



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

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Επίδραση του οργανικού αζώτου στην αύξηση διαφορετικών στελεχών  
ζυμομυκήτων αναφορικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά  
του παραγόμενου οίνου

**Ευαγγελία Ι. Καγκελάρη**

Επιβλέπων Καθηγητής:  
Γεώργιος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2021**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία**

Επίδραση του οργανικού αζώτου στην αύξηση διαφορετικών στελεχών  
ζυμομυκήτων αναφορικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά  
του παραγόμενου οίνου

Impact of organic nitrogen on the growth of different yeast strains regarding  
the qualitative characteristics of the produced wine

**Ευαγγελία Ι. Καγκελάρη**

Εξεταστική Επιτροπή:

Κοτσερίδης Γεώργιος, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μπινιάρη Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

## **Επίδραση του οργανικού αζώτου στην αύξηση διαφορετικών στελεχών ζυμομυκήτων αναφορικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου οίνου**

*ΔΠΜΣ Αμπελουργία-Οινολογία  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Οινολογίας  
Τμήμα Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Αμπελολογίας*

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Τα πτητικά συστατικά του οίνου, τα οποία προκύπτουν ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τη δράση των ζυμών κατά την αλκοολική ζύμωση, έχουν γίνει αντικείμενο πολλών ερευνών αφού αποτελούν κύριο χαρακτηριστικό της ποιότητας ιδιαίτερα για των λευκών, φρέσκων οίνων.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση τριών εμπορικών στελεχών ζυμομύκητα [Melody (CHR Hansen, Denmark), Vivace (Renaissance yeast, Canada), X5 (Laffort, France)] κατά την αλκοολική ζύμωση γλεύκους της ελληνικής ποικιλίας Μαλαγουζιά. Σε κάθε εμπορικό σκεύασμα έγινε επέμβαση με δύο διαφορετικά επίπεδα θρέψης με οργανικό άζωτο (Springferm, Fermentis, France) 15 και 30 g/hL, σε τρία διαφορετικά στάδια της ζύμωσης 0, 24 και 48h μετά τον εμβολιασμό. Όλες οι επεμβάσεις έγιναν σε δύο επαναλήψεις, σύνολο 18 μικροοινοποιήσεις. Η εξέλιξη των ζυμώσεων ελεγχόταν καθημερινά ενώ το τέλος τους πιστοποιήθηκε με μέτρηση της πυκνότητας και των υπολειπόμενων σακχάρων. Μετά από διαδικασίες σταθεροποίησης οι οίνοι εμφιαλώθηκαν.

Στους τελικούς οίνους, αρχικά, έγινε προσδιορισμός της ολικής οξύτητας και του pH σύμφωνα με τις μεθόδους του OIV, ενώ ακολούθησε προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των κύριων οργανικών οξέων που συμβάλουν στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου (κιτρικό, τρυγικό, μηλικό, ηλεκτρικό, γαλακτικό, οξικό) καθώς και των συγκεντρώσεων της αιθανόλης και της γλυκερόλης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC). Τέλος, με Αέρια Χρωματογραφία και ανίχνευση Χρωματογράφου Μάζας (GC-MS) ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι πτητικές ενώσεις που προέρχονται από τη δράση των ζυμών (δευτερογενή προϊόντα ζύμωσης), όπως κάποιες ανώτερες αλκοόλες (Higher Alcohols), εστέρες των ανώτερων αλκοολών με οξικό οξύ (Acetates) και εστέρες των λιπαρών οξέων (Ethyl Esters). Απώτερος σκοπός του πειραματικού σχεδιασμού ήταν η ανίχνευση συσχετίσεων ή μη των συστατικών που αναφέρθηκαν με το διαφορετικό στέλεχος ζύμης που έφερε σε πέρας την αλκοολική ζύμωση, το διαφορετικό επίπεδο θρέψης οργανικού αζώτου και της επίδρασης του χρόνου προσθήκης του.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ζύμη Vivace μπορεί να δώσει πιο «μαλακούς» ή «στρογγυλούς» οίνους, γευστικά, καθώς οι οίνοι που παρήχθησαν με τη χρήση της είχαν χαμηλότερη οξύτητα και υψηλότερη γλυκερόλη. Αρωματικά, η ζύμη Melody δείχνει να παράγει περισσότερες ανώτερες αλκοόλες, ενώ η ζύμη Vivace περισσότερους εστέρες ανώτερων αλκοολών και λιγότερους εστέρες λιπαρών οξέων.

Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις προστιθέμενου οργανικού αζώτου δεν επηρέασαν του τελικούς οίνους, παρά μόνο στα πτητικά συστατικά τους, τα οποία επηρεάστηκαν σε διαφορετικό βαθμό για την κάθε ζύμη. Παρατηρήθηκε μία γενική αύξηση της συγκέντρωσης των πτητικών στην υψηλή συγκέντρωση προστιθέμενου οργανικού αζώτου για τις ανώτερες αλκοόλες και τους εστέρες τους, ενώ το αντίθετο συνέβη στους εστέρες των λιπαρών οξέων, όπου παρατηρήθηκε μία γενική μείωση.

Τέλος, η χρονική στιγμή προσθήκης του οργανικού αζώτου επηρέασε μόνο τη συγκέντρωση των πτητικών συστατικών και μάλιστα με διαφορετικά αποτελέσματα για το κάθε εμπορικό σκεύασμα ζύμης. Η καθυστερημένη, από την έναρξη της ζύμωσης, προσθήκη οργανικού αζώτου, κατά τη ζύμωση με το σκεύασμα Melody δείχνει να επιδρά αρνητικά στην παραγωγή ανώτερων αλκοολών, σε αντίθεση με τους εστέρες τους που φαίνονται να αυξάνονται. Για την ζύμη Vinace φαίνεται ότι οι περισσότερες πτητικές ενώσεις, που ταυτοποιήθηκαν, αυξήθηκαν για αργότερους χρόνους προσθήκης του οργανικού αζώτου. Τέλος, για το σκεύασμα X5, οι μετρήσεις έδειξαν, ότι η παραγωγή πτητικών ουσιών από τις ζύμες δεν επηρεάζεται από τον χρόνο προσθήκης του οργανικού αζώτου. Επομένως, ο κατάλληλος χρόνος προσθήκης του οργανικού αζώτου εξαρτάται από το εμπορικό σκεύασμα ζυμομύκητα που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

**Επιστημονική περιοχή:** Οινολογία

**Λέξεις κλειδιά:** Μαλαγουζιά, οργανικό άζωτο, χρόνος προσθήκης, πτητικά συστατικά, εμπορικές ζύμες, HPLC, GCMS

## **Impact of organic nitrogen on the growth of different yeast strains regarding the qualitative characteristics of the produced wine**

*MSc Viticulture & Oenology  
Department of Food Science & Human Nutrition  
Laboratory of Oenology  
Department of Crop Science  
Laboratory of Viticulture*

### **ABSTRACT**

A lot of research has been done around volatile compounds of wine, which are derived from alcoholic fermentation as secondary metabolites, as they are considered to be the main characteristic of wine quality. Malagouzia is one of the most aromatic and popular white varieties in Greece. In this study, Malagouzia wines were produced using three different commercial yeasts [Melody (CHR Hansen, Denmark), Vivace (Renaissance yeast, Canada), X5 (Laffort, France)], with the addition of two different concentrations of organic nitrogen (15, 30g/hL) at three different addition times (0,24,48 hours after inoculation). The wines were studied in order to determine the influence of N nutrition and its adding timing on the aroma profile.

The volatile compounds were determined using Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS)( fullscan for the qualitative and SIM (Selected Ion Monitoring) for the quantitative determination of compounds), after l/l extraction of the wine samples with dichloromethane.

Several aroma compounds were detected revealing a complex aroma profile mostly composed of alcohols, esters and terpenes. These results suggest that the concentration and timing of nitrogen addition can alter the concentration of certain aroma compounds and might provide the means to modify the volatile compound concentration of Malagouzia wine.

**Scientific area:** Oenology

**Key words:** Malagouzia, organic Nitrogen, addition timing, volatile compounds, commercial yeasts, HPLC, GCMS

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1. ΣΤΑΦΥΛΗ.....	11
1.1 Γενικά.....	11
1.2 Ανατομία ράγας.....	12
1.3. Στάδια ανάπτυξης ράγας.....	14
1.4. Χημική σύσταση σταφυλής.....	17
1.5. Χημική Σύσταση Γλεύκους.....	18
1.6. Μαλαγουζιά.....	20
2. ΟΙΝΟΣ.....	21
2.1 Αλκοολική ζύμωση.....	21
2.1 Ζυμομύκητες και θρέψη.....	24
2.2.1. Εμπορικές ζύμες.....	24
2.2.2. Φυσική μικροχλωρίδα σταφυλιού.....	24
2.2.3 Το άζωτο και η σημασία του.....	25
2.2.3.1 Τα θρεπτικά στοιχεία και ο ρόλος τους στον μεταβολισμό και τη φυσιολογία της αμπέλου.....	25
2.2.3.2 Αζωτούχος θρέψη των ζυμομυκήτων κατά την αλκοολική ζύμωση.....	26
2.2.4 Οι ζυμομύκητες στην σταφυλή και στην αλκοολική ζύμωση.....	30
2.2.5 Εμπορικά παρασκευάσματα ζύμης.....	32
2.3 Λευκή Οινοποίηση.....	33
2.4 Χημική σύσταση οίνου.....	37
2.5 Πτητικά συστατικά οίνου.....	39
2.5.1 Το άρωμα των οίνων.....	39
2.5.2 Πρωτογενές άρωμα.....	43
2.5.3 Δευτερογενές και τριτογενές άρωμα.....	44
2.5.3.1 Εστέρες.....	44
2.5.3.2 Αλκοόλες.....	46
2.5.3.3 Οξέα.....	48
2.5.3.4 Θειούχες Ενώσεις.....	49
2.5.3.5 Πτητικές φαινόλες.....	50
2.5.3.6 Λακτόνες.....	51
2.5.3.7 Ακετάλες.....	52
3. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....	53
3.1 Παρασκευή – προετοιμασία δειγμάτων οίνου.....	53

3.2 Ανάλυση οξέων-αλκοολών με HPLC .....	56
3.3 Εκχύλιση πτητικών συστατικών .....	57
3.4 Ανάλυση πτητικών συστατικών με GC-MS .....	58
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	60
4.1 Επίδραση της ζύμης .....	60
4.2 Επίδραση της προστιθέμενης ποσότητας οργανικού αζώτου.....	64
4.3 Επίδραση του χρόνου προσθήκης του οργανικού αζώτου .....	68
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	77

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δομή ώριμης ράγας.....	13
Εικόνα 2: Ενδοκάρπιο, Μεσοκάρπιο A & B .....	13
Εικόνα 3: Κυτταρική δομή Εξωκαρπίου, Μεσοκαρπίου και Ενδοκαρπίου .....	14
Εικόνα 4: Εξέλιξη της ανάπτυξης των ραγών .....	16
Εικόνα 5: Μεταβολές στα επίπεδα σακχάρων και οξέων κατά την ανάπτυξη άγας.....	17
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση αλκοολικής ζύμωσης στο κύτταρο ζύμης.....	23
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση πηγών και δεξαμενών αζώτου από τον αμπελώνα έως τον τελειωμένο οίνο, καθώς και τα βασικά συστατικά του οίνου που επηρεάζονται από το άζωτο.....	28
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση λευκής οينوποίησης.....	36
Εικόνα 9: Δέσμευση θειώδους ανυδρίτη από την αλδευδική-κετονική ομάδα των C6 σακχάρων.....	38
Εικόνα 10: Μικροβιακός σχηματισμός ανώτερων αλκοολών από αμινοξέα.....	39
Εικόνα 11: Παραδείγματα βασικών οσμηρών-πτητικών ενώσεων στα τρόφιμα (Belitzetal., 2009).....	40
Εικόνα 12: Τιμές κατώφλιου αντίληψης διάφορων «αρωματικών» (πτητικών) ενώσεων σε νερό στους 20°C (Belitzetal., 2009) .....	41
Εικόνα 13: Εστέρες και αρώματα που προσδίδουν στον οίνο (Παληγογιάννη, 2007) .....	44
Εικόνα 14: Συγκεντρώσεις από κάποιες αλκοόλες σε οίνους και μπίρα και το κατώφλι αντίληψης οσμής αυτών (Maarse, 1991) .....	48
Εικόνα 15: Φουρανόνες που συναντιούνται στα τρόφιμα .....	51

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χημική σύσταση βοστρύχων.....	17
Πίνακας 2: Χημική σύσταση του φλοιού .....	18
Πίνακας 3: Χημική σύσταση γιγάρτων .....	18
Πίνακας 4: Οι 13 ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ των 8 οίνων, και η χαρακτηριστική οσμή τους .....	55
Πίνακας 5: Πρότυπες καμπύλες αναφοράς οργανικών οξέων (μέσω HPLC) .....	57
Πίνακας 6: Πρότυπες καμπύλες αναφοράς αιθανόλης και γλυκερόλης (μέσω HPLC).....	57
Πίνακας 7: Πρότυπες καμπύλες αναφοράς των πτητικών ενώσεων (μέσω GC-MS).....	59
Πίνακας 8: Συνολική μεταβολή στις συγκεντρώσεις των επιμέρους ομάδες των πτητικών συστατικών .....	67



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Το pH των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών εμπορικών ζυμών .....	60
Διάγραμμα 2: Η Ολική Οξύτητα των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών εμπορικών ζυμών .....	60
Διάγραμμα 3: Τα οργανικά οξέα των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών εμπορικών ζυμών .....	61
Διάγραμμα 4: Η συγκέντρωση της αιθανόλης και της γλυκερόλης των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών εμπορικών ζυμών .....	62
Διάγραμμα 5: Τα 12 πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στους παραγόμενους οίνους των τριών διαφορετικών εμπορικών ζυμών .....	63
Διάγραμμα 6: Το pH των παραγόμενων οίνων των δύο προστιθέμενων συγκεντρώσεων οργανικού αζώτου .....	64
Διάγραμμα 7: Η ολική οξύτητα των παραγόμενων οίνων των δύο προστιθέμενων συγκεντρώσεων οργανικού αζώτου .....	65
Διάγραμμα 8: Τα οργανικά οξέα των παραγόμενων οίνων των δύο προστιθέμενων συγκεντρώσεων οργανικού αζώτου .....	65
Διάγραμμα 9: Η συγκέντρωση της αιθανόλης και της γλυκερόλης των παραγόμενων οίνων των δύο προστιθέμενων συγκεντρώσεων οργανικού αζώτου .....	66
Διάγραμμα 10: Τα 12 πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν των παραγόμενων οίνων των δύο προστιθέμενων συγκεντρώσεων οργανικού αζώτου .....	67
Διάγραμμα 11: Το pH των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου .....	68
Διάγραμμα 12: Η ολική οξύτητα των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου .....	69
Διάγραμμα 13: Η συγκέντρωση της αιθανόλης και της γλυκερόλης των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου .....	69
Διάγραμμα 14: Η συγκέντρωση των οργανικών οξέων των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη Melody .....	70
Διάγραμμα 15: Η συγκέντρωση των οργανικών οξέων των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη Vinace .....	70
Διάγραμμα 16: Η συγκέντρωση των οργανικών οξέων των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη X5 .....	71
Διάγραμμα 17: Τα 12 πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη Melody .....	72
Διάγραμμα 18: Τα 12 πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη Melody .....	73
Διάγραμμα 19: Τα 12 πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη Melody .....	74

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη διεξήχθη στο εργαστήριο Οινολογίας & Αλκοολούχων Ποτών του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Αμπελουργίας - Οινολογίας», υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κοτσερίδη Γεώργιου, τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την διαμόρφωση του θέματος, για την εμπιστοσύνη στην ανάθεση του συγκεκριμένου πειράματος αλλά και την υπομονή και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα. Νίκη Προξενιά μέλος ΕΔΙΠ, βαθμίδας Α, του εργαστηρίου Οινολογίας & Αλκοολούχων Ποτών του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του ΓΠΑ για την συνεχή και υπομονετική της καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά της τόσο καθ' όλη τη διάρκεια της εργαστηριακής όσο και της βιβλιογραφικής μου μελέτης. Επίσης την ευχαριστώ για την ασταμάτητη εμπύχωση που μου προσέφερε και με έκανε να πιστεύω στον εαυτό μου από την πρώτη έως την τελευταία στιγμή.

Τον κο. Πέτρο Ταραντίλη Καθηγητή του εργαστηρίου Γενικής Χημείας για την φιλοξενία του στο εργαστήριο και την μεγάλη διευκόλυνση στη χρήση του αέριου χρωματογράφου ώστε να αναλυθεί η πληθώρα των δειγμάτων.

Τον κο. Γιάννη Βουκίδη, υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Οινολογίας & Αλκοολούχων Ποτών του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του ΓΠΑ, για την πίστη του σε μένα, την ακούραστη καθοδήγησή του τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύζυγό μου που χωρίς τη βοήθεια, την υπομονή και τη στήριξή του δε θα κατόρθωνα ποτέ να ξεκινήσω αλλά και να φέρω εις πέρας αυτό το μεταπτυχιακό πρόγραμμα.

---

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της

## A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το αμπέλι είναι, ίσως, από τα παλαιότερα φυτά που παρουσιάστηκαν στη γη και η χρησιμοποίηση των καρπών του, των σταφυλιών, για την παραγωγή οίνου χρονολογείται περίπου στο 3000 π.Χ.. Ο οίνος είναι το αποτέλεσμα της ζύμωσης του χυμού των σταφυλιών, του γλεύκους, από τους ζυμομύκητες, οι οποίοι κυρίως μετατρέπουν τα σάκχαρα του γλεύκους σε αιθανόλη. Η δημοτικότητα του συγκεκριμένου αλκοολούχου ποτού είναι υψηλή σχεδόν σε όλον τον κόσμο, και γι' αυτό η οينوβιομηχανία είναι ένας κλάδος που βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη. Η Ελλάδα, λόγω του κλίματός της και των διαφόρων γηγενών ποικιλιών που καλλιεργούνται σε διάφορα μέρη της, παράγει πολλούς οίνους ανώτερης ποιότητας. Εκτός της γνωστής ιδιότητας του οίνου που περνά από γενιά σε γενιά μέσω του ρητού «οίνος ευφραίνει καρδίαν ανθρώπου», η μέτρια κατανάλωσή του σε καθημερινή βάση έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να έχει θετικές επιπτώσεις στην υγεία.

Ο οίνος είναι ένα πολυσύνθετο μίγμα οργανικών και ανόργανων συστατικών. Ανάμεσα στις διάφορες ουσίες που περιέχονται ξεχωρίζουν τα οργανικά οξέα, που είναι υπεύθυνα για την όξινη γεύση των οίνων, τα σάκχαρα, χαρακτηριστικά των γλυκών και ημίγλυκων οίνων, οι φαινολικές ενώσεις, που επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, όπως είναι το χρώμα και η γεύση, ενώ λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, η κατανάλωση του οίνου σε μικρές ποσότητες συσχετίζεται με θετικές για την υγεία ιδιότητες και τα πτητικά συστατικά, που προσδίδουν το μοναδικό αρωματικό προφίλ του κάθε οίνου.

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκαν οίνοι της ποικιλίας Μαλαγουζιά, η οποία καλλιεργείται σε μεγάλη έκταση σε σχεδόν όλη την Ελλάδα. Η Μαλαγουζιά, λόγω του εξαιρετικού αρωματικού προφίλ των κρασιών της, κερδίζει συνεχώς έδαφος στην προτίμηση των καταναλωτών.

## 1. ΣΤΑΦΥΛΗ

### 1.1 Γενικά

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η σύσταση και επομένως και η ποιότητα του οίνου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη χημική σύσταση της σταφυλής.

Η σταφυλή ή βότρυς είναι η ταξικαρπία της αμπέλου και αποτελείται από τον ποδίσκο, τον βόστρυχο και τις ράγες. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και η χημική σύσταση της σταφυλής παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα εξαιτίας του μεγάλου βαθμού ετεροζυγωτίας που χαρακτηρίζει τις ποικιλίες της αμπέλου, της έντονης επίδρασης του περιβάλλοντος (εδαφοκλιματικές συνθήκες) και της καλλιεργητικής τεχνικής (Σταυρακάκης, 2013). Το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα, η πυκνότητα της σταφυλής και το σχήμα των ραγών είναι από τα πιο διαδεδομένα γνωρίσματα της σταφυλής της κάθε ποικιλίας.

Τα στάδια ανάπτυξης της σταφυλής από την έκπτυξη των οφθαλμών, όπου είναι ήδη σχηματισμένες, μέχρι τον τρυγητό παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην τελική ποιότητα του καρπού. Τα στάδια αυτά, εν συντομία, είναι:

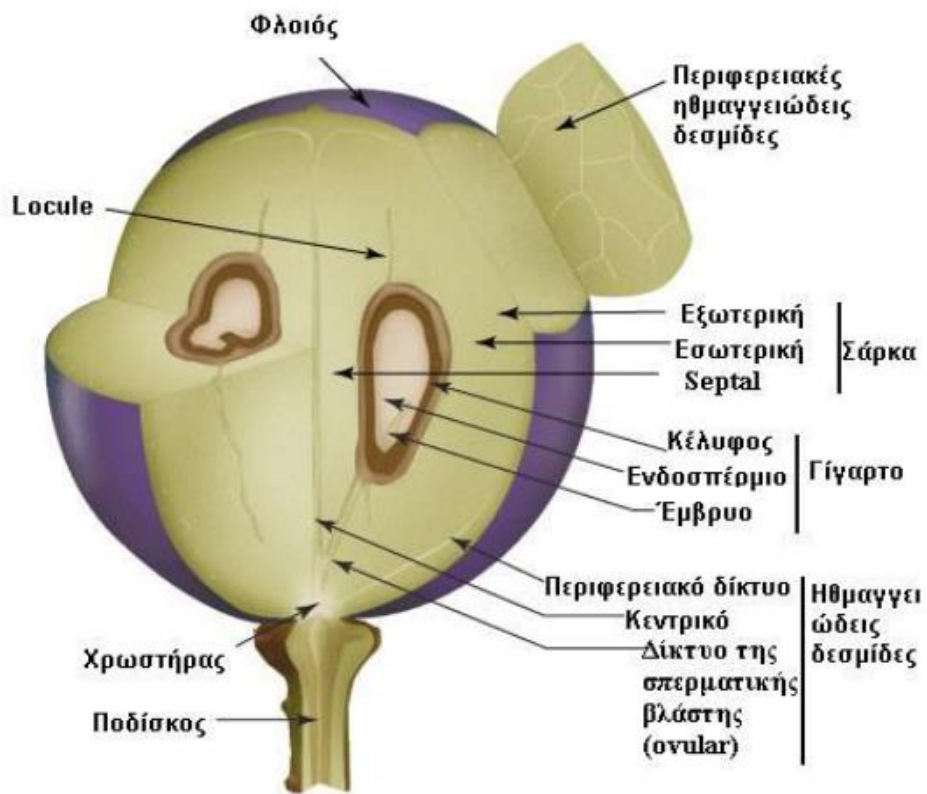
- Η άνθιση, η οποία ολοκληρώνεται σε δύο στάδια: την απόπτωση των πιλιδίων και την διάρρηξη των ανθών
- Η επικονίαση όπου επικρατεί η αυτογαμία (επικονίαση και γονιμοποίηση με γύρη από το ίδιο άνθος)
- Η γονιμοποίηση όπου ο γυρεόκοκκος, αφού από το προηγούμενο στάδιο βρεθεί στο στίγμα του υπέρου, εκβλαστώνει και σχηματίζει το γυρεοσωλήνα ο οποίος και θα εναποθέσει τους πυρήνες στον εμβρυόσακο
- Η καρπόδεση, που είναι η επιτυχής εξέλιξη της επικονίασης και γονιμοποίησης, δηλαδή η επιτυχής μετατροπή της σπερματικής βλάστης σε γίγαρτο και της ωοθήκης σε ράγα (Σταυρακάκης, 2013)

## 1.2 Ανατομία ράγας

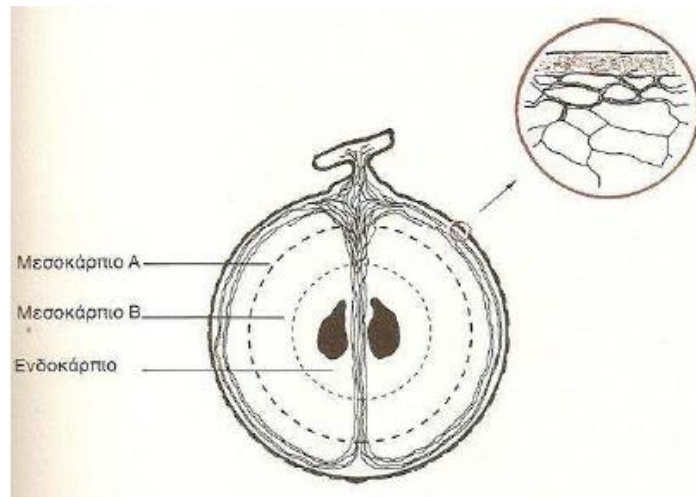
Η ράγα προσφύεται στο βόστρυχο με τον ποδίσκο που παρουσιάζει χαρακτηριστικά διευρυμένη βάση την κολλύρα. Το αγγειακό σύστημα του ποδίσκου εισέρχεται εντός της ράγας και σχηματίζει το χρωστήρα. Η ανατομική δομή της ώριμης ράγας περιλαμβάνει τον φλοιό ή εξωκάρπιο, τη σάρκα, τα γίγαρτα και το αγγειακό σύστημα.

Το περικάρπιο είναι όλο το μέρος της ράγας πλην των γιγάρτων και αποτελείται από τρεις ανατομικά διακριτούς ιστούς:

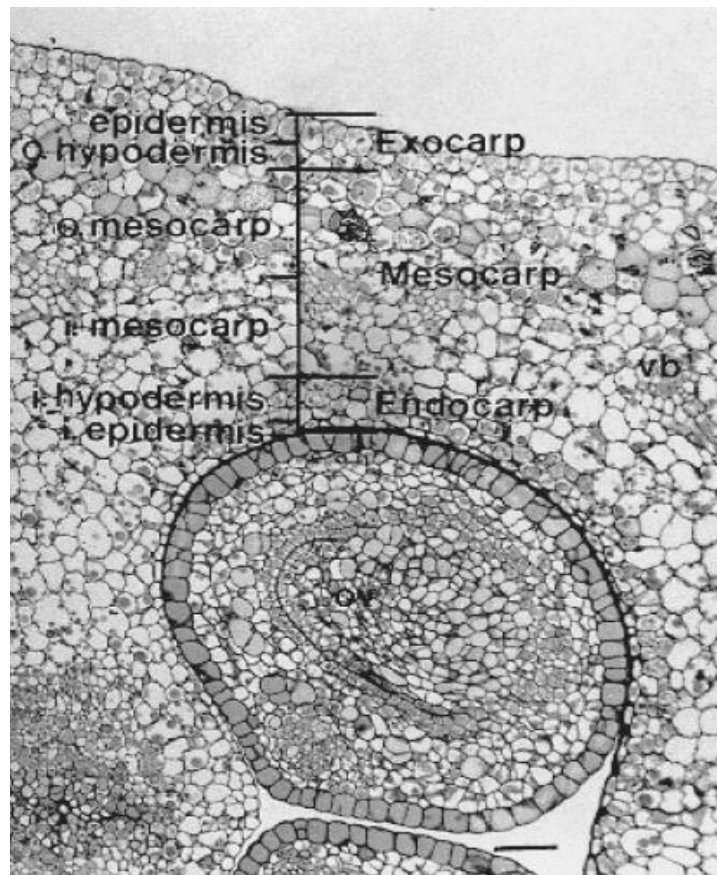
1. Το εξωκάρπιο ή αλλιώς φλοιό. Αποτελείται από την εφυμένίδα που είναι και το εξωτερικότερο στρώμα κυττάρων που καλύπτει τη ράγα και εξωτερικά καλύπτεται από λεπτό κυρώδες στρώμα το οποίο προστατεύει τη ράγα και στο οποίο προσκολλούνται οι γηγενείς ζύμες. Την επιδερμίδα που αποτελείται από μια στιβάδα κυττάρων με ανθεκτικά τοιχώματα, χλωροπλάστες και στομάτια. Τέλος το υπόδερμα που αποτελείται από 6-10 στιβάδες κυττάρων τα οποία κατά την ωρίμανση δεν αυξάνονται σε αριθμό αλλά μόνο σε μέγεθος.
2. Το μεσοκάρπιο ή αλλιώς σάρκα αποτελείται από 25-30 στιβάδες κυττάρων. Εκεί περιέχεται η μεγαλύτερη ποσότητα χυμού που θα δώσει το γλεύκος κατά την οινοποίηση.
3. Το ενδοκάρπιο είναι η ζώνη κυττάρων που διαχωρίζει το σάρκα από τα γίγαρτα.(Σταυρακάκης, 2013).



Εικόνα 1: Δομή ώριμης ράγας



Εικόνα 2: Ενδοκάρπιο, Μεσοκάρπιο Α & Β



Εικόνα 3: Κυτταρική δομή Εξωκαρπίου, Μεσοκαρπίου και Ενδοκαρπίου

### 1.3. Στάδια ανάπτυξης ράγας

Η ράγα αποτελεί ουσιαστικά ένα ανεξάρτητο βιοχημικό εργοστάσιο (Gholami et al., 1995). Μετά την άνθιση, όλες αυτές οι βιοχημικές αλλά και μοριακές μεταβολές έχουν ως συνέπεια μορφολογικές και φυσιολογικές μεταβολές, που επιφέρουν την ανάπτυξη του τοίχους της ωοθήκης σε αυτό που ονομάζεται περικάρπιο. Η ανάπτυξη του περικαρπίου, θεωρείται ότι είναι η εξελικτική επιλογή για την προστασία και τη διασπορά των σπόρων, και στην περίπτωση της ράγας του σταφυλιού, των γιγάρτων (Hardie et al., 1996). Η ανάπτυξη της ράγας πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικές περιόδους οι οποίες έχουν τη μορφή δυο διαδοχικών σιγμοειδών καμπυλών οι οποίες διαχωρίζονται από το στάδιο ανάσχεσης (ή lag phase).

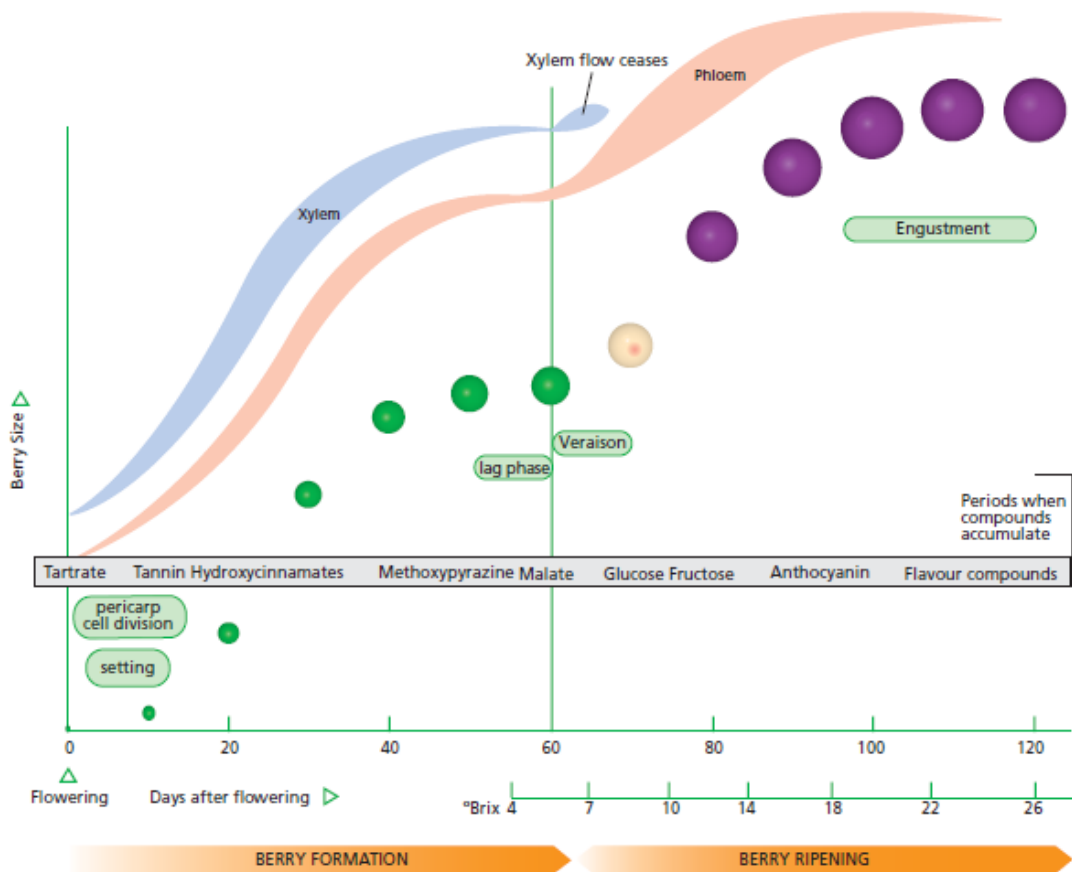
Η πρώτη περίοδος αύξησης διαρκεί από την άνθιση έως 60 περίπου μέρες μετά. Κατά την πρώτη αυτή περίοδο σχηματίζεται η ράγα και τα έμβρυα. Χαρακτηρίζεται από την έντονη κυτταροδιαίρεση στο τέλος της οποίας, που είναι και το τέλος της περιόδου, έχει σχηματιστεί το σύνολο των κυτάρων της ράγας που εν μέρει καθορίζουν και το μέγεθός της.

