουρία και θειάφι και ζυμώθηκαν με την ζύμη Vin7, παρουσίασαν την υψηλότερη πτητική οξύτητα (>0.8g/l). Σύμφωνα με την OENOBRANDS (2021), ο συγκεκριμένος ζυμομύκητας, λόγω ωσμωτικού στρες, παράγει γλυκερόλη με άμεσο παραπροϊόν το οξικό οξύ. Οι ίδιοι τονίζουν πως η πτητική οξύτητα δεν είναι οργανοληπτικά αντιληπτή, εκτός και αν είναι κοντά στα 0,9g/L.

3.3 ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΑΡΩΜΑΤΟΣ ΟΙΝΩΝ

Η αξιολόγηση των πτητικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν έγινε χρησιμοποιώντας ως βασική μεταβλητή την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε στο αμπέλι

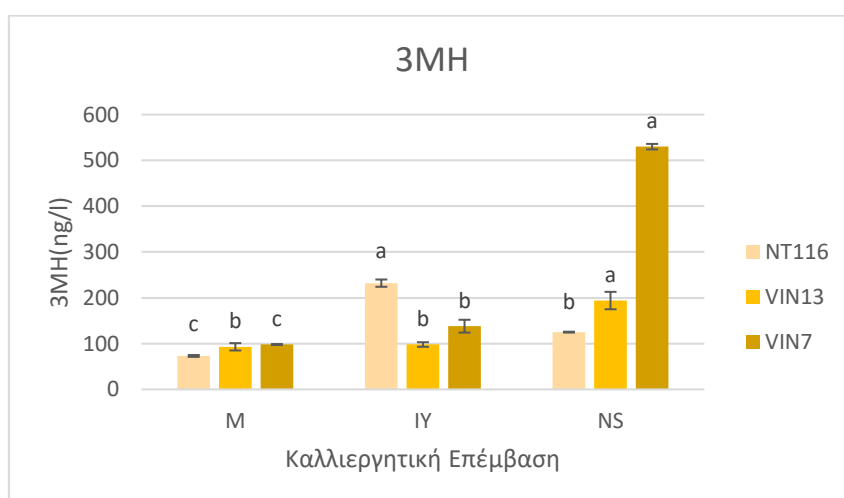
3.3.1 Πτητικές Θειόλες

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των θειολών πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία OENOBRANDS. Έγινε προσπάθεια να ανιχνευτούν τρεις θειόλες, η 3MH (3-mercaptohexan-1-ol), η 3MHA (3-mercaptohexyl

acetate) και η 4MMP (4-methyl-4-mercaptopentan-2-one). Ωστόσο μία μόνο από τις τρεις βρέθηκε και ποσοτικοποιήθηκε, η 3MH, που προσδίδει τροπικό άρωμα από γκρέιπφρουτ και passion fruit. Παρακάτω παρουσιάζονται οι τιμές της με βάση την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε και με βάση το πρωτόκολλο οινοποίησης που ακολουθήθηκε.

Τα αποτελέσματα που εμφανίζονται στο Γράφημα 1 φανερώνουν πως οι οίνοι που προέρχονται από σταφύλια χωρίς καλλιεργητική επέμβαση παρουσιάζουν την χαμηλότερη τιμή 3MH σε σχέση με τους οίνους που προέρχονται από σταφύλια στα οποία έχουν εφαρμοστεί απενεργοποιημένοι ζυμομύκητες και ουρία με θειάφι. Την μεγαλύτερη ωστόσο συγκέντρωση 3MH και μάλιστα με τιμή που ξεπερνάει τα 500ng/l, παρουσίασε η περίπτωση όπου γλεύκος που προέρχεται από σταφύλια στα οποία εφαρμόστηκε ουρία και θειάφι ζυμώθηκε με το πρωτόκολλο VIN7.

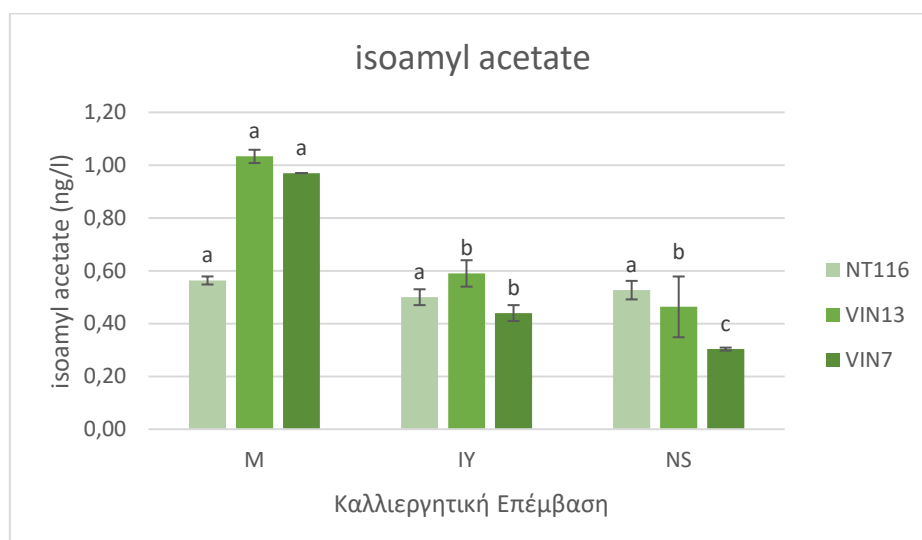
Πιο συγκεκριμένα, όταν η λίπανση με ουρία και θειάφι συνδυαστεί με το πρωτόκολλο VIN7, το οποίο σύμφωνα με την Anchor Yeasts (2021) ενισχύει τις πτητικές θειόλες, και με το πρωτόκολλο VIN13 το οποίο απελευθερώνει αρώματα passion fruit, γκρέιπφρουτ, γκουάβα (Anchor Yeasts, 2021), παρατηρούνται οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της 3MH. Εξαιρέση στο παραπάνω αποτελεί η περίπτωση όπου η λίπανση με αδρανοποιημένες ζύμες (IY) συνδυάστηκε με το πρωτόκολλο NT116, όπου και παρατηρήθηκε η δεύτερη πιο αυξημένη παραγωγή 3MH. Σε κάθε περίπτωση η μεγαλύτερη παραγωγή της 3MH σε επίπεδο πάνω από 500ng/l παρατηρήθηκε όταν η λίπανση με θειάφι και ουρία συνδυάστηκε με το VIN7 πρωτόκολλο.



Γράφημα 1 Συγκέντρωση της 3MH(ng/l) με βάση το είδος καλλιεργητικής επέμβασης που εφαρμόστηκε. Τιμές με διαφορετικό γράμμα (a,b,c) διαφέρουν στατιστικά.

3.3.2 Οξικοί Εστέρες

Η GC/MS ανάλυση οδήγησε στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση 3 οξικών εστέρων, του isoamyl acetate, του phenyl-ethyl acetate και του hexyl acetate. Οι οξικοί εστέρες αυτοί χαρακτηρίζονται από οσμές μπανάνας, ανθών και βλαστών αντίστοιχα (Carpena, 2021). Παρακάτω παρουσιάζονται οι τιμές τους με βάση την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε.

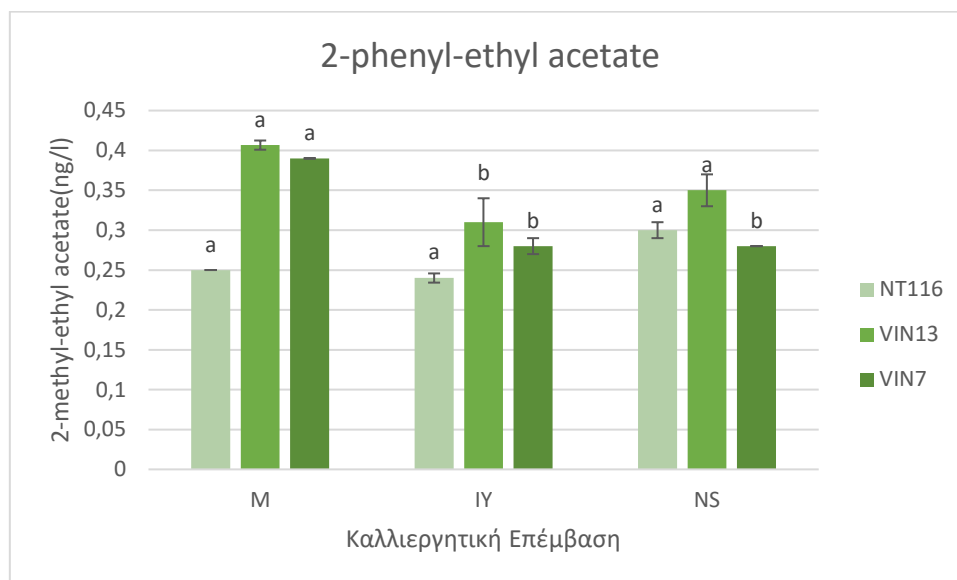


Γράφημα 2 Συγκέντρωση του isoamyl acetate (ng/l), με βάση την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε. Τιμές με διαφορετικό γράμμα (a, b, c) διαφέρουν στατιστικά.

