



**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 της αραίωσης φορτίου πρέμνων και των διαφορετικών  
πρωτοκόλλων οινοποίησης σε οίνους ποικιλίας Sauvignon blanc**

**Αναστασία Δ. Αγάτσα**

Επιβλέπων καθηγητής:

Γιώργος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2023**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Επίδραση της αραίωσης φορτίου πρέμνων και των διαφορετικών  
πρωτοκόλλων οινοποίησης σε οίνους ποικιλίας Sauvignon blanc

“Effect of cluster thinning treatment and different wine making protocols in  
Sauvignon blanc wines”

**Αναστασία Δ. Αγάτσα**

Εξεταστική Επιτροπή:

Γιώργος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σταματίνα Καλλίθρακα, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ

## Επίδραση της αραίωσης φορτίου πρέμνων και των διαφορετικών πρωτοκόλλων οινοποίησης σε οίνους ποικιλίας Sauvignon blanc

ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων I) Γαλακτοκομία II) Οινολογία  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Οινολογίας & Αλκοολούχων Ποτών

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραγωγή ενός ποιοτικού οίνου εξαρτάται τόσο από την καλλιεργητική φροντίδα του πρέμνου στον αμπελώνα όσο και από το πρωτόκολλο οινοποίησης που θα εφαρμοστεί κατά την αλκοολική ζύμωση. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική μελετήθηκε η επίδραση δύο παραγόντων στο χημικό και οργανοληπτικό προφίλ των παραγόμενων οίνων ποικιλίας Sauvignon blanc. Ο πρώτος παράγοντας αφορούσε την αραίωση φορτίου μετά το στάδιο του περκασμού ενώ ο άλλος παράγοντας αφορούσε το στέλεχος ζύμωσης που χρησιμοποιήθηκε κατά την αλκοολική ζύμωση καθώς έγινε ζύμωση με εμβολιασμό στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* και με συνεμβολιασμό *Torulaspora delbrueckii* και *Saccharomyces cerevisiae*. Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν σταφύλια του τρύγου 2022 από την περιοχή Ασπρόκαμπου Νεμέας, χωρισμένα σε δύο μέρη, διαφοροποιημένα ως προς την καλλιεργητική τεχνική. Ένα μέρος αυτών, είχε δεχθεί αραίωση φορτίου μετά το στάδιο του περκασμού («αραιωμένα») ενώ το άλλο όχι («κανονικά»). Στα γλεύκη που προέκυψαν πραγματοποιήθηκαν οι βασικές αναλύσεις (σακχαροπεριεκτικότητα, οξύτητα, pH, αμμωνιακού αζώτου και αζώτου βασικών αμινοξέων). Ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικά οινοποιητικά πρωτόκολλα ως προς τον μικροοργανισμό ζύμωσης, καταγράφηκε η εξέλιξη των αλκοολικών ζυμώσεων και στους σταθεροποιημένους οίνους πραγματοποιήθηκαν βασικές αναλύσεις οίνου (ενεργός οξύτητα-pH, ολική οξύτητα, αλκοολικός τίτλος, πτητική οξύτητα) και αναλύσεις φαινολικών συστατικών και οξειδωσιμότητας (απορρόφηση στα 420 nm, Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ), Ολικά φαινολικά με την μέθοδο Folin-Ciocalteu και Δείκτης οξειδωσιμότητας(k)). Ακόμα, έγινε προσδιορισμός των πτητικών συστατικών και οργανοληπτική αξιολόγηση από ομάδα γευσιγνωστών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι ο εμβολιασμός του γλεύκους με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces* και *Saccharomyces* είχε θετικό αντίκτυπο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων ενώ όσον αφορά την αραίωση φορτίου μετά το στάδιο του περκασμού προέκυψαν κάποιες διαφοροποιήσεις στους οίνους που προέρχονταν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραίωση ιδίως ως προς τον αλκοολικό τίτλο, την ολική και πτητική οξύτητα και τα ολικά φαινολικά χωρίς ωστόσο τα αποτελέσματα τους να διαφοροποιούνται ιδιαίτερα από τους οίνους που προέρχονταν από πρέμνα που δεν είχαν δεχθεί αραίωση.

**Επιστημονική περιοχή:** Οινολογία

**Λέξεις κλειδιά:** Sauvignon blanc, non-*Saccharomyces*, αραίωση φορτίου

## **Effect of cluster thinning treatment and different wine making protocols in Sauvignon blanc wines**

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

### **ABSTRACT**

The production of a quality wine depends both on the cultivation technique of the vine in the vineyard and on the winemaking protocol that will be applied during the alcoholic fermentation. In this postgraduate thesis, the effect of two factors on the chemical and organoleptic profile of the produced Sauvignon blanc wines was studied. The first factor related to the cluster thinning after the veraison stage while the other factor related to the fermentation strain used during the alcoholic fermentation as fermentation was done by inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* strain and co-inoculation of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*. To carry out the experiment, grapes of the 2022 vintage from the Asprokampo area of Nemea were used, divided into two parts, differentiated in terms of cultivation technique. A part of them had received cluster thinning after the stage of hanging ("thinned") while the other one had not ("normal"). The resulting musts were subjected to basic analyzes (sugar content, acidity, pH, ammonia nitrogen and nitrogen of basic amino acids). Two different winemaking protocols were followed in terms of the fermentation microorganism, the evolution of the alcoholic fermentations was recorded and the stabilized wines were subjected to basic wine analyzes (active acidity-pH, total acidity, alcoholic strength, volatile acidity) and analyzes of phenolic components and oxidizability (absorption at 420 nm, Phenolic Index (PDI), Total phenolics by the Folin-Ciocalteu method and Oxidability Index (k)). Furthermore, the volatile components were determined and organoleptic evaluation by a group of tasters. The results of the present study showed that the inoculation of the must with a mixed culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* had a positive impact on the organoleptic characteristics of the wines produced, while regarding the cluster thinning after the veraison stage, some differences emerged in the wines that came from vines that had received cluster thinning especially in terms of alcoholic strength, total and volatile acidity and total phenolics without, however, their results being particularly different from the wines that came from vines that had not received thinning.

**Scientific area:** Oenology

**Key words:** Sauvignon blanc, non--*Saccharomyces*, cluster thinning

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. Εισαγωγή</b> .....	<b>6</b>
1.1. Η προέλευση της αμπέλου και η ταξινόμηση των αμπελουργικών ποικιλιών .....	6
1.2. Η ποικιλία Sauvignon blanc.....	8
<b>1.2.1. Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2.2. Η καλλιέργεια Sauvignon Blanc στην Ελλάδα</b> .....	<b>9</b>
1.3. Γεωγραφική περιοχή καλλιέργειας της ποικιλίας του πειράματος.....	10
1.4. Καλλιεργητικές τεχνικές στον αμπελώνα .....	10
<b>1.4.1. Η τεχνική της αραιώσης φορτίου στο πρέμνο</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4.2. Χρόνος εφαρμογής αραιώσης φορτίου</b> .....	<b>12</b>
1.5. Αλκοολική ζύμωση .....	13
<b>1.5.1. Οι ζύμες οινοποίησης</b> .....	<b>14</b>
<b>1.5.2 Παράγοντες που επιδρούν στον πολλαπλασιασμό των ζυμών</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5.3 Ζύμωση με επιλεγμένες ζύμες</b> .....	<b>17</b>
1.6. Χημική σύσταση γλεύκους και οίνου .....	19
1.6.1 Οργανικά οξέα.....	19
1.6.2 Σάκχαρα .....	21
1.6.3 Φαινολικά συστατικά σταφυλιού και οίνου .....	21
1.6.4 Πτητικές ενώσεις στον οίνο .....	23
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>26</b>
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός .....	26
<b>2.1.1 Επέμβαση στον αμπελώνα</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1.2 Πρωτόκολλο Οινοποίησης και κωδικοποίηση δειγμάτων</b> .....	<b>26</b>
2.2 Προζυμωτικές αναλύσεις - Παρακολούθηση αλκοολικής ζύμωσης .....	28
2.2.1 Μέτρηση σακχάρων με διαθλασίμετρο .....	28
2.3 Μεταζυμωτικές κατεργασίες .....	30
2.3.1 Έλεγχος πρωτεϊνικής σταθερότητας.....	30
2.4 Μεταζυμωτικές αναλύσεις .....	30
<b>2.4.1 Προσδιορισμός ελεύθερου και ολικού SO<sub>2</sub></b> .....	<b>30</b>
<b>2.4.2 Ανάλυση FTIR</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4.1 Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4.2 Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4.3 Μέτρηση απορρόφησης στα 420nm</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4.4 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)</b> .....	<b>32</b>
2.4.5 Ολικά φαινολικά με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	32
2.5 Έλεγχος οξειδωτικής σταθερότητας με τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης.....	33
2.6 Ανάλυση πτητικών ενώσεων.....	34
<b>2.6.1 Εκχύλιση πτητικών συστατικών</b> .....	<b>34</b>
<b>2.6.2 Προσδιορισμός πτητικών ενώσεων με GC/MS</b> .....	<b>34</b>
2.7 Οργανοληπτική αξιολόγηση οίνων .....	36
2.8 Στατιστική ανάλυση δεδομένων .....	37
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>38</b>
3.1. Μετρήσεις στο σταφύλι.....	38
3.2. Προζυμωτικές αναλύσεις στο γλεύκος.....	39
3.3. Παρακολούθηση αλκοολικής ζύμωσης .....	39
3.4. Αναλύσεις στον οίνο.....	41
3.5. Αναλύσεις φαινολικών συστατικών .....	45
3.6. Ανάλυση αρωματικών ενώσεων των πειραματικών οίνων με GC-MS.....	48
3.6. Οργανοληπτική αξιολόγηση .....	54
3.7 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) .....	55
<b>4. Συμπεράσματα</b> .....	<b>60</b>
<b>Μελλοντική έρευνα</b> .....	<b>64</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>65</b>
<b>Διεθνής Βιβλιογραφία</b> .....	<b>65</b>
<b>Ελληνική βιβλιογραφία</b> .....	<b>69</b>
<b>Ιστοσελίδες</b> .....	<b>70</b>

# 1. Εισαγωγή

1.1. Η προέλευση της αμπέλου και η ταξινόμηση των αμπελουργικών ποικιλιών

Σύμφωνα με τον Μ. Σταυρακάκη, (2010) η «άμπελος η οиноφόρος» (*Vitis Vinifera L.*) αποτελεί το πλέον σημαντικό για την παραγωγική αμπελουργία είδος του γένους *Vitis* της οικογένειας των Αμπελίδων (*Vitaceae*, αρχικά *Ampelidae* και *Ampelidaceae*).

Από την ελληνική αρχαιότητα, φιλόσοφοι, συγγραφείς και ποιητές αναφέρουν χρήσιμες πληροφορίες για το πλήθος των ποικιλιών, την τεχνική καλλιέργειας και την οινοποίηση. Στις αρχές του περασμένου αιώνα οι Viana και Vermorel (1902-1910) αναφέρουν 24.000 ονόματα ποικιλιών και συνώνυμων που αντιστοιχούν σε περισσότερες από 9.000 ποικιλίες της οиноφόρου αμπέλου. Ο πρώτος που προσπάθησε να περιγράψει αμπελογραφικά της ελληνικές ποικιλίες ήταν ο Παλαιολόγος (1835, 1836) ο οποίος αναγνωρίζει 20 διαφορετικές ποικιλίες, ενώ στο δοκίμιο του ιερέα Πανδή (1867) αναφέρονται 30 διαφορετικά «είδη σταφυλών». Οι αμπελογραφικές περιγραφές και μελέτες αρχικά έδιναν έμφαση στις ιδιότητες των ποικιλιών *vinifera* που καλλιεργούνταν στην Ευρώπη ωστόσο μετά την εισβολή ασθενειών και εχθρών της αμπέλου στην Ευρώπη, και κυρίως της φυλλοξήρας (1863), ήταν αναγκαία η πιο συστηματική μελέτη ποικιλιών και υβριδίων των αμερικάνικων αμπέλων, όχι μόνο των παραγωγικών ποικιλιών αλλά και των ανθεκτικών στη ριζόβια μορφή της φυλλοξήρας ειδών.

Η προέλευση και η εμφάνιση της καλλιεργούμενης μορφής αμπέλου φαίνεται να προέρχεται από τις περιοχές του Καύκασου (σημερινή Αρμενία) ή και ανατολικότερα (σημερινό Αφγανιστάν), γύρω στο 6000-5000 π.Χ.. Κατά τον De Lattin (1939) υπάρχουν τα παρακάτω τρία υποείδη αμπέλου με την καλλιεργούμενη μορφή να έχει προέλθει από το υπο-είδος *Vitis vinifera caucasica*.

*Vitis vinifera sylvestris* GMELIN (Άμπελος αγρία η οиноφόρος)

*Vitis vinifera caucasica* VAVILON (Καυκασιανή η οиноφόρος)

*Vitis vinifera sativa* DE CADOLLE (Καλλιεργούμενη άμπελος).

Αρκετοί αμπελογράφοι θεωρούν ότι δεν πρόκειται περί διαφορετικών υπο-ειδών αλλά για ομάδες διαφόρων μορφών.

Με τα σημερινά δεδομένα η οиноφόρος άμπελος στην μία ή στην άλλη μορφή, εντοπίστηκε από τον προϊστορικό άνθρωπο-συλλέκτη ως αναρριχώμενος θάμνος σε δασώδεις ή παραποτάμιες περιοχές, και οι μικρές σταφυλές με τις εξίσου μικρές, μελανές και υπόξινες ράγες που περιείχαν μεγάλα γίγαρτα αποτέλεσαν βασικό στοιχείο της διατροφής του. Η έναρξη της περιόδου καλλιέργειας της άγριας αμπέλου τοποθετείται μεταξύ 8000-6000 π.Χ., ενώ η πρώτη οργανωμένη καλλιέργεια *Vitis vinifera sativa* τοποθετείται μεταξύ 6000-5000 π.Χ.

### 1.1.1. Η καλλιέργεια της αμπέλου στον ελλαδικό χώρο

Η καλλιέργεια της αμπέλου στον ευρύτερο ελλαδικό χώρο της αρχαιότητας μεταφέρθηκε, σύμφωνα με μια άποψη, από την Αίγυπτο μέσω της μινωικής Κρήτης (3000-2800 π.Χ.).

Σύμφωνα με την ελληνική μυθολογία, η άμπελος και ο οίνος συνδέονται με τον Διόνυσο, γιό του Δία και της Σεμέλης, και ο βλαστός της αμπέλου αποτελεί ενσάρκωση του θεού. Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο τόπος καταγωγής της διονυσιακής λατρείας καθώς αρχαίοι συγγραφείς ενδεικτικά αναφέρουν ως πόλεις ή περιοχές προέλευσης την Λυδία, την Φρυγία, τις Ινδίες, την Αίγυπτο και την Θράκη. Η Θράκη ειδικότερα, φαίνεται ότι υπήρξε σημαντικός χώρος ανάπτυξης και διάδοσης της διονυσιακής λατρείας και κατ' επέκταση της καλλιέργειας της αμπέλου και της παραγωγής φημισμένων οίνων.

Η άνθηση του μινωικού πολιτισμού αποτέλεσε σημαντικό παράγοντα διάδοσης και εξάπλωσης της αμπέλου στην υπόλοιπη Ελλάδα αλλά και στην βελτίωση της αμπελοκομικής τεχνικής και της οινοποίησης. Το ταξίδι των κρητικών ποικιλιών αμπέλου φαίνεται ότι είχε ως ενδιάμεσο σταθμό την Νάξο και στην συνέχεια διαδόθηκε στις υπόλοιπες Κυκλάδες, την νοτιοανατολική Πελοπόννησο και αργότερα την Ηπειρωτική Ελλάδα. Μετέπειτα η καλλιέργεια της αμπέλου μεταφέρθηκε σε ολόκληρη την ελληνική χερσόνησο και η τεχνική της εξελίχθηκε σε τέτοιο επίπεδο ώστε να θεωρείται εμπειρική τέχνη στην αρχαία Ελλάδα. Ακολούθησε η διάδοση της στη Δύση με πρώτα κέντρα τη νότια Ιταλία, τη Σικελία και αργότερα την νότια Γαλλία (Σταυρακάκης, 2013).

### 1.1.2. Οινοποιήσιμες ποικιλίες αμπέλου

Στις ποικιλίες οινοποιίας, βασική γενική ιδιότητα είναι η παραγωγικότητα καθώς επηρεάζει άμεσα την ποιότητα του παραγόμενου οίνου καθώς και ο γενετικός χαρακτήρας που ελέγχει το χρόνο ωρίμανσης. Από τους ειδικούς χαρακτήρες η οινοποιία ασχολείται κυρίως με την χημική σύνθεση των ραγών, του βόστρυχου και των γιγάρτων και δευτερευόντως με τους ανατομικούς και μορφολογικούς χαρακτήρες (Σταυρακάκης, 2010).

Η χημική σύσταση της σάρκας δεν διαφέρει από του γλεύκους για την ίδια ποικιλία αμπέλου και τον ίδιο βαθμό ωριμότητας των ραγών, ωστόσο διαφέρει κατά πολύ μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών και επηρεάζεται έντονα από το βαθμό ωριμότητας, το ύψος φορτίου, της εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής και τις επεμβάσεις φυτοπροστασίας. Το γλεύκος αποτελείται από νερό στο οποίο βρίσκονται κυρίως διαλυμένα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη) και οργανικά οξέα (τρυγικό, μηλικό, κιτρικό). Ακόμα, περιέχει ανόργανα άλατα, πηκτίνες, ταννίνες, αρωματικές ουσίες, ιχνοστοιχεία. Η οινολογική αξία της ποικιλίας προσδιορίζεται από την ειδική σχέση μεταξύ σακχάρων και οξέων, σχέση που καθορίζει την γευστική ισορροπία του γλεύκους και την καταλληλότητα για την παρασκευή του επιθυμητού οίνου. Η χημική σύσταση της ράγας επηρεάζεται από τους ίδιους παράγοντες που επηρεάζουν και την χημική σύσταση της σάρκας. Ο φλοιός των ώριμων ραγών είναι πλούσιος σε πολυφαινόλες, αρωματικές και πρόδρομες των αρωμάτων ουσίες, κυτταρίνη, πηκτίνες και ανόργανες ουσίες (κυρίως κάλιο) (Σταυρακάκης, 2010).

## 1.2. Η ποικιλία Sauvignon blanc

Η ποικιλία Sauvignon blanc είναι μια λευκή οινοποιήσιμη ποικιλία το όνομα της οποίας προέρχεται από τις γαλλικές λέξεις sauvage ("άγριο"), vigne ("αμπέλι") και blanc ("λευκό") (Galet, 1998). Πρώτη φορά αναφέρθηκε το 16<sup>ο</sup> αιώνα με το σταφύλι να είναι γνωστό ως Surin. Από το 17<sup>ο</sup> αιώνα άρχισε να καλλιεργείται στις περιοχές του Λίγηρα και του Μπορντό χωρίς ωστόσο να είναι γνωστή η ακριβής προέλευσή της. Από το 1980 η ποικιλία ξεκίνησε να καλλιεργείται ευρύτατα ιδίως στη Γαλλία, την Ρουμανία, τη Χιλή, την Καλιφόρνια, την Ιταλία και τη Νέα Ζηλανδία και πολύ αργότερα ξεκίνησε η καλλιέργεια της στην Ελλάδα και διαδόθηκε στις διάφορες αμπελουργικές περιοχές.

Η ποικιλία είναι πλέον γνωστή στη Γαλλία ως «Sauvignon», με συνώνυμα όπως το Blanc fumé, Fié, Sauvignon blanc, Sauvignon jaune και Sauvignon vert (Boursiquot, 2010). Το Sauvignon blanc είναι απόγονος του Savagnin blanc από την Γιούρα της Γαλλίας σύμφωνα με το ίδρυμα ερευνών της Γαλλίας (INRA Montpellier και Domaine de Vassal). Όσον αφορά στο Savagnin blanc είναι γονέας των ακόλουθων ποικιλιών: Sauvignon blanc, Chenin, Gruner Veltliner (Αυστρία), Verdesse (Άλπεις), Verdejo blanco (Ισπανία) και Verdelho da Madeira (Πορτογαλία) χωρίς ωστόσο να έχει προσδιοριστεί ο δεύτερος γονέας. Το 1997 αποδείχθηκε ότι το Sauvignon blanc και το Cabernet franc διασταυρώθηκαν (πιθανότατα στο Μπορντό) για να παράγουν μία από τις πιο δημοφιλείς ερυθρές ποικιλίες κρασιού, το Cabernet sauvignon (Boursiquot, 2010).

Ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειάς του, το Sauvignon blanc απαντάται με πολλές συνώνυμες ονομασίες. Για παράδειγμα, στη Χιλή συναντάται ως Sauvignon blanco ή Blanc Fumé όπως και στην Ν. Αφρική, ως Fume Muscat Sylvaner στην Γερμανία και Ουγγαρία, ως Fumé blanc στην Αυστρία, Γερμανία, Καναδά, Η.Π.Α. και Ν. Ζηλανδία. Στην Ουγγαρία αναφέρεται ως Weisser Sauvignon και Sovinjon Bel, ενώ στην Βοσνία και Ερζεγοβίνη επικρατούν τα Sovinjon Bijeli, Sovinjon και Muškatni Silvanac. Στην Ρωσία οι ονομασίες του είναι Gros Sauvignon, Sauvignon vert και Pinot Mestny bely ενώ στην Ρουμανία καλλιεργείται και οινοποιείται ως Sauvignon verde και στην Σλοβενία ως Zeleni sauvignon και Sauvignonasse.

### 1.2.1. Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά

Όσον αφορά την καλλιεργητική της συμπεριφορά είναι μια ποικιλία ζωηρή, μέτριας γονιμότητας και παραγωγικότητας, με δύο σταφυλές ανά καρποφόρο βλαστό. Συνήθως η γονιμότητα των πρώτων οφθαλμών της κληματίδας είναι χαμηλή γι' αυτό συνιστάται γραμμικό κλάδεμα βραχύ (2-3 οφθαλμοί ανά παραγωγική μονάδα) ή μακρύ κλάδεμα καρποφορίας (αμολυτή με 4-5 οφθαλμούς).

Η ωρίμανση των σταφυλιών είναι σχετικά πρώιμη ενώ θεωρείται όψιμη ως προς το χρόνο εκβλάστησης των λανθανόντων οφθαλμών. Εξαιτίας της πρώιμης ωρίμανσης δεν έχει υψηλές ηλιοθερμικές απαιτήσεις ωστόσο ο βραδύς ρυθμός ωρίμανσής της συμβάλλει καθοριστικά στο αρωματικό της δυναμικό γι' αυτό στις ψυχρές περιοχές, προκειμένου να επιτευχθεί αργός ρυθμός ωρίμανσης, γίνεται επιλογή κατάλληλου συστήματος μόρφωσης και χλωρά κλαδέματα. Στις θερμές περιοχές από την άλλη, που ο τρύγος γίνεται νωρίτερα



για να διατηρήσουν οι οίνοι υψηλή οξύτητα, έχει ως αποτέλεσμα να είναι αρωματικά ελλιπή.

Προσαρμόζεται εύκολα σε εδάφη με διαφορετική γονιμότητα και σύσταση, που όμως έχουν θετικό αντίκτυπο στο αρωματικό της δυναμικό, κυρίως χαλικώδη ή με μεγάλες κροκάλες εδάφη που θερμαίνονται καλύτερα ενώ, αντίθετα, βαριά, γόνιμα εδάφη προσδίδουν στους οίνους χορτώδη αρώματα (Σταυρακάκης, 2010). Ιδανικό pH εδάφους για την καλλιέργειά του θεωρείται το 6,5-8 και περιεκτικότητα σε ολικό ανθρακικό ασβέστιο 5-30%.

Για τον εμβολιασμό του χρησιμοποιούνται υποκείμενα μέσης ή μικρής ζωηρότητας. Στην Ελλάδα ικανοποιητικά αποτελέσματα έδωσε ο εμβολιασμός με 110R και 41B. Στην Ευρώπη χρησιμοποιούνται ακόμα τα SO4, 3309C, 41B, 5BB, 420A. Σχετικά με την ανθεκτικότητα της ποικιλίας σε ασθένειες παρουσιάζει ευαισθησία στο ωϊδίο και τον βοτρυτή ενώ είναι σχετικά ανθεκτική στο περονόσπορο. Εφόσον η ποικιλία καλλιεργηθεί σε κατάλληλες εδαφοκλιματικές συνθήκες και τρυγηθεί στο κατάλληλο στάδιο ωριμότητας, οι εν δυνάμει οίνοι θα έχουν ισορροπημένη αναλογία σακχάρων-οξέων και διατήρηση του τυπικού αρωματικού δυναμικού.

Η ποικιλία Sauvignon blanc χρησιμοποιείται παγκοσμίως για την παραγωγή αρωματικών οίνων με τυπικά αρώματα που οφείλονται κυρίως στην παραγωγή θειολών. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται κυρίως πτητικές θειόλες όπως οι 4-mercapto-4methylpentan-2-one (4MMP), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) και 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) οι οποίες ευθύνονται για άρωμα γκρέιπφρουτ και φρούτα του πάθους (Darriet, 1998) ενώ τα χορτώδη αρώματα που προσδίδει στους παραγόμενους οίνους σχετίζονται κυρίως με τις επεμβάσεις στο αμπέλι. Ακόμα, χαρακτηριστικό είναι το άρωμα πράσινης πιπεριάς που οφείλεται στις μεθοξυπυραζίνες ιδίως ibMP των οποίων η συγκέντρωση επηρεάζεται από το μικρο και μέσο-κλίμα του πρέμνου, γι' αυτό και προτείνεται η καλλιέργεια της ποικιλίας σε ψυχρές περιοχές σε αντίθεση με τις θερμές, καθώς και αμπελουργικές πρακτικές για την επίτευξη ευνοϊκών συνθηκών όπως σχετικά χαμηλή θερμοκρασία και μειωμένη έκθεση στο ηλιακό φως που ευνοεί το πρόδρομο μεταβολισμό των μεθοξυπυραζών και την διατήρησή τους κατά την ωρίμανση των σταφυλών.

### 1.2.2. Η καλλιέργεια Sauvignon Blanc στην Ελλάδα

Η ποικιλία Sauvignon blanc καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στην Δράμα, όπου μέχρι σήμερα αποτελεί μεγάλο τμήμα της αμπελουργικής της ζώνης, και στην συνέχεια εξαπλώθηκε στα υπόλοιπα αμπελουργικά διαμερίσματα της χώρας.

Σήμερα η καλλιέργειά της συνιστάται για τα αμπελουργικά διαμερίσματα της Στερεάς Ελλάδας, της Μακεδονίας, της Θράκης, για τους νομούς Αργολίδας, Αρκαδίας, Αχαΐας, Ηρακλείου, Κεφαλληνίας, Κορινθίας και Λάρισας και επιτρέπεται στο αμπελουργικό διαμέρισμα της Δωδεκανήσου (Σταυρακάκης, 2010).

Το Sauvignon blanc εγκλιματίστηκε άριστα στο κλίμα της Ελλάδας, με αποτέλεσμα την σωστή του ανάπτυξη και ωρίμανση που αντανακλάται στην ισορροπημένη οξύτητα και στα τυπικά αρώματα της ποικιλίας όπως κίτρο, γκρέιπφρουτ, πράσινο μήλο, φρούτα του

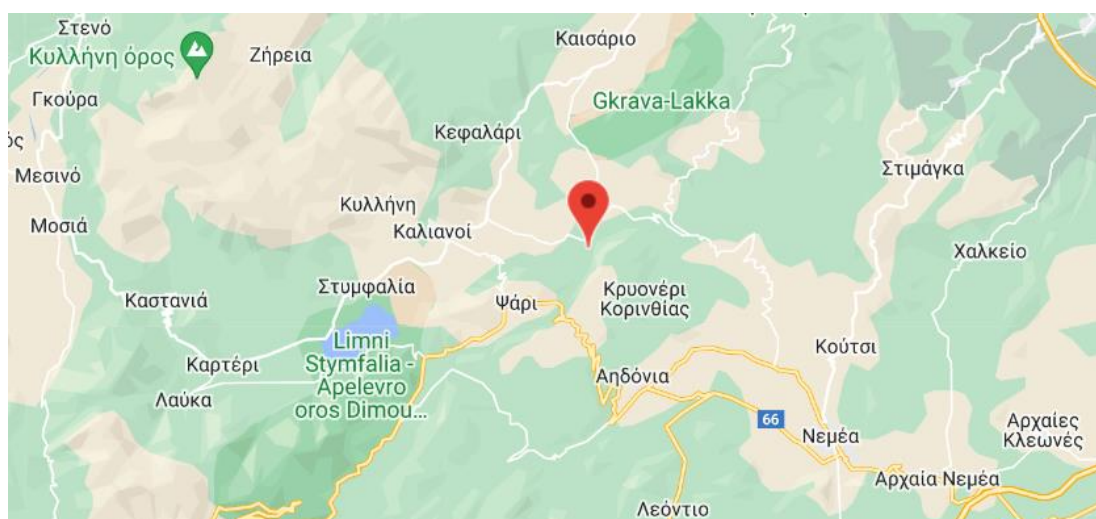
πάθους και λευκόσαρκα φρούτα σε συνδυασμό με γεμάτο σώμα στους παραγόμενους οίνους. Τα ελληνικά Sauvignon λόγω θερμού κλίματος διαφέρουν απ' εκείνα του Νέου Κόσμου που χαρακτηρίζονται από φυτικά αρώματα λόγω χαμηλών θερμοκρασιών και έλλειψη ηλιοφάνειας και ξεχωρίζουν κυρίως για το φρουτώδες άρωμα και την φρεσκάδα τους.

Παλαιότερα χρησιμοποιούνταν ως blend με άλλες λευκές ποικιλίες, όπως το Ασύρτικο, ωστόσο σήμερα παράγονται εξίσου εξαιρετικοί μονοποικιλιακοί οίνοι. Πολλοί παραγωγοί, βέβαια, προτιμούν την ωρίμανσή του σε δρύινα βαρέλια, που αν και δεν εμφανίζουν τόσο έντονο φρουτώδες άρωμα, διαθέτουν πιο πυκνή και ογκώδη γεύση και έναν πιο πλούσιο χαρακτήρα με νότες ξύλου.

### 1.3. Γεωγραφική περιοχή καλλιέργειας της ποικιλίας του πειράματος

Τα σταφύλια ποικιλίας Sauvignon blanc που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα προέρχονταν από την περιοχή Ασπρόκαμπου Νεμέας (Ψάρι) που ανήκει στην ζώνη Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης Νεμέας, από αμπελώνες του οροπεδίου της Στυμφαλίας με υψόμετρο 800 μ. Τα πρέμνα καλλιεργούνται σε βαθιά και αργιλώδη εδάφη με μεγάλο ποσοστό ανθρακικού ασβεστίου. Το κλίμα της περιοχής το χειμώνα είναι ψυχρό με αρκετές βροχές και χιόνια ενώ χαρακτηρίζεται από δροσερή άνοιξη και ξηρό καλοκαίρι με υψηλές θερμοκρασίες την ημέρα και χαμηλότερες την νύχτα.

Στο συγκεκριμένο αμπελοτεμάχιο έχει επικρατήσει η διαμόρφωση του βλαστικού τείχους σε σύστημα λύρας με σκοπό τον έλεγχο της ζωηρότητας των φυτών. Η διαμόρφωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μέσου μεγέθους του σταφυλιού κατά 50% χωρίς την ταυτόχρονη αύξηση της συνολικής παραγωγής ανά στρέμμα. Ακόμα, αυξάνει κατά 50% την έκθεση της φυλλικής επιφάνειας στην ηλιακή ακτινοβολία με θετικό αντίκτυπο στην ποιότητα των παραγόμενων οίνων. Η ετήσια παραγωγή δεν ξεπερνά τα 800 kg/στρ.



**Εικόνα 1.** Γεωγραφική περιοχή καλλιέργειας του αμπελοτεμαχίου του πειράματος

### 1.4. Καλλιεργητικές τεχνικές στον αμπελώνα

Οι καλλιεργητικές τεχνικές που εφαρμόζονται στον αμπελώνα όπως η άρδευση, το κλάδεμα μόρφωσης και καρποφορίας, η λίπανση και η αραίωση φορτίου μπορεί να έχουν μεγάλο

αντίκτυπο στον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό του πρέμνου (García Pastor, 2019). Λαμβάνοντας υπόψη τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης του πρέμνου, το ανάγλυφο της περιοχής, την ποικιλία, το υποκείμενο καθώς και το επιθυμητό παραγόμενο προϊόν μπορεί να επιλεγθεί η πιο αποτελεσματική τεχνική με σκοπό την βελτίωση της απόδοσης του πρέμνου σε όλο το κύκλο ζωής του αλλά και της σχέσης μεταξύ των φυτοχημικών ενώσεων του (σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα, αρωματικές και φαινολικές ενώσεις) (Askari-Khorasgani, 2019).