Κατά την πρώτη περίοδο ανάπτυξης, η ράγα, η οποία είναι πράσινη και φέρει στομάτια (και επομένως φωτοσυνθέτει), αυξάνεται σε μέγεθος καθώς συσσωρεύονται σε αυτήν διάφορα συστατικά (μέχρι τον περκασμό-veraison όπου το φαινόμενο κορυφώνεται). Τα οξέα που επικρατούν είναι το τρυγικό και το μηλικό τα οποία όμως δεν κατανέμονται

ομοιόμορφα στη ράγα, αλλά το τρυγικό παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση στα εξωτερικά στρώματα της ράγας, ενώ το μηλικό στη σάρκα. Επίσης, η συσσωρεύσή τους παρατηρείται σε διαφορετική χρονική περίοδο. Το τρυγικό συγκεντρώνεται κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης, ενώ το μηλικό πριν τον περκασμό. Αυτά τα οξέα είναι αυτά, που κατά κύριο λόγο, αποτελούν την ολική οξύτητα του οίνου και ως εκ τούτου παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην ποιότητα του παραγόμενου οίνου. Κατά τα πρώτα στάδια της περιόδου αυτής αυξάνεται η συγκέντρωση των υδροξικυκλικών οξέων στη σάρκα και το φλοιό και είναι σημαντικά ως πρόδρομα μόρια στο σχηματισμό πτητικών φαινολών, αλλά και λόγω του ρόλου τους στις αντιδράσεις αμαύρωσης. Σε αυτό το πρώτο στάδιο παράγονται και οι τανίνες συμπεριλαμβανομένων και των μονομερών κατεχινών. Βρίσκονται στους ιστούς του φλοιού και των γιγάρτων, αλλά όχι σε αυτούς της σάρκας. Προσδίδουν πικρή γεύση και στυφή αίσθηση στους οίνους αλλά παίζουν και σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του χρώματος (ερυθροί οίνοι). Επίσης, μέταλλα, αμινοξέα, μικροστοιχεία και πτητικές ενώσεις (μεθοξυπιραζίνες) συγκεντρώνονται στη ράγα κατά το στάδιο αυτό.

Η δεύτερη περίοδος ανάπτυξης ή περίοδος ωρίμανσης σηματοδοτείται από τον περκασμό, κατά τον οποίο παρατηρείται εμφάνιση χρώματος στον φλοιό, αλλά και μαλάκωμα της ράγας. Βασικό χαρακτηριστικό της φάσης αυτής είναι ο διπλασιασμός της ράγας σε μέγεθος από τον περκασμό έως την ωρίμανση. Η αύξηση αυτή σε μέγεθος επιφέρει μείωση των συγκεντρώσεων των κάποιων ουσιών που παρήχθησαν στη πρώτη περίοδο λόγω αραίωσης. Άλλες πάλι μειώνονται (οξέα) για την παραγωγή από αυτές άλλων ουσιών. Οι τανίνες επίσης μειώνονται. Η συγκέντρωση των τανινών των γιγάρτων στο διάλυμα μειώνονται λόγω δέσμευσή τους στην εξωτερική στιβάδα των γιγάρτων αλλά και λόγω μεταβολής της σύστασής τους κι έτσι μειώνεται και η πικρή γεύση του παραγόμενου οίνου. Οι τανίνες των φλοιών μειώνονται ή παραμένουν σταθερές αλλά λόγω της μεταβολής του μεγέθους τους, που αυξάνει σημαντικά, μειώνεται η στυφή αίσθηση στον παραγόμενο οίνο. Επίσης, αλληλεπιδρούν με τις πηκτίνες και τις ανθοκυάνες και επομένως επηρεάζουν το χρώμα και την υφή του οίνου. Άλλες ενώσεις που μειώνονται είναι οι μεθοξυπιραζίνες κι έτσι μειώνονται τα χορτώδη αρώματα του οίνου.

Παρόλες αυτές τις μεταβολές των ενώσεων, η σημαντικότερη μεταβολή στη ράγα είναι η αύξηση στις συγκεντρώσεις ενώσεων, κυριότερες εκ τω οποίων είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, αλλά και των ανθοκυανών και διαφόρων πρόδρομων πτητικών συστατικών (ενώσεις που καθίστανται πτητικές μόνο μετά την αλκοολική ζύμωση ή/και την ωρίμανση). Επίσης, τα επίπεδα των αμινοξέων είναι περίπου διπλάσια κατά την ωρίμανση σε σχέση με τον περκασμό.



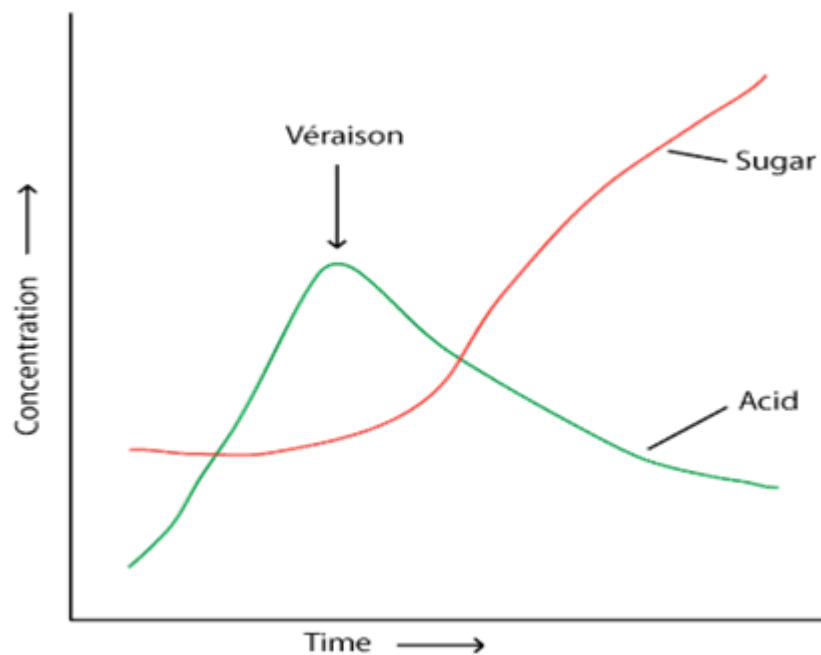
Εικόνα 4: Εξέλιξη της ανάπτυξης των ραγών

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζονται το σχετικό μέγεθος και χρώματος ράγας ανά δεκαήμερο, μετά την άνθιση, καθώς και τα κυριότερα στάδια ανάπτυξης. Επίσης παρουσιάζονται οι περίοδοι συγκέντρωσης διαφόρων ενώσεων, τα επίπεδα οBrix του χυμού, καθώς και ένα διάγραμμα του ρυθμού εισροής των χυμών από το ξύλο και τον ηθμό στη ράγα (Εικονογράφηση: JordanKoutroumanidis, Winetitles).

Γενικά κατά το πρώτο στάδιο ανάπτυξης συσσωρεύονται στη ράγα οξέα ενώ τα επίπεδα σακχάρων είναι πολύ χαμηλά.

Κατά το δεύτερο στάδιο ανάπτυξης- ωρίμανσης συσσωρεύονται σάκχαρα έως την πλήρη ωρίμανση. Οι πρωτεΐνες επίσης αυξάνονται μετά τον περκασμό και ακολουθούν παράλληλη με τα σάκχαρα πορεία.





Εικόνα 5: Μεταβολές στα επίπεδα σακχάρων και οξέων κατά την ανάπτυξη της ράγας.

#### 1.4. Χημική σύσταση σταφυλής

Η σταφυλή αποτελείται από το βόστρυχο και τις ράγες. Κατά την πλήρη ωρίμανση, ανάλογα με την ποικιλία, η εκατοστιαία αναλογία του βοστρύχου επί του βάρους της σταφυλής κυμαίνεται μεταξύ 1.5 και 7.5%.

Η χημική σύσταση των βοστρύχων παρουσιάζεται στον Πίνακα 1:

Πίνακας 1: Χημική σύσταση βοστρύχων

Νερό	65-85%
Σάκχαρα	1%
Τανίνες	2-4%
Αζωτούχες ουσίες	1-1.5%
Ανόργανες ουσίες	2-2.5%
Ρητίνες	1%
Διάφορα οργανικά οξέα	0.5-2%

Τα ανόργανα συστατικά του βοστρύχου αποτελούνται από άλατα φωσφορικά, ασβεστίου και καλίου.

Πίνακας 2: Χημική σύσταση του φλοιού

Νερό	75-80%
Όξινα συστατικά	1-1.5%
Ανόργανες ουσίες	1.5-2%
Τανίνες	1-2%
Αζωτούχες ουσίες	1.5-2%
Διάφορες ουσίες	10-15%

Πίνακας 3: Χημική σύσταση γιγάρτων

Νερό	36-40%
Όξινα συστατικά	1%
Ανόργανες ουσίες	2-4%
Τανίνες	5-8%
Αζωτούχες ουσίες	5%
Διάφορες ουσίες	10-15%
Ελαιώδεις ουσίες	10-20%
Υδρογονάνθρακες	34-36%

Η σάρκα των ραγών είναι το κύριο συστατικό του γλεύκους. Ο χυμός των κυττάρων της είναι περίπου το 99.5% και οι κυτταρικές μεμβράνες το 0.5%. Η σάρκα συνήθως περιέχει 65-80% νερό και 17-25% ζυμώσιμα σάκχαρα. Περιέχει, επίσης, οργανικά οξέα, αζωτούχες ενώσεις, ανόργανα άλατα, πηκτινικές ουσίες, τανίνες και αρωματικές ουσίες, πολύ λιγότερες όμως από το φλοιό. Τα ζυμώσιμα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα προσδίδουν στον οίνο τη γευστική του ισορροπία (Σουφλερός 2000, Τσέτουρας 2008).

### 1.5. Χημική Σύσταση Γλεύκους

Πρόκειται για αραιό υδατικό διάλυμα πολυσύνθετο, που η σύστασή του ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία της αμπέλου, την περιοχή καλλιέργειάς της, το βαθμό ωριμότητας των σταφυλιών και την υγιεινή κατάστασή τους. Το νερό αποτελεί το 70-80% του συνόλου του γλεύκους. Είναι βασικός διαλύτης που στον οποίο βρίσκονται διαλυμένες ή σε αιώρηση οι διάφορες ουσίες του γλεύκους. Τα σάκχαρα αποτελούν το 12-30% του γλεύκους.

Τα σάκχαρα του γλεύκους διακρίνονται σε αλδόζες με 6 άτομα άνθρακα (γλυκόζη, γαλακτόζη, μανόζη), σε αλδόζες με 5 άτομα άνθρακα (αραβινόζη, ξυλόζη), σε κετόζες με 6

άτομα άνθρακα (φρουκτόζη) και σε κετόζες με 5 άτομα άνθρακα (ξυλουλόζη, ριβουλόζη). Τα σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα μπορούν να ζυμωθούν. Αυτά είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, τα οποία προέρχονται από τη σύνθεση της σακχαρόζης στα φύλλα μέσω της φωτοσύνθεσης και αποθηκεύονται στη ράγα ως πλεόνασμα της θρέψης των γιγάρτων. Η αναλογία τους, στο γλεύκος ώριμων σταφυλιών, είναι περίπου 1:1. Στα γλεύκη μη επαρκώς ώριμων σταφυλιών, υπερτερεί η γλυκόζη, ενώ σε αυτά υπερώριμων σταφυλιών, η φρουκτόζη. Στα γλεύκη επίσης περιέχονται πολυσακχαρίτες, ομοπολυσακχαρίτες-πηκτίνες, από τα κυτταρικά τοιχώματα των φλοιών και της σάρκας. Δεν περιέχονται σε γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea* αλλά και στα γλεύκη από υγιή σταφύλια υδρολύονται από τα ενδογενή ή τα προστιθέμενα πηκτινολυτικά ένζυμα. Επίσης, περιέχονται ετεροπολυσακχαρίτες-κόμμεα (γόμες) οι οποίοι είναι διαλυτοί.

Στα γλεύκη τεχνολογικώς ώριμων σταφυλιών, τα οργανικά οξέα κυμαίνονται στα 4-12 g/L και η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται εντόνως από τις κλιματικές συνθήκες του εκάστοτε καλοκαιριού. Τα κυριότερα οξέα του γλεύκους είναι το τρυγικό, τομηλικό, το κιτρικό.

Οι φαινολικές ουσίες που περιέχονται είναι πολλές με κυριότερες τις ανθοκυάνες (προσδίδουν το κόκκινο χρώμα), φλαβόνες (υποκίτρινο χρώμα) και οι τανίνες (στυφή αίσθηση και πικρή γεύση).

Οι αζωτούχες ενώσεις, κυρίως πρωτεΐνες και αμινοξέα που περιέχονται στο γλεύκος είναι τα κύρια θρεπτικά που χρειάζονται οι ζύμες ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Το άζωτο βρίσκεται σε ανόργανη μορφή ( $\text{NH}_4^+$ ) σε ποσοστό 5% περίπου και σε οργανική 95%. Από την οργανική, το 45% περίπου αντιπροσωπεύουν τα ελεύθερα αμινοξέα, κυριότερα από τα οποία είναι η αλανίνη, το ασπαραγινικό οξύ, το γλουταμινικό οξύ (συγκέντρωση μεγαλύτερη από 100 mg/L), η προλίνη (300 mg/L), η θρεονίνη και η αργινίνη σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 50 mg/L.

Ακόμη περιέχονται αρωματικές-πρόδρομες πτητικές- ουσίες από τις οποίες παράγονται στον οίνο οι ανώτερες κ άλλες αλκοόλες, εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες, τερπενικές ενώσεις οι οποίες του προσδίδουν το χαρακτηριστικό του άρωμα και γεύση. Επίσης περιέχονται βιταμίνες: B1, B2, B3, B4, B5, B6, B12, C, που είναι πρόσθετοι παράγοντες ανάπτυξης των ζυμομυκήτων της αλκοολικής ζύμωσης, και ανόργανα συστατικά, 2-4 g/L, άλατα κυρίως των μεταλλικών στοιχείων καλίου, νατρίου, ασβεστίου, μαγνησίου, σιδήρου, χαλκού κ.ά. με ανόργανα και οργανικά οξέα. Τα ανόργανα συστατικά σχηματίζονται στους βλαστούς του φυτού και μετακινούνται στη συνέχεια στα σταφύλια, απ' όπου τελικά περνούν στο γλεύκος. Οι ανόργανες ουσίες διακρίνονται σε ανιόντα και κατιόντα. Τα κυριότερα ανιόντα που περιέχονται στο γλεύκος είναι ανιόντα  $\text{Cl}^-$  ( $\text{NaCl}$ ), ανιόντα  $\text{SO}_4^{--}$  ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), και ανιόντα  $\text{PO}_4^{--}$ . Τα φωσφορικά οξέα συμμετέχουν στους ενδιάμεσους μεταβολισμούς και στις κυριότερες χημικές μεταβολές του οίνου. Η σπουδαιότητα που παρουσιάζει ο φώσφορος οδηγεί μερικές φορές στην προσθήκη φωσφορικού αμμωνίου στο γλεύκος για την διευκόλυνση της αλκοολικής ζύμωσης.

Τα κατιόντα που περνούν από το σταφύλι στο γλεύκος και στον οίνο είναι κατιόντα  $K^+$  με περιεκτικότητα 0.1-0.8 g/L και παρουσιάζουν ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον υπό τη μορφή του οξίνου τρυγικού καλίου, κατιόντα  $Na^+$  σε περιεκτικότητα 20-200mg/L, η οποία αυξάνονται με την προσθήκη θειώδη ανυδρίτη ή μπεντονίτη κακής ποιότητας, κατιόντα  $Ca^{++}$  σε περιεκτικότητα 80-100 mg/L και  $Mg^{++}$  σε περιεκτικότητα 80-120 mg/L. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κατιόντα  $Fe^{++}/Fe^{+++}$  και  $Cu^+/Cu^{++}$  λόγω του ότι παρουσιάζουν θολώματα στον οίνο αν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ο σίδηρος έχει περιεκτικότητα στο γλεύκος 2-5 mg/L, αλλά φτάνει στονοίνο μέχρι 40-50 mg/L. Η αναλογία δισθενή και τρισθενή σιδήρου μεταβάλλεται ανάλογα με το δυναμικό οξειδοαναγωγής του οίνου. Το γλεύκος είναι πλούσιο σε χαλκό λόγω των διαφόρων ψεκασμών του αμπελιού. Αυξάνεται κατά την οينوποίηση, όπως και ο σίδηρος, λόγω της επαφής του γλεύκους με σωληνώσεις και κρουνοί (Σουφλερός, 2000).

## 1.6. Μαλαγουζιά

Η Μαλαγουζιά είναι μια πολύ ενδιαφέρουσα ποικιλία οينوποιίας με πολύ χαρακτηριστικά αρώματα, η οποία βρέθηκε στο περιθώριο για αρκετά χρόνια και έφτασε σε σημείο εξαφάνισης. Χάρη όμως στη οξύνοια κάποιων οινολόγων, καθηγητών πανεπιστημίων και οينوπαραγωγών, αναγνωρίστηκε η σημαντικότητα και η ποιότητα της ποικιλίας και με τον πολλαπλασιασμό των λίγων, γνωστών, διασωθέντων πρέμων διασώθηκε και στη συνέχεια καλλιεργήθηκε σε όλο και μεγαλύτερες εκτάσεις από τη δεκαετία του '80 και μετά. Προέλευση της εν λόγω ποικιλίας θεωρείται η δυτική Στερεά Ελλάδα (περιοχή Αιτωλοακαρνανίας, ορεινή Ναυπακτία).

Είναι συνιστώμενη στα αμπελουργικά διαμερίσματα Θράκης, Μακεδονίας, Ηπείρου, Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας, Πελοποννήσου, Ιονίων Νήσων και επιτρεπόμενη στα υπόλοιπα αμπελουργικά διαμερίσματα (Κυκλάδων, Βορείου Αιγαίου, Δωδεκανήσου και Κρήτης) άρα καλλιεργείται πλέον σχεδόν σε όλη την Ελλάδα, κυρίως στις αμπελουργικές περιοχές της Πελοποννήσου και Στερεάς Ελλάδας αλλά και με ισχυρή τάση επέκτασης στη Μακεδονία, Ήπειρο, Θεσσαλία.

Ποικιλία πρώιμη, ζυερή και παραγωγική και επομένως μπορεί να μορφωθεί σε διάφορα σχήματα. Στους παλαιούς αμπελώνες επικρατεί το χαμηλό κύπελλο και δέχεται κλάδεμα βραχύ, ενώ στους νέους αμπελώνες επικρατεί το γραμμικό σχήμα με ίδιο κλάδεμα καρποφορίας. Προσαρμόζεται και παράγει άριστα σε ελαφρά, χαλικώδη, μέσης γονιμότητας εδάφη, με επαρκή εδαφική υγρασία και σε δροσερές περιοχές. Κάτω από αυτές τις συνθήκες μπορεί να αναπτύξει στο μέγιστο το αρωματικό δυναμικό της. Είναι πολύ απαιτητική σε καλλιεργητικές επεμβάσεις και είναι πολύ ευαίσθητη στο ωίδιο, τον περονόσπορο και τον βοτρυτή αλλά και εξαιρετικά ευαίσθητη στις ιώσεις. Συχνά εμφανίζει ανθόρροια και μικρορραγία που μπορεί να οφείλονται σε προβλήματα θρέψης ή σε απότομες αλλαγές θερμοκρασίας και υγρασίας (Σταυρακάκης, 2010).

Από τις πλέον χαρισματικές ποικιλίες του ελληνικού αμπελώνα με αρωματικό δυναμικό με μεγάλη έως πολύ μεγάλη, κυλινδρική, πυκνή έως πολύ πυκνή, με μεγάλο αριθμό ραγών, σταφυλή. Φλοιός μάλλον παχύς, κίτρινος ή κιτρινοπράσινος. Σάρκα μαλακή, γλυκιά, μέτρια χυμώδης, με χαρακτηριστικό άρωμα και πολύ ευχάριστη γεύση.

Η Μαλαγουζιά δίνει γλεύκος με 210-230g/L, ολική οξύτητα 4,8-7g/L σε τρυγικό οξύ και pH 3.4-3.6 (Σταυρακάκης, 2010), ανάλογα με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες και τις καλλιεργητικές τεχνικές (terroir), που οδηγεί σε οίνους που αναδύουν καθαρά αρώματα λουλουδιών (χαμομήλι, γιασεμί, τριαντάφυλλο) και βοτάνων (δυσόσμος, βασιλικός), κίτρου, λεμονιού, λάιμ, γκρέιπφρουτ, ανανά και ροδάκινου ενώ είναι σχετικά υψηλόβαθμα (μετρίως υψηλές περιεκτικότητες σε αλκοόλη), με πλούσιο σώμα και άρωμα.

## 2. ΟΙΝΟΣ

Η ιστορία της αμπελουργίας και της οινοποίησης έχει βαθιές ρίζες στα βάθη των χιλιετιών και είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ιστορία της ανθρωπότητας. Τα παλαιότερα αρχαιολογικά στοιχεία σχετικά με την άνοδο της παραγωγής ζυμούμενων προϊόντων βασισμένων στο ρύζι, το μέλι και τα φρούτα, βρέθηκαν στη Κίνα σε τάφους που χρονολογούνται από το 7000 π.Χ. Δεδομένα χημικών αναλύσεων επιβεβαιώνουν το ξεκίνημα της οινοποίησης από το 5400 π.Χ., ενώ τα δεδομένα για τη χρήση ζυμών κατά την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης των οίνων στην αρχαία Αίγυπτο, χρονολογούνται το 3150 π.Χ. Από την Αίγυπτο και τη Μεσοποταμία, η παραγωγή ζυμούμενων αλκοολούχων ποτών διαδόθηκε στην Ευρώπη και τον Νέο Κόσμο.

Οινοποίηση είναι η φυσική διεργασία μετατροπής των σταφυλιών και κατ' επέκταση του γλεύκους σε οίνο, κάτω από τη δράση διαφόρων στελεχών ζυμομυκήτων, οι οποίοι μετατρέπουν τα σάκχαρα του γλεύκους σε αιθανόλη. Με βάση το χρώμα του ο οίνος διακρίνεται σε ερυθρό, λευκό, ροζέ ή και πορτοκαλί (orange wines), με βάση την περιεκτικότητα σε σάκχαρα σε ξηρά, ημίξηρα, ημίγλυκα και γλυκά ενώ με βάση την περιεκτικότητα σε διοξείδιο του άνθρακα διακρίνονται σε ημιαφρώδη και αφρώδη.

### 2.1 Αλκοολική ζύμωση

Ζύμωση είναι βιοχημικός μετασχηματισμός οργανικών ενώσεων, που διασπώνται σε απλούστερα συστατικά με την επενέργεια ενζύμων. Από καθαρά βιοχημικής απόψεως, η ζύμωση είναι μια ανεξάρτητη από το O<sub>2</sub>, κυτταροπλασματική διαδικασία οξειδωσης, που περιλαμβάνει συνήθως την κλασσική γλυκόλυση (αναγωγή NAD<sup>+</sup> σε NADH και προϊόν πυροσταφυλικό), η οποία δεν συνεχίζει με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο O<sub>2</sub>, αλλά με ένα επιπρόσθετο αναερόβιο στάδιο που καταλήγει στην ατελή αναγωγή του προϊόντος γλυκόλυσης και οξειδωση του ανηγμένου NADH σε NAD<sup>+</sup> ούτως ώστε να διασφαλίζεται η συνέχεια της γλυκόλυσης. Η διεργασία μετατροπής αυτού του τύπου γίνεται πάντα με την παρέμβαση μικροοργανισμών, υπό συνθήκες πρακτικώς αναερόβιες, (η ζύμωση δεν είναι αναερόβια αναπνοή) προς προϊόντα περισσότερο χρήσιμα για τον άνθρωπο σε σχέση με το υλικό εκκίνησης (Παπανικολάου, ΓΠΑ).

Χαρακτηριστικά των ζυμώσεων από σάκχαρα είναι η αναγωγή του πυροσταφυλικού, που παράγεται από τη γλυκόλυση, προς οξέα (γαλακτικό, βουτυρικό, οξικό) και αλκοόλες (αιθανόλη, ισοπροπυλική αλκοόλη) με ταυτόχρονη έκλυση αερίων (κυρίως CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>) και διαφόρων άλλων παραπροϊόντων (γλυκερόλη, ...κ.ά). Αλκοολική ζύμωση ειδικότερα

καλείται η διάσπαση των σακχάρων του γενικού τύπου  $C_6H_{12}O_6$  από τα ένζυμα των ζυμών με κύριο προϊόν την αιθανόλη (Τσακίρης, 1998).

Η αλκοολική ζύμωση αποτελεί βιοχημικό φαινόμενο κατά το οποίο τα σάκχαρα μετατρέπονται από τα ένζυμα των μικροοργανισμών, κυρίως κάποιων ζυμών, σε αιθυλική αλκοόλη (αιθανόλη) με ταυτόχρονη έκλυση  $CO_2$  και ενέργειας υπό τη μορφή θερμότητας (εξώθερμη αντίδραση με  $\Delta G = +24 \text{ kcal/μόριο γλυκόζης}$ )

Ο γενικός τύπος της αλκοολικής ζύμωσης είναι:

**Γλυκόζη**  $\xrightarrow{\text{ένζυμο ζυμάση}}$  **Αιθανόλη + Διοξειδίο του άνθρακα**

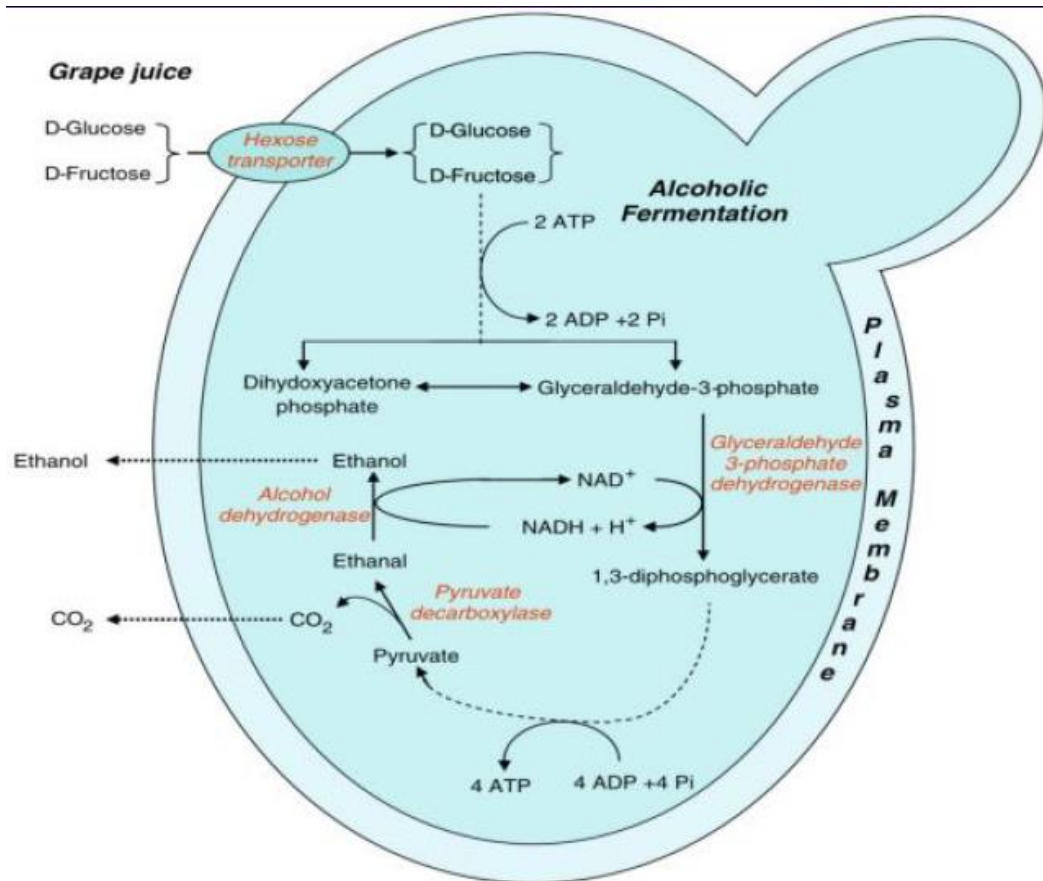


Το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα σε σακχαρούχα διαλύματα, όπου οι εμπειριεχόμενες ζύμες (φυσικά ή μετά από εμβολιασμό) παράγουν ενέργεια καταβολίζοντας τα σάκχαρα, μέσω της γλυκόλυσης, σε διοξειδίο του άνθρακα και νερό με τη χρήση του οξυγόνου ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων: αναπνοή. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην αύξηση της βιομάζας των ζυμών. Κατόπιν και αφού οι ζύμες καταναλώσουν πρακτικά το υπάρχον οξυγόνο (η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται πάντοτε με την παρουσία οξυγόνου απλά η συγκέντρωσή του είναι πάρα πολύ μικρή, περίπου το 99.9% του διαλυμένου οξυγόνου έχει χρησιμοποιηθεί από τις ζύμες για την αναπνοή προτού στραφούν στην ζύμωση), στρέφονται στη παραγωγή ενέργειας καταβολίζοντας τα εναπομείναντα σάκχαρα σε αιθανόλη και διοξειδίο του άνθρακα, με τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων ενδιάμεσους μεταβολίτες. Η ζύμωση λοιπόν λαμβάνει χώρα όταν ο αριθμός των ζυμών είναι πολύ μεγάλος, της τάξης του  $10^7$ - $10^9$  κύτταρα. Ο πολλαπλασιασμός και η δράση των ζυμών επηρεάζεται από διάφορους φυσικούς και χημικούς παράγοντες, οι σπουδαιότεροι εκ των οποίων είναι:

- Η πίεση
- Η θερμοκρασία
- Η παρουσία οξυγόνου
- Η συγκέντρωση αλκοόλης
- Οι συγκεντρώσεις των οξέων
- Η παρουσία και η συγκέντρωση αντισηπτικών-αντιοξειδωτικών ουσιών (π.χ θειώδης ανυδρίτης)
- Η συγκέντρωση των θρεπτικών, για τις ζύμες, στοιχείων- ενώσεων στο μέσο

Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στο γλεύκος των σταφυλιών, ως σακχαρούχο διάλυμα, κι έτσι με τη συνεχή μετατροπή των σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη) σε αιθανόλη παραλαμβάνεται τελικό διάλυμα με πρακτικά απουσία σακχάρων (με εξαίρεση τους φυσικούς ημίξηρους 2-18g/L, ημίγλυκους 19-40g/L ή γλυκείς οίνους >40g/L, όπου τα σάκχαρα παραμένουν σε υψηλότερα επίπεδα) και υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης της τάξεως των 11-

15%νολή και παραπάνω (για οίνους γλυκείς). Έτσι, από ένα σακχαρούχο διάλυμα, πρακτικά έναν χυμό φρούτου, παραλαμβάνεται ένα αλκοολούχο διάλυμα του οποίου τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά είναι τελείως διαφορετικά.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση αλκοολικής ζύμωσης στο κύτταρο ζύμης

Στην αλκοολική ζύμωση παρατηρούνται τέσσερα βασικά στάδια:

1. Μετατροπή της γλυκόζης σε τριοζες
2. Αφυδρογόνωση των τριοζών σε πυροσταφυλικό οξύ
3. Αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέως σε ακεταλδεΐδη
4. Αναγωγή της ακεταλδεΐδης σε αιθυλική αλκοόλη.

Για να πραγματοποιηθούν αυτά αλλά και άλλα ενδιάμεσα στάδια απαιτείται η παρουσία πολλών ενζύμων, ορισμένα συνένζυμα αλλά και ανόργανα ιόντα.

Τα βασικότερα ένζυμα στην διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης είναι:

- Η ADP, διφωσφορική αδενοσίνη, που παίζει σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς μεταφοράς ενέργειας ανάμεσα στις βιοχημικές αντιδράσεις.
- Το NAD, νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοσίδιο, το οποίο είναι μια αφυδρογονάση που καταλύει τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής

- Η TPP, αποκαρβοξυλάση, (πυροφωσφορικός εστέρας της θειαμίνης ή της βιταμίνης B1) η οποία καταλύει τις αποκαρβοξυλιώσεις, όπως εκείνη του πυροσταφυλικού σε ακεταλδεΐδη και διοξειδίο του άνθρακα
- Το CoA-SH, συνένζυμο A, που συμμετέχει κυρίως στη σύνθεση λιπαρών οξέων και λιπιδίων (Σουφλερός, 1997).

Αν και ως αλκοολική ζύμωση ορίζεται η μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη και διοξειδίο του άνθρακα, στην πραγματικότητα παράγονται πολλά άλλα δευτερογενή προϊόντα σε μικρές ποσότητες. Τέτοια είναι η γλυκερόλη, το οξικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ, η ακετόνη, η ακεταλδεΐδη, εστέρες, ανώτερες αλκοόλες, πτητικά οξέα κ.ά.

## 2.1 Ζυμομύκητες και θρέψη

### 2.2.1. Εμπορικές ζύμες

Ο ρόλος των ζυμών κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης διαπιστώθηκε από τον Paster το 1860. Στις αρχές του 1980, ο Emil Christian Hansen του εργαστηρίου της Carlsberg, απομόνωσε την πρώτη καθαρή καλλιέργεια ζύμης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο για την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης γλεύκους. Η πρακτική αυτή άρχισε να εξαπλώνεται στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα ενώ η εμπορική παραγωγή οίνου σ' όλο το κόσμο βασίστηκε στην χρήση εκκινητών καλλιέργειας.

Η προσεκτική χρήση επιλεγμένων εμπορικών στελεχών ζυμομυκήτων για τη διεξαγωγή της αλκοολικής ζύμωσης, βελτίωσε σημαντικά τον έλεγχο και την αξιοπιστία της αλκοολικής ζύμωσης των οίνων, περιόρισε την ανάπτυξη μη επιθυμητών μικροβιακών στελεχών κατά τη διάρκειά της και συνέβαλε σημαντικά στην βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των παραγόμενων οίνων.

Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται για τη σύγχρονη οινοποίηση, όπως ο *Saccharomyces cerevisiae*, πρέπει να πληρούν ορισμένες συγκεκριμένες ιδιότητες όπως: γρήγορη έναρξη αλκοολικής ζύμωσης, υψηλή αποτελεσματικότητα αλκοολικής ζύμωσης, υψηλή αντοχή στην αιθανόλη και τα θειώδη, υψηλή ωσμωτική αντίσταση, χαμηλή βέλτιστη θερμοκρασία, μέτρια παραγωγή βιομάζας, χαμηλή παραγωγή σουλφιδίων, θειολών, πτητικών οξέων, ανώτερων αλκοολών και βιογενών αμινών, ικανότητα απελευθέρωσης γλυκοσιδικών δεσμών, ικανότητα αυτόλυσης, χαμηλή παραγωγή αφρού και υψηλή παραγωγή συμπαγών ιζημάτων.