Από το Γράφημα 2 φαίνεται πως η συγκέντρωση του οξικού ισο-αμυλεστέρα (isoamyl acetate) στους τελικούς οίνους είναι μεγαλύτερη όταν αυτοί προέρχονται από σταφύλια του μάρτυρα. Όταν μάλιστα αυτοί έχουν ζυμωθεί με το πρωτόκολλο VIN13 και VIN7 τότε το επίπεδο του συγκεκριμένου οξικού εστέρα είναι ιδιαίτερα υψηλό. Όταν η ζύμωση πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο NT116 δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση στη συγκέντρωση του isoamyl acetate μεταξύ των διαφορετικών καλλιεργητικών επεμβάσεων.

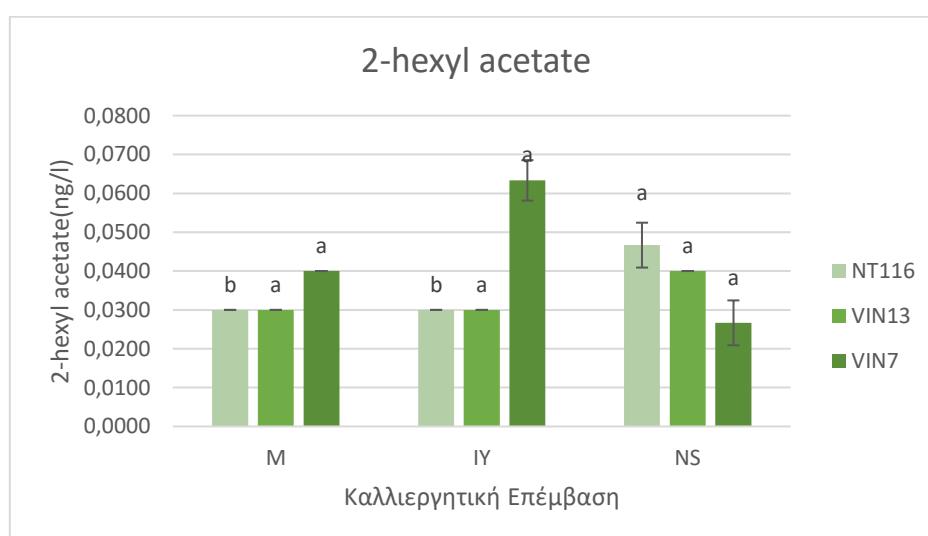
Από το Γράφημα 3 δεν μπορεί να προκύψει ξεκάθαρο συμπέρασμα για το ποιος παράγοντας επηρεάζει περισσότερο την παραγωγή του οξικού 2-φαινυλ-αιθυλεστέρα (2-phenyl-ethyl acetate). Τα γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια χωρίς καμία επέμβαση και αυτά που προέρχονται από σταφύλια που έχει εφαρμοστεί ουρία και θειάφι (NS) και έχουν ζυμωθεί με το πρωτόκολλο VIN13 και VIN7 να έχουν υψηλότερη συγκέντρωση 2-phenyl-ethyl acetate, με σημαντική στατιστική διαφορά ωστόσο να προκύπτει για το πρωτόκολλο VIN7. Αντίθετα όταν εφαρμόστηκε το

πρωτόκολλο NT116, οι οίνου που προέρχονται από σταφύλια με κάποια επέμβαση στο αμπέλι παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση του οξικού αυτού εστέρα, με τη περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε ουρία και θειάφι (NS) να υπερισχύει με στατιστικά σημαντική διαφορά.



Γράφημα 3 Συγκέντρωση του 2-phenyl-ethyl acetate (ng/l), με βάση την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε. Τιμές με διαφορετικό γράμμα (a,b,c) διαφέρουν στατιστικά.

Από το Γράφημα 4 προκύπτει πως η συγκέντρωση του οξικού εξυλεστέρα (2-hexyl acetate) παρουσιάζει ελάχιστη διαφοροποίηση καθώς μεταβάλλεται η λίπανση που εφαρμόστηκε αλλά παραμένει ίδιο το πρωτόκολλο οινοποίησης.



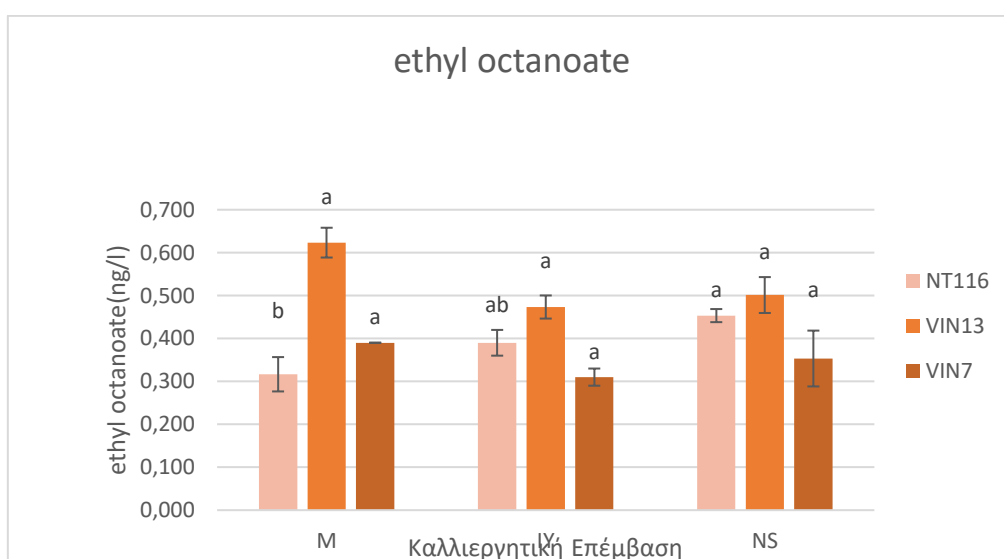
Γράφημα 4 Συγκέντρωση του 2-hexyl acetate (ng/l), με βάση την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε. Τιμές με διαφορετικό γράμμα (a,b,c) διαφέρουν στατιστικά.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πως η συγκέντρωση των οξικών εστέρων εξαρτάται περισσότερο από το πρωτόκολλο οινοποίησης που ακολουθήθηκε παρά από την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε. Τόσο η συγκέντρωση του isoamyl acetate όσο και αυτή του 2-methylethyl acetate είναι υψηλότερη σε οίνους που προέρχονται από σταφύλια στα οποία δεν έχει γίνει κάποια καλλιεργητική επέμβαση και προέρχονται από γλεύκη που ζυμώθηκαν βάσει του πρωτοκόλλου VIN13.

3.3.3 Αιθυλικοί εστέρες

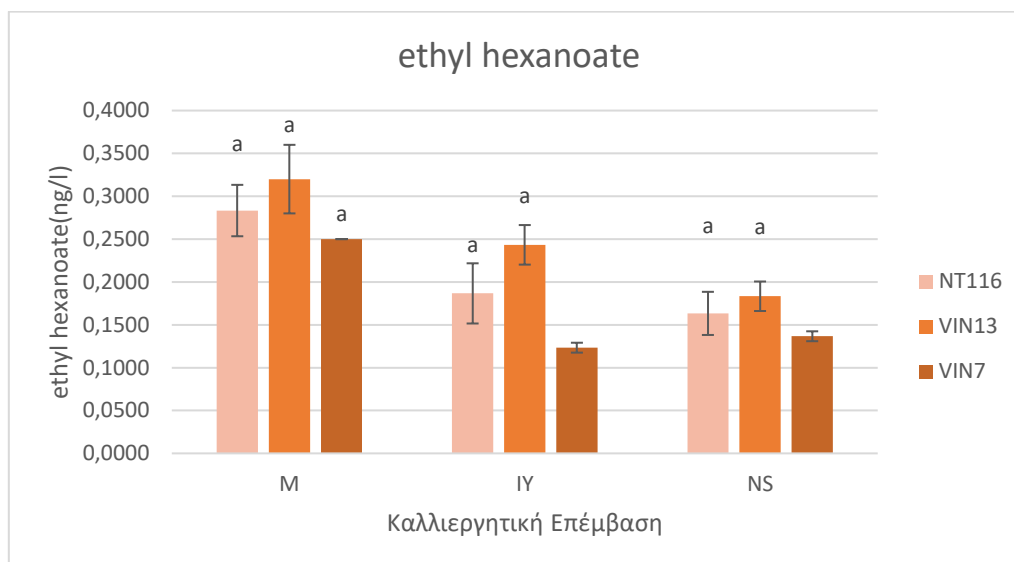
Η GC/MS ανάλυση οδήγησε στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση 4 αιθυλεστέρων, του 2-ethyl octanoate, 2-ethyl decanoate, του 2-ethyl-2-methyl butyrate και του 2-ethyl-3-methyl butyrate, που χαρακτηρίζονται από οσμές ανθών και γλυκού (Carpena, 2021). Παρακάτω παρουσιάζονται οι τιμές τους με βάση τη λίπανση που εφαρμόστηκε και με βάση το πρωτόκολλο οινοποίησης που ακολουθήθηκε.