#### 1.4.1. Η τεχνική της αραίωσης φορτίου στο πρέμνο

Η σωστή ισορροπία μεταξύ αναπαραγωγικής και βλαστικής ανάπτυξης είναι θεμελιώδης για την βέλτιστη ωρίμανση των σταφυλών. Σε έναν αμπελώνα, η υψηλή παραγωγή ανά πρέμνο μπορεί να καθυστερήσει την ωρίμανση και να έχει ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας των σταφυλών και κατ' επέκταση του παραγόμενου οίνου (Wang, 2018). Για το λόγο αυτό, καλλιεργητικές τεχνικές όπως η αραίωση φορτίου των πρέμνων μπορεί να έχουν ευνοϊκή επίδραση τόσο την ανάπτυξη του πρέμνου όσο και στην σύνθεση των σταφυλών.

Στην ουσία η αραίωση φορτίου είναι η τεχνική της αφαίρεσης ολόκληρων ταξιανθιών ή βοτρυών με σκοπό στην αποκατάσταση της αναλογίας μεταξύ επιφάνειας ενεργού φυλλώματος και βάρους παραγωγής. Βασικός στόχος αυτής της καλλιεργητικής τεχνικής είναι η βελτίωση των ποιοτικών χαρακτήρων των σταφυλών και η ομοιόμορφη ωρίμανση τους. Με την προσαρμογή του φορτίου διαμορφώνονται καλύτερες συνθήκες θρέψης για τις ταξιανθίες/ταξικαρπίες ενώ ακόμα προωθείται η βέλτιστη διαφοροποίηση των λανθανόντων οφθαλμών και ο σχηματισμός περισσότερων καταβολών ταξιανθιών. Οι βότρυες που παραμένουν στα πρέμνα συνήθως παρουσιάζουν αύξηση του μήκους και βάρους.

Η τεχνική αραίωσης φορτίου μελετάται σε συνδυασμό με βλαστολόγημα (αφαίρεση λαίμαργων βλαστών, διπλών βλαστών, βλαστών σε ακατάλληλες θέσεις όταν το μήκος τους είναι 15-30cm). Πιο συγκεκριμένα, στην ποικιλία Sauvignon blanc, η εφαρμογή πρώιμου αραιώματος και πρώιμου βλαστολογήματος είχε θετική επίδραση στην βλάστηση και παραγωγή (ποσοτικά και ποιοτικά) σε σχέση με την εφαρμογή μόνο ελαφρού βλαστολογήματος, και μάλιστα διαπιστώθηκε ότι όσο αυξανόταν ο αριθμός των ταξιανθιών καθυστερούσε η ωρίμανση (Naor 2002).

Ωστόσο είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η αναλογία βάρους παραγωγής ανά φυλλική επιφάνεια μεμονωμένα δεν είναι αντιπροσωπευτική για τις πραγματικές ποιοτικές δυνατότητες του αμπελώνα και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κι άλλοι παράμετροι όπως τα ανατομικά χαρακτηριστικά των σταφυλών (μέγεθος, πυκνότητα βότρυ, μέγεθος ράγας, πάχος φλοιού), η κατάσταση του φυλλώματος (ηλικία, θρεπτική και υδατική κατάσταση), το μικροκλίμα των σταφυλών και η ισορροπία του πρέμνου (ζωηρότητα, ανταγωνισμός βλαστών-σταφυλών).

Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, όταν η αραίωση του φορτίου εφαρμόστηκε σε αμπελώνες υψηλής παραγωγικότητας είχε ως αποτέλεσμα την πρώιμιση της παραγωγής (Valentini, 1991) ενώ υπό άλλες συνθήκες, δηλαδή μη αραίωσης φορτίου, η ωρίμανση καθυστέρησε. Η αφαίρεση σταφυλών εκτός από την μείωση στην παραγωγή, είχε επίδραση και στην

χημική σύνθεση της ράγας καθώς αύξησε την συγκέντρωση σακχάρων και του pH και μείωσε την συγκέντρωση των οξέων στο εσωτερικό της ράγας (Wolpert, 1983; Reynolds, 1989a; Morando, 1991; Zironi, 1993). Ακόμα, σε παγετόπληκτες περιοχές, η εφαρμογή αυτής της τεχνικής είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της συχνότητας φαινομένων σήψης των σταφυλών και συνέβαλλε στην επαρκή ωρίμανση του ξύλου (Bravo, 1993; Kliewer, 1983; Lott & Emig, 1985; Reynolds, 1986; Bavaresco, 1991).

Από την άλλη, οι Ough & Nagaoka (1984) ανέφεραν ότι η αφαίρεση σταφυλών είχε ελάχιστη επίδραση στην ωρίμανση της ράγας και στην σύνθεση του γλεύκους παρ' όλο που πολλοί ερευνητές μελετώντας διαφορετικές ποικιλίες διαπίστωσαν βελτίωση στην ποιότητα του παραγόμενου οίνου με έντονο ποικιλιακό χαρακτήρα (Carbonneau, 1977; Bravo, 1984; Ough & Nagaoka, 1984; Lott & Emig, 1985; Grigolli, 1989; Di Collalto, 1991; Ubigli, 1991).

Ακόμα, η αραίωση φορτίου των πρέμνων φαίνεται ότι έχει επίδραση και στις αρωματικές ενώσεις στο εσωτερικό των σταφυλών, καθώς στην ποικιλία Μοσχάτο αποδείχτηκε ότι συνέβαλλε στην αύξηση της συγκέντρωσης των τερπενίων στο σταφύλι, και πιο συγκεκριμένα της λιναλοόλης, που συσχετίστηκε στις περισσότερες περιπτώσεις με θετικά χαρακτηριστικά στην γεύση και στο άρωμα των οίνων (Alem, 2021). Επίσης, μια άλλη έρευνα έδειξε ότι η αραίωση φορτίου στην ποικιλία Chardonnay, που εφαρμόστηκε σε διάφορα φαινορικά στάδια, αύξησε την συγκέντρωση των μονοτερπενίων κατά την διάρκεια της αραίωσης ενώ τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν μελετώντας και την ποικιλία Sauvignon blanc, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση των μονοτερπενίων (Kok, 2011; Naor, 2002).

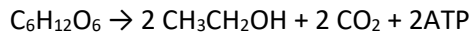
#### 1.4.2. Χρόνος εφαρμογής αραίωσης φορτίου

Η χρονική περίοδος εφαρμογής της αραίωσης φορτίου στο πρέμνο έχει μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη και την χημική σύσταση της σταφυλής. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν διεξαχθεί, το κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης της σταφυλής για αφαίρεση βοτρυών είναι κοντά στον περκασμό, αφού έχει ανασχεθεί η βλάστηση του πρέμνου. Αρκετά νωρίτερα από το στάδιο του περκασμού διεγείρει την αύξηση της ράγας ανά σταφυλή ενώ μετά τον περκασμό αυτή η παρέμβαση είναι εντελώς αναποτελεσματική (Κουνδουράς, 2021). Ακόμα, έχει αποδειχθεί ότι στην ποικιλία Sauvignon blanc η αραίωση λίγες ημέρες πριν το στάδιο του περκασμού είχε βέλτιστα αποτελέσματα στην χημική σύνθεση των σταφυλών και στην συγκέντρωση των μονοτερπενίων (Kok, 2011).

Έχει γίνει εκτενής έρευνα για να προσδιοριστεί το κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης της σταφυλής, κατά το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί αραίωση φορτίου στο πρέμνο, με μελέτες να επικεντρώνονται και στην περίοδο πριν την άνθιση αλλά και μετά τον περκασμό. Πιο συγκεκριμένα, αρκετά είναι τα ευρήματα που αποδεικνύουν ότι η αραίωση φορτίου από την άνθιση έως τον περκασμό είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της απόδοσης της παραγωγής (Looney & Wood, 1977; Looney, 1981b; Bravo, 1984; Lott & Emig, 1985; Bavaresco, 1991; Van Schalkwyk & De Villiers, 1992a). Ωστόσο, σύμφωνα με κάποιες άλλες μελέτες, μείωση της απόδοσης επιτυγχάνεται όταν η αφαίρεση των σταφυλών γίνεται μετά το σχηματισμό της ράγας μέχρι τον περκασμό. Μάλιστα, η μέγιστη μείωση της παραγωγής παρατηρείται με την αφαίρεση σταφυλών μετά το περκασμό, καθώς σε αυτό το στάδιο έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των ραγών και η κυτταρική διαίρεση στο εσωτερικό του (Fisher, 1977; Di Collalto, 1991; Van Schalkwyk & De Villiers, 1995).

### 1.5. Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση αποτελεί βιοχημικό φαινόμενο κατά το οποίο τα ένζυμα κάποιων ζυμών μεταβολίζουν τα σακχάρα σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα ενώ ταυτόχρονα παράγεται ενέργεια με την μορφή θερμότητας (περίπου 25 kcal/μόριο γλυκόζης) (Τσέτουρας, 2003). Με την διαδικασία αυτή το υπό ζύμωση γλεύκος μετατρέπεται σε οίνο. Η απλοποιημένη αντίδραση αναπαρίσταται ως εξής:



Η αλκοολική ζύμωση βρίσκει εφαρμογή τόσο στη βιομηχανία παραγωγής οίνου και άλλων αλκοολούχων ποτών, όσο και στη βιομηχανία παραγωγής αλκοόλης (για ενεργειακούς, φαρμακευτικούς και άλλους σκοπούς) από υποπροϊόντα της γεωργο-βιομηχανίας.

Οι ζύμες και πολλοί μικροοργανισμοί μεταβολίζουν το πυροσταφυλικό οξύ και παράγουν αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, αντί για γαλακτικό οξύ. Στην αλκοολική ζύμωση, η γλυκόζη εισέρχεται στο κύτταρο της ζύμης μέσω της εκλεκτικά περατής κυτταροπλασματικής του μεμβράνης. Εκεί, με τη μεσολάβηση της εξωκινάσης και του αδενοζινοτριφωσφορικού οξέος (ATP) φωσφορυλιώνονται στο έκτο άτομο C και στη συνέχεια, αφού πρώτα μετατραπεί μέσω ισομερίωσης προς φρουκτόζη, και στο πρώτο άτομο άνθρακα. Στη συνέχεια, η διφωσφορυλιωμένη φρουκτόζη, με την παρέμβαση του ενζύμου της αλδολάσης, διαχωρίζεται προς δύο τριόζες που καταλήγουν μέσω σειράς αντιδράσεων σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Επειδή η αλκοολική ζύμωση είναι οξειδοαναγωγική αντίδραση, ταυτόχρονα με το σχηματισμό των δύο μορίων πυροσταφυλικού οξέος ανάγονται με τέσσερα άτομα υδρογόνου και δύο μόρια του συνενζύμου νικοτινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD). Στο τελευταίο στάδιο, τα δύο μόρια του πυροσταφυλικού οξέος δίνουν με αποκαρβοξυλίωση δύο μόρια διοξειδίου του άνθρακα και δύο μόρια ακεταλδεΐδης (Μπαλατσούρας, 2006).

Η αιθανόλη αποτελεί ένα από τα κύρια τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των σακχάρων από τους ζυμομύκητες ενώ, σε ίσες μοριακές ποσότητες με την αιθανόλη, σχηματίζεται και διοξείδιο του άνθρακα, αν και το μεγαλύτερο μέρος του διαφεύγει στην ατμόσφαιρα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Το διοξείδιο του άνθρακα είναι ιδιαίτερα διαλυτό στον οίνο και μάλιστα έχει παρατηρηθεί πως σε υψηλές πιέσεις δημιουργεί συνθήκες τοξικότητας για τους ζυμομύκητες με αποτέλεσμα την επιβράδυνση και διακοπή της ζύμωσης. Κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται, επίσης, διάφορα πτητικά και μη πτητικά οξέα, συμπεριλαμβανομένης και της γλυκερόλης, όπως και μικρές ποσότητες πτητικών εστέρων, που επηρεάζουν όμως σημαντικά την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Επιπλέον, μπορεί να παραχθούν και σουλφίδια τα οποία υποβαθμίζουν αρωματικά τον παραγόμενο οίνο αλλά και ενώσεις όπως το διακετύλιο, η ακετοΐνη, η βουτάνο-2-3-διόλη οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν θετικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου προσδίδοντας του ευχάριστα αρώματα βουτύρου και καραμέλας (Μπαλατσούρας, 2006).

Ο κύριος ζυμομύκητας της οινοποίησης είναι ο προαιρετικά αναερόβιος *Saccharomyces cerevisiae*. Σε αυτόν, ο μηχανισμός παραγωγής αιθανόλης ξεκινάει με την παραγωγή πυροσταφυλικού οξέος από γλυκόζη μέσω της οδού EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) και ακολουθεί μετατροπή του σε αιθανόλη, κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα

1 μόριο γλυκόζης μέσω της οδού EMP δίνει 2 μόρια πυροσταφυλικού οξέος, τα οποία δίνουν 2 μόρια αιθανόλης με ταυτόχρονη οξειδωση 2 μορίων NADH.

Κατά την αλκοολική ζύμωση, η ενέργεια που παράγεται από 1 μόριο γλυκόζης είναι 2 μόρια ATP, δηλαδή όσο περίπου το 5% εκείνης που παράγεται, υπό αερόβιες συνθήκες, από τον ίδιο μικροοργανισμό (36 μόρια ATP). Η αντίδραση παραγωγής αιθανόλης είναι συνεπώς ικανή να επανοξειδώσει τα 2 μόρια NADH που παράγονται κατά τη μεταβολική οδό της γλυκόλυσης. Ένα ποσοστό της γλυκόζης εισέρχεται στην οδό των φωσφοροπεντοζών, μέσω της οποίας παράγονται C4 και C5 υδατάνθρακες, οι οποίοι αποτελούν απαραίτητες πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση κυτταρικών υλικών, όπως επίσης και 2 μόρια NADPH και 1 μόριο NADH. Η επανοξείδωση των μορίων αυτών δεν μπορεί να γίνει μέσω της μετατροπής του πυροσταφυλικού σε αιθανόλη, αφού το παραγόμενο πυροσταφυλικό επαρκεί μόνο για την επανοξείδωση των 2 μορίων NADH που παράγονται από τη μεταβολική οδό EMP. Έτσι, τα μόρια αυτά επανοξειδώνονται μέσω άλλων αντιδράσεων και κυρίως μέσω των αντιδράσεων βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων (Μπαλατσούρας, 2006).

Στον ενεργειακό ισολογισμό, η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας που προκύπτει από το χημικό μετασχηματισμό ενός μορίου γλυκόζης σε CO<sub>2</sub> και αιθανόλη είναι 40 Kcal. Η ενέργεια του σχηματισμού ενός μορίου ATP είναι ίση με 7,3 Kcal. Κατά την αλκοολική ζύμωση σχηματίζονται δύο μόρια ATP και κατά συνέπεια ελευθερώνονται συνολικά 25,4 Kcal υπό τη μορφή ενέργειας εκλύοντας θερμότητα στο γλεύκος που βρίσκεται σε ζύμωση. Η επανοξείδωση του NADH, συνεπάγεται την κατανάλωση οξυγόνου και την οξείδωση πυροσταφυλικού οξέος μέσω του κύκλου του Krebs με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας ενέργειας καθώς για κάθε μόριο σακχάρου σχηματίζονται 36 μόρια ATP. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα η αναπνευστική οδός για το ίδιο βάρος σακχάρων να θέτει στη διάθεση της ζύμης 19 φορές περισσότερη ενέργεια. Η ζύμωση των σακχάρων από τη ζύμη παράγει πάντοτε λίγο γαλακτικό οξύ, περίπου 200 mg/l. Ο μηχανισμός αυτού του σχηματισμού μοιάζει με αυτόν της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Οι ζύμες σχηματίζουν σχεδόν αποκλειστικά D(-) γαλακτικό οξύ σε σύγκριση με τα γαλακτικά βακτήρια (Τσακίρης 2017, Αγγελής 2017, Μπαλατσούρας, 2006, Κατινάκης 2004).

#### 1.5.1. Οι ζύμες οινοποίησης

Η ζυμομύκητες ή ζύμες είναι μικροοργανισμοί οι οποίοι κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης μεταβολίζουν τα σάκχαρα σε αιθανόλη και CO<sub>2</sub> σύμφωνα με τη γλυκολυτική οδό EMP (Γλυκόζη + 2ADP + 2P<sub>i</sub> → 2Αιθανόλη + 2CO<sub>2</sub> + 2ATP) αλλά και παράγουν δευτερογενή προϊόντα όπως ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, γλυκερόλη, ηλεκτρικό οξύ, διακετύλιο, ακετοΐνη.

Οι ζυμομύκητες, ως προς την μορφολογία τους, είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί με μέγεθος κυττάρων 5-8μm. Ο πυρήνας τους είναι οργανωμένος και κυρίως αποτελούνται από κυτταρικό τοίχωμα, κυτταρική μεμβράνη, κυτταρόπλασμα, μιτοχόνδρια και άλλα οργανίδια. Οι ζυμομύκητες του γλεύκους και οίνου είναι ατελείς ζυμομύκητες και ασκομύκητες. Τα δύο αυτά είδη διαφέρουν ως προς το τρόπο αναπαραγωγής τους καθώς οι ασκομύκητες πολλαπλασιάζονται αγενώς ή εγγενώς ενώ οι ατελείς ζυμομύκητες μόνο αγενώς. Οι ζύμες μεταφέρονται στα διάφορα μέρη της σταφυλής μέσω εντόμων. Ο πληθυσμός τους εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες κατά την

ωρίμανση, την γεωγραφική θέση του αμπελώνα, τις καλλιεργητικές επεμβάσεις και τις συνθήκες υγιεινής κατά την συγκομιδή.

Οι κύριες ζύμες των σταφυλιών ανήκουν στο γένος *Hanseniaspora* ή *Kloeckera* και σε μικρότερο ποσοστό στο γένος *Torulopsis*. Ακολουθούν οι ζύμες που ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*, με επικρατέστερο το είδος *Saccharomyces cerevisiae*, το οποίο προέρχεται κυρίως από τον εξοπλισμό συγκομιδής και είναι μέρος της φυσικής χλωρίδας του οινοποιείου.

Αμέσως μετά την έναρξη της ζύμωσης του γλεύκους, ο πληθυσμός των ζυμών αρχίζει να μεταβάλλεται. Εκκινητές τις ζύμωσης είναι συνήθως οι ζυμομύκητες του γένους *Hanseniaspora* ή *Kloeckera* και *Torulopsis* οι οποίοι συνήθως μεταβολίζουν τα σάκχαρα μέχρι την παραγωγή αλκοόλης 3-4% vol ενώ κάποιοι ζυμομύκητες του γένους *Torulopsis* μπορεί να συμμετάσχουν στην ζύμωση έως η ποσότητα της αλκοόλης να είναι 6-8% vol. Στην συνέχεια, την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης αναλαμβάνουν οι ζυμομύκητες του γένους *Saccharomyces* που παρουσιάζουν υψηλή αντοχή σε αυξημένα επίπεδα αλκοόλης και θειώδη ανυδρίτη. Εκτός από το *Saccharomyces cerevisiae* που είναι το πιο συνηθισμένο είδος συναντώνται και άλλα είδη των *Saccharomyces* όπως οι *S. chevalieri*, *S. rosei*, *S. pretoriensis* κλπ. Προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, και μάλιστα σε γλεύκη πλούσια σε σάκχαρα, κάνει την εμφάνιση του και ο *Saccharomyces bayanus*. Το είδος αυτό θεωρείται ως το πιο ανθεκτικό στην αλκοόλη και μπορεί να παράγει ποσότητες με τελικό αλκοολικό τίτλο μέχρι 16-18 % vol.

#### 1.5.2 Παράγοντες που επιδρούν στον πολλαπλασιασμό των ζυμών

Ο πολλαπλασιασμός των ζυμών στο γλεύκος, η ταχύτητα αύξησης και η ικανότητά τους να ολοκληρώσουν την ζύμωση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία περιβάλλοντος και ζύμωσης, η ενεργός οξύτητα (pH), το οξυγόνο, η επάρκεια σε θρεπτικά συστατικά (σάκχαρα, άζωτο) και άλλους παράγοντες ανάπτυξης και επιβίωσης όπως βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία.

##### ➤ Επίδραση θερμοκρασίας και pH

Οι ζυμομύκητες είναι μεσόφιλοι οργανισμοί που αναπτύσσονται σε θερμοκρασιακό εύρος 20 έως 40°C ανάλογα το γένος και το είδος, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης για την πλειονότητά τους 25-28°C. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο μεγαλύτερο ποσοστό σακχάρων μένουν αζύμωτα εξαιτίας πιθανότατα της συσσώρευσης αιθανόλης στο εσωτερικό του κυττάρου (Τσακίρης, 2017). Ακόμα, έχει διαπιστωθεί ότι οι ζύμες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιομηχανία δίνουν βέλτιστες αποδόσεις υπό την ελάχιστη δυνατή θερμοκρασία ανάπτυξης και όχι υπό την άριστη θερμοκρασία. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του *Saccharomyces cerevisiae* που σε θερμοκρασία ζύμωσης 25-30°C (μέγιστη και ταχύτατη ανάπτυξη) παράγει οίνο χειρότερης ποιότητας σε σχέση με την ανάπτυξή του στους 15°C (ελάχιστη για την ανάπτυξή του) που προκύπτει οίνος καλύτερης ποιότητας. Από την άλλη, αν η θερμοκρασία ζύμωσης είναι πολύ χαμηλή, παρατηρείται καθυστέρηση στην ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης και γι' αυτό, για την ζύμωση του οινογλεύκους, επιλέγεται θερμοκρασιακό εύρος 18-20 °C. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η ζύμωση σε χαμηλές θερμοκρασίες συμβάλλει στην αυξημένη παραγωγή δευτερευόντων προϊόντων και στην παραγωγή οίνων με πλούσια αρώματα. Όσον αφορά την ενεργό οξύτητα (pH), οι

ζυμομύκητες αναπτύσσονται άριστα σε pH 4-5, σε υψηλότερο pH ή μικρότερο του 3 ευνοείται η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση (Τσακίρης 2014).

Συνοπτικά, η ομαλή εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης γλεύκους εξαρτάται τόσο από την θερμοκρασία ανάπτυξης όσο και από το pH. Σύμφωνα με τον Σουφλερό, ο συνδυασμός θερμοκρασία 20°C και pH 3,4 αυξάνει τις ανώτερες αλκοόλες κατά 35% και τους ανώτερους εστέρες κατά 100% σε σχέση με τον συνδυασμό θερμοκρασίας 30 και pH 2,9 (Ribereau-Gayon, 2006).

#### ➤ Επίδραση του οξυγόνου

Ανάλογα με την συγκέντρωση του διαθέσιμου οξυγόνου οι ζυμομύκητες επιλέγουν δύο διαφορετικές καταβολικές οδούς. Σε αναερόβιες συνθήκες πραγματοποιείται η αλκοολική ζύμωση ( $1\text{Γλυκόζη} \rightarrow 2\text{Αιθανόλη} + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP}$ ) κατά την οποία τα σάκχαρα μεταβολίζονται σε αλκοόλη, διοξείδιο του άνθρακα και ενέργεια (2 ATP), ενώ σε συνθήκες επάρκειας οξυγόνου πραγματοποιείται ο οξειδωτικός καταβολισμός ( $1\text{Γλυκόζη} \rightarrow 6\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 + 36\text{ATP}$ ) κατά τον οποίο παράγονται μεγαλύτερα ποσά ενέργειας που χρησιμοποιούνται για τις ανάγκες των ζυμών.

Σύμφωνα με το φαινόμενο Pasteur η αναπνοή εμποδίζει την ζύμωση (Ribereau-Gayon, 2006). Στην περίπτωση που συγκέντρωση σακχάρων στο μέσο είναι μικρή, και μπορεί να πραγματοποιηθεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση, τότε ο ζυμομύκητας μπορεί να μεταβολίσει τα σάκχαρα και με τις δύο καταβολικές οδούς. Η παρουσία οξυγόνου ωστόσο ευνοεί την αναπνευστική οδό και τον σχηματισμό βιομάζας ενώ μειώνει την παραγωγή αιθανόλης και την κατανάλωση σακχάρων. Από την άλλη, σύμφωνα με το φαινόμενο Crabtree, η καταβολική οδός που θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός εξαρτάται από την πηγή άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, αν η συγκέντρωση σακχάρων ξεπερνάει μια κρίσιμη τιμή (2-5g/L) ακολουθείται το μονοπάτι της αναπνευστικής οδού ανεξάρτητα από την συγκέντρωση οξυγόνου. Τέλος, στο φαινόμενο Custers αναφέρεται η παρεμπόδιση της αλκοολικής ζύμωσης παρουσία οξυγόνου που αποτελεί κοινό βιοχημικό χαρακτηριστικό ιδίως σε ζύμες που ανήκουν στα γένη *Dekkera* και *Brettanomyces* (Παραμυθιώτης, 2020, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις).

#### ➤ Θρεπτικά συστατικά

Οι ζυμομύκητες, για την επιβίωση και ανάπτυξη τους στο γλεύκος, έχουν ανάγκη θρεπτικά συστατικά όπως **υδατάνθρακες** και **άζωτο** (αμμωνία, αμινοξέα). Στην περίπτωση των υδατανθράκων οι ζύμες χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας τα σάκχαρα και κυρίως την γλυκόζη και την φρουκτόζη καθώς τα άλλα σάκχαρα υπάρχουν σε μικρότερες αναλογίες. Η συγκέντρωσή τους επηρεάζει τόσο την ταχύτητα της ζύμωσης όσο και την τελική ποσότητα αλκοόλης στον παραγόμενο οίνο. Αναλυτικότερα, αν η συγκέντρωση σακχάρων είναι πολύ μικρή τότε παρατηρείται πολύ αργή ζύμωση και ίσως και διακοπή της πριν την ολοκλήρωσή της. Αν η συγκέντρωσή τους είναι μεγαλύτερη (15-200 g/L) παρατηρείται αυξανόμενη και σταθερή εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης ενώ σε συγκεντρώσεις 600-650 g/L η ζύμωση δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί. Στο γλεύκος, ο λόγος γλυκόζης προς φρουκτόζη είναι περίπου ίσος με την μονάδα. Η γλυκόζη μεταβολίζεται κατά προτίμηση από τις ζύμες γιατί είναι λιγότερο σταθερή από την



φρουκτόζη. Γενικότερα καμία ζύμη δεν μπορεί να μεταβολίσει τις πεντόζες αλλά μπορεί να μεταβολίσει τις εξόζες και ιδίως τις D-ισομερείς.

Σημαντικός παράγοντας για την ομαλή ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και την ομαλή δραστηριότητα και κινητική της ζύμωσης αποτελεί το άζωτο. Στο γλεύκος, οι ζυμομύκητες μπορούν να αφομοιώσουν το άζωτο με τη μορφή ελεύθερων αμινοξέων και αμμωνίας. Η έλλειψη αζώτου εγκυμονεί επιβράδυνση ή και διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης, αυξημένη παραγωγή σουλφιδίων και ανώτερων αλκοολών ενώ ακόμα μειώνει την παραγωγή εστέρων και πτητικών λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας με εμφανείς επιπτώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Από την άλλη, η υψηλή περιεκτικότητα του γλεύκους σε άζωτο μπορεί να προκαλέσει πρωτεϊνική αστάθεια στους οίνους και μικροβιολογική αστάθεια λόγω υπολειμματικής ποσότητας αζώτου μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης (Κοτσερίδης, 2021, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις). Η ελάχιστη ποσότητα που απαιτείται κατά την αλκοολική ζύμωση από τους ζυμομύκητες είναι 140 mgN/L με βέλτιστη ποσότητα 300-400 mgN/L. Στην Ελλάδα, λόγω ζεστών κλιματολογικών συνθηκών παρατηρείται χαμηλή περιεκτικότητα σε αζωτούχα συστατικά. Σε γενικές γραμμές, οι ζυμομύκητες όσο μεγαλύτερη ποσότητα διαθέσιμου αζώτου έχουν στην διάθεσή τους τόσο πιο έντονη είναι η ζυμωτική τους ικανότητα (Rose & Harrisson, 1970; Bisson 2001).

Ακόμα, οι ζυμομύκητες έχουν ανάγκη και από άλλους παράγοντες ανάπτυξης και επιβίωσης, όπως οι βιταμίνες και τα μεταλλικά άλατα τα οποία υπάρχουν σε ικανοποιητικές ποσότητες στα γλεύκη ανεξαρτήτως ποικιλίας και γεωγραφικής προέλευσης των υπό οινοποίηση σταφυλών.

### 1.5.3 Ζύμωση με επιλεγμένες ζύμες

Στην περίπτωση της αλκοολικής ζύμωσης με επιλεγμένες ζύμες γίνεται εμβολιασμός του γλεύκους με τα επιθυμητά στελέχη τα οποία υπάρχουν στο εμπόριο ως σκευάσματα σε ξηρή μορφή ή υγρή καλλιέργεια. Έτσι, μπορεί να επιτευχθεί έλεγχος της πορείας της αλκοολικής ζύμωσης και του τελικού προϊόντος με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Αν δεν γίνει εμβολιασμός του γλεύκους με εμπορικά σκευάσματα τότε η ζύμωση ονομάζεται φυσική ή αυθόρμητη και επιτελείται από τις αυτόχθονες ζύμες της φυσικής χλωρίδας του σταφυλιού και του οινοποιείου.

Οι ζυμομύκητες διαχωρίζονται σε *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και διαφέρουν κυρίως ως προς την ικανότητα τους να ολοκληρώσουν την αλκοολική ζύμωση καθώς οι *non-Saccharomyces* έχουν μικρή αντοχή στα αυξημένα ποσοστά αλκοόλης με ζυμωτική ικανότητα 3-5% vol. Ακόμα, έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε οξυγόνο με αποτέλεσμα να συνδέονται με οξειδωτικά φαινόμενα στην επιφάνεια δεξαμενών ή βαρελιών (Fugelsang, 2010). Αντίθετα, οι *Saccharomyces* έχουν αυξημένη ζυμωτική ικανότητα κάτω από αντίξοες συνθήκες κατά την ζύμωση όπως χαμηλή συγκέντρωση διαθέσιμου οξυγόνου, υψηλή συγκέντρωση αλκοόλης και θειώδη ανυδρίτη. Οι ζύμες αυτές συνήθως δρουν συμπληρωματικά με τις *non-Saccharomyces* όταν οι δεύτερες αρχίζουν να παρουσιάζουν αδυναμία να συνεχίζουν περαιτέρω το μεταβολισμό των σακχάρων.

➤ *Saccharomyces cerevisiae*

Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας ευρέως μελετημένος ευκαρυωτικός μικροοργανισμός που η ύπαρξή του είναι γνωστή από το 19ο αιώνα και χρησιμοποιείται στην διαδικασία της ζύμωσης τόσο στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών όσο και αρτοποιητικών προϊόντων. Σήμερα αναγνωρίζονται 7 διαφορετικά γένη *Saccharomyces*, τα *S. cerevisiae*, *S. dairensis*, *S. exigus*, *S. kluyveri*, *S. servazzii*, *S. telluris* και *S. unisporus*. Η απομόνωσή τους γίνεται από εδαφικά δείγματα, άνθη φυτών, φρούτα, τρόφιμα κ.ά. Το *Saccharomyces cerevisiae* είναι το πληρέστερα μελετημένο είδος του γένους και ολόκληρης της οικογένειας *Saccharomycetaceae*. Η εκτεταμένη χρήση του στην αλκοολική ζύμωση του οίνου οφείλεται στην αντοχή του σε υψηλή συγκέντρωση αλκοόλης και διοξειδίου του θείου κατά την διάρκεια της ζύμωσης και την ικανότητά του να αναπτύσσεται σε pH 2.8 έως 4. Ακόμα, διαθέτει αμυντικούς μηχανισμούς έναντι άλλων μικροοργανισμών και πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να εκκρίνει αντιμικροβιακά πεπτιδία, που τον καθιστούν ικανό να επικρατεί έναντι άλλων ζυμών (Albergaria & Arneborg, 2016).

Καθ' όλη τη διάρκεια του 20<sup>ου</sup> αιώνα αναγνωρίστηκαν πάνω από 700 διαφορετικά στελέχη του *S. cerevisiae* με ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους κυρίως ως προς την ταχύτητα της ζύμωσης, την αντοχή στην θερμοκρασία και την παραγωγή ενώσεων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αρωματικό προφίλ του παραγόμενου οίνου (Robinson, 2006).

