



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

Χαρακτηρισμός τοπικών ποικιλιών σταφυλιών της Ικαρίας και μελέτη της ζύμωσής τους.



Ηλιάνα Καρίμαλη

Επιβλέπων Καθηγητής:
Βασιλική Ωραιοπούλου

ΑΘΗΝΑ, Ιούνιος 2018

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract	6
Εισαγωγή.....	7
Η ιστορία του Πράμνειου Οίνου	8
Ο οίνος Pramnian Odyssey Οινοποιίας Καρίμαλη	10
Το σταφύλι	11
Ερυθρή οινοποίηση.....	15
Αλκοολική ζύμωση	18
Ζυμώσεις με επιλεγμένες ζύμες.....	23
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	25
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
Ποικιλίες αμπέλου	29
Ποικιλίες αμπέλου της Ικαρίας	30
Το φωκιανό.....	30
Το Ρετενό.....	32
Το Κούντουρο (Η Μαντηλαριά).....	33
Φαινολικά συστατικά του σταφυλιού και του κρασιού	35
Ανθοκυανιδίνες και Ανθοκυάνες	36
Φλαβόνες και φλαβονόλες	38
Φαινολικά οξέα	39
Ταννίνες.....	40
Αρωματικές ενώσεις του κρασιού	41
Πειραματικό μέρος.....	44
Πειραματικός σχεδιασμός.....	44
Δείγματα σταφυλιών και μούστου	45
Αντιδραστήρια και Όργανα.....	46
Πειραματική διαδικασία – Αναλυτικές μέθοδοι.....	47
Εκχύλιση Φαινολικών Συστατικών των Διαφόρων Μερών του Σταφυλιού	47
Καταβύθιση των ταννινών με την μέθοδο BSA (Bovine serum albumin).....	49
Προσδιορισμός ξηρού βάρους φλοιών, σάρκας και εκχυλισμάτων αυτών	49

Μέθοδος Folin Ciocalteu - Μέτρηση ολικού φαινολικού φορτίου (TP)	50
Ποσοτικός προσδιορισμός επιμέρους ομάδων φαινολικών συστατικών με φασματοφωτομετρική μέθοδο	51
Ανάλυση φαινολικών συστατικών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ..	52
Ανάλυση αρωματικών ενώσεων του κρασιού με αέρια χρωματογραφία-φασματοφωτομετρία μάζας (GCMS).....	54
Ζυμώσεις – Παστερίωση μούστου – Εμβολιασμός με επιλεγμένες ζύμες.....	55
Μέθοδος Luff – Προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων	55
Ολική Οξύτητα.....	57
pH και Πυκνότητα.....	58
Προσδιορισμός της Χρωματικής Έντασης (E) και της Χρωματικής Απόχρωσης (A) των οίνων	59
Μέθοδος FAN (Free Amino Nitrogen)- Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού άζωτου	59
Μέτρηση αλκοολικών βαθμών	61
DPPH – Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	61
Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	63
A. Αναλύσεις στα εκχυλίσματα φλοιών των τριών ποικιλιών	63
Ποσοτικοποίηση ολικών και μερικών φαινολικών με την μέθοδο Folin Ciocalteu και την μέθοδο του Φωτομετρικού προσδιορισμού στα εκχυλίσματα των φλοιών	63
Ποσοτικοποίηση ανθοκυανών με HPLC στους φλοιούς των σταφυλιών.....	64
Ποσοτικοποίηση φλαβονολών με HPLC στους φλοιούς των σταφυλιών	68
B. Αναλύσεις στα εκχυλίσματα σάρκας των τριών ποικιλιών	71
Ποσοτικοποίηση ολικών και μερικών φαινολικών με την μέθοδο Folin Ciocalteu και την μέθοδο του Φωτομετρικού προσδιορισμού στα εκχυλίσματα της σάρκας.....	71
Ποσοτικοποίηση φλαβονολών με HPLC στις σάρκες των σταφυλιών.....	72
Γ. Αναλύσεις στα γίγαρτα των τριών ποικιλιών	73
Περιεκτικότητα γιγάρτων σε λιπαρά	73
Προσδιορισμός ταννινών στα γίγαρτα των ποικιλιών.....	73
Δ. Αναλύσεις στο κοινό μούστο των τριών αυτών ποικιλιών	74
Ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών στο μούστο με την μέθοδο Folin Ciocalteu και την μέθοδο του Φωτομετρικού προσδιορισμού.	74
Ποσοτικοποίηση των ανθοκυανών στο μούστο με την μέθοδο HPLC	75
E. Μελέτη της ζύμωσης με 4 είδη ζυμών και σύγκριση των τεσσάρων φρέσκων κρασιών.....	79
Ημέρες Ζύμωσης, αλκοολικοί βαθμοί, ανάγοντα σάκχαρα, διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο και Πυκνότητα στα τέσσερα φρέσκα κρασιά.....	79

ρΗ, ολική οξύτητα, φαινολικά και αντιοξειδωτικά συστατικά, και χρώμα των φρέσκων κρασιών	81
Ποσοτικοποίηση ανθοκυανών με HPLC στα τέσσερα φρέσκα κρασιά	83
Αρωματικά συστατικά στα τέσσερα κρασιά.....	85
Σύγκριση των αποτελεσμάτων των αρωματικών συστατικών με την δοκιμή έμπειρου δοκιμαστή.....	90
Συμπεράσματα	100
Βιβλιογραφία	103

Περίληψη

Η Ικαρία, ένα νησί του Αιγαίου που είναι γνωστό για τη μακροζωία, παρήγαγε κατά την αρχαιότητα ένα περίφημο κρασί, γνωστό ως Πράμνειος οίνος, το οποίο ο Όμηρος συνδέει με τη λατρεία του Θεού Διονύσου. Ο Πράμνειος Οίνος είναι ένα κόκκινο, ξηρό κρασί, φυσικά υψηλόβαθμο σε αιθανόλη, που παράγεται από τρεις τοπικές ποικιλίες της Ικαρίας. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε το φαινολικό προφίλ των τριών τοπικών ποικιλιών σταφυλιών της Ικαρίας οι οποίες είναι το φωκιανό, το ρετενό και το κούντουρο. Προσδιορίστηκαν ποσοτικά οι ανθοκυάνες, οι φλαβονόλες και οι τρυγικοί εστέρες στους φλοιούς και στη σάρκα, ενώ επιπλέον προσδιορίστηκαν και οι ταννίνες στα γίγαρτα. Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των κύριων φαινολικών συστατικών όπως των ανθοκυανών και των φλαβονολών με την χρήση της μεθόδου HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων συμπεραίνεται ότι το Κούντουρο είναι γενικότερα μία πλουσιότερη ποικιλία σε φαινολικά όπως ανθοκυάνες και ταννίνες ενώ στερείται σε φλαβονόλες. Την έλλειψη αυτή συμπληρώνουν οι άλλες δύο ποικιλίες που προσδιορίστηκαν με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φλαβονόλες.

Τα φαινολικά συστατικά μεταφέρονται από τους φλοιούς, την σάρκα και τα γίγαρτα στο ζυμούμενο γλεύκος κατά τη διάρκεια παραμονής των στεμφύλων, στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Οι τρεις αυτές ποικιλίες χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή του κρασιού Pramnian Odyssey στην οιοποιία Καρίμαλη και συμμετέχουν ισόποσα στο κοινό γλεύκος το οποίο προκύπτει από τετραήμερη παραμονή των στεμφύλων. Στο γλεύκος προσδιορίστηκε τόσο το ολικό φαινολικό περιεχόμενο όσο και οι περιεκτικότητες σε επιμέρους φαινολικές ομάδες κατά την διάρκεια παραμονής των στεμφύλων και μετά την αφαίρεση αυτών. Αποδείχτηκε πως το ολικό φαινολικό φορτίο έφτασε στην μέγιστη περιεκτικότητά του την τέταρτη ημέρα παραμονής. Επιπροσθέτως προσδιορίστηκαν και οι μεταβολές των διαφόρων ανθοκυανών τόσο κατά τη διάρκεια παραμονής, όσο και μετά την αφαίρεση των στεμφύλων από το γλεύκος. Από τα αποτελέσματα έγιναν φανερές οι αντιδράσεις πολυμερισμού που συμβαίνουν στο γλεύκος μεταξύ ανθοκυανών και πιθανώς προκυανιδινών καθώς οι περιεκτικότητες των πρώτων φάνηκαν να μειώνονται μετά την αφαίρεση των στεμφύλων, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της ωρίμανσης του οίνου.

Επίσης μελετήθηκε και η επίδραση διαφορετικών ζυμών στην του γλεύκους που προήλθε από την ανάμιξη αυτών των τριών ποικιλιών. Οι ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι γηγενείς ζύμες, ο *Saccharomyces cerevisiae*, η *Torulaspora delbrueckii* και η *Metschnikowia pulcherrima*. Οι γηγενείς ζύμες είναι αυτές που προέρχονται από το φυσικό περιβάλλον αυτών των ποικιλιών και ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς καθώς η πορεία της ζυμώσής του είναι γενικά γνωστή. Με την ζύμωση των άλλων δύο non-*Saccharomyces* ζυμών αποδείχτηκε ότι αντιθέτως με την βιβλιογραφία έδειξαν ανθεκτικότητα στην αλκοόλη καθώς κατάφεραν να ζυμώσουν το γλεύκος μέχρι περιεκτικότητα 13% v/v σε αιθανόλη. Έγιναν συγκριτικές αναλύσεις πριν (στο αρχικό γλεύκος) και μετά την αλκοολική ζύμωση (στα τέσσερα φρέσκα κρασιά), και προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση των υπολειπόμενων σακχάρων, η ολική οξύτητα, το pH, η περιεκτικότητα σε διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο και το χρώμα. Επίσης στα φρέσκα κρασιά, που προέκυψαν από τις εργαστηριακές ζυμώσεις έγινε ανάλυση των αρωματικών τους συστατικών

με Αέρια Χρωματογραφία Φασματοσκοπίας Μάζας (GC-MS). Επιπλέον έγινε ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση των ανθοκυανών καθώς και μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παραγόμενων οίνων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το κρασί των γηγενών ζυμών σημειώνει αρκετά προτερήματα συγκριτικά με τα υπόλοιπα κρασιά. Αυτά είναι το υψηλότερο ποσοστό αλκοόλης σε συνδυασμό με την ισορροπία μεταξύ της περιεκτικότητας των υπολειπόμενων σακχάρων και της περιεκτικότητας σε τρυγικό οξύ. Τέλος βρέθηκε ότι το κρασί αυτό εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και ενδιαφέρον οργανοληπτικό προφίλ μεταξύ των άλλων κρασιών καθώς ταυτοποιήθηκε με γλυκά αρώματα και οσμές φρούτων.

Abstract

Ikaria, an island of the Greek Aegean Sea known for longevity, produced during the antiquity the famous Pramnios wine, which Homer associated with the worship of God Dionysus. The Pramnios wine is a red, dry wine with a natural high alcohol level produced from three local vine varieties of Ikaria. Seeking the peculiarity of this wine, this study investigates the phenolic profile of these varieties, called Fokianos, Retenos and Kountouros. The concentrations of anthocyanins, flavonols and tartrate esters were determined in the barks and flesh. The tannins concentration was also determined in the seeds. Subsequently, the main phenolic components such as anthocyanins and flavonols were identified and quantitated by HPLC-DAD-ESI-MS / MS. From the results, it is concluded that Kountouros is generally a richer variety in phenolics such as anthocyanins and tannins. Kountouros lacking in flavonols, but this deficiency is being complemented by the other two varieties, which have been identified with a higher content of flavonols.

In the production of Pramnian Odyssey wine at the Karimalis winery, these three varieties were combined in equal quantities, and maceration lasted for four days. The total phenolic content and the contents of individual phenolic groups were determined during the stay of the marc and after the removal of the marc. The fourth day is when the total phenol content of the must reached its maximum. In addition, concentrations of different anthocyanins were determined both during the maceration and after it. The decrease of anthocyanins concentration during fermentation was due to the polymerization reactions between anthocyanins and procyanidins.

Subsequently, the effect of four different yeasts on the alcoholic fermentation was investigated. Native yeasts derived from the natural environment of the aforementioned varieties, *Saccharomyces cerevisiae*, and the non-*Saccharomyces* *Torulaspota delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* were used. The percentage of ethanol production, the antioxidant ability and the aromatic compounds of the fresh wines were investigated. The two non-*Saccharomyces* yeasts were proved to be resistant to alcohol as they managed to ferment the must up to 13% v / v in ethanol. For the analysis of aromatic compounds, Gas Chromatography/Mass Spectrometry was used. Comparative analyzes of the four fresh wines, i.e. the concentration of residual sugars, total acidity, pH, concentration of free amino nitrogen, and color, indicated differences among the products, total phenolic content, identification and quantification anthocyanins and antioxidant capacity. The results showed that the native yeast wine has several advantages compared to the other wines. These are the highest alcohol content combined with the existing content of reducing sugars and the reduced tartaric acid content. Finally, it was found that this wine has a greater antioxidant capacity and an interesting organoleptic profile among other wines as it was identified with sweet flavors and fruit odors.

Εισαγωγή

Το ενδιαφέρον για την παραγωγή τοπικών οίνων υψηλής ποιότητας αυξάνεται τα τελευταία χρόνια. Στο επίκεντρο βρίσκεται η ανάδειξη τοπικών ποικιλιών οινοποιήσιμων σταφυλιών που δημιουργούν μοναδικά κρασιά με ιδιαίτερη γεύση, χρώμα και άρωμα. Είναι πολύ σημαντικό σε μία διεθνοποιημένη αγορά να μπαίνουν κρασιά που προέρχονται από σπάνιες ποικιλίες οι οποίες έλκουν το ενδιαφέρον του οινόφιλου κοινού και των διαμορφωτών γνώμης για το κρασί. Προϋπόθεση είναι φυσικά να υπάρχει και ένα επιτυχημένο προϊόν. Τόσο οι παραγωγοί όσο και το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης προσπαθούν να διευρύνουν το μερίδιο της αγοράς που καταλαμβάνουν τα κρασιά με ονομασία προέλευσης και οι τοπικοί οίνοι.

Η οινοποιία Καρίμαλη παράγει τον ερυθρό οίνο με την ονομασία Pramnian Odyssey ο οποίος είναι καταχωρημένος τοπικός οίνος της Ικαρίας. Το κρασί αυτό εκτός του ότι αποτελείται από τις τοπικές ποικιλίες της Ικαρίας, οι οποίες είναι το φωκιανό, το ρετενό και το κούντουρο(μαντηλάρι Ικαρίας), συνδέεται στον τρόπο παραγωγής του και με το γνωστό κρασί από την αρχαιότητα τον περίφημο Πράμνειο Οίνο. Οι βασικές ιδιαιτερότητες στην παραγωγή του Πράμνειου οίνου ήταν και είναι η έναρξη του τρύγου, η οποία συμβαίνει αρχές με μέσα Σεπτεμβρίου σε αρκετά ώριμα σταφύλια και από τις τρεις ποικιλίες καθώς και η υπόλοιπη διαδικασία παραγωγής του, η οποία γίνεται φυσικά χωρίς προσθήκες άλλων οινολογικών βοηθημάτων. Η ιδιαιτερότητα των γηγενών ζυμών των τοπικών ποικιλιών της Ικαρίας έγκειται στην ικανότητα τους να παράγουν οίνο με υψηλό αλκοολικό βαθμό και ιδιαίτερο οργανοληπτικό χαρακτήρα.

Έτσι λοιπόν στην παρούσα διπλωματική εργασία δημιουργήθηκε το ενδιαφέρον για την ανάλυση των φαινολικών συστατικών των ποικιλιών αυτών ώστε να εξακριβωθεί η ιδιαιτερότητά τόσο της κάθε ποικιλίας ξεχωριστά όσο και η συμπεριφορά του μούστου που αποτελείται από τα φαινολικά συστατικά και τις γηγενείς ζύμες και των τριών ποικιλιών μαζί. Εκτός από τους γηγενείς μικροοργανισμούς έχει ενδιαφέρον και η ζύμωση με άλλους που θα μπορούσαν να δώσουν άλλα αρωματικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά στο κρασί. Οι ζύμες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν είναι ο *Saccharomyce cerevisiae*, που είναι η κοινή ζύμη που χρησιμοποιείται στην οινοποιία, καθώς και δύο *non-Saccharomyces* ζύμες, η *Torulaspora delbrueckii* και η *Metschnikowia pulcherrima*, που δοκιμάζονται τα τελευταία χρόνια στην οινοποιία για την πρόσδοση διαφορετικών αρωματικών χαρακτηριστικών στα κρασιά.

Η ιστορία του Πράμνειου Οίνου

Η Ικαρία ήταν παραγωγός του περίφημου Πράμνειου Οίνου. Ο πράμνειος οίνος είναι ένα κόκκινο, ξηρό κρασί με φυσικά υψηλόβαθμο αλκοολικό βαθμό, το οποίο ορισμένοι έθαβαν σε πήλινα δοχεία (πιθάρια) μέσα στο χώμα μέχρι και τη δεκαετία του 1980. Ο Όμηρος συνδέει την λατρεία του θεού Διονύσου με την παραγωγή του πράμνειου οίνου στο νησί της Ικαρίας. Σύμφωνα με την μυθολογία ο Διόνυσος ήταν Θεός της γονιμότητας, της απόλαυσης της φύσης και φυσικά του οίνου.

Μία απόδειξη για την προέλευση του πράμνειου οίνου αποτελεί ο Ομηρικός ύμνος εις Διόνυσον, ο οποίος μνημονεύει 6 περιοχές που αναφέρονται ως τόποι που γεννήθηκε ο Διόνυσος (Δράκανο, Ικάρου ανεμόεσσα, Νάξος, Αλφειός, Θήβα, όρος Νύσα). Από αυτούς οι δύο (Δράκανο και Ικάρου ανεμόεσσα) είναι στην Ικαρία. Αλλά, και οι άλλοι τόποι δεν είναι άσχετοι με την Ικαρία. Αν σηματοδοτήσει κανείς στο χάρτη αυτά τα τοπωνύμια θα διαπιστώσει ότι βρίσκονται περίπου στην ίδια ευθεία. Στο θαλάσσιο δρόμο που ένωνε την Ιωνική ακτή με την Ελληνική Χερσόνησο, και που έχει την Ικαρία στο κέντρο του (Γιαννίρης, 2006).

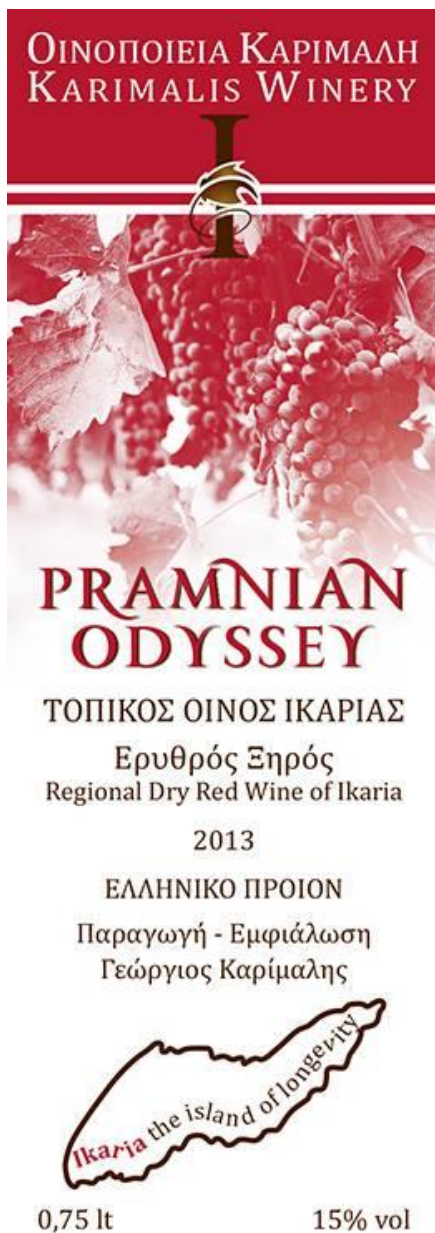
Η υπόθεση ότι η Ικαρία είναι η πατρίδα του Διονύσου και του κρασιού ενισχύεται ακόμη και από το αρχαίο μύθο του Ικάρου, του πρώτου ανθρώπου που έφτιαξε οίνο. Η Οινόη, όπως δηλώνει και το όνομά της, θα πρέπει να ήταν το επίγειο της εμπορίας ικαριώτικου κρασιού, και αποτελεί την παλιά πρωτεύουσα του νησιού. Η περιοχή του Κοσκινά, ιδιαίτερα η νότια πλευρά του Κάστρου, ανάμεσα στον Κοσκινά και στην Πούντα, με τη μεγαλύτερη έκθεση στον ήλιο, θα πρέπει να ήταν το επίκεντρο των αμπελώνων. Ωστόσο, είναι αξιοπρόσεκτο και ένα ιδιαίτερο γεωμορφολογικό χαρακτηριστικό που δεν έχει επαρκώς ερευνηθεί, στη νότια πλευρά της οροσειράς, ακριβώς κάτω από την κορυφογραμμή, υπάρχουν πλατώματα που κάποτε θα πρέπει να ήταν ενωμένα και να αποτελούσαν μια ενιαία επίπεδη ζώνη από το Μαυράτο μέχρι την Πούντα. Είναι η περιοχή της οροσειράς του Αθέρα που σήμερα φέρει ακόμη το όνομα Πράμνος.

Υπάρχουν αρκετές εκδοχές για την καταγωγή του ονόματος Πράμνειος: Μία είναι ότι το όνομα προέρχεται από το ότι "πραΐνει το μένος" και μία άλλη ότι υπάρχει ένα οινοφόρο όρος στην Ικαρία, η Πράμνη, όπου αναπτύσσονται τα αμπέλια ("πραμνία άμπελος") από τα οποία προέρχεται ο πράμνειος οίνος. Σύμφωνα, με μεταγενέστερες έρευνες, το όνομα προέρχεται από τον Πράμνο, την οροσειρά που σήμερα καλείται Αθέρας καθώς επίσης μπορεί να προέρχεται και από την τοποθεσία " Πράμνια πέτρα " του οικισμού Οινόη (σημερινή κοινότητα Εύδηλος) της Ικαρίας.