Από το Γράφημα 5 προκύπτει πως κρατώντας σταθερό το πρωτόκολλο οινοποίησης και μεταβάλλοντας την λίπανση, δεν παρατηρείτε στατιστική διαφορά στη συγκέντρωση του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα (ethyl octanoate). Εξάιρεση αποτελεί η περίπτωση της NT116 οινοποίησης, όπου ο ethyl octanoate εμφανίζεται αυξημένος όταν εφαρμόστηκε η λίπανση με ουρία και θειάφι (NS). Ωστόσο παρατηρείται πως το πρωτόκολλο VIN13 δίνει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ethyl octanoate, με υψηλότερη όταν ακολουθήθηκε σε ζύμωση γλευκών που προέρχονται από σταφύλια χωρίς κάποια επέμβαση.

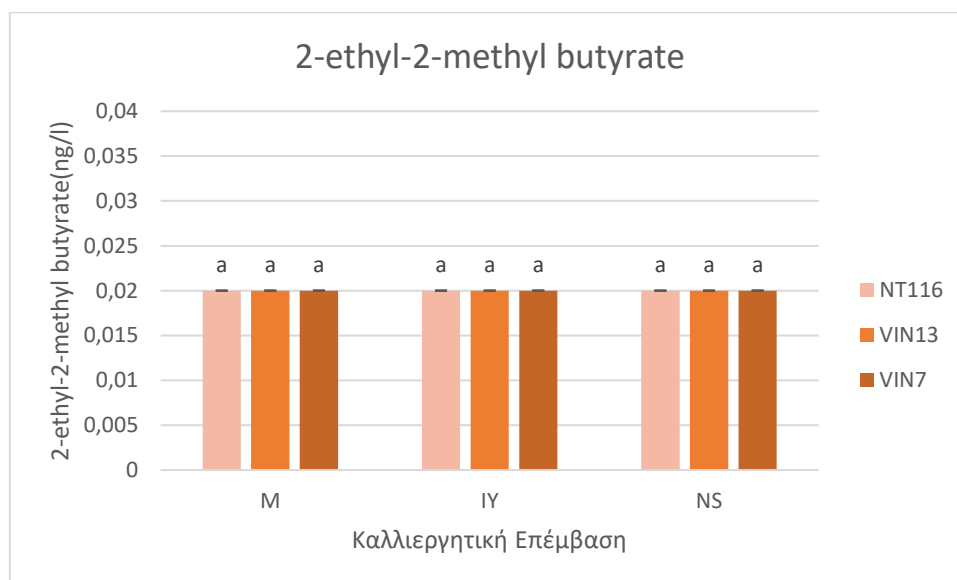


Γράφημα 5 Συγκέντρωση του ethyl octanoate (ng/l), με βάση την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε. Τιμές με διαφορετικό γράμμα (a,b,c) διαφέρουν στατιστικά.

Από το Γράφημα 6 προκύπτει πως και η συγκέντρωση του εξανοϊκού αιθυλεστέρα (ethyl hexanoate) εμφανίζει αυξητική τάση όταν οι οίνοι προέρχονται από σταφύλια στα οποία δεν έχει εφαρμοστεί λίπανση (M). Κρατώντας σταθερή την καλλιεργητική επέμβαση το πρωτόκολλο VIN13 οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ethyl hexanoate.



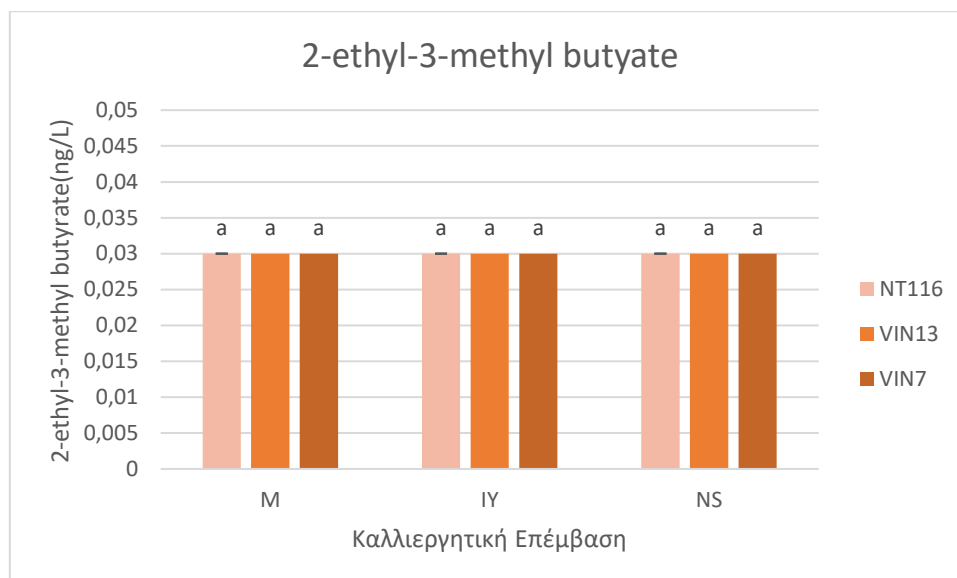
Γράφημα 6 Συγκέντρωση του ethyl hexanoate(ng/l), με βάση την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε. Τιμές με διαφορετικό γράμμα (a,b,c) διαφέρουν στατιστικά.



Γράφημα 7 Συγκέντρωση του 2-ethyl-2-methyl butyrate(ng/l), με βάση την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε. Τιμές με διαφορετικό γράμμα (a,b,c) διαφέρουν στατιστικά.

Από τα Γραφήματα 7 & 8 προκύπτει πως τόσο ο 2-ethyl-2-methyl butyrate όσο και ο 2-ethyl-3-methyl butyrate που ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν τους οίνους

παρουσιάζουν την ίδια χαμηλή συγκέντρωση σε όλες τις περιπτώσεις χωρίς να επηρεάζονται από την καλλιεργητική ή το πρωτόκολλο οινοποίησης.

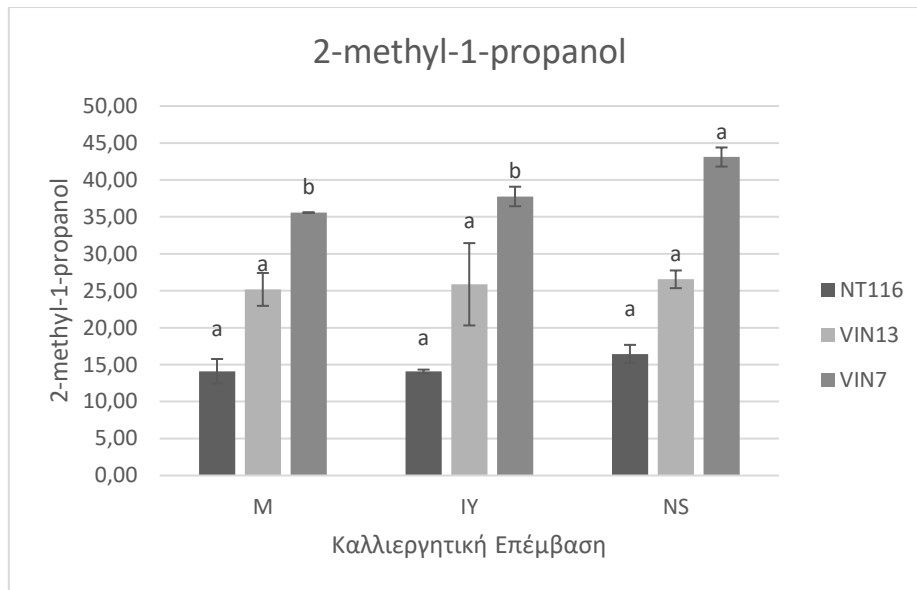


Γράφημα 8 Συγκέντρωση του 2-ethyl-3-methyl butyrate(ng/l), με βάση το είδος λίπανσης που εφαρμόστηκε. Τιμές με διαφορετικό γράμμα (a,b,c) διαφέρουν στατιστικά.