➤ *Torulaspora delbrueckii*

Η ζύμη *Torulaspora delbrueckii* γνωστή παλαιότερα ως *Saccharomyces delbrueckii* ή *Saccharomyces rosei* ανήκει στα λίγα είδη non-*Saccharomyces* ζυμομυκήτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή οίνου και ζύθου και μπορεί να απομονωθεί είτε από το σταφύλι είτε από το γλεύκος και τον οίνο (Velmarayan Bredaa, 2013). Οι non-*Saccharomyces* ζύμες έχουν μικρή αντοχή στα αυξημένα επίπεδα αιθανόλης και μέτρια αντοχή σε SO<sub>2</sub> (Comitini et al., 2011) γι' αυτό χρησιμοποιούνται ως εκκινήτες της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους. Επίσης, λόγω της αδυναμίας τους να καταναλώσουν όλη την ποσότητα σακχάρων του γλεύκους κρίνεται αναγκαίος ο συν-εμβολιασμός τους με κάποιο άλλο στέλεχος ζύμης όπως *S. cerevisiae* για την ομαλή ολοκλήρωση της ζύμωσης. Ο ρόλος τέτοιων ζυμομυκήτων στην οινολογία έχει ανασκοπηθεί από αρκετούς συγγραφείς (Fleet, 2008, Jolly et al., 2006, Suárez-Lepe and Morata, 2012) και η συμβολή τους στην ζύμωση σχετίζεται με την βελτίωση της πολυπλοκότητας των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων (Clemente-Jimenez, 2005). Χαρακτηριστικό του είδους *T. delbrueckii* είναι η χαμηλή πτητική οξύτητα (Bely, 2008, Renault, 2009), η μειωμένη παραγωγή οξικού αιθυλεστέρα και ακεταλδεϋδης (Ciani & Picciotti, 1995) και η μειωμένη παραγωγή H<sub>2</sub>S (Comitini, 2011) ενώ σχετίζεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης (Ciani and Maccarelli, 1998). Η χρήση του ζυμομύκητα *T. delbrueckii* επιδρά στην παραγωγή πτητικών εστέρων με εμφανή μείωση της isoamyl acetate και των C6-C10 λιπαρών οξέων (Viana et al. 2008; Azzolini et al. 2012; Sadoudi et al. 2012; Cordero-Bueso et al. 2013) πράγμα που ήταν λιγότερο αντιληπτό σε νεαρούς οίνους παρά σε γλυκείς παλαιωμένους εξαιτίας του υψηλού ορίου αντίληψης που έχουν (κατώφλι αντίληψης). Η ζύμωση με στέλεχη *T. delbrueckii* συνδέεται ακόμα με την παραγωγή οίνων με ευχάριστα αρώματα ανθέων και φρούτων καθώς παράγονται αυξημένες συγκεντρώσεις εστέρων και ανώτερων αλκοολών (King, 2000; Plata, 2003; Raynal, 2011). Επιπρόσθετα, η χρήση *T. delbrueckii* κατά την αλκοολική ζύμωση έχει συσχετισθεί με αύξηση των πολυσακχαριτών (Giovani, Rosi, & Bertuccioli, 2012) και των αρωματικών ενώσεων (Comitini, 2011).

Η χρήση συνκαλλιιεργειών του *T. delbrueckii* και του *Saccharomyces* θα μπορούσε να είναι καθοριστική για τη ρύθμιση της παραγωγής αιθυλεστέρων και λιπαρών οξέων, που σχηματίζονται ενζυματικά κατά τη ζύμωση και συνδέονται με ελλατωματικές οσμές, ιδιαίτερα σε οίνους ποικιλίας Soave και Chardonnay. Έχει αποδειχθεί ότι η συν-καλλιέργεια *T. delbrueckii* με *S. cerevisiae* παράγει οίνους με χαμηλή πτητική οξύτητα, υψηλότερες τερπενόλες και 2-φαινυλαιθανόλη (Ciani & Maccarelli, 1998; Sadoudi et al., 2012; Van Breda et al., 2013). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η συνκαλλιέργεια με *T. delbrueckii* με *S. cerevisiae* στην αρχή της ζύμωσης είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης των βινυλιφαινολών καθώς κατά την ζύμωση γλεύκους ποικιλίας Chardonnay η συγκέντρωση της 4-vinylguaiacol ήταν πολύ χαμηλότερη από το κατώφλι αντίληψης της. Έτσι παράγονται ποιοτικότεροι οίνοι καθώς οι φαινόλες ευθύνονται για δυσάρεστα αρώματα με χαμηλό κατώφλι αντίληψης (Benito et al., 2011). Συμβολιασμός των ειδών *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* σε Sauvignon blanc και Chenin blanc έδειξε πως οι οίνοι που προέκυψαν ήταν καλύτεροι από τις καθαρές καλλιέργειες *S. cerevisiae* 5 και 18 μήνες μετά την παραγωγή (Jolly, 2003), ομοίως και οίνοι από Amarone που εμβολιάστηκαν διαδοχικά με *T. delbrueckii* και είχαν αυξημένη ένταση αρώματος όπως κόκκινα φρούτα, αυξημένη γλυκύτητα και στυπτικότητα και χαμηλότερη ένταση φυτικών χαρακτήρων (Azzolini, 2012).

## 1.6. Χημική σύσταση γλεύκους και οίνου

Ο οίνος είναι ένα μείγμα οργανικών και ανόργανων ενώσεων που προέρχεται από την ολική ή μερική αλκοολική ζύμωση του γλεύκους. Η σύσταση του εξαρτάται τόσο από τις συνθήκες στον αμπελώνα όπως καλλιιεργητικές φροντίδες, το κλίμα της περιοχής και μικρόκλιμα του πρέμνου, το έδαφος και την ποικιλία όσο και από την τεχνική οινοποίησης που θα εφαρμοστεί ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα. Το περιβάλλον ανάπτυξης του αμπελώνα (κλίμα, έδαφος, τοποθεσία) που περιγράφεται με την γαλλική λέξη "terroir" επηρεάζει καθοριστικά την ποιότητα του παραγόμενου οίνου και το αρωματικό του προφίλ.

Το γλεύκος λαμβάνεται από την έκθλιψη των σταφυλών και είναι υδατικό σακχαρούχο διάλυμα πυκνότητας 1,05-1,13 που περιέχει οργανικά οξέα, χρωστικές, ταννίνες, αζωτούχες και πηκτινικές ύλες και ιχνοστοιχεία. Η ποσοστιαία αναλογία των ουσιών αυτών και κυρίως η αναλογία σακχάρων προς οξέα καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό το είδος και την ποιότητα των παραγόμενων οίνων (Σταυρακάκης, 2013). Σύμφωνα με τον 1308/2013 Κανονισμό της Ε.Ε, ο οίνος ανεξάρτητα από τον τρόπο οινοποίησης, έχει αποκτημένο αλκοολικό τίτλο τουλάχιστον 8,5-9% vol., ενώ εκτός κάποιων εξαιρέσεων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 15% vol και η ολική οξύτητα, εκφραζόμενη σε τρυγικό οξύ, να είναι τουλάχιστον τα 3,5 g/L.

### 1.6.1 Οργανικά οξέα

Η σημαντική συμβολή των οξέων δεν αρκείται μόνο στην όξινη γεύση που προσδίδουν αλλά προσφέρουν ακόμα προστασία από οξειδώσεις και θολώματα (σιδήρου, πρωτεϊνικά), μικροβιακή σταθερότητα ενώ συνεισφέρουν στην διατήρηση του χρώματος και στην πολυπλοκότητα του αρώματος του οίνου. Η όξινη γεύση στο γλεύκος και τον οίνο οφείλεται στα ελεύθερα οργανικά οξέα τα οποία δεν έχουν εξουδετερωθεί από τις βάσεις που

βρίσκονται στο γλεύκος και τον οίνο. Έτσι αποτελούν ρυθμιστές τόσο της ολικής ή ογκομετρούμενης οξύτητας όσο και της ενεργού οξύτητας ή pH του γλεύκους και οίνου.

Η συγκέντρωση των οργανικών οξέων στον οίνο αποτρέπει την παρουσία μικροβιολογικών προσβολών καθώς η υψηλή οξύτητα ή χαμηλό pH προστατεύουν από μικροβιολογικές αλλοιώσεις και ιδίως βακτηριακές που οδηγούν σε ποιοτική υποβάθμιση. Ωστόσο η όξινη γεύση επηρεάζεται και από άλλα συστατικά όπως τα σάκχαρα, τις αλκοόλες, τις τανίνες κλπ (Σουφλερός, 1997).

Τα οξέα που περιέχονται στον οίνο προέρχονται αρχικά από το σταφύλι και από την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους ενώ μέρος αυτών μπορεί να προέρχεται από μικροβιολογικές προσβολές του γλεύκους και του οίνου. Τα κυριότερα οξέα στο σταφύλι είναι το τρυγικό, το μηλικό, το κιτρικό, το γλυκονικό, το οξαλικό, το ασκορβικό οξύ και τα ουρονικά οξέα. Κατά την αλκοολική ζύμωση και σε περίπτωση προσβολών παράγονται το ηλεκτρικό, το γαλακτικό, το κιτρομηλικό, το διμεθυλογλυκερικό, το πυροσταφυλικό και το ακετογλουταρικό, το μυρμηκικό και το οξικό οξύ.

Από τα παραπάνω οξέα κυριότερα είναι το τρυγικό οξύ, το μηλικό οξύ και σε μικρότερη συγκέντρωση το κιτρικό οξύ. Η παρουσία τους εντοπίζεται αρχικά στο σταφύλι και στην συνέχεια μέσω της σύνθλιψης τους και μετέπειτα της αλκοολικής ζύμωσης καταλήγουν στον οίνο. Κατά την αλκοολική ζύμωση παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στην συγκέντρωση αυτών των οξέων ενώ εμφανίζονται και ως δευτερεύοντα προϊόντα της ζύμωσης ή ως προϊόντα ενζυμικής ή βακτηριακής δράσης το γαλακτικό και το οξικό οξύ, τα οποία σε κατάλληλες συγκεντρώσεις συμβάλουν στην ισορροπία των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου.

Η άμπελος είναι το μοναδικό φυτό που αποθηκεύει στα νεαρά φύλλα και στις πράσινες ράγες **τρυγικό οξύ** το οποίο είναι και το πιο ισχυρό σε σχέση με τα υπόλοιπα οξέα και συμβάλλει στην διαμόρφωση του pH του οίνου ενώ ακόμα προσφέρει μικροβιακή προστασία. Η συγκέντρωση του είναι μειούμενη από το σταφύλι μέχρι τον παραγόμενο οίνο και εξαρτάται από την ποικιλία, το κλίμα, το έδαφος, το αλκοολικό τίτλο, το έδαφος, την συγκέντρωση ανόργανων ανιόντων και την περιεκτικότητα του οίνου σε μηλικό οξύ. Έτσι, στο σταφύλι η συγκέντρωση του είναι 15-7,5 g/L, στα γλεύκη 6-2 g/L και στους οίνους 1,5-2,5 g/L. Όσον αφορά το **μηλικό οξύ** σε αντίθεση με τρυγικό είναι πολύ διαδεδομένο στην φύση με μέγιστη συγκέντρωση στην σταφυλή πριν τον περκασμό (20-25 g/L) και μείωση κατά την ωρίμανση (2-4 g/L). Η συγκέντρωση του μειώνεται κατά την αλκοολική ζύμωση και σε συγκέντρωση 1-2,5 g/L προσδίδει στον οίνο φρουτώδη γεύση και φρεσκάδα. Το μηλικό οξύ κατά την διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης μεταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ με αποτέλεσμα την μείωση της οξύτητας και την σταθεροποίηση ιδίως σε οίνους που ενδείκνυται για παλαίωση.

Το **κιτρικό οξύ** βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις στο σταφύλι (2,25-0.3 g/L) εκτός και αν είναι προσβεβλημένο από *Botrytis cinerea* που προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του. Κατά την διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, το κιτρικό οξύ διασπάται σε οξικό οξύ με αποτέλεσμα την αύξηση της πτητικής οξύτητας. Χαρακτηριστική του ιδιότητα είναι η δυνατότητα να δεσμεύει και να διαλυτοποιεί τον τρισθενή σίδηρο αποτρέποντας την δημιουργία θολωμάτων.

Στον ελληνικό αμπελώνα, λόγω υψηλών θερμοκρασιών, η ωρίμανση των σταφυλών είναι ταχύτερη με αποτέλεσμα την παραγωγή οίνων με μειωμένη οξύτητα (<5 g/l) και pH (>3,6). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία, για οίνους ή γλεύκη με μειωμένη οξύτητα επιτρέπεται διόρθωση με προσθήκη τρυγικού οξέος. Ακόμα, αύξηση της ολικής οξύτητας μπορεί να επιτευχθεί με προσθήκη μηλικού, γαλακτικού ή κιτρικού οξέος. Σε περιπτώσεις αυξημένης οξύτητας επιτρέπεται η προσθήκη στο γλεύκος ή στον οίνο κάποιου βασικού άλατος όπως  $\text{CaCO}_3$  και  $\text{KHCO}_3$ . Συνήθως, οι τιμές της ολικής οξύτητας στον οίνο κυμαίνονται 4-8 g/L τρυγικό οξύ και στο γλεύκος 6-8 g/L

### 1.6.2 Σάκχαρα

Τα σάκχαρα αποτελούνται από μια ανθρακική αλυσίδα που περιέχει αλκοολικές ομάδες και μια αλδεϋδική ή κετονική ομάδα (αλδόζες ή κετόζες αντίστοιχα). Περιέχονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο σταφυλοχυμό και μετατρέπονται μέσω της αλκοολικής ζύμωσης σε αλκοόλη ιδίως η γλυκόζη και η φρουκτόζη που υπάρχουν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Διακρίνονται σε αναγωγικά ή ανάγοντα τα οποία διαχωρίζονται σε ζυμώσιμα και μη και στα μη αναγωγικά στα οποία ανήκουν οι πολυσακχαρίτες.

Τα αναγωγικά σάκχαρα δεσμεύουν το θειώδη ανυδρίτη και είναι βιολογικά ασταθή με αποτέλεσμα να προσβάλλονται από τα γαλακτικά βακτήρια και να αυξάνουν την πτητική οξύτητα. Στα ζυμώσιμα αναγωγικά σάκχαρα γλεύκους και οίνου ανήκουν οι εξόζες D(+)γλυκόζη, D(-)φρουκτόζη και D(-)γαλακτόζη. Η συγκέντρωση των ζυμώσιμων σακχάρων στο γλεύκος που προέρχεται από ώριμα σταφύλια είναι 15-20% κατά βάρος σάκχαρα αποτελούμενα από γλυκόζη και φρουκτόζη. Κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, η γλυκόζη αφομοιώνεται περισσότερο από τους ζυμομύκητες συγκριτικά με την φρουκτόζη με αποτέλεσμα ο λόγος γλυκόζη προς φρουκτόζη να είναι μικρότερος της μονάδας (Καλλίθρακα, 2021).

Στα μη ζυμώσιμα αναγωγικά σάκχαρα γλεύκους και οίνου ανήκουν οι πεντόζες και η συγκέντρωσή τους είναι μικρότερη από 2g/L. Περιέχονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους βόστρυχες των σταφυλών απ' ότι στην σάρκα και στον φλοιό και δεν ζυμώνονται από τις ζύμες αλλά προσβάλλονται από τα γαλακτικά βακτήρια με αποτέλεσμα την αύξηση της πτητικής οξύτητας (Σουφλερός 2015, Τσακίρης 2017).

Οι οίνοι με βάση την περιεκτικότητά τους σε αζύμωτα σάκχαρα διακρίνονται σε:

- Ξηρούς <2 g/L
- Ημίξηρους 2-18 g/L
- Ημίγλυκους 18-40 g/L
- Γλυκείς >40 g/L

### 1.6.3 Φαινολικά συστατικά σταφυλιού και οίνου

Οι φαινολικές ενώσεις διαθέτουν ένα βενζολικό δακτύλιο στον οποίο συνδέονται μια ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου και κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στο σταφύλι και κατ' επέκταση στον οίνο. Στο σταφύλι βρίσκονται κυρίως στον φλοιό και στα γίγαρτα και μικρές ποσότητες επίσης μπορούν να εκχυλιστούν κατά την παλαίωση των οίνων σε ξύλινα

βαρέλια και κατά τον μεταβολισμό των ζυμών στην διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Κατά την οινοποίηση, εκχυλίζονται στο γλεύκος και είναι υπεύθυνες για την σταθεροποίηση του χρώματος και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων καθώς συμμετέχουν στην στυπτικότητα και την πικράδα αυτών (Chira, 2009; Kallithraka, 1998; Ribereau-Gayón, 1999; Sun, 2013). Στα φαινολικά συστατικά οφείλονται οι διαφορές μεταξύ των ερυθρών και λευκών οίνων. Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης, τα φαινολικά που εκχυλίζονται αρχικά προέρχονται από τους φλοιούς, καθώς αυτά των γιγάρτων εκχυλίζονται με πιο αργό ρυθμό και κυρίως κατά τη μακρά εκχύλιση που εφαρμόζεται μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης (Casassa, 2013a; Casassa, 2013b; Harbetson, 2009). Στους ερυθρούς οίνους, ιδίως επηρεάζουν την ένταση και την απόχρωση του χρώματος, το άρωμα και την γεύση. Αξίζει να τονιστεί ότι οι αλλοιώσεις του χρώματος και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων είναι αποτέλεσμα των χημικών και ενζυμικών οξειδωτικών δράσεων στα φαινολικά συστατικά (Κουράκου, 1998).

Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε:

- Μη φλαβονοειδείς φαινόλες
- Φλαβονοειδείς φαινόλες

Στις **μη φλαβονοειδείς φαινόλες** ανήκουν κυρίως τα φαινολικά οξέα και τα στυλβένια, με τα πρώτα να διακρίνονται σε βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα. Τα βενζοϊκά οξέα, με κυριότερο το γαλλικό οξύ, βρίσκονται σε όλα τα μέρη της ράγας ενώ τα κινναμωμικά οξέα βρίσκονται κυρίως στον φλοιό και στην σάρκα. Η σύνθεση τους ξεκινά κατά τον περκασμό και μειώνεται κατά την ωρίμανση της ράγας λόγω αύξησης του μεγέθους της ή της αραίωσής τους. Κατά την οξείδωση τους μπορεί να προκαλέσουν καφέτιασμα των λευκών οίνων. Τα στυλβένια βρίσκονται κυρίως στον φλοιό της ράγας.

Στις **φλαβονοειδείς φαινόλες** ανήκουν φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανονόλες, φλαβανόλες και ανθοκυάνες.

- **Φλαβονόλες:** ανιχνεύονται κυρίως στους φλοιούς των ραγών στην στιβάδα του υποδέρματος, αλλά έχουν ανιχνευτεί και στη σάρκα (Makris, 2006b; Teixeira, 2013) ενώ δεν εμφανίζονται συχνά στους βόστρυχες. Έχουν κίτρινο χρώμα και συναντώνται κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών. Συντίθενται κατά το στάδιο ωρίμανσης των σταφυλιών (Jackson, 2008). Η περιεκτικότητά τους στους λευκούς οίνους είναι πολύ χαμηλότερη απ' ό,τι στους ερυθρούς εξαιτίας της απουσίας των φλοιών κατά την οινοποίηση.
- **Φλαβανόνες:** παρουσιάζουν μικρές διαφορές συγκριτικά με τις φλαβονόλες ενώ τα παράγωγά τους ανήκουν στα φαινολικά συστατικά του ξύλου της δρυός οπότε παρουσιάζονται μόνο σε οίνους που παλαιώσαν σε δρύινα βαρέλια (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).
- **Φλαβανόλες:** είναι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν κυρίως στα γίγαρτα, δευτερευόντως στους φλοιούς και σε μικρότερες συγκεντρώσεις στη σάρκα (Chira, 2009; Prieur, 1994; Sun, 2001; Κουράκου-Δραγώνα, 1998) και διακρίνονται σε μονομερείς, ολιγομερείς και πολυμερείς ανάλογα την δομή τους. Οι μονομερείς έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση στις ράγες και οι ολιγομερείς και πολυμερείς κυρίως στο φλοιό και την σάρκα των ραγών. Παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην σταθεροποίηση

του χρώματος των σταφυλιών και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου καθώς συμμετέχουν στην στυπτικότητα και πικράδα αυτών. Η σύνθεση τους ξεκινά πριν τον περκασμό και η εξέλιξη τους κατά την διάρκεια της ωρίμανσης εξαρτάται από τον τύπο και την δομή τους ( Downey, 2003; Olle, 2011).

- **Ανθοκυάνες:** είναι ερυθρές χρωστικές σταφυλιών που βρίσκονται κυρίως στον φλοιό των ραγών και πιο σπάνια στη σάρκα ενώ επίσης υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες στα φύλλα, ιδίως προς το τέλος της παραγωγικής περιόδου. Στις ερυθρές οινοποιήσιμες ποικιλίες, η βιοσύνθεση των ανθοκυανών αρχίζει την περίοδο του περκασμού και παρουσιάζει μέγιστη τιμή καθώς πλησιάζει η περίοδος της συγκομιδής (Cacho, 1992; Castellarin, 2007; Esteban, 2001; Ojeda, 2002; Zarrouk, 2012), ωστόσο έχει παρατηρηθεί μικρή πτώση λίγο πριν τη συγκομιδή ή κατά τη διάρκεια υπερωρίμανσης των σταφυλιών. Οι ελεύθερες ανθοκυάνες προσδίδουν στους φρέσκους οίνους ένα έντονο ερυθρό-βιολετί χρώμα ενώ κατά την παλαίωση οι συζευγμένες κυρίως με ταννίνες μορφές τους προσδίδουν στον οίνο κεραμιδί αποχρώσεις.
- **Ταννίνες:** πρόκειται για ενώσεις που βρίσκονται στους φλοιούς, στα γίγαρτα και στους βοστρύχους της σταφυλής. Από χημική άποψη είναι μεγαλομόρια με φαινολικό δακτύλιο που προκύπτουν από τον πολυμερισμό στοιχειωδών μορίων με φαινολική ομάδα και διακρίνονται σε υδρολύσιμες και συμπυκνωμένες.

#### 1.6.4 Πτητικές ενώσεις στον οίνο

Το άρωμα του οίνου είναι αποτέλεσμα πλήθους πτητικών ενώσεων που συνεισφέρουν στο αρωματικό του χαρακτήρα (Francis, 2005). Η πτητικότητα είναι απαραίτητη ιδιότητα ενός συστατικού αρώματος και επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες του οίνου όπως η περιεκτικότητα του μέσου σε σάκχαρα, ο αλκοολικός τίτλος και η θερμοκρασία. Σε κάποιους οίνους μπορεί να υπάρχουν αρωματικές ενώσεις σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και να έχουν μεγάλη επίδραση στο αρωματικό τους δυναμικό ενώ αντίθετα, άλλες που βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, να έχουν μικρή επίδραση. Αυτό οφείλεται στο κατώφλι αντίληψης δηλαδή την μικρότερη συγκέντρωση κατά την οποία μια ουσία αρώματος μπορεί να γίνει αντιληπτή στον οίνο. Επομένως, το είδος των πτητικών ενώσεων και οι συγκεντρώσεις τους συνθέτουν ένα ξεχωριστό και ιδιαίτερο αρωματικό χαρακτήρα για κάθε οίνο.

Οι πτητικές ενώσεις αρώματος που συναντώνται στους οίνους μπορεί να προέρχονται από το σταφύλι ή να εμφανίζονται κατά την αλκοολική ζύμωση ή παλαίωση. Επομένως, το αρωματικό δυναμικό του οίνου εξαρτάται από την ποικιλία (Ferreira, 2002; Forde, 2011; Sequirel, 2004), το έδαφος, το κλίμα και τις διάφορες τεχνικές καλλιέργειας ( Bindon, 2007, dos Santos, 2007, Koundouras, 2009), τα διάφορα βιοχημικά φαινόμενα, τις οξειδώσεις και τις υδρολύσεις που γίνονται πριν και κατά την αλκοολική ζύμωση, τον τρόπο οινοποίησης αλλά και τις χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την συντήρηση και παλαίωση του οίνου στο βαρέλι ή στην φιάλη.

Οι πτητικές ενώσεις χωρίζονται ανάλογα την προέλευσή τους σε τρεις κατηγορίες. Έτσι, διακρίνουμε τα **πρωτογενή ή ποικιλιακά αρώματα** που προέρχονται από το σταφύλι και διατηρούνται στον οίνο, τα **δευτερογενή** που αναπτύσσονται κατά την αλκοολική ζύμωση και τα **τριτογενή** που εμφανίζονται κατά την παλαίωση τόσο στο βαρέλι όσο και στην φιάλη.

Το πρωτογενές άρωμα αποτελεί την ταυτότητα του οίνου ενώ το δευτερογενές και το τριτογενές διαφοροποιεί τον οίνο σε σχέση με την πρώτη ύλη παραγωγής. Τα αρώματα που χαρακτηρίζουν έναν οίνο διαφέρουν από αυτά που παρουσιάζει το γλεύκος πριν την οινοποίηση εξαιτίας πρόδρομων συστατικών του σταφυλιού (Forde, 2011), που κατά την οινοποίηση μετατρέπονται σε πτητικά και σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα συστατικά αρώματος του σταφυλιού προσδίδουν το ποικιλιακό άρωμα στους οίνους (Clarke Ron, 2004; Jackson Ron, 2002). Το ποικιλιακό άρωμα αποτελεί χαρακτηριστικό της ποιότητας του οίνου, που ωστόσο δεν εκφράζεται πάντα και με την ίδια ένταση καθώς εξαρτάται από τον κλώνο της ποικιλίας, το περιβάλλον, τις καλλιεργητικές συνθήκες και τον τρόπο οινοποίησης.

Τα συστατικά που συμβάλλουν στο πρωτογενές άρωμα διακρίνονται σε μεθοξυπυραζίνες, θειόλες, ισοπρενοειδή και κετόνες. Οι μεθοξυπυραζίνες προσδίδουν χορτώδη αρώματα όπως πιπεριά και φασόλι, οι θειόλες προσδίδουν αρώματα γκρέιπφρουτ και φρούτα του πάθους τα οποία έχουν θετική συνεισφορά ιδίως στους λευκούς οίνους. Τα ισοπρενοειδή ευθύνονται για αρώματα ανθέων και φρέσκων φρούτων και οι κετόνες προέρχονται από το σπάσιμο των σταφυλιών και υπάρχουν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση κυρίως στους ερυθρούς οίνους προσδίδοντας αρώματα ανθέων.

Το **δευτερογενές άρωμα** του οίνου που αναπτύσσεται κατά την αλκοολική ζύμωση οφείλεται σε πλήθος ενώσεων όπως οι εστέρες που προσδίδουν κυρίως αρώματα φρέσκων φρούτων αλλά συνδέονται και με ελαττωματικές οσμές όπως ο οξικός αιθυλεστέρας που έχει οσμή ακετόνης σε συγκέντρωση πάνω από 150 mg/L. Επίσης, παράγονται αλκοόλες με κυρίαρχη την αιθανόλη. Οι ανώτερες αλκοόλες (3-6 C) αποτελούν υποπροϊόντα ζυμών και βακτηρίων και προσδίδουν στον οίνο πολυπλοκότητα αλλά μπορεί να ευθύνονται και για ελαττωματικές οσμές.

Ενώσεις που περιέχουν θείο, όπως το υδρόθειο ( $H_2S$ ), θεωρούνται υπεύθυνες για δυσάρεστες οσμές στον οίνο. Το  $H_2S$  εμφανίζεται κατά τη ζύμωση, την ωρίμανση και την παλαίωση σε φιάλη και σε αυξημένες συγκεντρώσεις δίνει την οσμή κλούβιου αυγού στον οίνο. Οι δυσοσμίες λόγω θειούχων ενώσεων έχουν συνδεθεί με την αυτόλυση των νεκρών κυττάρων των ζυμών (Jackson, 2002-2008).

Επιπλέον, οι αλδεΐδες και οι κετόνες συμβάλλουν στο δευτερογενές άρωμα του οίνου με κυρίαρχη την ακεταλδεΐδη η οποία προσδίδει οσμή μωλωπισμένου μήλου και καρυδιού και έχει κατώφλι αντίληψης 100 mg/L. Η συγκέντρωσή της αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου λόγω οξείδωσης της αιθανόλης και η παρουσία της σε λευκούς οίνους είναι ένδειξη οξείδωσης. Ακόμα, τα πτητικά οργανικά οξέα συνδέονται με το δευτερογενές άρωμα. Παράγονται από το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων από ζύμες και βακτήρια όπως το οξικό οξύ που προσδίδει οσμή ξυδιού σε συγκέντρωση 0.7-1.1 mg/L και παράγεται από στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*.

Το **τριτογενές άρωμα** του οίνου αναπτύσσεται μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης και κατά την διάρκεια της παλαίωσης-ωρίμανσης των οίνων και οφείλεται σε διάφορες χημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται με αποτέλεσμα την μείωση των τερπενίων και των εστέρων και την μετατροπή των πτητικών φαινολών σε μη πτητικές. Ακόμα, παρατηρείται αύξηση των αλδεϊδών και εκχύλιση ουσιών από το ξύλο των καινούργιων βαρελιών όπως η βανιλίνη, η λιγνίνη και οι ταννίνες αλλά και οι λακτόνες οι οποίες προσδίδουν αρώματα ξύλου και βανίλιας.



### **Σκοπός διεξαγωγής του πειράματος**

Σκοπός του παρόντος πειράματος ήταν η μελέτη της επίδρασης δύο παραγόντων στο χημικό και οργανοληπτικό προφίλ των παραγόμενων οίνων ποικιλίας Sauvignon blanc. Ο πρώτος παράγοντας αφορούσε την καλλιεργητική τεχνική που εφαρμόστηκε στα πρέμνα και πιο συγκεκριμένα την αραίωση φορτίου μετά το στάδιο του περκασμού ενώ ο άλλος παράγοντας αφορούσε το στέλεχος ζύμωσης που χρησιμοποιήθηκε κατά την αλκοολική ζύμωση καθώς έγινε ζύμωση με εμβολιασμό στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* και με συνεμβολιασμό με *Torulaspota delbrueckii* και *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

#### 2.1.1 Επέμβαση στον αμπελώνα

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν σταφύλια ποικιλίας Sauvignon blanc του τρύγου 2022, από την περιοχή του Ασπρόκαμπου Νεμέας χωρισμένα σε δύο μέρη, διαφοροποιημένα ως προς την καλλιεργητική τεχνική. Ένα μέρος αυτών, είχε δεχθεί αραίωση φορτίου μετά το στάδιο του περκασμού («**αραιωμένα**») ενώ το άλλο όχι («**κανονικά**»).

#### 2.1.2 Πρωτόκολλο Οινοποίησης και κωδικοποίηση δειγμάτων

Η οινοποίηση των σταφυλιών ποικιλίας Sauvignon Blanc, διεξήχθη στο εργαστήριο Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και ακολουθήθηκε ίδια διαδικασία και για τις δύο περιπτώσεις σταφυλιών, είτε είχαν δεχθεί αραίωση φορτίου στον αμπελώνα είτε όχι («αραιωμένα» και «κανονικά»).

Αρχικά, τα σταφύλια μεταφέρθηκαν σε σπαστήρα όπου έσπασαν οι ράγες και απομακρύνθηκαν οι βόστρυχες. Στη συνέχεια, ο σταφυλοπολτός, αφού προστέθηκε μεταδιθειώδες κάλιο (metabisulfite) σε συγκέντρωση 5 g/hL και ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση 10 g/hL, μεταφέρθηκε σε υδροπρέσσα. Υπό πίεση μέχρι 0,5 bar διαχωρίστηκε το γλεύκος από τα στερεά μέρη του καρπού (φλοιοί και γίγαρτα) και το γλεύκος συγκεντρώθηκε σε ανοξείδωτη δεξαμενή. Εκεί, προστέθηκαν ηκτινολυτικά ένζυμα Rohavin L100 (MK Enzymes) σε συγκέντρωση 5 mL/hL και τα γλεύκη αφέθηκαν για στατική απολάσπωση σε ψύξη, στους 5°C μέχρι την επόμενη μέρα στους 5°C. Μετά το πέρας του χρόνου, έγινε μετάγγιση του διαυγούς γλεύκους, ακολούθησαν οι βασικές αναλύσεις γλεύκους και κατόπιν διαίρεση σε 4 δεξαμενάκια χωρητικότητας 15 λίτρων. Στο καθένα τοποθετήθηκαν 12 λίτρα γλεύκους. Η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε και στις δύο περιπτώσεις σταφυλιών με αποτέλεσμα να προκύψουν 8 δεξαμενάκια στα οποία ακολούθησε αλκοολική ζύμωση σύμφωνα με τα παρακάτω.

- 2 δεξαμενές της ομάδας «αραιωμένα» εμβολιάστηκαν με το εμπορικό παρασκεύασμα Safoeno SH12 (Fermentis) σε συγκέντρωση 25 g/hL. Το συγκεκριμένο παρασκεύασμα αποτελεί στέλεχος του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2 δεξαμενές της ομάδας «αραιωμένα» εμβολιάστηκαν με το εμπορικό παρασκεύασμα Prelude (Chr Hansen) σε συγκέντρωση 25 g/hL. Το συγκεκριμένο παρασκεύασμα είναι ζύμη non-Sacch και αποτελεί στέλεχος της ζύμης *Torulasporea delbrueckii*.
- 2 δεξαμενές της ομάδας «κανονικά» εμβολιάστηκαν με το εμπορικό παρασκεύασμα Safoeno SH12 (Fermentis) σε συγκέντρωση 25 g/hL όπως και παραπάνω.
- 2 δεξαμενές της ομάδας «κανονικά» εμβολιάστηκαν με το εμπορικό παρασκεύασμα Prelude (Chr Hansen) σε συγκέντρωση 25 g/hL όπως και παραπάνω.