Η διακίνηση και εμπορία των κρασιών στην Ελλάδα την κλασική εποχή γινόταν μέσα σε αμφορείς. Οι αμφορείς έβγαιναν σε μια ποικιλία σχημάτων και χρωμάτων αναλόγως του πηλού από τον οποίο φτιάχνονταν. Αυτά τα χαρακτηριστικά μας βοηθούν πολλές φορές να ξεχωρίσουμε την προέλευσή τους, αφού το σχήμα κάθε αμφορέα είναι χαρακτηριστικό μιας πόλης - κράτους σε τέτοιο βαθμό που αποτελούσε συχνά το νομισματικό της σύμβολο. Όλοι έχουν στενό στόμιο για να μπορούν να ταπωθούν με φελλό. Αφού τους γέμιζαν, τους έκλειναν με το πώμα και τους σφράγιζαν με γύψο ή με πίσσα. Στο κάτω μέρος κατέληγαν σε μια μυτερή βάση, για αυτό ονομάζονταν οξυπύθμενοι. Το οξυπύθμενο σχήμα βόλεψε στην τοποθέτηση των αμφορέων στα πλοία σε πολλές κατακόρυφες σειρές. Επίσης είχαν και δύο σφραγισμένες λαβές

με έντονη κλίση. Οι σφραγίδες έφεραν επιγραφή με στοιχεία που αφορούσαν το κρασί που περιείχε ο αμφορέας (ποσότητα, ποιότητα, το όνομα της πόλης από την οποία προερχόταν). Είχε λοιπόν επινοηθεί από τους αρχαίους Έλληνες για πρώτη φορά η έννοια της Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης των κρασιών (ΠΟΠ), λόγω της τεράστιας οικονομικής σημασίας τους. Η πρώτη ιστορικά ονομασία προέλευσης που έχει ανακαλυφθεί έως τώρα προέρχεται από την Ικαρία και είναι ο λεγόμενος Πράμνιος Οίνος. Το εμπόριο των ελληνικών κρασιών απλωνόταν σε ολόκληρη τη Μεσόγειο μέχρι την Ιβηρική Χερσόνησο και τον Εύξεινο Πόντο και αποτελούσε μια από τις σημαντικότερες οικονομικές δραστηριότητες. Το εμπόριο του κρασιού συνεχίστηκε με μεγάλο ρυθμό και στα ρωμαϊκά χρόνια. Οι γνώσεις των Ελλήνων αμπελουργών — οινοποιών άρχισαν, μέσω των Ρωμαίων, να διαδίδονται και να εφαρμόζονται και σε άλλες περιοχές της Ευρώπης (Πέτση, 2008).

Ο οίνος Pramnian Odyssey Οινοποιίας Καρίμαλη



Εικόνα 1: Η ετικέτα του Πράμνειου

ετικέτα ως Πράμνειος Οίνος, προσεγγίζει και ποιοτικά το αρχαίο οίνο της Ικαρίας καθώς η παραγωγή του γίνεται με σύγχρονα μέσα και μεθόδους αλλά ακολουθεί τα βήματα και τις διαδικασίες του αρχαίου Πράμνειου οίνου. Οι αναφερόμενες ποικιλίες σταφυλιών περιέχονται σε ίσες αναλογίες. Το κρασί κυκλοφορεί με την ετικέτα που φαίνεται στην εικόνα 1.

Η ιδιαιτερότητα του Ικαριώτικου κρασιού δίνει το κίνητρο στους ντόπιους κατοίκους της Ικαρίας να συνεχίσουν την παραγωγή του και να κρατήσουν ζωντανή την φήμη του αρχαίου Ικαριώτικου, Πράμνειου Οίνου. Στους αμπελώνες και το οινοποιείο του Γεωργίου Καρίμαλη, το οποίο είναι στο χωριό Πηγή της Ικαρίας, μια περιοχή της ευρύτερης Αρχαίας Οινόης και σε υψόμετρο 400 μέτρα, γίνεται εδώ και 20 χρόνια μια συστηματική προσπάθεια προσέγγισης αυτού του αρχαίου ικαριώτικου οίνου. Οι αμπελώνες που εξασφαλίζουν την πρώτη ύλη του οινοποιείου βρίσκονται τριγύρω από την εγκατάσταση του οινοποιείου και είναι καλλιεργημένοι εξίσου και με τις τρεις ποικιλίες από τις οποίες γινόταν οι παραγωγή του πράμνειου οίνου. Πρόκειται για τοπικές ερυθρές ποικιλίες φωκιανό, κούντουρο και ρετενό που ευδοκούν στο νησί από την αρχαιότητα. Η παραγωγή του κρασιού γίνεται με φυσικό τρόπο χρησιμοποιώντας τις γηγενείς ζύμες του νησιού που είναι από τις ισχυρότερες αφού μπορούν να δώσουν κρασιά μέχρι και 19 βαθμούς αλκοόλης. Μάλιστα για κρασιά με 14-15 αλκοολικούς βαθμούς η πτητική οξύτητα που βρίσκουμε είναι εξαιρετικά χαμηλή (0,3-0,4) δείγμα και αυτό της ιδιαιτερότητας των γηγενών ζυμών. Στην παραγωγή των κρασιών γίνεται περιορισμένη χρήση θειώδη ανυδρίτη (SO₂) και χωρίς προσθήκες άλλων οινολογικών βοηθημάτων. Οι αμπελώνες πιστοποιούνται ως βιολογικοί και το κτήμα καλλιεργείται σύμφωνα με τις αρχές της αειφόρου γεωργίας. Είναι προφανές λοιπόν ότι το κρασί που παράγεται έκτος από το όνομα που παίρνει στην

Το σταφύλι

Το σταφύλι αποτελεί την πρώτη ύλη στην παραγωγή κρασιού κι έτσι έχει μεγάλη σημασία για την ποιότητα και τον τύπο του κρασιού που θέλουμε να παράγουμε. Το σταφύλι αποτελεί τον καρπό του ξυλώδους φυτού της αμπέλου, του βοτανικού γένους *Vitis*. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τη σύνθεση του σταφυλιού, όπως επίσης τη σύσταση και την ανατομία των μερών αυτού, ώστε να κατανοηθεί η επίδραση τους στα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

Πιο συγκεκριμένα, το σταφύλι κυρίως από το είδος *Vitis Vinifera*, που περιλαμβάνει 5.000-10.000 διαφορετικές ποικιλίες, αποτελεί την πρώτη ύλη για την παραγωγή του οίνου σε παγκόσμια κλίμακα. Ως πρώτη ύλη ασκεί σπουδαία επίδραση στη σύσταση, στον τύπο και στην ποιότητα του οίνου.

Κάθε βότρυς (ή τσαμπί) του σταφυλιού απαρτίζεται από δύο κύρια μέρη:

- Το ξυλώδες μέρος που ονομάζεται βόστρυχας ή κοτσάνι και
- Τις ράγες (ή ρόγες), οι οποίες αποτελούν το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού.

Η αναλογία των δύο αυτών μερών του σταφυλιού δεν είναι σταθερή αλλά εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων όπως η ποικιλία, οι κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος, η ηλικία των πρέμνων, ο χρόνος του τρυγητού κ.α. Στις οινοποιήσιμες ποικιλίες σταφυλιών η διακύμανση του μεγέθους των βοστρύχων είναι ακόμα μεγαλύτερη σε σχέση με τα επιτραπέζια σταφύλια. Οι βόστρυχοι αποτελούνται κυρίως από νερό σε ποσοστό ακόμα και 90% κ.β. αρχικά ενώ στη συνέχεια κατά την ξυλοποίηση το ποσοστό αυτό μειώνεται σε 70-80 % και παράλληλα αυξάνεται το ποσοστό ξηρής ουσίας που φτάνει στο 20-30%. Η ξηρή ουσία -στο μεγαλύτερο μέρος της- περιέχει ξυλώδεις ουσίες, ενώ στο υπόλοιπο περιλαμβάνει τα συστατικά που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 (Α. Τσακίρης, 1994).

Πίνακας 1: Η σύσταση της ξηρής ουσίας των βοστρύχων του σταφυλιού

Συστατικά	Περιεκτικότητα (% κ.β)
Ταννίνες	2-4%
Ρητίνες	1%
Αζωτούχες ενώσεις	1-2%
Ανόργανα συστατικά	2-3%
Οργανικά οξέα	1-2%
Σάκχαρα	1%

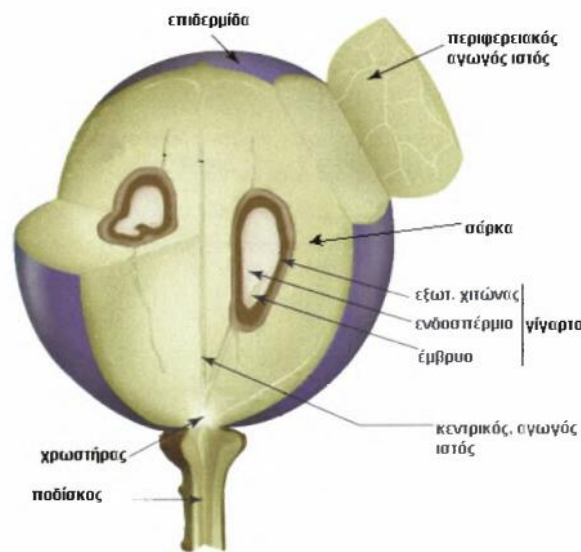
Η εναπόθεση ζαχάρων στο βόστρυχα παρατηρείται στο στάδιο που οι ράγες αυξάνονται και τα ζάχαρα από τα φύλλα διέρχονται προς αυτές. Μετά και όταν τα σταφύλια ωριμάσουν, τα ζάχαρα στο βόστρυχα μειώνονται (Σουφλερός, 1997).

Στην αρχή η ράγα είναι πράσινη με σκληρή υφή, πλούσια σε οξέα και με μικρή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Έπειτα, καθώς αυξάνεται σε μέγεθος, αυξάνονται συγχρόνως και τα σάκχαρα, ενώ η περιεκτικότητα των οργανικών οξέων μειώνεται. Όταν η ράγα αρχίζει να ωριμάζει, τότε παρατηρείται μαλάκωμα αλλιώς γυάλισμα του φλοιού (περκασμός) και αλλαγή χρώματος. Η περιεκτικότητα των σακχάρων σταθεροποιείται στα ανώτερα επίπεδα κατά τα τελευταία στάδια της ωρίμανσης, ενώ τα οξέα στα στάδια αυτά είναι μειωμένα (Πολίτης, 1997).

Η σύσταση και συγκεκριμένα η περιεκτικότητα των ραγών σε νερό, ταννίνες και ανόργανα άλατα επηρεάζουν το παραγόμενο κρασί, ιδιαίτερα κατά την ερυθρή οινοποίηση, όπου η ζύμωση του γλεύκους γίνεται παρουσία των στεμφύλων.

Η ράγα αποτελείται από τα παρακάτω τρία μέρη:

- Τον φλοιό σε ποσοστό 10-20 % κ.β.
- Τη σάρκα σε ποσοστό 74-87 % κ.β.
- Τα γίγαρτα σε ποσοστό 3-6 % κ.β. (τα οποία όμως σε ορισμένες περιπτώσεις απουσιάζουν εντελώς)



Εικόνα 2: Ανατομία της ράγας του σταφυλιού

Ο φλοιός με τη σειρά του αποτελείται από τρία στρώματα: την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδερμα το οποίο περιέχει ανθοκυάνες. Επιπλέον, ο φλοιός περιέχει ελάχιστη ποσότητα σακχάρων και είναι πλούσιους σε αδιάλυτες πηκτίνες, σε κυτταρίνη και σε πρωτεΐνες. Το μηλικό και τρυγικό οξύ βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις ενώ το κιτρικό οξύ υπερέχει ποσοτικά σε

σχέση με τα άλλα οξέα. Στον πίνακα 2 φαίνεται αναλυτικά η σύσταση του φλοιού (Σουφλερός, Ε., 2000).

Πίνακας 2: Η σύσταση του φλοιού των ραγών του σταφυλιού

Συστατικά	Περιεκτικότητα (% κ.β.)
νερό	75 - 80
ταννίνες	1 - 2
όξινες ενώσεις	1 - 1.5
ανόργανες ενώσεις	1.5 - 2
αζωτούχες ενώσεις	1.5 - 2
λοιπές ουσίες	10 - 15

Η σάρκα αποτελεί το τμήμα εκείνο της ράγας που περιέχει σχεδόν αποκλειστικά τον χυμό του σταφυλιού, ο οποίος αφού παραληφθεί με κατάλληλη επεξεργασία θα αποτελέσει το προς οινοποίηση γλεύκος. Για τον λόγο αυτό, η χημική σύσταση της σάρκας είναι σε μεγάλο ποσοστό ίδια με τη σύσταση του γλεύκους. Στον Πίνακα 3 φαίνεται αναλυτικά η σύσταση της σάρκας (Σουφλερός, Ε., 2000).

Πίνακας 3: Η σύσταση της σάρκας των ραγών του σταφυλιού

Συστατικά	Περιεκτικότητα (% κ.β.)
νερό	65 - 80
σάκχαρα	10 - 30
λοιπά συστατικά: 1. Οργανικά οξέα 2. Ανόργανες ενώσεις 3. Αζωτούχες ενώσεις 4. Πηκτινικές ύλες 5. Αρωματικές ουσίες 6. Χρωστικές (μόνο σε βαφικές ποικιλίες) 7. Ταννίνες κλπ.	5 - 6

Τα γίγαρτα βρίσκονται στο ενδοκάρπιο, το οποίο δε διακρίνεται με σαφή τρόπο από τη σάρκα. Ο ιστός των γιγάρτων είναι πλούσιος σε εφεδρικές ελαιώδεις και γλυκεροφωσφωρικές ουσίες. Τα γίγαρτα αποτελούν πλούσια πηγή ταννινών και φαινολικών ενώσεων αλλά περιέχουν και ελαιώδεις ουσίες οι οποίες αποτελούν τη βάση για την εκδήλωση βουτυρικής ζύμωσης, η οποία

προκαλεί αρνητική χαρακτηριστική οσμή. Στον Πίνακα 4 φαίνεται η σύσταση των γιγάρτων (Σουφλερός, 1997).

Πίνακας 4: Η σύσταση των γιγάρτων των ραγών του σταφυλιού

Συστατικά	Περιεκτικότητα (% κ.β.)
νερό	25 - 45
υδρογονάνθρακες	34 - 36
ελαιώδης ουσίες	13 - 20
ταννίνες	4 - 6
αζωτούχες ενώσεις	4 - 6.5
ανόργανες ουσίες	2 - 4
λιπαρά οξέα	1

Η ύπαρξη χιλιάδων διαφορετικών καλλιεργήσιμων ποικιλιών σταφυλιού σε συνδυασμό με το διαφορετικό χαρακτήρα που προσδίδουν στο κρασί οι κλιματικές συνθήκες, η σύσταση του εδάφους και οι τεχνικές οινοποίησης δίνουν έναν εξαιρετικά μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών παραγόμενων κρασιών, το καθένα από τα οποία έχει ξεχωριστό γευστικό και αρωματικό χαρακτήρα. Τα στοιχεία αυτά έχουν καθιερώσει, σήμερα, την οινική βιομηχανία σε βασικό πυλώνα του κλάδου των αλκοολούχων ποτών. Σήμερα, καλλιεργούνται παγκοσμίως περίπου 75000 τετραγωνικά χιλιόμετρα εκτάσεων αμπέλου, για την παραγωγή σταφυλιών, το 71% των οποίων προορίζεται για την παραγωγή κρασιού. Στην Ελλάδα έχει σημειωθεί ιδιαίτερη ανάπτυξη του κλάδου τα τελευταία 50 χρόνια, ενώ η πληθώρα των μοναδικών ελληνικών ποικιλιών, η ιδιαιτερότητα των εδαφών και το ιδανικό γεωγραφικό πλάτος στο οποίο βρίσκεται η χώρα, αποτελούν παράγοντες που ευνοούν την παραγωγή ακόμα ποιοτικότερων κρασιών (Μπιμπίλας, 2017).

Ερυθρή οινοποίηση

Η οινοποίηση ξεκινά από την στιγμή που τα σταφύλια φτάσουν στο οινοποιείο. Αφού δηλαδή έχει ολοκληρωθεί ο τρύγος και έχει γίνει σωστή μεταφορά των σταφυλιών στο οινοποιείο ώστε η πρώτη ύλη να καταπονηθεί όσον το δυνατόν λιγότερο. Τα αμέσως επόμενα βήματα κατά την οινοποίηση είναι η διαλογή των σταφυλιών, η αποβοστρύχωση, η έκθλιψη, η προζυμωτική κρυσταλλοποίηση, η μεταφορά της γλεύκους με τα στέμφυλα (σταφυλόμαζα) στα δοχεία οινοποίησης (δεξαμενές, βαρέλια) με ταυτόχρονη θείωση, η αλκοολική ζύμωση παρουσία των στερεών μερών με ταυτόχρονη εκχύλιση των συστατικών των μερών αυτών, ο διαχωρισμός του ημιζυμωμένου ή αποζυμωμένου γλεύκους από τα στέμφυλα, η απομάκρυνση των στεμφύλων από τα δοχεία οινοποίησης και η μεταφορά τους στο πιεστήριο, η πίεση αυτών προς παραγωγή του «κρασιού πίεσης», και τέλος οι συμπληρωματικές ζυμώσεις των σακχάρων που έχουν απομείνει με αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση. Η υλοποίηση των διεργασιών αυτών, η αλληλουχία με την οποία συμβαίνουν αλλά και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται, διαφοροποιούνται σημαντικά ανάλογα με το αν πρόκειται για λευκή ή ερυθρή οινοποίηση και ανάλογα με τις οινοποιητικές τεχνικές που επιλέγει ο εκάστοτε οινοπαραγωγός για την παραγωγή του επιθυμητού γι' αυτόν τελικού προϊόντος. Όλες αυτές οι διεργασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω αποτελούν τις βασικές προζυμωτικές διεργασίες της οινοποίησης και θα αναλυθούν συνοπτικά παρακάτω.

1. Η διαλογή των σταφυλιών

Η διαλογή των σταφυλιών αποσκοπεί στην αφαίρεση των χαλασμένων και κατεστραμμένων ραγών. Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο έγινε ο τρύγος ή διαλογή μπορεί να γίνει είτε κατά τον τρύγο όταν αυτός είναι χειρωνακτικός, είτε μετά τον τρύγο όταν αυτός είναι μηχανικός. Κατά τον τρύγο απλά αφαιρούνται τα χαλασμένα μέρη καθώς συλλέγονται τα σταφύλια από τα αμπέλια. Μετά τον τρύγο, η διαλογή γίνεται είτε σε τραπέζια διαλογής με ηλεκτροκινητήρα είτε με αυτόματους διαλογείς, οι οποίοι αναγνωρίζουν τα κατεστραμμένα μέρη από το μέγεθος ή από το χρώμα των ραγών.

2. Αποβοστρύχωση

Η αποβοστρύχωση έχει επικρατήσει τα τελευταία χρόνια να γίνεται ξεχωριστά από την έκθλιψη. Περιλαμβάνει την απομάκρυνση, εκτός των βοστρύχων, και άλλων φυτικών μερών όπως φύλλα και μίσχους της αμπέλου. Δηλαδή επιδιώκεται η απομάκρυνση των ανεπιθύμητων αυτών μερών, χωρίς το ράγισμα των ραγών. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι η ελαχιστοποίηση της πρόσληψης φαινολικών και λιπιδίων από τα μέρη της αμπέλου που είναι ανεπιθύμητα οργανοληπτικά σε σχέση με τα φαινολικά της ράγας του σταφυλιού. Συνήθως χρησιμοποιείται κοινός εξοπλισμός αποβοστρυχωτήρα-σπαστήρα (εκθλιπτήρα) σε σειρά. Η αποβοστρύχωση έχει ιδιαίτερη σημασία στην ερυθρή οινοποίηση αφού επιδιώκεται η παραμονή του γλεύκους με τα στέμφυλα. Ενώ στη λευκή οινοποίηση που η παραμονή των στέμφυλων με το γλεύκος δεν είναι επιθυμητή, η αποβοστρύχωση δεν έχει τόσο μεγάλη σημασία αφού το γλεύκος μπορεί να ληφθεί με απευθείας έκθλιψη.

3. Έκθλιψη («σπάσιμο ή εκραγισμός»)

Έκθλιψη είναι ουσιαστικά το σπάσιμο των ραγών. Η έκθλιψη ξεκινά από την αποβοστρύχωση καθώς είναι αναπόφευκτο το σπάσιμο κάποιων ραγών κατά των

διαχωρισμό τους από τους βοστρύχους και τα υπόλοιπα ανεπιθύμητα μέρη της αμπέλου. Το σπάσιμο ενός ποσοστού των ραγών κατά την αποβοστρύχωση έχει ως αποτέλεσμα την πιθανότητα έναρξης οξειδωτικού μαυρίσματος αλλά και την πιθανότητα ανάπτυξης κάποιας μικροβιακής μόλυνσης. Έτσι λοιπόν κρίνεται αναγκαία η άμεση έκθλιψη ακριβώς μετά την αποβοστρύχωση. Η ελαχιστοποίηση του χρόνου ανάμεσα σε αυτά τα δύο στάδια έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή κάποιας ανεπιθύμητης αντίδρασης όπως αυτών που αναφέρθηκαν. Η έκθλιψη μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις διεργασίες, η πρώτη είναι η πίεση των ραγών διαμέσου ενός διάτρητου τοιχώματος, η δεύτερη είναι η χρήση ενός ζεύγους κυλίνδρων που στρέφονται με διαφορετικές κατευθύνσεις και η τρίτη διεργασία είναι η φυγοκέντρωση. Κατά την τελευταία διεργασία υπάρχει μεγάλη πιθανότητα για έκθλιψη των γιγάρτων, κάτι το οποίο χαρακτηρίζεται ανεπιθύμητο κατά την οινοποίηση, για αυτό και αποφεύγεται. (Jackson, 2008)

4. Προζυμωτική κρυσταλλοποίηση

Η προζυμωτική κρυσταλλοποίηση χρησιμοποιείται στην παραγωγή ροζέ και ερυθρών κρασιών με σκοπό να βελτιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους και την «πολυπλοκότητά» τους (De Santis, 2010).