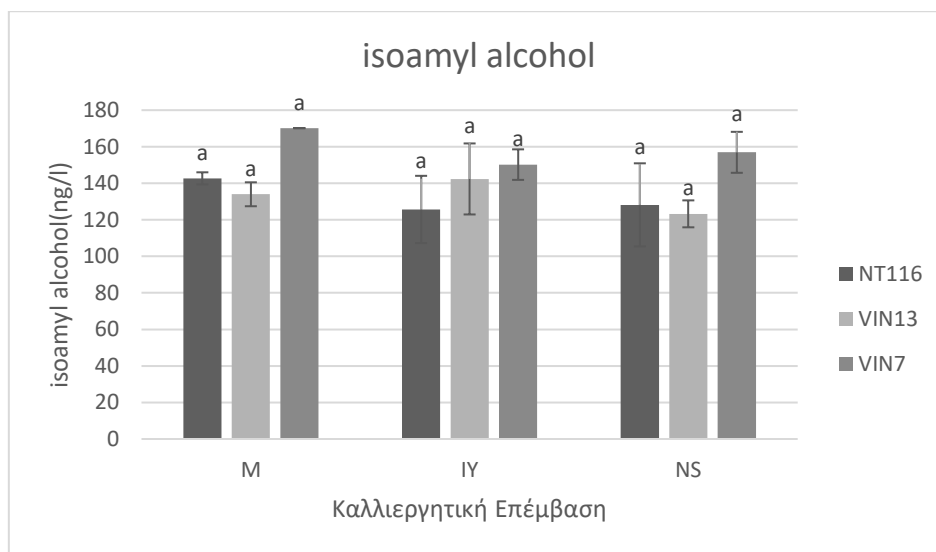
Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πως η συγκέντρωση των αιθυλεστέρων εξαρτάται περισσότερο από το πρωτόκολλο οινοποίησης που ακολουθήθηκε παρά από την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε. Τόσο η συγκέντρωση του ethyl octanoate όσο και αυτή του ethyl hexanoate είναι υψηλότερη σε οίνους που προέρχονται από σταφύλια στα οποία δεν έχει γίνει κάποια καλλιεργητική επέμβαση και προέρχονται από γλεύκη που ζυμώθηκαν βάσει του πρωτοκόλλου VIN13.

3.3.4 Ανώτερες Αλκοόλες

Η GC/MS ανάλυση οδήγησε στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση 2 ανώτερων αλκοολών, της 2-μέθυλ-1-προπανόλης (2-methyl-1-propanol) και της ισοαμυλικής αλκοόλης (isoamyl alcohol). Παρακάτω παρουσιάζονται οι τιμές τους με βάση την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε.



Γράφημα 9 Συγκέντρωση της 2-methyl-1-propanol (ng/l), με βάση την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε. Τιμές με διαφορετικό γράμμα (a,b,c) διαφέρουν στατιστικά.



Γράφημα 10 Συγκέντρωση της isoamyl alcohol (ng/l), με βάση την καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε. Τιμές με διαφορετικό γράμμα (a,b,c) διαφέρουν στατιστικά.

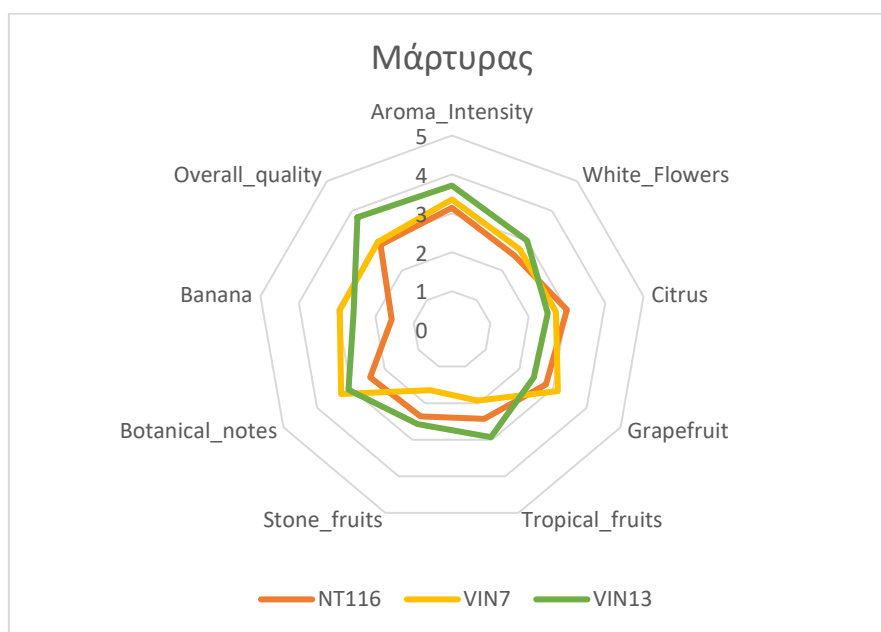
Από τα Γραφήματα 9 και 10 προκύπτει πως η καλλιεργητική επέμβαση δεν επηρεάζει την παραγωγή των ανώτερων αλκοολών. Η παραγωγή τους φαίνεται πως εξαρτάται από το πρωτόκολλο οινοποίησης που ακολουθήθηκε, με το VIN7 να οδηγεί σε υψηλότερη παραγωγή τόσο της 2-methyl-1-propanol όσο και της isoamyl alcohol, σε όλες τις διαφορετικές περιπτώσεις καλλιεργητικής επέμβασης ή μη.

3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

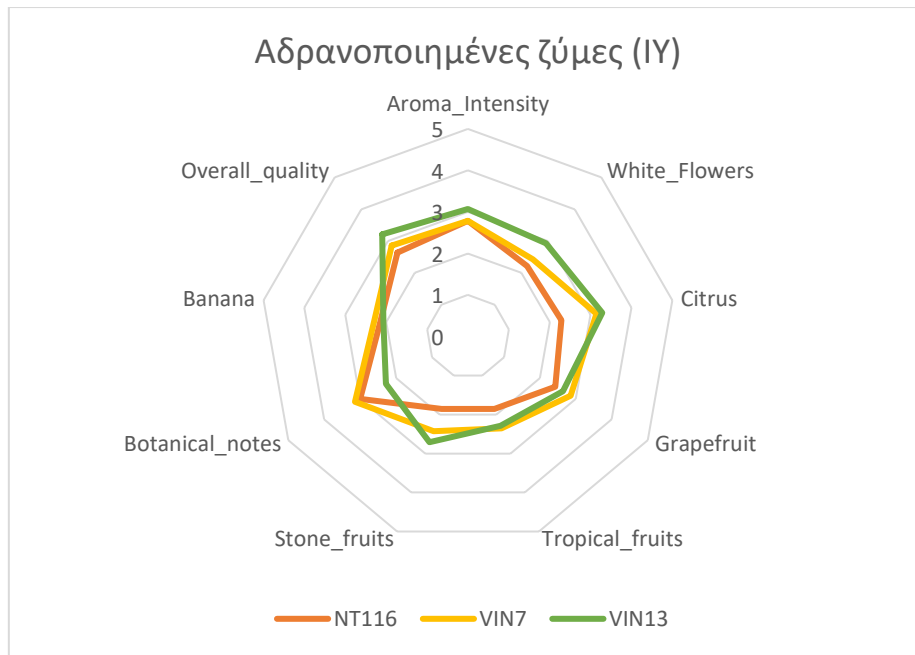
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την οργανοληπτική αξιολόγηση οίνων από Ροδίτη, με βάση τη διαφορετική καλλιεργητική επέμβαση που εφαρμόστηκε στα σταφύλια από τα οποία προέρχονται και το πρωτόκολλο οινοποίησης που ακολουθήθηκε.

3.4.1 Οργανοληπτική αξιολόγηση με βάση το πρωτόκολλο οινοποίησης

Από το Γράφημα 11 φαίνεται πως οι οίνοι που προέρχονται από σταφύλια χωρίς κάποια καλλιεργητική επέμβαση και έχουν ζυμωθεί ακολουθώντας το πρωτόκολλο VIN13, όχι μόνο υπερσχύουν στην αρωματική ένταση και τη συνολική εκτίμηση του αρώματός τους, αλλά παρουσιάζουν και πιο έντονα τα αρώματα λευκών λουλουδιών, τροπικών φρούτων και πυρηνόκαρπων. Εκείνοι που έχουν ζυμωθεί ακολουθώντας το πρωτόκολλο VIN7, φαίνεται να παρουσιάζουν αυξημένη την αντίληψη της βοτανικότητας και του γκρέιπφρουτ ενώ για εκείνους που έχει ακολουθηθεί το πρωτόκολλο NT116 για την οινοποίηση, τα αρώματα εσπεριδοειδών είναι εκείνα που ξεχωρίζουν.