### 2.2.2. Φυσική μικροχλωρίδα σταφυλιού

Ο φλοιός των ραγών εποικείται από διάφορα είδη και στελέχη ζυμομυκήτων και βακτηριών. Τα βακτηριακά στελέχη των σταφυλιών αποτελούν περισσότερα από 50 είδη τα οποία ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των πρωτεοβακτηρίων. Η αναλογία μεταξύ της μικροχλωρίδας ζυμών και βακτηρίων καθώς και στελεχών *Saccharomyces* και non-



*Saccharomyces*, εξαρτάται από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες και είναι σημαντική για τις χημικές και οργανοληπτικές αλλαγές οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, επηρεάζοντας τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Η παρουσία νηματωδών μυκήτων από τα γένη *Aspergillus* και *Penicillium* σε μολυσμένα σταφύλια (ωίδιο, βοτρυτής), είναι ανεπιθύμητη καθώς μπορεί να οδηγήσει στη παραγωγή μυκοτοξινών οι οποίες έχουν δυσάρεστες οσμές και γεύσεις. Κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, η μικροχλωρίδα του γλεύκους αντιπροσωπεύεται κυρίως από τα φυσιολογικά υπάρχοντα είδη τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλή αντίσταση στην αιθανόλη, όπως τα είδη *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Candida* και μερικά στελέχη του *S. cerevisiae*.

Κατά την αλκοολική ζύμωση, η ποσότητα της μικροχλωρίδας του οίνου μεταβάλλεται δραματικά: ο πληθυσμός του *S. cerevisiae* κυριαρχεί έναντι ζυμών ευαίσθητων στην αιθανόλη καθώς και βακτηρίων και μυκήτων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο πλεονέκτημα του σακχαρομύκητα να προσαρμόζεται στην υψηλή ταχύτητα της ζύμωσης, το υψηλό ποσοστό αιθανόλης και τις αναερόβιες συνθήκες. Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά του σακχαρομύκητα που τον οδήγησε στην καλύτερη κατανόηση της εξέλιξης και της μορφολογίας του για την χρήση του στην οινοποίηση, είναι η ικανότητα αλκοολικής ζύμωσης υπό αερόβιες συνθήκες (Eldarou et al., 2016).

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότεροι οινοποιοί και οινολόγοι στρέφονται προς την οινοποίηση με γηγενείς ζύμες είτε με αυτόματη έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης είτε, σπανιότερα, με χρήση τυποποιημένων ζυμών τις οποίες απομόνωσαν από τους αμπελώνες από τους οποίους συλλέγονται τα σταφύλια τα οποία οινοποιούν, σε μία προσπάθεια να δώσουν ιδιαίτερο χαρακτήρα στους οίνους τους. Παρόλα αυτά η χρήση εμπορικών σκευασμάτων επιλεγμένων και συγκεκριμένων ζυμών είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται κατά κόρον ώστε να υπάρχει αποτελεσματικότερος έλεγχος της πορείας της ζύμωσης αλλά και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του παραγόμενου οίνου.

### 2.2.3 Το άζωτο και η σημασία του

#### 2.2.3.1 Τα θρεπτικά στοιχεία και ο ρόλος τους στον μεταβολισμό και τη φυσιολογία της αμπέλου

Υπάρχουν 14 στοιχεία τα οποία θεωρούνται απαραίτητα για τα ανώτερα φυτά. Αυτά διαχωρίζονται σε μακροστοιχεία (N, P, K, Ca, Mg, S) και ιχνοστοιχεία (Fe, Mn, Zn, Cu, Cl, B, Mo, Ni). Γενικά το αμπέλι θεωρείται ένα φυτό το οποίο έχει περιορισμένες απαιτήσεις σε λιπάσματα, όμως καθώς τα αποθέματα των θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος δεν επαρκούν να καλύψουν τις θρεπτικές ανάγκες των φυτών, λόγω της συνεχούς μονοκαλλιέργειας, απαιτείται η προσθήκη λιπασμάτων τα οποία θα εξασφαλίσουν τη διατήρηση της παραγωγής σε σταθερά επίπεδα κάθε χρόνο διασφαλίζοντας ταυτόχρονα και την επιθυμητή σύνθεση της σταφυλής. Οι ελλείψεις θρεπτικών στοιχείων μπορούν να επηρεάσουν το μέγεθος, το χρώμα, τη χημική σύσταση, την απόδοση και τη διάρκεια ζωής μεμονωμένων οργάνων ή και ολόκληρου του φυτού.

Το άζωτο είναι ένα από τα σημαντικότερα θρεπτικά συστατικά που απαιτούν τα φυτά προκειμένου να αναπτυχθούν επαρκώς. Τα νιτρικά ( $\text{NO}_3^-$ ) και τα αμμωνιακά ( $\text{NH}_4^+$ ) ιόντα αποτελούν τις βασικές μορφές αζώτου που απορροφώνται από τα φυτά. Συγκεκριμένα, το άζωτο αποτελεί συστατικό της χλωροφύλλης, των πρωτεϊνών, των ορμονών, των νουκλεϊκών οξέων, της λεκιθίνης, των βιταμινών και των αλκαλοειδών. Προάγει τη βλαστική ανάπτυξη (ζωηρότητα), προκαλεί καθυστέρηση στην έκπτυξη των οφθαλμών, αυξάνει το μέγεθος των βλαστών και των φύλλων, αυξάνει την ευαισθησία στην ξηρασία και στις ασθένειες, προκαλεί μείωση της σύνθεσης ρεσβερατρόλης, παρατείνει τη βλαστική περίοδο, προάγει τις ελλείψεις Fe και K. Ευνοεί την αύξηση της παραγωγής, καθυστερεί την ωρίμανση και υποβαθμίζει την ποιότητα. (Methodologies and Results in Grapevine Research, 2010). Γι' αυτό και θα πρέπει να γίνεται λελογισμένη χρήση του ως λίπασμα ώστε να προάγεται η σωστή ανάπτυξη του πρέμνου αλλά να μην υποβαθμίζεται η χημική σύσταση της σταφυλής.

Επομένως η διαχείριση της θρέψης, και δη της αζωτούχου θρέψης, της αμπέλου έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τη σύσταση των ραγών, τη συγκέντρωση και τη σύνθεση σε συστατικά ποιότητας των σταφυλών άρα και του γλεύκους και εν τέλει τη σύνθεση του οίνου.

#### 2.2.3.2 Αζωτούχος θρέψη των ζυμομυκήτων κατά την αλκοολική ζύμωση

Η διαδικασία μετατροπής του γλεύκους σε οίνο από τις ζύμες απουσία οξυγόνου είναι γνωστή ως αλκοολική ζύμωση. Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο από ζύμες του γένους *Saccharomyces* και ειδικά από τα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet 1993, Henschke 1997b, Lambrechts, 2000). Αυτές οι ζύμες βρίσκονται φυσικά στο φλοιό των ραγών, στον εξοπλισμό συγκομιδής και επεξεργασίας στο οινοποιείο ή προστίθενται ως καλλιέργεια έναρξης. Καθώς ο αρχικός πληθυσμός των ζυμών ( $1-5 \times 10^6$  κύτταρα/mL) που εμβολιάζεται στο γλεύκος δεν είναι συνήθως επαρκής για να ολοκληρώσει τη ζύμωση, οι ζύμες πρέπει να πολλαπλασιαστούν ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί ένας επαρκής ρυθμός ζύμωσης. Η ανάπτυξη των ζυμών όμως εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των κατάλληλων πηγών θρεπτικών στοιχείων (Henschke, 1993, Albers, 1998, Magasanik, 2002).

Το άζωτο είναι ένας σημαντικός παράγοντας ενεργοποίησης της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς η μείωση της συγκέντρωσης του στο γλεύκος επιδρά αρνητικά στον ρυθμό της ζύμωσης. Υπάρχουν περιπτώσεις που η μείωση της συγκέντρωσης του αζώτου στο γλεύκος μπορεί να προκαλέσει τη διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης (Lagunas 1982, Salmon 1989, Manginot et al. 1997). Τα σταφύλια συνήθως παρέχουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τις ζύμες και αντιπροσωπεύουν την κύρια πηγή του αζώτου στο γλεύκος, εκτός αν προστίθεται συμπλήρωμα αζώτου από τον οινοποιό. Η απόφαση σχετικά με την προσθήκη συμπληρώματος αζώτου στο γλεύκος θα πρέπει να λαμβάνεται με βάση τη μέτρηση του αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου πριν τη ζύμωση, τις συνθήκες οινοποίησης (pH, στέλεχος της ζύμης, θερμοκρασία, αερισμός) και τον τύπο του οίνου (Henschke 1997a).

Το άζωτο αποτελεί το πλέον άφθονο μακροστοιχείο του εδάφους της αμπέλου και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές λειτουργίες και διαδικασίες της αμπέλου αλλά, όπως προαναφέρθηκε, και των ζυμομυκήτων που εμπλέκονται στην αλκοολική ζύμωση (ζύμες και βακτήρια της μηλογαλακτικής ζύμωσης). Η ανάπτυξη των ζυμών, η κινητική των ζυμώσεων και οι μεταβολικές διεργασίες των γευστικών χαρακτηριστικών επηρεάζονται σημαντικά από την κατάσταση του αζώτου στο γλεύκος (Bisson, 1991, Kunkee, 1991, Henschke, 1991). Το γλεύκος τροφοδοτεί τους ζυμομύκητες με το απαραίτητο άζωτο για την ανάπτυξή τους και την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης και έτσι επηρεάζει τη σύσταση και το άρωμα του κρασιού (Ranz 1991, Henschke, 1993).

Παρόλα αυτά σε πολλές αμπελουργικές περιοχές ανά τον κόσμο, οι οποίες έχουν συμμετάσχει σε έρευνες, η περιορισμένη διαθεσιμότητα αζώτου δημιουργεί προβλήματα απορρόφησης του από τη ράγα και κατ' επέκταση μειωμένη περιεκτικότητα του στο γλεύκος. Όμως και η υψηλή συγκέντρωση του ολικού αζώτου στη ράγα δεν εξασφαλίζει πάντοτε υψηλή συγκέντρωση αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου στο γλεύκος. Γλεύκη φτωχά σε άζωτο δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, με αποτέλεσμα η χαμηλή βιομάζα ζυμομυκήτων να οδηγεί σε χαμηλό μεταβολικό ρυθμό, ο οποίος αποτελεί απόδειξη αργής ή μη-ολοκληρωμένης ζύμωσης, που έχει αρνητική επίπτωση στην ποιότητα του οίνου. Η κατάλληλη ποσότητα αφομοιώσιμου αζώτου (YAN) προωθεί τη σωστή εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης και την παραγωγή ποιοτικών οίνων (Vilanova, 2015).

Τα σταφύλια περιέχουν μία ποικιλία αζωτούχων ενώσεων (αμινοξέα, αμμωνιακά ιόντα, πουρίνες, πυριμιδίνες, πεπτιδία και πρωτεΐνες) (Σουφλερός 2000) εκ των οποίων οι πιο σημαντικές για τους ζυμομύκητες είναι τα α-αμινοξέα (πρωτογενή αμινοξέα) τα οποία παράγονται στα κύτταρα των σταφυλιών για να επιτρέψει- προωθήσει την ανάπτυξη και λειτουργία τους, τα αμμωνιακά ιόντα τα οποία προέρχονται κυρίως από την αυτόλυση των ζυμών και τα ολιγοπεπτιδία, γνωστές ως YAN ή αφομοιώσιμο από τους ζυμομύκητες άζωτο (Jiraneketal., 1995). Η προλίνη αποτελεί το κυρίαρχο αμινοξύ σε πολλές ποικιλίες σταφυλιών και δεν μπορεί να μεταβολιστεί υπό αναερόβιες συνθήκες. Επίσης η υδροξυπρολίνη και τα δευτεροταγή αμινοξέα δεν μεταβολίζονται υπό συνθήκες οينوποίησης.

Οι κύριες πηγές αφομοιώσιμου αζώτου που υπάρχουν στο χυμό των σταφυλιών, είναι το αμμώνιο, τα α-αμινοξέα και σε μικρότερο βαθμό τα ολιγοπεπτιδία. Κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της αλκοολικής ζύμωσης, οι ενώσεις αυτές καταναλώνονται ταχύτατα από τις ζύμες, καλύπτοντας έτσι τις βιοσυνθετικές απαιτήσεις τους για αμινοξέα, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών και την ανάπτυξή τους. Επειδή τα αμινοξέα είναι χημικώς διαφοροποιημένα μόρια, ο πιο εύκολος τρόπος μέτρησης του αφομοιώσιμου αζώτου σχετίζεται με τον προσδιορισμό των ελεύθερων ή α-αμινοξέων και συνήθως αναφέρεται ως ελεύθερο άζωτο αμινοξέων (FAN). Υπάρχουν αρκετές χημικές, ενζυμικές και φυσικές μέθοδοι οι οποίες είναι διαθέσιμες αλλά συνήθως χρησιμοποιείται η μέθοδος της ο-phthaldialdehyde/Nacetyl-L-cysteine (NOPA) (Ugliano, 2007).

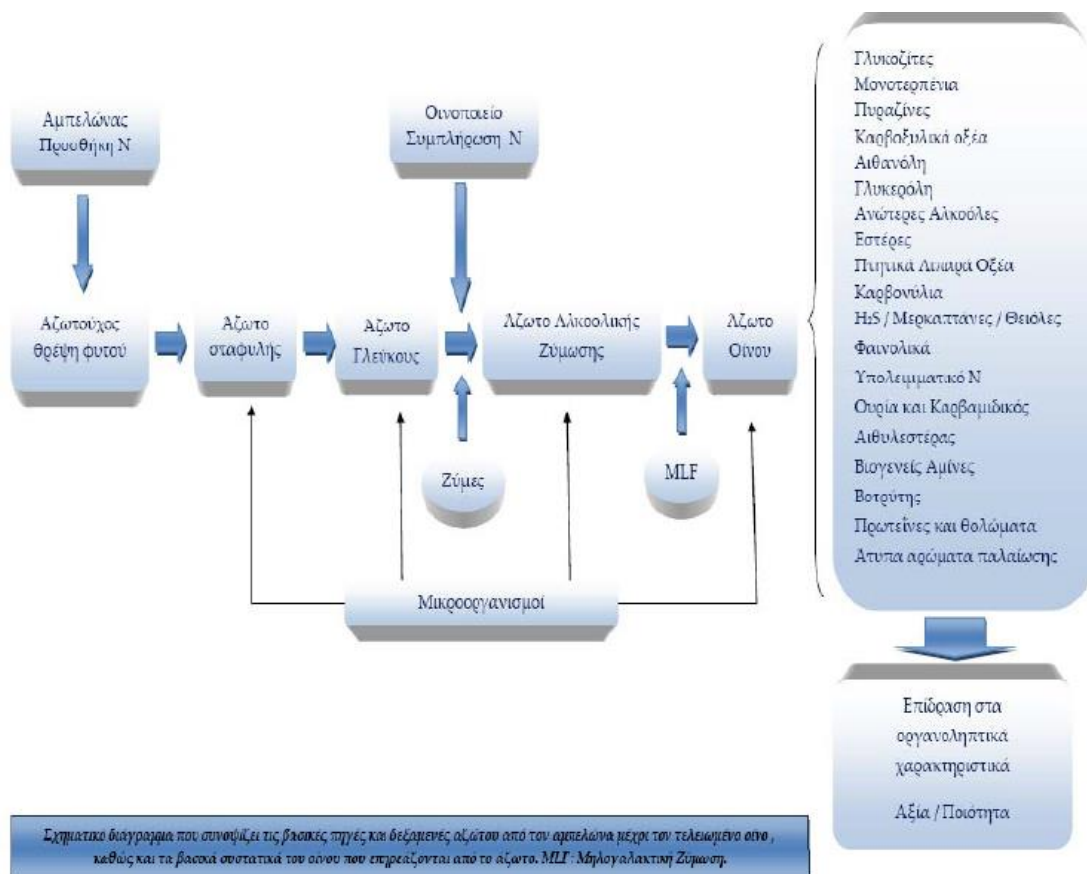
Οι ζύμες μπορούν να αφομοιώσουν περίπου 400 mgN/L σε γλεύκη πλούσια σε άζωτο ενώ η ελάχιστη συγκέντρωση προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος για μία ανεπιτυχή ζύμωση είναι περίπου 140 mgN/L, όπως έχει εδραιωθεί από διάφορες πειραματικές μελέτες (Agenbach, 1977 και Bely, 1990). Συγκέντρωση που είναι ίση ή υπερβαίνει τα 140 mgN/L, θεωρείται γενικά το κατώφλι για την ολοκλήρωση μιας αλκοολικής ζύμωσης. Γενικά συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 150mgN/L μπορεί να οδηγήσουν σε προβληματική ζύμωση (Henschke, 1993) με αποτέλεσμα να αυξάνει το μεταβολικό στρες και να μειώνεται ο ρυθμός απόδοσης βιομάζας των ζυμών, που οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σουλφιδίων (κυρίως δισουλφιδίων: ανεπιθύμητων θειούχων πτητικών ενώσεων που υποβαθμίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου), υψηλής ποσότητας στερεών, υψηλών θερμοκρασιών, που οδηγούν σε ταχύτερη εξέλιξη της ζύμωσης και μείωση των δευτερογενών αρωματικών χαρακτηριστικών του παραγόμενου οίνου καθώς και υψηλής συγκέντρωσης αζύμωτων σακχάρων άρα ατελείς “κολλημένες” (sluggish) ζυμώσεις με αποτέλεσμα μη ξηρούς οίνους και αυξημένο κίνδυνο προσβολής των σακχάρων αυτών από μικροοργανισμούς (οξικά βακτήρια). Προκειμένου να αποφευχθούν αυτά τα προβλήματα είναι απαραίτητη η μέτρηση YAN στο γλεύκος. Έτσι, εάν εξακριβωθεί έλλειψη αφομοιώσιμου αζώτου (YAN), η θρέψη του γλεύκους με ανόργανο άζωτο υπό τη μορφή αμμωνιακών αλάτων, όπως το φωσφορικό διαμμώνιο (DAP), μπορεί να μειώσει τέτοιους κινδύνους και να βελτιώσει εν γένει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

Εκτός από την επίδραση στην κινητική ανάπτυξης των ζυμών, το YAN μπορεί να ρυθμίσει τον μεταβολισμό των ζυμών σε διάφορα επίπεδα συμπεριλαμβανομένων των διαδικασιών παραγωγής των πτητικών και μη πτητικών δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι μεταβάλλουν τη γευστική ισορροπία των οίνων. Από τις μη πτητικές ενώσεις, η γλυκερόλη, το μηλικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ, επηρεάζονται από τη πηγή αζώτου και τη συγκέντρωση. Πολλές από τις πτητικές ενώσεις που συντίθενται από τις ζύμες, μεταβάλλονται επίσης αναλόγως με τις πηγές ή/και τις συγκεντρώσεις του αζώτου. Οι πιο σημαντικές ενώσεις περιλαμβάνουν τον οξικό αιθυλεστέρα, ανώτερες αλκοόλες, μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα (MCFA) καθώς και οξέα διακλαδισμένης αλυσίδας. Οι εστέρες προσδίδουν φρουτώδη αρώματα και αρώματα λουλουδιών, οι ανώτερες αλκοόλες συνδέονται περισσότερο με οσμές διαλύτη ή ζυμελαίων και τα λιπαρά οξέα δίνουν οσμές που σχετίζονται με το σαπούνι, το τυρί, τον ιδρώτα ζώων και το τάγγισμα. (Torrea, 2011)

Το γλεύκος συνήθως περιέχει τη χαμηλότερη αναλογία αζώτου:αμινοξέων, η οποία κυμαίνεται 1:3-3, γεγονός που εξαρτάται από τις ιδιαίτερες καλλιεργητικές τεχνικές καθώς και την ποικιλία και το τύπο του εδάφους. Η προσθήκη DAP αυξάνει τη συγκεκριμένη αναλογία, και για γλεύκος φτωχό σε άζωτο, υπερβαίνει την αναλογία 3:1. Το DAP αποτελεί προτεινόμενη πηγή αζώτου για ζύμες που προκαλούν καταστολή του καταβολικού αζώτου (NCR), αναστέλλοντας τη μεταγραφή των γονιδίων που απαιτούνται για τη χρήση φτωχών πηγών αζώτου. Όταν οι προτιμώμενες πηγές περιοριστούν, τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη πρόσληψη και την αξιοποίηση των εναλλακτικών πηγών από-καταστέλλονται (Deed, 2011). Πιο συγκεκριμένα, μέσα πλούσια σε άζωτο απαιτούν τη σύνθεση οργανικών αζωτούχων μεταβολιτών (ειδικά αμινοξέα και νουκλεϊκά οξέα) από πρόδρομες ουσίες

άνθρακα οι οποίες προέρχονται από τη γλυκόλυση και το κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων, ενώ το ανόργανο άζωτο δημιουργείται μέσω της τρσανσαμίνωσης των αμινοξέων.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τις επιπτώσεις του ανόργανου και του οργανικού αζώτου στους πτητικούς και μη-πτητικούς μεταβολίτες τόσο των σταφυλιών όσο και των ζυμομυκήτων κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Οι περισσότερες έρευνες εστιάζουν στην ιδανική, για την τελειότερη δυνατή ζύμωση, συγκέντρωση του αζώτου, η οποία επιτυγχάνεται γενικά μέσω συμπλήρωσης με χαμηλό ποσοστό αζώτου, απολάσπωσης του γλεύκους στο καταλληλότερο στάδιο(παραμονή συγκεκριμένου ποσοστού λασπών στο γλεύκος) ή δημιουργία συνθετικού μέσου με κάποιο αμμωνιακό άλας. Πολλές μελέτες έχουν εξετάσει την επίδραση της συγκέντρωσης YAN στον σχηματισμού των μεταβολιτών των ζυμών κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, μέσω προσθήκης διαφορετικών ποσοτήτων DAP πριν αλλά και μετά τον εμβολιασμό. Είναι σημαντικό να επαναληφθεί η σημασία της μέτρησης του αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου στη ράγα ή στο γλεύκος πριν την αλκοολική ζύμωση.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση πηγών και δεξαμενών αζώτου από τον αμπελώνα έως τον τελειωμένο οίνο, καθώς και τα βασικά συστατικά του οίνου που επηρεάζονται από το άζωτο.

Συμπερασματικά, το αφομοιώσιμο άζωτο βρέθηκε να διαμορφώνει τη συγκέντρωση πολλών μεταβολιτών, τόσο των σταφυλιών όσο και των ζυμομυκήτων, οι οποίοι με τη σειρά

τους διαμορφώνουν και τις χημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες των οίνων. Από τις κυριότερες ενώσεις του οίνου, η αιθανόλη, η γλυκερόλη, τα οργανικά οξέα, ο θειώδης ανυδρίτης και τα φαινολικά μπορούν να επηρεαστούν, ενώ πτητικές ενώσεις των ζυμών όπως ανώτερες αλκοόλες, λιπαρά οξέα, οξικοί και αιθυλεστέρες, καρβονυλικές και θειούχες ενώσεις, μπορούν επίσης να μεταβληθούν. Οι πρωτογενείς αρωματικοί μεταβολίτες των σταφυλιών, όπως τα τερπένια, τα νορισοπρενοειδή, οι θειόλες και τα φαινολικά, επηρεάζονται επίσης αλλά σε μικρότερο ποσοστό. Η εξέλιξη της μεταβλητότητας των μεταβολιτών, με την προσθήκη DAP, είναι πολύπλοκη, γεγονός που εκφράζει και το πλήθος των μεταβολικών και ρυθμιστικών μονοπατιών που εμπλέκονται (Vilanova, 2015).

#### 2.2.4 Οι ζυμομύκητες στην σταφυλή και στην αλκοολική ζύμωση

Οι ζύμες βρίσκονται πάνω στις ράγες των ώριμων σταφυλιών και συγκεκριμένα πάνω στην κηρώδη ουσία που καλύπτει το φλοιό της ράγας. Η ουσία αυτή έχει τη μορφή λεπιών κάτω από τα οποία προσκολλώνται οι ζύμες. Είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, που όπως λέει και το όνομά τους, προκαλούν ζυμώσεις. Η μεταφορά τους στα σταφύλια γίνεται κυρίως από τα έντομα και κατά κύριο λόγο από τη δροσόφιλα, από το έδαφος, από άλλα σάπια υπολείμματα καρπών κλπ. Αφού τα σταφύλια συγκομιστούν και οδηγηθούν προς οινοποίηση οι ζύμες αυτές περνάνε από το φλοιό στο γλεύκος μαζί με άλλες επίσης ζύμες από τον εξοπλισμό οινοποίησης.

Οι ζύμες που απαντώνται στην σταφυλή συνήθως ανήκουν στα γένη *Metschnikowia*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Candida* και *Kloeckera* και είναι γνωστές ως άγριες ζύμες. Αν και το είδος *Saccharomyces* έχει πολύ μικρότερη παρουσία στο σταφύλι τελικά έχει επικρατήσει έναντι των άγριων ζυμών αφού έχει αναπτύξει την καλύτερη προσαρμογή στις αντίξοες συνθήκες που αναπτύσσονται κατά την αλκοολική ζύμωση. Λόγω των αναερόβιων κυρίως συνθηκών που επικρατούν στο μέσο απουσιάζει κατά την αλκοολική ζύμωση η παρουσία αερόβιων μικροοργανισμών- μυκήτων και αερόβιων βακτηρίων. Οι άγριες ζύμες, επειδή είναι προαιρετικά αερόβιοι μικροοργανισμοί, παρευρίσκονται στην αλκοολική ζύμωση και ανταγωνίζονται τον *Saccharomyces* για θρεπτικά συστατικά. Ωστόσο, στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, ανιχνεύεται ένα πολύ μικρό ποσοστό αυτών των ζυμών λόγω της όχι τόσο καλής προσαρμοστικότητάς τους στις συνθήκες αυτές (Boulton, 1996).

Οι ζύμες διαχωρίζονται σε σπορογόνες και άσπορες και ο πληθυσμός τους εξαρτάται κυρίως από το κλίμα της περιοχής καλλιέργειας των αμπελιών. Οι ζύμες που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση ανήκουν στην κλάση των Ασκομυκήτων και στο γένος των Σακχαρομυκήτων. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 4-10μm και το σχήμα τους είναι από σφαιρικό έως ελλειψοειδές, επίμηκες ή και ακανόνιστο.

Κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης παρατηρήθηκε ότι επικρατούν οι άσπορες ζύμες *Kloeckera*, (*K.apiculata*) και *Torulopsis* (*T.bacillaris*). Πολύ σύντομα αρχίζουν να επικρατούν οι σπορογόνες *Saccharomyces* και κυρίως ο *S.cerevisiae* με ζυμωτική ικανότητα μέχρι 13-14%vol. Και οι τρεις αυτές ζύμες μαζί αποτελούν το 90% του

πληθυσμού των ζυμών. Ταυτόχρονα υπάρχουν κι άλλες ζύμες, προς το τέλος της ζύμωσης, κυρίως όταν τα γλεύκη είναι πλούσια σε σάκχαρα εμφανίζεται και ο *S.bayanus*, που μπορεί να ζυμώσει μέχρι 16-18%vol.

Οι κυριότεροι ζυμομύκητες που απαντώνται στα γλεύκη και στα εν ζυμώσει γλεύκη είναι:

***Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus***: στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης η συμμετοχή του είναι μικρή αλλά με το πέρασμα του χρόνου αυξάνεται συνεχώς και φτάνει να αποτελεί το 90% του συνόλου των ζυμών. Έχει ικανότητα ζύμωσης μεγάλων ποσοτήτων σακχάρων που να οδηγούν έως και 13-14%vol. Στα αρνητικά του ζυμομύκητα είναι η μη ζύμωση της γαλακτόζης και η μια μικρή αύξηση της πηπτικής οξύτητας του οίνου.

***Saccharomyces chevalieri***: η ζυμωτική του ικανότητα είναι παρόμοια με του *S.cerevisiae*. Δεν μπορεί να μεταβολίσει τη μαλτόζη.

***Saccharomyces bayanus***: παλιότερα γνωστός ως *S. oviformis*. Έχει μεγαλύτερη ζυμωτική ικανότητα από τον *S.cerevisiae* και συνεχίζει να ζυμώνει έως και 16-18% vol. Είναι ανθεκτικός στον θειώδη ανυδρίτη και σε αυτόν οφείλεται ένα 40% των αναζυμώσεων.

***Schizosaccharomyces pombe***: έχει μεγάλη ανθεκτικότητα στο θειώδη ανυδρίτη κι έτσι μπορεί και προσβάλει τα αζύμωτα σάκχαρα στους τελειωμένους, θειωμένους οίνους. Γι' αυτό το λόγο, αν και βρίσκεται σπάνια στο γλεύκος και τον οίνο, έχει υψηλό τεχνολογικό ενδιαφέρον για την οινολογία. Έχει την ικανότητα να μετατρέπει το μηλικό οξύ σε αλκοόλη.

***Saccharomyces bailli***: αρκετά ανθεκτικός στον θειώδη ανυδρίτη, επικίνδυνος για αναζυμώσεις σε γλυκείς οίνους αλλά συναντάται στο σταφύλι πολύ σπάνια.

***Hanseniaspora uvarum* ή *Kloeckera apiculata***: ο δεύτερος είναι η ατελής μορφή του πρώτου. Έχει μικρή ζυμωτική ικανότητα που φτάνει μόλις το 3-4% vol αλλά συναντάται πολύ συχνά σε μεγάλα ποσοστά πάνω στο σταφύλι.

***Saccharomyces ludwigii***: είναι ανθεκτικός στο θειώδη ανυδρίτη και σε συνδυασμό με την υψηλή του ζυμωτική ικανότητα, 17%vol, προκαλεί συχνά προβλήματα επαναζύμωσης σε εμφιαλωμένους οίνους και παράγει μεγάλες ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα.

***Torulopsis basillaris***: προτιμά τη ζύμωση της φρουκτόζης έναντι της γλυκόζης αλλά η ζυμωτική του ικανότητα φτάνει μέχρι 6-8%vol. Παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο θειώδη ανυδρίτη.

***Brettanomyces***: σχηματίζει μυκήλιο. Ως επί το πλείστον, η παρουσία του δεν είναι επιθυμητή. Παράγει οξικό αιθυλεστέρα και ακεταμίδιο.

***Candida***: βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο σταφύλι αλλά δε ζυμώνει, αναπνέει. Σχηματίζει μυκήλιο λευκού ή υποκίτρινου χρώματος στην επιφάνεια του οίνου (ασθένεια άνθιση του οίνου). Καταναλώνει αιθυλική αλκοόλη για την ανάπτυξή του.

***Kluyveromyces thermotolerans***: μπορεί να αναπτυχθεί σε γλεύκη με υψηλή συγκέντρωση σακχάρων. Έχει την ικανότητα να ζυμώσει τη γλυκόζη αλλά και τη ραφινόζη και εκτός από αιθανόλη παράγει και γαλακτικό οξύ. Είναι ελαφρώς ευαίσθητος στο θειώδη ανυδρίτη αλλά ευαίσθητος στην αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης και γι' αυτό ο *Saccharomyces* συχνά είναι αυτός που επικρατεί στο τέλος ζυμώσεων που ξεκίνησαν με *Kluyveromyces thermotolerans*.

***Torulaspora delbrueckii***: έχει μεγαλύτερη ανεκτικότητα σε μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου όπου και συνεχίζει να αυξάνει τη βιομάζα του σε σχέση με τον *S. cerevisiae* έτσι να επικρατεί έναντι αυτού στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Όμως σε συνθήκες πλήρους αναεροβίωσης, όπως είναι οι συνθήκες οينوποίησης, παρουσιάζει μικρότερη ανάπτυξη και ζυμώνει με μικρότερο ρυθμό, μέχρι το σημείο που ο *T. Delbrueckii* εξαφανίζεται και η ζύμωση ολοκληρώνεται με τον *S. cerevisiae*. (Ramirez, 2018)

### 2.2.5 Εμπορικά παρασκευάσματα ζύμης

Η φυσική χλωρίδα του γλεύκους μπορεί να ξεκινήσει την αλκοολική ζύμωση αλλά η εξέλιξη της ζύμωσης και τα αποτελέσματα των 'άγριων' ζυμών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων είναι ασαφή. Εναλλακτικά, οι οινοποιοί χρησιμοποιούν επιλεγμένες ζύμες, με τις οποίες εμβολιάζεται το γλεύκος. Πρόκειται για στελέχη, κυρίως *Saccharomyces*, που απομονώθηκαν από φυσικές χλωρίδες σταφυλιών και διαφορετικές μικροβιολογικές, χημικές, φυσικές και οργανοληπτικές πτυχές. Τα εμπορικά στελέχη ζυμομυκήτων πωλούνται σε ξηρή μορφή μέσα σε πακέτα κενού ή σε υγρές καλλιέργειες. Το ξηρό προϊόν περιέχει ζωντανά κύτταρα ενεργής μαγιάς τα οποία πρέπει να προετοιμαστούν κατάλληλα για τον εμβολιασμό σε χυμό σταφυλιών. Έτσι εξασφαλίζεται η αριθμητική υπεροχή και η ζωηρότητα του των ζυμών στην έναρξη της ζύμωσης. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται καλύτερος έλεγχος της ζύμωσης, η οποία ονομάζεται ελεγχόμενη ή κατευθυνόμενη, αλλά και των επιθυμητών χαρακτηριστικών του κρασιού που θα παραχθεί. Αν δεν εφαρμοσθεί προσθήκη ζυμών, η αλκοολική ζύμωση λέγεται φυσική ή αυθόρμητη.

Οι τρεις εμπορικές ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν για την οινοποίηση του γλεύκους, στην παρούσα διπλωματική μελέτη ήταν: η MELODY™ (Chr. Hansen), Hvinace (VIC-23) (Renaissance) και η ZYMAFLOREX5 (Lafforte).