Σε όλα, αμέσως μετά τον εμβολιασμό, προστέθηκε οργανικό άζωτο Springferm (Fermentis) σε συγκέντρωση 30 g/hL και ανόργανο άζωτο με την μορφή του φωσφορικού διαμμώνιου (DAP) σε συγκέντρωση 30 g/hL. Η θερμοκρασία, σε όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων, διατηρούνταν σταθερή στους 19-20 °C

Μετά το πέρας 4 ημερών (δηλαδή περίπου στο 1/3 της αλκοολικής ζύμωσης με κριτήριο τη συγκέντρωση σακχάρων), οι δεξαμενές και από τις δύο ομάδες που είχαν εμβολιαστεί με *Torulaspora*, εμβολιάστηκαν εκ νέου με το παρασκεύασμα του *S. cerevisiae* (Safoeno SH12, (Fermentis) σε συγκέντρωση 25 g/hL και οι δύο ομάδες και προστέθηκε ξανά οργανικό άζωτο Springferm (Fermentis) σε συγκέντρωση 30 g/hL και ανόργανο άζωτο με την μορφή του φωσφορικού διαμμώνιου (DAP) DAP (διφωσφορικό αμμώνιο) σε συγκέντρωση 30 g/hL.

Η διαφοροποίηση αυτή ως προς τον εμβολιασμό με ζυμομύκητα σε συνδυασμό με την προ υπάρχουσα διαφοροποίηση ως προς την καλλιεργητική τεχνική, είχε ως αποτέλεσμα να προκύψουν συνολικά 8 δεξαμενές (12 λίτρα γλεύκους) ανά δύο ίδιες.

Οι δεξαμενές αυτές, κωδικοποιήθηκαν ως εξής: SBASH12A, SBASH12B, SBATSHA, SBATSHB, SBKSH12A, SBKSH12B, SBKTSHA, SBKTSHB. Όπου το SB προκύπτει από την ποικιλία των σταφυλιών Sauvignon Blanc, το A ή το K προκύπτουν από το «αραιωμένο» ή το «κανονικό» αντίστοιχα, το SH12 ή το TSH δηλώνουν το είδος του ζυμομύκητα που εμβολιάστηκε το δείγμα και τέλος, το A ή το B δηλώνουν τις επαναλήψεις του δείγματος. Συνολικά, ο πειραματικός σχεδιασμός και η κωδικοποίηση των δειγμάτων φαίνεται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1.** Κωδικοποίηση δειγμάτων

Επεμβάσεις στο χωράφι							
Αραιωμένα				Κανονικά			
Επεμβάσεις κατά την οινοποίηση							
Saccharomyces cerevisiae		Torulaspora delbrueckii & Saccharomyces cerevisiae		Saccharomyces cerevisiae		Torulaspora delbrueckii & Saccharomyces cerevisiae	
SBASH12A	SBASH12B	SBATSHA	SBATSHB	SBKSH12A	SBKSH12B	SBKTSHA	SBKTSHB

Καθημερινά, σε όλες τις δεξαμενές γινόταν ήπια ανάδευση, για ομογενοποίηση του γλεύκους, και δειγματοληψία για μετρήσεις σακχαροπεριεκτικότητας (°Brix) και θερμοκρασίας (°C).

Την 14<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης έπειτα από μετρήσεις σακχάρων (°Brix) και διαπίστωση στασιμότητας στην πορεία της ζύμωσης, οι 8 δεξαμενές επανεμβολιάστηκαν με το παρασκεύασμα Safoeno HD A54 (Fermentis) που κυρίως αποτελείται από *Saccharomyces bayanus* σε συγκέντρωση 30 g/hL και επιπλέον προστέθηκε DAP (διφωσφορικό αμμώνιο) σε συγκέντρωση 10 g/hL. Επίσης, έγινε και προσθήκη 10 g/hL ανθρακικού καλίου (carbonate calcium) με σκοπό την μείωση της ογκομετρούμενης οξύτητας.

Την 23<sup>η</sup> μέρα της ζύμωσης έγινε προσθήκη Tanisulfur C. (Dolmar) σε συγκέντρωση 4 g/hL προκειμένου να αποφευχθούν αναγωγικά αρώματα στον οίνο.

Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε σε διάστημα 25 ημερών. Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης έγινε απολάσπωση και μετάγγιση των οίνων σε δεξαμενές των 10 L όπου έγινε προσθήκη metabisulfite σε συγκέντρωση 10 g/hL, και τοποθετήθηκαν σε ψύξη στους 10 °C. Μετά από 10 περίπου μέρες και ύστερα από διαπίστωση πρωτεϊνικής αστάθειας με bentotest και διαδοχικούς πειραματισμούς με αυξανόμενες δόσεις μπεντονίτη, ο οίνος έδωσε ενδείξεις σταθερότητας με συγκέντρωση μπεντονίτη 0,2 g/hL όπου και προστέθηκε και στις 8 δεξαμενές. Στη συνέχεια αφού οι οίνοι σταθεροποιήθηκαν πρωτεϊνικά και τρυγικά ακολούθησε η εμφιάλωση τους.

## 2.2 Προζυμωτικές αναλύσεις - Παρακολούθηση αλκοολικής ζύμωσης

Με την παραλαβή των σταφυλιών μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των βοτρυών και το συνολικό βάρος των σταφυλιών των δύο επεμβάσεων στο αμπέλι, αραιωμένων και κανονικών. Στην συνέχεια έγινε μέτρηση του βάρους και του όγκου 100 ραγών. Αφού συλλέχθηκαν με τυχαιοποίηση 100 ράγες από την κάθε περίπτωση, μετρήθηκε το βάρος τους με ζυγό ακριβείας και ο όγκος τους με εμβάπτιση σε ογκομετρικό κύλινδρο 500 mL που περιείχε απιονισμένο νερό και μετρήθηκε η εκτόπιση του όγκου του.

Μετά την έκθλιψη, την παραλαβή και την απολάσπωση του γλεύκους έγιναν οι βασικές αναλύσεις γλεύκους (σακχαροπεριεκτικότητα, οξύτητα και pH). Κατά την εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης, με καθημερινή δειγματοληψία διενεργούνταν αναλύσεις σακχάρων, ογκομετρούμενης οξύτητας, pH, αμμωνιακού αζώτου και αζώτου βασικών αμινοξέων.

Τα πρωτόκολλα των αναλύσεων αναφέρονται παρακάτω.

### 2.2.1 Μέτρηση σακχάρων με διαθλασίμετρο

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης πραγματοποιούνταν δειγματοληψία και από τις 8 δεξαμενές με τα γλεύκη με σκοπό την μέτρηση σακχάρων με διαθλασίμετρο ABBE REFRACTOMETER (WAY-1S). Με το διαθλασίμετρο γίνεται μέτρηση των ολικών διαλυτών στερεών σε ένα υγρό μέσω του δείκτη διάθλασης. Στο γλεύκος σχεδόν το σύνολο των διαλυτών στερεών συστατικών αποτελείται από σάκχαρα έτσι η μέτρηση με διαθλασίμετρο, το οποίο είναι βαθμονομημένο στους 20°C, αντιστοιχεί κατευθείαν σε συγκέντρωση σακχάρων σε βαθμούς °Brix ( $\text{g}_{\text{σακχάρων}}/100\text{g}_{\text{γλεύκους}}$ ).

### 2.2.2 Μέτρηση pH και προσδιορισμός Ολικής Οξύτητας

Οι αναλύσεις έγιναν σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους του OIV που προβλέπει και η ευρωπαϊκή νομοθεσία.

Ως ενεργός οξύτητα ορίζεται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση στον οίνο και δίνουν κατιόντα υδρογόνου (H<sup>+</sup>) και είναι ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των κατιόντων υδροξωνίου στο διάλυμα ( $\text{pH}=-\log[\text{H}^+]$ ).

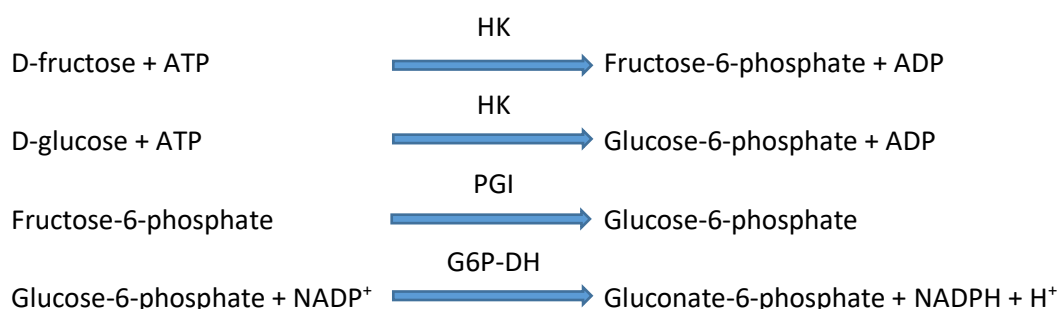
Η μέτρηση της ενεργού οξύτητας - pH έγινε με την χρήση pH-μετρου HI 5521 (HANNA) αφού πρώτα είχε βαθμονομηθεί με κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα, ένα με τιμή 4 και ένα με τιμή 7. Στους οίνους ανάλογα με την αμπελοαγρική περιοχή, την ποικιλία της αμπέλου και την τεχνική παρασκευής τους οι ενδεικτικές τιμές είναι 2,8-4,2.

Ως Ολική οξύτητα ορίζεται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων, είτε σε μοριακή κατάσταση είτε σε μορφή ανιόντων, που βρίσκονται στο γλεύκος και τον οίνο.

Η μέτρηση της ολικής οξύτητας του γλεύκους πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο με τιτλοδότηση γλεύκους 10 mL με NaOH (0.1M), παρουσία δείκτη «κυανό της βρωμοθυμόλης», αφού πρώτα είχε απομακρυνθεί το CO<sub>2</sub> με ανακίνηση μέχρι αφρισμού. Η ογκομετρούμενη οξύτητα εκφράστηκε σε  $\frac{\text{g τρυγικού οξέος}}{\text{L γλεύκους}}$ . Στους λευκούς οίνους οι ενδεικτικές τιμές είναι 5-8 g/L.

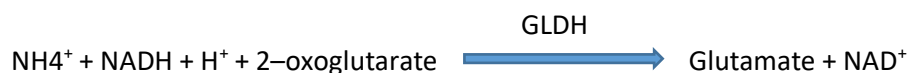
### 2.2.3 Ενζυμικός προσδιορισμός υπολειπόμενων σακχάρων, αμμωνιακού αζώτου και αζώτου α-Αμινοξέων

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την ενζυμική ανάλυση των συστατικών που θα προσδιοριστούν φαίνονται παρακάτω. Αναλυτικότερα, ο προσδιορισμός των σακχάρων περιγράφεται από τις αντιδράσεις:

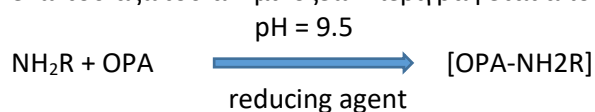


Η D-φρουκτόζη και η D-γλυκόζη, μέσω των αντιδράσεων που περιγράφονται, δημιουργούν NADPH. Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της D-γλυκόζης/D-φρουκτόζης εάν προστεθεί το ένζυμο PGI ή της D-γλυκόζης εάν δεν προστεθεί. Οι αντιδράσεις επάγονται στους 37°C και λαμβάνεται η απορρόφησή τους στα 340nm.

Το άζωτο προσδιορίζεται με τις δύο μορφές που χρησιμοποιεί ο ζυμομύκητας, ανόργανο και οργανικό (α-αμινοξέων). Ο προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου στα δείγματα περιγράφεται από την παρακάτω αντίδραση:



ενώ του αζώτου α-Αμινοξέων περιγράφεται από την αντίδραση:



Η αμινομάδα στο α-άτομο άνθρακα των αμινοξέων αντιδρά με ο-φθαλδιαλδεΐδη (OPA) παρουσία αναγωγικού παράγοντα σε αλκαλικό μέσο και δημιουργεί ένα χρωμοφόρο που μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά στα 340 nm.

Για τον προσδιορισμό των υπολειπόμενων σακχάρων, του αμμωνιακού αζώτου και του αζώτου α-Αμινοξέων στο γλεύκος χρησιμοποιήθηκε ο ενζυμικός αναλυτής Y15 (BioSystems). Οι αναλύσεις έγιναν με προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια της εταιρίας BioSystems.

Με την ίδια μέθοδο, όταν επιβεβαιώθηκε η πλήρης ζύμωση των σακχάρων (γλυκόζης/φρουκτόζης), πιστοποιήθηκε και το τέλος των αλκοολικών ζυμώσεων.

### 2.3 Μεταζυμωτικές κατεργασίες

Μετά την 25η μέρα ζύμωσης και την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, οι 8 δεξαμενές («αραιωμένα» και «κανονικά») απολασπώθηκαν και μεταγγίστηκαν σε νέα δοχεία ενώ έγινε προσθήκη σε αυτά 10 g/hL metabisulfite. Στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ψύξη στους 10°C.

#### 2.3.1 Έλεγχος πρωτεϊνικής σταθερότητας

Μετά το πέρας 10 ημερών των δεξαμενών στην ψύξη έγινε έλεγχος πρωτεϊνικής σταθερότητας των οίνων με χημική μετουσίωση (Bentotest). Κατά την μέθοδο αυτή, σε δείγμα οίνου γίνεται χρήση φωσφομολυβδικού οξέος σε θειικό οξύ με αποτέλεσμα την μετουσίωση και κατακρήμιση πρωτεϊνών. Η κατακρήμιση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Για την πραγματοποίηση του ελέγχου έγιναν δύο μετρήσεις για κάθε δείγμα οίνου με σκοπό την μέτρηση της θολερότητας του με νεφελόμετρο Torbidimento 111 (VELP SCIENTIFICA). Πιο συγκεκριμένα έγινε αρχικά διήθηση δείγματος οίνου με φίλτρο 0.45μm και στην συνέχεια καταγραφή της μέτρησης θολερότητας. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη του αντιδραστηρίου και καταγραφή της δεύτερης μέτρησης μετά το πέρας ενός λεπτού. Η διαφορά των δύο μετρήσεων διέφερε κατά 2 NTU με αποτέλεσμα ο οίνος να θεωρηθεί πρωτεϊνικά ασταθής και να απαιτήθηκε περαιτέρω επεξεργασία με μπεντονίτη (αργιλώδες κολλοειδές αρνητικά φορτισμένο που καταβυθίζει θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες του οίνου). Έπειτα από διαδοχικούς πειραματισμούς με αυξανόμενες δόσεις μπεντονίτη (Bentotest), προστέθηκε και στις 8 δεξαμενές 0,2 g/hL.

### 2.4 Μεταζυμωτικές αναλύσεις

Σημαντική παράμετρος, που προσδιορίστηκε σε διάφορα στάδια, ήταν η συγκέντρωση του ελεύθερου αλλά και του ολικού θειώδη ανυδρίτη.

#### 2.4.1 Προσδιορισμός ελεύθερου και ολικού SO<sub>2</sub>

Για το προσδιορισμό του ελεύθερου και ολικού θειώδη ανυδρίτη των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος τιτλοδοτητής ENO 20 (OENO-BIO) που φέρει ηλεκτρόδιο δυναμικού οξειδοαναγωγής. Πιο συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη τιτλοδοτήθηκαν με ιώδιο 20 mL δείγματος στο οποίο είχε προστεθεί 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1/3. Για τον προσδιορισμό του ολικού θειώδη ανυδρίτη τιτλοδοτήθηκαν με ιώδιο 20 mL δείγματος, αφού πρώτα είχαν προστεθεί 2mL NaOH (5N), για την απελευθέρωση του δεσμευμένου ανυδρίτη, και κατόπιν 4 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1/3. Η συγκέντρωση του ελεύθερου και ολικού θειώδη ανυδρίτη εκφράστηκε σε mg SO<sub>2</sub>/L.

## 2.4.2 Ανάλυση FTIR

Ο προσδιορισμός της ολικής οξύτητας, του αλκοολικού τίτλου και της πτητικής οξύτητας των οίνων πραγματοποιήθηκε με αναλυτή FTIR (Winescan) ωστόσο αντιπροσωπευτικά δείγματα αναλύθηκαν και με τις κλασσικές μεθόδους στο εργαστήριο οινολογίας του ΓΠΑ όπως περιγράφεται παρακάτω.

Η φασματοσκοπία FTIR είναι μια τεχνική που παρέχει δομικές πληροφορίες σχετικά με τα μοριακά χαρακτηριστικά ενός μεγάλου φάσματος ενώσεων. Το κύριο πλεονέκτημα είναι η ταχύτητα, ο υψηλός βαθμός αυτοματισμού, η ανάλυση, και η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας. Οι πρόσφατες βελτιώσεις στα όργανα μαζί με τις προόδους στις οπτικές ίνες και τη χημειομετρική έχουν παράσχει ένα αναλυτικό εργαλείο που είναι κατάλληλο για ποιοτική ανάλυση και έλεγχο διεργασιών σε πολλές βιομηχανίες. Αν και η φασματοσκοπία FTIR εφαρμόζεται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, η αποδοχή της στη βιομηχανία σταφυλιών και οίνου ήταν σχετικά αργή και κυρίως περιορίζεται σε μεγάλα οινοποιεία. Η παραγωγή οίνου απαιτεί συνεχή παρακολούθηση του προϊόντος και έλεγχο της διεργασίας από την έναρξη της ωρίμανσης των σταφυλιών μέχρι την εμφιάλωση του τελικού προϊόντος. Η άμεση φασματοσκοπική μέτρηση είναι κατάλληλη σε αυτό το πλαίσιο επειδή επιτρέπει την ταχεία και ταυτόχρονη ανάλυση πολλών ενώσεων με ελάχιστη προετοιμασία δείγματος και κατανάλωση αντιδραστηρίου.

Η φασματοσκοπία FTIR βασίζεται στην αρχή ότι οι λειτουργικές ομάδες εντός ενός δείγματος, κατά την έκθεση σε υπέρυθρη ακτινοβολία, δονούνται. Η διάκριση μεταξύ τεχνικών NIR και mid-IR είναι φθίνουσα, και οι μέθοδοι θεωρούνται συμπληρωματικές, με κάθε φασματική περιοχή να παρέχει μοναδικά πλεονεκτήματα.

Οι περισσότερες ενώσεις με ομοιοπολικούς δεσμούς απορροφούν σε συγκεκριμένες συχνότητες ακτινοβολίας στην περιοχή IR του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Μόνο οι ασύμμετροι δεσμοί με διπολική ροπή που αλλάζουν σε συνάρτηση με το χρόνο είναι ικανοί να απορροφούν ακτινοβολία υπέρυθρων και οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις για κάθε τύπο δεσμού βρίσκονται σε συγκεκριμένα μικρά τμήματα της περιοχής δόνησης IR. Η δονητική περιοχή υπέρυθρων είναι σε μήκη κύματος ~2500–25.000 nm, που αντιστοιχεί σε κυματικούς αριθμούς 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ . Οι απλούστεροι τύποι δονητικής κίνησης σε έναν μοριακό δεσμό είναι οι τρόποι τάνυσης και κάμψης, οι οποίοι προκαλούν θεμελιώδεις απορροφήσεις με τις οποίες προκαλούνται δονητικές μεταπτώσεις στα μόρια, με αποτέλεσμα μεταβάσεις από τη μηδενική κατάσταση στη διεγερμένη κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας (acs.org).

## 2.4.1 Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου

Ως αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο ορίζεται ο αριθμός των λίτρων άνυδρης αιθανόλης που περιέχονται σε 100 L οίνου σε θερμοκρασία 20 °C. Για τον προσδιορισμό του αλκοολικού τίτλου των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε συσκευή απόσταξης DE-1626 (P SELECTA). Για την διαδικασία προσδιορισμού τοποθετήθηκε οίνος σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL και αφότου μετρήθηκε η θερμοκρασία του, προστέθηκαν 10 mL CaOH (για την μετατροπή του δείγματος σε αλκαλικό) και 2 ελαφρόπετρες για αποφυγή έντονου βρασμού. Στην συνέχεια, συλλέχθηκε απόσταγμα ίσο με τα 3/4 του αρχικού όγκου του δείγματος και μετρήθηκε η

θερμοκρασία (η οποία δεν πρέπει να έχει απόκλιση  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Κατόπιν, το δείγμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο, μετρήθηκε η θερμοκρασία του ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$  από θερμοκρασία περιβάλλοντος) και, με αλκοολόμετρο, μετρήθηκε αρχικά ο φαινομενικός αλκοολικός τίτλος και μετά υπολογίστηκε ο πραγματικός αλκοολικός τίτλος. Η μονάδα μέτρησης είναι %vol με τιμές να κυμαίνονται για λευκούς οίνους 11-12 %vol.

#### 2.4.2 Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας

Ως πτητική οξύτητα ορίζεται το σύνολο των οξέων της σειράς του οξικού οξέος που υπάρχουν στους οίνους ελεύθερα ή με την μορφή αλάτων. Με βάση τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης ανώτατο όριο στους λευκούς οίνους είναι  $1,08 \text{ g}_{\text{οξικού οξέος}}/\text{L}$ .

Εργαστηριακά, η πτητική οξύτητα προσδιορίστηκε με συσκευή απόσταξης DE-1626 (P SELECTA) όπου αποστάχθηκαν μεθ' υδρατμών 20mL δείγματος παρουσία 0,5g τρυγικού οξέος και συλλέχθηκε απόσταγμα 250mL. Σε όλο τον όγκο του αποσταγματος προστέθηκε δείκτης φαινολοφθαλείνης, έγινε τιτλοδότηση με 0.1M NaOH και υπολογίστηκε η κατανάλωση (εμφανής ροζ χρωματισμός του δείγματος). Στην συνέχεια, προστέθηκαν 4 σταγόνες αραιό υδροχλωρικό οξύ για αποχρωματισμό, 2mL δείκτη αμύλου και τιτλοδοτήθηκε εκ νέου με διάλυμα 0,005 M  $\text{I}_2$  για υπολογισμό της νέας κατανάλωσης. Με βάση τις δύο καταναλώσεις (NaOH,  $\text{I}_2$ ) υπολογίστηκε η πτητική οξύτητα.

#### 2.4.3 Μέτρηση απορρόφησης στα 420nm

Η απορρόφηση στα 420nm είναι η σημαντικότερη στους λευκούς οίνους για την εκτίμηση του χρώματός τους και το βαθμό οξειδωσής τους. Η αύξηση της απορρόφησης στα 420nm είναι ένδειξη οξειδωσής του οίνου, λαμβάνοντας βέβαια υπόψη και άλλες παραμέτρους.

Για την μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων έγινε χρήση φασματοφωτόμετρου UV-1900 (SHIMADZU). Το δείγμα οίνου φυγοκεντρήθηκε και τοποθετήθηκε σε κυψελίδα των 10mm. Για το μηδενισμό του οργάνου, ως υγρό αναφοράς χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό.

#### 2.4.4 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν στο μόριό τους βενζολικούς δακτυλίους που παρουσιάζουν ισχυρή απορρόφηση στο υπεριώδες φως, το μέγιστο της οποίας παρατηρείται στα 280nm. Έτσι προσδιορίζεται η συγκέντρωση των φλαβανοειδών και μη φαινολών και κάποιων μη φαινολικών που απορροφούν στο φάσμα αυτό.

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε φυγοκεντρημένο δείγμα οίνου (4000rpm) το οποίο αραιώθηκε με απιονισμένο νερό (1:10) και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280nm με χρήση φασματοφωτόμετρου UV-1900 (SHIMADZU). Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε ως υγρό αναφοράς απιονισμένο νερό.

#### 2.4.5 Ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

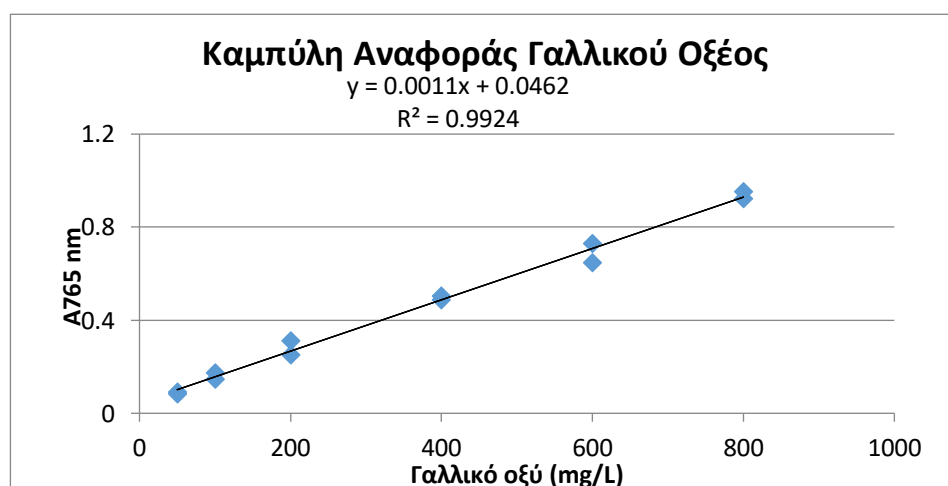
Πρόκειται για μια φωτομετρική μέθοδο που μετρά το σύνολο των φαινολικών ουσιών βασιζόμενη στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το αντιδραστήριο Folin-



Ciocalteau. Οι φαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος με χρήση πρότυπης καμπύλης.

Για την εκτέλεση της διαδικασίας, σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL μεταφέρθηκαν με τη σειρά 0,1 mL δείγμα οίνου, 3 mL απεσταγμένο νερό, 0,5 mL αντιδραστήριο Folin -Ciocalteau και 1,5 mL ανθρακικού νατρίου. Μετά από κάθε προσθήκη το μίγμα αναδεύονταν. Στο τέλος συμπληρώθηκε ο όγκος μέχρι την χαραγή της ογκομετρικής φιάλης με νερό και μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα όπου παρέμεινε για 30 min για την ανάπτυξη του χρωμοφόρου. Στην συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος στα 765 nm με κυψελίδα 1cm στο φασματοφωτόμετρο UV-1900 (SHIMADZU). Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας το προϊόν της αντίδρασης που είχε αντικατασταθεί το δείγμα με νερό.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών του δείγματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) έγινε από την ευθεία που περιγράφει την πρότυπη καμπύλη που σχηματίστηκε από γνωστές συγκεντρώσεις του συστατικού βαθμονόμησης, του γαλλικού οξέος. Για την κατασκευή της ευθείας, από πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος 1 g/L παρασκευάστηκαν οι συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 600 και 800 mg/L κι εφαρμόστηκε η μέθοδος όπως παραπάνω. Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις με τις απορροφήσεις που λήφθηκαν από την φωτομέτρηση στα 765 nm, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη. Από την ευθεία  $y=ax+\beta$  που την περιγράφει υπολογίστηκε η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών του δείγματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mgGAE/L).



**Σχήμα 1.** Πρότυπη ευθεία γαλλικού οξέος για την βαθμονόμηση της μεθόδου προσδιορισμού ολικών φαινολικών συστατικών Folin-Ciocalteau.

## 2.5 Έλεγχος οξειδωτικής σταθερότητας με τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης

Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών των λευκών οίνων έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία πολυμερισμένων ενώσεων με χαρακτηριστικό καφετί χρωματισμό. Η παρουσία των ενώσεων αυτών επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των λευκών οίνων και συμβάλλουν στην ποιοτική τους υποβάθμιση. Με το τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης

υπάρχει δυνατότητα πρόβλεψης των οξειδωτικών αντιδράσεων στον οίνο και αποφυγής επιπτώσεων τους (Sioumis, 2005)

Για την μελέτη της οξειδωτικής σταθερότητας συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε δείγμα οίνου και τοποθετήθηκε σε τρία διαφορετικά φιαλίδια σε όγκο 2/3 του συνολικού τους όγκου (30mL σε φιαλίδιο των 45mL). Τα φιαλίδια μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο, στους 55°C και συνθήκες σκότους για 12 ημέρες. Καθημερινά λαμβάνονταν μια ποσότητα από κάθε φιαλίδιο για καταγραφή της απορρόφησης των δειγμάτων στα 420nm με φασματοφωτόμετρο UV-1900 (SHIMADZU) και το υγρό επέστρεφε στο φιαλίδιο έτσι ώστε να μην μεταβάλλεται ο όγκος του υγρού. Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό.

Στο τέλος του χρόνου, οι απορροφήσεις συγκεντρώθηκαν κι επεξεργάστηκαν μαθηματικά. Από την καμπύλη μεταβολής της απορρόφησης για κάθε δείγμα για γραμμική σχέση ( $y=ax+\beta$ ) μέσω της εξίσωσης  $A_{420} = A_{420,0} + kt$ , όπου  $A_{420}$  είναι η μεταβολή του χρώματος στον οίνο,  $A_{420,0}$  η αρχική μέτρηση του χρώματος,  $k$  ο συντελεστής του ρυθμού μεταβολής του χρώματος και  $t$  το χρονικό διάστημα. Από την ευθεία υπολογίζεται ο συντελεστής  $k$ , ο οποίος χαρακτηρίζει την ταχύτητα μεταβολής του χρώματος στα 420 nm για κάθε δείγμα. Όσο μικρότερη τιμή έχει ο συντελεστής  $k$  τόσο πιο αργά θα εμφανιστούν οι καφέ αποχρώσεις οξείδωσης του οίνου.

## 2.6 Ανάλυση πτητικών ενώσεων

### 2.6.1 Εκχύλιση πτητικών συστατικών

Για την εκχύλιση των πτητικών ενώσεων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε φυγοκεντρημένο δείγμα οίνου 40mL το οποίο τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη (50mL) και προστέθηκαν, ως εσωτερικά πρότυπα, αιθανολικά διαλύματα οκτανόλης-3 (3-octanol), επτανοϊκού αιθυλεστέρα (ethyl-heptanoate) και επτανοϊκού οξέος (heptanoic acid) σε τελική συγκέντρωση 10 mg/L για το καθένα με τη βοήθεια των οποίων θα γίνει η ημι-ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών. Συμπληρώθηκε ο όγκος στα 50 mL και το δείγμα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη (100 mL). Εκεί προστέθηκαν 5 mL διχλωρομεθάνιο και τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα για ανάδευση 10 min. Μετά το τέλος της ανάδευσης το δείγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου διαχωρίστηκε σε δύο φάσεις, υδατική και οργανική. Η οργανική φάση μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρου ενώ η υδατική επιστράφηκε στην εσφυρισμένη κωνική φιάλη και η διαδικασία εκχύλισης επαναλήφθηκε. Η οργανική φάση και από τις δυο εκχυλίσεις ενώθηκαν και ο σωλήνας με το σύνολο του εκχυλίσματος φυγοκεντρήθηκε (4000 rpm, 10 min) για καλύτερο διαχωρισμό. Η φάση του διχλωρομεθανίου συλλέχθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο 20mL και προστέθηκε άνυδρο θειικό νάτριο. Το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε υπό άζωτο και συντηρήθηκε στους -20°C μέχρι να γίνει προσδιορισμός των πτητικών συστατικών με GC/MS.

### 2.6.2 Προσδιορισμός πτητικών ενώσεων με GC/MS

Η αέρια χρωματογραφία (Gas-Chromatography) είναι μια αναλυτική τεχνική για το διαχωρισμό και την ανάλυση των αρωματικών ενώσεων του οίνου και στηρίζεται στη

διαφορετική ταχύτητα μετατόπισης των διαφόρων συστατικών του μέσω μιας κινητής και μια σταθερής φάσης. Η ταχύτητα μετακίνησης της ουσίας μέσα στην χρωματογραφική στήλη καθορίζει τον χρόνο κατακράτησης και στην συνέχεια γίνεται ταυτοποίηση της ουσίας μέσω της σύγκρισης της με τους χρόνους κατακράτησης πρότυπων ουσιών. Κατόπιν γίνεται ημι-ποσοτικός προσδιορισμός μέσω της σύγκρισης του εμβαδού κορυφής των διαφόρων συστατικών του δείγματος με το εμβαδόν κορυφής πρότυπων ουσιών.

Ο αέριος χρωματογράφος (Clarus 5090, Perkin Elmers) αποτελείται από έναν φούρνο και βαλβίδες ελέγχου της θερμοκρασίας του φούρνου, ένα μικροεπεξεργαστή, φιάλη φέροντος αερίου και σωληνώσεις για την σύνδεση του εγχυτήρα στην στήλη και την έξοδο για την σύνδεσή του με το φασματόμετρο μάζας. Το φασματόμετρο μάζας (Mass Spectrometry, Clarus 5Q8S) χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το αέριο χρωματογράφο για την ταυτοποίηση των συστατικών του οίνου. Αποτελείται από μια πηγή ιονισμού, το φακό εστίασης, τον αναλυτή μάζας, τον ανιχνευτή ιόντων και πολλαπλές βαλβίδες άντλησης. Ο φασματογράφος παρέχει πληροφορίες για τον χρόνο ανίχνευσης, το λόγο μάζα προς φορτίο ( $m/z$ ) και την ένταση του σήματος που λαμβάνει. Έτσι μέσω της χρωματογραφίας πραγματοποιείται καλός διαχωρισμός και υψηλή ταχύτητα ανάλυσης ενώ μέσω της φασματογραφίας μάζας πραγματοποιείται ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των ενώσεων.