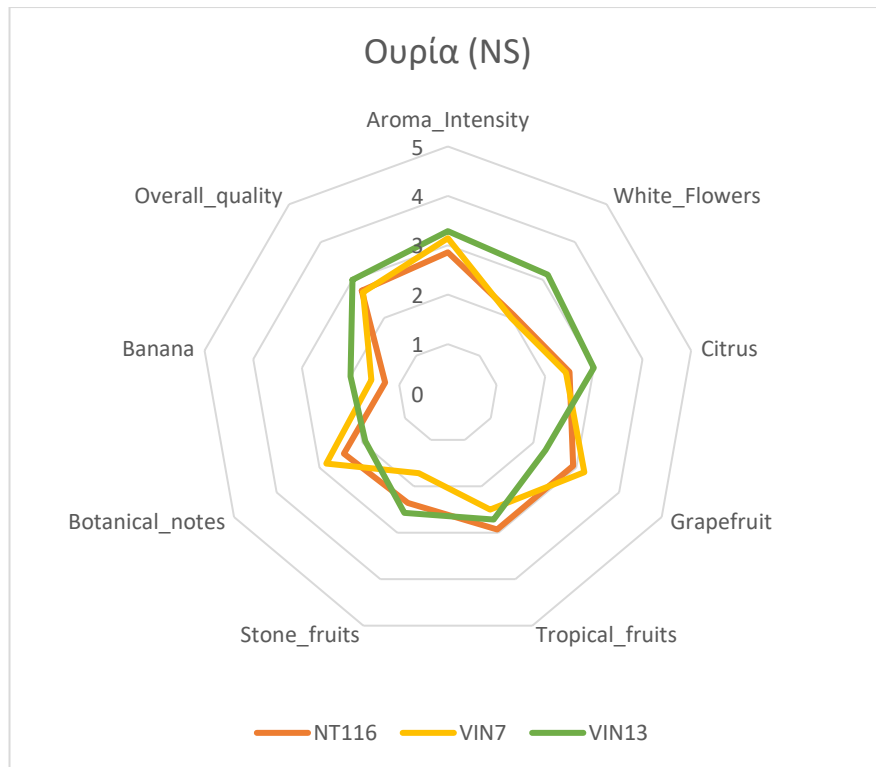
Γράφημα 11 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης των οίνων που προέρχονται από τα σταφύλια μάρτυρα (M).



Γράφημα 12 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης των οίνων που προέρχονται από τα σταφύλια στα οποία εφαρμόστηκαν αδρανοποιημένες ζύμες (IY).

Και από το Γράφημα 12 φαίνεται πως οι οίνοι που προέρχονται από σταφύλια με προσθήκη αδρανοποιημένων ζυμών (IY) και έχουν ζυμωθεί ακολουθώντας το πρωτόκολλο VIN13, υπερिशύουν στην αρωματική ένταση και τη συνολική εκτίμηση του αρώματός τους. Οι ίδιοι οίνοι έχουν και πιο έντονο το ανθικό άρωμα και το άρωμα πυρηνόκαρπων. Από εκεί και πέρα, τα αρώματα τροπικών φρούτων, γκρέιπφρουτ και εσπεριδοειδών έχουν την ίδια ένταση είτε η οινοποίηση έγινε με βάση το πρωτόκολλο VIN13 είτε με βάση το VIN7.

Τέλος από το Γράφημα 13 προκύπτει πως, όταν το πρωτόκολλο VIN13 χρησιμοποιήθηκε για τη ζύμωση γλευκών που προέρχονται από σταφύλια στα οποία έγινε εφαρμογή ουρίας (NS), έδωσε οίνους πιο έντονα αρωματικούς. Το ίδιο πρωτόκολλο οδήγησε και σε πιο έντονο άρωμα λευκών λουλουδιών, εσπεριδοειδών και πυρηνόκαρπων, ενώ αντίστοιχα το VIN7 τόνισε τις βοτανικές νότες και το γκρέιπφρουτ.



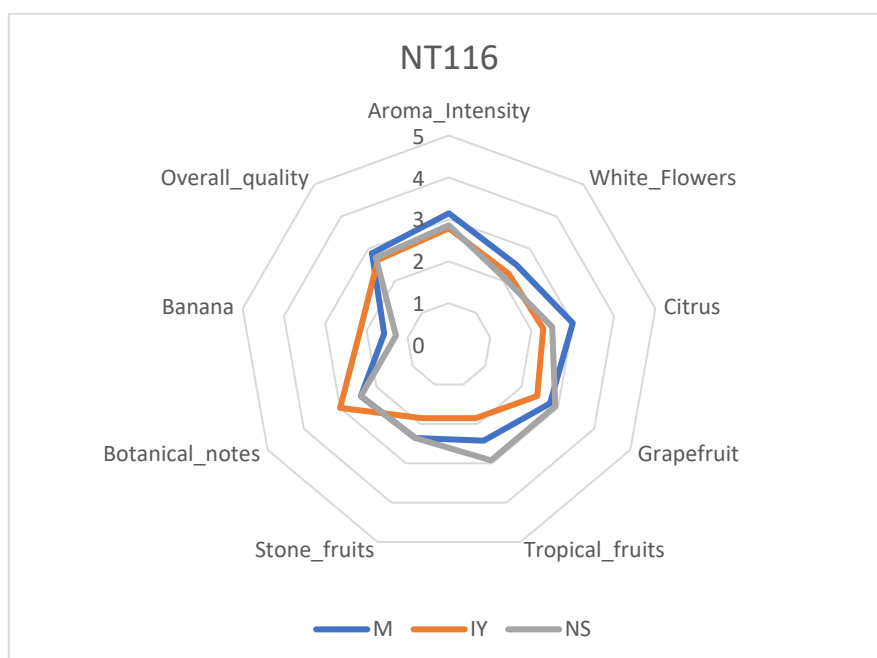
Γράφημα 13 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης των οίνων που προέρχονται από τα σταφύλια στα οποία εφαρμόστηκε ουρία και θειάφι (NS).

Αξιολογώντας συνολικά τα πρωτόκολλα, φαίνεται πως το VIN13, ανεξαρτήτως του είδους της καλλιεργητικής επέμβασης δίνει οίνους πιο έντονα αρωματικούς, με ενισχυμένο το άρωμα τόσο των λευκών λουλουδιών όσο και των πυρηνόκαρπων, ενώ το VIN7, ανεξαρτήτως του είδους της καλλιεργητικής επέμβασης δίνει οίνους που αρωματικά χαρακτηρίζονται από βοτανικότητα και νότες γκρέιπφρουτ. Το πρωτόκολλο NT116 φαίνεται πως οδηγεί σε οίνους αρωματικά υποδεέστερους.

3.4.2 Οργανοληπτική αξιολόγηση με βάση την καλλιεργητική επέμβαση.

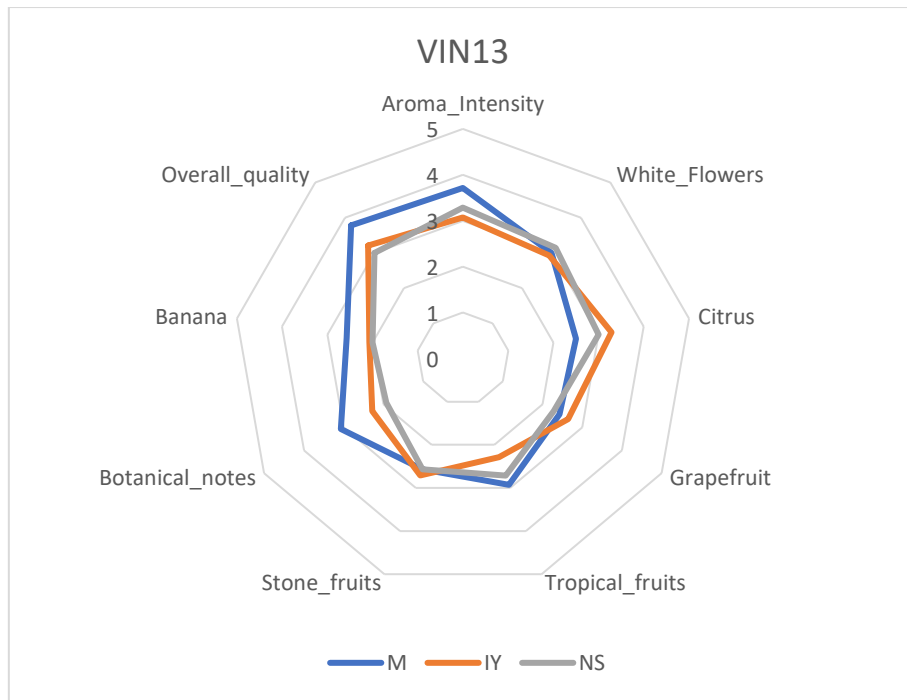
Παρατηρώντας το Γράφημα 14, φαίνεται πως οι οίνοι που έχουν οινοποιηθεί με το πρωτόκολλο NT116 και προέρχονται από σταφύλια στα οποία δεν έχει γίνει κάποια καλλιεργητική επέμβαση (M) παρουσιάζουν υψηλότερη αρωματική ένταση και συνολικά θεωρούνται πιο ποιοτικοί ως προς το άρωμα. Οι ίδιοι οίνοι φαίνεται να έχουν και πιο τονισμένα τα χαρακτηριστικά των λευκών λουλουδιών και των εσπεριδοειδών σε σχέση με οίνους που προέρχονται από σταφύλια στα οποία έχει εφαρμοστεί είτε ουρία (NS) είτε αδρανοποιημένοι ζυμομύκητες (IY). Πιο έντονο χαρακτήρα μπανάνας

και βοτανικότητας φαίνεται πως παρουσιάζουν οι οίνοι που προέρχονται από σταφύλια στα οποία έχουν εφαρμοστεί αδρανοποιημένοι ζυμομύκητες (IY), ενώ τροπικά φρούτα και γκρέιπφρουτ βρίσκουμε περισσότερο στους οίνους που προέρχονται από σταφύλια στα οποία έχει εφαρμοστεί ουρία (NS).