Η κρυσταλλοποίηση στα ερυθρά κρασιά διαρκεί 2 με 7 μέρες αν και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί χρόνοι κρυσταλλοποίησης 10 ημερών, και σε θερμοκρασιακό εύρος 4-15 °C. Τόσο το ανθοκυανικό περιεχόμενο όσο και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο δε μεταβάλλεται σημαντικά μετά την 4η-5η μέρα της προζυμωτικής κρυσταλλοποίησης (Canals, 2005).

5. Μεταφορά του γλεύκους με τα στεμφύλα (σταφυλόμαζα) στα δοχεία οινοποίησης (δεξαμενές, βαρέλια) με ταυτόχρονη θείωση

Η σταφυλόμαζα που παραλαμβάνεται, από την αποβοστρύχωση και έκθλιψη, μεταφέρεται στις δεξαμενές οινοποίησης (οινοποιητές) με τη βοήθεια ειδικής αντλίας και ταυτόχρονα γίνεται θείωση με τη βοήθεια θειοδομετρητών. Όταν ο θειώδης ανυδρίτης προστίθεται πριν τη ζύμωση δεσμεύεται με τα σάκχαρα και έτσι κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης απελευθερώνεται προοδευτικά και προσφέρει προστασία καθ' όλη τη διάρκειά της (Τσέτουρας, 2003).

6. Αλκοολική ζύμωση παρουσία των στερεών μερών με ταυτόχρονη εκχύλιση των συστατικών των μερών αυτών

Στη συνέχεια, ξεκινά η αλκοολική ζύμωση με παράλληλη την εκχύλιση (κυρίως) των φαινολικών συστατικών. Η διάρκεια παραμονής των στεμφύλων με το γλεύκος μπορεί να ποικίλει σημαντικά από λίγα 24ωρα ως και μερικές βδομάδες ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλιού και το οργανοληπτικό αποτέλεσμα που θέλει να πετύχει ο οινολόγος. Η θερμοκρασία αποτελεί ακόμα έναν καθοριστικό παράγοντα της διεργασίας. Ενώ έχει παρατηρηθεί ότι βέλτιστοι ρυθμοί εκχύλισης παρατηρούνται σε θερμοκρασίες 30-35 °C, πρέπει παράλληλα να μην επιβραδύνεται η δράση των σακχαρομυκήτων ώστε να μη μειώνεται η αρωματική ένταση. Συνήθως, επιλέγεται μια θερμοκρασία στο εύρος 25-35 °C (Σουφλερός, 1997) (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Σημαντικό παράγοντα για την εκχύλιση των συστατικών των στεμφύλων στο γλεύκος και την αποφυγή μικροβιακής ανάπτυξης από την επαφή των στεμφύλων με τον αέρα, αποτελεί η ανακύκλωση του γλεύκους που αποσκοπεί στη συνεχή επαφή των δύο

φάσεων. Η διαβροχή της στερεής φάσης από την υγρή με χρήση αντλιών αποτελεί μία μέθοδο ανακύκλωσης του γλεύκους. Τελευταία γίνεται χρήση δεξαμενών από ανοξείδωτο χάλυβα με εσωτερικούς ψυκτήρες για αυτόματη ρύθμιση της θερμοκρασίας και αυτόματη ανακύκλωση του γλεύκους οι οποίες χαρακτηρίζονται και ως οινοποιητές. Οι δύο τρόποι με τους οποίους γίνεται η ανακύκλωση του γλεύκους ο «φυσικός» και ο «ενισχυμένος» είναι κοινοί και για τους δύο τύπους οινοποιητών. Ο φυσικός τρόπος προϋποθέτει ανοικτό το σκέπασμα του κεντρικού σωλήνα και βασίζεται στην πίεση που ασκεί το εκλυόμενο διοξείδιο του άνθρακα. Ο ενισχυμένος τρόπος προϋποθέτει κλειστό το σκέπασμα του κεντρικού σωλήνα και σε λειτουργία το σύστημα ανακύκλωσης μέσω αντλίας.

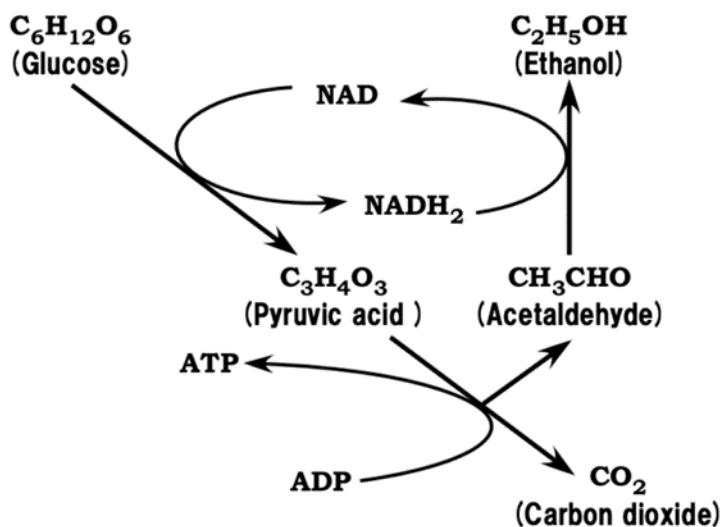
7. Διαχωρισμός του ημιζυμωμένου ή αποζυμωμένου γλεύκους από τα στέμφυλα
Αρχικά γίνεται η απομάκρυνση της ελεύθερης υγρής φάσης που αποτελεί περίπου το 85% του ολικού όγκου του κρασιού. Η απομάκρυνση του κρασιού γίνεται συνήθως από τον πυθμένα της δεξαμενής οινοποίησης, εκεί όπου βρίσκεται η θυρίδα εκκένωσης των στεμφύλων, και είναι προσαρμοσμένο ένα διπλό πτερύγιο με άνοιγμα περίπου ίσο με τη διάμετρο του πυθμένα. Ο οίνος εκροής, όπως ονομάζεται, απομακρύνεται και διοχετεύεται σε νέα δεξαμενή επεξεργασίας με τη βοήθεια σωληνώσεων και αντλιών ή όταν υπάρχει η κατάλληλη διαμόρφωση χώρου μέσω της βαρύτητας.
8. Απομάκρυνση των στεμφύλων από τα δοχεία οινοποίησης και μεταφορά τους στο πιεστήριο
Στα δοχεία οινοποίησης, όταν το υγρό απομακρύνεται από τη δεξαμενή και τα στέμφυλα συγκεντρώνονται στον πυθμένα, το πτερύγιο τα ωθεί αυτόματα προς τη θυρίδα και στη συνέχεια μεταφέρονται στο πιεστήριο.
9. Πίεση των στεμφύλων προς παραγωγή του «κρασιού πίεσης»
Το υπόλοιπο 15% του οίνου κατακρατείται από τα στέμφυλα και παραλαμβάνεται με την πίεση αυτών. Το παραγόμενο προϊόν, που ονομάζεται οίνος πίεσης, θεωρείται κατώτερο ποιοτικά από τον οίνο εκροής, αν και είναι πλουσιότερο σε όλα τα συστατικά του από τον οίνο εκροής, με εξαίρεση την περιεκτικότητά του σε αλκοόλη. Ο οίνος πίεσης που προκύπτει κυρίως από την πρώτη πίεση χρησιμοποιείται για τις διάφορες αναμείξεις.
10. Συμπληρωματικές ζυμώσεις των σακχάρων που έχουν απομείνει με αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση
Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται και η μηλογαλακτική ζύμωση από τα γαλακτικά βακτήρια. Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι μια δευτερεύουσα δράση που συνήθως ακολουθεί την αλκοολική ζύμωση ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να συμβαίνουν και παράλληλα. Κατά την μηλογαλακτική ζύμωση μειώνεται η οξύτητα του κρασιού, καθώς μετατρέπεται το μηλικό οξύ σε γαλακτικό με αποτέλεσμα να επηρεάζει και τα γευστικά και αρωματικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου κρασιού (Σουφλερός, 1997).

Αλκοολική ζύμωση

Μετά την έκθλιψη και την επεξεργασία των σταφυλιών στο οινοποιείο ακολουθεί η ζύμωση του γλεύκους στις κατάλληλες δεξαμενές ζύμωσης. Ζυμώσεις είναι οι διασπάσεις σύνθετων οργανικών υλών σε άλλες απλούστερες με τη βοήθεια ενζύμων διαφόρων ζυμών. Η αλκοολική ζύμωση είναι η διάσπαση σακχάρων γενικού τύπου $C_6H_{12}O_6$ από τα ένζυμα των ζυμών, προς αιθυλική αλκοόλη (αιθανόλη) (Belitz D., 2006) .

Η αλκοολική ζύμωση είναι ένα συναρπαστικό φαινόμενο που εντυπωσίασε πολλούς επιστήμονες και αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας εδώ και πολλά χρόνια. Ο Pasteur παρατηρώντας και μελετώντας την αλκοολική ζύμωση δημιούργησε τη βιοχημεία και έτσι η αλκοολική ζύμωση είναι το πρώτο βιοχημικό μοντέλο που μελετήθηκε κατά στάδια. Με το πέρασμα των χρόνων αρκετοί επιστήμονες ασχολήθηκαν με τη μελέτη της αλκοολικής ζύμωσης και έτσι οι απόψεις που διαμορφώνονταν για την εξήγηση του φαινομένου ήταν πολλές (Σουφλερός, 1997) .

Σήμερα είναι γνωστό πως η αλκοολική ζύμωση αποτελεί βιοχημικό φαινόμενο κατά το οποίο τα σάκχαρα μετατρέπονται από τα ένζυμα κάποιων ζυμών σε αιθανόλη ενώ ταυτόχρονα παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και εκλύεται θερμότητα (περίπου 24 kcal/μόριο γλυκόζης) (Τσέτουρας, 2003). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στους σακχαρούχους χυμούς των φρούτων και περιλαμβάνει περίπου 30 ξεχωριστές χημικές αντιδράσεις. Το γλεύκος ως σακχαρούχος χυμός του σταφυλιού αν αφεθεί σε ήπια θερμοκρασία, μετά από λίγο χρονικό διάστημα παρουσιάζει φαινόμενο ζωηρής αντίδρασης (βρασμό), στην οποία παρατηρείται έκλυση διοξειδίου του άνθρακα, απελευθέρωση θερμότητας, παραγωγή αλκοόλης και σταδιακή μείωση των σακχάρων. Μέσω της αλκοολικής ζύμωσης λοιπόν ο χυμός του σταφυλιού μετατρέπεται σε κρασί, που είναι ένα προϊόν με ανώτερη ποιότητα και ποικιλία στην έκφραση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων (Masneuf-Pomarede I., 2006).

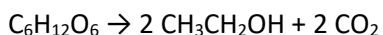


Εικόνα 3: Γενική μορφή αλκοολικής ζύμωσης

Στην αλκοολική ζύμωση παρατηρούμε τέσσερα βασικά στάδια:

- A. Μετατροπή της γλυκόζης σε τριόζες
- B. Αφυδρογόνωση των τριοζών σε πυροσταφυλικό οξύ
- C. Αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος σε ακεταλδεΐδη
- D. Αναγωγή της ακεταλδεΐδης σε αιθυλική αλκοόλη

Συνοπτικότερα το φαινόμενο της αλκοολικής ζύμωσης περιγράφεται με την παρακάτω αντίδραση:



(παραγόμενη ενέργεια: 118 kJ/mol σε μορφή ATP)

Πρόκειται για αναερόβια διαδικασία. Το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, σε συνδυασμό με την αύξηση της θερμοκρασίας, κάνει το γλεύκος να φαίνεται ότι βράζει.

Στην πραγματικότητα υπάρχουν πάρα πολλά άλλα δευτερογενή προϊόντα, που παράγονται σε μικρές ποσότητες κατά την αλκοολική ζύμωση. Τέτοια προϊόντα είναι η γλυκερόλη, το οξικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ, η ακετόνη, η ακεταλδεΐδη, εστέρες, ανώτερες αλκοόλες, πτητικά οξέα, διακετύλιο, ακετοΐνη 2,3-βουτανεδιόλη κ.α. (Αλεξάκης, 2000).

Η μεταβολική διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης όπως και η διαδικασία της αναπνοής των ζυμών αρχίζουν με τον ίδιο τρόπο αποικοδόμησης της γλυκόζης προς πυροσταφυλικό οξύ. Ως δευτερεύον προϊόν της ζύμωσης παράγεται επίσης και γλυκερόλη μέσω της μεταβολικής διαδικασίας της πυροσταφυλικής ζύμωσης. Το κρασί περιέχει περίπου 8 g γλυκερόλης ανά 100 g αιθανόλης. Το μεγαλύτερο ποσοστό της γλυκερόλης παράγεται κατά το πρώτο στάδιο της ζύμωσης και στη συνέχεια ο ρυθμός της μειώνεται δραστικά, χωρίς ποτέ να μηδενιστεί (Ribereau-Gayon, 2006).

Η διάσπαση των σακχάρων στην αλκοολική ζύμωση γίνεται από μικροοργανισμούς (ζυμομύκητες) οι οποίοι μεταβολίζουν τα σάκχαρα για να εξασφαλίσουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση τους. Έτσι για να υπάρξει ζύμωση χρειάζεται ένα μεγάλο ποσό κυττάρων ζυμομυκήτων. Οι μύκητες που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση είναι του γένους των σακχαρομυκήτων. Διάφορα είδη ζυμομυκήτων είναι κατάλληλα για ζύμωση. Ωστόσο κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται το είδος *S. cerevisiae*, που είναι ευκαρυωτικός μικροοργανισμός και πρόκειται για ζύμη αρτοβιομηχανίας.

Η αλκοολική ζύμωση είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο το οποίο περιλαμβάνει πολλές ενζυμικές αντιδράσεις και για να ολοκληρωθεί είναι απαραίτητος ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων, ορισμένα συνένζυμα και ανόργανα ιόντα. Τα κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση είναι: (Σουφλερός, 1997)

- Η αποκαρβοξυλίωση TPP (πυροφωσφορικός εστέρας της θειαμίνης ή της βιταμίνης B1), η οποία καταλύει τις αποκαρβοξυλίώσεις όπως εκείνη του πυροσταφυλικού οξέος σε ακεταλδεΐδη και διοξείδιο του άνθρακα.
- Το νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NAD), το οποίο είναι μια αφυδρογονάση που καταλύει τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής.

- Η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), που παίζει σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς μεταφοράς ενέργειας ανάμεσα στις βιοχημικές αντιδράσεις.
- Το συνένζυμο A (CoA-SH), που συμμετέχει κυρίως στη σύνθεση λιπαρών οξέων και λιπιδίων.

Κατά την αλκοολική ζύμωση αυξάνεται ο όγκος του γλεύκους κατά 20% λόγω της παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Ένα μέρος από το διοξείδιο του άνθρακα διαλύεται στο γλεύκος ενώ το μεγαλύτερο μέρος αποβάλλεται στο περιβάλλον, όταν οι δεξαμενές είναι ανοιχτές. Από 200 L γλεύκους με σάκχαρα 20% απελευθερώνονται 10 m³ διοξειδίου του άνθρακα. Στα ερυθρά κρασιά η διαλυτότητα του διοξειδίου του άνθρακα είναι 0.1-0.5% g/L και στα λευκά κρασιά η διαλυτότητα είναι 0.5-1.0 g/L (Τσέτουρας, 2003).

Στην αλκοολική ζύμωση παρατηρούμε τα εξής φαινόμενα:

- Αύξηση της θερμοκρασίας του γλεύκους.
- Αναβρασμό του γλεύκους (θορυβώδης ζύμωση), με ταυτόχρονη έκλυση διοξειδίου του άνθρακα.
- Μεταβολή της γεύσης του γλεύκους, η οποία οφείλεται στην αποικοδόμηση των σακχάρων προς αιθυλική αλκοόλη,
- Μείωση του ειδικού βάρους.

Συνήθως το γλεύκος ζυμώνεται αργά για περίπου 21 μέρες. Οι κατάλληλες θερμοκρασίες ζύμωσης για την ερυθρή οινοποίηση είναι 25°C-30°C ενώ για τη λευκή οινοποίηση είναι 15°C-20°C (Betrand, 1987). Η αύξηση της θερμοκρασίας στην αλκοολική ζύμωση εξαρτάται από τον ρυθμό μετατροπής των σακχάρων που περιέχονται στο γλεύκος. Για τη αποφυγή της ανεπιθύμητης αύξησης της θερμοκρασίας στα οινοποιεία σήμερα χρησιμοποιούνται δοχεία οινοποίησης με διπλά τοιχώματα μέσα στα οποία κυκλοφορεί ψυκτικό υγρό που ψύχει το γλεύκος και ελέγχει τη θερμοκρασία του κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης θα πρέπει να παρακολουθούνται η θερμοκρασία και η πυκνότητα του γλεύκους. Αυτό γίνεται συνήθως δύο φορές τη μέρα (πρωί-απόγευμα). Στα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, η ζύμωση είναι έντονη, όσο συνεχίζεται ανεβαίνει ο αλκοολικός βαθμός και μετριάζεται ο βρασμός. Έπειτα η ζύμωση γίνεται με αργό ρυθμό και πέφτει η θερμοκρασία του ζυμωμένου υγρού. Όταν ο αλκοολικός τίτλος φτάσει τα 11-15% vol, περιορίζεται η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των ζυμομυκήτων και η ζύμωση γίνεται αργή (Τσέτουρας, 2003).

Ο πολλαπλασιασμός των ζυμών ευνοείται από το οξυγόνο. Έτσι σε περιπτώσεις που η αλκοολική ζύμωση δεν εξελίσσεται κανονικά τότε μπορεί να γίνει αερισμός του γλεύκους. Ο αερισμός έχει διαφορετικά αποτελέσματα στην αρχή, στο μέσο και στο τέλος της ζύμωσης. Συνήθως γίνεται στην αρχή της ζύμωσης όταν έχουν ζυμωθεί τα 30-40g των σακχάρων. Οι ζύμες καταναλώνουν οξυγόνο με συνέπεια να μειώνεται το δυναμικό οξειδοαναγωγής. Από 400 mV που είναι στην αρχή πέφτει στα 120 mV σε τρεις ημέρες. Τότε απαιτείται ο αερισμός του γλεύκους ώστε να επανέρθει στα αρχικά του στάδια. Σε περίπτωση που ο αερισμός γίνει προς το τέλος της ζύμωσης τότε θα έχουμε απώλεια αλκοόλης (Τσέτουρας, 2003).

Ακόμη σε παρόμοιες περιπτώσεις μπορούν να προστεθούν στο γλεύκος ποσότητες θρεπτικών αλάτων ώστε να πολλαπλασιαστούν οι ζύμες. Συνήθως τα θρεπτικά άλατα προστίθενται στην αρχή, πριν την έναρξη της ζύμωσης, οπότε καταναλώνονται όλα για τροφή του ζυμομύκητα

(Erasmus, 2003). Η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης επηρεάζεται επίσης από το θειώδες οξύ: 100 mg/L καθυστερούν την έναρξη της ζύμωσης κατά τρεις ημέρες (Belitz D., 2006).

Το γλεύκος ζυμώνεται είτε σε κλειστές είτε σε ανοιχτές δεξαμενές. Οι ανοιχτές δεξαμενές χρησιμοποιούνται όταν ο τρύγος γίνεται σε ζεστές ημέρες και όταν έχουμε υψηλόβαθμα κρασιά. Στα γλεύκη που ζυμώνονται σε ανοιχτές δεξαμενές η ζύμωση τελειώνει κανονικά και το κρασί μπορεί να φτάσει σε μεγάλο αλκοολικό βαθμό. Τα αζύμωτα σάκχαρα σε αυτή τη περίπτωση είναι ελάχιστα. Οι κλειστές δεξαμενές χρησιμοποιούνται όταν ο τρύγος γίνεται στις ψυχρές ημέρες. Χρησιμοποιούνται κλειστά δοχεία για να περιοριστεί η εξάτμιση της αλκοόλης και για τη αποφυγή οξειδώσεων. Στα κλειστά οινοδοχεία υπάρχει σύστημα που επιτρέπει την έξοδο του διοξειδίου του άνθρακα, αλλά εμποδίζει την είσοδο του αέρα. Κατά τη ζύμωση σε κλειστό οινοδοχείο οι ζυμομύκητες δεν παίρνουν αρκετό οξυγόνο και όταν η θερμοκρασία ζύμωσης γίνει υψηλή, η δράση τους μπορεί να σταματήσει. Συνιστάται κάποιες φορές να γίνεται αερισμός με μηχανικά μέσα στις κλειστές δεξαμενές έτσι ώστε να τελειώσει η ζύμωση γρηγορότερα (Τσακίρης, 2005).

Οι ζυμομύκητες για να πολλαπλασιαστούν χρειάζονται αζωτούχες ενώσεις, υδατάνθρακες και μεταλλικά άλατα. Αν η ζύμωση δεν εξελίσσεται κανονικά, παρά τον αερισμό και τα προστιθέμενα θρεπτικά άλατα τότε μπορούμε να βοηθήσουμε την αναζύμωση με προσθήκη καλλιεργημένης ζύμης του εμπορίου. Τα αποτελέσματα αν επικρατούν και ευνοϊκές θερμοκρασίες είναι πολύ καλά. Επίσης η αναζύμωση του γλεύκους μπορεί να γίνει εάν προσθέσουμε γλεύκος που ζυμώνει κανονικά. Σε αυτή την περίπτωση χρειάζεται προσοχή ώστε στην αρχή να αναμιγνύονται μικρές ποσότητες και έπειτα να αυξάνονται σταδιακά (Erasmus, 2003).