Αναλυτικότερα, για το εν λόγω πείραμα, συλλέχθηκαν δείγματα από τους παραγόμενους πειραματικούς οίνους και για τον διαχωρισμό των πτητικών ενώσεων τους χρησιμοποιήθηκε αέρια χρωματογραφία (GC) και μετέπειτα φασματομετρία μαζών (MS). Το εκχύλισμα κάθε δείγματος από την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα έκχυσης στον αέριο χρωματογράφο με σκοπό την ταυτοποίηση και ημι-ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών. Η τριχοειδή στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Agilent J&W (DB 5MS UI) είχε μήκος 50m, εσωτερική διάμετρο 0,25 mm και πάχος υμενίου 0,25 mm. Η πίεση της κεφαλής της στήλης ήταν 47 psi και το φέρον αέριο της ήταν ήλιο (He) με σταθερή παροχή 1,96 mL/min. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ο φούρνος διατηρήθηκε στους 40°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια με ρυθμό αύξησης 5°C/min, έφτασε στους 240°C όπου και παρέμεινε για 20min. Όσον αφορά το φασματόμετρο μάζας λειτουργούσε με ενέργεια ηλεκτρονίων ρυθμισμένη στα 70eV και εύρος μάζας σάρωσης 40-300  $m/z$ . Η θερμοκρασία πηγής ήταν ρυθμισμένη στους 250°C. Συνολικά όλη η διαδικασία προσδιορισμού για κάθε δείγμα είχε διάρκεια 62min.

Τα δείγματα έκχυσης τοποθετημένα σε vials μεταφέρθηκαν στο GC/MS και αφού ολοκληρώθηκε η ανάλυσή τους εμφανίστηκε στον υπολογιστή το αντίστοιχο χρωματογράφημα με τις κορυφές των πτητικών ενώσεων για κάθε δείγμα γλεύκους/οίνου. Στην συνέχεια εντοπίστηκαν και ολοκληρώθηκαν οι κορυφές που αντιστοιχούν στις ενώσεις για τις οποίες υπάρχουν πρότυπες καμπύλες και για τα εσωτερικά πρότυπα.

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν (peak area) μεταφέρθηκαν σε αρχείο excel και υπολογίστηκαν οι λόγοι των ενώσεων με το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο (οι ανώτερες αλκοόλες με 3-octanol, οι εστέρες με ethyl-heptanoate και τα πτητικά λιπαρά οξέα με το heptanoic acid). Ο λόγος χρησιμοποιήθηκε ως  $\gamma$  στις εξισώσεις των προτύπων καμπυλών και λύθηκε ως προς  $x$ , το οποίο αντιστοιχεί στην συγκέντρωση της πτητικής ένωσης σε mg / L.

Απο τις τέσσερις επαναλήψεις για κάθε δείγμα υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική τους απόκλιση.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ημιποσοτική ανάλυση, δηλαδή, παρουσιάζονται οι λόγοι του εμβαδού της κορυφής κάθε πτητικής ένωσης ως προς το εμβαδό του εσωτερικού πρότυπου.

## 2.7 Οργανοληπτική αξιολόγηση οίνων

Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, στους παραγόμενους οίνους που είχαν εμφιαλωθεί σε φιάλες των 750 mL πραγματοποιήθηκε οσφρητική και γευστική αξιολόγηση. Η οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων έλαβε μέρος στο Εργαστήριο Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο με λευκούς πάγκους και η ομάδα γευσιγνωσίας απαρτιζόταν από 12 άτομα εξειδικευμένων και έμπειρων δοκιμαστών (άντρες και γυναίκες) ηλικίας μεταξύ 20-50 ετών. Οι οίνοι από τις πειραματικές επεμβάσεις (4 δείγματα, οι πειραματικές επαναλήψεις αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1 για να προκύψει ένα δείγμα) σερβιρίστηκαν σε γυάλινα ποτήρια γευσιγνωσίας τύπου INAO σε σχήμα τουλίπας και κλειστά με καπάκι για την μείωση της απώλειας των αρωμάτων.

*Πίνακας 2. Ερωτηματολόγιο αξιολόγησης των οίνων*

<b>Δοκιμαστής:</b>						
	<b>Κλίμακα βαθμολόγησης: 1-5</b>					
<b>Δείγματα</b>						
<b><u>Οσφρητική αξιολόγηση</u></b>						
Ένταση αρώματος (άτονο-μέτριο-έντονο)						
Τροπικά Φρούτα (λίγο-μέτριο-πολύ)						
Ανανάς (λίγο-μέτριο-πολύ)						
Μπανάνα (λίγο-μέτριο-πολύ)						
Εσπεριδοειδή (λίγο-μέτριο-πολύ)						
Άνθη (λίγο-μέτριο-πολύ)						
<b><u>Γευστική αξιολόγηση</u></b>						
Οξύτητα (χαμηλή-μέτρια-υψηλή)						
Σώμα (χαμηλό-μέτριο-υψηλό)						
Συνολική εκτίμηση (χαμηλή-μέτρια-υψηλή)						

Οι δοκιμαστές κλήθηκαν να συμπληρώσουν το φύλλο γευσιγνωσίας με σκοπό τη συνολική εκτίμηση έντασης αρώματος οίνων, την κατηγοριοποίηση των αρωμάτων και την γευστική τους αξιολόγηση. Πιο συγκεκριμένα με κλίμακα βαθμολόγησης μεταξύ 1-5 (άτονο-μέτριο-έντονο) κατέταξαν την ένταση του αρώματος και το είδος του αρώματος τροπικά φρούτα, ανανάς, μπανάνα, εσπεριδοειδή, άνθη ενώ χαρακτήρισαν τους οίνους ως προς την οξύτητα

(χαμηλή-μέτρια-υψηλή) και το σώμα (χαμηλό-μέτριο-υψηλό) και έκαναν μια συνολική τους εκτίμηση. Στον πίνακα 2 παρατίθεται αναλυτικά το φύλλο αξιολόγησης των οίνων.

## 2.8 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό JMP-11. Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων (τιμή επιπέδου σημαντικότητας  $p < 0,05$  ή όριο εμπιστοσύνης 95%) αξιολογήθηκαν μέσω της εφαρμογής της ανάλυσης διακύμανσης με έναν παράγοντα (OneWay ANOVA) με χρήση του Tukey HSD τεστ για την σύγκριση των μέσων και για τον εντοπισμό των συγκεκριμένων ζευγών που εμφανίζουν στατιστικές διαφορές.

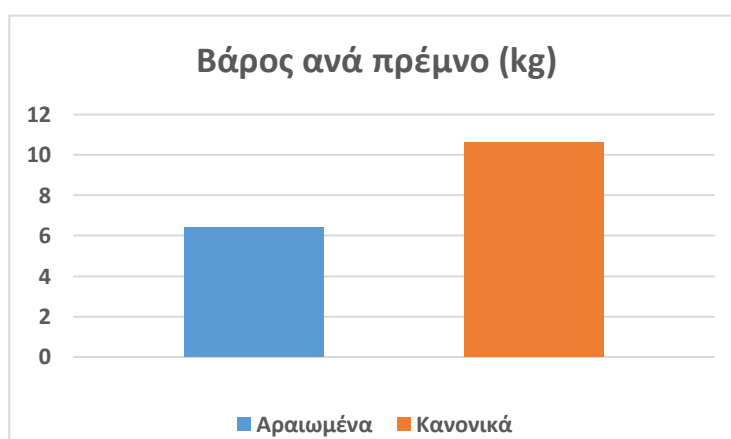
Για την δημιουργία των πινάκων και των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το Microsoft Excel. Όταν τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε γράφημα, παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (ως μπάρες) και η τυπική απόκλιση των επαναλήψεων. Με a, b, c κ.ο.κ. χαρακτηρίζεται η στατιστική διαφορά των δειγμάτων (σε επίπεδο 0.05%). Δείγματα με ίδιο γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων κατά την διάρκεια όλων των σταδίων της πειραματικής διαδικασίας.

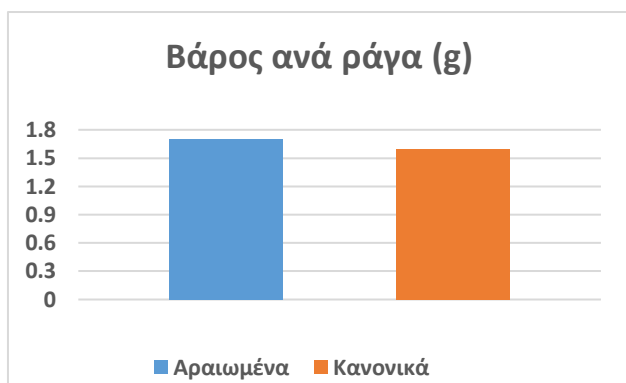
#### 3.1. Μετρήσεις στο σταφύλι

Με την παραλαβή των σταφυλιών μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των βοτρώων και το συνολικό βάρος των σταφυλιών των δύο επεμβάσεων στο αμπέλι, αραιωμένων και κανονικών. Πιο συγκεκριμένα, τα 5 τελάρα που περιείχαν 685 βότρες από τα «αραιωμένα» σταφύλια είχαν συνολικό βάρος 95,800 kg και προήλθαν από 15 πρέμνα και τα 5 τελάρα που περιείχαν 745 βότρες από «κανονικά» σταφύλια είχαν συνολικό βάρος 105,900 kg και προήλθαν από 10 πρέμνα. Το βάρος ανά πρέμνο για τα πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου είναι μικρότερο (6,4 kg) απ' αυτά που δεν είχαν δεχθεί (10,6 kg) και συνάδει με την μείωση της απόδοσης με την συγκεκριμένη τεχνική (σχήμα 2).



**Σχήμα 2.** Βάρος σταφυλιών ανά πρέμνο που προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά)

Στην συνέχεια έγινε μέτρηση του βάρους και του όγκου 100 ραγών. Αφού συλλέχθηκαν με τυχαιοποίηση 100 ράγες από την κάθε περίπτωση, μετρήθηκε το βάρος τους με ζυγό ακριβείας και ο όγκος τους με εμβάπτιση σε ογκομετρικό κύλινδρο 500 mL που περιείχε απιονισμένο νερό και μετρήθηκε η εκτόπιση του όγκου του. Για τα «αραιωμένα» το βάρος και ο όγκος τους ήταν 168,7 g και 150 mL και για τα «κανονικά» το βάρος και ο όγκος τους ήταν 161,82 g και 145 mL αντίστοιχα. Υπολογίστηκε ακόμα το βάρος ανά ράγα για τα «αραιωμένα» 1,7 g και ο όγκος 1,5 mL και για τα «κανονικά» το βάρος και ο όγκος ανά ράγα 1,6 g και 1,45 mL αντίστοιχα. Τα «αραιωμένα» έχουν μεγαλύτερο βάρος και όγκο ανά ράγα απ' ότι τα «κανονικά» γιατί λόγω της αραιώσης, το πρέμνο έχει μεγαλύτερες ποσότητες διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών άρα αυξάνεται ο όγκος και το βάρος ανά ράγα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται στα σχήματα 2-4.



**Σχήμα 3.** Βάρος σταφυλών ανά ράγα που προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά)



**Σχήμα 4.** Όγκος σταφυλών ανά ράγα που προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά)

Ακολούθησε έκθλιψη των σταφυλιών και παραλαβή γλεύκους όγκου 50 L για τα «αραιωμένα» και 60 L για τα «κανονικά».

### 3.2. Προζυμωτικές αναλύσεις στο γλεύκος

Μετά την έκθλιψη, την παραλαβή, την απολάσπωση και τον διαχωρισμό του σταφυλοπολτού σε δύο διαφορετικές δεξαμενές («αραιωμένα» και «κανονικά») πραγματοποιήθηκαν βασικές αναλύσεις (σακχαροπεριεκτικότητα, οξύτητα, pH, αμμωνιακού άζωτου και άζωτου βασικών αμινοξέων). Τα αποτελέσματα των εν λόγω μετρήσεων δίνονται στον πίνακα 3. Παρατηρείται ότι η τιμές της ογκομετρούμενης οξύτητας και του pH δεν διαφέρουν, ενώ μεγαλύτερη σακχαροπεριεκτικότητα εμφανίζει το γλεύκος από τα «αραιωμένα». Και τα δύο γλεύκη δείχνουν πλήρη ωρίμανση των σταφυλών. Όσον αφορά το αμμωνιακό άζωτο και το άζωτο βασικών αμινοξέων μεγαλύτερες τιμές έχει το γλεύκος από τα «κανονικά».

**Πίνακας 5.** Βασικές οινολογικές αναλύσεις γλεύκους για τα αραιωμένα και τα κανονικά πριν την αλκοολική ζύμωση

Μετρήσεις	Αραιωμένα	Κανονικά
Brix	23,8 ± 0,2	23,3 ± 0,2
Ογκομετρούμενη οξύτητα	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1
pH	3,2 ± 0,1	3,1 ± 0,1
Αμμωνιακό άζωτο	15,6 ± 0,2	18 ± 0,1
Άζωτο βασικών αμινοξέων	39,7 ± 0,2	47,5 ± 0,2

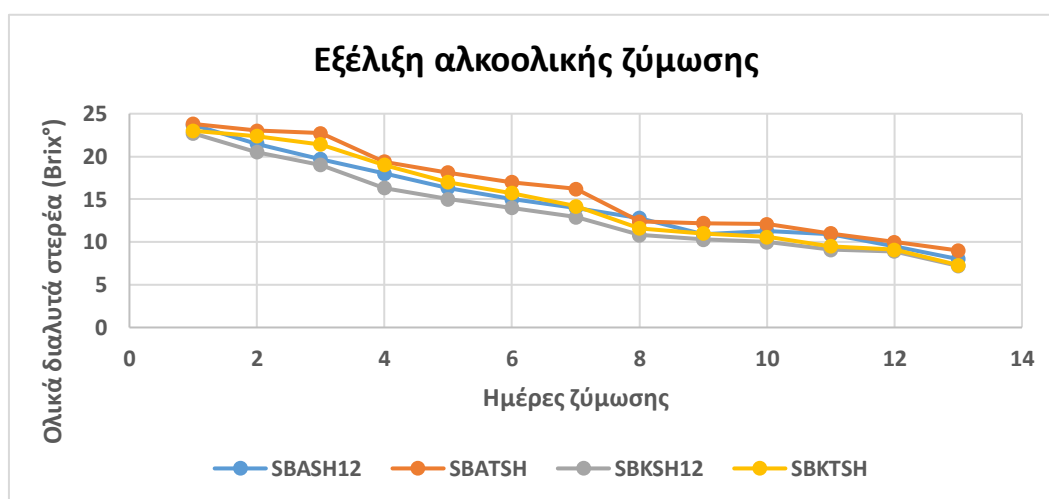
### 3.3. Παρακολούθηση αλκοολικής ζύμωσης

Μετά την τοποθέτηση του γλεύκους σε δύο διαφορετικές δεξαμενές ανάλογα με την αμπελουργική επέμβαση («αραιωμένα» και «κανονικά»), ακολούθησε και διαφοροποίηση

ως προς τον εμβολιασμό με ζυμομύκητα. Έτσι, προέκυψαν τα 4 δείγματα (2 επαναλήψεις ανά περίπτωση) στα οποία έγινε λευκή οινοποίηση σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που αναφέρονται στο κεφάλαιο Μέθοδοι-Υλικά.

Στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης και μέχρι την 15<sup>η</sup> μέρα πραγματοποιήθηκε καθημερινή δειγματοληψία απ' όλες τις δεξαμενές με σκοπό την μέτρηση σακχάρων με διαθλασίμετρο ABBE REFRACTOMETER (WAY-1S) του εργαστηρίου οινολογίας ΓΠΑ. Στο γλεύκος σχεδόν το σύνολο των διαλυτών στερεών συστατικών αποτελείται από σάκχαρα έτσι η μέτρηση με διαθλασίμετρο το οποίο είναι βαθμονομημένο στους 20°C αντιστοιχεί κατευθείαν σε συγκέντρωση σακχάρων σε βαθμούς °Brix (gσακχάρων/100gγλεύκος).

Η εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 5. Οι ενδείξεις αποτελούν μέσο όρο των βιολογικών επαναλήψεων των ζυμώσεων. Από ότι φαίνεται, δεν διαφοροποιήθηκε ιδιαίτερα και ήταν περίπου ίδια για όλα τα δείγματα ανεξαρτήτου αραιώσης φορτίου ή μη στον αμπελώνα και προσθήκης στελεχών ζυμών *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* ή μόνο *S. cerevisiae*.



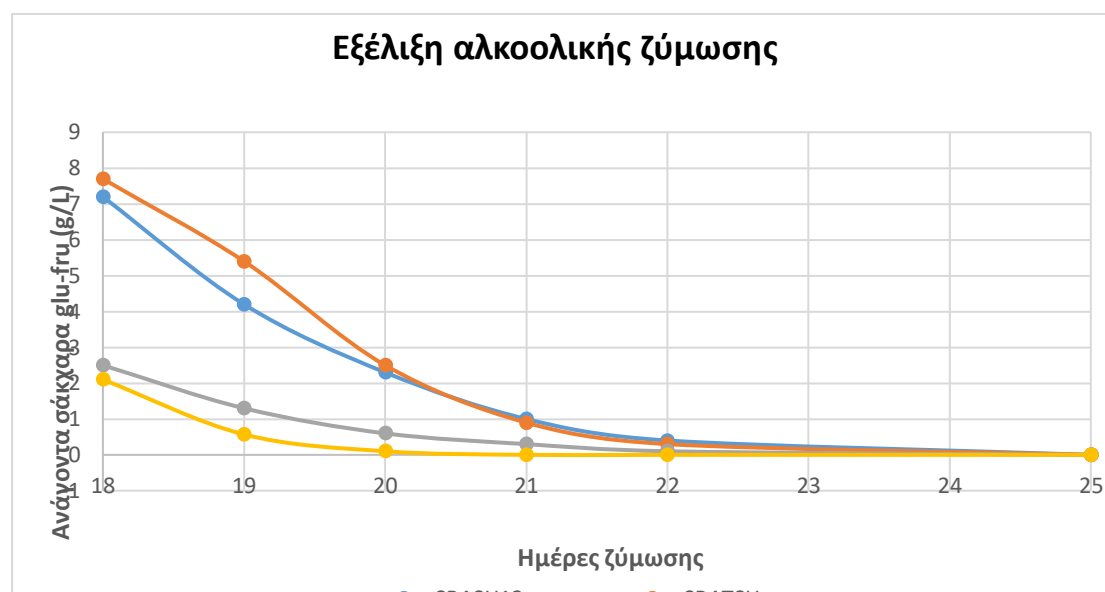
**Σχήμα 5.** Παρακολούθηση αλκοολικής ζύμωσης χρησιμοποιώντας διαθλασίμετρο στους 4 παραγόμενους οίνους ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά).

Μετά το πέρας της 15<sup>ης</sup> μέρας της ζύμωσης και μέχρι την ολοκλήρωσή της, η καθημερινή μέτρηση των αναγόντων σακχάρων πραγματοποιούνταν με ενζυμική ανάλυση γλυκόζης / φρουκτόζης στον αναλυτή του εργαστηρίου καθώς η διαθλασιμετρία δεν μπορεί να δώσει την μεταβολή των σακχάρων με ακρίβεια στο τελικό στάδιο της ζύμωσης (σχήμα 6).

Η αλκοολική ζύμωση μέχρι το τελικό της στάδιο πραγματοποιήθηκε ομαλά και σε παρόμοιες πορείες τόσο για τα «αραιωμένα» όσο και για «κανονικά». Μετά την 15<sup>η</sup> μέρα παρατηρούμε στα «αραιωμένα» που έχουν εμβολιαστεί με *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* ή μόνο με *S. cerevisiae* καθυστέρηση της αλκοολικής ζύμωσης σε σχέση με τα «κανονικά» ωστόσο η διαφορά αυτή καλύφθηκε μέχρι το τέλος της ζύμωσης και οι ζυμώσεις και για τις τέσσερις περιπτώσεις τελείωσαν ταυτόχρονα την 25<sup>η</sup> ημέρα. Όπως αναφέρθηκε, το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης πιστοποιήθηκε με ανάλυση υπολειπόμενων σακχάρων με ενζυμικό αναλυτή. Από την πλήρη κατανάλωση των εξοζών φαίνεται ότι επιτεύχθηκε ο



στόχος της παραγωγής ξηρών οίνων. Στην συνέχεια, στους οίνους έγινε προσθήκη θειώδη ανυδρίτη και μεταφέρθηκαν στον ψυκτικό θάλαμο στους 5°C για τρυγική και πρωτεϊνική σταθεροποίηση.



**Σχήμα 6.** Παρακολούθηση αλκοολικής ζύμωσης με μέτρηση Γλυκόζης/Φρουκτόζης στους παραγόμενους οίνους ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραίωση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά)

### 3.4. Αναλύσεις στον οίνο

Στους σταθεροποιημένους οίνους πραγματοποιήθηκαν οι βασικές αναλύσεις οίνου σύμφωνα με τις επίσημες ή συνήθεις μεθόδους του ΟΙV κι επιπλέον αναλύσεις φαινολικών συστατικών και οξειδωσιμότητας. Ο προσδιορισμός ολικής οξύτητας και ενεργού οξύτητας - pH έγιναν με τα πρωτόκολλα που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 2 (2.2.1). Ακόμα, προσδιορίστηκε ο αλκοολικός τίτλος και η πτητική οξύτητα με ανάλυση FTIR και επιβεβαιώθηκαν με κλασικές μεθόδους. Τέλος, οι αναλύσεις χρώματος και φαινολικών συστατικών περιλάμβαναν απορρόφηση στα 420 nm, Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) και Ολικά φαινολικά με την μέθοδο Folin-Ciocalteu σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mgGAE/L).

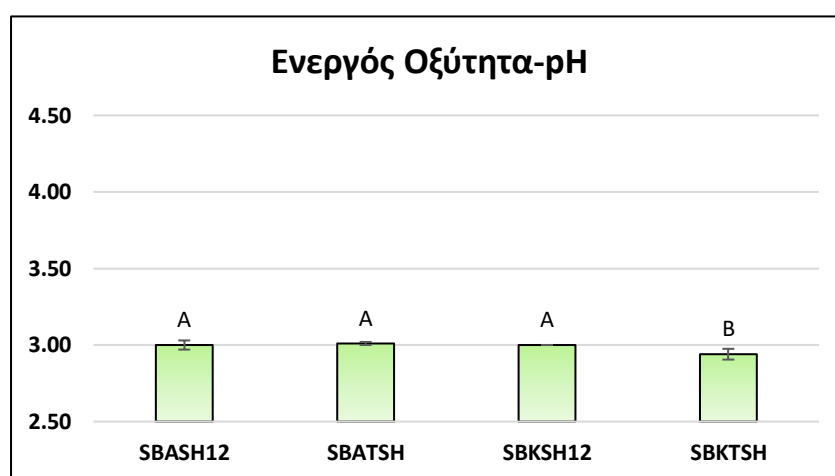
Όλες οι μεταβλητές, απεικονίζονται σε διαγράμματα με μπάρες οι οποίες αποτελούν τον μέσο όρο των βιολογικών επαναλήψεων ενώ φαίνεται και η τυπική απόκλιση. Για την δημιουργία των πινάκων και των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το Microsoft Excel. Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό JMP-11. Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων (τιμή επιπέδου σημαντικότητας  $p < 0,05$  ή όριο εμπιστοσύνης 95%) αξιολογήθηκαν μέσω της εφαρμογής της ανάλυσης διακύμανσης με έναν παράγοντα (OneWay ANOVA) με χρήση του Tukey HSD τεστ για την σύγκριση των μέσων και για τον εντοπισμό των συγκεκριμένων ζευγών που εμφανίζουν στατιστικές διαφορές. Στα γραφήματα τα στατιστικά όμοια ζεύγη έχουν επισημανθεί με

ίδια γράμματα ενώ τα ζεύγη με στατιστικά σημαντική διαφορά (σε επίπεδο 0.05%) με διαφορετικούς χαρακτήρες (A, B, C, κ.ο.κ.).

### 3.4.1. Ενεργός Οξύτητα – pH

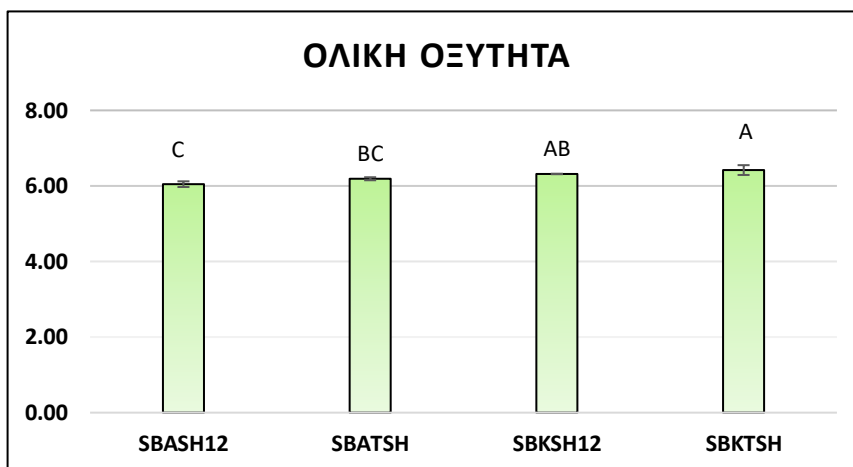
Ως ενεργός οξύτητα ορίζεται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων σε διάσταση στον οίνο που δίνουν κατιόντα υδρογόνου ( $H^+$ ) και είναι ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των κατιόντων υδροξωνίου στο διάλυμα ( $pH = -\log[H^+]$ ).

Όσον αφορά την ενεργό οξύτητα (pH), στο σχήμα 7 φαίνεται ότι, τόσο για τους οίνους που προέρχονται από πρέμνα που έχουν δεχθεί αραίωση φορτίου («αραιωμένα») και εμβολιάστηκαν με στέλεχος ζύμωσης *Saccharomyces cerevisiae* (SBASH12) ή που εμβολιάστηκαν με *Torulasporea delbrueckii* και *S. cerevisiae* (SBATSH), όσο και για τους οίνους που προέρχονται από πρέμνα που δεν έχουν δεχθεί αραίωση φορτίου («κανονικά») και εμβολιάστηκαν με στέλεχος ζύμωσης *S. cerevisiae* (SBKSH12) ή με *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* (SBKTSH), τα αποτελέσματα τους δεν εμφανίζουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Ωστόσο, οι τιμές pH και για τα τέσσερα δείγματα είναι εντός ορίων των ενδεικτικών τιμών για λευκούς οίνους με εύρος τιμών 2,94-3,01. Γεγονός που δεν επαληθεύει αντίστοιχες έρευνες που υποστηρίζουν ότι η αραίωση φορτίου στο πρέμνο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του pH στο εσωτερικό της ράγας και κατ' επέκταση στον οίνο (Wolpert, 1983; Reynolds, 1989a; Morando, 1991; Zironi, 1993).



**Σχήμα 7.** Μεταβολή της ενεργού οξύτητας (pH) στους 4 παραγόμενους οίνους ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραίωση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά)

### 3.4.2. Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα

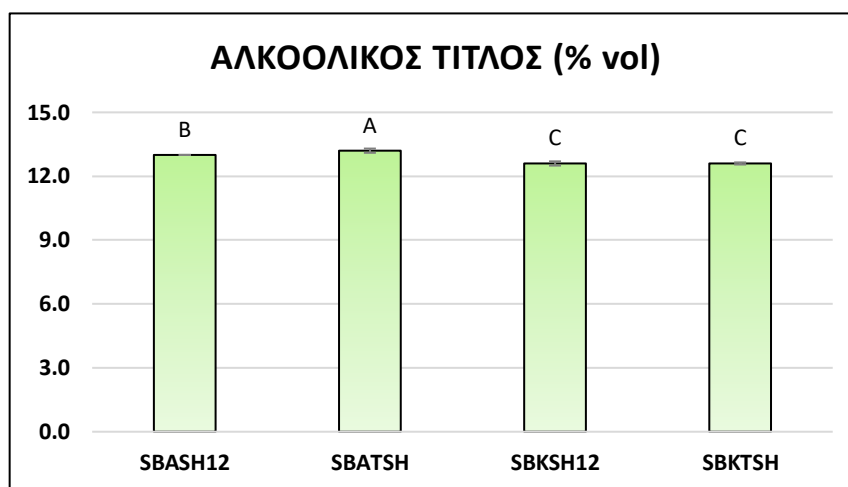


**Σχήμα 8.** Μεταβολή της ολικής οξύτητας στους 4 παραγόμενους οίνους που προήλθαν από αραιωμένα και κανονικά πρέμνα ποικιλίας *Sauvignon blanc* και εμβολιάστηκαν με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* ή με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces*

Ως Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα ορίζεται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων, είτε σε μοριακή κατάσταση είτε σε μορφή ανιόντων, που βρίσκονται στο γλεύκος και τον οίνο και που προσδιορίζονται μετά από εξουδετέρωσή τους με αλκαλικό διάλυμα  $\text{NaOH}$  0,1 N μέχρι το pH 7 σαν ισοδύναμα τρυγικού οξέος.

Όπως προκύπτει από το σχήμα 8, η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα εκφρασμένη σε γρυγικού οξέος/L είναι ελαφρώς μικρότερη στα «αραιωμένα» (SBASH12, SBATSH) απ' ό τι στα «κανονικά» (SBKSH12, SBKTSH). Οι τιμές της είναι ενδεικτικές τυπικής οξύτητας για λευκούς οίνους (6,05-6,42). Σε ότι αφορά τις επεμβάσεις, αυτές διαφοροποιούνται περισσότερο ως προς την επέμβαση του αραιώματος δίνοντας χαμηλότερες τιμές, γεγονός που επαληθεύεται με αντίστοιχες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η αραιώση φορτίου σε πρέμνα μείωσε την συγκέντρωση των οξέων στο εσωτερικό της ράγας (Wolpert, 1983; Reynolds, 1989a; Morando, 1991; Zironi, 1993). Βέβαια, διαφορές υπάρχουν και ως προς το πρωτόκολλο οινοποίησης με τάση αύξησης στα δείγματα που ζύμωσαν με *non-Sach* ζύμες αλλά δεν προκύπτουν ασφαλή συμπεράσματα.

### 3.4.3. Αλκοολικός Τίτλος



**Σχήμα 9.** Αλκοολικός τίτλος των 4 παραγόμενων οίνων ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραίωση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά)

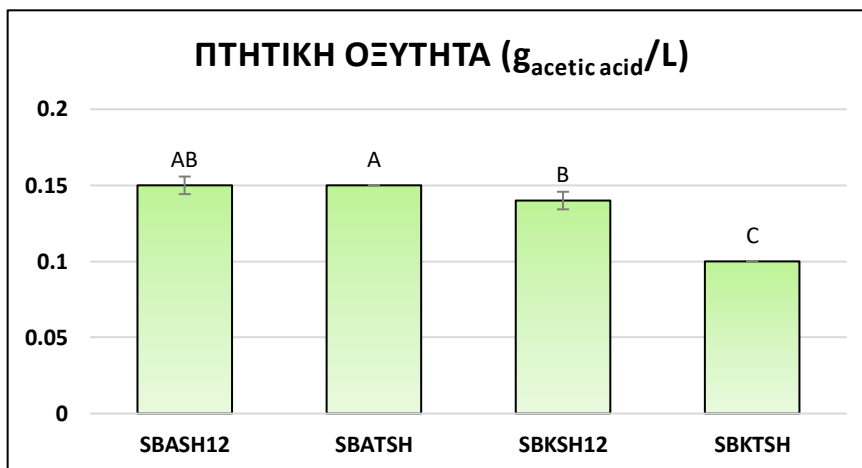
Ως αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο ορίζεται ο αριθμός των λίτρων άνυδρης αιθανόλης που περιέχονται σε 100 λίτρα οίνου σε θερμοκρασία 20°C και η μονάδα μέτρησής του είναι %vol. Ο αλκοολικός τίτλος τόσο στον οίνο που προέρχεται από πρέμνα που έχουν δεχθεί αραίωση («αραιωμένα») μετά τον περκασμό και έχουν συνεμβολιαστεί με *T. delbruecki* και *S. cerevisiae* ή μόνο με *S. cerevisiae* όσο στον οίνο που προέρχεται από πρέμνα που δεν έχουν δεχθεί αραίωση («κανονικά») και είναι εμβολιασμένα με *T. delbruecki* και *S. cerevisiae* ή με *S. cerevisiae*, είναι σε μάλλον αυξημένα επίπεδα για λευκούς οίνους, με εύρος τιμών 12,9-13,2 (σχήμα 9). Λαμβάνοντας υπόψη τις επεμβάσεις, ο αλκοολικός τίτλος στα «αραιωμένα» (SBASH12, SBATSH) φαίνεται να έχει αυξητική τάση σε σχέση με τα «κανονικά» (SBKSH12, SBKTSH), και με στατιστικά σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματά τους, που συνάδει με την ελαφρά μεγαλύτερη σακχαροπεριεκτικότητα του γλεύκους των αραιωμένων σταφυλιών. Όσο αφορά το στέλεχος ζύμωσης που έχουν εμβολιαστεί, δεν υπάρχει σαφής τάση αν το στέλεχος επηρεάζει την περιεκτικότητα σε αλκοόλη.