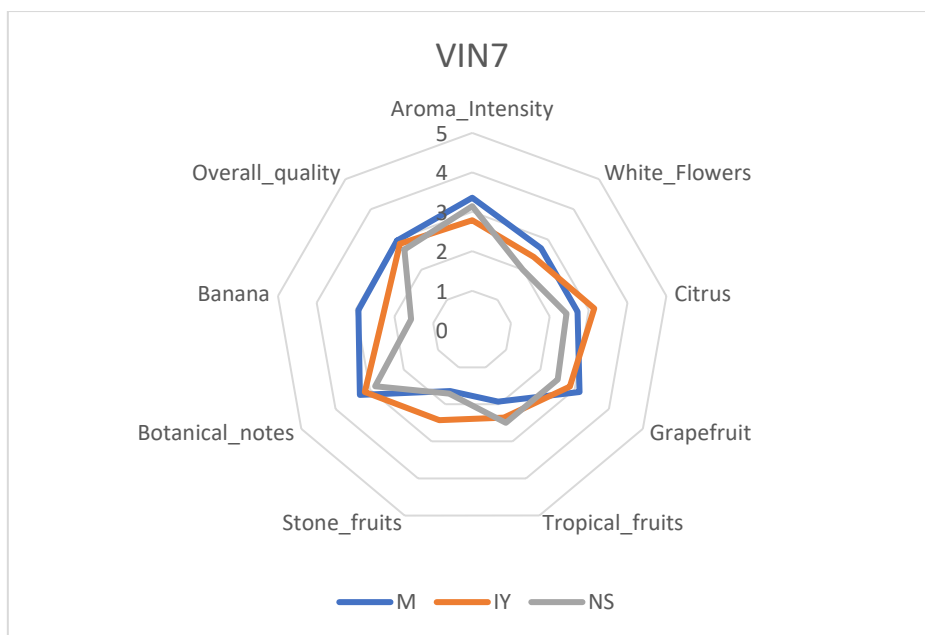
Γράφημα 14 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης των οίνων που οινοποιήθηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο NT116.

Και στο Γράφημα 15, όπου παρουσιάζεται η οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων που οινοποιήθηκαν με βάση το πρωτόκολλο VIN13, παρατηρείται πως οι οίνοι που προέρχονται από σταφύλια χωρίς καμία καλλιεργητική επέμβαση παρουσιάζουν υψηλότερη αρωματική ένταση και συνολικά θεωρούνται πιο ποιοτικοί ως προς το άρωμα, ενώ έχουν τονισμένους τους χαρακτήρες βοτανικότητας, τροπικών φρούτων και μπανάνας. Στους οίνους που προέρχονται από σταφύλια στα οποία έχουν εφαρμοστεί αδρανοποιημένοι ζυμομύκητες (IY) υπερισχύουν οι χαρακτήρες εσπεριδοειδών, πυρηνόκαρπων και γκρέιπφρουτ, ενώ εκείνοι που προέρχονται από σταφύλια στα οποία έχει εφαρμοστεί ουρία (NS) φαίνεται πως αρωματικά είναι υποδεέστεροι.



Γράφημα 15 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης των οίνων που οινοποιήθηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο VIN13.

Τέλος από το Γράφημα 16, στο οποία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των οίνων που οινοποιήθηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο VIN7, φαίνεται πάλι πως εκείνοι που προέρχονται από σταφύλια-μάρτυρα υπερσχύουν αρωματικά ως προς την ένταση και την ποιότητα και παρουσιάζουν πιο έντονα χαρακτηριστικά μπανάνας, γκρέιπφρουτ και λευκών λουλουδιών. Εκείνοι που προέρχονται από σταφύλια στα οποία εφαρμόστηκαν αδρανοποιημένοι ζυμομύκητες (IY) παρουσιάζουν πιο εμφανή τον χαρακτήρα εσπεριδοειδών και πυρηνόκαρπων, ενώ οι οίνοι που προέρχονται από σταφύλια στα οποία εφαρμόστηκε ουρία και θειάφι (NS) εμφανίζονται υποδεέστεροι αρωματικά.



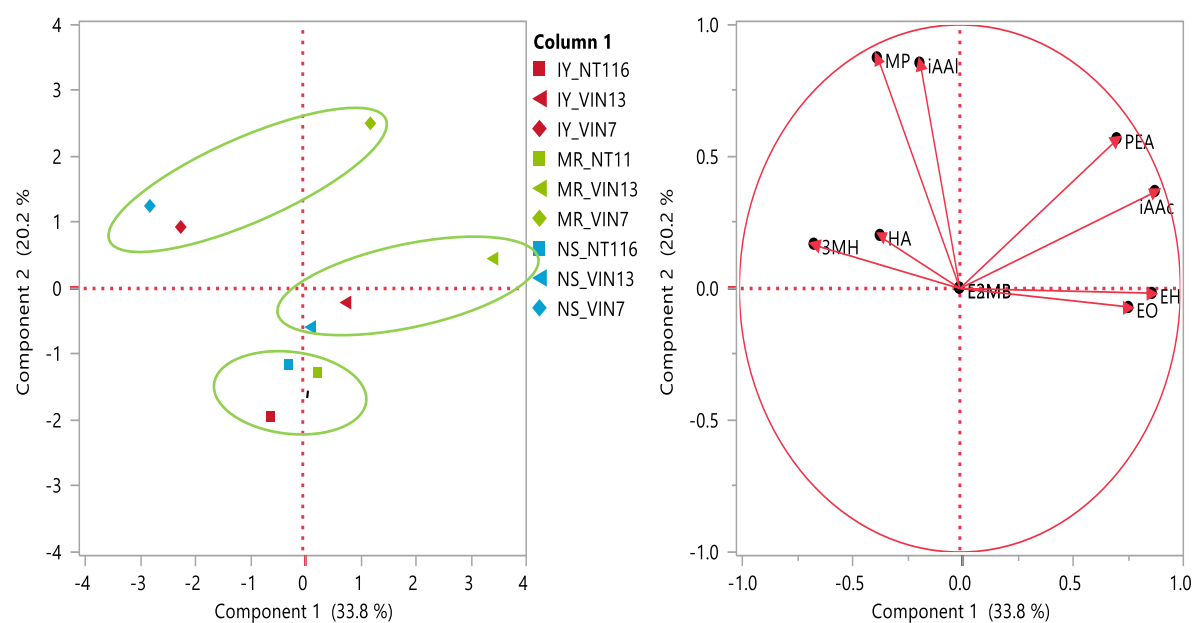
Γράφημα 16 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης των οίνων που οινοποιήθηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο VIN7.

3.5 ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ανακεφαλαιώνοντας τα αποτελέσματα των πτητικών συστατικών, και με την βοήθεια της πολυπαραγοντικής ανάλυσης (Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών - PCA), προέκυψε το Σχήμα 1 όπου παρουσιάζεται η συσχέτιση των πειραματικών οίνων με το σύνολο των δεδομένων που προέκυψαν από την ανάλυση των πτητικών συστατικών. Η κάθε παράμετρος, και ανάλογα με την βαρύτητα που έχει, συμμετέχει στην δημιουργία των δύο Κύριων Συνιστωσών Component 1 και Component 2 που περιγράφουν το 33,8 και το 20,2 της πληροφορίας αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα δεν δείχνουν να ομαδοποιούνται ως προς την λίπανση στον αμπελώνα εκτός ίσως από τον μάρτυρα που οι διαφορετικές οινοποιήσεις τοποθετούνται στο θετικό σκέλος της Συνιστώσας 1. Βέβαια, ως προς τα πρωτόκολλα οινοποίησης, οι οίνοι δείχνουν να συγκεντρώνουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και ομαδοποιούνται ανάλογα, με το πρωτόκολλο VIN13 να αποδίδει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε PEA, iAAC, EH και EO, το VIN7 να δίνει οίνους με μεγαλύτερες

συγκεντρώσεις σε 3MH, HA, MP και iAAI και το NT116 να είναι αρωματικά το πιο ουδέτερο.