Η ελεγχόμενη ζύμωση με επιλεγμένες ζύμες έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

- Προκαθορισμένη έναρξη της ζύμωσης
- Αποτελεσματικότητα και ταχύτητα στην ολοκλήρωση της ζύμωσης
- Απουσία ανεπιθύμητων οσμών και γεύσεων
- Δυνατότητα ζύμωσης σε μεγάλη ποσότητα αλκοόλης
- Επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (πολλά δευτερογενή αρώματα οφείλονται σε στελέχη ζυμών που έλαβαν μέρος στη ζύμωση)
- Έλεγχος οξύτητας

Συνήθως ο εμβολιασμός γίνεται με καθαρές ζύμες όπως ο *S. cerevisie*. Η διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης μπορεί να οφείλεται στους εξής παράγοντες:

- Υψηλή θερμοκρασία
- Χαμηλή θερμοκρασία στις ψυχρές περιοχές
- Η μόλυνση του γλεύκους από βακτήρια ή μύκητες
- Η έλλειψη οξυγόνου για τον πολλαπλασιασμό των ζυμών
- Η πολύ μεγάλη περιεκτικότητα σε σάκχαρα

Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα επηρεάζει το μεταβολισμό της ζύμης. Αύξηση της αλκοόλης πάνω από 10% v/v, στο γλεύκος που ζυμώνεται, επηρεάζει τη δράση της ζύμης. Με την αύξηση της περιεκτικότητας του γλεύκους σε αλκοόλη η ζύμη γίνεται λιγότερο ενεργή και περιεκτικότητα πάνω από 15% v/v συνήθως αναστέλλει τη δράση της ζύμης. Στις περιπτώσεις που η ζύμωση

διακόπτεται γίνεται προσθήκη ζυμών του εμπορίου (30-50 g/100L γλεύκους) ή μονόξινου φωσφορικού αμμωνίου (10 g/100L γλεύκους) και θειαμίνης (0.5 g/ton) (Π. Τσέτουρας, 2003).

Όταν η αλκοολική ζύμωση τελειώσει τότε όλα τα ζυμώσιμα σάκχαρα έχουν μετατραπεί σε αιθυλική αλκοόλη. Συνήθως κατά τη λήξη της αλκοολικής ζύμωσης η αιθανόλη έχει συγκέντρωση 12-15% (v/v) (Belitz D., 2006).

Η λήξη της αλκοολικής ζύμωσης προσδιορίζεται ως εξής:

- A. Μετρώντας τα ανόργανα σάκχαρα τα οποία αποτελούν όλα τα σάκχαρα του γλεύκους. Ένα γλεύκος αποζυμώθηκε όταν τα σάκχαρα είναι σε ποσοστό μικρότερο από 2 g/L για τα κόκκινα κρασιά και 1.5 g/L για τα λευκά κρασιά. Τιμές 0-15 g/L δείχνουν πως δεν υπάρχει κίνδυνος αναζύμωσης την άνοιξη. Κάποια σάκχαρα που βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 2 g/L δε ζυμώνονται και ονομάζονται υπόλοιπα σάκχαρα. Αυτά τα σάκχαρα είναι η αραβινόζη (0.26-1.65 g/L) και η ξυλόζη (0.4 g/L)
- B. Συγκρίνοντας το ειδικό βάρος του γλεύκους που έβρασε βάση του υπολογιζόμενου αλκοολικού βαθμού. Τα ξηρά κρασιά μετά τη λήξη της ζύμωσης έχουν ειδικό βάρος μικρότερο του 0.998 (Π. Τσέτουρας, 2003).

Κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται επίσης και κάποια άλλα προϊόντα σε μικρότερες ποσότητες. Συνοπτικά αυτά τα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης, μαζί με όσα έχουν ήδη προαναφερθεί, είναι τα εξής:

- Αιθυλική αλκοόλη
- Διοξείδιο του άνθρακα
- Γλυκερίνη
- Ανώτερες αλκοόλες
- Οργανικά οξέα (Γαλακτικό, Ηλεκτρικό, Οξικό, Μυρμηκικό, Προπιονικό, Βουτυρικό, Κιτρομηλικό, Γλυκονικό, Γλυκερικό)
- Αλδεΐδες
- Εστέρες
- Άλλα προϊόντα σε μικρές ποσότητες όπως η μεθυλική αλκοόλη και η ισοβουτυλενογλυκόλη.

Στους ερυθρούς οίνους συνήθως μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης ακολουθεί η μηλογαλακτική ζύμωση, κατά την οποία γίνεται μετατροπή του μηλικού οξέος που προέρχεται από τα σταφύλια σε γαλακτικό, με αποτέλεσμα να μειώνεται η οξύτητα που οφείλεται στο μηλικό οξύ σε ποσοστό 50%. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το κρασί να βελτιώνει τον άγριο χαρακτήρα του. Έπειτα το κρασί οδηγείται στα βαρέλια για να ωριμάσει και να παλαιώσει.

Ζυμώσεις με επιλεγμένες ζύμες



Εικόνα 4: Η ζύμωση του κρασιού

Στην οινοποίηση, ο όρος "άγρια ζύμη" έχει πολλαπλές έννοιες. Στο πιο βασικό της πλαίσιο, αναφέρεται στη ζύμη που δεν έχει εισαχθεί στο μούστο με σκόπιμο εμβολιασμό από την καλλιέργεια του στελέχους. Αυτές οι "άγριες ζύμες" λοιπόν έρχονται σε επαφή με το μούστο μέσω της παρουσίας τους στον εξοπλισμό συγκομιδής, στους κάδους μεταφοράς και ως μέρος της φυσικής χλωρίδας ενός οινοποιείου. Πολύ συχνά αυτά είναι τα στελέχη του

S. cerevisiae που έχουν αναπτυχθεί σε αυτά τα μέρη όπου γίνεται η συγκομιδή των σταφυλιών με την πάροδο του χρόνου. Οι μύκητες με το μεγαλύτερο ποσοστό συμμετοχής είναι ο *Saccharomyces apiculatus* που συμπεριλαμβάνεται στις άγριες ζύμες που υπάρχουν στην επιφάνεια των σταφυλιών και ο *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoides* ή *pastorianus* που είναι επιλεγμένες ζύμες με επιθυμητές ιδιότητες κατά τη ζύμωση (Belitz D., 2006). Σε αυτό το πλαίσιο, αυτές οι άγριες ζύμες αναφέρονται συχνά ως ζυμομύκητες περιβάλλοντος, ή ως γηγενείς ζύμες σε αντίθεση με τις εμβολιασμένες, η οποίες αναφέρονται και ως επιλεγμένες ή καλλιεργημένες ζύμες. Τα οινοποιεία τα οποία βασίζονται αποκλειστικά σε αυτά τα στελέχη "άγριων ζυμών" πωλούν τα κρασιά τους ως προϊόν φυσικών ζυμώσεων. Οι πιο κοινές άγριες ζύμες που βρίσκονται στον αμπελώνα είναι από τα γένη *Kloeckera*, *Candida* και *Pichia*. Το ίδιο το *S. cerevisiae* βρίσκεται πολύ σπάνια στον αμπελώνα ή στην επιφάνεια των πρόσφατα συγκομισθέντων οινοποιήσιμων σταφυλιών, εκτός εάν το οινοποιείο επανεισαγάγει επανειλημμένα απόβλητα οινοποιείων (όπως οι οινολάσπες και ο ελαιοπυρήνας) στον αμπελώνα (Robinson, 2006).

Είναι γνωστό ότι η non-*Saccharomyces* ζύμες έχουν σημαντικό ρόλο στην αρχή της ζύμωσης σχεδόν όλων των οίνων καθώς πιστεύεται ότι οι ζύμες αυτές δεν μπορούν να δράσουν σε συγκέντρωση αλκοόλ μεγαλύτερη από 3-5% v/v, πολλά οινοποιεία όμως επιλέγουν να επιτρέψουν σε αυτές τις ζύμες να συνεχίσουν περαιτέρω τη ζύμωση, έναντι της ενίσχυση του ζυμούμενου μούστου με στελέχη *Saccharomyces* που μπορούν να τελειώσουν τη ζύμωση. Ενώ τα στελέχη non-*Saccharomyces* ζυμώνουν γλυκόζη και φρουκτόζη σε αλκοόλη, έχουν επίσης τη δυνατότητα να δημιουργούν άλλα ενδιάμεσα προϊόντα που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το άρωμα και τη γεύση του κρασιού. Ορισμένα από αυτά τα ενδιάμεσα προϊόντα θα μπορούσαν να είναι θετικά, όπως η φαινυλαιθανόλη, η οποία μπορεί να προσδώσει ένα άρωμα τριαντάφυλλου (B. Zoecklein, 1999). Ωστόσο, όπως και με τα στελέχη *Saccharomyces* του περιβάλλοντος, τα προϊόντα αυτών των ζυμών μπορούν να είναι πολύ απρόβλεπτα - ειδικά όσον αφορά τους τύπους γεύσεων και αρωμάτων που μπορούν να παράγουν αυτές οι ζύμες (Robinson, 2006). Οι non-*Saccharomyces* ζύμες συχνά χρειάζονται πολύ μεγαλύτερη έκθεση στο οξυγόνο από τα στελέχη *Saccharomyces* για να μπορούν να εξασφαλίσουν επιβίωση και γι' αυτό αυτές οι ζύμες δρουν οξειδωτικά στην επιφάνεια των κρασιών στις δεξαμενές ή στα βαρέλια, εκεί όπου μπορούν να εξασφαλίσουν την παροχή οξυγόνου (K. Fugelsang, 2010).

Οι non-*Saccharomyces* ζυμομύκητες θα ξεκινήσουν τη ζύμωση πριν οι πληθυσμοί των *Saccharomyces* ζυμομυκήτων αποκτήσουν επαρκή κυτταρική πυκνότητα. Οι non-*Saccharomyces* ζυμομύκητες τείνουν να θεωρούνται ευνοϊκοί για τις ζυμώσεις καθώς συμβάλουν αισθητά στον εμπλουτισμό της γεύσης του κρασιού. Επιπλέον αρχίζουν τις ζυμώσεις ταχύτερα, για να βοηθήσουν στην αποτροπή της εμφάνισης άλλων δυσμενών ουσιών, οι οποίες ενδέχεται να εμφανιστούν μέχρι πριν από το τέλος της περιόδου καθυστέρησης των *Saccharomyces* ζυμών. Οι non-*Saccharomyces* ζυμομύκητες είναι σε θέση να ζυμώνουν το κρασί έως ότου η περιεκτικότητα σε αλκοόλ φθάσει το 5%, μετά από αυτήν την συγκέντρωση η ευαισθησία τους στην αιθανόλη αποτρέπει περαιτέρω μεταβολισμό και προκαλεί την εξάλειψη όλων των ειδών ζύμης εκτός από τους *Saccharomyces*. Οι *Saccharomyces* είναι υπεύθυνοι για όλες τις ζυμώσεις του κρασιού με συγκέντρωση αιθανόλης λιγότερο από 5%.

Η φλούδα των σταφυλιών καλύπτεται συνήθως από βακτηρίδια, μύκητες και ζύμες. Οι άγριες ζύμες όπως οι *Pichia*, *Kloeckera*, και *Torulopsis* είναι σε μεγαλύτερη περίσσεια από τη ζύμη του κρασιού *Saccharomyces*. Αυτή η βιοποικιλότητα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως την ποικιλία του σταφυλιού, το στάδιο ωρίμανσης κατά τον τρυγητό, τις αντιμυκητιακές δράσεις κατά την καλλιέργεια, τις κλιματικές συνθήκες της σοδειάς, τις μολύνσεις από μύκητες και γενικά τις αμπελουργικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια (Sapis-domercq, 1980). Επιπλέον παράγοντες που επηρεάζουν την τελική σύσταση των ζυμών πριν την αλκοολική ζύμωση, είναι όλες οι επαφές του σταφυλιού, κατά τον τρυγητό, τις μεταφορές του σταφυλιού καθώς και τις προζυμωτικές διεργασίες στο οινοποιείο (Constantí, 1997) (Mortimer, 1999)). Παρά το γεγονός ότι είδη του *Saccharomyces* γενικά θεωρούνται πιο επιθυμητά για αποτελεσματική αλκοολική ζύμωση, άγριες ζύμες από άλλα γένη συνεισφέρουν στη γεύση, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Όταν βρεθούν στο γλεύκος πολλαπλασιάζονται με εξαιρετικά μεγάλο ρυθμό. Είναι σχετικά ευαίσθητοι οργανισμοί. Θερμοκρασίες κάτω των 5 °C τους οδηγούν σε νάρκη ενώ αν υπάρξουν σε πάνω από τους 35 °C πεθαίνουν.

Διαφορετικές ζύμες συμμετέχουν στην αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση ακόμα και υπό την παρουσία διοξειδίου του θείου (θειώδης ανυδρίτης) (Beltran, 2004). Συνήθως τα είδη *Kloeckera*, *Hanseniaspora* και *Candida* κυριαρχούν στα πρώτα στάδια της ζύμωσης ενώ κατά τα ενδιάμεσα στάδια επικρατούν τα είδη *Pichia* και *Metschnikowia*. Στα τελευταία στάδια, επικρατεί κυρίως ο *S. cerevisiae* λόγω της αντοχής του σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Κάποιες άλλες ζύμες που μπορεί να είναι παρούσες κατά την αλκοολική ζύμωση αλλά και στο τελικό προϊόν μπορεί να έχουν αρνητική οργανοληπτική επίδραση στο κρασί. Για να αποτραπεί το φαινόμενο αυτό, προστίθεται θειώδης ανιδύτρης και εμβολιάζεται το γλεύκος με ορισμένα στελέχη ξηρών ζυμών (*S. cerevisiae*). Η δραστική επιλεκτική δράση του θειώδη ανιδρύτη στην ανάπτυξη των ζυμών σε συνδυασμό με την υψηλή αντοχή του *S. cerevisiae* ευνοεί την ανάπτυξη του και την αύξηση του πληθυσμού του.

Εναλλακτικά, για την αλκοολική ζύμωση παραγωγής οίνου χρησιμοποιούνται επιλεγμένες ζύμες, με τις οποίες εμβολιάζεται το γλεύκος. Υπάρχουν πολλά είδη ζυμών στο εμπόριο που έχουν διαφορετικές μικροβιολογικές, χημικές, φυσικές και οργανοληπτικές πτυχές. Τα εμπορικά στελέχη ζυμομυκήτων πωλούνται σε ξηρή μορφή μέσα σε πακέτα κενού ή σε υγρές καλλιέργειες. Η ξηρή μαγιά περιέχει ζωντανά κύτταρα ενεργής μαγιάς τα οποία πρέπει να προετοιμαστούν κατάλληλα για τον εμβολιασμό σε χυμό σταφυλιών. Αυτό είναι πολύ σημαντικό βήμα και θα εξασφαλίσει την αποτελεσματικότητα της ζύμης κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Υπάρχουν

εκατοντάδες διαφορετικά είδη ζύμης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία της οινοποίησης και το καθένα έχει τα δικά του χαρακτηριστικά και λειτουργία. Επιτυγχάνεται έτσι καλύτερος έλεγχος της ζύμωσης, αλλά και των επιθυμητών χαρακτηριστικών του κρασιού που θα παραχθεί. Αν δεν εφαρμοσθεί προσθήκη ζυμών, η αλκοολική ζύμωση λέγεται φυσική ή αυθόρμητη, ενώ αλλιώς ονομάζεται ελεγχόμενη.

Ο πολλαπλασιασμός και η δράση των ζυμών μπορεί να ευνοηθεί ή να επιταχυνθεί με τη δράση διαφόρων χημικών ή φυσικών παραγόντων. Οι σπουδαιότεροι παράγοντες που παίζουν ρόλο στην οινοποίηση και επηρεάζουν το πληθυσμό και τη δράση των ζυμών είναι οι εξής: (Τσέτουρας, 2003)

- Η πίεση
- Η θερμοκρασία
- Το οξυγόνο του αέρα
- Η αλκοόλη
- Τα οξέα
- Οι αντισηπτικές ουσίες (θειώδης ανυδρίτης)
- Οι θρεπτικές ουσίες της ζύμης

Οι ζύμες μπορούν να ζουν και να δρουν παρουσία αλλά και απουσία οξυγόνου. Όσο λιγότερο είναι το οξυγόνο τόσο δυσκολότερα πολλαπλασιάζονται. Όμως στις συνθήκες αυτές αυξάνεται η ζυμωτική δράση τους και συνεπώς αυξάνεται η παραγωγή αλκοόλης (Τσιβερίωτου, 2003).

Ενώ λοιπόν οι άγριες ζύμες είναι μία ανάμιξη διάφορων άγνωστων, πολλές φορές, ζυμομυκήτων που υπάρχουν στα φυσικά περιβάλλοντα, οι επιλεγμένες ζύμες που εμβολιάζονται στο γλεύκος μπορεί να είναι είτε ένα γνωστό στέλεχος ζυμομυκήτων είτε γνωστά στελέχη σε συνδυασμό. Οι επιλεγμένες ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις ζυμώσεις της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν τρία στελέχη που εμβολιάστηκαν ξεχωριστά και συγκεκριμένα ήταν ο *S. cerevisiae* από τους *Saccharomyces* ζυμομύκητες, και η *M. pulcherrima* και η *T. delbrueckii* από τους non-*Saccharomyces* ζυμομύκητες.

Metschnikowia pulcherrima

Η *Metschnikowia pulcherrima* είναι ένα πανταχού παρόν είδος ζύμης, με πολλά στελέχη τα οποία ανήκουν στην οικογένεια *Metschnikowiaceae* και βρίσκονται στα σταφύλια, τα κεράσια, τα λουλούδια και τα αλλοιωμένα φρούτα. Πρόκειται για non-*Saccharomyces* ζύμη και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οινοποίηση του κρασιού όταν είναι παρούσα στα σταφύλια ή στον εξοπλισμό του οινοποιείου, καθώς επίσης έχει ιστορικά χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία οίνου της Νότιας Αφρικής. Η *M. pulcherrima* έχει σχήμα ωοειδές σε ελλειψοειδή μορφή και αναπαράγεται με εκβλάστηση. Τα κύτταρα του έχουν πυκνά τοιχώματα. Ως αποτέλεσμα της

ελλιπούς εμφάνισής τους, τα κύτταρα παραμένουν προσκολλημένα μετά την διαίρεση και οι ψευδοφυλίες σχηματίζονται υπό αναερόβιες συνθήκες (Davis campus, 2017).

Οι οξικές προτεάσες που εκκρίνονται από την *M. pulcherrima* βρέθηκαν να είναι αποτελεσματικές στην υποβάθμιση των πρωτεϊνών του κρασιού τόσο σε διαλύματα κρασιού όσο και σε τεχνητά διαλύματα που προσομοιάζουν το κρασί (Lagace, 1990). Αυτό υποδηλώνει ότι εάν υπάρχει υψηλή συγκέντρωση της παραπάνω ζύμης, οι ιδιότητες των τελικών οίνων μπορούν να επηρεαστούν σε μεγάλο βαθμό από την δράση της.

Το οξυγόνο απαιτείται για το μεταβολισμό της μαγιάς αυτής, οπότε η έλλειψη οξυγόνου είναι ανασταλτική. Η μέγιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξή της είναι περίπου 39 °C. Δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε οργανικά οξέα και στο σορβικό. Η ζύμη μπορεί να ανεχθεί χαμηλά pH, αλλά το pH πάνω από 7 είναι ανασταλτικό και ένα pH πάνω από 3,6 επιτρέπει ανταγωνισμό από βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς. Η προσθήκη SO₂ αναστέλλει την ανάπτυξη αυτής της ζύμης (Davis campus, 2017).

Η αξία της στην αμπελοοικονομική βιομηχανία έγκειται στην ανταγωνιστική της συμπεριφορά σε σχέση με άλλα ανεπιθύμητα είδη ζύμης που εμπλέκονται στην οινοποίηση. Στελέχη του *M.pulcherrima* εξετάστηκαν για την δραστηριότητα τους εναντίον ενός μεγάλου φάσματος στελεχών ζύμης συμπεριλαμβανομένων των *Pichia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora*, *Brettanomyces* και *Saccharomyces*. Ένα από τα αξιοσημείωτα αποτελέσματα ήταν η έλλειψη της αντιμικροβιακής δραστηριότητας έναντι της ανάπτυξης του *S. cerevisiae*, ενώ δείχνουν σημαντική αντιμικροβιακή δραστηριότητα σε μια σειρά ζυμών αλλοίωσης, όπως *Brettanomyces / Dekkera*, *Hanseniaspora* και *Pichia*. Τα πειράματα ζύμωσης επιβεβαίωσαν την αντιμικροβιακή δράση του *M. Pulcherrima* σε καλλιέργειες non-*Saccharomyces*. Η αντιμικροβιακή δράση που παρατηρείται οφείλεται στη χρωστική ακινητοποίηση του σιδήρου *pulcherrimin* και του οξέος *pulcherriminic*, η οποία απομονώνει κάθε σίδηρο στο μέσο ανάπτυξης, ένα στοιχείο ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη άλλων ζυμών (Oro L, 2014). Το στέλεχος *M.pulcherrima* αποδείχθηκε επίσης πολύ αποτελεσματικό έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών μετά τη συγκομιδή των σταφυλιών (Sezai Türkel, 2014).