### 3.4.4. Πτητική Οξύτητα

Ως πτητική οξύτητα ορίζεται το σύνολο των οξέων της σειράς του οξικού οξέος που υπάρχουν στους οίνους ελεύθερα ή με την μορφή αλάτων. Με βάση τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης ανώτατο όριο στους λευκούς οίνους είναι 1,08 γραμμικού οξέος/L.

Η πτητική οξύτητα, όπως φαίνεται από τα δεδομένα του σχήματος 10, διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα αποδεικνύοντας υγιή αλκοολική ζύμωση με εύρος τιμών 0,1-0,15 g/L. Δεν παρουσιάζονται μεγάλες διαφορές ανάμεσα στους οίνους που προέκυψαν από «αραιωμένα» (SBASH12, SBATSH) και «κανονικά» (SBKSH12, SBKTSH) σταφύλια, αλλά και οι μικρές διαφορές που εμφανίζονται κυμαίνονται σε επίπεδα υγιούς παρουσίας των οξέων μικρής αλυσίδας άνθρακα στον οίνο. Ωστόσο, φαίνεται ότι τα «κανονικά» έχουν ελαφρώς μικρότερη πτητική οξύτητα ιδίως εκείνα που συνεμβολιάστηκαν με *S. cerevisiae* και *T.*

*delbrueckii* (SBKTSH) συγκριτικά με εκείνα που εμβολιάστηκαν μόνο με *S. cerevisiae*, αποτέλεσμα που μπορούν να επιβεβαιώσουν αντίστοιχες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και έχουν συμπεράνει ότι η συν-καλλιέργεια *T. delbrueckii* με *S. cerevisiae* παράγει οίνους με χαμηλή πτητική οξύτητα, υψηλότερες τερπενόλες και 2-φαινυλαιθανόλη (Ciani & Maccarelli, 1998; Sadoudi, 2012; Van Breda, 2013).



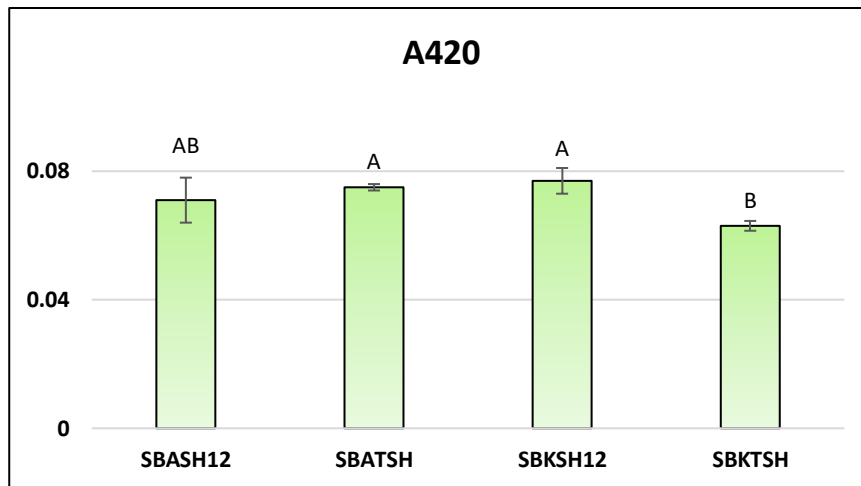
**Σχήμα 10.** Πτητική οξύτητα των 4 παραγόμενων οίνων ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραίωση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά).

### 3.5. Αναλύσεις φαινολικών συστατικών

Στις μετρήσεις φαινολικών συστατικών περιλήφθηκαν οι αναλύσεις χρώματος, ολικών φαινολικών και ο ρυθμός μεταβολής του χρώματος. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων περιγράφονται στα παρακάτω σχήματα.

#### 3.5.1. Απορρόφηση στα 420 nm

Η απορρόφηση στα 420nm είναι η σημαντικότερη στους λευκούς οίνους για την εκτίμηση του χρώματός τους και το βαθμό οξειδωσής τους. Η αύξηση της απορρόφησης στα 420nm είναι ένδειξη οξειδωσής του οίνου, λαμβάνοντας βέβαια υπόψη και άλλες παραμέτρους. Η απορρόφηση όλων των δειγμάτων κυμαίνεται μεταξύ 0,06-0,08, τιμές που θεωρούνται φυσιολογικές για λευκούς φρέσκους οίνους (σχήμα 11).

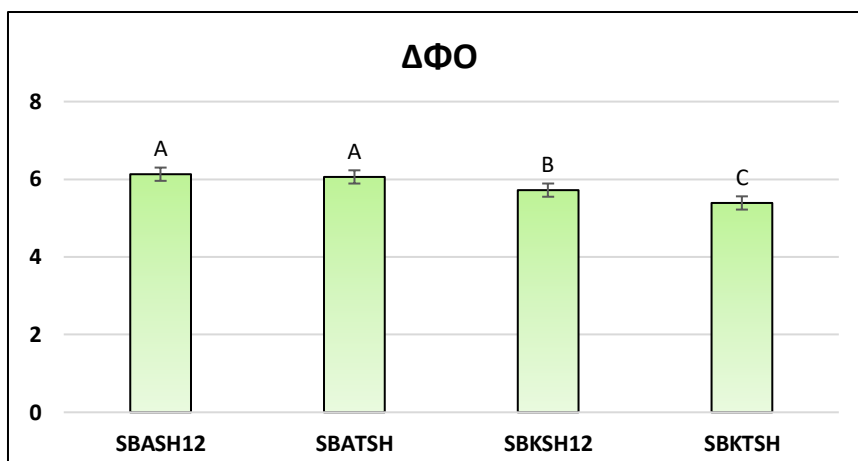


**Σχήμα 11.** Απορρόφηση στα 420 nm στους 4 παραγόμενους οίνους ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά)

Ανάμεσα στα «αραιωμένα» (SBASH12, SBATSH) και τα «κανονικά» (SBKSH12, SBKTSH), δεν παρουσιάζονται στατιστικές διαφορές ως προς την απορρόφηση τους στα 420nm. Ωστόσο φαίνεται ότι τα «αραιωμένα» που εμβολιάστηκαν μόνο με *S. cerevisiae* (SBASH12) έχουν μικρότερη τάση απορρόφησης από εκείνα που συνεμβολιάστηκαν με *S. cerevisiae* και *T. delbrueckii* (SBATSH). Αντίθετα, όσον αφορά τα «κανονικά» φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη τάση απορρόφησης εκείνα που εμβολιάστηκαν με *S. cerevisiae* (SBKSH12) συγκριτικά με εκείνα που συνεμβολιάστηκαν με *S. cerevisiae* και *T. delbrueckii* (SBKTSH).

### 3.5.2 Δείκτης φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ)

Ο δείκτης φαινολικών ουσιών αξιοποιεί την ισχυρή απορρόφηση του βενζολικού δακτυλίου των φαινολικών συστατικών στα 280nm και αποτελεί την απλούστερη, ταχύτερη και πιο επαναλήψιμη μέθοδο εκτίμησης της περιεκτικότητας των φαινολικών στατικών, που περιέχει ένας οίνος στο σύνολό τους, χωρίς δηλαδή να δίνει πληροφορίες για συγκεκριμένη κατηγορία φαινολικών ουσιών. Στην προκειμένη περίπτωση, σύμφωνα με το σχήμα 12, παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «αραιωμένων» και «κανονικών» και μάλιστα τα αραιωμένα έχουν υψηλότερες τιμές ΔΦΟ. Στα «κανονικά», την μικρότερη τιμή ΔΦΟ έχουν οι οίνοι που συνεμβολιάστηκαν με *S. cerevisiae* και *T. delbrueckii* (SBKTSH) ενώ στα «αραιωμένα» την μεγαλύτερη τιμή οι οίνοι που εμβολιάστηκαν μόνο με *S. cerevisiae* (SBASH12).

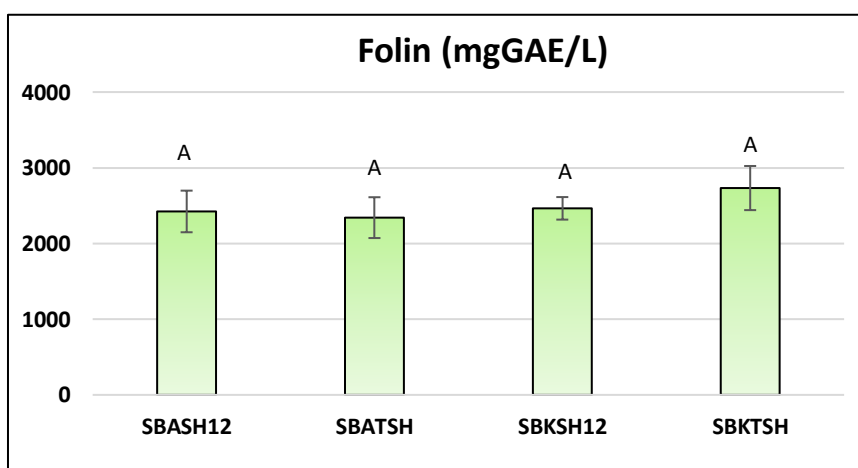


**Σχήμα 12.** Δείκτης φαινολικών ουσιών των 4 παραγόμενων οίνων ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά).

### 3.5.3. Ολικά φαινολικά με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η συγκεκριμένη μέθοδος προσδιορίζει τα φαινολικά συστατικά στο σύνολό τους βασιζόμενη στην ιδιότητά τους να οξειδώνονται από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών.

Οι συγκεντρώσεις του φαινολικού φορτίου των οίνων κυμαίνεται από 2341-2732 mgGAE/L. Από το σχήμα 13 φαίνεται ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους οίνους με τις διάφορες επεμβάσεις. Την υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών παρουσιάζουν οι οίνοι από τα «κανονικά» που έχουν συνεμβολιαστεί με *S. cerevisiae* και *T. delbrueckii* (SBKTSH) και η μικρότερη στο αντίστοιχο των «αραιωμένων» μην δίνοντας κάποιο σαφές μοτίβο.

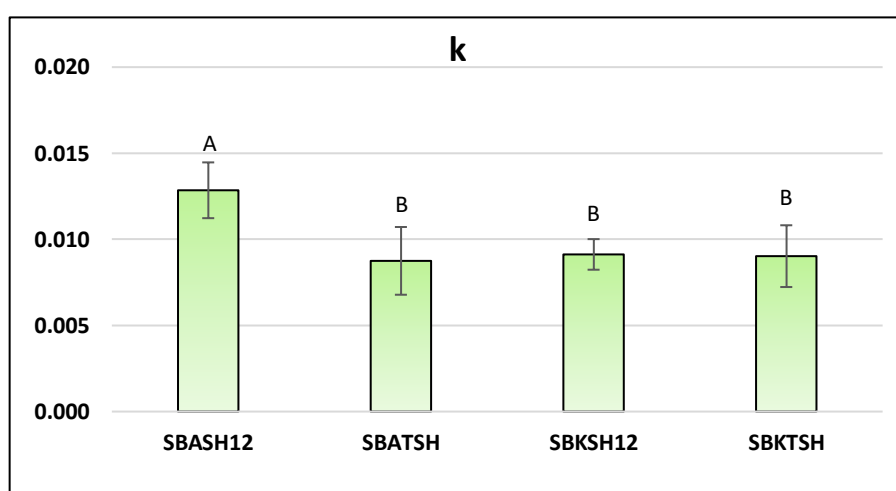


**Σχήμα 13.** Μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών (mg γαλλικού οξέος/ L) με την μέθοδο Folin-Ciocalteu στους 4 παραγόμενους οίνους που προήλθαν από αραιωμένα και κανονικά πρέμνα ποικιλίας *Sauvignon blanc* και εμβολιάστηκαν με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* ή με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces*

### 3.5.4. Οξειδωσιμότητα

Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών των λευκών οίνων έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία πολυμερισμένων ενώσεων με χαρακτηριστικό καφετί χρωματισμό. Η παρουσία των ενώσεων αυτών επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των λευκών οίνων και συμβάλλουν στην ποιοτική τους υποβάθμιση. Όσο αυξάνεται η τιμή  $k$  τόσο αυξάνεται η τάση του οίνου για οξείδωση.

Στο σχήμα 14 παρουσιάζονται οι συντελεστές οξειδωσιμότητας στους οίνους επεμβάσεων. Από τα τέσσερα δείγματα οίνων μεγαλύτερη τάση για οξείδωση παρουσιάζει ο οίνος από τα «αραιωμένα» που εμβολιάστηκε μόνο με *S.cerevisiae* (SBASH12) συγκριτικά με τα υπόλοιπα που η τιμή  $k$  (συντελεστής ρυθμού μεταβολής χρώματος) είναι χαμηλότερη. Βέβαια, γενικά οι συντελεστές οξειδωσιμότητας κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα.



**Σχήμα 14.** Μεταβολή του ρυθμού οξείδωσης των φαινολικών συστατικών στους 4 παραγόμενους οίνους από σταφύλια ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά)

### 3.6. Ανάλυση αρωματικών ενώσεων των πειραματικών οίνων με GC-MS

Στην ενότητα αυτή γίνεται παρουσίαση της ποιοτικής και ποσοτικής μελέτης των ενώσεων αρώματος των πειραματικών οίνων έτσι ώστε να γίνει σύγκριση της επίδρασης των διαφορετικών παραγόντων καλλιέργειας και οινοποίησης στο αρωματικό προφίλ των οίνων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS) και στην συνέχεια ακολούθησε ανίχνευση, ταυτοποίηση και ταξινόμηση των πτητικών ενώσεων στις εξής κατηγορίες: Ανώτερες αλκοόλες, Οξικοί εστέρες, Αιθυλικοί εστέρες, Πτητικά λιπαρά οξέα και Τερπένια.

Όλες οι μεταβλητές, απεικονίζονται με μπάρες οι οποίες αποτελούν τον μέσο όρο των βιολογικών επαναλήψεων ενώ φαίνεται και η τυπική απόκλιση. Για την δημιουργία των πινάκων και των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το Microsoft Excel ενώ για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό JMP-11. Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων (τιμή επιπέδου σημαντικότητας  $p < 0,05$  ή όριο

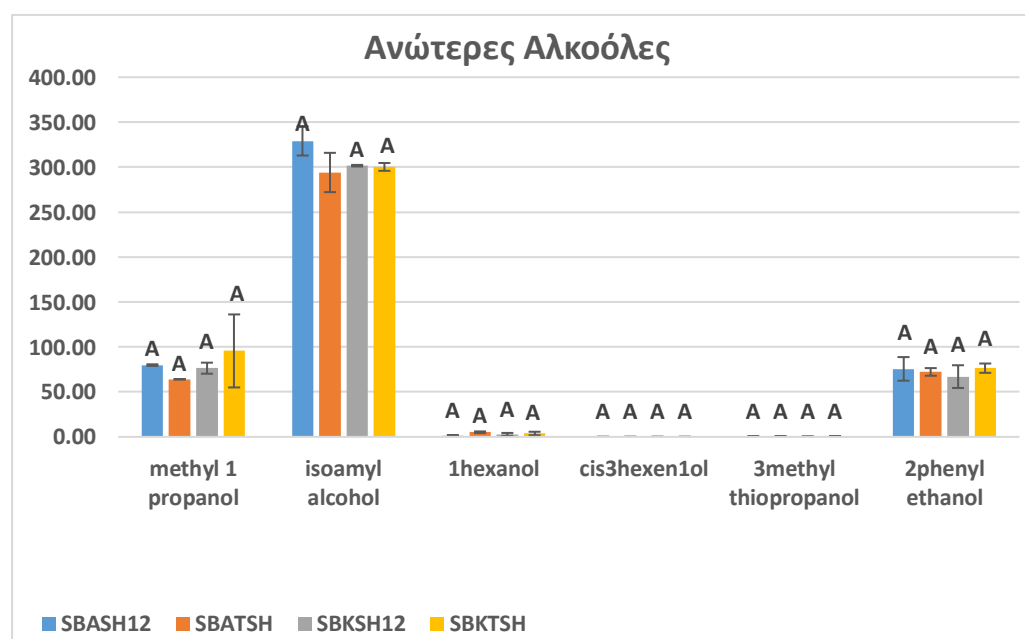


εμπιστοσύνης 95%) αξιολογήθηκαν μέσω της εφαρμογής της ανάλυσης διακύμανσης με έναν παράγοντα (OneWay ANOVA) με χρήση του Tukey HSD τεστ για την σύγκριση των μέσων και για τον εντοπισμό των συγκεκριμένων ζευγών που εμφανίζουν στατιστικές διαφορές. Με A, B, C, κ.ο.κ. χαρακτηρίζεται η στατιστική διαφορά των δειγμάτων (σε επίπεδο 0.05%). Δείγματα με ίδιο γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

### 3.6.1. Ανώτερες αλκοόλες

Οι ανώτερες αλκοόλες με περισσότερους από δύο άνθρακες είναι η σημαντικότερη κατηγορία πτητικών ενώσεων που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση. Η βιοσύνθεση τους γίνεται είτε απευθείας από τα σάκχαρα είτε από τα αμινοξέα των σταφυλιών μέσω της αντίδρασης Ehrlich. Οι ανώτερες αλκοόλες μπορούν να επηρεάσουν το άρωμα του οίνου θετικά αλλά και αρνητικά. Σε γενικές γραμμές, σε μικρές συγκεντρώσεις (<400 mg/L) η παρουσία τους συνδέεται με ευχάριστα αρώματα ανθέων και γλυκών φρούτων αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορεί να προσδώσουν ελαττωματικές ανεπιθύμητες οσμές με καυστικό χαρακτήρα (Maarse, 1991). Όταν η συγκέντρωση των αλκοολών είναι χαμηλή εντείνεται το άρωμα των λουλουδιών, η πολυπλοκότητα του μπουκέτου και αποτελεί ένδειξη ποιοτικής υπεροχής του οίνου (Kallis, 2019).

Στους πειραματικούς οίνους ανιχνεύτηκαν *methyl-1-propanol*, *isoamyl alcohol*, *1-hexanol*, *cis-3-hexen1ol*, *3-methyl-thiopropanol*, *2-phenyl-ethanol*. Όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα, η *isoamyl alcohol* ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση απ' όλες τις υπόλοιπες αλκοόλες. Ακόμα, ακολουθούν οι αρωματικές ενώσεις *methyl-1-propanol* και *2-phenyl-ethanol* οι οποίες ανιχνεύτηκαν σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα οίνου ωστόσο σε εμφανώς χαμηλότερη συγκέντρωση ανιχνεύτηκαν οι ενώσεις *1-hexanol*, *cis-3 hexen1ol* και *3-methyl-thiopropanol* σε όλα τα δείγματα.



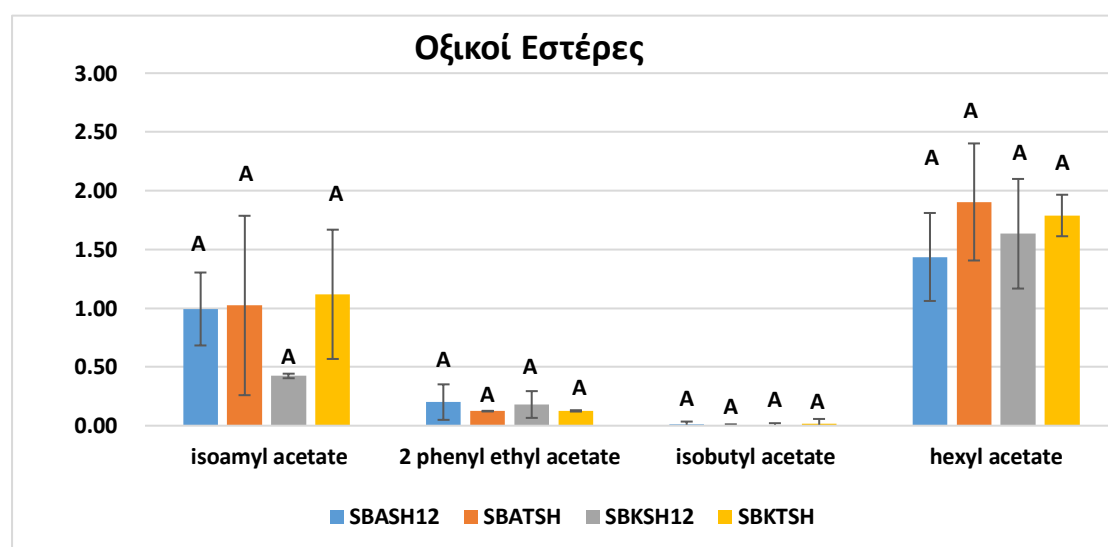
**Σχήμα 15.** Συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών στους 4 παραγόμενους οίνους ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά).

Πιο αναλυτικά, όπως παρατηρούμε σε όλα τα δείγματα οίνου (σχήμα 15) υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της αρωματικής ένωσης *isoamyl alcohol* και πιο συγκεκριμένα αυξητική τάση φαίνεται να έχει το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα “αραιωμένα” και έχει εμβολιαστεί με καθαρή καλλιέργεια *S.Cerevisiae*. Όσον αφορά την συγκέντρωση των ενώσεων *methyl-1-propanol* και *2-phenyl ethanol* παρατηρούμε ότι είναι υψηλότερη στο δείγμα οίνου που προέρχεται από τα “κανονικά” πρέμνα, δηλαδή εκείνα που δεν έχουν δεχθεί αραιώση φορτίου στο στάδιο του περκασμού και έχει εμβολιαστεί με συν-καλλιέργεια *S.Cerevisiae* και *T.delbrueckii* ενώ ελαφρώς μειούμενη τάση ως προς την συγκέντρωσή του παρατηρείται στο δείγμα από τα “αραιωμένα” που έχει εμβολιαστεί με με συν-καλλιέργεια *S.Cerevisiae* και *T. delbrueckii*. Οι υπόλοιπες αλκοόλες *1-hexanol*, *cis-3-hexen1ol*, *3-methyl thiopropanol* ακολουθούν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις που όμως δεν αποκλείει την συμβολή τους στο άρωμα του οίνου λόγω του μικρού ορίου ανίχνευσης που έχουν κάποιες από αυτές.

### 3.6.2 Εστέρες

Οι εστέρες είναι άλλη μια κατηγορία αρωματικών ενώσεων που παράγονται κατά τον μεταβολισμό της αλκοολικής ζύμωσης και συμβάλλουν στις φρουτώδες νότες του οίνου. Οι κύριοι εστέρες μπορούν να χωριστούν σε α) οξικούς εστέρες και β) αιθυλικούς εστέρες.

Όσον αφορά τους οξικούς εστέρες, στους πειραματικούς οίνους ανιχνεύτηκαν *isoamyl acetate*, *2-phenylethyl acetate*, *isobutyl acetate* και *hexyl acetate*.

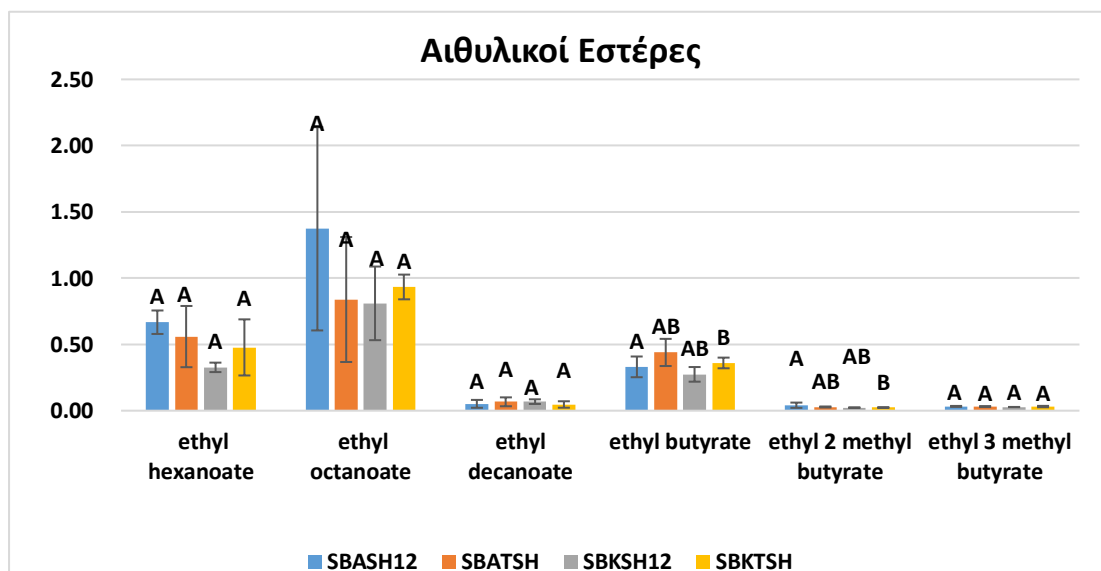


**Σχήμα 16.** Συγκέντρωση οξικών εστέρων στους 4 παραγόμενους οίνους ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά).

Όπως παρατηρούμε στο σχήμα 16, σε υψηλότερη συγκέντρωση εμφανίζονται οι αρωματικές ενώσεις *isoamyl acetate* και *hexyl acetate* σε όλα τα δείγματα οίνου. Πιο συγκεκριμένα το δείγμα οίνου από τα “κανονικά” που έχει εμβολιαστεί με συν-καλλιέργεια *S.cerevisiae* και *T.delbrueckii* (SBKTSH) φαίνεται πως έχει μειούμενη τάση ως προς την ένωση *isoamyl acetate* συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα τα οποία παρουσιάζουν

παρόμοιες συγκεντρώσεις χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Ακόμα, παρατηρούνται διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων και ως προς τον οξικό εστέρα *hexyl acetate* καθώς το δείγμα SBATSH που έχει υποστεί αραίωση φορτίου και έχει εμβολιαστεί με συν-καλλιέργεια *S.cerevisiae* και *T. delbrueckii* έχει αυξανόμενη τάση ως προς την συγκέντρωση του σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Από την άλλη, οι ενώσεις *2-phenylethyl acetate* και *isobutyl acetate* εμφανίζονται σε χαμηλή συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα οίνου. Ειδικότερα, η συγκέντρωση της ένωσης *isobutyl acetate* τείνει σε μηδενικές τιμές.

Οι αιθυλικοί εστέρες που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα των πειραματικών οίνων είναι *ethyl hexanoate*, *ethyl octanoate*, *ethyl decanoate*, *ethyl butyrate*, *ethyl-2-methyl butyrate* και *ethyl-3-methyl butyrate*. Όπως φαίνεται στο σχήμα 17, οι αρωματικές ενώσεις *ethyl hexanoate*, *ethyl octanoate* και *ethyl butyrate* βρέθηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα ενώ σε μικρότερη συγκέντρωση βρέθηκαν οι ενώσεις *ethyl decanoate*, *ethyl-2-methyl butyrate* και *ethyl-3-methyl butyrate*.



**Σχήμα 17.** Συγκέντρωση αιθυλικών εστέρων στους 4 παραγόμενους οίνους ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραίωση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά).

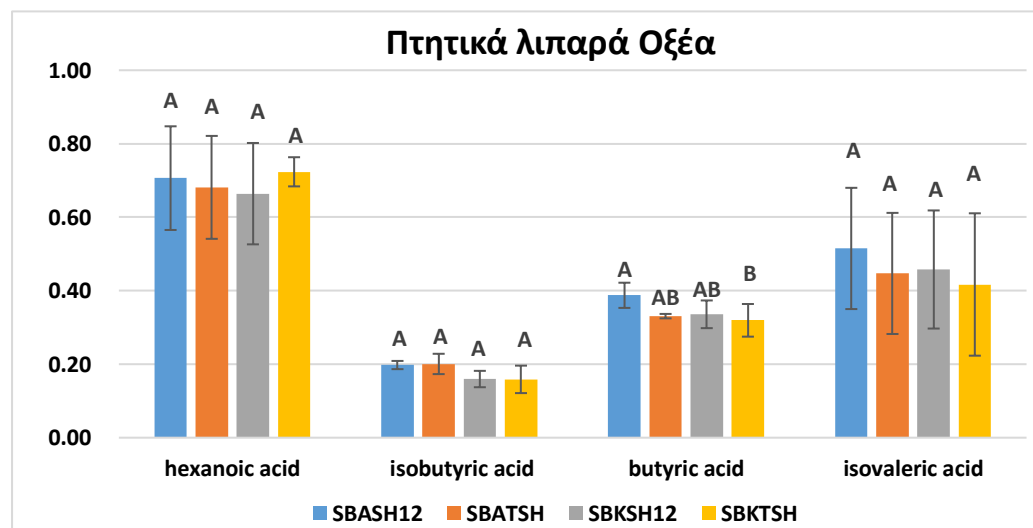
Αναλυτικότερα, οι αιθυλικοί εστέρες *ethyl hexanoate* και *ethyl butyrate* παρουσιάζονται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις σε όλα τα δείγματα οίνου. Ωστόσο παρατηρείται ότι το δείγμα οίνου SBKSH12 που προέρχεται από τα “κανονικά” πρέμνα, δηλαδή εκείνα που δεν έχουν δεχθεί αραίωση φορτίου στο στάδιο του περκασμού και έχει εμβολιαστεί με στέλεχος ζυμομύκητα *S. cerevisiae* έχει τάση για χαμηλότερη συγκέντρωση και στις δύο ενώσεις. Η ένωση *ethyl octanoate* παρουσιάζεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκριτικά με τους υπόλοιπους εστέρες σε όλα τα δείγματα, με την υψηλότερη συγκέντρωση να εμφανίζεται στο δείγμα SBASH12 το οποίο προέρχεται από τα “αραιωμένα” πρέμνα που έχει εμβολιαστεί με στέλεχος ζυμομύκητα *S. cerevisiae*. Απ’ την άλλη, σε χαμηλές συγκεντρώσεις συναντώνται οι ενώσεις *ethyl decanoate*, *ethyl-2-methyl butyrate* και *ethyl-3-methyl butyrate* σε όλα τα δείγματα οίνου. Παρ’ όλο που οι ενώσεις *ethyl-2-methyl butyrate* και

*ethyl-3-methyl butyrate* συναντώνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στους οίνους, συμβάλλουν στο άρωμα τους καθώς έχουν χαμηλό κατώφλι αντίληψης (Jeromei, 2019).

### 3.6.3 Πτητικά λιπαρά οξέα

Τα πτητικά λιπαρά οξέα που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση από τους ζυμομύκητες διαμορφώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου ιδίως την οξύτητα και το άρωμά του. Το οξικό οξύ (*acetic acid*) αποτελεί το σημαντικότερο πτητικό οξύ στους οίνους. Το οξύ αυτό διαμορφώνει κατά 90% την πτητική οξύτητα του οίνου και σε μεγάλες συγκεντρώσεις (> 0,8 g/L) συνδέεται με ελαττώματα στον οίνο καθώς προσδίδει οσμή ξυδιού και συνδέεται με προσβολές από οξικά ή γαλακτικά βακτήρια. Σε μικρές συγκεντρώσεις προσδίδει πολυπλοκότητα στο άρωμα και την γεύση του οίνου. Στα οξέα μεσαίας ανθρακικής αλυσίδας ανήκουν τα *butyric*, *hexanoic*, *octanoic*, *decanoic*, *isobutyric* και *isovaleric acid* καθώς και *2-methyl propanoic*, *2-methyl butanoic* και *3-methyl butanoic acid* (Pretorius, 2016; Swiegers, 2005). Η συγκέντρωση και η αναλογία των οξέων αυτών που απελευθερώνονται στο μέσο της ζύμωσης εξαρτάται από το στέλεχος του ζυμομύκητα, τις σύνθεση του μέσου και τις συνθήκες ζύμωσης. Τα συγκεκριμένα οξέα έχουν συνδεθεί με αρώματα όπως ταγγισμένο βούτυρο, τυρί και καυστικές-πικάντικες οσμές, καθιστώντας τα ανεπιθύμητα στον οίνο σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Pretorius, 2016; Ruiz, 2019). Σύμφωνα με τους Escribano et al (2018) και Ruiz et al., (2019) μια στρατηγική για την μείωση της συγκέντρωσης πτητικών οξέων στον οίνο είναι ο συνεμβολιασμός του γλεύκου με *non-Saccharomyces* στελέχη ζυμομυκήτων *D. hansenii*, *C. zeylanoides*, *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*, and *Z. bailii*.