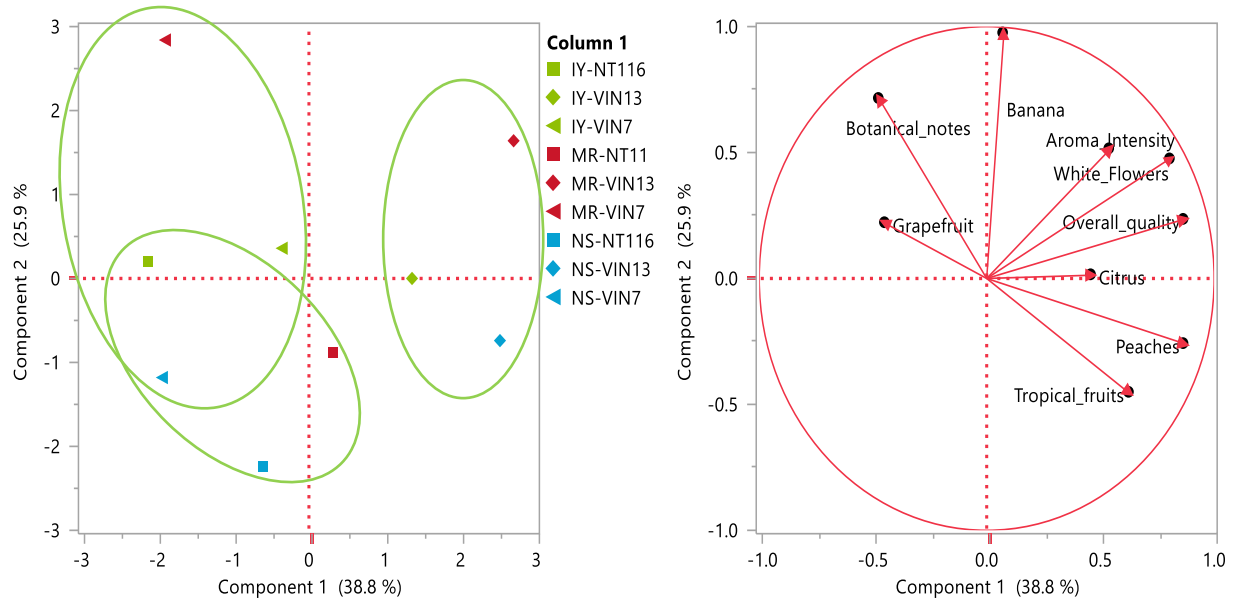


Σχήμα 1 Ανάλυση κύριων συνιστωσών αποτελεσμάτων πτητικών συστατικών για τους οίνους που προέκυψαν από σταφύλια της ποικιλίας Ροδίτης μετά από διαφορετικές επεμβάσεις λιπάνσεων στο αμπέλι αλλά και διαφορετικά πρωτόκολλα οινοποίησης σύμφωνα με το πειραματικό σχέδιο. Οι συντομογραφίες αντιστοιχούν στα ακόλουθα συστατικά: MP (2-methyl-1-propanol), iAAc (isoamyl acetate), iAAI (isoamyl alcohol), EO (ethyl octanoate), EH (ethyl hexanoate), PEA (2-phenylethyl acetate), E2MB (ethyl-2-methyl butyrate), E3MB (ethyl-3-methyl butyrate), HA (hexyl acetate), 3MH (3-mercaptopropan-1-ol)

Συγκεντρώνοντας όλα τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης και με την βοήθεια της Πολυπαραγοντικής ανάλυσης, στο Σχήμα 2, παρουσιάζεται η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών για τα κριτήρια οργανοληπτικής αξιολόγησης. Ανάλογα με την βαρύτητα που το κάθε κριτήριο συμμετέχει, στη διαμόρφωση των αξόνων, σχηματίστηκαν οι δύο συνιστώσες Component 1 και Component 2 του Σχήματος 2 οι οποίες περιγράφουν το 38,8 και 25,9 % της πληροφορίας αντίστοιχα.

Από το σχήμα φαίνεται ότι τα δείγματα δεν παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά ως προς τις επεμβάσεις λίπανσης στον αμπελώνα ενώ το πρωτόκολλο οινοποίησης αποτελεί κυρίαρχη μεταβλητή. Οι οίνοι που παράχθηκαν με το πρωτόκολλο VIN13 ομαδοποιούνται στο θετικό σκέλος της Συνιστώσας 1 και χαρακτηρίστηκαν από υψηλές αξιολογήσεις στο σύνολο σχεδόν των κριτηρίων που κυριαρχούν οσμές εσπεριδοειδών, τροπικών φρούτων, λουλουδιών και πυρηνοκάρπων ενώ χαρακτηρίστηκαν και ως πιο ποιοτικοί. Σε αντίθεση, το πρωτόκολλο VIN7

χαρακτηρίστηκε κατ' εξοχήν για τη βοτανικότητα και την οσμή γκρέιπφρουτ. Το πρωτόκολλο NT116 είχε αρνητικές συσχετίσεις με τα περισσότερα κριτήρια μιας και βρίσκεται στον αντίποδα του συνόλου τους.



Σχήμα 2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών αποτελεσμάτων οργανοληπτικής αξιολόγησης για τους οίνους που προέκυψαν από σταφύλια της ποικιλίας Ροδίτης μετά από διαφορετικές επεμβάσεις λιπάνσεων στο αμπέλι αλλά και διαφορετικά πρωτόκολλα οινοποίησης σύμφωνα με το πειραματικό σχέδιο.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο Ροδίτης, μια από τις πιο πολυφυτεμένες ποικιλίες στην Ελλάδα που συναντάται από την Πελοπόννησο μέχρι την Θράκη, χρησιμοποιείται κυρίως για οίνους μαζικής παραγωγής. Σίγουρα, υπό προϋποθέσεις κατά την καλλιέργεια, μπορεί να δώσει κρασιά υψηλής ποιότητας που προορίζονται ακόμα και για παλαίωση, αλλά στην πλειοψηφία του και λόγω της παραγωγικότητάς του και λόγω της χαμηλής του τιμής συμμετέχει κυρίως βοηθητικά, σε αναμειξείς ή ως βάση για παραγωγή ρετσίνας.

Πλέον όμως οι απαιτήσεις της αγοράς για ποιοτικά εμφιαλωμένα κρασιά ακόμα και σε χαμηλές τιμές έχουν αυξηθεί και ο Ροδίτης μπορεί να αποτελέσει ένα πολύ καλό εργαλείο τόσο λόγω της εύκολης καλλιέργειάς του όσο και της δυνατότητάς του να τροποποιηθεί αρωματικά. Μέσω λοιπόν της παρούσας μελέτης έγινε η προσπάθεια να μελετηθεί η τροποποίηση του αρωματικού κλάσματος της ποικιλίας, εφαρμόζοντας διαφορετικές καλλιεργητικές επεμβάσεις και ακολουθώντας διαφορετικά πρωτόκολλα οινοποίησης.

Οι πτητικές ενώσεις που αναλύθηκαν ανήκουν στις ομάδες των θειολών, των εστέρων και των ανώτερων αλκοολών. Όσον αφορά του οίνους που προέρχονται από τα σταφύλια στα οποία δεν είχε εφαρμοστεί καμία καλλιεργητική επέμβαση (Μ), αυτά εμφανίζουν τη χαμηλότερη συγκέντρωση θειολικών ενώσεων και συγκεκριμένα της 3ΜΗ, ανεξάρτητα από το πρωτόκολλο οινοποίησης που ακολουθήθηκε. Στα ίδια κρασιά συναντώνται οι υψηλότερες συγκεντρώσεις οξικών εστέρων (isoamyl acetate, phenyl-ethyl acetate) και κυρίως όταν αυτά ζυμώθηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο VIN13. Οι οίνους που προέρχονται από σταφύλια-μάρτυρα και κατά την οινοποίησή τους ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο VIN13 παρουσιάζουν και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των αιθυλεστέρων ethyl octanoate και ethyl decanoate.

Στους οίνους που προέρχονται από σταφύλια στα οποία είχαν εφαρμοστεί αδρανοποιημένοι ζυμομύκητες (IY), η συγκέντρωση των θειολών είναι υψηλότερη από εκείνη στους οίνους του μάρτυρα. Ειδικότερα όταν ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο NT116, η τιμή της 3ΜΗ ήταν η υψηλότερη σε σχέση με το VIN13 και VIN7. Όσον αφορά στους εστέρες, σχεδόν στην πλειοψηφία τους οι συγκεντρώσεις τόσο των οξικών εστέρων όσο και των αιθυλεστέρων είναι χαμηλότερες από εκείνες του μάρτυρα. Και σε αυτή την περίπτωση όμως, το πρωτόκολλο VIN13 δίνει την

υψηλότερη συγκέντρωση εστέρων. Εξαιρέση αποτελεί ο ethyl hexanoate, ο οποίος παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση από όλες τις περιπτώσεις όταν ζυμώθηκε με το πρωτόκολλο VIN7.

Οι οίνοι που προέρχονται από σταφύλια στα οποία εφαρμόστηκε ουρία και θειάφι (NS), παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση 3MH και ειδικά όταν ζυμώθηκαν βάσει του VIN7, όπου η τιμή της ξεπέρασε τα 500ng/l. Οι εστέρες στο σύνολό τους παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές με εκείνους στους οίνους από ΙΥ-σταφύλια και χαμηλότερες από τον μάρτυρα, με το πρωτόκολλο NT116 και VIN13 να έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις στους οξικούς εστέρες και στους αιθυλεστέρων αντίστοιχα.