Για ένα χρονικό διάστημα ο τομέας του κρασιού αναζητούσε τρόπους παραγωγής οίνων με χαμηλή περιεκτικότητα σε οινόπνευμα. Μια προφανής προσέγγιση θα ήταν να χρησιμοποιηθούν στελέχη ζυμομυκήτων οίνων τα οποία είναι αναποτελεσματικά για τη μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη, αλλά στην πράξη διαπιστώθηκε ότι οι εμπορικές ζύμες των οίνων έχουν όλες τις ίδιες αποδόσεις αιθανόλης. Η έρευνα σχετικά με τη δυναμική του πληθυσμού των ζυμομυκήτων δείχνει ότι η χρήση του *M. pulcherrima* σε διαδοχικό εμβολιασμό με *Saccharomyces uvarum* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μπορεί να παράγει κρασί Shirazi και Chardonnays με μειωμένη περιεκτικότητα σε αλκοόλες (Contreras A, 2015).

Torulaspora delbrueckii

Η *Torulaspora delbrueckii* είναι το πιο μελετημένο είδος του γένους *Torulaspora*, το γένος αυτό περιέχει 8 είδη μέχρι σήμερα. Η *T. delbrueckii* απομονώθηκε από διάφορες βιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της βιομηχανίας ψωμιού, έτσι ορισμένα στελέχη της *T. delbrueckii* είναι διαθέσιμα στο εμπόριο σε εφαρμογές κατεψυγμένης ζύμης (Pacheco A, 2012). Άλλες εφαρμογές αυτής της ζύμης περιλαμβάνουν την ζύμωση τροφίμων, την παραγωγή αποσταγμένων και παραδοσιακών ζυμωμένων ποτών, συμπεριλαμβανομένων των mecal, colonche, tequila, μηλίτη, χυμός φρούτων, χυμός φράουλα και χυμός ζαχαροκάλαμου. Η *T. delbrueckii* απαντάται σε πολλά φυσικά περιβάλλοντα όπως στα εδάφη, στα φυτά, στα φρούτα και στα έντομα (Nguyen Nhu H., Suh, & Blackwell, 2007) (Nguyen N. H., Suh, Erbil, & Blackwell, 2006).

Η *T. delbrueckii* συνδέεται με την οινοποίηση δεκαετίες πριν και απομονώνεται είτε από σταφύλι, είτε από μούστο και κρασί (Valmaryvan Bredaa, 2013). Η *T. Delbrueckii* προτείνεται πλέον ως καλλιέργεια εκκίνησης (έτσι ώστε να συσχετιστεί με τον *S. cerevisiae* σε μικτές καλλιέργειες) για ορισμένες εφαρμογές, ιδιαίτερα για τη μείωση της πτητικής οξύτητας σε ζυμώσεις υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων, όπως στους οίνους Sauternes (Bely M, 2008). Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι το είδος *T. delbrueckii* είχε επιλεγεί για να χρησιμοποιείται στην οινοποίηση και σε άλλες ανθρώπινες χρήσεις περίπου πριν από 1900 και 4000 χρόνια, αντίστοιχα (Albertin W, 2014).

Saccharomyces cerevisiae

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένα είδος ζύμης, το οποίο χρησιμοποιείται στην οινοποίηση, στην αρτοποιία και στη ζυθοποιία από την αρχαιότητα. Πιστεύεται ότι απομονώθηκε αρχικά από τον φλοιό των σταφυλιών (μπορεί επίσης κανείς να δει τη ζύμη ως συστατικό της λεπτής λευκής μεμβράνης στα δέρματα ορισμένων φαιόχρωμων φρούτων όπως τα δαμάσκηνα· υπάρχει μεταξύ των κηρών της επιδερμίδας). Είναι ένας από τους πιο έντονα μελετημένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που χρησιμοποιούνται ως μοντέλα στη μοριακή και κυτταρική βιολογία, όπως και το *Escherichia coli* χρησιμοποιείται ως μοντέλο βακτηρίου. Είναι ο μικροοργανισμός που θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ο πιο κοινός τύπος ζύμωσης. Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* είναι στρογγυλά έως ωοειδή, διαμέτρου 5-10 μm και αναπαράγεται με μια διαδικασία διαίρεσης που είναι γνωστή ως εκβλάστηση (Feldmann, 2010).

Όπως προαναφέρθηκε ο *S. cerevisiae* είναι η πιο συνηθισμένη ζύμη που συνδέεται με την οινοποίηση, ο οποίος έχει ευνοηθεί λόγω των προβλέψιμων και έντονων δυνατοτήτων του στη ζύμωση, λόγω της αντοχής του σε σχετικά υψηλά επίπεδα αλκοόλης και διοξειδίου του θείου καθώς και της ικανότητάς του να αναπτύσσεται σε φυσιολογικό pH μεταξύ 2,8 και 4. Αντίθετα η εκτεταμένη χρήση του αποτελεί σκόπιμο εμβολιασμό από καλλιεργημένο απόθεμα, καθώς ο *S. cerevisiae* σπανίως είναι το μόνο είδος ζύμης που εμπλέκεται στη ζύμωση. Τα σταφύλια που προέρχονται από τη συγκομιδή συνήθως περιέχουν μια ποικιλία "άγριων ζυμών" από τα γένη *Kloeckera* και *Candida*. Αυτές οι ζύμες αρχίζουν συχνά τη διαδικασία ζύμωσης σχεδόν αμέσως μετά την συγκομιδή των σταφυλιών καθώς το βάρος των συστάδων των σταφυλιών στους

κάδους συγκομιδής αρχίζει να συνθλίβει τα σταφύλια, αποδεδειγμένα τον πλούσιο σε ζάχαρη μούστο (K. Fugelsang, 2010).

Ενώ οι προσθήκες διοξειδίου του θείου (συχνά προστιθέμενες στον εκθλιπτήρα) μπορούν να περιορίσουν μερικές από τις δραστηριότητες των άγριων ζυμών, οι ζύμες αυτές αδρανοποιούνται τελείως μόλις το επίπεδο αλκοόλης του ζυμωμένου κρασιού φθάσει περίπου στο 15%, διότι λόγω της τοξικότητας της αλκοόλης είναι αδύνατον να επιβιώσουν τα κύτταρα των ζυμομυκήτων. Ανθεκτικά στην αλκοόλη όμως παραμένουν τα είδη *Saccharomyces*. Το *S. cerevisiae* είναι ένα είδος ζύμης που μπορεί να ανεχθεί επίπεδα αλκοόλ 17-20% και χρησιμοποιείται συχνά στην παραγωγή οίνων με ενισχυμένη συγκέντρωση σε αλκοόλ όπως είναι οι οίνοι από τις ποικιλίες Zinfandel και Syrah που περιέχουν υψηλά επίπεδα ζάχαρης (B. Zoecklein, 1999).

Τα είδη ζυμομυκήτων που είναι κοινώς γνωστά ως *S. cerevisiae* εμφανίστηκαν για πρώτη φορά σε κείμενο οινολογίας του 19ου αιώνα με την ονομασία *Saccharomyces ellipsoideus*, λόγω του ελλειπτικού σχήματος των κυττάρων τους. Καθ' όλη τη διάρκεια του 20ού αιώνα εντοπίστηκαν περισσότερα από 700 διαφορετικά στελέχη του *S. cerevisiae*. Η διαφορά μεταξύ αυτής της συντριπτικής πλειοψηφίας ζυμομυκήτων είναι κατά βάση πολύ λίγες, παρόλο που πολλοί οινοπαραγωγοί ανέπτυξαν προτίμηση για συγκεκριμένα στελέχη έτσι ώστε να παράγουν ορισμένους οίνους ή έδειχναν μεγαλύτερο ενδιαφέρον σε αυτούς τους ζυμομυκήτες που βρισκόταν στις ποικιλίες σταφυλιών με τις οποίες εργαζόνταν. Ορισμένες λοιπόν διαφορές ανάμεσα στα στελέχη του *S. cerevisiae* είναι, η ταχύτητα ζύμωσης, η αντοχή στη θερμοκρασία, και η παραγωγή πτητικών ενώσεων θείου (όπως υδρόθειο) και άλλων ενώσεων που μπορούν να επηρεάσουν το άρωμα του οίνου (Robinson, 2006).

Το 1996, το *S. cerevisiae* ήταν ο πρώτος μονοκύτταρος, ευκαρυωτικός οργανισμός που είχε γνωστή την αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος. Αυτή η αλληλουχία βοήθησε να επιβεβαιωθεί ο ένας σχεδόν αιώνας των εργασιών των μυκητολόγων και οινολόγων για την αναγνώριση διαφορετικών στελεχών *S. cerevisiae* που χρησιμοποιούνται στη μύρα, το ψωμί και την οινοποίηση. Σήμερα υπάρχουν αρκετές εκατοντάδες διαφορετικά στελέχη του *S. cerevisiae* ταυτοποιημένα (Robinson, 2006). Δεν είναι όλα τα στελέχη κατάλληλα για την οινοποίηση και μάλιστα μεταξύ των στελεχών που υπάρχουν, υπάρχει συζήτηση μεταξύ των οινοποιών και των επιστημόνων σχετικά με το πραγματικό μέγεθος των διαφορών μεταξύ των διαφόρων στελεχών και τις πιθανές επιπτώσεις τους στο κρασί (B. Zoecklein, 1999). Ακόμη και μεταξύ στελεχών που έχουν επιδείξει διακριτική διαφορά όταν συγκρίνονται μεταξύ των νέων οίνων, οι διαφορές αυτές φαίνονται να ελαχιστοποιούνται και να καθίστανται λιγότερο χαρακτηριστικές με την ηλικία των οίνων (Bird, 2005).

Οι εμβολιασμένες (ή καθαρές καλλιέργειες) ζύμες του στελέχους *S. cerevisiae*, έχουν ταυτοποιηθεί από τα οινοποιεία σε ολόκληρο τον κόσμο. Τα στελέχη αυτά δοκιμάζονται σε εργαστήρια για να προσδιορίσουν την αντοχή του στελέχους στο θειικό άλας και στο αλκοόλ, τα επίπεδα παραγωγής οξικού οξέος και θειούχων ενώσεων, την δυνατότητα ενίσχυσης του χρώματος του κρασιού ή ορισμένων χαρακτηριστικών της ποικιλίας και άλλα μεταβολικά προϊόντα που παράγονται από την ζύμη (Robinson, 2006).

Ο *S. cerevisiae* μπορεί να αφομοιώσει άζωτο τόσο από ανόργανες (αμμωνία και αμμώνιο) όσο και από οργανικές ενώσεις (αμινοξέα, ιδιαίτερα αργινίνη). Και έτσι όταν φτάσει η ώρα τα

κύτταρα των ζυμομυκήτων να αδρανοποιηθούν, τα ένζυμα μέσα στα κύτταρα των ζυμομυκήτων αρχίζουν να αυτολύονται διασπώντας το κύτταρο, συμπεριλαμβανομένων των αμινοξέων. Αυτή η αυτόλυση του κυττάρου παρέχει μια διαθέσιμη πηγή αζώτου για τα ζυμομυκητικά κύτταρα που ζυμώνουν ακόμα και είναι βιώσιμα. Εντούτοις, αυτή η αυτόλυση μπορεί επίσης να απελευθερώσει ενώσεις θείου (όπως η διάσπαση του αμινοξέος της κυστεΐνης) η οποία μπορεί να συνδυαστεί με άλλα μόρια και να αντιδράσει με αλκοόλη για να δημιουργήσει πτητικές θειόλες που μπορούν να συμβάλλουν σε μία "πενιχρή ζύμωση" ή μεταγενέστερα να δημιουργήσουν διάφορα σφάλματα στους παραγόμενους οίνους. Αυτά τα ελαττώματα του κρασιού για τα οποία μπορεί να οφείλεται ο *S. cerevisiae* είναι το γεγονός ότι κάποια στελέχη του μπορούν να παράγουν υψηλότερα από τα ιδανικά επίπεδα οξικού οξέος και ακεταλδεΐδης (K. Fugelsang, 2010).

Ποικιλίες αμπέλου

Υπάρχουν 60 διαφορετικά είδη αμπέλου ανά τον κόσμο αλλά ελάχιστα είναι αυτά που χρησιμοποιούνται στη μοντέρνα αμπελουργία. Τα πιο σημαντικά είναι: *Vitis Vinifera*: Αποτελεί το κύριο ευρασιατικό είδος. Παράγει σχεδόν όλα τα σταφύλια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κρασιού, εδώ και πολλές χιλιάδες χρόνια. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν μεταξύ 5.000-10.000 ποικιλίες *V. Vinifera*. *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis berlandieri*: Τα τρία αυτά είδη είναι ενδημικά της Βορείου Αμερικής και σπάνια καλλιεργούνται για την παραγωγή κρασιού. Παρόλα αυτά, σε αντίθεση με το *V. Vinifera* είναι ανθεκτικά στο παράσιτο της φυλλοξήρας που προσβάλλει τις ρίζες της αμπέλου και έτσι χρησιμοποιούνται για να παρέχουν τα συστήματα ρίζας πάνω στα οποία μοσολιάζονται οι άμπελοι *V. Vinifera*.

Ένας πληθυσμός αμπελιών ανήκει στην ίδια ποικιλία αν η καταγωγή κάθε φυτού ακολουθεί μια σειρά μοσχευμάτων που έχουν ληφθεί μέσω του ίδιου, μοναδικού αρχικού φυτού. Δύο άμπελοι προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες όταν ανιχνευθούν σε αυτές δυο διαφορετικές φύτες. Οι 5.000-10.000 διαφορετικές ποικιλίες *V. Vinifera* που υπάρχουν σήμερα, διαφέρουν μεταξύ τους στο χρώμα τη γεύση και τη σύνθεση των σταφυλιών τους. Οι ποικιλίες σταφυλιού διαφέρουν, ακόμα, στο πόσο καλά ωριμάζουν σε διαφορετικό περιβάλλον, στην ανθεκτικότητα τους σε παράσιτα και ασθένειες, στην παραγωγή τους καθώς και σε άλλους παράγοντες που μπορεί να έχουν σημασία για έναν αμπελουργό.

Παρά το ότι υπάρχουν χιλιάδες διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιού, οι περισσότερες αφορούν συγκεκριμένες περιοχές. Ως διεθνείς ποικιλίες χαρακτηρίζονται οι ποικιλίες που αναπτύχθηκαν επιτυχώς σε περιοχές πέραν της αρχικής τους. Οι βασικότερες διεθνείς ποικιλίες είναι οι ακόλουθες: Το Chardonnay, το Riesling και το Sauvignon Blanc από τις λευκές, και το Cabernet Sauvignon, το Merlot, το Syrah και το Pinot Noir από τις ερυθρές ποικιλίες. Άλλες παγκοσμίως γνωστές ποικιλίες που ευδοκίμουν όμως, κυρίως σε μια συγκεκριμένη περιοχή αποτελούν: το Tempranillo και η Grenache στην Ισπανία, το Sangiovese στην Ιταλία, το Malbec στην Αργεντινή, το Pinotage στη Νότια Αφρική και το Gewurztraminer στη Γερμανία και την Αυστρία. Στην Ελλάδα υπάρχουν περισσότερες από 200 γηγενείς ποικιλίες, ελάχιστες από τις οποίες καλλιεργούνται αλλού (Μπιμπίλας, 2017).

Ποικιλίες αμπέλου της Ικαρίας

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τρεις ποικιλίες αμπέλου που ευδοκούν στην Ικαρία. Το φωκιανό το ρετενό και το κούντουρο ή, όπως είναι γνωστό και στην υπόλοιπη Ελλάδα, η μαντηλαριά. Αναλυτικότερα με την κάθε ποικιλία θα ασχοληθούμε παρακάτω.

Το φωκιανό



Εικόνα 5: Σταφύλι της ποικιλίας Φωκιανό

Το Φωκιανό καλλιεργείται στα νησιά της Σάμου, της Ικαρίας, στις Κυκλάδες, στα Δωδεκάνησα και στην Πελοπόννησο, με πιο σημαντικό κέντρο καλλιέργειας την Ικαρία στην οποία καταλαμβάνει το 70% και πλέον των εκτάσεων των αμπελώνων της (Σταυρακάκης, 2010). Είναι ποικιλία ανατολικής μικρασιατικής προέλευσης (φωκιανό ή αλλιώς: Σαμιώτικο, Δαμάσκηνο, Δαμασκηνάτο, συρίχι, ξερομαχειρούδα, εφτάκιλο, ερικαράς, Ρικαράς, Ιρί-καρά, Ραζακί κόκκινο Αρμελετούσα, Γιορούκινο, Λαδικινό.) Παρά τις επιμέρους διαφορές σε ορισμένους αμπελογραφικούς χαρακτήρες, παρουσιάζουν γενετικές ομοιότητες που ενισχύουν την υπόθεση ότι πιθανόν προέρχονται από κοινή γονεϊκή ποικιλία προερχόμενη είτε από το αρχικό γενετικό

κέντρο δημιουργίας της καυκασιανής αμπέλου ή από το δευτερογενές κέντρο της ευρύτερης περιοχής του Αιγαίου μαζί με άλλες ελληνικές ποικιλίες. (Κούσουλας, 2002)

Ο Ronasenda (1887, (Σταυρακάκης, 2010)) αναφέρει τις ονομασίες Sri-kara και Sriskara ως σταφύλι της Συρίας, ενώ ο Pulliat (1888, (Σταυρακάκης, 2010)) περιγράφει την ποικιλία Ιρί-καρά με λευκές ράγες. Οι Viala και Vermorel (1902- 1910, (Σταυρακάκης, 2010)) την αναφέρουν ως Fourkiano και την περιγράφουν ως Phokiano (Ericara, Iri-Cara, Iri-Kara, Iris-Kara). Ο Κριμπάς (1943, (Σταυρακάκης, 2010)) αναφέρει τρεις χρωματικές παραλλαγές. Φωκιανό μαύρο, φωκιανό κοκκινέλι και φωκιανό άσπρο που καλλιεργούνταν κυρίως στη Λήμνο, τις Κυκλάδες και δευτερευόντως στην Κρήτη (Νομός Λασιθίου) και την Εύβοια. Θεωρεί ότι λίαν συγγενείς είναι και η ποικιλία Αρμελετούσα που καλλιεργείται στην Άνδρο και τις υπόλοιπες Κυκλάδες. Οι παραλλαγές αυτές παρουσίαζαν όμοιους αμπελογραφικούς χαρακτήρες στην αυξανόμενη κορυφή, τη νεαρή βλάστηση και το αναπτυσσόμενο φύλλο. Διαφορές σημειώνονταν στο σχήμα και στο μέγεθος της σταφυλής, τους τεχνολογικούς χαρακτήρες των ραγών (χρώμα, συνεκτικότητα σάρκας κ.α.) και την παραγωγικότητα (κατά φθίνουσα τάξη: Φωκιανό μαύρο, φωκιανό κοκκινέλι, Φωκιανό άσπρο). Η ποικιλία που σήμερα καλλιεργείται και περιγράφεται αντιστοιχεί

περισσότερο στο φωκιανό μαύρο. Οι Λογοθέτης και Βλάχος (1963, (Σταυρακάκης, 2010)) αναφέρουν επίσης ότι οι ποικιλίες Αρμελετούσα και Γιουρούκικο είναι συγγενείς με τον φωκιανό. Η καλλιέργεια της ποικιλίας επιτρέπεται στα αμπελουργικά διαμερίσματα των Κυκλάδων, της Δωδεκανήσου και της Θράκης καθώς και σε πολλούς νομούς της χώρας (Σάμου, Λέσβου, Χαλκιδικής, Χανίων, Αρκαδίας κ.α.) (Σταυρακάκης, 2010).

Είναι μια ποικιλία αρκετά εύρωστη, παραγωγική, ανθεκτική στις ασθένειες και την ξηρασία. Προσαρμόζεται άριστα σε ξηρές και θερμές περιοχές όπου παράγει σταφυλές με πλούσιο άρωμα. Από αυτήν την ποικιλία παρασκευάζονται ερυθροί οίνοι αρκετά καλής ποιότητας, που χαρακτηρίζονται από μέτριο αλκοολικό τίτλο, μέτρια οξύτητα και χρώμα. Επίσης καλλιεργείται και για επιτραπέζια κατανάλωση. Είναι φυτό μέτριας ζωηρότητας και παραγωγικότητας. Σε κάθε βλαστό φέρει 2-3 σταφύλια, με ερυθρές χοντρές ράγες τόσο μεγάλες που τα σταφύλια ξεπερνούν τα 500 g, κυλινδροκωνικά κανονικής πυκνότητας. Η αναλογίες φλοιού, γιγάρτων και σάρκας είναι 4.5, 1.2 και 94.3% αντίστοιχα. Το φύλλο του φωκιανού είναι μέτριου μεγέθους, τρίλοβο και άλλοτε πεντάλοβο, χρώματος βαθιοπράσινο στην πάνω και ανοιχτό πράσινο στην κάτω επιφάνεια και λείο και στις δύο όψεις. Η ράγα είναι μεγάλου μεγέθους (περίπου στα 3 g), σφαιρική, με 1-2 μεγάλα γίγαρτα. Ο φλοιός είναι χρώματος ερυθρομελανού, όχι πάντα ομοιογενής. Οι ράγες αποτελούν το 97% του βάρους του σταφυλιού. Το φυτό διαμορφώνεται σε σχήμα κυπελλοειδές και σε κορδόνια Royat, και κλαδεύεται στα 2-3 μάτια (Σκάρου, 2013). Θα μπορούσε να πει κανένας ότι μοιάζει με τη γαλλική Σενζώ, και γι' αυτό το λόγο η συγκαλλιέργειά της με άλλες ερυθρές (μαύρες) ελληνικές ποικιλίες δίνει εξαιρετα οινοποιητικά αποτελέσματα, γιατί το Φωκιανό χωρίς να έχει σώμα ή χρώμα έντονο, εντούτοις έχει σάκχαρα αυξημένα και λεπτό άρωμα. Κλαδεύεται σε κεφάλια των 2-3 ματιών και κάθε καρποφόρα βέργα της δένει 2-3 σταφύλια. Χαρακτηριστικό της ποικιλίας είναι ότι τα παρακλάδια της (οι ταχυφυείς), που βγαίνουν μετά το κορυφολόγημα δεν έχουν καθόλου παρατσάμπια (καμπανάρια). Εντούτοις «παρατσάμπια» έχουν σχεδόν όλα τα κύρια σταφύλια. Επειδή τα σταφύλια της γλυκαίνουν πάρα πολύ, ξεραίνεται εύκολα και δίνει επίσης εξαιρετες χωρικές σταφίδες για οικογενειακή κατανάλωση. (Κούσουλας, 2002).