Στους πειραματικούς οίνους (σχήμα 18) ανιχνεύτηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις *hexanoic*, *isobutyric*, *butyric* και *isovaleric acid*.



**Σχήμα 18.** Συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων στους 4 παραγόμενους οίνους ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά).

Όπως διακρίνεται από το διάγραμμα, σε όλα τα δείγματα η συγκέντρωση της ένωσης *hexanoic acid* ήταν υψηλότερη συγκριτικά με υπόλοιπα πτητικά οξέα που ανιχνεύτηκαν

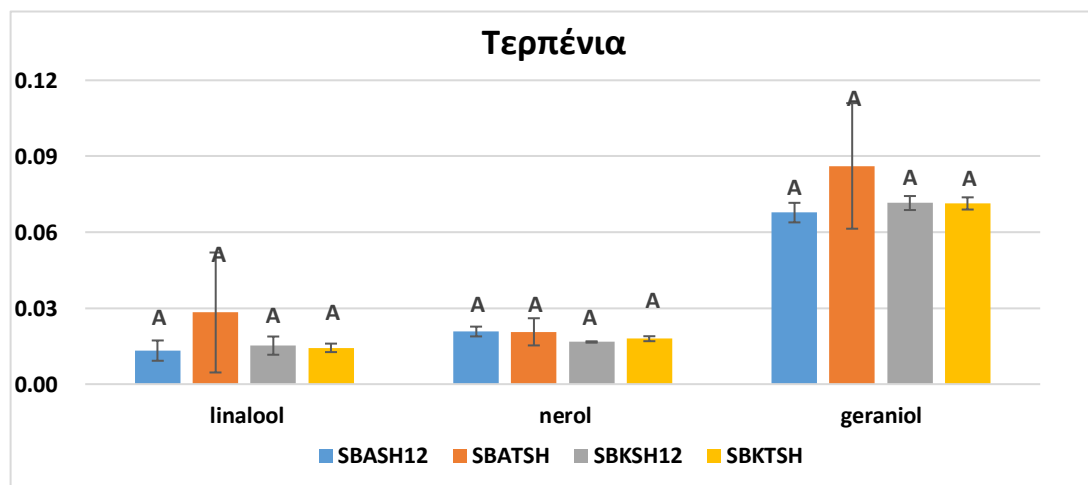
στους οίνους ενώ ακολουθούν τα πτητικά οξέα *butyric* και *isovaleric acid*. Στην μικρότερη συγκέντρωση ανιχνεύτηκε η ένωση *isobutyric acid* για όλα τα δείγματα.

### 3.6.4 Τερπένια

Όσον αφορά τα τερπένια, αν και περιέχονται σε μικρές συγκεντρώσεις στο κρασί, ωστόσο έχουν μεγάλη συμβολή στον αρωματικό προφίλ του και προσδίδουν κυρίως αρώματα ανθέων. Η σημαντικότερη κατηγορία τερπενίων στο κρασί είναι τα μονοτερπένια όπως *linalool* (αρώματα ανθέων και ιδίως άνθη εσπεριδοειδών), *geraniol* (τριαντάφυλλο, γεράνι), *citronellol* (πράσινο κίτρο), *nerol* (τριαντάφυλλο, άνθη κίτρου) και *α-terpineol* (άνθη, οσμή ξύλου).

Η *linalool* και η *citronellol* έχουν το χαμηλότερο κατώφλι αντίληψης 15 και 18 µg/L αντίστοιχα, ενώ η *α-terpineol* και η *nerol* έχουν υψηλότερο 400 µg/L και η *geraniol* έχει ενδιάμεσο κατώφλι αντίληψης 130 µg/L. Η *linalool*, η *citronellol* και η *geraniol* εντοπίζονται σε υψηλή συγκέντρωση στην ποικιλία Μοσχάτο προσδίδοντας ανθικό και φρουτώδη χαρακτήρα στους παραγόμενους οίνους (Ruiz, 2019). Η συγκέντρωσή τους στα σταφύλια επηρεάζεται από τις καλλιεργητικές τεχνικές, το βαθμό ωρίμανσης και τις εδαφικές συνθήκες (Τερρου, 2020). Έχει παρατηρηθεί ότι οι χαρακτηριστικές ουσίες *linalool*, *citronellol* και *geraniol* ελαττώνονται όσο αυξάνεται ο χρόνος ωρίμανσης (Jachson, 2008).

Όσον αφορά το διεξαγόμενο πείραμα, στους παραγόμενους οίνους εντοπίστηκαν *geraniol*, *linalool* και *nerol*. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 19 η συγκέντρωση της *geraniol* είναι εμφανώς μεγαλύτερη σε όλα τα δείγματα οίνων συγκριτικά με τις ενώσεις *linalool* και *nerol* γεγονός που δεν επιβεβαιώνεται στατιστικά.



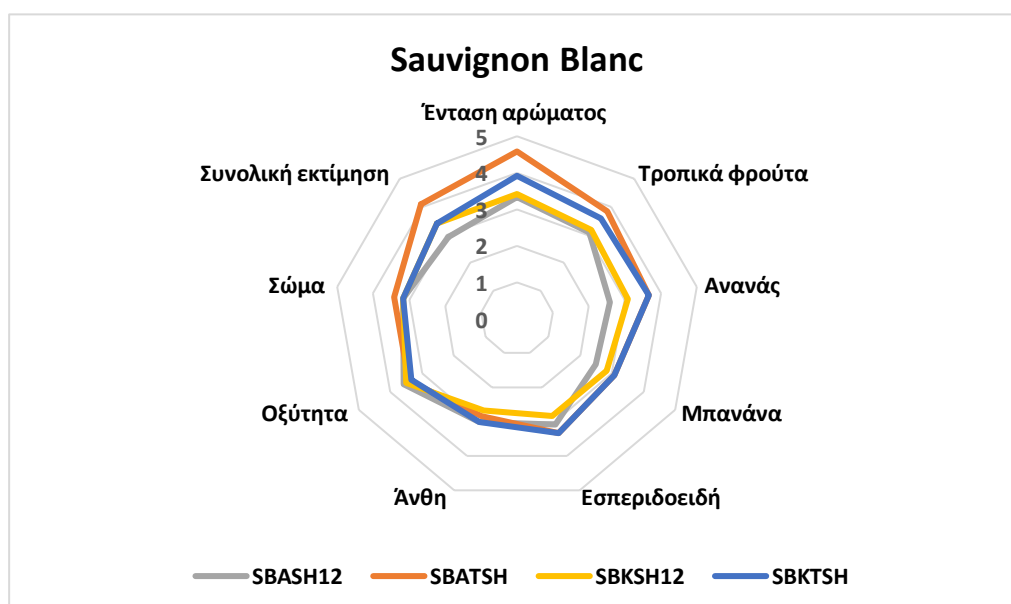
**Σχήμα 19.** Συγκέντρωση τερπενίων στους 4 παραγόμενους οίνους ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραίωση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά).

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά την *linalool* και την *nerol*, φαίνεται πως σε όλα τα δείγματα οίνου οι συγκεντρώσεις τους είναι χαμηλές και δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ανεξαρτήτως αν προέρχονται από πρέμνα που έχουν δεχθεί αραίωση φορτίου ή μη στο στάδιο του περκασμού και αν έχει πραγματοποιηθεί αλκοολική ζύμωση με καθαρή

καλλιέργεια *S.cerevisiae* ή μικτή *S.cerevisiae* και *T. delbrueckii*. Όσον αφορά την *geraniol* η συγκέντρωση της στα δείγματα έχει αυξητική τάση και πιο συγκεκριμένα φαίνεται πως το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα “αραιωμένα” και έχει εμβολιαστεί με συν-καλλιέργεια *S.cerevisiae* και *T.delbrueckii* (SBATSH) έχει σε μεγαλύτερη συγκέντρωση την ένωση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Έτσι, αναμένεται το δείγμα αυτό (SBATSH) να έχει πιο έντονο το ανθικό και φρουτώδες αρωματικό χαρακτήρα.

### 3.6. Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η αξιολόγηση των 4 πειραματικών οίνων πραγματοποιήθηκε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών από πάνελ εξειδικευμένων και έμπειρων δοκιμαστών 12 ατόμων οι οποίοι κλήθηκαν να βαθμολογήσουν με κλίμακα 1-5 τους οίνους ως προς την αρωματική τους ένταση και το είδος του αρώματος (τροπικά φρούτα, ανανά, μπανάνα, εσπεριδοειδή και άνθη), την οξύτητα και το σώμα τους. Τα αποτελέσματα της γευσιγνωσίας αναλύθηκαν στατιστικά και προέκυψαν σημαντικές στατιστικές διαφορές.



Σχήμα 20. Αποτελέσματα οργανοληπτικής δοκιμής των 4 παραγόμενων οίνων ποικιλίας Sauvignon blanc

Όπως προκύπτει από το ιστόγραμμα το δείγμα οίνου που προέρχεται από πρέμνα που έχουν δεχθεί αραίωση φορτίου και έχει εμβολιαστεί με *S.cerevisiae* και *T.delbrueckii* (SBATSH) έχει την μεγαλύτερη ένταση αρώματος και ακολουθεί το δείγμα οίνου που προέρχεται από πρέμνα που δεν έχουν δεχθεί αραίωση φορτίου και έχει εμβολιαστεί με *S.cerevisiae* (SBKTSH). Και στις δύο περιπτώσεις φαίνεται πως τα δείγματα που έχουν συνεμβολιαστεί με *Saccharomyces* και *non-Saccharomyces* (*S.cerevisiae* και *T.delbrueckii*) ζυμομύκητες έχουν μεγαλύτερη ένταση αρώματος από εκείνα που έχουν εμβολιαστεί μόνο με *Saccharomyces* (*S.cerevisiae*). Ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και για τα αρώματα των τροπικών φρούτων και του ανανά καθώς το δείγμα οίνου SBATSH και SBKTSH παρουσιάζουν αυξημένη ένταση αρώματος τροπικών φρούτων και ανανά συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα SBASH12 και SBKSH12.

Πιο έντονο άρωμα τροπικών φρούτων και ανανά διαπιστώθηκε στο SBATSH και μετέπειτα στο SBKTSH χωρίς ωστόσο σημαντική στατιστική διαφορά. Όπως προκύπτει, την χαμηλότερη τιμή στην ένταση του αρώματος και των οσμών τροπικών φρούτων και ανανά έλαβε το δείγμα οίνου SBASH12 που έχει δεχθεί αραίωση φορτίου στο πρέμνο και έχει εμβολιαστεί με *S.cerevisiae* ζυμομύκητα κατά την αλκοολική ζύμωση. Όσον αφορά το άρωμα μπανάνας, τα δείγματα SBATSH και SBKTSH παρουσιάζουν πιο έντονα την οσμή αυτή όπως και το δείγμα οίνου SBKTSH με μικρή στατιστική διαφορά ενώ λιγότερο έντονο είναι το άρωμα μπανάνας στο δείγμα SBASH12. Για το άρωμα των εσπεριδοειδών, και τα τέσσερα δείγματα (SBKTSH, SBKSH12, SBATSH, SBASH12) αξιολογήθηκαν με παρόμοια ένταση χωρίς σημαντικές στατιστικές διαφορές.

Ανεξαρτήτως αν τα δείγματα προέρχονται από πρέμνα που έχουν δεχθεί αραίωση φορτίου ή όχι, και αν έχουν εμβολιαστεί με *S.cerevisiae* και *T.delbrueckii* ή μόνο *S.cerevisiae*, δεν παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις ως προς το άρωμα των ανθέων, την οξύτητα και το σώμα. Σε γενικές γραμμές από το πάνελ των δοκιμαστών φαίνεται ότι προτιμήθηκε το δείγμα **SBATSH** στο οποίο υπήρξε εμβολιασμός με μεικτή καλλιέργεια *S.cerevisiae* και *T.delbrueckii* και είχε εφαρμοστεί στο πρέμνο η καλλιεργητική τεχνική της αραίωσης φορτίου πριν τον περκασμό. Στην δεύτερη θέση προτίμησης είναι τα δείγματα **SBKTSH** και **SBKSH12** τα οποία έχουν ως κοινό παρονομαστή την μη αραίωση φορτίου στον αμπελώνα και διαφοροποιούνται ως προς τον εμβολιασμό τους κατά την αλκοολική ζύμωση καθώς το πρώτο έχει εμβολιαστεί με *Saccharomyces* και το δεύτερο με *Saccharomyces* και *non-Saccharomyces* ζυμομύκητες. Στον αντίποδα το δείγμα οίνου που προτιμήθηκε λιγότερο από το πάνελ ήταν το **SBASH12** το οποίο έχει εμβολιαστεί με *S. cerevisiae* και έχει δεχθεί αραίωση φορτίου μετά τον περκασμό στον αμπελώνα.

### 3.7 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

#### 3.7.1. PCA αναλύσεων και πτητικών ενώσεων

Για την συνολική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των εργαστηριακών αναλύσεων και πτητικών ενώσεων έγινε πολυπαραγοντική ανάλυση με ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). Μέσα από μαθηματικές εξισώσεις, οι μεταβλητές που μελετήθηκαν διαμόρφωσαν τις δύο κύριες συνιστώσες-άξονες σύμφωνα με τον **πίνακα 6**. Ο άξονας 1 απαρτίζεται από το 52,5% της πληροφορίας ενώ ο άξονας 2 από το 30,7%.

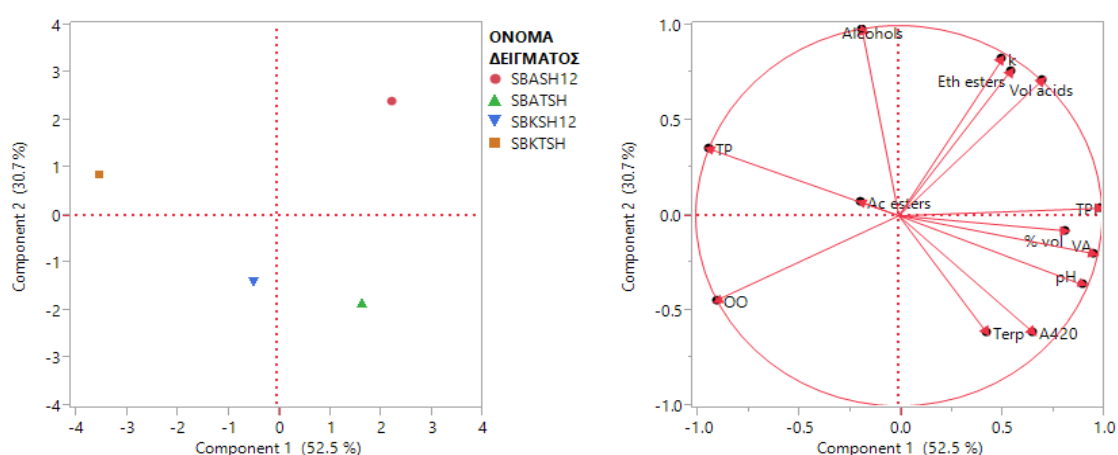
Ο κύριος **άξονας 1** διαμορφώνεται από τις μεταβλητές με το μεγαλύτερο ποσοστό, όπως από τον αλκοολικό τίτλο, την πτητική οξύτητα, το pH, τους αιθυλικούς εστέρες, το συντελεστής οξειδωσιμότητας (k) και τα λιπαρά οξέα. Δηλαδή από 0 μέχρι 90 μοίρες όσο πιο κοντά βρίσκονται οι μεταβλητές στον άξονα τόσο μεγαλύτερη είναι η θετική τους συνεισφορά στη διαμόρφωση του. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (ΔΦΟ), σαν μέγεθος, συμμετέχει στη διαμόρφωση αυτού του άξονα σε μεγάλο βαθμό καθώς είναι σχεδόν πάνω του. Αντιθέτως, η απορρόφηση στα 420nm και τα τερπένια δεν συμμετέχουν τόσο στη διαμόρφωση του, καθώς είναι σχετικά απομακρυσμένες από αυτόν. Από 90 μέχρι 180 μοίρες παρατηρείται αρνητική συσχέτιση με τις παραμέτρους που διαμορφώνουν τον

άξονα, έτσι οι αλκοόλες, οι οξικοί εστέρες, οι ολικές φαινόλες (μέθοδος Folin-Ciocalteu) και η ογκομετρούμενη οξύτητα, σχετίζονται αρνητικά με τον άξονα αυτόν.

Ο κύριος **άξονας 2** διαμορφώνεται από τις μεταβλητές με το μεγαλύτερο ποσοστό, όπως οι αλκοόλες, οι αιθυλικοί εστέρες, ο συντελεστής οξειδωσιμότητας (k) και τα λιπαρά οξέα ενώ αρνητική συσχέτιση με τον άξονα εμφανίζουν η ογκομετρούμενη οξύτητα, το pH, ο αλκοολικός τίτλος, η πτητική οξύτητα, η απορρόφηση στα 420nm και τα τερπένια.

**Πίνακας 6.** Ποσοστά βαρύτητας με τα οποία συμμετέχουν οι μεταβλητές της μελέτης στη διαμόρφωση των δυο κύριων συνιστωσών.

	Component 1	Component 2
OO	-0,3428	-0,22207
pH	0,34628	-0,18192
% vol	0,3127	-0,03936
VA	0,36852	-0,10001
A420	0,25281	-0,30701
TPI	0,38103	0,01967
TP	-0,35763	0,17619
k	0,19495	0,41266
Alcohols	-0,06961	0,49121
Ac esters	-0,07047	0,03521
Eth esters	0,21069	0,3821
Vol acids	0,26925	0,35579
Terp	0,16522	-0,30812



**Σχήμα 21.** Ανάλυση κύριων συνιστωσών στους οίνους που προήλθαν από σταφύλια ποικιλίας Sauvignon blanc που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά)



Ο άξονας 1 χωρίζει τον πίνακα σε δυο ομάδες, οι οποίες είναι διακριτές ως προς την αραίωση (αραιωμένα) ή μη (κανονικά) που δέχθηκαν τα πρέμνα μετά το στάδιο του περκασμού. Τα «αραιωμένα» δηλαδή διαχωρίζονται από τα «κανονικά» ως προς τον άξονα 1. Τα «αραιωμένα» έχουν θετική συσχέτιση με όλες τις παραμέτρους που διαμορφώνουν τον άξονα 1, δηλαδή τον αλκοολικό τίτλο, την πτητική οξύτητα, το pH, τους αιθυλικούς εστέρες, τον συντελεστή οξειδωσιμότητας (k) και τα λιπαρά οξέα ενώ τα «κανονικά» έχουν αρνητική συσχέτιση με τα στοιχεία που διαμορφώνουν τον άξονα 1. Δηλαδή έχουν μικρότερο αλκοολικό τίτλο, πτητική οξύτητα, pH, συντελεστή οξειδωσιμότητας (k) και λιγότερους αιθυλικούς εστέρες και λιπαρά οξέα αλλά έχουν θετική συσχέτιση με τις ολικές φαινόλες (μέθοδος Folin-Ciocalteu), την ογκομετρούμενη οξύτητα, τις αλκοόλες και τους οξικούς εστέρες.

Ο άξονας 2 διαφοροποιεί τα δείγματα και ως προς τις δύο υπό μελέτη παραμέτρους δηλαδή την αραίωση φορτίου (αραιωμένα και κανονικά) και τον εμβολιασμό τους κατά την αλκοολική ζύμωση με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces (S.cerevisiae)* ή με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces (T.delbrueckii)* και *Saccharomyces (S.cerevisiae)*.

Στο θετικό κομμάτι, όπως προκύπτει από τον άξονα 2, βρίσκονται το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα «αραιωμένα» πρέμνα και έχει εμβολιαστεί με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* και το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα «κανονικά» που έχουν εμβολιαστεί με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces (T.delbrueckii)* και *Saccharomyces (S.cerevisiae)*. Έτσι, το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα «αραιωμένα» πρέμνα και έχει εμβολιαστεί με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* έχει θετική συσχέτιση με αιθυλικούς εστέρες, λιπαρά οξέα, συγκέντρωση ολικών φαινολικών (ΔΦΟ) και είναι περισσότερο ευοξειδωτο (συντελεστής οξειδωσιμότητας k) ενώ όσο αφορά το δείγμα οίνου από τα «κανονικά» που έχει εμβολιαστεί με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces (T.delbrueckii)* και *Saccharomyces (S.cerevisiae)* έχει θετική συσχέτιση με τις αλκοόλες, τους οξικούς εστέρες και τις ολικές φαινόλες (μέθοδος Folin-Ciocalteu).

Στο αρνητικό κομμάτι βρίσκεται το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα «αραιωμένα» και έχει εμβολιαστεί με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces* και *Saccharomyces* και τα «κανονικά» που έχουν εμβολιαστεί με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces*. Το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα «αραιωμένα» και έχει εμβολιαστεί με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces* και *Saccharomyces* παρουσιάζει θετική συσχέτιση με τον αλκοολικό τίτλο, την πτητική οξύτητα, το pH, την απορρόφηση στα 420nm και την συγκέντρωση των τερπενίων, ενώ από τα «κανονικά» που έχουν εμβολιαστεί με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* έχουν θετική συσχέτιση μόνο ως προς την ογκομετρούμενη οξύτητα.

### 3.7.2 PCA οργανοληπτικής αξιολόγησης

Για τη συνολική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της οργανοληπτικής αξιολόγησης έγινε πολυπαραγοντική ανάλυση με ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). Μέσα από μαθηματικές εξισώσεις, οι μεταβλητές που μελετήθηκαν διαμόρφωσαν τις δύο κύριες συνιστώσες-άξονες σύμφωνα με τον πίνακα 7. Ο άξονας 1 απαρτίζεται από το 70% της πληροφορίας ενώ ο άξονας 2 από το 18,7%.

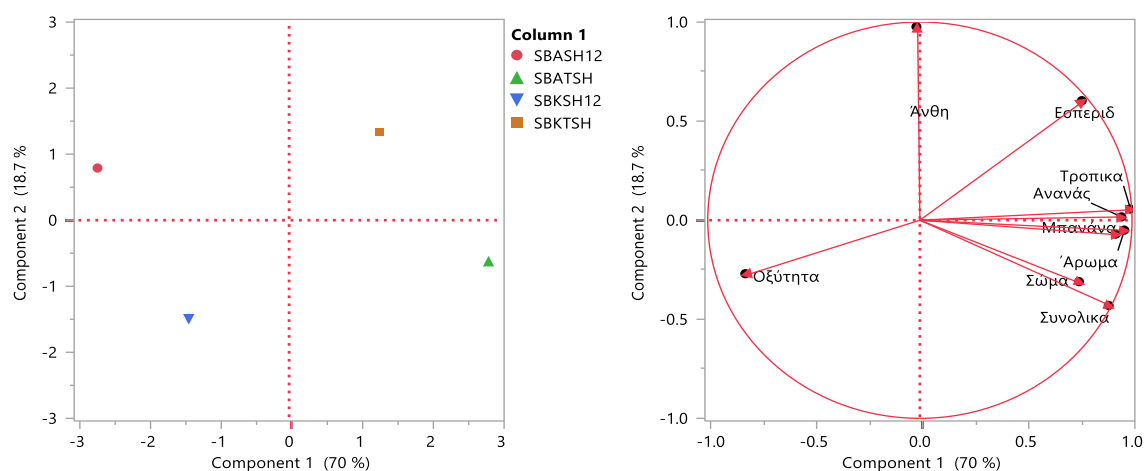
Ο κύριος άξονας 1 διαμορφώνεται από τις μεταβλητές με το μεγαλύτερο ποσοστό, όπως το συνολικό άρωμα, το άρωμα των τροπικών φρούτων, μπανάνας και ανανά και την συνολική

εκτίμηση. Δηλαδή από 0 μέχρι 90 μοίρες όσο πιο κοντά βρίσκονται οι μεταβλητές στον άξονα τόσο μεγαλύτερη είναι η θετική τους συνεισφορά στη διαμόρφωση του. Η ένταση των αρωμάτων τροπικών φρούτων και ανανά, σαν μέγεθος, συμμετέχει στη διαμόρφωση αυτού του άξονα σε μεγάλο βαθμό καθώς είναι σχεδόν πάνω του. Αντιθέτως, οι παράμετροι σώμα και άρωμα εσπεριδοειδών δεν συμμετέχουν τόσο στη διαμόρφωση του, καθώς είναι σχετικά απομακρυσμένες από αυτόν. Από 90 μέχρι 180 μοίρες παρατηρείται αρνητική συσχέτιση με τις παραμέτρους που διαμορφώνουν τον άξονα, έτσι το άρωμα ανθέων και η οξύτητα, σχετίζονται αρνητικά με τον άξονα αυτόν.

Ο κύριος άξονας 2 διαμορφώνεται από τις μεταβλητές με το μεγαλύτερο ποσοστό, όπως το άρωμα των ανθέων και των εσπεριδοειδών. Πιο συγκεκριμένα, η ένταση του αρώματος των ανθέων συμμετέχει στην διαμόρφωση αυτού του άξονα σε μεγάλο βαθμό καθώς είναι σχεδόν πάνω του. Αρνητική συσχέτιση με τον άξονα εμφανίζουν το συνολικό άρωμα, το άρωμα μπανάνας, η οξύτητα, το σώμα και η συνολική εκτίμηση.

**Πίνακας 7.** Ποσοστά βαρύτητας με τα οποία συμμετέχουν οι μεταβλητές της μελέτης στη διαμόρφωση των δυο κύριων συνιστωσών.

	Component 1	Component 2
Άρωμα	0,38394	-0,03993
Τροπικά	0,39591	0,04027
Ανανάς	0,37903	0,01268
Μπανάνα	0,36861	-0,05649
Εσπεριδοειδή	0,30549	0,46095
Άνθη	-0,00418	0,75218
Οξύτητα	-0,32537	-0,21308
Σώμα	0,29927	-0,24368
Συνολικά	0,35713	-0,33227



**Σχήμα 22.** Ανάλυση κύριων συνιστωσών στους οίνους που προήλθαν από σταφύλια ποικιλίας *Sauvignon blanc* που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά)

Ο άξονας 1 διαφοροποιεί τα δείγματα και ως προς το πρωτόκολλο οινοποίησης δηλαδή ως προς τον εμβολιασμό τους με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces (S.cerevisiae)* και με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces (T.delbrueckii)* και *Saccharomyces (S.cerevisiae)*. Έτσι όπως προκύπτει από τον άξονα 1, στο θετικό κομμάτι βρίσκεται τα δείγματα οίνου που προέκυψαν από ζύμωση παρουσία *T.delbrueckii* στα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Τα δείγματα αυτά έχουν θετική συσχέτιση με τα περισσότερα περιγραφικά στοιχεία όπως το άρωμα των εσπεριδοειδών, μπανάνας, ανανά, τροπικών φρούτων, το σώμα, την ένταση αρώματος και την συνολική εκτίμηση.

Στο αρνητικό κομμάτι του άξονα 1 βρίσκεται τα δείγματα οίνου που προήλθαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces (S. cerevisiae)*. Παρουσιάζουν θετική συσχέτιση την υψηλή ογκομετρούμενη οξύτητα ενώ χαρακτηρίστηκαν από μικρά σκορ σε όλους τους περιγραφικούς όρους που αφορούν οσμές φρούτων.

Ο άξονας 2 διαφοροποιεί τα δείγματα ως προς τις δύο υπό μελέτη παραμέτρους δηλαδή την αραιώση φορτίου (αραιωμένα και κανονικά) και τον εμβολιασμό τους κατά την αλκοολική ζύμωση με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces (S. cerevisiae)* ή με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces (T. delbrueckii)* και *Saccharomyces (S. cerevisiae)*. Έτσι, στο θετικό κομμάτι βρίσκεται το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα «αραιωμένα» πρέμνα και έχει εμβολιαστεί με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces (S. cerevisiae)* και το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα «κανονικά» και έχει εμβολιαστεί με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces (T. delbrueckii)* και *Saccharomyces (S. cerevisiae)*. Όσον αφορά το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα «αραιωμένα» πρέμνα και έχει εμβολιαστεί με καθαρή *Saccharomyces (S. cerevisiae)* δεν έχει θετική συσχέτιση με κάποια παράμετρο ενώ το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα «κανονικά» και έχει εμβολιαστεί με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces (T. delbrueckii)* και *Saccharomyces (S. cerevisiae)* έχει ελαφρώς θετική συσχέτιση με το άρωμα εσπεριδοειδών.

Στο αρνητικό κομμάτι του άξονα είναι το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα «κανονικά» και έχει εμβολιαστεί με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces (S. cerevisiae)* και το δείγμα οίνου που προέρχεται από τα «αραιωμένα» πρέμνα και έχουν εμβολιαστεί με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces (T. delbrueckii)* και *Saccharomyces (S. cerevisiae)*.

## 4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση δύο παραγόντων στο χημικό και οργανοληπτικό προφίλ των παραγόμενων οίνων ποικιλίας Sauvignon blanc. Ο πρώτος παράγοντας αφορούσε την καλλιεργητική τεχνική που εφαρμόστηκε στα πρέμνα και πιο συγκεκριμένα την αραίωση φορτίου μετά το στάδιο του περκασμού ενώ ο άλλος παράγοντας αφορούσε το στέλεχος ζύμωσης που χρησιμοποιήθηκε κατά την αλκοολική ζύμωση καθώς έγινε ζύμωση με εμβολιασμό στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* και με συνεμβολιασμό *Torulaspora delbrueckii* και *Saccharomyces cerevisiae*.

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν σταφύλια του τρύγου 2022 από την περιοχή Ασπρόκαμπου Νεμέας, χωρισμένα σε δύο μέρη, διαφοροποιημένα ως προς την καλλιεργητική τεχνική. Ένα μέρος αυτών, είχε δεχθεί αραίωση φορτίου μετά το στάδιο του περκασμού («αραιωμένα») ενώ το άλλο όχι («κανονικά»). Με την παραλαβή των σταφυλιών μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των βοτρύων και το συνολικό βάρος των σταφυλιών των δύο επεμβάσεων στο αμπέλι, αραιωμένων και κανονικών. Με αποτέλεσμα να προκύψει ότι τα «αραιωμένα» είχαν μικρότερο βάρος ανά πρέμνο που συνάδει με μείωση της απόδοσης λόγω της συγκεκριμένης τεχνικής και μεγαλύτερο βάρος και όγκο ανά ράγα γιατί λόγω της αραίωσης, το πρέμνο έχει μεγαλύτερες ποσότητες διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών άρα αυξάνεται ο όγκος και το βάρος ανά ράγα συγκριτικά με τα «κανονικά».

Μετά την τοποθέτηση του γλεύκους σε δύο διαφορετικές δεξαμενές ανάλογα με την αμπελουργική επέμβαση («αραιωμένα» και «κανονικά») πραγματοποιήθηκαν βασικές αναλύσεις (σακχαροπεριεκτικότητα, οξύτητα, pH, αμμωνιακού αζώτου και αζώτου βασικών αμινοξέων). Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές της ογκομετρούμενης οξύτητας και του pH δεν διέφεραν μεταξύ «αραιωμένων» και «κανονικών» ενώ μεγαλύτερη σακχαροπεριεκτικότητα είχε το γλεύκος από τα «αραιωμένα». Αποτέλεσμα που επιβεβαιώνεται απο αντίστοιχη έρευνα (Wolpert, 1983; Reynolds, 1989a; Morando, 1991; Zironi, 1993) σύμφωνα με την οποία η αφαίρεση σταφυλών εκτός από την μείωση στην παραγωγή, είχε επίδραση και στην χημική σύνθεση της ράγας καθώς αύξησε την συγκέντρωση σακχάρων. Όσον αφορά το αμμωνιακό άζωτο και το άζωτο βασικών αμινοξέων μεγαλύτερες τιμές είχε το γλεύκος από τα «κανονικά».

Μετά την τοποθέτηση του γλεύκους σε δύο διαφορετικές δεξαμενές ανάλογα την αμπελουργική επέμβαση («αραιωμένα» και «κανονικά»), ακολούθησε και διαφοροποίηση ως προς τον εμβολιασμό με ζυμομύκητα. Με αποτέλεσμα να προκύψουν 4 δείγματα (2 επαναλήψεις ανά περίπτωση) στα οποία ακολούθησε αλκοολική ζύμωση σύμφωνα με τα παρακάτω:

- 2 δεξαμενές της ομάδας «αραιωμένα» εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. **(SBASH12)**
- 2 δεξαμενές της ομάδας «αραιωμένα» εμβολιάστηκαν με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii*) και *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*). **(SBATSH)**
- 2 δεξαμενές της ομάδας «κανονικά» εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. **(SBKSH12)**

- 2 δεξαμενές της ομάδας «κανονικά» εμβολιάστηκαν με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii*) και *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*). **(SBKTSH)**

Η εξέλιξη των ζυμώσεων όλων των δειγμάτων παρακολουθούνταν καθημερινά, με μέτρηση των σακχάρων με διαθλασιμετρία και έπειτα με ενζυμική ανάλυση της γλυκόζης/-φρουκτόζης από ενζυμικό αναλυτή. Με βάση αυτές τις μετρήσεις δεν εμφάνισαν ιδιαίτερες διαφορές ανεξάρτητα από το αν είχαν εμβολιαστεί με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces* και *Saccharomyces* και αν προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραιώση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά). Οι ζυμώσεις και για τις τέσσερις περιπτώσεις ολοκληρώθηκαν ταυτόχρονα με παρόμοιες πορείες.