Η ζύμη MELODY™ είναι μίγμα τριών διαφορετικών ζυμών, των *Kluyveromyces thermotolerans* (20%), *Torulaspora delbrueckii* (20%), οι οποίοι είναι *non-Saccharomyces*, και ενός στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* (60%) το οποίο επιλέχθηκε για να παίρνει ηγετικό ρόλο κατά την αλκοολική ζύμωση αλλά και να φέρνει εις πέρας την ολοκλήρωση της κατανάλωσης των σακχάρων ακόμα και σε οίνους που η αλκοολική ζύμωση τελειώνει με υψηλές περιεκτικότητες αλκοόλης (για γλεύκη με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων). Συνιστάται για την ενίσχυση των αρωμάτων φρούτων και λουλουδιών αλλά και των «στρογγυλών» γεύσεων στα λευκά κρασιά (<https://www.chr-hansen.com/en/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/product-cards/melody>).



Η ζύμη VIVACE περιέχει ένα στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae bayanus* και ενδείκνυται για λευκή οινοποίηση. Έχει ευρύ φάσμα θερμοκρασιών στο οποίο αποδίδει (14-28°C), με ανθεκτικότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης (13°C), χαμηλή παραγωγή πτητικής οξύτητας και μέσες προς υψηλές απαιτήσεις σε άζωτο. Συνιστάται για την ανάδειξη των ποικιλιακών γνωρισμάτων λευκών ποικιλιών δροσερών κλιμάτων (όπως *Chardonnay, Riesling, Pinot Gris/Grigio, Chardonnay, Sauvignon Blanc* όπου και ενισχύει τα αρώματα αχλαδιού, μήλου και πράσινου δαμάσκηνου. (<https://www.renaissanceyeast.com/en/products/vivace>).

Η ζύμη ZYMAFLORE X5 αποτελείται από ένα γενετικά τροποποιημένο στέλεχος X το οποίο λήφθηκε μετά από την «διασταύρωση» δύο στελεχών A και B ώστε να διατηρήσει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των δύο στελεχών. Προορίζεται για την παραγωγή καθαρών, τεχνολογικών και αρωματικών λευκών και ροζέ κρασιών με υψηλή αρωματική ένταση (ποικιλιακά αρώματα τύπου θειόλης, δευτερογενή αρώματα ζύμωσης). Ποικιλίες σταφυλιών για τις οποίες ενδείκνυται είναι οι: Riesling, Sauvignon, Colombard, Rolle, Manseng αλλά και ερυθρές ποικιλίες για ροζέ κρασιά. Ενισχύει την έκφραση πτητικών αρωματικών τύπου θειόλης (4MMP) και παραγωγής αρωμάτων ζύμωσης (εστέρες). Είναι προσαρμοσμένη σε δύσκολες συνθήκες ζύμωσης, όπως η χαμηλές θερμοκρασίες ( $\leq 16^\circ\text{C}$ ) και οι χαμηλές τιμές θολρότητας (40 NTU άρα πολύ χαμηλό YAN) που δίνει τα πιο επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά με διόρθωση του αφομοιώσιμου αζώτου στα 180 mg/L. Συνιστάται για οίνους με υψηλή αρωματική ένταση και/ή με έντονο προφίλ ποικιλίας και ζύμωσης. (<https://laffort.com/en/decision-making-tools/>).

### 2.3 Λευκή Οινοποίηση

Λευκή χαρακτηρίζεται η οινοποίηση κατά την οποία από λευκές ή ερυθρές ποικιλίες σταφυλιού παρασκευάζεται «λευκός» οίνος. Ο οίνος χαρακτηρίζεται λευκός γιατί είναι διαυγής, με χρώμα που κυμαίνεται από ελαφρώς πράσινο ως χρυσοκίτρινο και αυτό δίνει την εντύπωση ότι είναι «άχρωμος».

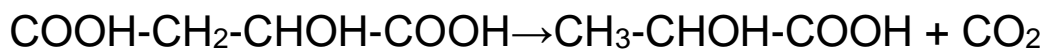
Το κυριότερο χαρακτηριστικό της λευκής οινοποίησης που τη διαφοροποιεί από την ερυθρή είναι η μη παραμονή των στέμφυλων με το χυμό, αλλά η άμεση απομάκρυνση αυτών και η παραλαβή γλεύκους με πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε χρωστικές. Επίσης, εν γένει, όλα τα στάδια της οινοποίησης γίνονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, από τα αντίστοιχα στάδια της ερυθρής και επιδιώκονται κατά το δυνατόν αναερόβιες συνθήκες για την προστασία του αρώματος από οξειδωση και του χρώματος από αμαύρωση. Ακόμα, οι κατεργασίες fining και φιλτραρίσματα είναι πιο έντονα σε σχέση με τους ερυθρούς οίνους.

Μια εξαίρεση στον κανόνα της λευκής οινοποίησης είναι η κρουεκχύλιση, η οποία κερδίζει έδαφος τα τελευταία χρόνια. Αφορά λευκά σταφύλια, όπου μετά τον απορραγισμό και την έκθλιψη αυτών, τα στέμφυλα παραμένουν σε επαφή με το γλεύκος για περιορισμένη χρονική διάρκεια (συνήθως 2-14h), πάντα πριν την έναρξη της ζύμωσης, έτσι ώστε να παραλαμβάνονται γλεύκη πλουσιότερα, κυρίως σε πρόδρομες πτητικές ενώσεις και χρωστικές από τους φλοιούς, και φαινόλες από τους φλοιούς και τα γίγαρτα. Λόγω της

χαμηλής θερμοκρασίας της εκχύλισης αυτής (<10°C) και της μικρής διάρκειας επαφής, επηρεάζεται θετικά το άρωμα και η γεύση (εντονότερο ποικιλιακό άρωμα) και ελαφρώς αρνητικά το χρώμα του οίνου.

Μια ακόμα παραλλαγή της λευκής οινοποίησης είναι η ανάδευση του φρέσκου οίνου έτσι ώστε οι λεπτές οινολάσπες να έρχονται σε επαφή με όλη τη μάζα του οίνου (bâtonnage).

Επίσης, κατά την λευκή οινοποίηση, πριν ή μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, μπορεί να λάβει χώρα η μηλογαλακτική ζύμωση, η οποία κρίνεται απαραίτητη στην παραγωγή premium τερευθρών οίνων. Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι η μετατροπή του μηλικού οξέος του οίνου ή εν ζυμώσει γλεύκους (ανάλογα με τη χρονική στιγμή έναρξης της) σε γαλακτικό από τα γαλακτικά βακτήρια. Η βιομετατροπή αυτή οδηγεί στη μείωση της ολικής οξύτητας του οίνου. Αυτό συμβαίνει καθώς από μηλικό, που έχει δύο καρβοξυλικές ομάδες (-COOH), τα βακτήρια παράγουν γαλακτικό που έχει μία καρβοξυλική ομάδα.



Επίσης, αυξάνεται ελαφρώς και η πτητική οξύτητα αφού το οξικό οξύ είναι ένα από τα παραπροϊόντα της βιομετατροπής αυτής.

Τα γαλακτικά βακτήρια αποτελούν μια ομάδα Gram(+) βακτηρίων ικανά να παράγουν γαλακτικό οξύ και από την αποδόμηση των σακχάρων. Τα γαλακτικά βακτήρια των γλευκών και των οίνων ανήκουν στα γένη *Pediococcus*, *Leuconostoc* και *Lactobacillus* (Τσακίρης, 1998).

### **Κυριότερα και συνηθέστερα στάδια της λευκής οινοποίησης**

Η διαδικασία λευκής οινοποίησης έχει ως εξής:

Τα σταφύλια παραλαμβάνονται στο οινοποιείο είτε ολόκληρα αν προέρχονται από χειρονακτικό τρύγο, είτε αποραγισμένα αν προέρχονται από μηχανικό τρύγο.

Εάν η θερμοκρασία των σταφυλιών, από το χειρονακτικό μόνο τρύγο, δεν είναι η επιθυμητή και υπάρχει δυνατότητα ψύχονται ώστε να αποφευχθεί ο ταχύς ρυθμός οξειδωσης και αμαύρωσης.

Τα σταφύλια κατόπιν ρίχνονται στην σταφυλοδόχο από όπου οδηγούνται στον εκθλυπτήρα-απορραγιστήρα, ο οποίος αποτελείται από δύο κυλίνδρους, η απόσταση των οποίων ρυθμίζεται ανάλογα με το μέγεθος των ραγών της κάθε ποικιλίας, ώστε να μην σπάνε τα γίγαρτα και απελευθερώνουν φαινόλες και λιπαρά οξέα που θα προσδώσουν στον οίνο πικρή, στυφή, «πράσινη» γεύση). Αμέσως μετά υπάρχει μια ελικοειδής διάταξη πτερυγίων μέσα σε ένα διάτρητο τύμπανο, από τις οπές του οποίου εξέρχονται οι ράγες και από το άκρο του οι βόστρυχοι. Αυτό το σημείο είναι και το σημείο όπου το γλεύκος πρέπει να προστατευτεί από οξειδώσεις (χημικές, ενζυμικές, μικροβιολογικές) και

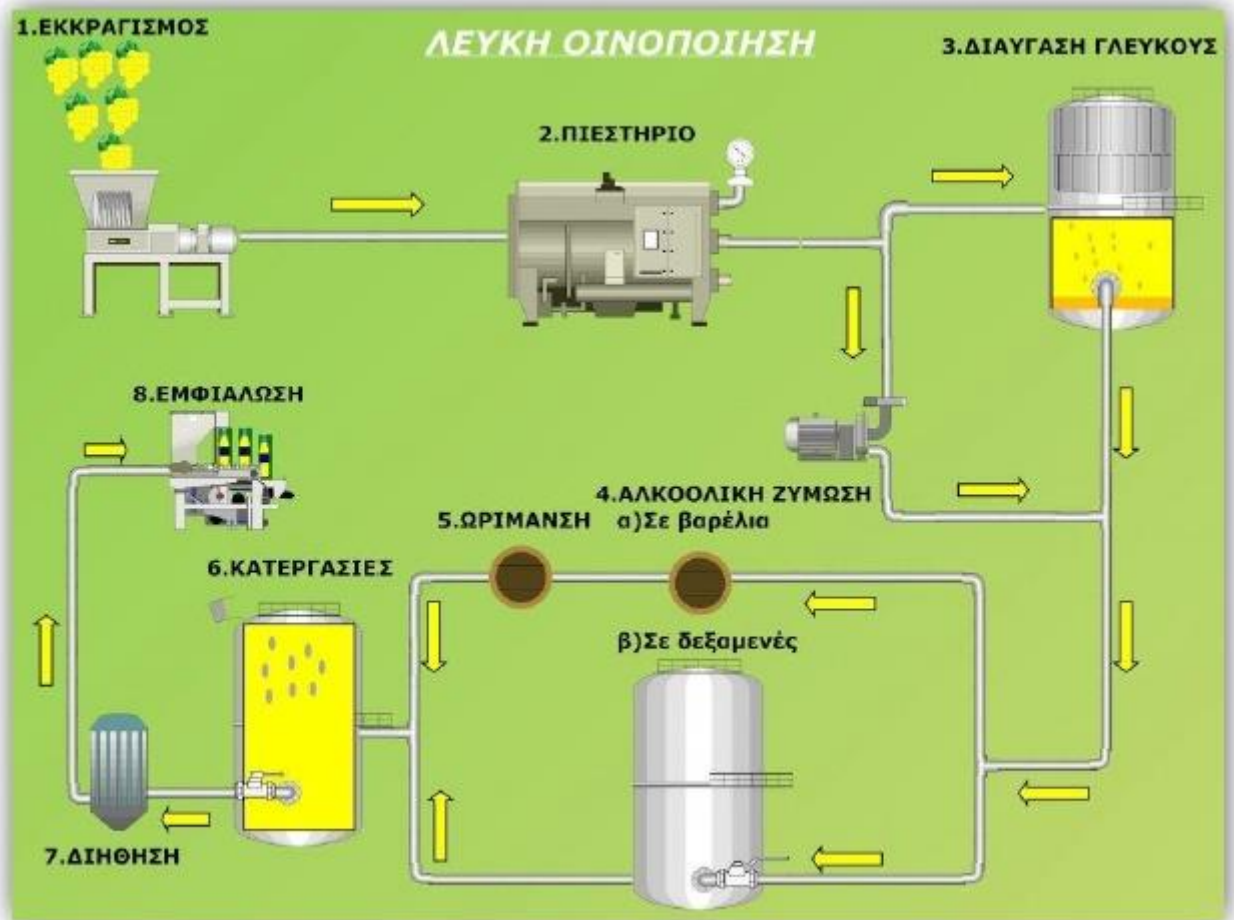
προσβολές από βακτήρια, με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας θειώδους ανυδρίτη ( $\text{SO}_2$ ). Επίσης, υπάρχει η περίπτωση της μη έκθλιψης των σταφυλιών μια τεχνική που χρησιμοποιείται στην παραγωγική διαδικασία της σαμπάνιας, αλλά μπορεί να εφαρμοστεί και για την παραγωγή οποιουδήποτε λευκού οίνου κυρίως από ερυθρά-ερυθρωπά σταφύλια.

Στη συνέχεια η σταφυλομάζα οδηγείται στο πιεστήριο. Πλέον τα πιο διαδεδομένα πιεστήρια είναι τα πιεστήρια μεμβράνης των οποίων η αρχή λειτουργίας είναι η πίεση του σταφυλοπολλτού (ή ολόκληρων των σταφυλιών) με τη βοήθεια μιας μεμβράνης, η οποία διαστέλλεται εσωτερικά με τη βοήθεια νερού ή αέρα υπό πίεση και ο χυμός εξέρχεται από το διάτρητο τύμπανο. Από το πιεστήριο παραλαμβάνονται τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες γλεύκους με διαφορετικά ποιοτικά χαρακτηριστικά. Όταν το πιεστήριο γεμίζεται με τη σταφυλομάζα, λόγω βαρύτητας ρέει χυμός, ο πρόρωγος ( $G$ ), ο οποίος και αποτελεί την καλύτερη ποιότητα χυμού του σταφυλιού αφού έχει υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, χαμηλό  $\text{pH}$  ( $<3$ ), χαμηλή συγκέντρωση  $K$  ( $<1.2\text{g/L}$ ), χαμηλές συγκεντρώσεις πολυφαινόλων και χαμηλά ποσοστά οξειδασών. Κατόπιν με την άσκηση μικρής πίεσης ( $P_1$ ) ρέει χυμός με πολύ ποιοτικά χαρακτηριστικά, γιατί το μεγαλύτερο μέρος του χυμού αυτού προέρχεται από την ίδια ζώνη της σάρκας της ράγας (ενδιάμεση ζώνη) απ' όπου προέρχεται και ο πρόρωγος. Στην  $P_1$  η συγκέντρωση σε σάκχαρα είναι επίσης υψηλή, αν και ελαφρώς μειωμένη, και το  $\text{pH}$  και το κάλιο, αν και ελαφρώς αυξημένα, παραμένουν χαμηλά. Με αύξηση της πίεσης ( $P_2$  και  $P_3$ ) ο χυμός που παραλαμβάνεται προέρχεται και από την εξωτερική ζώνη της σάρκας της ράγας, και επομένως έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα και αυξημένο  $\text{pH}$  και κάλιο ενώ τα οργανικά οξέα είναι και αυτά αυξημένα. Συνήθως και αυτό το κλάσμα αναμιγνύεται με τα δύο πρώτα. Το τελευταίο κλάσμα είναι το πιο υποβαθμισμένο, και συνήθως οινοποιείται και χωριστά για να μην υποβαθμίσει το υπόλοιπο γλεύκος ή ακόμα δεν παραλαμβάνεται καν. Το κλάσμα αυτό έχει αυξημένο  $\text{pH}$ , πολύ μεγαλύτερα ποσοστά καλίου και πολύ περισσότερα φαινολικά συστατικά που προσδίδουν τραχύτητα στη γεύση και αυξημένα ποσοστά οξειδασών που αμαυρώνουν το χρώμα στον οίνο αφού ο χυμός αυτός προέρχεται από το μέρος της σάρκας που περιβάλλει τα γίγαρτα (εσωτερική ζώνη). Εν γένει με την αύξηση της πίεσης παρατηρείται μια συνεχής αύξηση του  $\text{pH}$  αλλά και περεταίρω μείωσή του, λόγω αύξησης των ποσοτήτων καλίου που παραλαμβάνεται, κι έτσι το γλεύκος, αλλά και ο οίνος που θα παραχθεί από αυτό, θα έχει αυξημένο κίνδυνο μικροβιακών προσβολών και χημικών – ενζυμικών οξειδώσεων και επομένως υποβάθμιση των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών. Επίσης, παρατηρείται μείωση της οξύτητας του γλεύκους και επομένως μείωση της ποιότητάς του, από οργανοληπτικής απόψεως. Ταυτόχρονα αυξάνονται συνεχώς τα ποσοστά πολυφαινόλων που εκχυλίζονται στο γλεύκος και επομένως υποβαθμίζεται περεταίρω, εμφανισιακά-αμαύρωση και γευστικά-πικρή γεύση.

Μετά το πιεστήριο στο γλεύκος αιωρούνται στερεά σωματίδια του σταφυλιού, πηκτικικές ουσίες κ.ά. Για να απομακρυνθούν αυτές οι ουσίες, αλλά και μέρος των οξειδασών (τυροσινάση), πιθανά υπολείμματα φυτοφαρμάκων και θειούχες πτητικές ενώσεις, το γλεύκος οδηγείται σε δεξαμενές ψυχόμενες για απολάσπωση. Η απολάσπωση θα γίνει είτε στατικά, ώστε τα στερεά συστατικά να καθιζάνουν με τη βοήθεια της βαρύτητας,

είτε σε ειδική διάταξη για να απομακρυνθούν δυναμικώς με επίπλευση, με φυγοκέντηση, με φίλτρο κενού κ.ά. Σε όλες τις περιπτώσεις πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στο να διατηρηθεί η θερμοκρασία καθ'όλη τη διάρκεια χαμηλή (<10°C), ιδιαίτερα εάν τα επίπεδα του θειώδη ανυδρίτη είναι χαμηλά, ώστε να αποφευχθεί αυθόρμητη ζύμωση από τις γηγενείς ζύμες και προσβολές από οξικά βακτήρια και άλλους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς. Σε αυτό το στάδιο γίνεται και η προσθήκη των πηκτινολυτικών ενζύμων, που βοηθούν στη διαύγαση του γλεύκους μέσω της λύσης των δεσμών των σακχάρων που αποτελούν την πηκτινικές ουσίες, που δρουν ως προστατευτικά, γύρω από τα σωματίδια της γλευκολάσσης και εμποδίζουν την κροκιδωσή τους και κατά συνέπεια την καθίζησή τους. Η προσθήκη δεν είναι απαραίτητη, παρόλα αυτά διευκολύνει την διαδικασία ιδιαίτερα στην περίπτωση που η ποικιλία είναι πλούσια σε πηκτίνη. Πολύ σημαντική δε, η προσθήκη, όταν το γλέυκος πρόκειται να οδηγηθεί για επίπλευση, όπου με την παρουσία πηκτίνης η επίπλευση καθίσταται πρακτικά αδύνατη. Η διάρκεια της απολάσπωσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και αποφασίζεται από τον οινολόγο. Το στάδιο αυτό είναι σημαντικό καθώς με την απομάκρυνση των στερεών συστατικών της σάρκας της ράγας μπορεί να βελτιωθεί το αρωματικό προφίλ του οίνου λόγω της απομάκρυνσης των 'πράσινων', 'χορτωδών' αρωμάτων αλλά και την αποφυγή αναγωγικών οσμών. Ταυτόχρονα, όμως έρευνες έχουν δείξει ότι, με την διατήρηση μιας ποσότητας των λασπών (στα 100NTU) μπορεί να επιτευχθεί η αρχική τροφοδοσία των ζυμών με άζωτο για την ανάπτυξή τους καθώς και αύξηση των ποικιλιακών αρωμάτων (Moio et al., 2004).

Κατόπιν, στο 'καθαρό' πλέον γλέυκος γίνονται οι όποιες διορθώσεις μπορεί να χρειαστούν στη σύστασή του. Εισ περίπτωση χαμηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα γίνεται προσθήκη σακχάρων ή ανακαθαρισμένου γλεύκους ανάλογα με τη νομοθεσία κάθε χώρας. Περίπου 17g σακχαρόζης ανά λίτρο γλεύκους ή εν ζυμώσει γλεύκους παράγει 1% νολαιθανόλης. Για αύξηση της ολικής οξύτητας κατά 0.75g/L, εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ, απαιτείται 1g/L τρυγικού οξέος. Για μείωση της ολικής οξύτητας χρησιμοποιείται το ουδέτερο τρυγικό κάλιο (2.5g/L για μείωση της ολικής οξύτητας κατά 1.5g/L εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ), ανθρακικό ασβέστιο (1g/L για μείωση της ολικής οξύτητας 1.5g/L εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ), όξινο ανθρακικό κάλιο (1.5g/L για μείωση της ολικής οξύτητας 1.5g/L εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ). Επίσης, γίνεται προσθήκη θρεπτικών ουσιών για την αύξηση των ζυμών (άζωτο, μικροστοιχεία, βιταμίνες κ.ά). Τέλος, μια από τις σημαντικότερες προσθήκες είναι εκείνη των ζυμών που θα επιτελέσουν την αλκοολική ζύμωση αλλά και των βακτηρίων που θα επιτελέσουν την μηλογαλακτική ζύμωση.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση λευκής οινοποίησης.

## 2.4 Χημική σύσταση οίνου

Η χημική σύσταση του οίνου είναι περίπου 87.7% νερό, 11% αιθανόλη, 1% οργανικά οξέα, και 0.2% τανίνες. Ενυπάρχουν όμως σε αυτό και άλλες ουσίες που επιδρούν στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου και επομένως στην ποιότητα αυτού. Τέτοιες είναι οι πτητικές ενώσεις που του προσδίδουν το άρωμά του.

Η αιθανόλη είναι το κύριο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης (γλυκόζη → αιθανόλη + διοξείδιο του άνθρακα) και περιέχεται στους οίνους σε ποσοστά 9-15%. Η οσμή της είναι δριμεία. Γενικά όσο μικρότερο το μόριο μιας ένωσης, όσο δηλαδή πιο πτητική είναι η ένωση, τόσο πιο δεικτική είναι οσφρητικά.

Τα σάκχαρα που υπάρχουν στον οίνο όπως και στο γλεύκος είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη κυρίως αλλά και η γαλακτόζη, η μανόζη, η αραβινόζη, η ξυλόζη και η ξυλουλόζη, η ριβουλόζη. Τα σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα μπορούν να ζυμωθούν και τα σάκχαρα με αλδεϋδική ή κετονική ομάδα μπορούν να δεσμεύσουν τον θειώδη ανυδρίτη. Ανάγοντα σάκχαρα είναι αυτά που έχουν ελεύθερη αλδεϋδική ή κετονική ομάδα. Στα μη ανάγοντα σάκχαρα ανήκει η σακχαρόζη (1,2-α-D-γλυκόζη-β-D φρουκτόζη), η οποία

υδρολύεται σε γλυκόζη και φρουκτόζη, αλλά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν περιέχεται στους οίνους σε ποσότητες ικανές να προσδιοριστούν. Η αραβινόζη και η ξυλόζη είναι σάκχαρα που δεν μπορούν να ζυμωθούν αλλά προσβάλλονται από γαλακτικά βακτήρια με αντίστοιχη αύξηση της πτητικής οξύτητας. Επίσης, μη αγωγικά σακχαρα είναι και οι δισακχαρίτες: λακτόζη (γλυκόζη + γαλακτόζη), μαλτόζη (2 μόρια γλυκόζης), μελιβιόζη (γαλακτόζη + γλυκόζη), ραφινόζη (φρουκτόζη + μελιβιόζη)(τρισακχαρίτης).

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή των σακχάρων. Έχουν σχετικά μεγάλο μοριακό βάρος και κολλοειδείς ιδιότητες. Στον οίνο υπάρχουν σε συγκεντρώσεις από 100 mg/L μέχρι μερικά g/L. Αναλόγως της προέλευσής τους διακρίνονται σε πολυσακχαρίτες του σταφυλιού, πολυσακχαρίτες που προέρχονται από αυτόλυση των μυκήτων, πολυσακχαρίτες που προέρχονται από βακτήρια, όπως στην περίπτωση της "πάχυνσης" των οίνων (ετεροπολυσακχαρίτες: γαλακτόζη, μαννόζη, αραβινόζη, γαλακτουρονικό οξύ, όπως επίσης και γλυκάνη), πολυσακχαρίτες που παράγονται από βακτήρια κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση και πολυσακχαρίτες που παράγονται από τον *Botrytis Cinerea*.



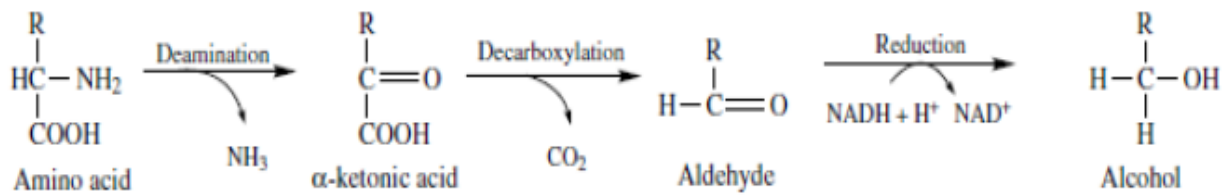
Εικόνα 9: Δέσμευση θειώδους ανυδρίτη από την αλδεύδικη-κετονική ομάδα των C6 σακχάρων

Τα οργανικά οξέα που περιέχονται στον οίνο είναι κατά κύριο λόγο τα κυριότερα οξέα του σταφυλιού, τα οποία μεταφέρονται στο γλεύκος. Αυτά είναι το τρυγικό οξύ, και σε μικρότερες ποσότητες, το μηλικό και το κιτρικό οξύ, καθώς και το οξαλικό οξύ, ασκορβικό, γαλακτουρονικό, γλυκουρονικό οξύ. Κατά τη ζύμωση παράγονται επίσης το ηλεκτρικό οξύ, γαλακτικό οξύ, κιτρομηλικό οξύ, διαίθυλο-2,3-γλυκερινικό οξύ καθώς και μυρμηκικό οξύ, οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, βουτυρικό οξύ, στα οποία οφείλεται η πτητική οξύτητα.

Η μεθανόλη, (τοξική) προέρχεται από την απομεθυλίωση των πηκτινών από τα πηκτινολυτικά ένζυμα. Η περιεκτικότητα στον οίνο αυξάνει κατά την οينوποίηση σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> και κατά την θερμοοينوποίηση, και γενικά με συνθήκες που ευνοούν τη δράση των πηκτινολυτικών ενζύμων. Ο οίνος που προέρχεται από υβρίδια έχει αυξημένη περιεκτικότητα σε μεθανόλη. Η χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων ευνοεί την εμφάνιση μεθανόλης στον οίνο. Οι λευκοί οίνοι περιέχουν μικρότερες ποσότητες λόγω απουσίας εκχύλισης και η περιεκτικότητά τους σε μεθανόλη είναι 30 με 700 mg/L, οι ροζέ οίνοι 30 με 110 mg/L και οι ερυθροί οίνοι 70 με 150 mg/L. Η εξανόλη προέρχεται από την αναγωγή της εξανάλης. Δίνει χαρακτηριστική οσμή χόρτου.

Οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση επίσης. Από τα σάκχαρα του γλεύκους παράγουν τα αντίστοιχα α-κετονοξέα και κατόπιν με αποκαρβοξυλίωση και αναγωγή αυτών παράγονται οι αντίστοιχες ανώτερες αλκοόλες (π.χ η προπανόλη παράγεται από α-κετοβουτυρικό, που δημιουργείται από πυροσταφυλικό και ακετυλο-CoA, η ισοαμυλική αλκοόλη παράγεται από το α-κετοϊσοκαπροϊκό, που δημιουργείται από το α-κετογαλακτικό, που προέρχεται από το πυροσταφυλικό.

Σχηματίζονται επίσης από τις ζύμες με την απαμίνωση των α-αμινοξέων στα αντίστοιχα κετονικά οξέα και την αποκαρβοξυλίωση αυτών. (εικόνα)



Εικόνα 10: Μικροβιακός σχηματισμός ανώτερων αλκοολών από αμινοξέα

Στον οίνο, όπως και στο γλεύκος υπάρχουν και αζωτούχα συστατικά. Το μεγαλύτερο μέρος αυτών (αμινοξέα,  $\text{NH}_4^+$ ) καταναλώνεται κατά την αλκοολική ζύμωση από τις ζύμες αλλά και από τα γαλακτικά βακτήρια σε τυχόν μηλογαλακτική ζύμωση αλλά και από τα λοιπά βακτήρια του γλεύκους. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ορισμένα αμινοξέα μεταβολίζονται σε ανώτερες αλκοόλες όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Μόνο 0,5-4 g/L αζωτούχων ενώσεων υπάρχουν τελικώς στον οίνο.

## 2.5 Πτητικά συστατικά οίνου

### 2.5.1 Το άρωμα των οίνων

Όταν καταναλώνουμε φαγητό ή ποτό, η αλληλεπίδραση γεύσης, οσμής και υφής μας δίνει ένα «αίσθημα» που περιγράφεται καλύτερα από την αγγλική λέξη flavor. Είναι όλες αυτές οι αισθήσεις: γεύση, όσφρηση και αφή(στόματος) συνδυασμένες. Η αίσθηση στόματος αυτή (flavor), είναι αποτέλεσμα διαφόρων ενώσεων που διαχωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τις ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τη γεύση και ενώσεις υπεύθυνες για την οσμή, οι τελευταίες εκ των οποίων συνηθίζεται να αναφέρονται και ως «αρωματικές» ουσίες. Κάποιες από αυτές διεγείρουν και τις δύο αυτές αισθήσεις. Οι ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τη γεύση ενός ποτού ή φαγητού είναι γενικά μη πτητικές σε θερμοκρασία δωματίου. Για αυτό και αλληλεπιδρούν μόνο με τους γευστικούς υποδοχείς δηλαδή τους γευστικούς κάλυκες της γλώσσας (γλυκό, πικρό, ξινό, αλμυρό και umami).

Compound	Aroma	Occurrence
(R)-Limonene	Citrus-like	Orange juice
(R)-1-p-Menthene-8-thiol	Grapefruit-like	Grapefruit juice
Benzaldehyde	Bitter almond-like	Almonds, cherries, plums
Neral/geranial	Lemon-like	Lemons
1-(p-Hydroxy-phenyl)-3-butanone (raspberry ketone)	Raspberry-like	Raspberries
(R)-(-)-1-Octen-3-ol	Mushroom-like	Champignons, Camembert cheese
(E,Z)-2,6-Nonadienal	Cucumber-like	Cucumbers
Geosmin	Earthy	Beetroot
trans-5-Methyl-2-hepten-4-one (filbertone)	Nut-like	Hazelnuts
2-Furfurylthiol	Roasted	Coffee
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	Caramel-like	Biscuits, dark beer, coffee
2-Acetyl-1-pyrroline	Roasted	White-bread crust

Εικόνα 11: Παραδείγματα βασικών οσμηρών-πηκτικών ενώσεων στα τρόφιμα (Belitzetal., 2009)

Το γλεύκος των σταφυλιών, που περιέχει την «ουσία» του σταφυλιού, του αμπελιού και των στοιχείων του εδάφους (terroir), μετασχηματίζεται από σακχαρούχο διάλυμα σε αλκοολικό με τη δράση ζυμών και δευτερευόντως βακτηριών. Το τελικό αυτό διάλυμα έχει τελείως διαφορετικά χαρακτηριστικά από το αρχικό. Εκτός από τη γεύση και το χρώμα που μεταβάλλονται, μεταβάλλεται άρδην και το «άρωμά» του. Όλες αυτές οι μεταβολές οφείλονται στις ουσίες που παράγονται βιολογικά και τέτοιες είναι οι αλκοόλες, τα οξέα, οι αλδεΐδες, οι εστέρες, οι πολυυδροξυφαινόλες, οι ανθοκυάνες, οι αζωτούχες ενώσεις, τα ένζυμα, οι βιταμίνες και τα ίχνη υδατανθράκων. Επίσης, περιέχει ανόργανα συστατικά, μέταλλα, οξέα και ιβασεις (Salvatore, 1972).

Το άρωμα του οίνου αποτελείται από ένα σύνολο συστατικών τα οποία είτε προέρχονται από τα σταφύλια, είτε παράγονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ή σχηματίζονται μετά το τέλος της ζύμωσης, ενζυμικά ή χημικά. Το άρωμα του οίνου έχει δηλαδή τριπλή προέλευση: από τα χαρακτηριστικά της ποικιλίας που οινοποιήθηκε (πρωτογενές άρωμα), από τις βιοχημικές μετατροπές των πρόδρομων (της ποικιλίας)



αρωματικών ουσιών ή παραγωγή νέων πτητικών ουσιών κατά την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους (*δευτερογενές άρωμα*) και αυτές που σχηματίζονται (ή εκχυλίζονται από τα βαρέλια) κατά την συντήρηση ή παλαίωση του κρασιού (*τριτογενές άρωμα*) (Bakkeretal, 2011).

Τα πτητικά που έχουν ανιχνευτεί στο κρασί, αριθμούν σε μόρια περισσότερα από 600. Παρότι τα συστατικά αυτά έχουν ταυτοποιηθεί, η ακριβής συνεισφορά τους στο τελικό άρωμα του οίνου έχει μελετηθεί μόνο για ορισμένα από αυτά (Jackson, 2002). Ο Ortega-Heras και οι συνεργάτες του (2004) θεωρούν ότι ο οίνος είναι από τα πιο πολύπλοκα αλκοολούχα ποτά και σ' αυτό συνεισφέρει το άρωμά του. Η πολυπλοκότητα ενός τέτοιου συστήματος εξηγείται από πολλούς λόγους. Τα πτητικά συστατικά που υπάρχουν σε φαγητά και ποτά που είναι προϊόντα θερμικής επεξεργασίας και/ ή ζύμωσης είναι περισσότερα από 800, με πολύ διαφορετική φύση, που καλύπτει μεγάλο εύρος σε πολικότητα, διαλυτότητα, πτητικότητα και pH. Επιπλέον, οι χαμηλές συγκεντρώσεις στις οποίες συμμετέχουν ορισμένες ενώσεις αλλά και η αστάθειά τους είναι παράγοντες που πρέπει να αντιμετωπισθούν από τους ερευνητές. Τέλος, η επιλογή της κατάλληλης διαδικασίας, μέσω της οποίας θα επιτύχουν ένα εκχύλισμα που θα περιέχει όλα τα πτητικά, είναι ζήτημα που απαιτεί μεγάλη έρευνα (Belitzetal, 2009).