Ανάλογα με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, μορφώνεται σε κύπελλο (Σάμο, Ικαρία, Κυκλάδες, Κρήτη) με χαμηλό ύψος κορμού και 3-5, συνήθως τρεις, βραχίονες και σε γραμμικό (αμφίπλευρο Royat) στη Μακεδονία. Το ετήσιο κλάδεμα καρποφορίας είναι βραχύ με μία κεφαλή των δύο με τριών οφθαλμών ανά βραχίονα. Είναι αρκετά ανθεκτική ποικιλία σ' όλες τις ασθένειες, παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντοχή στο ωίδιο και στο περονόσπορο. Παρατηρείται έναρξη βλάστησης στο τρίτο δεκαήμερο του Μαρτίου, πλήρης βλάστηση στο δεύτερο δεκαήμερο του Απριλίου και έναρξη άνθησης-πλήρη άνθηση 18 με 22 Μαΐου. Επίσης παρατηρείται έναρξη ωρίμανσης πρώτο με δεύτερο δεκαήμερο του Ιουλίου και πλήρης ωρίμανση στο τρίτο δεκαήμερο του Ιουλίου με πρώτο δεκαήμερο του Αυγούστου. Το γλεύκος της ποικιλίας (σάκχαρα 230- 260 g/L, ολική οξύτητα 4,4-4,8 g/L σε τρυγικό οξύ, pH 3,4-4,0) συνοινοποιείται με άλλες ερυθρές ποικιλίες που καλλιεργούνται κυρίως στην Ικαρία για την παραγωγή τοπικών οίνων (Σταυρακάκης, 2010).

Το Ρετενό



Η ποικιλία Ρετενό καλλιεργείται, στην Εύβοια, στη Μαγνησία, στη Σάμο, στην Ικαρία και στις Σποράδες, είναι δε γνωστή και ως Ρητινό, Αρητινό, Ρετίνο, Αρετινό, Ριπνό. Το κρασί του είναι υψηλού αλκοολικού τίτλου, καλής οξύτητας με μέτριο χρώμα. Χαρακτηρίζεται από ζηρότητα παραγωγικότητα και είναι ανθεκτικό στην ξηρασία. Κάθε καρποφόρος κληματίδα φέρει δύο σταφύλια τα οποία είναι

Εικόνα 6: Σταφύλι της ποικιλίας Ρετενό

μέσου μεγέθους προς μεγάλα, κυλινδρικά, πτερυγωτά και πυκνόραγα. Οι ράγες είναι μέσου ως μεγάλου μεγέθους, σχήματος σφαιρικού ως ελαφρά ελλειψοειδούς. Ο φλοιός είναι παχύς, με ερυθροϊώδη προς μελανοϊώδη χρωματισμό, ανθεκτικός με άφθονη ανθηρότητα και με γεύση στυφνή. Η σάρκα είναι άχρωμη, μαλακή και με γεύση γλυκιά και έχει 2-3 μεγάλα γίγαρτα. Η αναλογίες φλοιού, γιγάρτων και σάρκας είναι 5.0, 2.5 και 92.5% αντίστοιχα. Το φύλλο είναι πεντάλοβο με βαθιοπράσινο χρώμα. Έχει πρέμνο ζηρό και παραγωγικό που διαμορφώνεται σε κυπελλοειδές που δέχεται κλάδεμα καρποφορίας βραχύ. Η ποικιλία αυτή εμφανίζει ωριμότητα στο δεύτερο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου. Συμμετέχει στους ερυθρωπούς και ερυθρούς οίνους σε τοπικούς ξηρούς, ημίξηρους και ημίγλυκους. Κατά τον Κριμπά (1944, (Σταυρακάκης, 2010)) υπάρχει και λευκή ποικιλία με την ονομασία ρητινό άσπρο (Σταυρακάκης, 2010).

Το Κούντουρο (Η Μαντηλαριά)



Η Μαντηλαριά είναι μία από τις πιο γνωστές ερυθρές ελληνικές ποικιλίες και έχει συνδεθεί με τη μακραίωνη οινοκαλλιεργητική παράδοση του τόπου μας και ειδικότερα μ' αυτήν του αιγαιοπελαγίτικου χώρου. Έχει αναφερθεί σε αρχαία κείμενα, κυρίως από τον Πausanias, για τη σχέση της με τον Αρούσιο Οίνο που παράγονταν στην περιοχή της σημερινής Χίου - η Αρούσια ήταν περιοχή που στην αρχαιότητα φημιζόταν για τα κρασιά της. Συνώνυμό της είναι το Αμοργιανό (Ρόδος), Μαντηλάρι (Κρήτη), μαύρη Κουντούρα (Αττική, Αχαΐα, Λέσβος, Εύβοια, Σαμοθράκη, Χαλκιδική, Θεσσαλονίκη, Μαγνησία), μαύρη Δουμπραΐνα (Αττική), Κούντουρο (Ικαρία, Χίος), Μαγκελάρικο (Νίσυρος) και Παριανό (Πάρος).

Εικόνα 7: Σταφύλι της ποικιλίας Κούντουρο

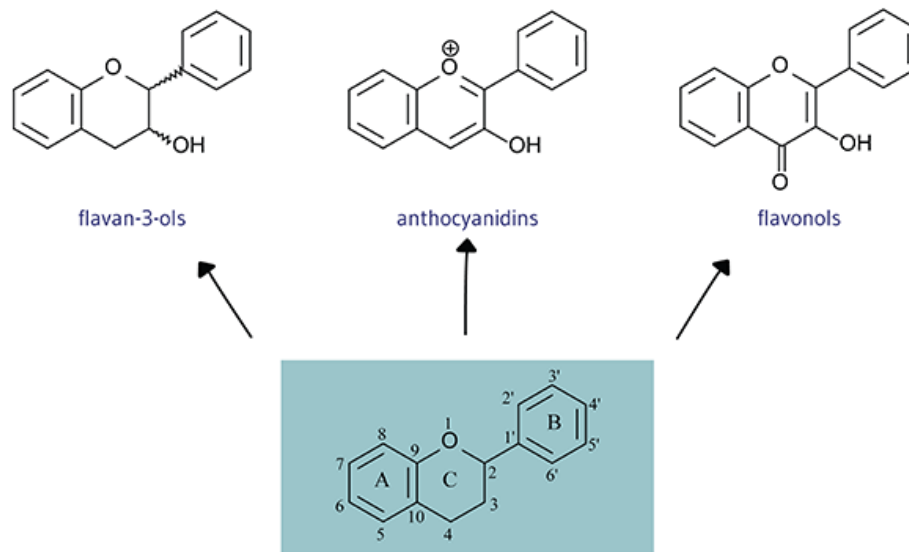
Αρχικά καλλιεργούνταν στο Βόρειο Αιγαίο (Ικαρία, Σάμος) στις Κυκλάδες (ιδιαίτερα στην Πάρο και στη Θήρα, της οποίας καταλαμβάνει το 15% περίπου του αμπελώνα της), τη Ρόδο, την Κρήτη και τα Δωδεκάνησα και εν συνεχεία επεκτάθηκε στην Αττική, τη Βοιωτία, την Εύβοια, τη Θεσσαλία και τη Μακεδονία. Σήμερα έχει φτάσει να καλύπτει 30.000 στρέμματα. Ωριμάζει όψιμα, δηλαδή περί τα τέλη Σεπτεμβρίου με αρχές Οκτωβρίου. Όσον αφορά την καλλιέργειά της, η μαντηλαριά διαμορφώνεται είτε στο παραδοσιακό κύπελλο είτε στο γραμμωτό διπλής κατεύθυνσης. Οι παραδοσιακές καλλιέργειες και εκείνες των νησιών είναι κυρίως διαμορφωμένες σε παραδοσιακό κύπελλο, ενώ οι υπόλοιπες σε γραμμικό. Είναι ποικιλία ζωηρή και παραγωγική και κλαδεύεται ανάλογα με την περιοχή, τη διαμόρφωση και την ποιότητα της πρώτης ύλης που θέλουμε να πάρουμε. Συνήθως κλαδεύεται σε δύο μάτια για καλύτερο αποτέλεσμα. Επειδή είναι πολύ ζωηρή ποικιλία, έπειτα από έρευνες έχει βρεθεί ότι οι αποστάσεις φύτευσης μεταξύ των φυτών πρέπει να είναι μεγαλύτερες από 1,20 μέτρα. Η Μαντηλαριά είναι ευαίσθητη στον περονόσπορο, το βοτρυτή και τη φαιά σήψη, αλλά πολύ ανθεκτική στην ξηρασία και γι' αυτό καλλιεργείται με πολύ καλά αποτελέσματα στη νησιωτική χώρα. Αγαπάει τα ελαφρώς ξηρά εδάφη, το χαμηλό υψόμετρο και τις περιοχές με ζεστά καλοκαίρια. Πρόκειται για εξαιρετική μαύρη ποικιλία σχετικά χαμηλόβαθμη με πολλές χρωστικές (στους παραγόμενους οίνους δίνει έντονο και σταθερό χρώμα), η οποία δεν έχει εκτιμηθεί ανάλογα γιατί δεν έχει ερευνηθεί σε βάθος από αμπελουργική (χρήση κατάλληλου μικροκλίματος και καλλιεργητικών φροντίδων) και οινολογική άποψη. Τα κρασιά που παράγονται από τη μαντηλαριά είναι έντονου χρώματος, με αρώματα κόκκινων φρούτων, μέτριας αλκοόλης, πλούσια σε ταννίνες αλλά και με μέτρια προς χαμηλή οξύτητα. Γενικά, δίνει κρασιά που, λόγω της τονικότητας και του χρωματικού δυναμικού τους, ενδείκνυνται για παλαίωση αλλά κυρίως για τη χρησιμοποίησή τους σε χαρμάνια μαζί με άλλες ποικιλίες - για τη διόρθωση του χρώματός τους. (Βαχλιώτης, 2009)

Όταν το φύλλο αναπτυχθεί αρκετά χαρακτηρίζεται ως μεγάλο φύλλο, σχήματος σφηνοειδούς, πεντάκολπο – πεντάλοβο. Η άνω επιφάνεια είναι ελαφρά κυματώδης κι έχει σκούρο πράσινο χρώμα ενώ η κάτω επιφάνεια του φύλλου φέρει χνοώδη χνοασμό. Σε κάθε βλαστό φέρεται συνήθως 1 σταφυλή, που εμφανίζεται συνήθως από τον 3ο ή 4ο κόμβο. Είναι μεγάλη έως μετρίου μεγέθους, ακανόνιστου, κυλινδροκωνικού ή κωνικού σχήματος, πολύ πυκνόραγη. Φέρει μικρό αριθμό ραγών. Η ράγα είναι μέτρια προς μεγάλη, δισκοειδής. Το χρώμα του φλοιού είναι κυανομέλανο. Ο φλοιός είναι παχύς με άφθονη ανθηρότητα και άφθονες χρωστικές (μία από τις πιο βαθύχρωμες ποικιλίες του ελληνικού αμπελώνα. Η σάρκα δεν είναι χρωματισμένη, είναι αρκετά μαλακή και εύχυμη. Η αναλογίες φλοιού, γιγάρτων και σάρκας είναι 6.1, 4.1 και 89.8% αντίστοιχα. Συνήθως υπάρχουν 3 γίγαντα ανά ράγα, μέσου μεγέθους και βάρους (Νεοφύτου).

Παρατηρείται εκβλάστηση στο τρίτο δεκαήμερο Μαρτίου και άνθηση στο δεύτερο δεκαήμερο Μαΐου. Περκασμός παρατηρείται τέλη Ιουλίου με αρχές Αυγούστου και η τεχνολογική ωριμότητα φαίνεται από τις αρχές Σεπτεμβρίου έως και τις αρχές Οκτωβρίου, έτσι μπορεί να χαρακτηριστεί σχετικά όψιμη ποικιλία.

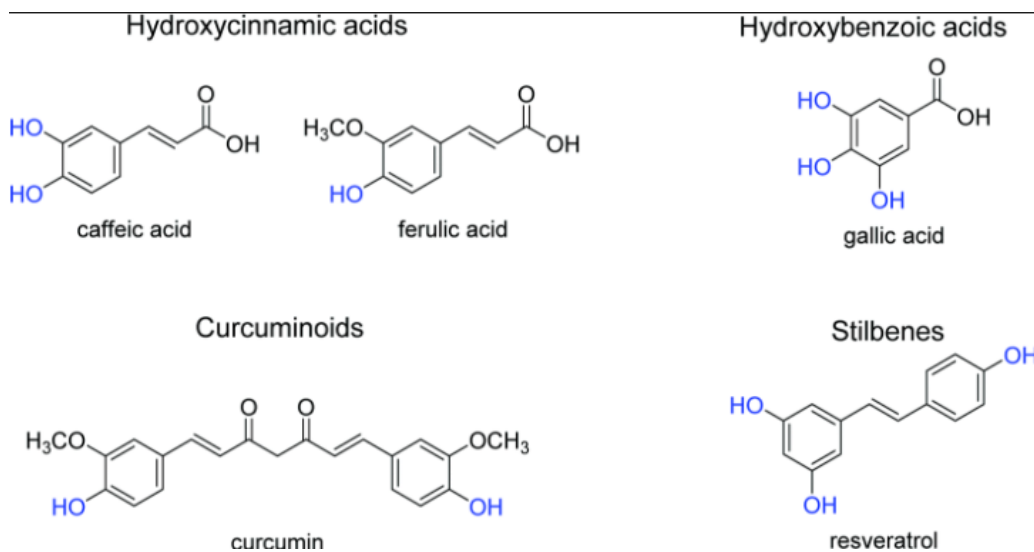
Φαινολικά συστατικά του σταφυλιού και του κρασιού

Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού προέρχονται κατά κύριο λόγο από το σταφύλι και πιο συγκεκριμένα από τα στερεά του μέρη, τον φλοιό και τα γίγαρτα. Έτσι βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα ερυθρά κρασιά, στα οποία εκχυλίζεται το μεγαλύτερο μέρος, ύστερα από την επαφή με τα στέμφυλα. Μικρότερες ποσότητες προσλαμβάνονται από το ξύλο των βαρελιών, ενώ σε πολύ μικρές ποσότητες φαινολικά παράγονται από τον μεταβολισμό των ζυμών και μπορούν να εκχυλιστούν από τον φελλό της φιάλης αν έρθει σε επαφή με το κρασί (Conde, 1998) (Jackson, 2008).



Εικόνα 8: Τα φλαβονοειδή του κρασιού

Τα κύρια φαινολικά του κρασιού μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες. Στα διφαινυλοπροπανοειδή γνωστά και ως φλαβονοειδή που περιλαμβάνουν τις φλαβονόλες, τις φλαβαν-3-όλες και τις ανθοκυάνες, και στα φαινυλοπροπανοειδή ή μη φλαβονοειδή που περιλαμβάνουν υδροξυ-βενζοϊκά και υδροξυ-κινναμικά οξέα (φαινολικά οξέα) (Minussi, 2003). Η δομή των φλαβονοειδών (διφαινυλοπροπανοειδών) περιλαμβάνει δύο φαινολικούς δακτυλίους (A και B) συνδεδεμένους με έναν κεντρικό δακτύλιο πυρανίου (C). Η δομή των μη φλαβονοειδών είναι πιο απλή σε σχέση με τα φλαβονοειδή καθώς αποτελούνται από μία C3-C6 κεντρική αλυσίδα συνδεδεμένη στο φαινολικό δακτύλιο.



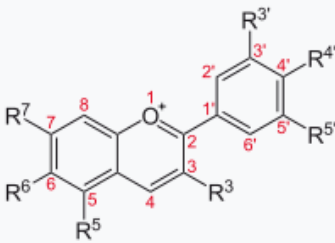
Εικόνα 9: Τα φαινυλοπροπανοειδή ή μη φλαβονοειδή συστατικά του κρασιού

Παρακάτω θα αναλυθούν τα φαινολικά συστατικά στα οποία δόθηκε βάση στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Ανθοκυανιδίνες και Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται σε όλο το φυτικό βασίλειο, και είναι συχνά υπεύθυνες για τα μπλε έως κόκκινα χρώματα που βρίσκονται στα λουλούδια, στα φρούτα και στα φύλλα. Στα κόκκινα σταφύλια αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια του σταδίου της αλλαγής του χρώματος του φλοιού των ραγών, το οποίο μεταβάλλεται από πράσινο σε σκούρες κόκκινες αποχρώσεις. Καθώς η συγκέντρωση των σακχάρων αυξάνεται στις ράγες του σταφυλιού, παράλληλα γίνεται αύξηση και στη συγκέντρωση των ανθοκυανινών. Εντοπίζονται κυρίως στον φλοιό των σταφυλιών, αφήνοντας το χυμό της σάρκας σχεδόν άχρωμο, σε περιορισμένες μόνο περιπτώσεις, κυρίως σε κάποιες ερυθρές ποικιλίες, οι ανθοκυάνες συναντώνται και στη σάρκα των σταφυλιών. Επομένως, για να επιτευχθεί χρωματισμός στο κρασί θα πρέπει κατά την ζύμωση να έρχονται σε επαφή οι φλοιοί των σταφυλιών με το γλεύκος, έτσι ώστε να εκχυλίζονται οι ανθοκυάνες από τα στέμφυλα (Robinson, 2006).

Οι ανθοκυάνες αποτελούν μία από τις πιο βασικές ομάδες φλαβονοειδών. Ο όρος ανθοκυάνες ή ανθοκυανίνες αναφέρεται σε γλυκοζυλιωμένες ανθοκυανιδίνες, οι οποίες είναι οι κόκκινες χρωστικές του κρασιού και απαντώνται σχεδόν πάντα στο κρασί γλυκοζυλιωμένες. Οι ανθοκυανιδίνες έχουν τη βασική δομή του φλαβυλίου, με σκελετό C6-C3-C6. Το μόριο τους αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτύλιους (A και B) και ενδιάμεσα παρεμβάλλεται ένας πυρυλικός δακτύλιος. Ο δακτύλιος A φέρει πάντα δύο φαινολικά υδροξύλια στις θέσεις -5 και -7 και ο δακτύλιος B ένα φαινολικό υδροξύλιο στη θέση -4' (Εικ. 10). Οι ανθοκυάνες είναι ετεροζίτες των ανθοκυανιδινών με αλδόζες, κυρίως γλυκόζη. Τα μόρια είναι πιο σταθερά στη γλυκοζυλιωμένη μορφή των ανθοκυανών σε σχέση με την αγλυκονική μορφή των ανθοκυανιδινών, γι' αυτό και απαντώνται κυρίως ως ανθοκυάνες στη φύση.

Basic structure	Anthocyanidin	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇
	Aurantidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
	Cyanidin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
	Delphinidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
	Europinidin	-OCH ₃	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-H	-OH
	Pelargonidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
	Malvidin	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
	Peonidin	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
	Petunidin	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
	Rosinidin	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH ₃

Εικόνα 10: Δομή του μορίου των ανθοκυανιδινών

Η κατάταξη των ανθοκυανών γίνεται με βάση τη θέση των υδροξυλίων και των μεθυλίων στο Β δακτύλιο των ανθοκυανιδινών. Από τις εννέα ανθοκυανιδίνες που είναι γνωστές και οι οποίες παρουσιάζονται στην Εικ. 10, οι πέντε (Κυανιδίνη, Πεονιδίνη, Δελφινιδίνη, Πετουινιδίνη και Μαλβιδίνη) αποτελούν δομικά στοιχεία των ανθοκυανών που βρίσκονται στο σταφύλι και το κρασί (Κουράκου-Δραγώνα, 1998) (Ribereau-Gayon, 2006).

Από τις ανθοκυανιδίνες των σταφυλιών η κυανιδίνη είναι αυτή που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία μετά τον περκασμό των σταφυλιών, με τη συγκέντρωσή της να αυξάνεται για περίπου δύο βδομάδες κατά την ωρίμανση. Επειδή όμως σε συνδυασμό με τη δελφινιδίνη αποτελούν τις πιο ασταθείς από τις προκυανιδίνες στη συνέχεια μετασχηματίζονται και τελικά επικρατεί σε συντριπτικό ποσοστό η μαλβιδίνη, η οποία αποτελεί τη βασική ανθοκυανιδίνη σχεδόν όλων των σταφυλιών και κρασιών. Σε ορισμένες ποικιλίες φτάνει να αντιπροσωπεύει το 90% των περιεχόμενων ανθοκυανών, όπως για παράδειγμα στην ποικιλία Grenache (Cheynier, 2006).

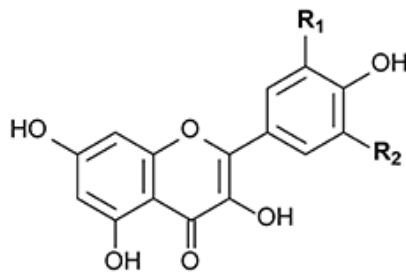
Η σύσταση και η συγκέντρωση σε ανθοκυανιδίνες ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία, την ωρίμανση των σταφυλιών, τις κλιματικές συνθήκες, την εντοπιότητα, τη στρεμματική απόδοση και τις συνθήκες καλλιέργειας. Παράλληλα εξαρτώνται και από τις συνθήκες εκχύλισης και οινοποίησης. Κατά την επαφή των στεμφύλων με το γλεύκος, πραγματοποιείται η εκχύλιση των ανθοκυανών και των λοιπών φαινολικών. Η εκχύλιση αυτή μπορεί να λάβει χώρα προζυμωτικά ή κατά την αλκοολική ζύμωση είτε με θρυμματισμένα σταφύλια (κλασσική οινοποίηση) είτε με ολόκληρα σταφύλια (carbonic maceration). Αφού φτάσει σε ένα μέγιστο, η συγκέντρωση των ανθοκυανών αρχίζει να μειώνεται σαν αποτέλεσμα της ρόφησης τους στα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών, της ιζηματοποίησης τους σε μορφή κolloειδών μαζί με τρυγικά άλατα καθώς και της διαδικασίας σταθεροποίησης και φιλτραρίσματος. Επιπλέον, αντιδράσεις υδρόλυσης καθώς και αντιδράσεις συμπύκνωσης με άλλα φαινολικά συστατικά κατά την οινοποίηση διαφοροποιούν την ανθοκυανική σύσταση (Μπιμπίλας, 2017).