Οι αιθυλεστέρες 2-methyl-2-ethyl butyrate και 2-methyl-3-ethyl butyrate παρουσιάζουν σταθερές τιμές ανεξάρτητα της καλλιεργητικής τεχνικής και των πρωτόκολλων οινοποίησης. Για τις ανώτερες αλκοόλες που προσδιορίστηκαν, φαίνεται πως η καλλιεργητική επέμβαση δεν επηρεάζει την παραγωγή τους. Αυτή εξαρτάται από το πρωτόκολλο οινοποίησης που ακολουθήθηκε, με το VIN7 να οδηγεί σε υψηλότερη παραγωγή τόσο της 2-methyl-1-propanol όσο και της isoamyl alcohol, σε όλες τις διαφορετικές περιπτώσεις καλλιεργητικής επέμβασης ή μη.

Συνοψίζοντας όλα τα προηγούμενα, προκύπτει πως οι θειόλες μόνο επηρεάζονται σημαντικά από την καλλιεργητική επέμβαση, με τη λίπανση με ουρία και το πρωτόκολλο VIN7 να αποτελούν τον συνδυασμό για υψηλότερη συγκέντρωση 3MH. Οι εστέρες σχεδόν στην πλειοψηφία τους εξαρτώνται από το πρωτόκολλο οινοποίησης με το VIN13 να οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή τους, ανεξάρτητα της καλλιεργητικής επέμβασης. Και οι ανώτερες αλκοόλες δεν φαίνεται να επηρεάζονται από την λίπανση, αλλά από το πρωτόκολλο οινοποίησης, με το VIN7 όμως να δίνει υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Τα παραπάνω αφορούν αποκλειστικά το αναλυτικό κομμάτι και τα αποτελέσματα που έδωσε η GC-MS. Πολύ σημαντικό ρόλο όμως παίζουν και τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης καθώς απεικονίζουν την αίσθηση που αφήνει κάθε κρασί στον καταναλωτή. Ανεξάρτητα από το πρωτόκολλο οινοποίησης, τα κρασιά από σταφύλια-μάρτυρα έχουν μεγαλύτερη αρωματική ένταση και η συνολική τους ποιότητα θεωρήθηκε υψηλότερη, ενώ υποδεέστερα θεωρήθηκαν εκείνα που

προέρχονται από σταφύλια με ουρία. Από εκεί και πέρα το πρωτόκολλο VIN13 φαίνεται ότι έδωσε την μεγαλύτερη αίσθηση σχεδόν σε όλα τα επιμέρους χαρακτηριστικά που αξιολογήθηκαν, σε κάθε περίπτωση καλλιεργητικής επέμβασης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ancin-Azpilicueta, C., Nieto-Rojo, R., Gomez-Cordon, J. 2012. *Effect of foliar urea fertilization on volatile compounds in Tempranillo wines*. Published online in Wiley Online Library: 15 October 2012
- Bertrand, (1981) Les levures de la région viticole de Naoussa (Grèce). These de l'Universite de Bordeaux
- Carpena, M., Fraga-Corral, M., Otero, P., Nogueira, R., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M., Simal-Gandara, J., 2020 *Secondary Aroma: Influence of Wine Microorganisms in Their Aroma Profile*. Published on: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/1/51> [2021]
- Celik, Z.D., Cabaroglu, T., Krieger_Weber, S., 2019. *Impact of malolactic fermentation on the volatile composition of Turkish Kalecik karasired wines*. Çukurova University, Agriculture Faculty, Food Engineering Department, Adana, Turkey.
- Ferrari, S., 2010. *Biological elicitors of plant secondary metabolites: Mode of action and use in the production of nutraceuticals*. *Biofarms for nutraceuticals: Functional food and safety control by biosensors*, 152 – 166.
- Garde-Cerdan, T., Santamaria, P. Rubio-Breton, P. Gonzalez_arenzana, L., Lopez-Alfaro, I., Lopez, R. 2014. *Foliar application of proline, phenylalanine, and uria to Tempranillo vines: Effect on grape volatile composition and comparison with the use of commercial nitrogen fertilizers*. Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja-CSIC-Universidad de La Rioja, Spain
- Lasik-Kurdys, M., Majcher, M., Nowak, J., 2018. *Effects of Different Techniques of Malolactic Fermentation Induction on Diacetyl Metabolism and Biosynthesis of Selected Aromatic Esters in Cool-Climate Grape Wines*. Poznań University of Life Sciences, Poland.
- Lazarakis, K., 2018. *The Wines of Greece*, Athens: Infinite Ideas Limited
- Lissarrague, J.R., Téllez, J., García, E., Peiro, E., 2014. *Impact on agronomic parameters in Vines and wine quality of foliar treatments with specific fractions of yeast derivatives*. American Society Enology Viticulture. 65th ASEV National Conference & 39th ASEV Eastern Section Annual Meeting, Hyatt Regency Austin, Austin Texas.
- Magalhães, N., 2015. *Tratado de Viticultura – A Videira, A vinha e o Terroir*. Esfera Poética
- Makhotkina, O., Araujo, L. D., Olejar, K., Herbst-Johnstone, M., Fedrizzi, B., & Kilmartin, P. A., 2014. *Aroma impact of ascorbic acid and glutathione*

- additions to Sauvignon blanc at harvest to supplement sulfur dioxide. American Journal of Enology and Viticulture* 65, 388 – 393.
- Miliordos, D., Kanapitsas, Al., Lola, D., Goulioti, E., Kontoudakis, N., Leventis, G., Tsiknia, M., Kotseridis, Y., 2022. *Effect of Nitrogen Fertilization on Savvatiano (Vitis Vinifer L.) Grape and Wine Composition.*
 - Morata, A. and Loira, I., 2016 *Grape and Wine Biotechnologie*, Rijeka Croatia: IntechOpen
 - Negri, A.S., Prinsi, B., Rossoni, M., Failla, O., Scienza, A., Cocucci, M. & Espen, L., 2008. *Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening.* BMC Genomics 9, 378
 - Pastore, C., Dal Santo, S., Zenoni, S., Movahed, N., Allegro, G., Valentini, G., Filippetti I., Tornielli, G.B., 2017. *Frontiers in Plant Science* 8, 929.
 - Patel, H., Krishnamurthy, R., 2013. *Elicitors in plant tissue culture.* Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2, 2278 – 4136.
 - Radman, R., Saez, T., Bucke, C., Keshavarz, T., 2003. *Elicitation of plants and microbial cell systems.* Biotechnology and Applied Biochemistry 37, 91 – 102.
 - Rapp, A.; Mandery, H. (1986) Wine aroma. *Experientia* 42: 873-884.
 - Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006). *Handbook of Enology Volume 2 : The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments.* England: JohnWiley&SonsLtd.
 - Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Cavelier, F., 2011. *Varietal Thiols in WineQ Discovery, Analysis and Applications.* Universite de Montpellier, France
 - Santamaría, A.R., Mulinacci, N., Valletta, A., Innocenti, M., Pasqua, G., 2011. *Effects of elicitors on the production of resveratrol and viniferins in cell cultures of Vitis vinifera L. cv Italia.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 59, 9094 – 9101
 - Styger, G., Prior, B., Bauer, F. (2011). Wine flavor and aroma . *J Ind Microbiol Biotechnol.*
 - Swiegers JH, Pretorius IS (2005) Yeast modulation of wine flavour. *Adv Appl Microbiol* 57:131–175
 - Tomasi, D., Panighel, A., Flamini, R., Lovat, L., Battista, F., 2017. *Foliar application of specific inactivated yeast with action on phenolic and aromatic metabolism of grapes.* OIV congress.

- Valadas, M.T., 2019. *Foliar application of yeast derivatives at veraison to grapevines and their effects on the chemical composition A bibliographic review*. Instituto Superior D' Agronomia, Universidade de Lisboa.
- Villangó, Sz., Pásti, Gy., Kállay, M., Leskó, A., Balga, I., Donkó, A., Ladányi, M., Pálfi, Z., Zsófi, Z., 2015. *Enhancing Phenolic Maturity of Syrah with the Application of a New Foliar Spray*. South African Journal of Enology and Viticulture 36, 304 – 315.
- Σταυρακάκης, Μ., 2010. Αμπελογραφία, Αθήνα: Εκδόσεις Τροπή
- Σουφλερός, Ε., 2015. Οινολογία, Θεσσαλονίκη: Ιδιωτικές Έκδοση
- ΕΝΟΑΠ, 2022. *Στοιχεία του Πελοποννησιακού Αμπελώνα* [online] Available at: <https://enoap.org/%CE%B1%CE%BC%CF%80%CE%B5%CE%BB%CF%89%CE%BD%CE%B1%CF%82.html> [Accessed 29 April 2022]
- Συνδεσμος Ελληνικού Οίνου. *Γνωρίστε τις Ποικιλίες* [online] Available at: <https://winesofgreece.org/el/varieties/%cf%81%ce%bf%ce%b4%ce%af%cf%84%ce%b7%cf%82/> [Accessed 29 April 2022]