Υπάρχει γενική ομοφωνία ότι η *καλλιέργεια των σταφυλιών* αλλά και το *έδαφος* έχουν κύρια επίδραση στον τύπο του αρώματος και στην ποιότητά του οίνου. Το ίδιο ισχύει και με τα διαφορετικά στελέχη της ζύμης. Τα κύτταρα των ζυμών (*Saccharomyces cerevisiae*) παράγουν πτητικές ουσίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους. Οι ουσίες απελευθερώνονται από μη πτητικές πρόδρομες ενώσεις των σταφυλιών και οι ζύμες μπορούν να μεταβολίσουν (*catabolize*) τέτοιες, όπως θειο-ενώσεις ή βινυλοφαινόλες. Ανάμεσα σε αυτές που αναφέρονται πολύ συχνά είναι 3-μεθυλοβουτανόλη και ο οξικός εστέρας της, καθώς και οι αιθυλεστέρες των οξικών, εξανοϊκού και οκτανοϊκού.

Το άρωμα του οίνου, σε αντίθεση με το χρώμα και τη γεύση του, είναι δύσκολο να περιγραφεί. Δε χαρακτηρίζεται μόνο από ένα στοιχείο, αντίθετα αποτελείται από σύνθεση αρωμάτων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η πολυπλοκότητα του αρώματος είναι αυτή που δίνει στο κρασί ιδιαίτερο χαρακτήρα. Οι αρωματικές αποχρώσεις ενός κρασιού αποτελούν πλήθος κατηγοριών. Αναφέρονται μερικές από αυτές:

- Άρωμα λουλουδιών
- Άρωμα φρούτων
- Άρωμα ξηρών φρούτων και καρπών
- Άρωμα χόρτων
- Άρωμα μπαχαρικών κ.ά.

Όσον αφορά στην ποιότητα του αρώματος, ο οίνος μπορεί να χαρακτηριστεί αρωματικός ή ότι έχει λεπτό άρωμα, κομψό, κοινό, ελαττωματικό κ.λ.π. Η περιεκτικότητά ενός οίνου σε πτητικά συστατικά είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για την ποιότητα και τις οργανοληπτικές του ιδιότητες. Έτσι ένας οίνος χαρακτηρίζεται:

- Απαράδεκτος όταν παρουσιάζει σοβαρά προβλήματα, όπως πολύ άσχημο άρωμα ή/και γεύση που καθιστά αδύνατη την κατανάλωσή του.
- Κάτω του μετρίου όταν πρόκειται για οίνο με αξιοσημείωτα ελαττώματα, όπως απουσία γεύσης ή άσχημη γεύση ή/και άρωμα.
- Μέτριος όταν ο οίνος είναι ουδέτερος χωρίς ιδιαίτερο ενδιαφέρον αλλά και χωρίς ιδιαίτερα ελαττώματα.
- Πολύ καλός όταν ο οίνος παρουσιάζει διαβαθμίσεις φινέτσας, γεύση και χαρακτήρα χωρίς σημαντικά ελαττώματα.
- Ξεχωριστός όταν πρόκειται για οίνο με εξαιρετική πολυπλοκότητα και χαρακτήρα.
- Εξαιρετικός όταν παρουσιάζει σημαντική πολυπλοκότητα χαρακτήρα, που αναδεικνύει όλες τις αναμενόμενες ιδιότητες ενός κλασικού οίνου της ποικιλίας στην οποία ανήκει.

Η πολυπλοκότητα της χημικής σύνθεσης των πτητικών κλασμάτων, σε συνδυασμό με το εύρος της συγκέντρωσης, με την οποία συμμετέχουν στον οίνο (συνήθως από 1 ng/L έως και ορισμένα g/L), κάνουν την ποιοτική καθώς και την ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών αυτών μια εξαιρετικά πολύπλοκη και απαιτητική εργασία (Jackson, 2002).

Compound	Threshold value (mg/l)
Ethanol	100
Maltol	9
Furfural	3.0
Hexanol	2.5
Benzaldehyde	0.35
Vanillin	0.02
Raspberry ketone	0.01
Limonene	0.01
Linalool	0.006
Hexanal	0.0045
2-Phenylethanal	0.004
Methylpropanal	0.001
Ethylbutyrate	0.001
(+)-Nootkatone	0.001
(-)-Nootkatone	1.0
Filbertone	0.00005
Methylthiol	0.00002
2-Isobutyl-3-methoxypyrazine	0.000002
1-p-Menthene-8-thiol	0.00000002

Εικόνα 12: Τιμές από κατώφλια αντίληψης διάφορων «αρωματικών» (πτητικών) ενώσεων σε νερό στους 20°C (Belitzetal., 2009)

### 2.5.2 Πρωτογενές άρωμα

Τα πτητικά συστατικά που προέρχονται από το σταφύλι ανήκουν σε διάφορες τάξεις χημικών ενώσεων, με σημαντικότερα τα τερπένια (χαρακτηριστικά των μοσχάτων ποικιλιών), τις πυραζίνες (οσμή πράσινης πιπεριάς), τις φαινολικές ενώσεις (άρωμα καπνού, ξύλου ή δέρματος), αλλά και αλκοόλες, όπως η μεθανόλη και η εξανόλη (οσμή χόρτου).

Έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 70 ενώσεις τερπενίων, κυρίως μονοτερπένια (ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα), που μπορεί να είναι υδρογονάνθρακες, αλδεΐδες, αλκοόλες ή ακόμη και εστέρες, αλλά και κάποια σεσκιτερπένια (ενώσεις με 15 άτομα άνθρακα). Γενικά πρόκειται για ενώσεις με έντονο και ευχάριστο χαρακτήρα αρώματος, που έχουν σημαντική οργανοληπτική επίδραση. Σε αυτές αποδίδεται το άρωμα των λουλουδιών. Στις μοσχάτες ποικιλίες συνιστούν τα σημαντικότερα αρωματικά συστατικά, από αυτά που καθορίζουν το άρωμά τους. Εντοπίζονται στην ράγα, κυρίως στον φλοιό, ενώ αυξάνονται κατά την ωρίμανση, για να μειωθούν κατά την υπερωρίμανση.

Πολλές πρόδρομες αρωματικές ενώσεις βρίσκονται υπό την μορφή γλυκοζιτών στο γλεύκος, αλλά μπορούν να απελευθερωθούν, δίνοντας αρωματικές ενώσεις. Έτσι βρίσκονται και διάφορες τερπενικές ενώσεις. Για την απελευθέρωση του πτητικού μορίου θεωρείται αναγκαία η χρήση ενζύμων (β-γλυκοσιδάση) κατά την οινοποίηση. Οι βασικές τερπενικές ενώσεις των αρωματικών ποικιλιών είναι η α-τερπινεόλη, η λιναλοόλη, η γερανιολη, η νερόλη, η σιτρονελόλη, το λιμονένιο, και τα τέσσερα οξειδία (A,B,C,D) της λιναλοόλης, με την σιτρονελόλη και την λιναλοόλη να είναι από τις πιο αρωματικές ενώσεις. Η συνολική συγκέντρωσή τους στον οίνο φτάνει τα 1-3 mg/L. Ένα μέρος τους χάνεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ κατά την παλαίωση οξειδώνονται σε ενώσεις λιγότερο αρωματικές (Σουφλερός 2000, Τσακίρης 2014, Ribéreau-Gayon 2006b, Jackson 2002).

Ο βοτανώδης/φυλλώδης χαρακτήρας των οίνων Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon και Semillion οφείλεται στην παρουσία μεθυλοπυραζινών παράγωγων των σταφυλιών. Οι συγκεντρώσεις τους στους οίνους κυμαίνονται μεταξύ των 1-40 ng/L ενώ η τιμή 1-2 ng/L μπορεί να θεωρηθεί ως όριο ανίχνευσης για τις 2-μεθοξυ-3-(2-μεθυλοπροπυλο)-πυραζίνη (ή ισοβουτυλομεθοξυ πυραζίνη), 2-μεθοξυ-3-(1-μεθυλοπροπυλο)-πυραζίνη (ή sec-βουτυλομεθοξυ πυραζίνη) και 2-μεθοξυ-3-(1-μέθυλεθυλο)-πυραζίνη (ή ισοπροπυλομεθοξυ πυραζίνη). Η προέλευση των αλκοξυ-πυραζινών είναι τα σταφύλια, αν και οι μηχανισμοί σύνθεσής τους δεν είναι ακόμα ξεκαθαρισμένοι. Οι Kotseridis et al. (1999) αναφέρουν ότι το περιεχόμενο των οίνων σε 3-ισοβουτυλο-2-μεθοξυ-πυραζίνη εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες και το βαθμό ωριμότητας των σταφυλιών. Όσο μεγαλύτερος ο βαθμός ωριμότητας τόσο μικρότερο το περιεχόμενο στη συγκεκριμένη πυραζίνη.

Ο ανθρανιλικός μεθυλεστέρας (methyl anthranilate) έχει συσχετισθεί με το τυπικό άρωμα ορισμένων αμερικάνικων ποικιλιών, αλλά δεν έχει ανιχνευθεί ποτέ σε ευρωπαϊκά γλεύκη και οίνους *Vitis vinifera*. Μια άλλη κατηγορία αζωτούχων ετεροκυκλικών ενώσεων είναι οι πυριδίνες, οι οποίες προσδίδουν δυσάρεστες οσμές στους οίνους. Μερικές από

αυτές είναι η 2-αιθυλο-3,4,5,6-τετραϋδρο-πυριδίνη, η 2-ακετυλο-3,4,5,6-τετραϋδρο-πυριδίνη και η 2-ακετυλο-1,4,5,6-τετραϋδρο-πυριδίνη (Jackson 2002).

### 2.5.3 Δευτερογενές και τριτογενές άρωμα

Αναμφισβήτητα, το μεγαλύτερο ποσοστό των αρωματικών ενώσεων που βρίσκονται στους οίνους παράγεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και αποτελείται κυρίως από αλκοόλες, αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων, οξικούς εστέρες αλκοολών, αλειφατικά οξέα και καρβονυλικές ενώσεις (Jackson, 2002)

Οι εστέρες του οξικού οξέος είναι πολύ σημαντικοί αρωματικά, καθώς προσδίδουν στους οίνους αρώματα φρούτων, όπως επίσης και οι εστέρες των λιπαρών οξέων με 4-10 άτομα άνθρακα. Στα πτητικά συστατικά των οίνων περιλαμβάνονται και οι αλκοόλες με 6 άτομα άνθρακα όπως η 1-εξανόλη, η cis- και η trans-3-εξαν-1-όλη, η 2-φαινυλαιθανόλη και ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας (Flamini & Traldi, 2010).

Η συγκέντρωση αυτών των συστατικών στους οίνους σχετίζονται με διάφορες παραμέτρους κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, όπως η θερμοκρασία που διεξάγεται η ζύμωση, το στέλεχος του ζυμομύκητα, τα επίπεδα του αζώτου του γλεύκους που μπορούν να αφομοιωθούν από τις ζύμες, το κολλάρισμα του οίνου κ.α. (Rapp, 1991).

#### 2.5.3.1 Εστέρες

Οι εστέρες παίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο στο άρωμα του οίνου και ανήκουν συνήθως στο δευτερογενές άρωμά του. Οι εστέρες προέρχονται κυρίως από την δράση των ενζύμων των ζυμομυκήτων κατά την αλκοολική ζύμωση και τη χημική εστεροποίηση κατά την παλαίωση του οίνου. Ωστόσο η χημική οδός οδηγεί στο σχηματισμό όξινων εστέρων, οι οποίοι δεν είναι πτητικοί και άρα δεν συμμετέχουν στη διαμόρφωση του αρώματος του οίνου ή συμμετέχουν πολύ περιορισμένα. Ελάχιστοι από αυτούς προέρχονται απευθείας από το σταφύλι. (Τσακίρης, 1998). Προκύπτουν κυρίως από την αντίδραση της αιθυλικής αλκοόλης και ενός οξέος, ενεργοποιημένου από το συνένζυμο A.

Αποτελούν ποιοτικά τα κυριότερα συστατικά των οίνων και είναι επίσης, μαζί με το νερό, την αιθανόλη και τις υπόλοιπες αλκοόλες και κύριο ποσοτικό συστατικό (>100ppm). Οι αιθυλεστέρες των οργανικών οξέων είναι οι πιο άφθονοι. Επίσης, οι αιθυλικόεστέρες των λιπαρών οξέων και οι οξικοί εστέρες των αλκοολών απαντούν με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους οίνους και ακολουθούν, σε μικρότερες ποσότητες, εστέρες των υδροξυοξέων, κετοξέων και αρωματικών οξέων με αλκοόλες ή πολυόλες. Σε σχέση με τη συνεισφορά των εστέρων στην οσφρητική και γευστική αντίληψη των οίνων, οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων και οι οξικοί εστέρες θεωρούνται οι πιο σημαντικόι διότι προσδίδουν οσμές φρούτων και λουλουδιών παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται συχνά για να περιγράψουν τους οίνους (Maarse, 1991).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα εστέρων:

*Αιθυλεστέρες πτητικών οξέων (EtOH+ πτητικό οξύ)*

- Οξικός αιθυλεστέρας (>150mg/L: οσμή κόλλας, ακετόνη, διαλύτης)
- Βουτυρικός αιθυλεστέρας(τσιχλόφουσκα, φράουλα)
- Εξανοϊκός αιθυλεστέρας (C8-C12)(μήλο, ανανάς)

*Οξικοί εστέρες ανώτερων αλκοολών (οξικό οξύ+ ανώτερη αλκοόλη)*

- Ισοαμυλικός αιθυλεστέρας: μπανάνα
- Οξικός φαινυλαιθυλεστέρας: τριαντάφυλλο, ροδόνερο,
- Μικρής αλύσου: λουλούδια, φρούτα

Σύμφωνα με τον Maarse (1991), αξίζει να σημειωθεί ότι ανάμεσα στους εστέρες των ανώτερων αλκοολών, ο ισοαμυλικός αιθυλεστέρας έχει την πιο σημαντική συνεισφορά στο άρωμα των οίνων. Επίσης, ο οξικός αιθυλεστέρας δεν συμβάλλει στο άρωμα σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 75ppm, ενώ σε υψηλότερες των 150-200ppm προσδίδει ελαττωματική οσμή στους οίνους.

Φορμικός αιθυλεστέρας	Αιθέριο, φρουτώδες, σαν ρούμι
Οξικός αιθυλεστέρας	Αιθέριο, δριμύ, σαν κρασί-μπράντυ
Προπανοϊκός αιθυλεστέρας	Έντονο, αιθέριο, φρουτώδες, σαν ρούμι
Βουτανοϊκός αιθυλεστέρας	Αιθέριο, φρουτώδες, βουτυρώδες
Πεντανοϊκός αιθυλεστέρας	Έντονο, φρουτώδες, σαν μήλο
Εξανοϊκός αιθυλεστέρας	Έντονο, άρωμα λουλουδιού, σαν μήλο, μπανάνα, ροδάκινο
Οκτανοϊκός αιθυλεστέρας	Φρουτώδες, γλυκό, άρωμα λουλουδιού
Δεκανοϊκός αιθυλεστέρας	Γλυκό, λιπώδες, σαν καρύδι, κρασί-κονιάκ
Οξικός βουτυλεστέρας	Έντονο, φρουτώδες
Οξικός πεντυλεστέρας	-
Οξικός εξυλεστέρας	Γλυκό, φρουτώδες, σαν αγλάδι
Οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας	Άρωμα λουλουδιού, φρουτώδες σαν ξηρό δαμάσκηνο, καπνώδες, πικάντικο,
Κιναμωμικός αιθυλεστέρας	Γλυκό, βαλσαμικό, φρουτώδες, σαν μέλι
Οξικός 3-μεθυλο-βουτυλεστέρας	Έντονο, ευχάριστο, σαν μπανάνα
2-Υδροξυ-προπανοϊκός αιθυλεστέρας	Φρουτώδες, άρωμα λουλουδιού
Οξικός 2-μεθυλο-προπυλεστέρας	-
2-Μεθυλο-προπανοϊκός αιθυλεστέρας	-
3-Μεθυλο-βουτανοϊκός αιθυλεστέρας	Φρουτώδες

*Εικόνα 7: Εστέρες και αρώματα που προσδίδουν στον οίνο (Παληγογιάννη, 2007)*

Στατιστικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί για το άρωμα του οίνου συσχετίζουν θετικά την ποιότητά του με τη συγκέντρωση των αιθυλεστέρων των C6, C8 και C10 λιπαρών οξέων, του οξικού αιθυλεστέρα, του οξικού εστέρα της 3-μεθυλο-βουτανόλης, της 2-φαινυλοαιθανόλης (phenylethyl alcohol) και της εξανόλης (1-hexanol). Άλλοι εστέρες που θεωρείται ότι συνεισφέρουν σημαντικά στο άρωμα του οίνου είναι ο αιθυλεστέρας του δεκ-9-ενοϊκού οξέος και του 2-υδροξυ-προπανοϊκού οξέος (propanoic acid, 2-hydroxy ethyl ester).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποσότητα των εστέρων στο κρασί είναι το ίδιο το σταφύλι (η ποικιλία, η φυσιολογία του φυτού, και το στάδιο ωρίμανσης). Όμως τα σταφύλια δεν αποτελούν την κύρια πηγή προέλευσης των εστέρων, αλλά οι συνθήκες ζύμωσης και παλαίωσης.

Η παραγωγή των εστέρων ευνοείται από την χαμηλή θερμοκρασία ζύμωσης, την απουσία στερεών αιωρημάτων, το στέλεχος του ζυμομύκητα που διεξάγει τη ζύμωση και γενικά κάθε παράγοντα που φαίνεται ότι μειώνει την ταχύτητα της ζύμωσης, προσδιορίζοντας έτσι τις συνθήκες της σύγχρονης οινοποίησης λευκών οίνων. Είναι πιθανόν η παραγωγή αυτών των εστέρων, που γίνονται αντιληπτοί οσφρητικά, να συνδέεται με τη δημιουργία παχύτερου κυτταρικού τοιχώματος που δημιουργούν οι ζύμες σε περιβάλλον δυσμενές για αυτές. Στη δημιουργία οίνων υψηλής ποιότητας, η υπερβολική παρουσία τέτοιων εστέρων δεν θεωρείται πάντοτε ευνοϊκή, δεδομένου ότι καλύπτουν κατά ένα μέρος τα ποικιλιακά αρώματα. Η παραμονή του οίνου σε επαφή με τις νεκρές ζύμες (λεπτές οινολάσπες) ευνοεί την αύξηση της περιεκτικότητας σε εστέρες, αλλά και ανώτερες αλκοόλες. Στον οίνο έχουν προσδιοριστεί και άλλοι εστέρες, όπως οι εστέρες των παραγόμενων αμινοξέων, σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και δίχως εμφανή οργανοληπτικό έλεγχο (Τσακίρης, 2014).

#### 2.5.3.2 Αλκοόλες

Οι αλκοόλες ανιχνεύονται στους οίνους σε σημαντικές ποσότητες, αποτελούν περίπου το 50% των αρωματικών ενώσεων, μη συμπεριλαμβανομένης της αιθανόλης, αλλά αντίθετα με τους εστέρες, σύμφωνα με τον Jackson (2002) συνεισφέρουν αρνητικά στο άρωμα και στη γεύση των οίνων.

Οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται από τα σάκχαρα κατά την αλκοολική ζύμωση, τα οποία στην συνέχεια αποκαρβοξυλιώνονται και ανάγονται προς αλκοόλες. Σχηματίζονται επίσης από αμινοξέα, μετά από απαμίνωση και αποκαρβοξυλίωση. Στον οίνο βρίσκονται η προπανόλη-1, η προπανόλη-2, η βουτανόλη-1, η βουτανόλη-2 και η ισοβουτανόλη, που έχουν οσμή παρόμοια με αυτή της αιθανόλης. Η 2-μέθυλο-1-βουτανόλη υπάρχει σε συγκεντρώσεις 15-150 mg/L και η 3-μέθυλο-1-βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη) σε συγκεντρώσεις από 30-500 mg/L. Και οι δύο αυτές αλκοόλες έχουν χαρακτηριστική, αρκετά δριμεία οσμή, και ονομάζονται αμυλικές αλκοόλες. Στους οίνους βρίσκονται, επίσης, η εξανόλη, η επτανόλη, η οκτανόλη και η δεκανόλη. Η φαινυλο-2-αιθανόλη έχει άρωμα τριαντάφυλλου και συγκεντρώσεις 10-80 mg/L. Η τυροσόλη έχει άρωμα μελιού. Η 2,3-βουτανοδιόλη σχηματίζεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ως δευτερεύον

προϊόν, όπως και η ακετοΐνη. Η γλυκερόλη βρίσκεται σε συγκεντρώσεις 5-20 g/L και σχηματίζεται κυρίως στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης (Τσακίρης, 2014).

Οι ανώτερες αλκοόλες προέρχονται κυρίως από την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους, ενώ μόνο η εξανόλη, η εξ-3-ενόλη και η οκτανόλη ανευρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες στα σταφύλια.

Γενικά, παράγοντες που αυξάνουν τον ρυθμό ζύμωσης, όπως οξυγόνωση του γλεύκους, υψηλές θερμοκρασίες και παρουσία στερεών σωματιδίων, αυξάνουν και τον σχηματισμό ανώτερων αλκοολών. Ο σχηματισμός τους εξαρτάται από τις συνθήκες της ζύμωσης και, κυρίως, από το στέλεχος της ζύμης που διεξάγει την αλκοολική ζύμωση (Ribéreau-Gayon et al. 2006b).

Το τεχνολογικό ενδιαφέρον των ανώτερων αλκοολών είναι η συμμετοχή τους στη σύνθεση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων. Όταν οι ενώσεις αυτές περιέχονται σε μικρές ποσότητες ασκούν ευνοϊκή επίδραση στο άρωμα των οίνων, δε συμβαίνει όμως το ίδιο όταν οι ουσίες αυτές περιέχονται σε ποσότητες μεγαλύτερες από 300ppm σύμφωνα με τους Amerine και Roessler και μεγαλύτερες από 400ppm σύμφωνα με τους Ribereau-Gayon και Bidan, ενώ νεότερες έρευνες αυξάνουν την συγκέντρωση αυτή στα 500-600ppm (Maarse, 1991).

Οι περισσότεροι ερευνητές θεωρούν ότι συνεισφέρουν περισσότερο στην ένταση του αρώματος του οίνου παρά στην ποιότητά του, η οποία μειώνεται σημαντικά εάν ξεπερνούν τα 400 mg/L. Εξαίρεση αποτελεί η 2-φαινυλοαιθανόλη, της οποίας η συγκέντρωση στους οίνους έχει συσχετισθεί θετικά με την ποιότητά τους. Η ένωση αυτή έχει άρωμα τριαντάφυλλου και είναι βασικό πτητικό συστατικό των κρασιών Muscadine. Αν και περιέχεται σε μικρές ποσότητες στους οίνους, εντούτοις γίνεται αντιληπτή σε χαμηλές περιεκτικότητες. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η φαινυλοαιθανόλη, χαρακτηρίζεται από οσμή τριαντάφυλλου ή πικάντικη (spicy) ή μελιού ή λουλουδιών (Jackson, 2002).

Η προπανόλη φαίνεται να μην ασκεί μεγάλη επίδραση στο άρωμα των οίνων, γιατί έχει ουδέτερη οσμή. Οι αμυλικές αλκοόλες φαίνεται επίσης να μην έχουν ευνοϊκή επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων. Η εξανόλη-1, η οποία προέρχεται από το σταφύλι, δίνει στους οίνους χορτώδη οσμή και γεύση.

Η 2,3-βουτανοδιόλη αποτελεί βασικό κριτήριο για τη διαπίστωση τυχόν ενδυνάμωσης (προσθήκης αλκοόλης) στον οίνο. Παράγεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, προέρχεται από την αναγωγή της ακετοΐνης και έχει χαρακτηριστική πικρή-γλυκιά γεύση (Jackson, 2002).

Alcohol	Concentration range <sup>a</sup> (ppm)	Medium	Odor threshold value (ppm) [refs.]
Methanol	8–269	Wine	500 [42]
Propanol	5–125	Wine	500 [42], 750 [4], 306 [9], >500 [43]
2-Methyl propanol	9–174	Wine	228 [9], 75 [21], 500 [42], 200 [4], >500 [43]
1-Butanol	0.003–8.5	Wine	150 [42]
2-Methyl butanol	8–150	Wine	300–330 [43]
3-Methyl butanol	6–490	Wine	14.5 [4]
2- and 3-Methylbutanols	87–564	Wine	180 [14], 60 [4]
Pentanol	0.008–5.1	Wine	64.4 [9]
Hexanol	0.3–12	Wine	5.2 [21], 4 [4], 1.1 [9]
(E)-2-Hexenol	0.05	Beer	15 [13]
(Z)-3-Hexenol	0.01–0.85	Beer	13 [13]
Heptanol	0.02–0.05	Wine	2.5 [9]
Octanol	0.09–1.5	Wine	0.8 [9]
1-Octen-3-ol	—	Beer	0.2 [13]
Benzyl alcohol	0.008–0.42	Beer	900 [13]
2-Phenylethanol	4–197	Wine	25–105 [8], 7.5 [21], 200 [6], 100 [4]
Nonanol	tr–0.009	Wine	0.3 [9]
Decanol	—	Wine	0.4 [9]
Dodecanol	—	Wine	1.0 [9]

Εικόνα 14: Συγκεντρώσεις από κάποιες αλκοόλες σε οίνους και μπύρα και το κατώφλι αντίληψης οσμής αυτών (Maarse, 1991)

### 2.5.3.3 Οξέα

Ανάμεσα στα διάφορα οξέα που έχουν βρεθεί στους οίνους, τα λιπαρά οξέα αποτελούν τα μόνα που θεωρούνται πιθανά για τη συνεισφορά τους στο άρωμα. Αυτό οφείλεται στο χαμηλό κατώφλι αντίληψης που έχουν, στις σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις τους στους οίνους, σε σχέση με τα υπόλοιπα οξέα, και στην επαρκή πτητικότητά τους σε συνήθεις θερμοκρασίες. Το άρωμα των λιπαρών οξέων έχει περιγραφεί να μοιάζει με αυτό του ξυδιού, βουτύρου, τυριού, λαχανικών, και σαπουνιού, καθώς αυξάνει το μοριακό βάρος.

Οι Rapp & Mandery(1986) αναφέρουν ότι το οξικό, προπανοϊκό, βουτανοϊκό και 2-μεθυλο-προπανοϊκό οξύ είναι αρκετά πτητικά έτσι ώστε να συνεισφέρουν στο άρωμα των οίνων. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις τους στους οίνους που μελέτησαν ήταν μικρότερες από το κατώφλι αντίληψής τους.

Στα συνήθη επίπεδα που βρίσκεται το οξικό οξύ στους οίνους είναι επιθυμητό, διότι συνεισφέρει στην πολυπλοκότητα της γεύσης και του αρώματος του οίνου. Επίσης, είναι



εξίσου σημαντικό στην παραγωγή των οξικών εστέρων που προσδίδουν φρουτώδη χαρακτήρα. Ωστόσο, πάνω από το όριο συνεισφέρει αρνητικά στην ποιότητα των οίνων.

Τα λιπαρά πτητικά οξέα συναντώνται μόνο σε ίχνη στο γλεύκος. Η παρουσία τους στους οίνους οφείλεται στο σχηματισμό τους από τους ζυμομύκητες και τα βακτήρια (Jackson, 2002).

#### 2.5.3.4 Θειούχες Ενώσεις

Οι θειούχες ενώσεις του οίνου, εκτός από το υδρόθειο, ανήκουν σε διάφορες ομάδες, όπως οιθειόλες, μερκαπτάνες, οιθειοεστέρες, σουλφίδια και ετεροκυκλικές ενώσεις. Ένα μεγάλο μέρος των θειούχων ενώσεων προέρχεται από την κυστεΐνη, την κυστίνη, τους μονοσακχαρίτες, τη θειαμίνη και τη μεθειονίνη μετά από θέρμανση. Μερικές έχουν πολύ δυνατό άρωμα και ευθύνονται για την εμφάνιση μερικών πολύ ευχάριστων αρωμάτων αλλά και μερικών πολύ ενοχλητικών και μη ευχάριστων. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις προσδίδουν αρώματα, τα οποία έχουν περιγραφεί παρόμοια με του λάχανου, του σκόρδου, του κρεμμυδιού και του λάστιχου, και γενικότερα θεωρούνται ότι υποβαθμίζουν την ποιότητα του οίνου (Jackson, 2002).

Οιθειόλες είναι σημαντικά συστατικά του αρώματος των τροφίμων, λόγω της έντονης οσμής τους και της παρουσίας τους ως ενδιάμεσα προϊόντα, που μπορούν να αντιδράσουν με άλλα πτητικά (Belitzetal, 2009).

Το υδρόθειο και οιθειόλες (μερκαπτάνες) συνδέονται με την αντίληψη του κλούβιου αυγού, ενώ οιθειοεστέρες και τα σουλφίδια δίνουν μια σύνθετη οσφρητική αντίληψη. Οι θειούχες ενώσεις με μικρό μοριακό βάρος, όπως το υδρόθειο και οι μερκαπτάνες, στους οίνους που δεν παρουσιάζουν οργανοληπτικό ελάττωμα, βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες, κάτω από το κατώφλι οσφρητικής αντίληψης. Ακόμα και όταν φτάσουν στο κατώφλι αυτό οι οίνοι δεν αποκτούν δυσάρεστο οσφρητικό χαρακτήρα. Διάφοροι παράγοντες όμως μπορούν να οδηγήσουν σε παράγωγή αυξημένων συγκεντρώσεων και οίνων με σαφή οργανοληπτικά ελαττώματα. Η δημιουργία του υδρόθειου σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητη για τις ζύμες γιατί επιτρέπει την παραγωγή θειούχων ενώσεων, όπως η θειαμίνη, η κυστεΐνη, η μεθειονίνη, απαραίτητων στην ανάπτυξη των ζυμών και άρα είναι συνδεδεμένη και με τον τρόπο μεταβολισμού του αζώτου. Παράγεται με την αναγωγή ανόργανων ενώσεων του θείου που υπάρχουν στο γλεύκος, ως αποτέλεσμα της θείωσης των σταφυλιών ή του γλεύκους. Το διοξείδιο του θείου αφομοιώνεται από τις ζύμες πολύ εύκολα. Το υδρόθειο μπορεί να προέρχεται επίσης από την αποικοδόμηση πρωτεϊνών από τις ζύμες σε περιβάλλον που υπάρχει έλλειψη αφομοιώσιμου αζώτου. Παρόμοιο προϊόν είναι το διμεθυλοσουλφίδιο, προϊόν δευτερεύοντος μεταβολισμού του θείου που λαμβάνεται από την κυστεΐνη, που επίσης μπορεί να παραχθεί κατά την ωρίμανση του οίνου, συμμετέχοντας στην οσφρητική πολυπλοκότητα. Στον οίνο ανιχνεύονται και πολλές άλλες θειούχες ενώσεις μικρού σχετικά μοριακού βάρους που παράγονται είτε από τις ζύμες είτε μέσω της χημικής οδού. Ένα

μεγάλο μέρος τους απομακρύνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μαζί με το διοξείδιο του άνθρακα. Κατά την ωρίμανση μετασχηματίζονται συμμετέχοντας στα αρώματα παλαίωσης.

Μια άλλη κατηγορία ενώσεων είναι τα προϊόντα μεταβολισμού της κυστεΐνης, της μεθειονίνης και της ομομεθειονίνης όπως η 2-μερκαπτοαιθανόλη, από μία μεταβολική οδό που εικάζεται ότι είναι παρόμοια αυτής των ανωτέρων αλκοολών. Συνήθως, η περιεκτικότητά του δεν ξεπερνά το κατώφλι αντίληψης και γιαυτό συμμετέχουν στη γενική οσφρητική αντίληψη και πολυπλοκότητα του οίνου δίχως να δημιουργούν οργανοληπτικά ελαττώματα. Κάποιες μερκαπτάνες, όπως η 4-μεθυλο-4-αιθυλο-πεντάν-2-όλη, ή οποία έχει εξαιρετικά χαμηλό κατώφλι αντίληψης, ελευθερώνονται ενζυμικά από πρόδρομες ουσίες που υπάρχουν στα σταφύλια της ποικιλίας Sauvignon Blanc, συμβάλλοντας έτσι στο χαρακτηριστικό άρωμα της ποικιλίας. Το γεγονός ότι το γλεύκος των σταφυλιών της ως άνω ποικιλίας δεν είναι τόσο αρωματικό όσο οι παραγόμενοι από αυτό οίνοι, αποδίδεται την ενζυμική επίδραση επί της αντίστοιχης κυστεΐνης, πρόδρομης ουσίας, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Σημαντικό για τη δράση αυτή θεωρείται το στέλεχος της ζύμωσης που θα χρησιμοποιηθεί (Σουφλερός, 2000, Τσακίρης, 2014, Ribéreau-Gayon, 2006b, Jackson, 2002).

#### 2.5.3.5 Πτητικές φαινόλες

Οι πτητικές φαινόλες είναι δυνατό να συνεισφέρουν στο άρωμα του οίνου θετικά ή αρνητικά, κάτι το οποίο εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους (το κατώφλι αντίληψής τους είναι πολύ χαμηλό) και από το γεγονός ότι έχουν εξαιρετικά ευδιάκριτο άρωμα.

Ο Etievant (1999) μελέτησε το φαινολικό άρωμα ερυθρών οίνων και κατέληξε ότι οφείλεται στις 4-αιθυλο-φαινόλες. Επιπρόσθετα, κατέληξε ότι η 4-αιθυλο-φαινόλη συνεισφέρει περισσότερο από την 4-αιθυλο-γουαϊακόλη. Το ευχάριστο άρωμα της 4-αιθυλο-φαινόλης (άρωμα δέρματος, ξύλου, φαρμακευτικό, φαινολικό) μεταβάλλεται σε δυσάρεστο όταν η συγκέντρωσή της αυξάνει.

Οι λευκοί οίνοι χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις 4-βινυλο-φαινολών και χαμηλές συγκεντρώσεις 4-αιθυλο-φαινολών. Το αντίστροφο ισχύει για τους ερυθρούς οίνους. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο ότι οι ερυθροί οίνοι περιέχουν ενώσεις (όπως μεγάλου μοριακού βάρους τανίνες), οι οποίες δρουν παρεμποδιστικά στο σχηματισμό των βινυλο-φαινολών.