Το ανθοκυανικό προφίλ του σταφυλιού, σε αντίθεση με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, μπορεί να αποτελέσει κριτήριο για τη χημειο-ταξινόμηση των ποικιλιών. Σχέσεις μεταξύ μεμονομένων ή και ολικής συγκέντρωσης των επιμέρους ανθοκυανιδινών έχουν προταθεί για τον χαρακτηρισμό

της ποικιλίας σταφυλιού από την οποία προέρχεται το κρασί. Οι σχέσεις αυτές έχουν να κάνουν με την ενζυμική δραστηριότητα των φλαβονοειδο-3-υδροξυλασών και Ο-δι-υδροξυφαινυλο-Ο-μεθυλοτρανσφερασών. Ένας άλλος τρόπος ταξινόμησης βασίζεται στην παρουσία και σχετική ποσοτικοποίηση ακετυλωμένων ανθοκυανών με αιθυλικό και ρ-κουμαρικό οξύ, που σχετίζονται με τη δραστηριότητα των αιθυλο- και κινναμικών τρανσφερασών. Η παραγωγή των παραπάνω ενζύμων καθορίζεται αυστηρά από την ποικιλία του σταφυλιού, αφού αποτελούν άμεση έκφραση του γονιδιώματος. Παρά τις μεταβολές στο ανθοκυανικό προφίλ κατά την οινοποίηση των κρασιών, το ανθοκυανικό προφίλ του κρασιού χρησιμοποιείται επίσης ως χημειο-ταξινομικό κριτήριο για τη διάκριση διαφορών μεταξύ ποικιλιών, εντοπιότητας, απόδοσης, χρονολογίας και οινοποιητικών τεχνικών (Monagas, 2009).

Φλαβόνες και φλαβονόλες

Οι φλαβόνες και φλαβονόλες ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Οι ουσίες αυτές περιέχουν την κίτρινη χρωστική - την κερκετίνη. Η συγκέντρωση των φλαβονολών στις ράγες των σταφυλιών αυξάνεται καθώς αυτές εκτίθενται στο ηλιακό φως. Ορισμένοι καλλιεργητές αμπελώνων χρησιμοποιούν την μέτρηση φλαβονολών, δηλαδή της κερκετίνης, ως ένδειξη της έκθεσης στον ήλιο ενός αμπελώνα και της αποτελεσματικότητας των τεχνικών διαχείρισης της σκιάς.



	R ₁	R ₂
Isorhamnetin	OCH ₃	H
Kaempferol	H	H
Myricetin	OH	OH
Quercetin	OH	H

Εικόνα 11: Οι φλαβονόλες του κρασιού

Οι φλαβόνες είναι μια υπο-κατηγορία των πολυ-υδροξυ-φλαβονοειδών που βασίζονται στη δομή της 2-φαινυλο-χρωμόνης (2-3 διπλός δεσμός). Οι φλαβονόλες είναι φλαβόνες με έναν 3-υδροξυ-υποκαταστάτη. Αποτελούν κίτρινες χρωστικές, οι οποίες στο σταφύλι εντοπίζονται στο φλοιό είτε ως 3-γλυκοζίτες και 3-γλυκουρονίδια των μορίων της κερκετίνης, της καιμπφερόλης, και της μυρισετίνης, είτε και υδρολυμένα στις αντίστοιχες αγλυκόνες (Εικ. 11). Και οι 3 παραπάνω φλαβονόλες έχουν εντοπιστεί στα ερυθρά κρασιά ενώ στα λευκά έχουν ανιχνευτεί μόνο η κερκετίνη και η καιμπφερόλη. Επιπλέον τα τελευταία χρόνια σε κόκκινα κρασιά έχουν ανιχνευτεί 3 επιπλέον φλαβονόλες: η ισοραμνετίνη (5' μεθόξυ), η λαρικιτρίνη (3' υδροξυ, 5' μεθόξυ) και η συριγκετίνη (3', 5' διμεθόξυ). Στο κρασί οι φλαβονόλες παίρνουν μέρος στη δημιουργία έγχρωμων συμπλόκων ("copigments") με τις ανθοκυάνες. Η βασική λειτουργία τους είναι να

προστατεύουν τη σάρκα από τη UV ακτινοβολία όπως έχει προαναφερθεί. (Cheynier, 2006) (Ribereau-Gayon, 2006).

Μεταξύ των флаβονοειδών του κρασιού, οι флаβονόλες βρίσκονται στη μικρότερη συγκέντρωση, σε ποσοστό που ποικίλει από 1-10% του συνολικού φαινολικού περιεχομένου και εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας. Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους είναι της τάξης των 100 mg/L στα ερυθρά και 1-3 mg/L στα λευκά απουσία εκχύλισης (Jackson, 2008).

Φαινολικά οξέα

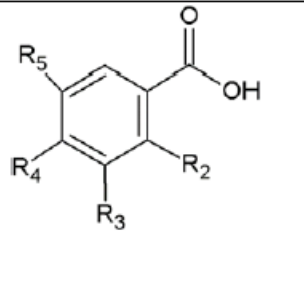
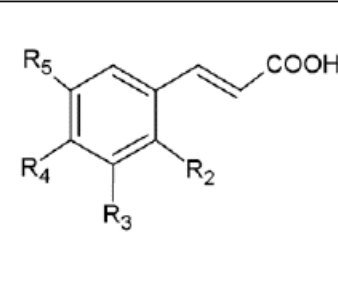
Στα μη флаβονοειδή του κρασιού που δεν έχει παλαιωθεί περιλαμβάνονται κυρίως τα φαινολικά οξέα και τα παραγωγά τους - και πιο συγκεκριμένα τα υδροξυ-κινναμικά και υδροξυ-βενζοϊκά οξέα - καθώς και οι πτητικές φαινόλες και τα στυλβένια. Βρίσκονται κυρίως στα χυμοτόπια των κутτάρων του φλοιού και της σάρκας και εκχυλίζονται εύκολα κατά τη θραύση των σταφυλιών. Βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 100-200 mg/L στα ερυθρά κρασιά και 10-20 mg/L στα λευκά.

Με τον όρο φαινολικά οξέα του κρασιού, αναφερόμαστε τόσο σε βενζοϊκά (π.χ. γαλλικό οξύ) όσο και σε (υδροξυ)κινναμικά οξέα αλλά και στους τρυγικούς εστέρες αυτών που απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο κρασί. Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα σε καθαρό αλκοολικό διάλυμα αλλά μπορεί να αποκτήσουν κίτρινη απόχρωση αν οξειδωθούν. Από οργανοληπτικής πλευράς, δεν έχουν συγκεκριμένα γευστικά ή αρωματικά χαρακτηριστικά αλλά ορισμένα από τα παράγωγα τους κατά το μεταβολισμό των ζυμών αποτελούν πτητικά φαινολικά συστατικά που επηρεάζουν τον αρωματικό χαρακτήρα του κρασιού (Jackson, 2008) (Rentzsch, 2009).

Τα κυριότερα από τα (υδροξυ)κινναμικά οξέα και η αντίστοιχη μορφή τους ως τρυγικοί εστέρες αυτών είναι τα εξής:

- το ρ-κουμαρικό (4-υδροξυ υποκατάσταση του φαινολικού δακτυλίου), και ο αντίστοιχος τρυγικός εστέρας είναι το κουταρικό οξύ
- το καφεϊκό (3, 4-διυδροξυ υποκατάσταση ή κατεχολική υποκατάσταση), και ο αντίστοιχος τρυγικός εστέρας είναι το καφταρικό οξύ
- το φερουλικό οξύ (3-μεθόξυ, 4-υδροξυ υποκατάσταση ή γουαϊακολική υποκατάσταση), και ο αντίστοιχος τρυγικός εστέρας είναι το φερταρικό οξύ

Τα κυριότερα από τα βενζοϊκά και τα (υδροξυ)κινναμικά οξέα φαίνονται και στον παρακάτω πίνακα:

Βενζοϊκά οξέα	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Κινναμωμικά οξέα
					
ρ-υδροξυβενζοϊκό οξύ	H	H	OH	H	ρ-κουμαρικό οξύ
πρωτοκατεχικό οξύ	H	OH	OH	H	καφεϊκό οξύ
βανιλλικό οξύ	H	OCH ₃	OH	H	φερουλικό οξύ
γαλλικό οξύ	H	OH	OH	OH	
συριγγικό οξύ	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	σιναπικό οξύ
σαλικυλικό οξύ	OH	H	H	H	
γεντισικό οξύ	OH	H	H	OH	

Εικόνα 12: Τα βενζοϊκά και κινναμικά οξέα του κρασιού

Ταννίνες

Οι ταννίνες αποτελούν μια κατηγορία φυσικών φαινολικών συστατικών υψηλού μοριακού βάρους, για τις οποίες δεν υπάρχει ένας αυστηρός ορισμός, και που αποτελούνται τόσο από φλαβονοειδή όσο και από μη φλαβονοειδή μονομερή. Οι ταννίνες χωρίζονται σε συμπυκνωμένες και σε υδρολύσιμες, ομαδοποίηση που αφορά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν, αλλά σε καμία περίπτωση στη χημική δομή, προέλευση, εξέλιξη, κλπ. Μία επί πλέον ομάδα είναι οι μικτές ή πολύπλοκες ταννίνες που προέρχονται από συνένωση μορίων των δύο παραπάνω ομάδων. Η κοινή ιδιότητα των ταννινών είναι η ικανότητα τους να ενώνονται με πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή όπως οι πολυσακχαρίτες. Η ένωση αυτή πραγματοποιείται είτε με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είτε μέσω δεσμών υδρογόνου. Σε ορισμένες περιπτώσεις δημιουργούνται και ιοντικοί ή ομοιοπολικοί δεσμοί (Κουράκου–Δραγώνα, 1998).

Αρωματικές ενώσεις του κρασιού

Το άρωμα του οίνου αποτελείται από ένα σύνολο συστατικών οι οποίες είτε προέρχονται από τα σταφύλια, είτε παράγονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ή σχηματίζονται μετά το τέλος της ζύμωσης, ενζυμικά ή χημικά. Προέρχεται δηλαδή, είτε από τα χαρακτηριστικά της ποικιλίας που οινοποιήθηκε (πρωτογενές άρωμα), ή εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης των σακχάρων του γλεύκους (δευτερογενές άρωμα) και τελικά ολοκληρώνεται στο στάδιο της συντήρησης ή παλαίωσης του κρασιού (τριτογενές άρωμα).

Τα πτητικά που έχουν ανιχνευτεί στο κρασί, αριθμούν σε μόρια περισσότερα από 800. Παρότι τα συστατικά αυτά έχουν ταυτοποιηθεί, η ακριβής συνεισφορά τους στο τελικό άρωμα του οίνου έχει μελετηθεί μόνο για ορισμένα από αυτά, (Belitz D., 2006). Το κρασί 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 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 επιτευχθεί ένα εκχύλισμα που θα περιέχει όλα τα πτητικά, είναι ζήτημα που απαιτεί μεγάλη έρευνα. Υπάρχει γενική ομοφωνία ότι η καλλιέργεια των σταφυλιών αλλά και το έδαφος έχουν κύρια επίδραση στον τύπο του αρώματος και στην ποιότητα του οίνου. Το ίδιο ισχύει και με τα διαφορετικά στελέχη της ζύμης. Τα κύτταρα των ζυμών παράγουν πτητικές ουσίες καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης τους. Οι ουσίες απελευθερώνονται από μη πτητικές πρόδρομες ενώσεις των σταφυλιών τις οποίες οι ζύμες μπορούν να μεταβολίσουν, τέτοιες ουσίες είναι οι θειο-ενώσεις ή οι βινυλοφαινόλες. Ανάμεσα σε αυτές που αναφέρονται πολύ συχνά συναντώνται και η 3-μεθυλοβουτανόλη και ο οξικός εστέρας της, καθώς και οι αιθυλεστέρες του οξικού, εξανοϊκού και οκτανοϊκού οξέος. 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 κράμα αρωμάτων που αλληλοεπιδρούν 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 (Miriam Ortega-Heras, 2010):

- 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 με λεπτό άρωμα, κομψό, κοινό, ελαττωματικό κ.λπ. Η περιεκτικότητά ενός οίνου σε πτητικά συστατικά είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για την ποιότητα και τις οργανοληπτικές του ιδιότητες. Οι περισσότερες έρευνες που διεξάγονται στην ανάλυση του αρώματος του κρασιού εστιάζουν, είτε στην ανάλυση των πτητικών, είτε στην ταυτοποίηση συστατικών (υπεύθυνων για πολύ εξειδικευμένες οσμές-γεύσεις). Η πολυπλοκότητα της χημικής σύνθεσης των πτητικών

κλασμάτων, σε συνδυασμό με το εύρος της συγκέντρωσης, με την οποία συμμετέχουν στον οίνο (συνήθως από 1 mg/L έως και ορισμένα g/L), κάνουν την ποιοτική καθώς και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών αυτών μια εξαιρετικά πολύπλοκη και απαιτητική εργασία. 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 (ΠΑΛΗΟΓΙΑΝΝΗ, 2007). Αναλυτικότερα θα δούμε τις αρωματικές ενώσεις παρακάτω.

- **Αλκοόλες**
Οι αλκοόλες ανιχνεύονται σε οίνους σε σημαντικές ποσότητες- αποτελούν περίπου το 50 % των αρωματικών ενώσεων, μη συμπεριλαμβανομένης της αιθανόλης- αλλά αντίθετα με τους εστέρες συνεισφέρουν αρνητικά στο άρωμα και στη γεύση των οίνων (Jackson, 2008). Οι περισσότεροι βέβαια 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.
- **Εστέρες.**
Οι εστέρες αποτελούν αριθμητικά το μεγαλύτερο μέρος των αρωματικών ενώσεων και παράγονται από τους σακχαρομύκητες. Οι αιθυλεστέρες 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 σημαντικοί διότι προσδίδουν οσμές φρούτων και λουλουδιών παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται συχνά για να περιγράψουν τους οίνους.
- **Λιπαρά 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 όριο ανίχνευσης 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 σάπωνα, καθώς αυξάνει το μοριακό βάρος.
- **Καρβονυλικές ενώσεις**
Ένας μεγάλος αριθμός καρβονυλικών ενώσεων έχει ανιχνευθεί στους οίνους. Εκτός από μερικές εξαιρέσεις, όπως η ακεταλδεΐδη και η ακετοΐνη (3-υδροξυ-βουταν-2-όνη), οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις απαντούν σε ίχνη.
- **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 στο υδροξυ-οξύ και προέρχονται από το μεταβολισμό των ζυμών και από το ξύλο δρυός των βαρελιών.

- **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.
- **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 όριο ανίχνευσής τους είναι πολύ χαμηλό) και από το γεγονός ότι έχουν εξαιρετικά ευδιάκριτο άρωμα.
- **Θειούχες ενώσεις**
Οι θειούχες ενώσεις που ανευρίσκονται στους οίνους ταξινομούνται σε πέντε κατηγορίες, σύμφωνα με τη χημική τους δομή: θειόλες, μερκαπτάνες, θειοεστέρες, σουλφίδια, και ετεροκυκλικές ενώσεις. 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.
- **Πτητικές αζωτούχες ενώσεις**
Οι πτητικές αζωτούχες ενώσεις που έχουν βρεθεί σε οίνους ταξινομούνται σε αμίνες, ακεταμίδια και ετεροκυκλικές ενώσεις. Οι αμίνες που ανευρίσκονται στα γλεύκη ή σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης είναι αδύνατον να συνεισφέρουν στο άρωμα των οίνων, διότι στο σύνθετο pH των οίνων, βρίσκονται υπό τη μορφή άλατος.
- **Υδρογονάνθρακες και παράγωγα**
Εκτός από τα αλειφατικά κανονικά αλκάνια και αλκένια που αποτελούν συστατικά των κηρών της επιφάνειας των σταφυλιών, έχουν ανιχνευθεί και μερικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, όπως το τολουόλιο, το ξυλόλιο και αλκυλο-βενζόλια. Ωστόσο, αυτές οι ενώσεις θεωρούνται ασήμαντες για το άρωμα των οίνων, επειδή η διαλυτότητά τους στο νερό είναι πολύ μικρή και δεν εκχυλίζονται σε σημαντικό ποσοστό στο γλεύκος. Επίσης, καθιζάνουν πολύ εύκολα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.
- **Τερπένια**
Τα τερπένια αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ενώσεων, διότι καθορίζουν τον αρωματικό χαρακτήρα ορισμένων ποικιλιών. Σε αντίθεση με τις περισσότερες ενώσεις που ανιχνεύονται στους οίνους, τα τερπένια προέρχονται από τα σταφύλια. Συναντώνται υπό τη μορφή των μονοτερπενοειδών αλκοολών ή των οξειδίων τους, ενώσεις οι οποίες είναι πτητικές και συνεισφέρουν στο άρωμα των οίνων. Ένα σημαντικό επίσης ποσοστό τερπενίων, υπάρχει υπό τη μορφή συμπλέγματος με γλυκοσίδες ή ως διόλες ή τριόλες. Οι δομές αυτές όμως δεν είναι πτητικές, οπότε δεν συνεισφέρουν στο άρωμα. Ωστόσο, είναι δυνατόν με ενζυμική υδρόλυση αυτών των συστατικών, να απελευθερωθούν τερπένια και με αυτόν τον τρόπο να ενισχυθεί το άρωμα πολλών οίνων.

Πειραματικό μέρος

Πειραματικός σχεδιασμός

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των ποικιλιών σταφυλιού που χρησιμοποιούνται στον Πράμνιο οίνο Ικαρίας, και ιδιαίτερα των φαινολικών συστατικών που είναι υπεύθυνα για το χρώμα και τη στιφάδα του κρασιού. Για το λόγο αυτό έγινε τόσο ποσοτική όσο και ποιοτική ανάλυση των φαινολικών συστατικών των τριών ποικιλιών ώστε να βρεθούν οι ιδιαιτερότητες της κάθε ποικιλίας αμπέλου. Ποσοτικά προσδιορίστηκαν οι τρυγικοί εστέρες και οι ταννίνες ενώ στις φλαβονόλες και στις ανθοκυάνες (υπεύθυνες για το χρώμα) εκτός από τον ποσοτικό τους προσδιορισμό έγινε και ταυτοποίηση αυτών μέσω της ανάλυσης HPLC και της αντίστοιχης βιβλιογραφίας. Έτσι μέσω αναλύσεων των φλοίων, της σάρκας και των γιγάρτων προσδιορίστηκαν τα διάφορα φαινολικά συστατικά των διαφόρων μερών των σταφυλιών των τριών ποικιλιών. Επιπλέον στόχος ήταν να μελετηθεί η εκχύλιση τόσο των διαφόρων ανθοκυανών όσο και άλλων φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο παραμονής των στεμφύλων στεμφύλων στο γλεύκος, καθώς και οι μεταβολές τους στη συνέχεια της ζύμωσης και στην αποθήκευση του φρέσκου κρασιού. Επομένως έγιναν δειγματοληψίες (μία ανά ημέρα) κατά τη διάρκεια των τεσσάρων ημερών που παραμένουν τα στέμφυλα στο γλεύκος για την εκχύλιση των φαινολικών, και προσδιορισμός των ολικών και των επί μέρους φαινολικών ομάδων ή συστατικών. Μετά την αφαίρεση των στεμφύλων έγιναν επίσης δειγματοληψίες και ανάλυση των δειγμάτων του ζυμούμενου μούστου και του φρέσκου κρασιού για την παρακολούθηση των μεταβολών των συγκεντρώσεων των προαναφερθέντων συστατικών σε βάθος χρόνου 120 ημερών.

Επί πλέον στόχος της διπλωματικής ήταν να συγκριθεί η ζύμωση με τις γηγενείς ζύμες (που πραγματοποιείται στο οινοποιείο) με ζύμωση με εξωγενείς ζύμες. Για την επίτευξη αυτού του στόχου πραγματοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές ζυμώσεις από τον κοινό μούστο αυτών των τριών ποικιλιών, που παραλήφθηκε από το οινοποιείο Καρίμαλη, με τις ίδιες εργαστηριακές συνθήκες. Σε μία από αυτές διατηρήθηκαν οι γηγενείς ζύμες των ποικιλιών και στις άλλες τρεις έγινε εμβολιασμός με επιλεγμένες ζύμες αφού αδρανοποιήθηκαν οι ήδη υπάρχουσες γηγενείς. Οι επιλεγμένες ζύμες ήταν η *T. delbrueckii* και η *M. Pulcherrima* στις οποίες κινήθηκε περισσότερο το ενδιαφέρον, και ο *S. Cerevisiae* χρησιμοποιήθηκε ως τρίτη επιλεγμένη ζύμη καθώς η πορεία της ζύμωσης του είναι αρκετά μελετημένη και γνωστή. Έγιναν αναλύσεις πριν και μετά την ζύμωση αυτών ώστε μέσω των αποτελεσμάτων να ληφθούν πορίσματα για την δράση των επιλεγμένων ζυμών συγκριτικά με την δράση των γηγενών, τόσο στην παραγόμενη αλκοόλη και στα καταναλωθέντα σάκχαρα συγκριτικά με τις ημέρες ζύμωσης όσο και στο διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο το οποίο μέσω τις περιεκτικότητας του φανερώνει την δράση των ζυμών. Με αναλύσεις στο pH, την πυκνότητα και την ολική οξύτητα έγινε προσπάθεια για εύρεση περισσότερων πληροφοριών και σύγκριση μεταξύ των ζυμώσεων. Επιπρόσθετα έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών και ποιοτικός προσδιορισμός με ταυτοποίηση των ανθοκυανών στα τελικά κρασιά. Τέλος έγινε ανάλυση των αρωματικών ενώσεων που προέκυψαν στα κρασιά των διαφόρων ζυμών και ταξινόμηση αυτών σε χαρακτηριστικές ομάδες για προσδιορισμό των αρωμάτων που προέρχονται από το σύνολο των ουσιών της κάθε ομάδας

ουσιών. Επίσης έγινε και βιβλιογραφική μελέτη των διαφόρων αρωματικών ενώσεων που βρέθηκαν, για την εύρεση των αρωμάτων που προσφέρουν στο κρασί καθώς και για το που συναντώνται στη φύση. Στόχος ήταν η μελέτη των διαφορετικών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν μεταξύ των ζυμώσεως και ενδιαφέρον παρουσίασε και η ταυτοποίηση των αρωματικών ουσιών της ανάλυσης GC-MS με την οργανοληπτική δοκιμή που έγινε από ειδικό γευσισγνώστη στα τέσσερα κρασιά που παράχθηκαν εργαστηριακά.