Στους σταθεροποιημένους οίνους πραγματοποιήθηκαν βασικές αναλύσεις οίνου (ενεργός οξύτητα-pH, ολική οξύτητα, αλκοολικός τίτλος, πτητική οξύτητα) σύμφωνα με τις επίσημες ή συνήθειες μεθόδους του ΟΙV κι επιπλέον αναλύσεις φαινολικών συστατικών και οξειδωσιμότητας. Στις αναλύσεις χρώματος και φαινολικών συστατικών περιλάμβαναν απορρόφηση στα 420 nm, Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ), Ολικά φαινολικά με την μέθοδο Folin-Ciocalteu σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mgGAE/L) και Δείκτης οξειδωσιμότητας (k).

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων που διενεργήθηκαν στους οίνους, μπορούν να εκφραστούν τα εξής συμπεράσματα:

Μετά την ολοκλήρωση των βασικών αναλύσεων προκύπτει ότι ανεξάρτητα από την καλλιεργητική τεχνική που έχει εφαρμοστεί στο πρέμνο (αραιώση φορτίου ή όχι) και από το στέλεχος ζύμωσης που έχει χρησιμοποιηθεί κατά την αλκοολική ζύμωση, τα τελικά προϊόντα δεν διαφέρουν τόσο μεταξύ τους όσον αφορά την ενεργό οξύτητα- pH.

Όσον αφορά την **ολική οξύτητα**, είναι ελαφρώς μειωμένη στα δείγματα οίνου που προέρχονται από πρέμνα που έχουν δεχθεί αραιώση φορτίου («αραιωμένα») απ' ότι σε αυτά που δεν έχουν δεχθεί («κανονικά»), γεγονός που επαληθεύεται με αντίστοιχες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η αραιώση φορτίου σε πρέμνα μείωσε την συγκέντρωση των οξέων στο εσωτερικό της ράγας (Wolpert, 1983; Reynolds, 1989a; Morando, 1991; Zironi, 1993). Βέβαια, διαφορές υπάρχουν και ως προς το πρωτόκολλο οινοποίησης με τάση αύξησης στα δείγματα που ζύμωσαν με non-Sach ζύμες αλλά δεν προκύπτουν ασφαλή συμπεράσματα.

Ακόμα, ο αλκοολικός τίτλος και για τα 4 δείγματα είναι αυξημένος για λευκούς οίνους με εύρος τιμών 12,9-13,2. Ο αλκοολικός τίτλος στα «αραιωμένα» φαίνεται να έχει αυξητική τάση σε σχέση με τα «κανονικά», και με στατιστικά σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματά τους, που συνάδει με την ελαφρά μεγαλύτερη σακχαροπεριεκτικότητα του γλεύκους των αραιωμένων σταφυλιών. Όσο αφορά το στέλεχος ζύμωσης που έχουν εμβολιαστεί, δεν υπάρχει σαφής τάση αν το στέλεχος επηρεάζει την περιεκτικότητα σε αλκοόλη.

Η **πτητική οξύτητα** είναι ελαφρώς μικρότερη στα «κανονικά» ιδίως σε εκείνα που συνεμβολιάστηκαν με *T.delbrueckii* και *S.cerevisiae* συγκριτικά με εκείνα που εμβολιάστηκαν μόνο με *S.cerevisiae*, αποτέλεσμα που μπορούν να επιβεβαιώσουν αντίστοιχες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και έχουν συμπεράνει ότι η συν-

καλλιέργεια *T.delbrueckii* με *S.cerevisiae* παράγει οίνους με χαμηλή πτητική οξύτητα (Ciani & Maccarelli, 1998; Sadoudi, 2012; Van Breda, 2013).

Όσον αφορά τις αναλύσεις φαινολικών συστατικών και οξειδωσιμότητας, η **συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (ΔΦΟ)** είναι μεγαλύτερη στα «αραιωμένα» απ' ό,τι στα «κανονικά» ενώ επιπλέον τόσο στα «αραιωμένα» όσο και στα «κανονικά» ελαφρώς μικρότερος είναι ο δείκτης ολικών φαινολικών στα δείγματα οίνου που έχουν συνεμβολιαστεί με *T.delbrueckii* και *S.cerevisiae* ενώ για τις **ολικές φαινόλες (μέθοδος Folin-Ciocalteu)** δεν προκύπτουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 οίνων. Τέλος, σύμφωνα με τον **συντελεστή οξειδωσιμότητας (k)** μεγαλύτερη τάση για οξείδωση παρουσιάζει ο οίνος από τα «αραιωμένα» που εμβολιάστηκε μόνο με *S.cerevisiae*. Σε γενικές γραμμές όμως οι συντελεστές οξειδωσιμότητας κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των ενώσεων αρώματος των πειραματικών οίνων με GC-MS, σε γενικές γραμμές, δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 4 παραγόμενων οίνων που εμβολιάστηκαν με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces* και *Saccharomyces* και προήλθαν από πρέμνα που είχαν δεχθεί αραίωση φορτίου (αραιωμένα) ή όχι (κανονικά).

Πιο συγκεκριμένα, παρόμοιες συγκεντρώσεις ανώτερων αλκοολών εντοπίστηκαν στους 4 παραγόμενους οίνους με την isoamyl alcohol να είναι στην υψηλότερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα και να ακολουθούν οι methyl-1-propanol και 2-phenylethanol με αποτέλεσμα να αναμένονται οίνοι πλούσιοι σε αρώματα ανθέων και γλυκών φρούτων. Αναφορικά με τους **οξικούς εστέρες** παρατηρήθηκε αυξητική τάση ιδιαίτερα των ενώσεων isoamyl acetate και hexyl acetate στα δείγματα οίνου είτε «αραιωμένα» είτε «κανονικά» που είχαν εμβολιαστεί με μικτή καλλιέργεια *T.delbrueckii* και *S.cerevisiae*, έτσι οι οίνοι αυτοί θα είναι περισσότερο πλούσιοι με αρώματα φρούτων όπως μπανάνα και ανανά. Για τους **αιθυλικούς εστέρες** παρατηρήθηκε αυξητική τάση στην συγκέντρωση ιδιαίτερα των ενώσεων ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl butyrate στα δείγματα οίνου που είχαν δεχθεί αραίωση φορτίου («αραιωμένα»). Τα **πτητικά λιπαρά οξέα** δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες διαφορές στην συγκεντρωσή τους μεταξύ των 4 δειγμάτων. Επιπρόσθετα, σχετικά με την συγκέντρωση των **τερπενίων**, αυξημένη ήταν η συγκέντρωσή τους στα «αραιωμένα» και πιο συγκεκριμένα σε αυτά που είχαν εμβολιαστεί με μικτή καλλιέργεια *T.delbrueckii* και *S.cerevisiae*. Συμπέρασμα, που έχει καταλήξει και πρόσφατη έρευνα σύμφωνα με την οποία η αραίωση φορτίου των πρέμνων φαίνεται ότι έχει επίδραση και στις αρωματικές ενώσεις στο εσωτερικό των σταφυλών, καθώς στην ποικιλία Μοσχάτο αποδείχτηκε ότι συνέβαλλε στην αύξηση της συγκέντρωσης των τερπενίων στο σταφύλι, και πιο συγκεκριμένα της λιναλοόλης, που συσχετίστηκε στις περισσότερες περιπτώσεις με θετικά χαρακτηριστικά στην γεύση και στο άρωμα των οίνων (Alem, 2021). Οι οίνοι αυτοί ενδέχεται να έχουν πιο έντονα αρώματα φρούτων όπως τροπικά φρούτα και ανανά.

Κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων από πάνελ εξειδικευμένων και έμπειρων δοκιμαστών (12 ατόμων) οι οποίοι κλήθηκαν να βαθμολογήσουν με κλίμακα 1-5 τους οίνους ως προς την αρωματική τους ένταση και το είδος του αρώματος (τροπικά φρούτα, ανανά, μπανάνα, εσπεριδοειδή και άνθη), την οξύτητα και το σώμα τους προέκυψαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων με αποτέλεσμα να προκύψουν τα κάτωθι συμπεράσματα. Την **μεγαλύτερη ένταση αρώματος** είχε το δείγμα οίνου από τα

«αραιωμένα» που είχε εμβολιαστεί με μικτή καλλιέργεια *T.delbrueckii* και *S.cerevisiae* όπως επίσης είχε πιο έντονα τα αρώματα των τροπικών φρούτων, του ανανά και της μπανάνας. Στην συνέχεια δεύτερο σε ένταση αρώματος και συγκεκριμένα αρωμάτων τροπικών φρούτων, μπανάνας και ανανά ακολουθεί το δείγμα οίνου από τα «κανονικά» που είχε εμβολιαστεί με μικτή καλλιέργεια *T.delbrueckii* και *S.cerevisiae*. Ακόμα, δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις ως προς στην ένταση του αρώματος των ανθέων και των εσπεριδοειδών, στην οξύτητα και στο σώμα. Σύμφωνα με τα συμπεράσματα αυτά προκύπτει ότι ο συνεμβολιασμός με *T.delbrueckii* και *S.cerevisiae* συμβάλλει στην αύξηση της έντασης του αρώματος των οίνων και την ανάδειξη αρωμάτων όπως τροπικά φρούτα, ανανά και μπανάνας. Γεγονός που επιβεβαιώνεται από αντίστοιχες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η συμβολή *T.delbrueckii* στην ζύμωση σχετίζεται με την βελτίωση της πολυπλοκότητας των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων (Clemente-Jimenez, 2005) και ότι συνεμβολιασμός των ειδών *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* σε Sauvignon blanc και Chenin blanc απέδειξε πως οι οίνοι που προέκυψαν ήταν καλύτεροι από τις καθαρές καλλιέργειες *S. cerevisiae* 5 και 18 μήνες μετά την παραγωγή (Jolly, 2003). Ομοίως και οίνοι από Amargone που εμβολιάστηκαν διαδοχικά με *T. delbrueckii* και είχαν αυξημένη ένταση αρώματος όπως κόκκινα φρούτα, αυξημένη γλυκύτητα και στυπτικότητα και χαμηλότερη ένταση φυτικών χαρακτήρων (Azzolini, 2012). Σε αντίθεση, η καθαρή καλλιέργεια με *S.cerevisiae* δεν συνέβαλε στο αρωματικό προφίλ των οίνων. Η αραιώση ή μη του φορτίου των πρέμνων όσον αφορά την οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων δεν αποδείχθηκε ότι επηρεάζει τα υπό μελέτη οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων ποικιλίας Sauvignon blanc.

Σε γενικότερο πλαίσιο από την παρούσα διατριβή προκύπτουν συνοπτικά τα εξής συμπεράσματα:

- Η αραιώση φορτίου μετά το στάδιο του περκασμού σε πρέμνα ποικιλίας Sauvignon blanc μείωσε την απόδοση ανά πρέμνο με θετικό αντίκτυπο στην ποιότητα των παραγόμενων οίνων και αύξησε το βάρος και όγκο ανά ράγα. Ακόμα, είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή σταφυλών με μεγαλύτερη σακχαροπεριεκτικότητα και κατά συνέπεια παραγωγή οίνων με υψηλότερο αλκοολικό τίτλο. Οι παραγόμενοι οίνοι που προέκυψαν είχαν χαμηλότερη ολική οξύτητα και υψηλότερη πτητική, περισσότερα ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin-Ciocalteu) και μεγαλύτερη τάση για οξειδωση συγκριτικά με τους οίνους που προέκυψαν από τα πρέμνα που δεν είχαν δεχθεί αραιώση.
- Όσον αφορά το στέλεχος ζύμωσης, στις βασικές αναλύσεις οίνου και φαινολικών συστατικών προκύπτει ότι ο συνεμβολιασμός του γλεύκους με μικτή καλλιέργεια non-Saccharomyces (*T. delbrueckii*) και Saccharomyces (*S. cerevisiae*) έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της πτητικής οξύτητας και της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών (ΔΦΟ) ενώ δεν υπάρχει σαφής τάση αν το στέλεχος επηρεάζει την περιεκτικότητα σε αλκοόλη, την ολική οξύτητα και την οξειδωσιμότητα
- Στις αναλύσεις πτητικών ενώσεων, όπως προκύπτει, η αραιώση φορτίου και το στέλεχος ζύμωσης δεν επηρέασαν τις συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών και των λιπαρών οξέων ενώ ο συνεμβολιασμός με non-Saccharomyces (*T. delbrueckii*) και

*Saccharomyces (S. cerevisiae)* φαίνεται να επέφερε αύξηση στην συγκέντρωση των οξικών εστέρων και των τερπενίων.

- Στην οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων η αραίωση ή μη του φορτίου των πρέμνων δεν αποδείχθηκε ότι επηρεάζει τα υπό μελέτη οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων ποικιλίας Sauvignon blanc ωστόσο φαίνεται πως καθοριστικό ρόλο είχε το στέλεχος του ζυμομύκητα κατά την αλκοολική ζύμωση καθώς προκύπτει ότι ο συνεμβολιασμός με *T.delbrueckii* και *S.cerevisiae* συμβάλλει στην αύξηση της έντασης του αρώματος των οίνων και την ανάδειξη αρωμάτων όπως τροπικά φρούτα, ανανά και μπανάνας.

### Μελλοντική έρευνα

Η μελέτη της εφαρμογής της αραίωσης φορτίου στο πρέμνο καθώς και το πρωτόκολλο οινοποίησης που θα ακολουθήσει κατά την αλκοολική ζύμωση με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces* ή με μικτή καλλιέργεια non-*Saccharomyces* και *Saccharomyces* αποτελεί αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια και η γνώση γύρω από αυτό είναι αρκετά περιορισμένη. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από το εν λόγω πείραμα αποτελούν μόνο την βάση για μια ενδελεχή έρευνα σε βάθος χρόνου.

Κατ' αρχήν, το πείραμα αφορά μια αμπελουργική χρονιά και σίγουρα, για πιο ισχυρά αποτελέσματα, απαιτούνται τουλάχιστον τρεις για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των επεμβάσεων στο αμπέλι ενώ παράλληλα θα μελετάται και η επίδραση του οινοποιητικού πρωτόκολλου στην πρώτη ύλη. Επιπλέον, ένας ακόμα παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψιν σε μελλοντική έρευνα είναι η χρονική στιγμή αραίωσης του φορτίου καθώς, όπως προκύπτει στο συγκεκριμένο πείραμα, μετά το στάδιο του περκασμού, τα δείγματα δεν είχαν ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις. Επίσης, θα μπορούσε να μελετηθεί και η επίδραση κάποιας άλλης καλλιεργητικής τεχνικής στον αμπελώνα όπως το ξεφύλλισμα ή το βλαστολόγημα σε διαφορετικά φαινορικά στάδια ανάπτυξης του πρέμνου. Όσον αφορά το πρωτόκολλο οινοποίησης, ο εμβολιασμός του γλεύκους με μικτή καλλιέργεια *T.delbrueckii* και *S.cerevisiae* είχε φανερά αποτελέσματα στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων, ωστόσο μεγάλο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η χρήση και διαφορετικών non-*Saccharomyces* ζυμών σε συνδυασμό με *S.cerevisiae*.



## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Διεθνής Βιβλιογραφία

Albergaria, H., & Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied microbiology and biotechnology*, 100 (5), 2035-2046.

Alem H., Ojeda H., Rigou P., Schneider R., Torregrosa L., (2021). The reduction of plant sink/source does not systematically improve the metabolic composition of *Vitis vinifera* white fruit. *Food chemistry* 345 pages 235-247.

Allan, J. (2019). Phenolic Change Associated With Post-Fermentation Skin Contact For Two White Wine Varietals, *Cornell University*.

Allen, T., Herbst-Johnstone, M., Girault, M., Butler, P., Logan, G., Jouanneau, S., Nico-lau, L., & Kilmartin, P. (2011). Influence of grapeharvesting steps on varietal thiol aromas in Sauvignon blanc wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10641–10650.

Ardilouze, C. (2006). Reductive vinification of white and rosé wines: the question of must extraction. *Int J Vitic Enol*, 13, 1-9.

Azzolini M., Tosi E., Lorenzini M., Finato F., Zapparoli G., (2013). Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* 31:277–293.

Barrajón N., Capece A., Arévalo-Villena M., Briones A., Romano P. (2011). Co-inoculation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains and influence on volatile composition of wines. *Food Microbiology* Volume 28, Issue 5, Pages 1080-108.

Benkwitz, F., Tominaga, T., Kilmartin, P.A., Lund, C., Wohlers, M., & Nicolau, L. (2012) Identifying the chemical composition related to the distinct aroma characteristics of New Zealand Sauvignon blanc wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 62–72.

Bisson F L., Pallmann L C., Brown A J., Olineka L T., Cocolin L., Mills A D., (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations, *American Journal of Enology and Viticulture*, Volume 52, Issue 3, Pages, 198-203.

Boursiquot, J.-M. (2010). About Sauvignon and its Clonal Development Programs in France, presentation at Variety Focus: Sauvignon blanc, May 6, 2010, in Davis, California – the entire presentation is accessible on videotape at UC Integrated Viticulture Online, <http://iv.ucdavis.edu>, in the section entitled Videotaped Seminars and Events.

Blondin, B., Dequin, S., Querol, A., & Legras, J. L. (2009). Genome of *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 361-378). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bozena P., Humaj J., Sochor J., and Baron M., (2022). Formation, Losses, Preservation and Recovery of Aroma Compounds in the Winemaking Process. *Fermentation* 8, 93.

Carpena M., Fraga-Corral M., Otero P., Nogueira A R., Garcia-Oliveira P., Prieto M A., and Simal-Gandara J., (2020). Secondary Aroma: Influence of Wine Microorganisms in Their Aroma Profile. *Foods* 2021, 10, 51.

Cataldo E., Salvi L., Paoli F., Fucile M., and Battista Mattii G., (2021). Effect of Agronomic Techniques on Aroma Composition of White Grapevines: A Review. *Agronomy* 11, 2027.

- Clemente-Jimenez J.M, Mingorance-Cazorla L., Martínez-Rodríguez S. , Las Heras-Vázquez F.J, Rodríguez-Vico F (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 3, Issue 3, Pages 301-308.
- Coetzee, C., Lisjak, K., Nicolau, L., Kilmartin, P., & du Toit, W.J. (2013). Oxygen and sulfur dioxide additions to Sauvignon blanc must: Effect on must and wine composition. *Flavour and Fragrance Journal*, 28, 155–167.
- Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M., (2011). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 873-82.
- Deed Nathan K., Hennie J. J. van Vuuren, Richard C. Gardner.(2011). Effects of nitrogen catabolite repression and diammonium phosphate addition during wine fermentation by a commercial strain of *S. cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89:1537–1549, DOI: 10.1007/s00253-011-3084-y.
- De Prado, R. de Andrés, Yuste-Rojas, M., Sort X., Andrés-Lacueva, C., Torres, M. & Lamuela-Raventós, R. M. (2007). Effect of Soil Type on Wines Produced from *Vitis vinifera* L. Cv. Grenache in Commercial Vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 779-786.
- Diago, M.P.; Vilanova, M.; Blanco, J.A.; Tardaguila, J. (2010). Effects of mechanical thinning on fruit and wine composition and sensory attributes of Grenache and Tempranillo varieties (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* 16, 314–326.
- Dimopoulou M., Vicky Troianou, Chrisavgi Toumpeki, Despina Lola, Elli Goulioti, Aikaterini Tzamourani, Etienne Dorignac, Spiros Paramithiotis and Yorgos Kotseridis (2023). Influence of *Saccharomyces pastorianus* and *Saccharomyces bayanus* Inoculation Ratio to Oenological Characteristics of Sauvignon Blanc Wine, *Appl. Sci.* 2023, 13, 3393.
- Eldarov M. A., S. A. Kishkovskaia, T. N. Tanaschuk, A. V. Mardanov.(2016). Genomics and Biochemistry of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 81, No. 13, 1650-1668, DOI: 10.1134/S0006297916130046.
- Ellis, L. P., & Kok, C. (1987). Colour changes in Blanc de noir wines during ageing at different temperatures and its colour preference limits. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 8(1), 16-22.
- Escribano R., Gonzalez-Arenzana L., Portu J., Garijo P., Lopez-Alfaro L., Lopez r., Gutierrez A. R. (2018). Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-Saccharomyces species and clones. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1521-1531.
- Fleet GH, Prakitchaiwattana C, Beh AL, Heard GM (2002) The yeast ecology of wine grapes. In: Ciani M (ed) Biodiversity and biotechnology of wine yeasts. Research Signpost, Kerala, India, pp 1–17.
- Galet, P. (1998). Grape Varieties and Rootstock Varieties. OENOPLURIMÉDIA sarl, Château de Chaintré, 71570 CHAINTRÉ, France.
- Gatti, M.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Poni, S. (2012). Effects of cluster thinning and preflowering leaf removal on growth and grape composition in cv. Sangiovese. *Am. J. Enol. Vitic.* 63, 325–332.
- García-Pastor, M.E.; Serrano, M.; Guillén, F.; Castillo, S.; Martínez-Romero, D.; Valero, V.; Zapata, P.J. (2019). Methyl jasmonate effects on table grape ripening, vine yield, berry quality and bioactive compounds depend on applied concentration. *Sci. Hortic.* 247, 380–389.
- Jackson R. S., (2008). Oak and Cooperage. In: Wine Science Principles and Applications, 3<sup>rd</sup> edition, *Academic Press*, USA:(452-472).

- Jeromel, A., Korenika, A.-M., & Tomaz, I. (2019). An influence of different yeast species on wine aroma composition. *In Fermented Beverages* pp. 171-285.
- Karvonen, J. (2014). The annual growth cycle of grapevines in Southern Finland. *Vitis* 53, 175–180.
- Keller, M.; Mills, L.J.; Wample, R.L.; Spayd, S.E. (2005). Cluster thinning effects on three deficit-irrigated *Vitis vinifera* cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 91–103.
- Kok, D. (2011). Influences of pre-and post-veraison cluster thinning treatments on grape composition variables and monoterpene levels of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *J. Food Agric. Environ.* 9, 22–26.
- Kotseridis, Y.; Anocibar Beloqui, A.; Bertrand, A.; Doazan, J. P.; (1998). An analytical method for studying the volatile compounds of Merlot noir clone wines. *Amer. J. Enol. Vitic.* 49, 44-48.
- Kurtzman CP, Fell JW. (2005). Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts (in: *The Yeast Handbook*, Gábor P, de la Rosa CL, eds.). *Berlin: Springer*. pages 11–30. ISBN 978-3-540-26100-1. CS1 maint: Uses authors parameter (link).
- Loira I., R. Vejarano, M.A. Banuelos, A. Morata, W. Tesfaye, C. Uthurry, A. Villa, I. Cintora, J.A. Suarez-Lepe (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *Food Science and Technology* 59 915e922.
- Lyu, X., Dias Araujo, L., Quek, S.-Y., & Kilmartin, P.A. (2021). Effects of antioxidant and elemental sulfur additions at crushing on aroma profiles of Pinot Gris, Chardonnay and Sauvignon Blanc wines. *Food Chemistry*, 2021, 346, 128914.
- Marais J. (1994). Sauvignon blanc Cultivar aroma. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol 15, No 2.
- Martorell P., Stratford M., Steels H., Fernández-Espinar Ma Teresa & Querol A. (2007) Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 234-242.
- Mosetti D., J. C. Herrera, P. Sabbatini, A. Green, G. Alberti, E. Peterlunger, K. Lisjak and S. D. Castellarin. (2016). Impact of leaf removal after berry set on fruit composition and bunch rot in 'Sauvignon blanc. DOI: 10.5073/vitis.2016.55.57-64.
- Naor, A.; Gal, Y.; Bravdo, B. (2002). Shoot and cluster thinning influence vegetative growth, fruit yield, and wine quality of 'Sauvignon blanc' grapevines. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127, 628–634.
- Nuzzo, V.; Matthews, M.A. (2006) Response of fruit growth and ripening to crop level in dry-farmed Cabernet Sauvignon on four rootstocks. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 314–324.
- Piernas J., Giménez J M., Noguera-Artiaga L., García-Pastor E. M., García-Martínez S. and Zapata J. P. (2022). Influence of Bunch Compactness and Berry Thinning Methods on Wine Grape Quality and Sensory Attribute of Wine in *Vitis vinifera* L. cv. 'Monastrell'. *Agronomy* 12, 680.
- Pretorius, L. M. G. (2016). Yeast and its importance to wine Aroma - A review. *Understanding Wine Chemistry*, 21 (June), 97-129.
- Ramírez M. and Velázquez R. (2018). The Yeast *Torulaspota delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking. *Fermentation* 4, 94; doi:10.3390/fermentation4040094.

- Ribereau-Gayon P., Dubourdieu , B. Doneche and A. Lonvaud (2006). Biochemistry of Alcoholic Fermentation and Metabolic Pathways of Wine Yeasts, Handbook of Enology Volume 1, *The Microbiology of Wine and Vinifications* 2<sup>nd</sup> Edition, pp. 79-114 John Wiley & Sons, Ltd.
- Rigou P., Mekoue J., Sieczkowski N., Doco T., Vernhet A., (2021). Impact of industrial yeast derivative products on the modification of wine aroma compounds and sensorial profile. *Food Chemistry* 358 129760.
- Roman S., Pilar Rubio-Breton E., Perez-Alvarez P., Garde-Cerdan T., (2020). Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. *Food Research International* 137.
- Romano P., Braschi G., Siesto G., Patrignani F., and Lanciotti R., (2022). Role of Yeasts on the Sensory Component of Wines. *Foods* 2022, 11, 1921.
- Rose A.H. and J.S.Harrison, (1993). The Yeasts, Vol 5: Yeast Technology, London-New York, *Academic Press*, 2<sup>nd</sup> edition.
- Ruiz J., Kiene F., Belda I., Fracassetti D., Marquina, D., Navascues E., Calderon F., Benito S., (2019). Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Sablayrolles, J. M. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, 42(4), 418-424.
- Sancho-Galan, P., Amores-Arocha, A., Jimenez-Cantizano, A., Palacios, V. (2021). Influence of the Presence of Grape Skins during White Wine Alcoholic Fermentation. *Agronomy*, 11 (3): 452.
- Santesteban, L.G.; Miranda, C.; Royo, J.B. (2011). Thinning intensity and water regime affect the impact cluster thinning has on grape quality. *Vitis J. Grapevine Res.* 50, 159–165.
- Schalkwyk van D., J.J Hunter and J.J Venter (1995). Effect of Bunch Removal on Grape Composition and Wine Quality of *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol 16, No. 2.
- Silva P., Cardoso H. & Gerós H. (2004) Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 65-72.
- Sioumis N., Kallithraka S., Tsoutsouras E. Makris D., Kefalas, P. (2005) Browning development in white wines: dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics. *European Food Research and Technology*, 220, 326-330.
- Sokolowsky, M., Rosenberger, A., & Fischer, U. (2015). Sensory impact of skin contact on white wines characterized by descriptive analysis, time–intensity analysis and temporal dominance of sensations analysis. *Food Quality and Preference*, 39, 285-297.
- Swiegers J., Bartowsky E. J., Henschke P.A., & Pretorius I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173
- Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., Dubourdieu, D. (1998). Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis. vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 159–162.
- Van Leeuwen, C. & Seguin, G. (2006). The Concept of Terroir in Viticulture. *Journal of Wine Research* 17, 1–10.

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

Walker K, Skelton H, Smith K. (2002). «Cutaneous lesions showing giant yeast forms of Blastomyces dermatitidis». *Journal of Cutaneous Pathology* 29 (10): 616–618. doi:10.1034/j.1600-0560.2002.291009.x. PMID 12453301.

### **Ελληνική βιβλιογραφία**

Αγγελής Γ. (2017). Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία , Β Έκδοση, Unibooks.

Καρίμαλη (2018), «Χαρακτηρισμός τοπικών ποικιλιών σταφυλιών της Ικαρίας και μελέτη της ζύμωσης τους», Διπλωματική εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών.

[https://dspace.lib.ntua.gr/xmlui/bitstream/handle/123456789/47568/%CE%9A%CE%B1%CF%81%CE%AF%CE%BC%CE%B1%CE%BB%CE%B7%20%CE%97%CE%BB%CE%B9%CE%AC%CE%BD%CE%B1%20%CE%94%CE%B9%CF%80%CE%BB%CF%89%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20%CE%95%CF%81%CE%B3%CE%B1%CF%83%CE%AF%CE%B1%20%CE%A4%CE%B5%CE%BB%CE%B9%CE%BA%CF%8C.pdf?sequence=1&fbclid=IwAR09eQPPGZlcWlmrCKF\\_ZKn16l2FjlxAgI0tpgnzfFtcCC2Y72NjNurOvDY](https://dspace.lib.ntua.gr/xmlui/bitstream/handle/123456789/47568/%CE%9A%CE%B1%CF%81%CE%AF%CE%BC%CE%B1%CE%BB%CE%B7%20%CE%97%CE%BB%CE%B9%CE%AC%CE%BD%CE%B1%20%CE%94%CE%B9%CF%80%CE%BB%CF%89%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20%CE%95%CF%81%CE%B3%CE%B1%CF%83%CE%AF%CE%B1%20%CE%A4%CE%B5%CE%BB%CE%B9%CE%BA%CF%8C.pdf?sequence=1&fbclid=IwAR09eQPPGZlcWlmrCKF_ZKn16l2FjlxAgI0tpgnzfFtcCC2Y72NjNurOvDY)

Καλλίθρακα Σ. (2021). Διαλέξεις: “Οργανικά Οξέα”, “Σάκχαρα”, Τμήμα Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου ΓΠΑ, ΠΜΣ Οινολογίας.

Κατινάκης Π., (2004). Βιοχημεία, Εκδόσεις Έμβρυο.

Κοτσερίδης Γ. (2021). Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Τμήμα Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου ΓΠΑ, ΠΜΣ Οινολογίας.

Κοτσερίδης Γ., Καλλίθρακα Σ., Προξενιά Ν., (2017) Οινολογία ΙΙ, Εργαστηριακές ασκήσεις, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Εργαστήριο Οινολογίας, ΓΠΑ.

Κοτσερίδης Γ., Προξενιά Ν., (2017) Οινολογία Ι, Εργαστηριακές ασκήσεις, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Εργαστήριο Οινολογίας, ΓΠΑ.

Κουνδουράς Σ. (2021). Διάλεξη “Ετήσιες Καλλιεργητικές Πρακτικές Αμπελώνα” Τμήμα Γεωπονίας, Εργαστήριο Αμπελουργίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ΠΜΣ Οινολογίας ΓΠΑ.

Κουράκου-Δραγώνα Στ. (1998). Θέματα Οινολογίας: Επιστήμη και τεχνολογία στο τομέα της οινοποιητικής τεχνικής, Εκδόσεις Τροχαλία.

Μπαλατσούρας Γ. (2006). Μικροβιολογία Τροφίμων, Εκδόσεις Έμβρυο.

Μπεκατώρου Α. (2016). Θέματα αμπελουργίας ανάπτυξη της αμπέλου - υποκείμενα – ποικι-λίες. Επίκουρος Καθηγήτρια Χημείας & Τεχνολογίας Τροφίμων.

Παραμυθιώτης Σ. (2020). Διάλεξη “Ζύμες και Αλκοολική Ζύμωση” Τμήμα Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου ΓΠΑ, ΠΜΣ Οινολογίας.

Σουφλερός Ηρ. Ευάγγελος, (1999). Η παλαιώση του οίνου, Ο Οινολόγος , αρ. τεύχους 43.

Σουφλερός Ηρ. Ευάγγελος, (2015). Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνολογία, 3η έκδοση.

Σταύρακας Δημήτριος Ε. (2011). Αμπελογραφία, Εκδόσεις Ζήτη.

Σταυρακάκης Μανόλης Ν. (2010). Αμπελογραφία, Εκδόσεις Τροπή.

Σταυρακάκης Μανόλης Ν. (2013). Αμπελουργία, Εκδόσεις Τροπή.

Ταραντίλης Π. (2021) Διάλεξη “Χημεία και Ανάλυση Γλεύκους και Οίνου” Τμήμα Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου ΓΠΑ, ΠΜΣ Οινολογίας.

Τσακίρης Α. (2000). Ποτογραφία, Εκδόσεις Ψυχάλου.

Τσακίρης Α. (2017). Οινολογία-απο το σταφύλι στο κρασί , 4η έκδοση, Εκδόσεις Ψυχάλου.

### **Ιστοσελίδες**

<https://www.strofiliawines.gr/en/>

<https://doi.org/10.3390/agronomy12030680>

<https://www.mdpi.com/journal/agronomy>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8467266/>

<https://oeclass.aua.gr/eclass/>

[www.oiv.int](http://www.oiv.int)

[www.oinologia.gr](http://www.oinologia.gr)

[www.acs.org](http://www.acs.org)

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129760>