Οι πτητικές φαινόλες δεν εντοπίζονται στα γλεύκη αλλά σχηματίζονται στους οίνους από το μεταβολισμό κάποιων πρόδρομων ενώσεων (πιο συγκεκριμένα, το p-κουμαρικό οξύ και το φερούλικό οξύ αποκαρβοξυλιώνονται από τους ζυμομύκητες και σχηματίζονται αντίστοιχα η 4-βινυλο-φαινόλη και η 4-βινυλο-γουαϊακόλη).

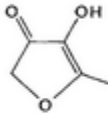
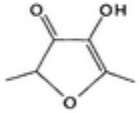
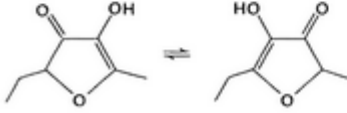
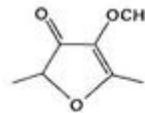
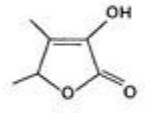
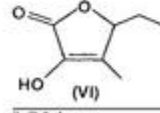
Οι πτητικές φαινόλες είναι δυνατόν να σχηματισθούν και από τη χημική αποικοδόμηση της λιγνίνης των βαρελιών, κατά τη διάρκεια παλαίωσης των οίνων. Σημαντικό ρόλο στα ποσά των πτητικών φαινολών που παράγονται με αυτόν τον τρόπο παίζει ο τύπος του ξύλου των βαρελιών καθώς επίσης και ο τρόπος κατεργασίας τους (κάψιμο).

### 2.5.3.6 Λακτόνες

Οι λακτόνες αποτελούν μία ιδιαίτερη κατηγορία εστέρων, οι οποίοι σχηματίζονται με *ένδο-εστεροποίηση* μεταξύ ενός καρβοξυλίου και υδροξυλίου. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτει ένας κυκλικός εστέρας, ο οποίος βρίσκεται σε ισορροπία με το υδροξυ-οξύ. Οι περισσότερες λακτόνες που ανευρίσκονται στους οίνους είναι γ-λακτόνες, δηλαδή το υδροξύλιο βρίσκεται σε γ-θέση ως προς το καρβοξύλιο του υδροξυ-οξέος και προέρχονται από το μεταβολισμό των ζυμών και από το ξύλο δρυός των βαρελιών.

Οι πιο σημαντικές λακτόνες για το άρωμα των οίνων είναι η σολερόνη (solerone: γ-λακτόνη του 4-ακέτυλο-4-υδροξυ-βουτανοϊκού οξέος), η σοτολόνη (sotolone: 4,5-διμεθυλο-3-υδροξυ-2(5H)-φουρανόνη) και οι λακτόνες δρυός (oak lactones: ισομερή της γ-λακτόνης του 3-μεθυλο-4-υδροξυ-οκτανοϊκού οξέος). Το άρωμα που προσδίδει η σολερόνη έχει περιγραφεί παρόμοιο με αυτό οίνου παλαιωμένου σε φιάλη (*bottle-aged*). Η σοτολόνη έχει ανιχνευθεί σε οίνους που παραχθήκαν από σταφύλια τα οποία είχαν μολυνθεί από τον μύκητα *Botrytis cinerea*. Έχει γλυκό άρωμα που προσομοιάζει αυτό της καραμέλας.

Από τις πτητικές ενώσεις που εκχυλίζονται στους οίνους από το ξύλο δρυός κατά τη διάρκεια της παλαίωσης σε βαρέλια, οι λακτόνες δρυός (*oak lactones*) θεωρούνται πολύ σημαντικές για το άρωμα. Η συγκέντρωση του *cis*-ισομερούς έχει συσχετισθεί θετικά με την ένταση του αρώματος καρύδας που περιγράφουν τους οίνους *Chardonnay*, καθώς και με την ένταση του αρώματος καρύδας, βανίλιας και σοκολάτας που χαρακτηρίζουν τους οίνους *Cabernet Sauvignon*. Για τις περισσότερες από αυτές τις λακτόνες τα ποσοτικά δεδομένα που αφορούν στη γεύση και στο άρωμα είναι περιορισμένα ή όχι μεγάλης ακρίβειας. Αυτό εξηγείται από τις τεχνικές δυσκολίες κατά τη διάρκεια των πειραματικών δεδομένων (οι ενώσεις μπορούν να παραχθούν και από αφυδάτωση 4- και 5-υδροξυ οξέων, και άρα οι συγκεντρώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι πιθανό να είναι υψηλότερες από τις πραγματικές) (Ribéreau-Gayon et al., 2006b, Jackson, 2002).

Structure	Substituent/trivial name or trade name (odor threshold in µg/kg, water)	Aroma quality	Occurrence
<b>A. 3(2H)-Furanones</b>			
 (I)	4-Hydroxy-5-methyl <i>Norfuraneol</i> (nasal: 23,000)	Roasted chicory-like, caramel	Meat broth
 (II)	4-Hydroxy-2,5-dimethyl <i>Furaneol</i> (nasal: 60; retronasal: 25)	Heat-treated strawberry, pineapple-like, caramel	cf. Table 5.20
 (III)	2-(5)-Ethyl-4-hydroxy- 5-(2)-methyl <sup>a</sup> <i>Ethylfuraneol</i> (nasal: 7.5)	Sweet, pastry, caramel	Soya sauce Emmental cheese
 (IV)	4-Methoxy-2,5-dimethyl <i>Mesifuran</i> (nasal: 3400)	Sherry-like	Strawberry, raspberry <sup>b</sup>
<b>B. 2(5H)-Furanones</b>			
 (V)	3-Hydroxy-4,5-dimethyl <i>Sotolon</i> (nasal, R-form 90, recomate, retronasal: 3)	Caramel, protein hydrolysate S-form 7	Coffee, sherry, seasonings, fenugreek seeds
 (VI)	5-Ethyl-3-hydroxy- <i>Abhexon</i> hydrolysate (nasal: 30, retronasal: 3)	Caramel, 4-methyl protein	Coffee, seasonings

<sup>a</sup> Of the two tautomeric forms, only the 5-ethyl-4-hydroxy-2-methyl isomer is aroma active.

<sup>b</sup> Arctic bramble (*Rubus arcticus*).

Εικόνα 8: Φουρανόνες που συναντιούνται στα τρόφιμα

### 2.5.3.7 Ακετάλες

Οι ακετάλες σχηματίζονται από την αντίδραση μιας αλδεΐδης με δύο αλκοόλες, κατά τη διάρκεια παλαίωσης των οίνων. Η μέθοδος απομόνωσης επηρεάζει σημαντικά τον ποσοτικό προσδιορισμό τους, διότι επικρατούν συνθήκες οι οποίες ευνοούν το σχηματισμό των ακεταλών. Επομένως, οι συγκεντρώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι συνήθως υπερεκτιμημένες.

Οι πιο σημαντικές ακετάλες που ανευρίσκονται στους οίνους είναι το 1,1-διαιθοξυ-αιθάνιο, το 1-αιθοξυ-1-(3-μεθυλο-βουτοξυ)-αιθάνιο και το 1,1-δι-(3-μεθυλο-βουτοξυ)-αιθάνιο, διότι σχηματίζονται από την ακεταλδεΐδη, την αιθανόλη και την 3-μεθυλο-βουτανόλη που απαντούν σε μεγάλες ποσότητες στους οίνους. Το 1,1-διαιθοξυ-αιθάνιο έχει το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τις υπόλοιπες ακετάλες και γι' αυτό το λόγο θεωρείται ότι ίσως συνεισφέρει στο άρωμα των

οίνων και κυρίως σε αυτούς τύπου Sherry. Η οσμή που προσδίδει έχει περιγραφεί ως χορτώδης.

Η αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ γλυκερόλης και ακεταλδεΐδης (σε pH κρασιού) οδηγεί στο σχηματισμό 4 ισομερών. Οι 4 ακετάλες είναι οι cis και trans 5-υδροξυ-2-μεθυλ-1,3-διοξάνιο καθώς και οι cis και trans 4-υδροξυμεθυλ-2-μεθυλ-1,3-διοξολάνιο οι οποίες είχαν ανευρεθεί σε κρασιά τύπου sherry (Jackson 2002).

Ο da Silva Ferreira κατόπιν μελέτης έδειξε ότι το άρωμά τους περιγράφεται σα γλυκό, που μοιάζει με παλιού πόρτο (old port-like), με την trans-5-υδροξυ-2-μεθυλ-1,3-διοξάνιο να έχει τη μεγαλύτερη ένταση αρώματος, και αποφάνθηκε ότι αυτές οι ουσίες θα μπορούσε να χρησιμοποιηθούν σα δείκτες ένδειξης παλαιότητας του κρασιού πόρτο.

### 3. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Παρασκευή – προετοιμασία δειγμάτων οίνου

Η οινοποιητική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παραγωγή των δειγμάτων ήταν η εξής:

Υγιή σταφύλια της ποικιλίας Μαλαγουζιά (400 kg) συλλέχτηκαν χειρωνακτικά από τους αμπελώνες του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα Σπάτα Αττικής, στην κατάλληλη τεχνολογική ωριμότητα, για την παρασκευή ξηρού οίνου. Τα σταφύλια μεταφέρθηκαν στο πειραματικό οινοποιείο του Οινολογικού εργαστηρίου του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου και οινοποιήθηκαν με τις συνήθεις διαδικασίες της λευκής οινοποίησης.

Τα σταφύλια, μετά από σπάσιμο και αποβοστρύχωση, πιέστηκαν σε κατακόρυφη πρέσα φρούτων και προστέθηκε θειώδης ανυδρίτης (SO<sub>2</sub>) με τη μορφή του μεταθειώδους καλίου 50mg/L. Το γλεύκος που παραλήφθηκε αφέθηκε στους 12 °C για 12 ώρες για καθίζηση και κατόπιν απολασπώθηκε με μετάγγιση. Οι προζυμωτικές μετρήσεις ήταν:

- **ολική οξύτητα 6.2 g/L,**
- **pH 3.2** και
- **ανάγοντα σάκχαρα 215 g/L**

Το απολασπωμένο γλεύκος διαιρέθηκε σε τρία ίσα μέρη και το καθένα εμβολιάστηκε με μία από τις παρακάτω εμπορικές ζύμες αφού πρώτα ενεργοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή.

- **Melody**–CHR Hansen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Torulasporea delbrueckii*),
- **Vivace**- Renaissance yeast (*Saccharomyces cerevisiae*),

- **X5**–Laffort (*Saccharomyces cerevisiae*).

Κάθε μια από τις τρεις δεξαμενές ζύμωσης διαιρέθηκε εκ νέου και στα ίσα μέρη αυτού προστέθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις οργανικού αζώτου, **15** και **30 g/hl Springferm** (Fermentis), σε τρία διαφορετικά στάδια της ζύμωσης (**0, 24 και 48 ώρες** μετά τον εμβολιασμό). Τα δείγματα και η κωδικοποίησή τους φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Κάθε μικρο-οινοποίηση (σύνολο 18 μικροοινοποιήσεις) έγινε σε δύο επαναλήψεις.

Εμπορικές ζύμες																	
Melody						Vivace						X5					
Συγκέντρωση οργανικού αζώτου (mg/L)																	
150			300			150			300			150			300		
Χρόνος προσθήκης (ώρες από τον εμβολιασμό)																	
0	24	48	0	24	48	0	24	48	0	24	48	0	24	48	0	24	48

Η ζύμωση έλαβε χώρα σε ελεγχόμενες συνθήκες, σε σταθερή θερμοκρασία 19°C. Η εξέλιξη των ζυμώσεων παρακολουθούνταν καθημερινά με τη χρήση οπτικού διαθλασιμέτρου ενώ το τέλος τους διαπιστώθηκε με τη μέτρηση της πυκνότητας. Μετά το τέλος τους, ο οίνος αφέθηκε για καθίζηση, ακολούθησε μετάγγιση για να απομακρυνθούν οι λεπτές οινολάσπες, προστέθηκε θειώδης ανυδρίτης με τη μορφή μεταθειώδους καλίου (metabisulfite) ώστε να επιτευχθούν επίπεδα ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη 25 mg/L και στη συνέχεια εμφιαλώθηκε. Πριν την εμφιάλωση, παραλήφθηκαν 500 mL και χρησιμοποιήθηκαν για τις βασικές αναλύσεις οίνων σύμφωνα με τις επίσημες ή τις συνήθεις μεθόδους του ΟΙV (**ολική οξύτητα, pH, αιθανόλη %vol, ελεύθερος και ολικός θειώδης ανυδρίτης SO<sub>2</sub>**). Οι φιάλες των 750mL αποθηκεύτηκαν σε κελάρι στους 12°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση των πτητικών συστατικών.

Στους τελικούς οίνους μετρήθηκαν, με HPLC, τα οργανικά οξέα (κιτρικό, τρυγικό, μηλικό, ηλεκτρικό, γαλακτικό, οξικό), η εκατοστιαία περιεκτικότητα της αιθανόλης (%EtOH), καθώς και η συγκέντρωση της παραγόμενης γλυκερόλης.

Τέλος, μέσω αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή μάζας (GC-MS) ανιχνεύθηκαν οι παρακάτω 12 ενώσεις που συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ των 18 οίνων. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν 3 εστέρες ανώτερων αλκοολών, 5 εστέρες λιπαρών οξέων, 3 ανώτερες αλκοόλες και 1 τερπένιο.

Πίνακας 4: Οι 13 ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ των 8 οίνων, και η χαρακτηριστική οσμή τους

<b>Ανώτερες αλκοόλες</b>		
Isoamylalcohol (3-methyl-1-butanol)	ισοαμυλική αλκοόλη	αρώματα καμένου, αλκοόλ (Sánchez-Palomoetal. 2015)
Phenethylalcohol (2-phenylethanol)	φαινυλ-2-αιθανόλη	λουλούδια, τριαντάφυλλο, γιασεμί (Sánchez-Palomoetal. 2015)
1-hexanol	1-εξανόλη	Χορτώδης οσμή (Jackson 2002)
<b>Εστέρες Ανώτερων Αλκοολών</b>		
Hexylacetate	οξικός εξυλεστέρας	φρουτώδες, μήλο (Rojasetal. 2001)
Isoamylacetate	οξικός ισοαμυλεστέρας	μπανάνα (Sánchez-Palomoet al.2015)
2-phenyl ethylacetate	οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας	λουλούδια (Sánchez-Palomoetal. 2015)
<b>Εστέρες λιπαρών οξέων</b>		
Ethyldecanoate	Δεκανοϊκός αιθυλεστέρας	γλυκό, φρουτώδες (Sánchez-Palomoetal. 2015)
Ethylcaproate (Ethylhexanoate)	Καπρωϊκός αιθυλεστέρας	φρουτώδες, πράσινο μήλο (Sánchez-Palomoetal. 2015)
Ethylcaprylate (Ethyl octanoate)	Καπρυλικός αιθυλεστέρας	γλυκό, φρουτώδες (Sánchez-Palomoetal. 2015)
Ethylbutyrate	Βουτυρικός αιθυλεστέρας	φρουτώδες (Burdock 2010)
Ethyl laurate (Ethyl dodecanoate)	Λαυρικός αιθυλεστέρας	λουλούδια, φρουτώδες, κρεμώδες (Burdock 2010)
<b>Τερπένια</b>		
Linalool	λιναλοόλη	λουλούδια, τριαντάφυλλο, λεμόνι (Rogercon&Symington 2013)

### 3.2 Ανάλυση οξέων-αλκοολών με HPLC

Η μεθοδολογία ανάλυσης των δειγμάτων με HPLC που ακολουθήθηκε στην παρούσα διατριβή ήταν η εξής:

Η ανάλυση των οργανικών οξέων, αλλά και EtOH/γλυκερόλης έγινε σε σύστημα HPLC Jasco 880-PU συνοδευόμενο από δύο ανιχνευτές σε σειρά. Ο ανιχνευτής UV (Series 1050, HewlettPackard) ρυθμίστηκε στα 214 nm για την ανίχνευση των οργανικών οξέων του οίνου ενώ ο ανιχνευτής RI (LC-30 RIDetector, PerkinElmer) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της αιθανόλης και της γλυκερόλης. Ο διαχωρισμός των συστατικών έγινε με στήλη Rezex™ ROA-OrganicAcidH+ (8%), LCColumn 300 x 7.8 mm (Phenomenex, U.S.A.). Η στήλη, κατά την διάρκεια της ανάλυσης, βρίσκονταν σε σταθερή θερμοκρασία, της 50°C (Model7971 columnheaterJonesChromatography). Η έκλουση γινόταν με διάλυμα 0.5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε απιονισμένο/απεσταγμένο νερό που είχε φιλτραριστεί με φίλτρο 0.2 μm και ανανεωνόταν κάθε 2 μέρες. Η ταχύτητα ροής ήταν 0.5 mL/min.

Τα δείγματα οίνου, χωρίς προηγούμενη κατεργασία, διηθήθηκαν με φίλτρο πορότητας 0.2μm (celluloseacetatemembrane) σε καθαρό γυάλινο φιαλίδιο. Από εκεί, με σύριγγα των 50μL, λαμβανόταν δείγμα και ακολουθούσε έγχυση με υπερπλήρωση, στο αντίστοιχο σύστημα έγχυσης του υγρού χρωματογράφου, όγκου 20 μL. Κάθε δείγμα αναλύθηκε σε δύο επαναλήψεις.

Η καταγραφή των χρωματογραφημάτων και η ολοκλήρωση των κορυφών έγινε με το λογισμικό PeakSimple 2.7.7 με τα ίδια εργαλεία ολοκλήρωσης και για της δύο ανιχνευτές (οξέων και αλκοολών).

#### Πρότυπες Καμπύλες Αναφοράς Οργανικών Οξέων, EtOH, Γλυκερόλης

Η μέθοδος βαθμονομήθηκε με πρότυπα διαλύματα για το κάθε συστατικό. Οι καμπύλες αναφοράς για τα οργανικά οξέα: κιτρικό, τρυγικό, μηλικό, ηλεκτρικό, γαλακτικό, οξικό, την αιθανόλη και την γλυκερόλη έγιναν με χρήση εμπορικών σκευασμάτων της κάθε ουσίας, διαλυμένες σε απιονισμένο νερό, σε πέντε (5) διαφορετικές συγκεντρώσεις η καθεμία, με εύρος τιμών αυτές που συναντώνται συνήθως της οίνους. Στη συνέχεια, έγινε η ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων με την ίδια μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε και στα δείγματα οίνου και τα εμβαδά των κορυφών καταγράφηκαν. Κάθε διάλυμα αναλύθηκε τουλάχιστον δύο φορές. Από την αντιστοίχιση των συγκεντρώσεων των συστατικών με τα εμβαδά των κορυφών σε ένα σύστημα αξόνων προέκυψαν πρότυπες καμπύλες οι οποίες περιγράφονται από της ευθείες της μορφής  $y=ax+\beta$  που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.



Πίνακας 5: Πρότυπες καμπύλες αναφοράς οργανικών οξέων (μέσω HPLC)

Οργανικά Οξέα	Εύρος συγκέντρωσης(g/L)	Καμπύλες αναφοράς	R <sup>2</sup>
Citric	0.5-4.0	$y=751.2x-36.56$	0.996
Tartaric	0.75-6.0	$y=1164x-83.43$	0.996
Malic	0.5-4.0	$y=654.6x-45.89$	0.997
Succinic	0.5-4.0	$y=397.5x-16.39$	0.997
Lactic	0.5-4.0	$y=547.9x-33.62$	0.997
Acetic	0.5-4.0	$y=366.9x-21.42$	0.997

Πίνακας 6: Πρότυπες καμπύλες αναφοράς αιθανόλης και γλυκερόλης (μέσω HPLC)

Αλκοόλη	Εύρος συγκέντρωσης(g/L)	Καμπύλες αναφοράς	R <sup>2</sup>
EtOH	1.6-5.0 g/L	$y=52.79x-65.5$	0.996
Glycerol	6.66-20.0 %	$y=8.368x+5.504$	0.993

### 3.3 Εκχύλιση πτητικών συστατικών

Για την απομόνωση και συμπύκνωση των πτητικών συστατικών των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία υγρής – υγρής εκχύλισης. Τα διάφορα στάδια που ακολουθήθηκαν φαίνονται παρακάτω.

Σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρου falcon των 50mL προστέθηκαν 1.5gNaCl και με σιφώνιο μεταφέρθηκαν 25mL δείγματος. Στη συνέχεια προστέθηκαν 3mLCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25μL καρβοφυλένιο και 25μL 3-οκτανόλη, ως εσωτερικά πρότυπα. Το falcon έκλεισε ερμητικά και αναδεύτηκε σε μηχανικό αναδευτήρα vortex στις 500rpm για 2min ενώ στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο, στους 0°C, για 10min.

Στο τέλος του χρόνου, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 15min στις 9000rpm στους 5°C. Το υποκείμενο διάλυμα του διχλωρομεθανίου, έχοντας εκχυλίσει τις πτητικές ενώσεις του οίνου, συλλέχθηκε με πλαστική σύριγγα των 10mL (ανθεκτική στο διχλωρομεθάνιο) που έφερε βελόνα μεγάλου μήκους και τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο των 10mL.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε με νέα προσθήκη 3 mL διχλωρομεθανίου. Μετά τη φυγοκέντρωση, το εκχύλισμα αφαιρέθηκε όπως και πριν, μεταφέρθηκε στο ίδιο φιαλίδιο με το προηγούμενο και αποθηκεύτηκε στους -80°C. Κάθε δείγμα οίνου εκχυλίστηκε δύο φορές.

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία για όλα τα δείγματα οίνου, τα εκχυλίσματα διχλωρομεθανίου αφυδατώθηκαν με την προσθήκη 0.5g άνυδρου άλατος θειικού νατρίου

(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) σε κάθε φιαλίδιο και ισχυρή ανάδευση για 3min, ώστε το αλάτι να έρθει σε επαφή με όλη τη μάζα του διαλύματος και να αφαιρεθεί, κατά το δυνατόν, από την φάση του διχλωρομεθανίου η υγρασία. Ακολούθησε διήθηση των εκχυλισμάτων μέσω φίλτρου χαρτιού 0.45μm αφού πρώτα είχε ξεπλυθεί με 1mL διαλύτη για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών που πιθανόν να επιβάρυναν το δείγμα. Το διήθημα συλλέχθηκε σε καθαρό γυάλινο φιαλίδιο των 10mL. Το αλάτι που έμεινε στο φίλτρο ξεπλύθηκε με 1mL διχλωρομεθάνιο και τα ξεπλύματα προστέθηκαν στο φιαλίδιο. Τέλος, το αφυδατωμένο και φιλτραρισμένο εκχύλισμα (7 mL) συμπυκνώθηκε με συνεχή ροή αζώτου μέχρι 0.5 mL. Ακολούθησε ανάλυση των πτητικών συστατικών με GC-MS.

### 3.4 Ανάλυση πτητικών συστατικών με GC-MS

Τα πτητικά συστατικά που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα οίνων με την προηγούμενη διαδικασία αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία και αναγνωρίστηκαν με ανιχνευτή μάζας. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το TraceβGC-Ultra με στήλη Thermo-5MS (30m x 0.25mmID x 0.25μm film thickness) και λογισμικό Xcalibur. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε Ήλιο με ρυθμό ροής 1mL/min. Ο όγκος δείγματος ήταν 1μL με χειροκίνητη έγχυση από τον χειριστή της GC-MS. Η θερμοκρασία του δειγματολήπτη ήταν ρυθμισμένη στους 220°C ενώ η θερμοκρασία της στήλης στους 250°C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του χρωματογράφου ξεκινούσε από τους 40°C, όπου και παρέμενε για 3min. Στη συνέχεια αυξανόταν με ρυθμό 3°C/min έως τους 160°C και κατόπιν με ρυθμό 10°C/min έως τους 240°C όπου και παρέμενε σταθερή για 10min.

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των ενώσεων, δημιουργήθηκαν καμπύλες πέντε (5) σημείων με χρήση εσωτερικών προτύπων. Το όργανο αυτό έχει τη δυνατότητα επιλογής μεθόδου fullscan (πλήρους σάρωσης του φάσματος) ή SIM (καταγραφής επιλεγμένων ιόντων). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε μέθοδος SIM (Selected Ion Monitoring) με επιλογή των πιο χαρακτηριστικών ιόντων για κάθε ένωση.

#### Πρότυπες Καμπύλες Αναφοράς Πτητικών Ενώσεων

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών που θα ανιχνεύονταν στα δείγματα σχηματίστηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς με πέντε σημεία που αντιστοιχούσαν σε πέντε γνωστές συγκεντρώσεις για κάθε ένα συστατικό που αναλύθηκε-εντοπίστηκε (για τα συστατικά που έδιναν ξεκάθαρη κορυφή και ταυτοποιούνταν από τον χρόνο κατακράτησης- Rt).

Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν 0.12, 0.24, 0.48, 0.96 και 1.92mg/L. Το διάλυμα για την κάθε συγκέντρωση δημιουργήθηκε με χρήση εμπορικών σκευασμάτων καθαρών ενώσεων τα οποία διαλύθηκαν σε καθαρή EtOH 99% και στη συνέχεια αραιώθηκαν για την επίτευξη των επιθυμητών συγκεντρώσεων. Στη συνέχεια κάθε ένα από τα διαλύματα εκχυλίστηκε με τη μέθοδο υγρής-υγρής εκχύλισης και αναλύθηκε με την ίδια

μέθοδο στη GC-MS που περιεγράφηκε για τα δείγματα. Κάθε συγκέντρωση αναλύθηκε τουλάχιστον δύο φορές.

Τα συστατικά που βαθμονομήθηκαν, το εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε και οι ευθείες βαθμονόμησης που προέκυψαν από την αντιστοίχιση των πρότυπων συγκεντρώσεων με τα εμβαδά των κορυφών τους σε ένα σύστημα αξόνων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

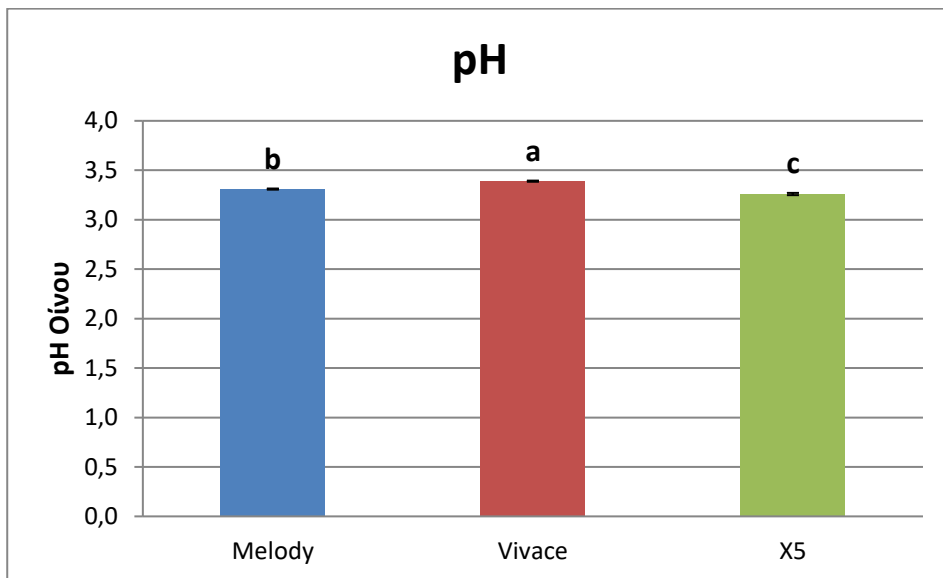
*Πίνακας 7: Πρότυπες καμπύλες αναφοράς των πτητικών ενώσεων (μέσω GC-MS)*

<b>Πτητικές ενώσεις</b>	<b>Εύρος συγκέντρωσης (mg/L)</b>	<b>Καμπύλες αναφοράς</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
isoamyl alcohol	4-10	$y=0.1809x-0.1649$	0.9717
phenethyl alcohol	2-32	$y=5.204x-4.8593$	0.9914
1 hexanol	0.12-1.92	$y=0.632x-0.0393$	0.9910
hexyl acetate	0.12-1.92	$y=0.7655x-0.0113$	0.9963
isoamyl acetate	0.5-8	$y=0.497x+0.0879$	0.9975
phenylethyl acetate	0.12-1.92	$y=3.1533x-0.3717$	0.9927
ethyl butyrate	0.12-1.92	$y=0.235-0.0028$	0.9931
ethyl caproate	0.12-1.92	$y=0.6527x-0.0076$	0.9969
ethyl octanoate	0.12-1.92	$y=0.8015x-0.0165$	0.9977
ethyl decanoate	0.12-1.92	$y=0.9971x-0.0783$	0.9940
ethyl laurate	0.12-1.92	$y=0.6709x+0.0848$	0.9758
linalool	0.04-0.64	$y=0.424x-0.0034$	0.9968

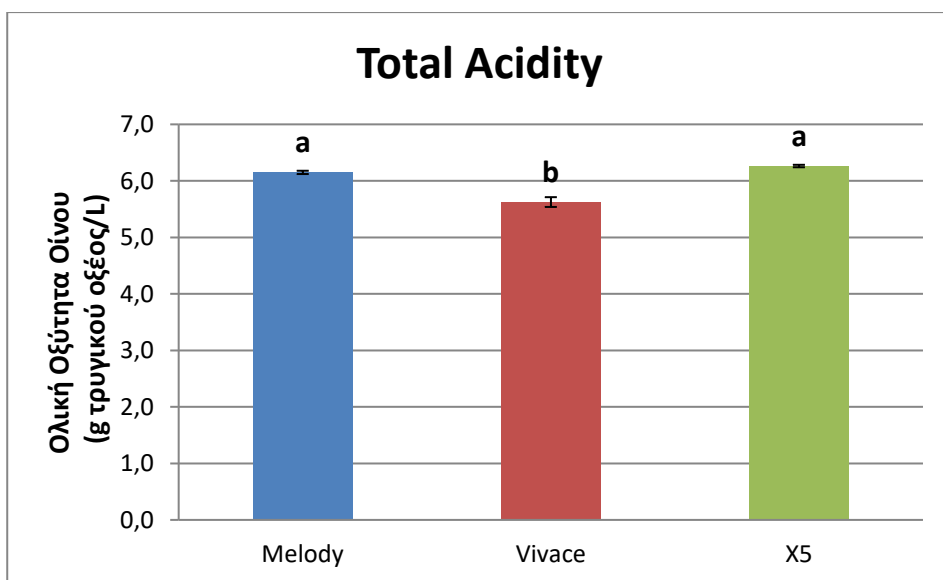
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

### 4.1 Επίδραση της ζύμης

Για την μελέτη της επίδρασης του διαφορετικού στελέχους ζυμομύκητα (**Melody**, **Vivace**, **X5**) στην αλκοολική ζύμωση, χρησιμοποιήθηκαν οι πειραματικές μικροοινοποιήσεις με συγκέντρωση οργανικού αζώτου ίσης με 150mg/L και χρόνο προσθήκης  $t=0$ . Τα αποτελέσματα παρατίθενται στα παρακάτω διαγράμματα:

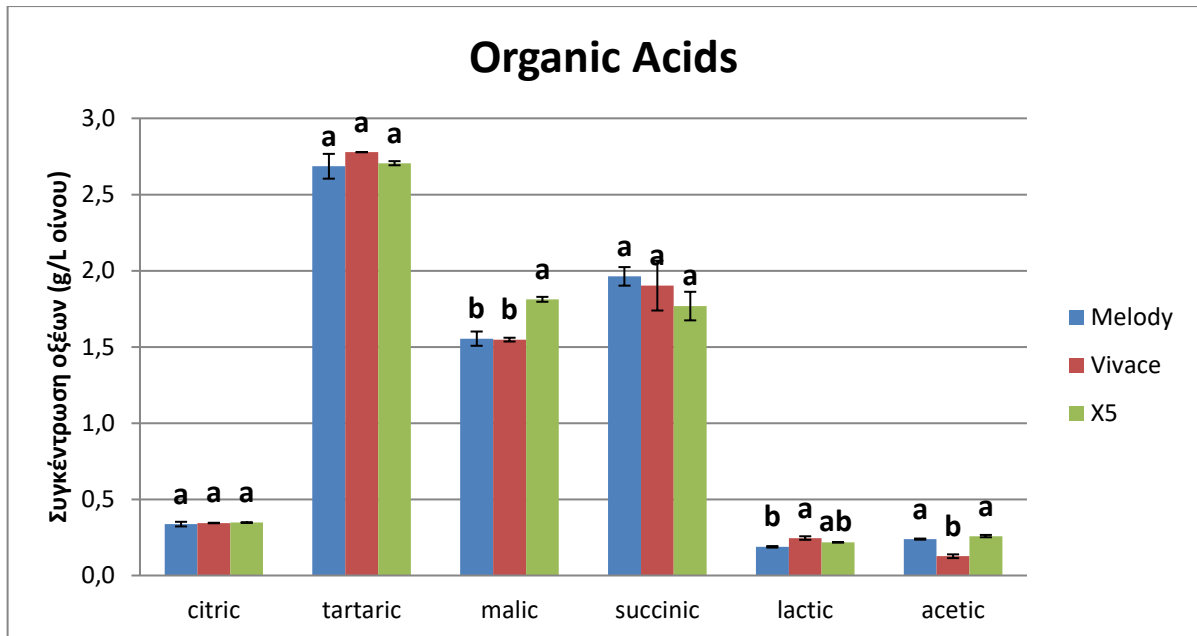


Διάγραμμα 1: Το pH των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών εμπορικών ζυμών



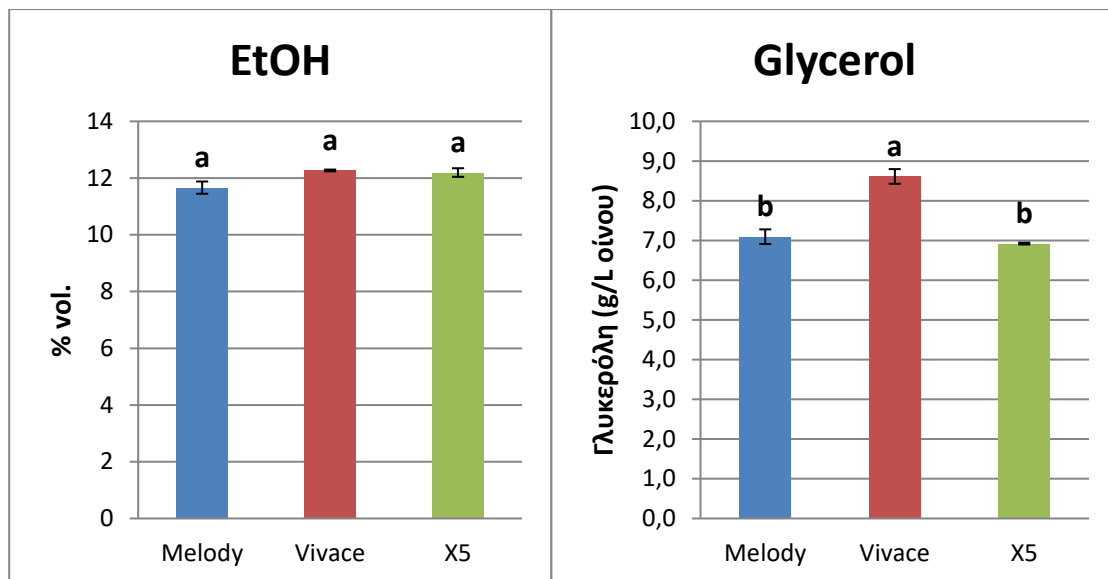
Διάγραμμα 2: Η Ολική Οξύτητα των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών εμπορικών ζυμών

Όπως φαίνεται στα δύο παραπάνω διαγράμματα 1 και 2 ο οίνος της ζύμης Vivace έχει την χαμηλότερη οξύτητα (5.6 g/L) και αναμενόμενα το υψηλότερο pH (3.39). Ακολουθεί η ζύμη Melody με οξύτητα 6.1 g/L και pH 3.31, και τέλος η X5 με τον οίνο με την υψηλότερη οξύτητα (6.3 g/L) και το χαμηλότερο pH (3.26).



Διάγραμμα 3: Τα οργανικά οξέα των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών εμπορικών ζυμών

Από το παραπάνω διάγραμμα 3 των οργανικών οξέων παρατηρείται ότι οι τρεις παραγόμενοι οίνοι των διαφορετικών ζυμών δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές για τη συγκέντρωση σε κιτρικό οξύ (0.3 g/L), σε τρυγικό (2.7 g/L) και σε ηλεκτρικό (1.9 g/L), ενώ διαφορά σημειώνεται στην συγκέντρωση του μηλικού όπου ο οίνος της ζύμης X5 έχει την υψηλότερη συγκέντρωση (1.8 g/L), έναντι του 1.5 g/L των άλλων δύο. Στην διαφορά αυτή ίσως οφείλεται και η παραπάνω αυξημένη, σε σχέση με τα άλλους δύο οίνους, ολική οξύτητα του οίνου της ζύμης X5. Το γεγονός αυτό ίσως ερμηνεύεται από την ικανότητα μερικών ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* να καταναλώνουν μικρές ποσότητες μηλικού οξέος (Delcourt et al., 1995, Gao & Fleet, 1995, Volschenk et al., 1997). Μικρές διαφορές παρατηρούνται στη συγκέντρωση του γαλακτικού (~0.2 g/L) και του οξικού (~0.2 g/L).

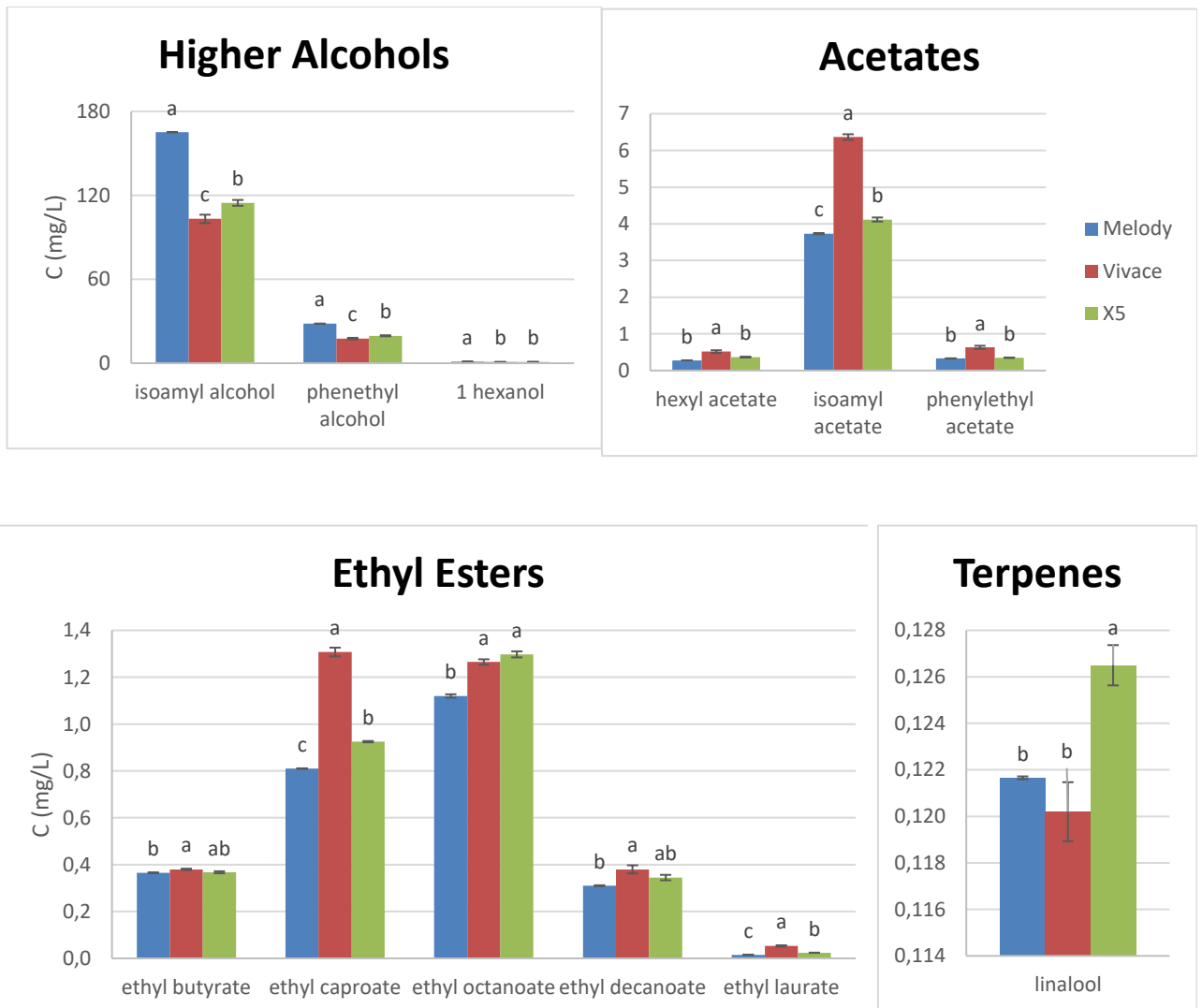


Διάγραμμα 4: Η συγκέντρωση της αιθανόλης και της γλυκερόλης των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών εμπορικών ζυμών

Οι τρεις παραγόμενοι οίνοι δεν είχαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους ως προς τον αλκοολικό του βαθμό (~12.2 %vol), έδειξαν όμως διαφοροποίηση στην συγκέντρωση της γλυκερόλης (διάγραμμα 4), όπου η ζύμη Vivace είχε την υψηλότερη στα 8.6 g/L, έναντι των άλλων δύο (~7 g/L). Ένα από τα χαρακτηριστικά των εμπορικών σκευασμάτων των ζυμών αποτελεί η παραγωγή γλυκερόλης, όπου όποιες ζύμες μπορούν να παράξουν υψηλά επίπεδα γλυκερόλης, φαίνεται να αυξάνουν το «σώμα» του οίνου (Gawel et al., 2007).

Οι ανώτερες αλκοόλες αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα αρωματικών ενώσεων στους 3 τελικούς οίνους (120-190 mg/L) με κυρίαρχη την ισοαμυλική αλκοόλη, που προσδίδει άρωμα αλκοόλ (100-165 mg/L, πολύ υψηλότερα από το κατώφλι αντίληψής της στα 30 mg/L (Xi et al., 2011)). Ακολουθεί η φαινύλ-2-αιθανόλη, που προσδίδει αρώματα λουλουδιών στους οίνους (17-28 mg/L, πάνω από το κατώφλι αντίληψής της στα 14 mg/L (Xi et al., 2011)). Τέλος, η 1-εξανόλη, με τη δυσάρεστη οσμή κομμένου γρασιδιού βρίσκεται σε ίχνη, της τάξης του 1 mg/L, αρκετά χαμηλότερα από το κατώφλι αντίληψής της στα 8 mg/L (Xi et al., 2011).

Όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα 5, η ζύμη Melody παράγει περισσότερες ανώτερες αλκοόλες, η ζύμη Vivace περισσότερες εστέρες ανώτερων αλκοολών και λιγότερες εστέρες λιπαρών οξέων σε σχέση με τις άλλες δύο, ενώ η X5 περισσότερα τερπένια (λιναλοόλη).



Διάγραμμα 5: Τα 12 πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στους παραγόμενους οίνους των τριών διαφορετικών εμπορικών ζυμών

Ακολουθούν οι εστέρες των ανώτερων αλκοολών με το οξικό οξύ (acetates) με συγκεντρώσεις από 4.3 – 7.5 mg/L με κυρίαρχο τον οξικό ισοαμυλεστέρα, που προσδίδει άρωμα μπανάνας (3.7 – 6.4 mg/L, πολύ υψηλότερα από το κατώφλι αντίληψής του στα 0.03 mg/L (Χι et al., 2011)). Ακολουθεί ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας, που προσδίδει αρώματα λουλουδιών, με συγκεντρώσεις από 0.33 – 0.63 mg/L (υψηλότερα από το κατώφλι αντίληψής του στα 0.25 mg/L (Χι et al., 2011)), και τέλος ο οξικός εξυλεστέρας, που προσδίδει φρουτώδες άρωμα μήλου, με συγκεντρώσεις από 0.28 – 0.52 mg/L, αρκετά χαμηλότερα από το κατώφλι αντίληψής του στα 1.5 mg/L (Χι et al., 2011).

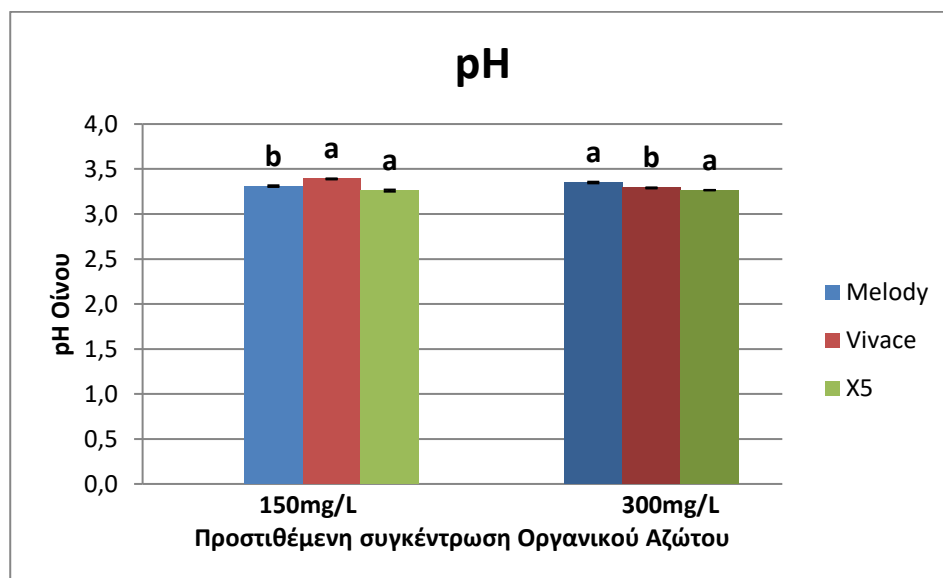
Στη συνέχεια, η συγκέντρωση των εστέρων των λιπαρών οξέων (ethylesters) κυμαίνονται από 2.6 - 3.4 mg/L, με κυρίαρχους τον καπροϊκό, που προσδίδει φρουτώδες άρωμα πράσινου μήλου (0.8 – 1.3 mg/L, πολύ υψηλότερα από το κατώφλι αντίληψής του

στα 0.014 mg/L (Xi et al., 2011)) και τον οκτανοϊκό αιθυλεστέρα, που προσδίδει και αυτός φρουτώδες άρωμα (1.1 – 1.3 mg/L, χαμηλότερα όμως από το κατώφλι αντίληψής του στα 0.25 mg/L (Xi et al., 2011)). Ακολουθούν σε μικρότερες συγκεντρώσεις, χαμηλότερες από το κατώφλι αντίληψής τους, ο δεκανοϊκός, ο βουτυρικός και ο λαυρικός αιθυλεστέρας.

Τέλος, από την ομάδα των τερπενίων, η λιναλοόλη, που προσδίδει στους οίνους αρώματα λουλουδιών, τριαντάφυλλου και λεβάντας, υπάρχει σε συγκεντρώσεις της τάξης των 0.12 mg/L αρκετά υψηλότερα από το κατώφλι αντίληψής της στα 0.025 mg/L (Xi et al., 2011).

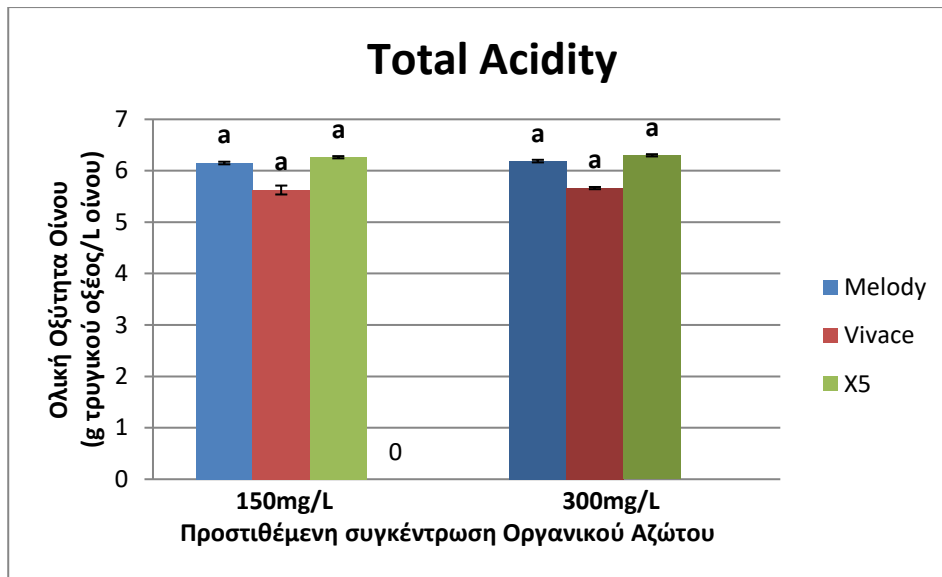
#### 4.2 Επίδραση της προστιθέμενης ποσότητας οργανικού αζώτου

Για την μελέτη της επίδρασης της διαφορετικής ποσότητας προσθήκης οργανικού αζώτου (150 και 300 mg/L) στον τελικό οίνο, χρησιμοποιήθηκαν οι πειραματικές μικροοινοποιήσεις και των τριών ζυμομυκήτων (**Melody**, **Vivace**, **X5**) με χρόνο προσθήκης  $t=0$ . Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την ανίχνευση σημαντικών διαφορών ανάμεσα στα δείγματα, πραγματοποιήθηκε ανάμεσα στους δύο τελικούς οίνους της ίδιας ζύμης, αλλά διαφορετικών συγκεντρώσεων προστιθέμενου οργανικού αζώτου (150 και 300 mg/L). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στα παρακάτω διαγράμματα:



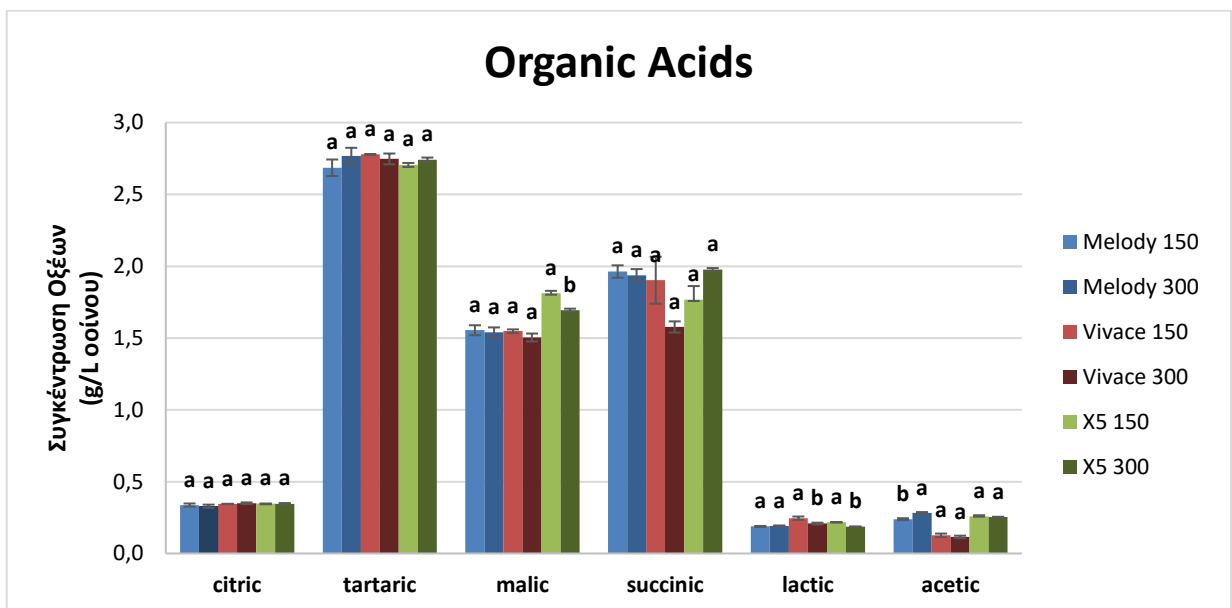
Διάγραμμα 6: Το pH των παραγόμενων οίνων των δύο προστιθέμενων συγκεντρώσεων οργανικού αζώτου





Διάγραμμα 7: Ηολική οξύτητα των παραγόμενων οίνων των δύο προστιθέμενων συγκεντρώσεων οργανικού αζώτου

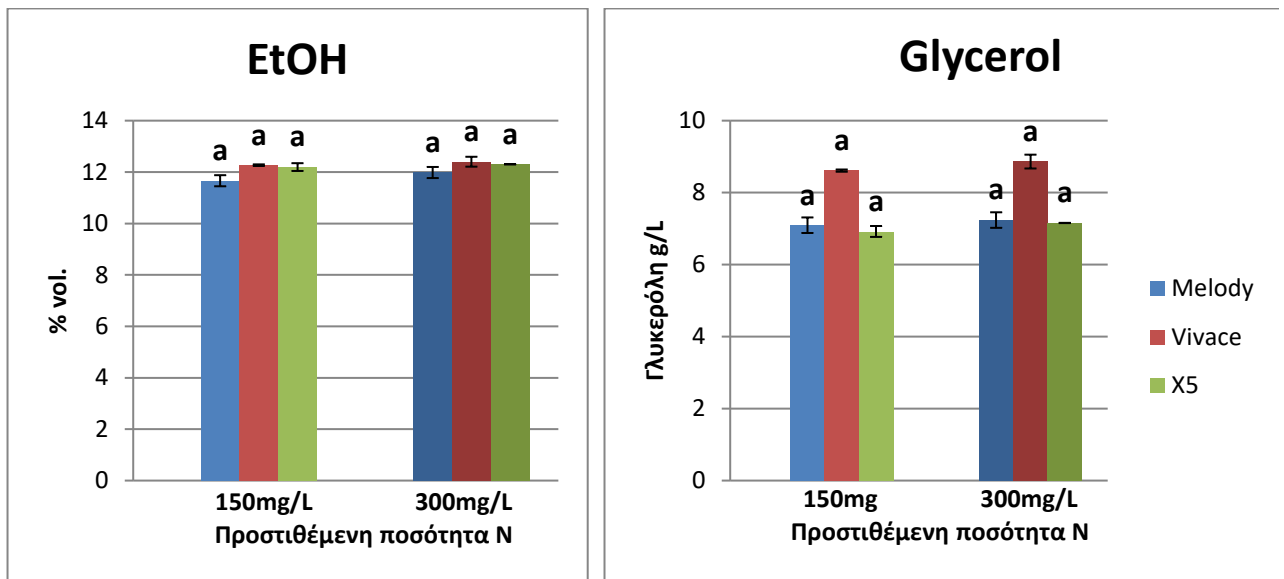
Οι δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις προστιθέμενου οργανικού αζώτου 150 και 300 mg/L, όπως φαίνεται, δεν είχε καμία επίδραση την ολική οξύτητα των τελικών οίνων (διάγραμμα 6). Επίσης, δεν παρουσιάζονται ουσιαστικές διαφορές στο pH τους (διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 8: Τα οργανικά οξέα των παραγόμενων οίνων των δύο προστιθέμενων συγκεντρώσεων οργανικού αζώτου

Τα οργανικά οξέα, όπως παρουσιάζονται στο παραπάνω διάγραμμα 8, δεν επηρεάζονται από τη διαφορετική ποσότητα προσθήκης οργανικού αζώτου, με εξαίρεση την πολύ μικρή διαφορά του μηλικού οξέος για τη ζύμη X5, όπου μειώνεται η συγκέντρωσή

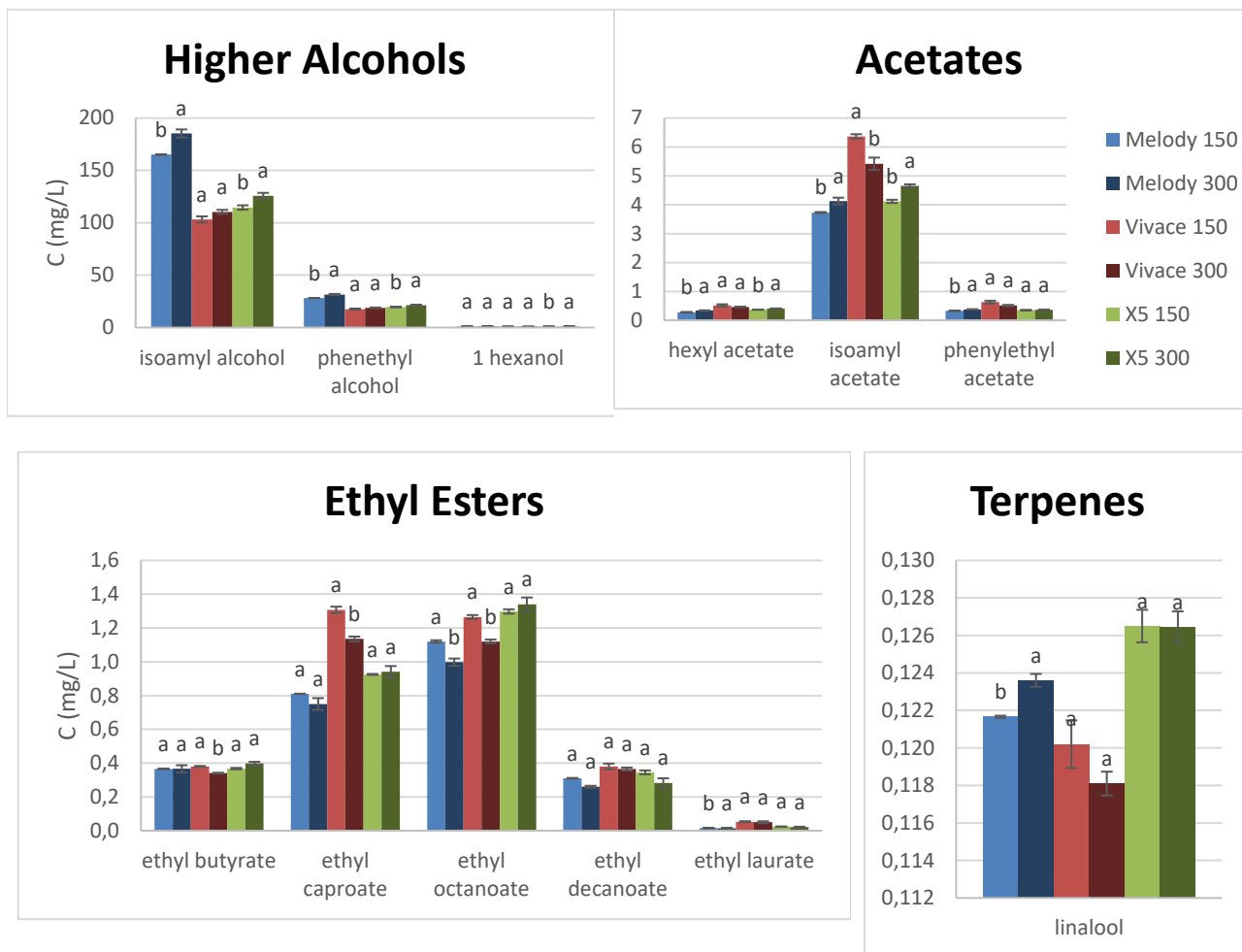
του σε υψηλότερες ποσότητες προσθήκης οργανικού αζώτου, κατά τη στιγμή του εμβολιασμού.



Διάγραμμα 9: Η συγκέντρωση της αιθανόλης και της γλυκερόλης των παραγόμενων οίνων των δύο προστιθέμενων συγκεντρώσεων οργανικού αζώτου

Όπως αποδεικνύεται από το παραπάνω διάγραμμα 9, η συγκέντρωση της αιθανόλης και της γλυκερόλης στους τελικούς οίνους, δεν επηρεάστηκαν από τις διαφορετικές ποσότητες προσθήκης οργανικού αζώτου, κατά τον εμβολιασμό. Σύμφωνα με τους Scanesetal. (1998), η παραγωγή της γλυκερόλης από στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να αυξηθεί από την περιεκτικότητα του γλεύκους σε ανόργανο άζωτο, καθώς έπειτα από έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι η παραγωγή της γλυκερόλης σε μέσο πλούσιο σε αμμωνιακό άζωτο, είναι υπερδιπλάσια αυτής σε μέσο πλούσιο σε μίγμα αμινοξέων.

Τα παρακάτω διαγράμματα 10 απεικονίζουν την επίδραση της ποσότητας του προστιθέμενου οργανικού αζώτου στα αρωματικά συστατικά των τελικών οίνων. Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε ανάμεσα στους δύο οίνους της ίδιας ζύμης, αλλά διαφορετικών συγκεντρώσεων οργανικού αζώτου. Παρατηρείται μία γενική αύξηση στη συγκέντρωσή τους στην υψηλή συγκέντρωση προστιθέμενου οργανικού αζώτου για τις ανώτερες αλκοόλες και τους εστέρες του, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στους εστέρες των λιπαρών οξέων, όπου παρατηρείται μία γενική μείωση. Η λιναλοόλη παραμένει στα ίδια επίπεδα. Συνολικά οι μεταβολές των ομάδων των πτητικών συστατικών των τελικών οίνων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 8. Φαίνεται ότι η ζύμη η οποία είχε την υψηλότερη αύξηση στην συγκέντρωση των πτητικών συστατικών ήταν η Melody.



Διάγραμμα 10: Τα 12 πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν των παραγόμενων οίνων των δύο προστιθέμενων συγκεντρώσεων οργανικού αζώτου

Πίνακας 8: Συνολική μεταβολή στις συγκεντρώσεις των επιμέρους ομάδες των πτητικών συστατικών

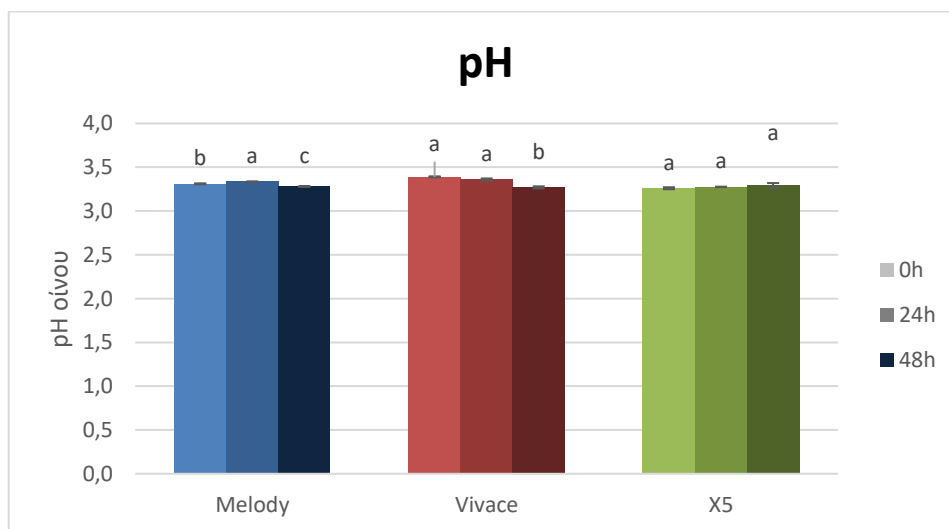
	Alcohols		Acetates		Ethyl Esters		Total Esters	
	150 mg/L	300 mg/L	150 mg/L	300 mg/L	150 mg/L	300 mg/L	150 mg/L	300 mg/L
<b>Melody</b>	194	218	4.3	4.8	2.6	2.4	6.7	7.2
<b>Vivace</b>	121	130	7.5	6.4	3.4	3.0	10.9	9.4
<b>X5</b>	135	148	4.8	5.4	3.0	3.0	7.8	8.4

Οι Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta (2008) παρατήρησαν και αυτοί μία γενική αύξηση στο σύνολο των εστέρων με τις αυξανόμενες δόσεις αμινοξέων στο γλεύκος, με κυρίαρχα τον οξικό ισοαμυλεστέρα και τον οξικό 2-φαινυλαιθυλεστέρα. Επίσης, οι Hernández-Orte et al. (2005) που διεξήγαγαν πειράματα με 3 διαφορετικά στελέχη ζυμομυκήτων, παρατήρησαν ότι με την αύξηση του προστιθέμενου οργανικού αζώτου η αύξηση ή η μείωση των πτητικών συστατικών του οίνου, εξαρτάται από τη ζύμη που διεξάγει κάθε φορά

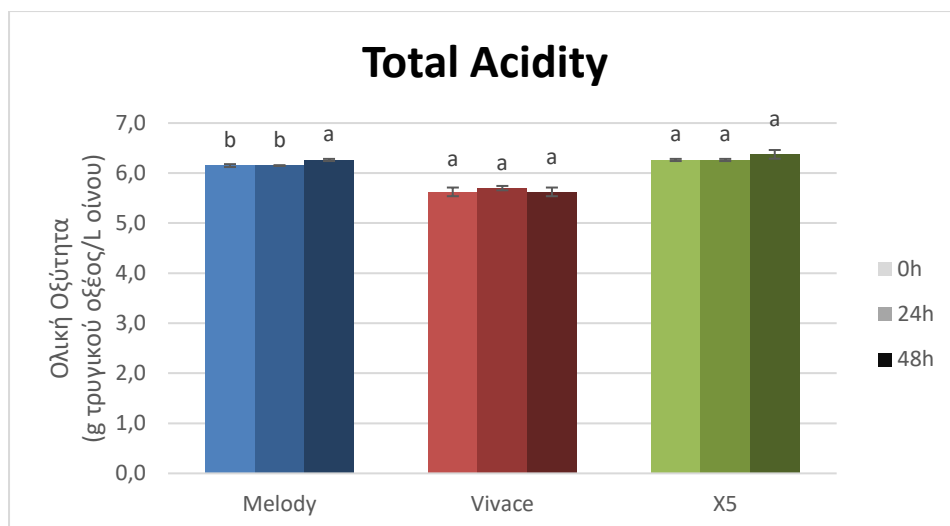
την αλκοολική ζύμωση. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, καθώς αποδείχθηκε ότι δεν είχαν την ίδια συμπεριφορά στην αύξηση του οργανικού αζώτου και οι 3 ζύμες. Ακόμη, οι Guitart et al. (1991) αναφέρουν, σύμφωνα με την έρευνά τους σε οίνους της ποικιλίας Chardonnay, τον υψηλότερο σχηματισμό εστέρων κατά την αλκοολική ζύμωση, σε γλεύκη με υψηλότερη συγκέντρωση αμινοξέων.

### 4.3 Επίδραση του χρόνου προσθήκης του οργανικού αζώτου

Για την μελέτη της επίδρασης του χρόνου προσθήκης του οργανικού αζώτου στους τελικούς οίνους, έγινε προσθήκη (150 mg/L) σε τρεις διαφορετικούς χρόνους. Κατά τον εμβολιασμό (t=0), 24 ώρες μετά από αυτόν και σε 48 ώρες. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μεταξύ των τριών δειγμάτων της ίδιας ζύμης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στα παρακάτω διαγράμματα:

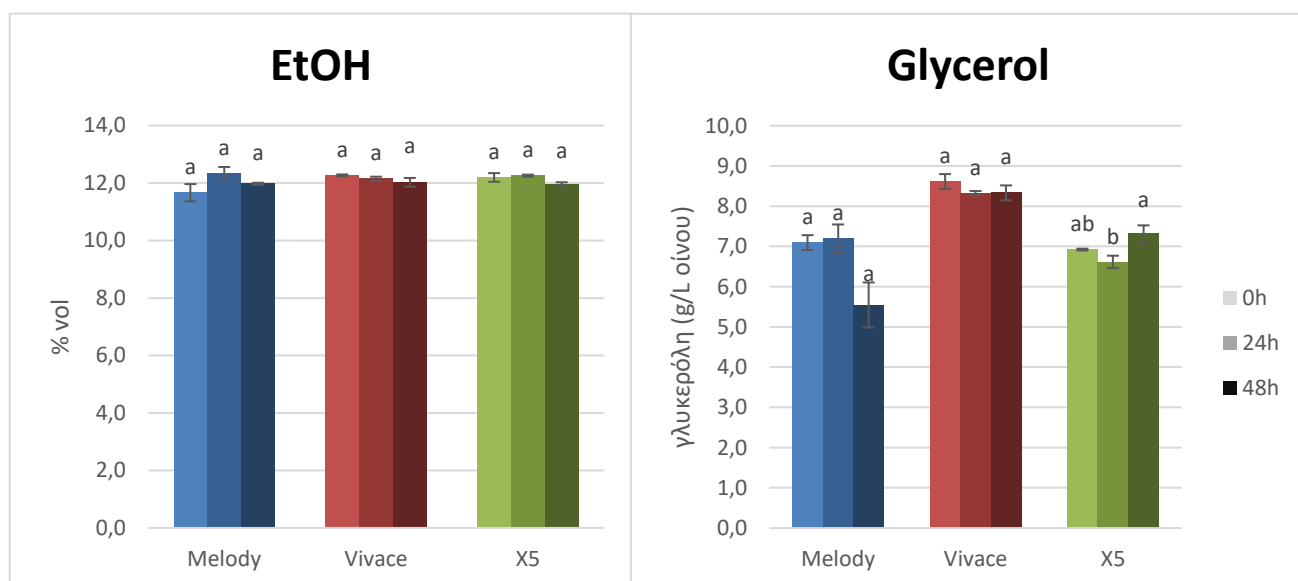


Διάγραμμα 11: Το pH των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου



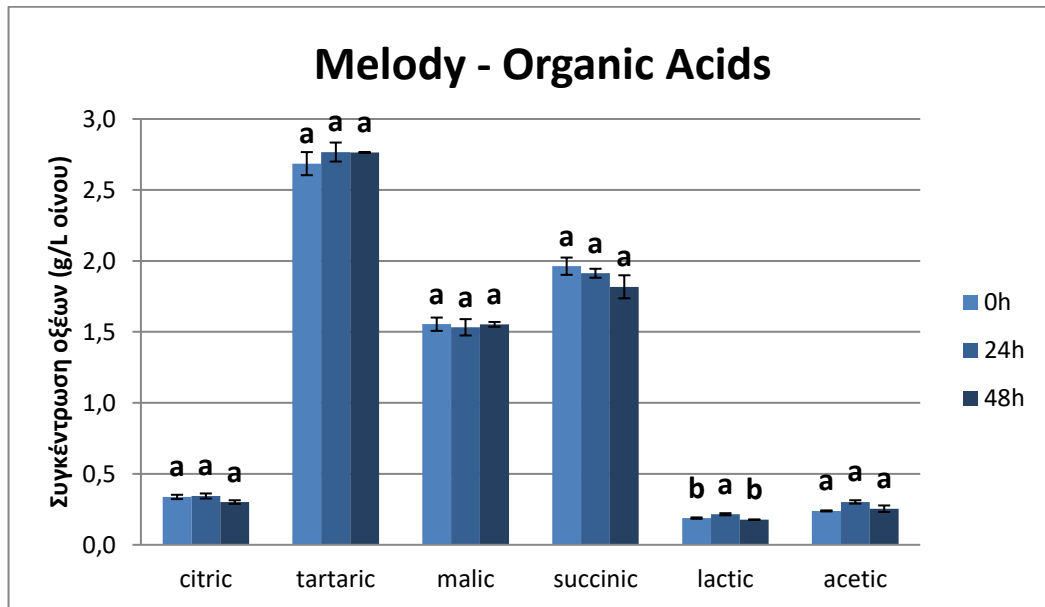
Διάγραμμα 12: Η ολική οξύτητα των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου

Όπως φαίνεται στα παραπάνω διαγράμματα 11 και 12, η ολική οξύτητα μόνο του οίνου της ζύμης Melody επηρεάστηκε από τη χρονική στιγμή της προσθήκης του οργανικού αζώτου, αν και αυξήθηκε αμελητέα. Συγκεκριμένα αυξήθηκε κατά 0.1 μονάδες, ενώ παρατηρήθηκε και η αναμενόμενη μείωση του pH κατά 0.03.

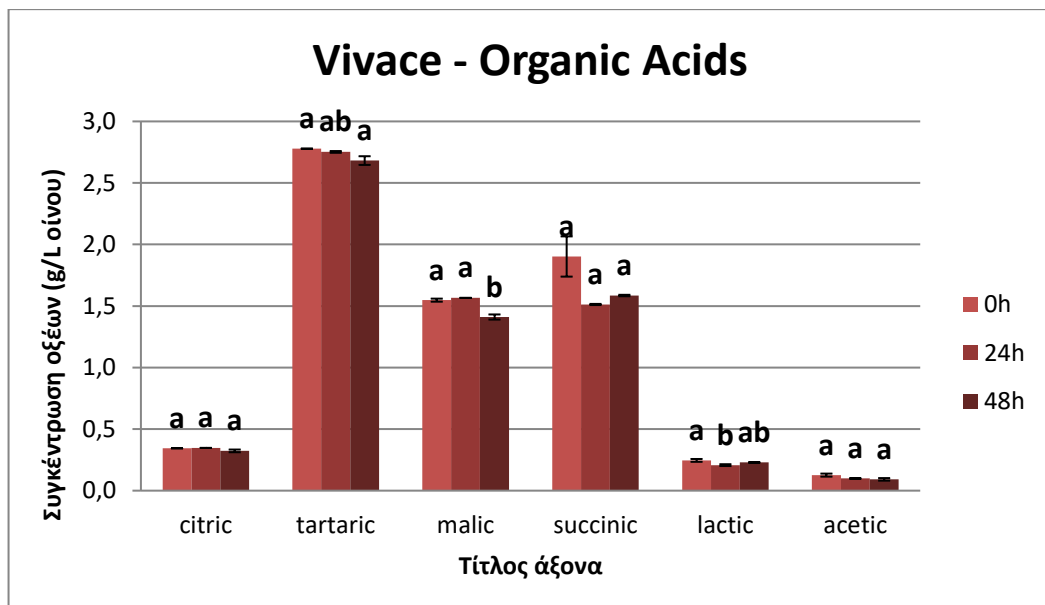


Διάγραμμα 13: Η συγκέντρωση της αιθανόλης και της γλυκερόλης των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου

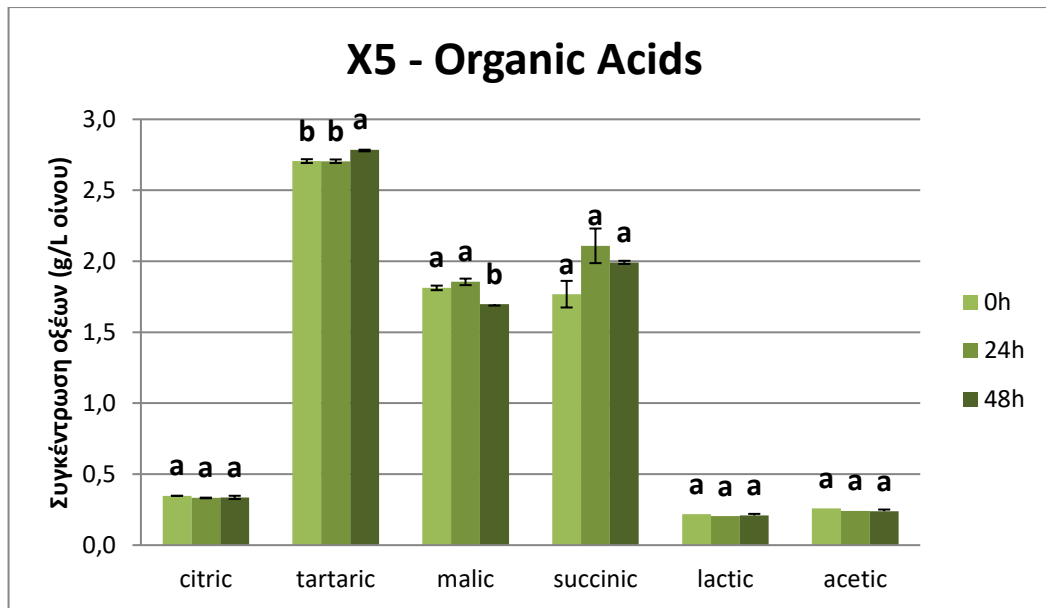
Η συγκέντρωση της αιθανόλης δεν επηρεάστηκε για καμία ζύμη από τον χρόνο προσθήκης του οργανικού αζώτου, σε αντίθεση με τη γλυκερόλη που έδειξε μεταβολή μόνο για τη ζύμη Χ5. Συγκεκριμένα, η μέγιστη συγκέντρωση της γλυκερόλης (7.3 g/L) παρατηρήθηκε στον οίνο που το οργανικό άζωτο προστέθηκε μετά από 48h από τον εμβολιασμό, ενώ ελάχιστη τιμή (6.6 g/L) έλαβε στον οίνο που η προσθήκη έγινε μετά από 24h από τον εμβολιασμό.



Διάγραμμα 14: Η συγκέντρωση των οργανικών οξέων των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη Melody

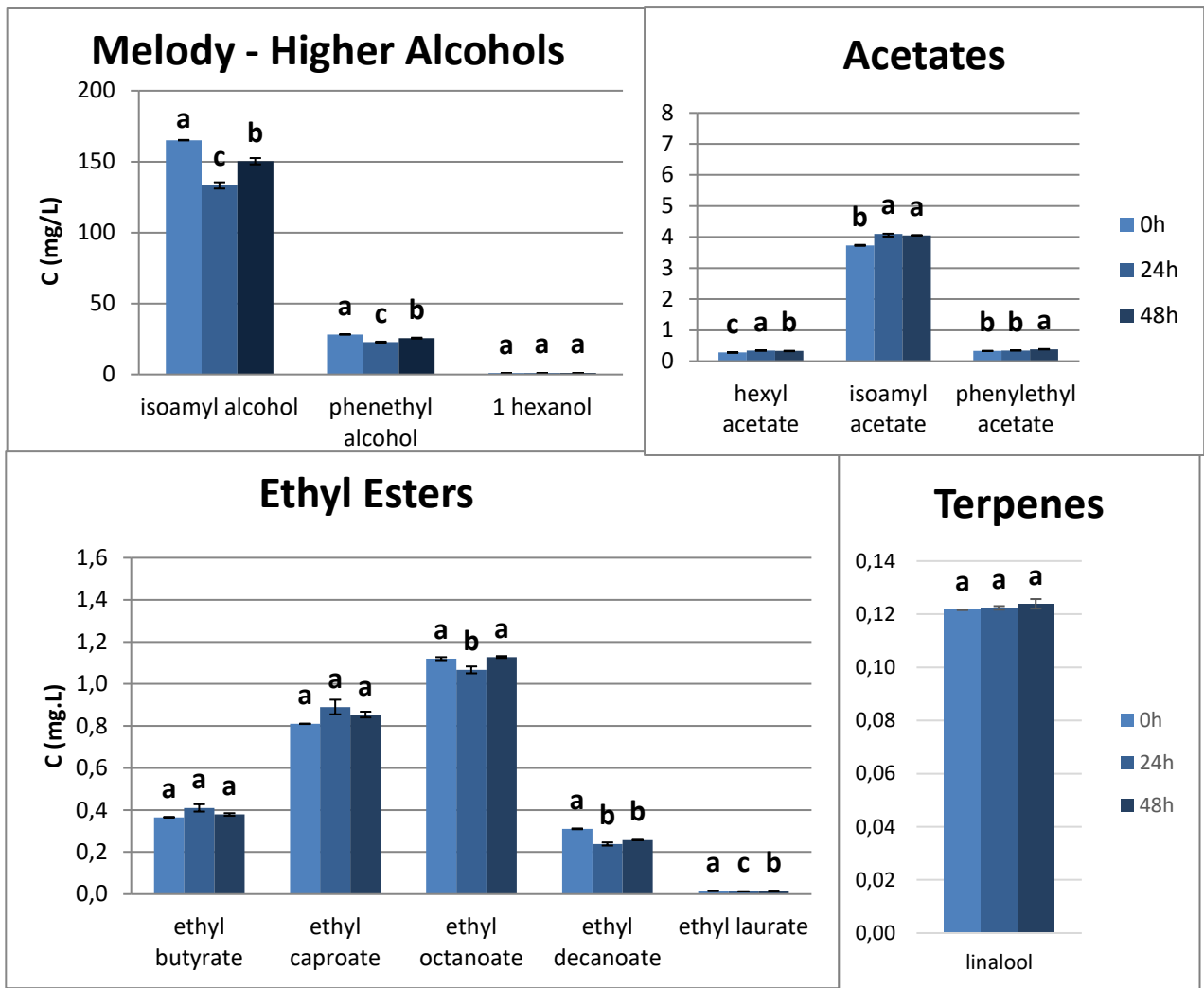


Διάγραμμα 15: Η συγκέντρωση των οργανικών οξέων των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη Vivace



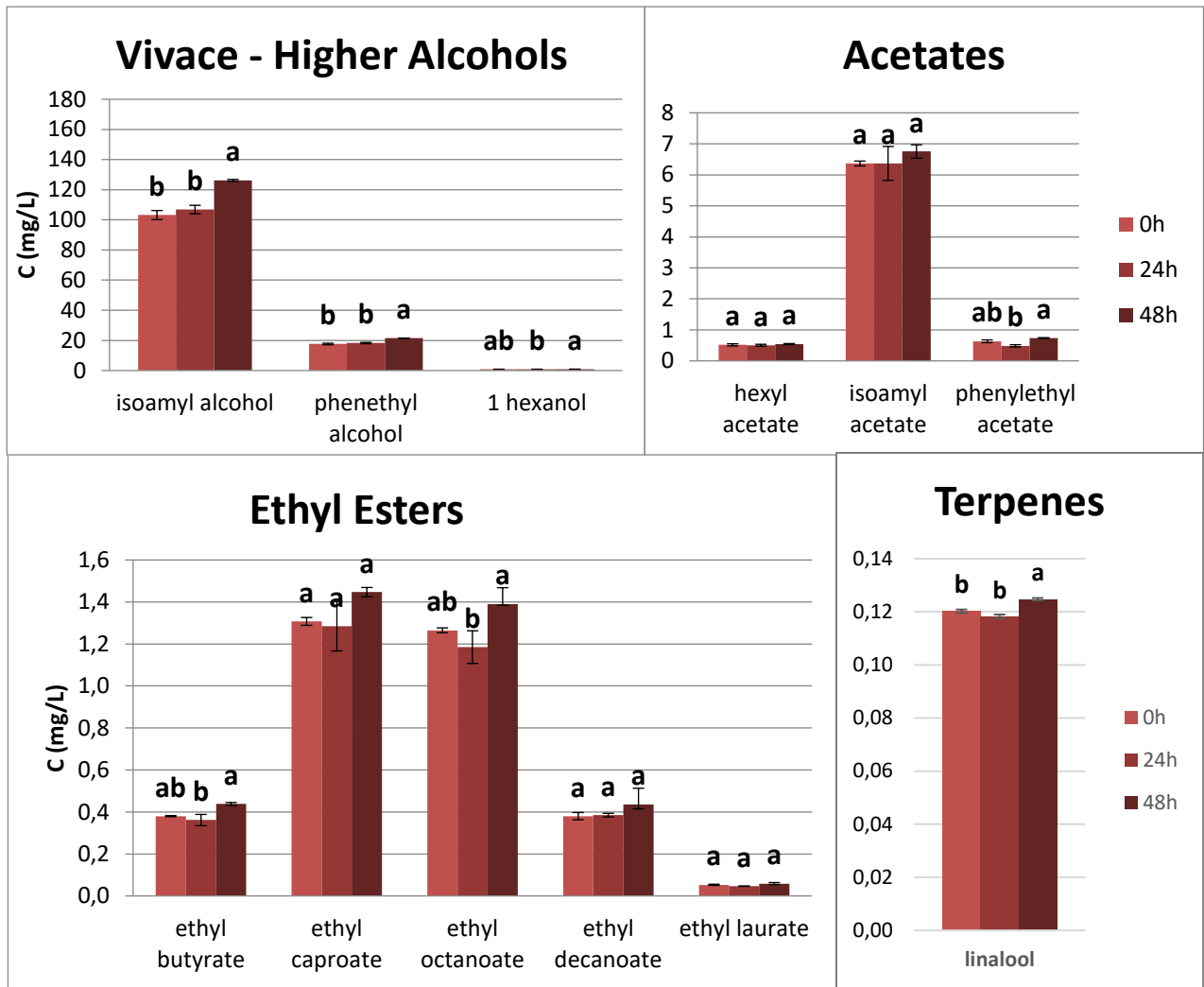
Διάγραμμα 16: Η συγκέντρωση των οργανικών οξέων των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη X5

Στα οργανικά οξέα που ποσοτικοποιήθηκαν μέσω HPLC δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά, με εξαίρεση ίσως, τη μείωση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος κατά 0.15 g/L για τις ζύμες Vínace και Melody, για τους οίνους που το οργανικό άζωτο προστέθηκε 48h μετά τον εμβολιασμό (διαγράμματα 14-16).

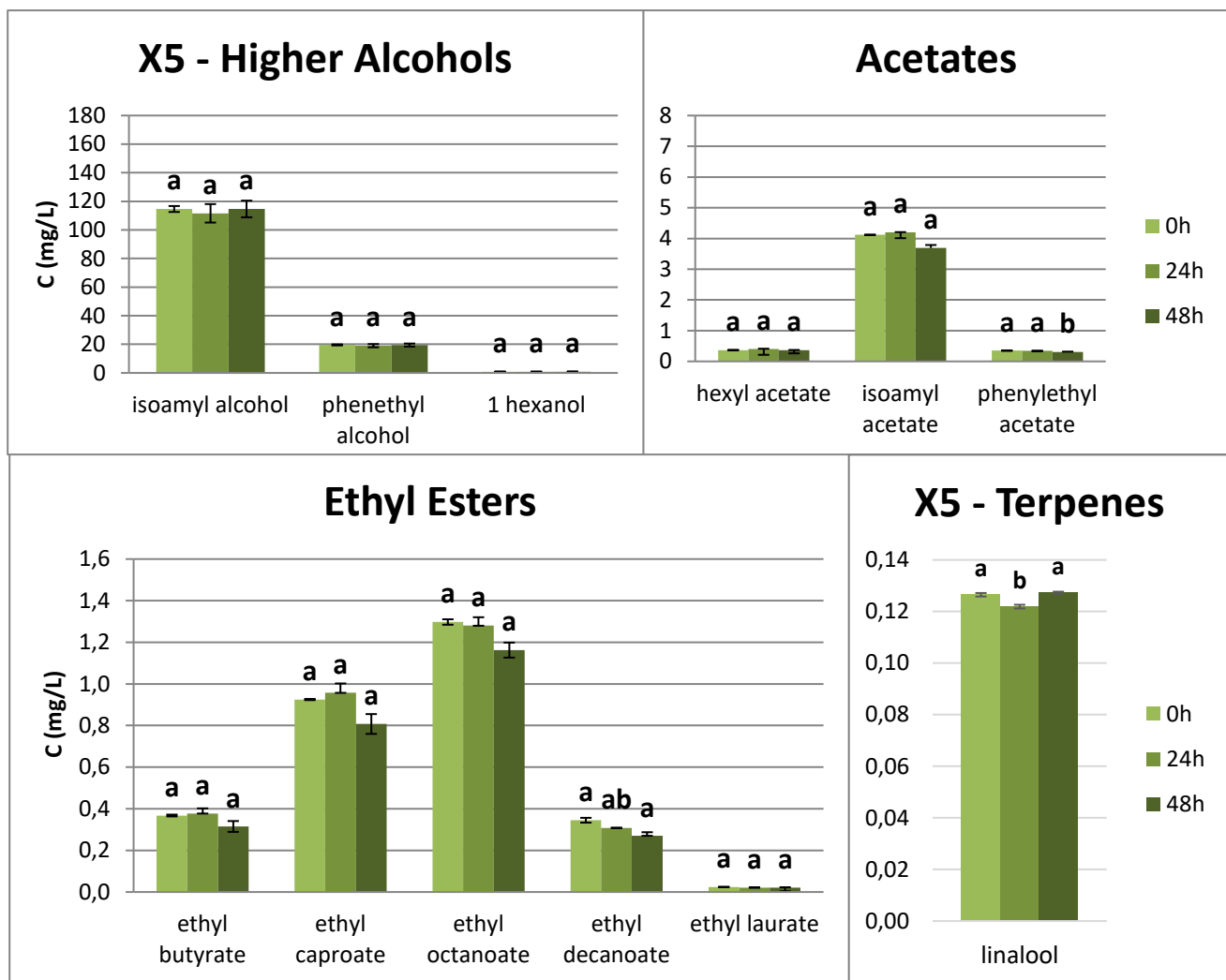


Διάγραμμα 17: Τα 12 πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη Melody





Διάγραμμα 18: Τα 12 πηκτικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη Melody



Διάγραμμα 19: Τα 12 πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν των παραγόμενων οίνων των τριών διαφορετικών χρόνων προσθήκης οργανικού αζώτου για τη ζύμη Melody

Όπως φαίνεται στα διαγράμματα 17 για τη ζύμη Melody, η παραγωγή ανώτερων αλκοολών μειώθηκε για αργότερους χρόνους προσθήκης του οργανικού αζώτου (24 και 48 h), σε αντίθεση με τους εστέρες τους, που φαίνεται να αυξάνονται. Η παραγωγή εστέρων των λιπαρών οξέων δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τον χρόνο προσθήκης του οργανικού αζώτου, με εξαίρεση τον οκτανοϊκό και δεκανοϊκό αιθυλεστέρα που παρατηρείται μία αμυδρή μείωση για αργότερους χρόνους προσθήκης. Η λιναλοόλη δεν έδειξε κάποια μεταβολή. Για τη ζύμη Vinace (διάγραμμα 18) φάνηκε ότι οι περισσότερες πτητικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν αυξήθηκαν για αργότερους χρόνους προσθήκης του οργανικού αζώτου (24 και 48h). Τέλος, για τη ζύμη X5(διάγραμμα 19) οι μετρήσεις έδειξαν, ότι η παραγωγή αρωματικών ουσιών από τις ζύμες δεν επηρεάζεται καθόλου από τον χρόνο προσθήκης του οργανικού αζώτου.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με πολυετείς έρευνες στον τομέα της επιστήμης του οίνου, η προσθήκη οργανικού αζώτου στα αρχικά στάδια της ζύμωσης, συντελεί στην παραγωγή πτητικών ενώσεων από τους ζυμομύκητες, όπως ανώτερες αλκοόλες και εστέρες.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση του διαφορετικού στελέχους ζυμομύκητα στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του τελικού οίνου, μέσω της χρήσης τριών διαφορετικών ζυμών (Melody, Vivace, X5). Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της προστιθέμενης ποσότητας οργανικού αζώτου (150 και 300 mg/L) και τέλος, η επίδραση του χρόνου προσθήκης του (κατά τη στιγμή του εμβολιασμού, 24 και 48 ώρες μετά από αυτόν).

Όσον αφορά τα τρία διαφορετικά εμπορικά σκευάσματα ζυμομυκήτων και την επίδρασή τους στους τελικούς οίνους, φάνηκε ότι η ζύμη Vivace παράγει οίνους με χαμηλότερη οξύτητα, και συνεπώς υψηλότερο pH. Οι οίνοι της ζύμης X5 παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση σε μηλικό οξύ. Η περιεκτικότητα σε αιθανόλη ήταν η ίδια και στους τρεις οίνους, ενώ η ζύμη Vivace παρουσίασε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκερόλη. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η ζύμη Vivace δίνει πιο «μαλακά» γευστικά ή «στρογγυλά» κρασιά. Αρωματικά, η ζύμη Melody φάνηκε να παράγει περισσότερες ανώτερες αλκοόλες, ενώ η ζύμη Vivace περισσότερους εστέρες ανώτερων αλκοολών και λιγότερους εστέρες λιπαρών οξέων.

Οι δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις προστιθέμενου οργανικού αζώτου δεν φάνηκε να επηρεάζει του τελικούς οίνους, παρά μόνο στα αρωματικά συστατικά τους. Παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωσή τους στην υψηλή συγκέντρωση προστιθέμενου οργανικού αζώτου για τις ανώτερες αλκοόλες και τους εστέρες τους, ενώ το αντίθετο συνέβη στους εστέρες των λιπαρών οξέων, όπου παρατηρήθηκε μία γενική μείωση. Ακόμη, φάνηκε ότι η ζύμη η οποία είχε την υψηλότερη αύξηση στην συγκέντρωση των πτητικών συστατικών ήταν η Melody. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αυξημένες δόσεις προστιθέμενου οργανικού αζώτου φαίνονται να βοηθούν στην αύξηση της έντασης του αρώματος του οίνου, αλλά βέβαια η έκταση αυτού του φαινομένου εξαρτάται από το στέλεχος που διεξάγει την εκάστοτε ζύμωση.

Τέλος, ο χρόνος προσθήκης του οργανικού αζώτου είχε διαφορετικά αποτελέσματα για την κάθε ζύμη. Μεταβολή στην οξύτητα παρατηρήθηκε μόνο για τη ζύμη Melody, όπου

αυξήθηκε κατά 0.1 g/L για την προσθήκη οργανικού αζώτου στις 48h μετά τον εμβολιασμό. Ακόμη, μεταβολή στην παραγωγή γλυκερόλης παρατηρήθηκε μόνο για τη ζύμη X5, όπου η μέγιστη συγκέντρωσή της παρατηρήθηκε στις 48 h προσθήκης. Όσον αφορά τα πτητικά συστατικά των τελικών οίνων που ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν, στη ζύμη Melody η παραγωγή ανώτερων αλκοολών μειώθηκε για αργότερους χρόνους προσθήκης του οργανικού αζώτου (24 και 48 h), σε αντίθεση με τους εστέρες τους, που φάνηκε να αυξάνονται. Για τη ζύμη Vinace φάνηκε ότι οι περισσότερες πτητικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν αυξήθηκαν για αργότερους χρόνους προσθήκης του οργανικού αζώτου (24 και 48h). Τέλος, για τη ζύμη X5 οι μετρήσεις έδειξαν, ότι η παραγωγή αρωματικών ουσιών από τις ζύμες δεν επηρεάζεται καθόλου από τον χρόνο προσθήκης του οργανικού αζώτου. Συμπερασματικά, ο κατάλληλος χρόνος προσθήκης του οργανικού αζώτου εξαρτάται από το εμπορικό σκεύασμα ζυμομύκητα που χρησιμοποιείται την κάθε φορά.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Παληγογιάννη Α. Π., (2007), *Μελέτη Πηητικών Συστατικών Ελληνικών Οίνων & Αποσταγμάτων – Παραγωγή Βιολειτουργικών Οίνων με Βάση Φυτά του Γένους Sideritis*, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
- Παπανικολάου Σ. *Αρχές Βιοτεχνολογίας Τροφίμων*, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.
- Σουφλερός, Ε. (2000). *Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία*, Τόμος Ι. Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.
- Σουφλερός, Ε. (2000). *Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία*, Τόμος ΙΙ. Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.
- Σταυρακάκης Μ. (2010). *Αμπελογραφία*. Αθήνα, Εκδόσεις Τροπή
- Σταυρακάκης Μ. (2013). *Αμπελοουργία*. Αθήνα, Εκδόσεις Τροπή
- Τσακίρης Α. (2014). *Οινολογία, από το σταφύλι στο κρασί*, 4η Έκδοση. Αθήνα: Εκδόσεις Ψύχαλου.
- Agenbach, W.A.(1977) A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. Proceedings of the South African Society for enology and viticulture. South African Society of enology and viticulture: Stellenbosch, South Africa.
- Bakker, J., & Clarke, R. J. (2011). *Wine: flavour chemistry*. John Wiley & Sons.
- Bauer K., Garbe D., Surburg H. (1997). *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Belitz H. D, Grosch W, Schieberle P. (2009). *Food chemistry, Springer*.
- Bely, Marina, Jean –Marie Sablayrolles and Pierre Barre. (1990) Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. Journal of fermentation and bioengineering 70.4:264-252.
- Linda F. Bisson, Monteiro, Francisco F., (1991) Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations. American journal of enology and viticulture 42.3:199-208.
- Boulton, R.B., Singleton, V., Bisson, L., and Kunkee, R.(1996), Principles and Practices of Winemaking. Chapman & Hall, New York.*
- Burdock G. A., (2010). *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*, Sixth Edition. U.S.A: CRC Press.
- Delcourt, F., Taillandier, P., Vidal, F., & Strehaiano, P. (1995). Influence of pH, malic acid and glucose concentrations on malic acid consumption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(2), 321-324.
- 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.
- Eldarov, M. A., Kishkovskaia, S. A., Tanaschuk, T. N., & Mardanov, A. V. (2016). Genomics and biochemistry of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Biochemistry (Moscow)*, 81(13), 1650-1668.
- Etiévant, P. X., Callement, G., Langlois, D., Issanchou, S., & Coquibus, N. (1999). Odor intensity evaluation in gas chromatography– olfactometry by finger span method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(4), 1673-1680.
- Flamini, R. Traldi P. (2010). Mass spectrometry in grape and wine chemistry. *John Wiley & Sons*, New Jersey, p.117

- Gao, C., & Fleet, G. H. (1995). Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. *Food Microbiology*, 12, 65-71.
- Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2008). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 41(3), 501-510.
- Gawel, R., SLUYTER, S. V., & Waters, E. J. (2007). The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Australian Journal of grape and wine research*, 13(1), 38-45.
- Gholami M., Hayasaka, Y., Coombe, B. G., Jackson, J.F., Robinson, S.P. Williams, P. J. (1995) "Biosynthesis of flavour compounds in Muscat Gordo Blanco grape berries," *Australian Journal of Grape & Wine Research* 1, 19-24.
- Grosch, W., Schieberle, P., & Maarse, H. (1991). *Volatile Compounds in Foods and Beverages. Henk Maarse, New York.*
- Guitart, A., Orte, P. H., Ferreira, V., Peña, C., & Cacho, J. (1999). Some observations about the correlation between the amino acid content of musts and wines of the Chardonnay variety and their fermentation aromas. *American Journal of enology and viticulture*, 50(3), 253-258.
- Hardie W. J., O'Brien T. P. and Jaudzems V. G., (1996) "Morphology, Anatomy and Development of the Pericarp after Anthesis in Grape, *Vitis vinifera* L.," *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol. 2, No. 2.
- Henschke, Paul A., and Vladimir Jiranek (1991) Hydrogen sulfide formation during fermentation: effect of nitrogen composition in model grape must. *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine: Seattle, Washington, USA 18-19 June 1991. American Society of Oenology and Viticulture, ASEV, 1991.*
- Henschke, Paul A., and Vladimir Jiranek (1993). Yeast metabolism of nitrogen compounds. *Wine microbiology and biotechnology*: 77-164.
- Henschke PA and CS Ough (1991). Urea accumulation in fermenting grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture* 42(4):317-321
- Henschke, Paul A. (1997) Wine yeast. In: Zimmerman F.K, Entian, K.D.(Eds) *Yeast sugar metabolism, Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications. Technomic Publishing Lancaster, UK : 527-560.*
- Hernández-Orte, P., Ibarz, M. ., Cacho, J., & Ferreira, V. (2005). Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chemistry*, 89(2), 163–174.
- Jackson R. S., (2002). *Wine tasting: a professional handbook*. U.K.: Elsevier Academic Press.
- Jackson, R. S. (2008). *Wine science: principles and applications* (pp. 270-331). San Diego: Academic Press.
- Jiranek, V., P. Langridge, and P. A Henschke.(1995) Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and environmental microbiology* 61.2:461-467.
- Jiranek, V., P. Langridge, and P. A Henschke. Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *American Journal of Enology and Viticulture* 46.1(1995): 75-83.
- Kotseridis, Y., Baumes, R. L., Bertrand, A., & Skouroumounis, G. K. (1999). Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay. *Journal of Chromatography A*, 841(2), 229–237

- Kujumdzieva, A., Nedeva, T., Morfova, M., and Savov, V., 1998 Isolation and Characterisation of Two Thermotolerant *Kluyveromyces* Yeast Strains. *Journal of Culture Collections* 2:44-50.
- Moio, L., Ugliano, M., Genovese, A., Gambuti, A., Pessina, R., & Piombino, P. (2004) Effect of antioxidant protection of must on volatile compounds and aroma shelf life of Falanghina (*Vitis vinifera* L.) wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 891–897.
- Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., Herrera, P., & González-Sanjosé, M. L. (2004). Changes in wine volatile compounds of varietal wines during ageing in wood barrels. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 341-350.
- Rapp, A., & Mandery, H. (1986). *Wine aroma. Experientia*, 42(8), 873-884.
- Rapp A., Versini G. (1991) “Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines”, *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine* : Seattle, Washington, Usa 18-19 June 1991, p. 156-164
- Rogerson F. & Symington C. (2013). Enzyme-catalyzed modulation of the typicality of touriga nacional aroma and flavor. *in: Understanding varietal aromas during alcoholic and malolactic fermentations*. 23-37. Lalemand. Lisbon, Portugal.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., & Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International journal of food microbiology*, 70(3), 283-289.
- Salvatore P., Lucia M.D. (1972). Wine, a food throughout the ages. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Oxford University Press, 361-362
- Sánchez-Palomo E., Garcia-Carpintero G. E. & Vinas G. M. A. (2015). Aroma fingerprint characterization of La Mancha red wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 36, 117-125.
- Scanes, K. T., Hohmann, S., & Prior, B. A. (1998). Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review.
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Francis, I. L., & Henschke, P. A. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice—Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food chemistry*, 127(3), 1072-1083.
- Ugliano Maurizio, Brooke Travis, Leigh Francis, Paul A.. Henschke Volatile Composition and Sensory Properties of Shiraz Wines As Affected by Nitrogen Supplementation and Yeast Species: Rationalizing Nitrogen Modulation of Wine Aroma, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12417–12425.
- Ugliano Maurizio, Paul A. Henschke, Markus J. Herderich, Isak S. Pretorius.(2007). Nitrogen management is critical for wine flavor and style. *The Australian Wine Research Institute*, Vol 22, No.6.
- Vilanova, M., Pretorius, I. S., & Henschke, P. A. (2015). Influence of diammonium phosphate addition to fermentation on wine biologicals. In *Processing and Impact on Active Components in Food* (pp. 483-491). Academic Press.
- Volschenk, H., Viljoen, M., Grobler, J., Petzold, B., Bauer, F., Subden, R. E., ... & van Vuuren, H. J. (1997). Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature biotechnology*, 15(3), 253.
- Xi, Z., Tao, Y., Zhang, L., & Li, H. (2011). Impact of cover crops in vineyard on the aroma compounds of *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon wine. *Food Chemistry*, 127(2), 516–522.