Δείγματα σταφυλιών και μούστου

Όλα τα δείγματα δόθηκαν από το οινοποιείο του Γεωργίου Καρίμαλη, από την Πηγή Ευδήλου Ικαρίας. Τα δείγματα των σταφυλιών των ποικιλιών Φωκιανό, Ρετενό και Κούντουρο παραλήφθηκαν κατά την διάρκεια του τρύγου στις 15/09/2017. Ο φλοιός αφαιρέθηκε χειρωνακτικά και παραλήφθηκαν δύο δείγματα των 50 g από την κάθε ποικιλία, και η εναπομένουσα σάρκα, η οποία περιλαμβάνει και τα γίγαρτα, παραλήφθηκε σε δείγματα των 100 g εις διπλούν από την κάθε ποικιλία. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυσή τους.

Η οινοποίηση που ακολουθεί το οινοποιείο Καρίμαλη είναι συνοπτικά η ακόλουθη: συλλογή σταφυλιών-τρύγος σε ώριμα σταφύλια, εκκραγισμός-αποβοστύχωση, παραμονή του μούστου με τα στέμφυλα τέσσερις ημέρες, ο διαχωρισμός τους, τοποθέτηση των στεμφύλων στο πιεστήριο για παραλαβή οίνου πίεσης, μεταφορά σε δεξαμενή ζύμωσης και απολάσπωση την 3η ημέρα, ζύμωση σε θερμοκρασία δωματίου 21-22 °C, μεταφορά στην τελική δεξαμενή ζύμωσης όπου κλείνεται με υδραυλική έξοδο η απαγωγή των αερίων ζύμωσης (ώστε να μένει στη δεξαμενή μία ελαφρά πίεση κατά την ζύμωση), θείωση, παραμονή για 1 χρόνο πάνω στις οινοζύμες για παλαίωση, μεταφορά για 6-10 μήνες σε άλλη δεξαμενή περαιτέρω παλαίωσης, τελική καθίζηση και φυσική διαύγαση, και εμφιάλωση. Η παραλαβή των δειγμάτων μούστου έγινε κατά την διάρκεια παραμονής των στεμφύλων στη δεξαμενή. Γινόταν παραλαβή ενός δείγματος των 250 mL ανά 24 ώρες. Επομένως για συνολικό χρόνο παραμονής των στεμφύλων τις τέσσερις ημέρες παραλήφθηκαν συνολικά 4 δείγματα. Πρώτο δείγμα στις 15/09/2017, δεύτερο δείγμα στις 16/09/2017 και τρίτο δείγμα στις 17/09/2017. Επιπλέον την ημέρα αφαίρεσης των στεμφύλων δηλαδή στις 18/09/2017 κρατήθηκε δείγμα γλεύκους 250 mL λίγο πριν την αφαίρεση αυτών. Επιπροσθέτως παραλήφθηκαν δείγματα από το ζυμωμένο γλεύκος μετά από μία εβδομάδα 22/09/2017, μετά από δύο μήνες 28/10/2017 και μετά από τέσσερις μήνες 01/01/2018. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυση τους.

Επιπλέον αποθηκεύτηκαν πέντε λίτρα μούστου στην κατάψυξη στις 19/09/2017 τα οποία λήφθηκαν από την δεξαμενή ζυμώσεων η οποία ήταν πληρωμένη με γλεύκος του οποίου είχαν αφαιρεθεί τα στέμφυλα.

Αντιδραστήρια και Όργανα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- εργαστηριακό Blender Waring Commercial
- φυγόκεντρος Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge
- περιστροφικός εξατμιστήρας κενού Heidolph Hei-VAP Value Digital Rotary Evaporators με ενσωματωμένο υδρόλουτρο
- λουτρό υπερήχων Sonication: Elma, S30H Elmasonic
- HPLC (HP 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, California)
- αέριος χρωματογράφος συνδεδεμένος με φασματόμετρο μάζας (Hewlett-Packard 6890 Agilent Technologies 5975C VL MSD)
- ARE Heating Magnetic Stirrer VELP. SCIENTIFICA
- Αλκοολόμετρο 174000 Alcoholmeter 10-20 Class II in 1/10 DS laboratories DUJARDIN-SALLERON
- Πεχάμετρο pHmeter Amel Instruments 338
- Φασματοφωτόμετρο U-2900 UV/VIS Spectrophotometer 200V Hitachi High Technologies Corporation Tokyo Japan
- φούρνος (Binder, Germany)
- αναλυτικός ζυγός (precisa, XT220A, UK)

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- αιθανόλη (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- γαλλικό οξύ (98% w/w, Aros Organics, Fair Lawn, New Jersey)
- αντιδραστήριο Folin (Merck, Darmstadt, Germany)
- ανθρακικό νάτριο (Mallinckrodt, St. Louis, Missouri)
- νερό και ακετονιτρίλιο ποιότητας HPLC και βαθμού MS από την εταιρία Firsher Chemical (Leicestershire, UK)
- ελεύθερη ρίζα 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- *Saccharomyces cerevisiae* (Safale US-05)
- *Torulaspora delbrueckii* (BIODIVA TD 291)
- *Metschnikowia pulcherrima* (FLAVIA MP 346)
- n-Πεντάνιο (n-Pentane) CARLO ERBA
- Διαιθυλαιθέρας (Diethylether) >99.5% FERAK
- Θεικό νάτριο (Sodium Sulfate, anh. a.r.) Chem-Lab NV
- Φορμικό Οξύ 98-100%, Merck
- Εξάνιο Analytical reagent grade, Fisher Scientific
- Αλβουμίνη από ορό αβγού (Bovine Serum Albumin, BSA) Biochemica, fraction V_≥96%(GE), Fluka Analytical, Sigma
- Καυστικό Νάτριο 0.1mol/l, Panreac
- Μπλε της Βρομοθυμόλης Riedel-de Häen

Πειραματική διαδικασία – Αναλυτικές μέθοδοι

Εκχύλιση Φαινολικών Συστατικών των Διαφόρων Μερών του Σταφυλιού

Για να είναι εφικτή η ανάλυση των φαινολικών συστατικών κάθε μέρους της ράγας κρίθηκε απαραίτητη η εκχύλιση τους ξεχωριστά (για κάθε μέρος της ράγας) όπως φαίνεται παρακάτω.

- Εκχύλιση φαινολικών συστατικών του φλοιού

Μετά την απόψυξη των φλοιών (50 g), ζυγίζεται δείγμα 5 g. Για την εκχύλιση χρησιμοποιείται οξινισμένη μεθανόλη με 1% φορμικό οξύ, καθώς η μεθανόλη αποτελεί πολύ καλό διαλύτη των



Εικόνα 13: Η φυγόκεντρος και το Blender.

φαινολικών συστατικών (Karasakalidis P.G, 2006), η δε οξίνιση παρεμποδίζει τις οξειδώσεις των ανθοκυανών. Όσον αφορά στη χρήση φορμικού, προτιμάται σε σχέση με ισχυρά οξέα όπως το υδροχλωρικό καθώς δεν επιτρέπει τη μετατροπή των τρυγικών αλάτων σε ελεύθερο τρυγικό οξύ, το οποίο είναι διαλυτό στη μεθανόλη και θα συνεχυλιζόταν (Downey M.O, 2007). Το δείγμα τοποθετείται στο εργαστηριακό Blender (Waring Commercial) (Εικ. 13) μαζί με 25 mL MeOH 1% HCOOH, για 1.5 λεπτό στην επιλογή HI (High) για διάσπαση των ινών του φλοιού, και επομένως καλύτερη εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Μετά την διάσπαση το δείγμα αποχύνεται σε σωλήνα φυγόκεντρος και αφού ξεπλυθεί το δοχείο του Blender με άλλα 25 mL οξινισμένης μεθανόλης, τα συνολικά 50 mL φυγόκεντρούνται (φυγόκεντρος Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge) (Εικ. 13) στα 10.000 rpm για 10 min. Μετά την φυγόκέντρηση γίνεται απόχυση του εκχυλίσματος σε σφαιρική φιάλη των 500 mL. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται εις τριπλούν, δηλαδή στον ίδιο σωλήνα φυγόκεντρος από τον οποίο αφαιρέθηκε το εκχύλισμα και έμεινε το ίζημα προστίθονται άλλα 50 mL οξινισμένης μεθανόλης και ξαναγίνεται φυγόκέντρηση.



Εικόνα 14: Οι σφαιρικές φιάλες με το εκχύλισμα φλοιών και ο Περιστροφικός

Οι αναμεμιγμένες οργανικές φάσεις στη σφαιρική φιάλη των 500 mL συμπυκνώνονται μέχρι όγκου περίπου 70 mL με την χρήση του περιστροφικού εξατμιστήρα κενού (Heidolph Hei-VAP Value Digital Rotary Evaporators με ενσωματωμένο υδρόλουτρο) (Εικ.14). Το συμπύκνωμα μεταφέρεται με διήθηση σε ογκομετρική φιάλη 100 mL και πληρώνεται μέχρι τη χαραγή με διάλυμα οξινομένης μεθανόλης. Τα δείγματα φυλάσσονται σε κατάψυξη (-18 °C) μέχρι την περαιτέρω ανάλυση τους.

- Εκχύλιση φαινολικών συστατικών της σάρκας

Πριν ξεπαγώσει το δείγμα της σάρκας που προορίζεται για ανάλυση, ζυγίζονται 40 g σάρκας και από αυτά αφαιρούνται μηχανικά τα γίγαρτα με την χρήση τσιμπίδας και κοφτερής λεπίδας. Με την λεπίδα κόβονται οι ξεφλουδισμένες ράγες στη μέση και με την τσιμπίδα αφαιρούνται τα γίγαρτα. Στη συνέχεια ζυγίζονται τα γίγαρτα που αφαιρέθηκαν από τα 40 g σάρκας και τοποθετείται η καθαρή πλέον από γίγαρτα σάρκα στο Blender για 1.5 min στην επιλογή Hi (High). Ο χυμός σάρκας σταφυλιού που προκύπτει τοποθετείται σε σωλήνα φυγοκέντρου και φυγοκεντρείται στα 10.000 rpm για 10 min. Στη συνέχεια παραλαμβάνεται το υγρό και με διήθηση ογκομετρείται (προκύπτει 25 mL) και φυλάσσεται σε κατάψυξη (-18 °C) μέχρι την περαιτέρω ανάλυση τους.

- Απομάκρυνση λιπιδίων και εκχύλιση ταννινών από τα γίγαρτα

Η ύπαρξη των λιπιδίων των γιγάρτων είναι ανεπιθύμητη, καθώς το γιγαρτέλαιο μπορεί να παρεμποδίσει την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών έτσι κρίθηκε απαραίτητη η απομάκρυνση αυτών των λιπιδίων. Σύμφωνα με την μέθοδο, τα γίγαρτα κονιοποιούνται σε γουδί, ζυγίζεται 1 g δείγματος μέσα σε λεπτό σωλήνα φυγοκέντρου και προστίθενται 5 mL εξανίου. Το δείγμα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων (Sonication: Elma, S30H Elmasonic) για ταχύτερη και αποτελεσματικότερη απολίπανση. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται εις τριπλούν και

η απόχυση του διαλύματος λιπιδίων γίνεται σε προζυγισμένο γυάλινο vial των 20 mL. Το vial αφήνεται σε απαγωγό για φυσική εξάτμιση του εξανίου και ζύγιση του εναπομείναντος ελαίου. Στο σωλήνα με το στερεό υπόλειμμα των γιγάρτων προστίθενται 10 mL οξινισμένης μεθανόλης και τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων για 10 min. Στη συνέχεια τοποθετείται στη φυγόκεντρο στα 5.000 rpm για 5 min. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για τέσσερις φορές ενώ τα εκχυλίσματα αποχύνονται σε σφαιρική φιάλη των 100 mL, στην οποία έχει σημειωθεί η στάθμη των 15 mL από πριν. Στη συνέχεια γίνεται συμπύκνωση των εκχυλισμάτων μέχρι όγκου περίπου 15 mL με την χρήση του περιστροφικού εξατμιστήρα κενού. Το συμπύκνωμα μεταφέρεται με διήθηση σε ογκομετρική φιάλη 25 mL και πληρώνεται μέχρι τη χαραγή με διάλυμα οξινισμένης μεθανόλης. Τα δείγματα φυλάσσονται σε κατάψυξη (-18 °C) μέχρι την περαιτέρω ανάλυση τους.

Καταβύθιση των ταννινών με την μέθοδο BSA (Bovine serum albumin)

Μετά την απολίπανση και την εκχύλιση των ταννινών από τα γίγαρτα γίνεται η καταβύθιση των ταννινών. Η αλβουμίνη είναι μια πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται στην οινοποιία για την καταβύθιση των ταννινών (SMITH, 2005). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίζεται στην προτεινόμενη μέθοδο του Bulter (Butler, 1981) (James F. Harbertson, 2003).

Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,2 M με pH=4,9 με συγκέντρωση BSA 30 g/L, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του εκχυλίσματος σε ταννίνες. Αναμειγνύονται 10 mL εκχυλίσματος με 15 mL του διαλύματος BSA σε σωλήνα φυγοκέντρου. Μετά την παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο υγρό παραλαμβάνεται και φυλάσσεται σε κατάψυξη (-18 °C) μέχρι την περαιτέρω ανάλυση του. Επισημαίνεται ότι τόσο η περιεκτικότητα του διαλύματος BSA όσο και ο χρησιμοποιούμενος όγκος του επελέγησαν ώστε η πρωτεΐνη να έχει τουλάχιστον το διπλάσιο βάρος σε σχέση με τις αναμενόμενες προς απομάκρυνση ταννίνες (Lan Ping, 2011) (Antonia Llobera, 2007). Η παραπάνω αναλογία εξασφαλίζει σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία τη βέλτιστη απομάκρυνση των ταννινών (María C. Claudy, 2004).

Προσδιορισμός ξηρού βάρους φλοιών, σάρκας και εκχυλισμάτων αυτών

Τα εκχυλίσματα αποτελούνται από τον διαλύτη και τις στερεές ουσίες που αυτός έχει παραλάβει κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους των εκχυλισμάτων απαιτείται η μάζα των στερεών που ανέκτησε ο διαλύτης. Αρχικά τοποθετούνται 50 mL εκχυλίσματος σε σφαιρική φιάλη των 100 mL, και τοποθετούνται στον περιστροφικό εξατμιστήρα κενού στους 35°C και στα 150 rpm για την συμπύκνωσή τους μέχρι αυξημένου ιξώδους υγρού. Στη συνέχεια η σφαιρική αυτή φιάλη με το αυξημένου ιξώδους υγρό τοποθετείται στον φούρνο για 24 ώρες στους 100°C. Στη συνέχεια ζυγίζεται και προσδιορίζεται το ξηρό βάρος μέσω της διαφοράς αυτής της ζύγισης και της ζύγισης της ίδιας σφαιρικής φιάλης πριν τοποθετηθεί μέσα το δείγμα.

Για το ξηρό βάρος των φλοιών και σαρκών παραλαμβάνεται δείγμα 1g και 5 g αντίστοιχα σε προζυγισμένα φιαλίδια. Τα φιαλίδια αφήνονται να ξηραθούν στον φούρνο στους 100°C για 24

ώρες. Στη συνέχεια ζυγίζονται και η διαφορά της μάζας των φιαλιδίων αποτελεί την μάζα των ξηρών φλοιών και ξηρής σάρκας αντίστοιχα.

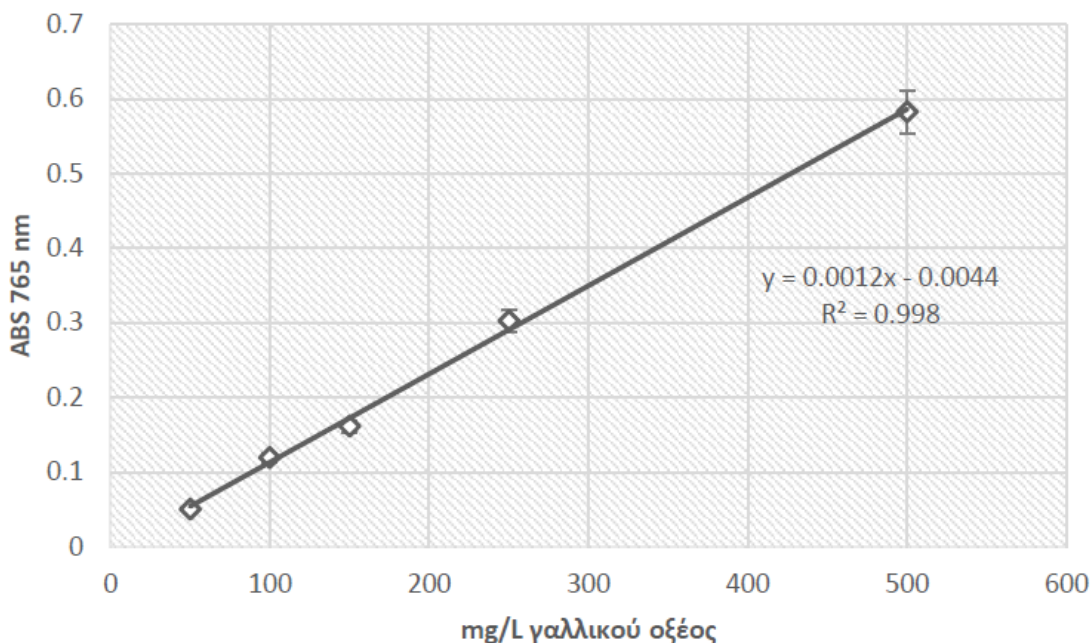
Μέθοδος Folin Ciocalteu - Μέτρηση ολικού φαινολικού φορτίου (TP)

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FCR), η οποία πήρε το όνομά της μετά τους Otto Folin, Vintilă Ciocâlțeu και Willey Glover Denis, βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών σε αλκαλικό περιβάλλον, με μίγμα φωσφοροβολφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέος (αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu). Η οξείδωση προκαλεί μία αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε μπλε, που μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα από ένα φασματοφωτόμετρο. Το αντιδραστήριο δεν μετρά μόνο φαινόλες, αλλά θα αντιδράσει με οποιαδήποτε αναγωγική ουσία. Την ίδια αντίδραση δίνουν και άλλα συστατικά, όπως τα ανάγοντα σάκχαρα και τα νουκλειϊκά οξέα.

Ως εκ τούτου, μετράει τη συνολική αναγωγική ικανότητα ενός δείγματος, όχι μόνο των φαινολικών ενώσεων. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου σε ξηρούς οίνους δεν δημιουργείται πρόβλημα, αφού η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα είναι της τάξης των 20 mg/L, οπότε η συνεισφορά τους στην τιμή της μέτρησης μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα (Waterhouse, 2005).

Σύμφωνα με τη μέθοδο, προστίθενται σε δοκιμαστικό σωλήνα 7.9 mL απιονισμένο νερό, 100 μL δείγμα κατάλληλα αραιωμένο (ή πρότυπο), και 500 μL αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu και ακολουθεί ανάδευση σε vortex. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία 30 s - 8 min και εν συνεχεία προστίθενται 1.5 mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 . Ακολουθεί ανάδευση και πάλι σε vortex και το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία είτε για 2 h στους 20 °C σε σκοτάδι, είτε για 30 min σε υδατόλουτρο στους 40°C.

Ακολουθεί φωτομέτρηση του δείγματος σε γυάλινη κυψελίδα πάχους 1 cm, σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 765 nm με τυφλό, αντιστοίχως παρασκευασμένο δείγμα όπου στη θέση των 100 μL δείγματος, προσθέτουμε 100 μL απιονισμένο νερό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg GAE/L), που προκύπτουν από αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς που παρασκευάσθηκε με συγκεντρώσεις 0-500 mg γαλλικού οξέος/L σε απιονισμένο νερό.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος για τη μέθοδο Folin Ciocalteu

Για την παρασκευή του κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 αναμιγνύονται 200 g άνυδρου Na_2CO_3 με 800 mL απιονισμένο νερό σε ποτήρι ζέσεως. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού υπό ανάδευση και εν συνεχεία αφήνεται να ψυχθεί. Προστίθενται μερικοί κρύσταλλοι ένυδρου Na_2CO_3 και το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 24 h. Ακολουθεί διήθηση με ταυτόχρονη μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη 1 L η οποία συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

Ποσοτικός προσδιορισμός επιμέρους ομάδων φαινολικών συστατικών με φασματοφωτομετρική μέθοδο

Οι ολικές ανθοκυάνες, οι φλαβονόλες και οι τρυγικοί εστέρες προσδιορίστηκαν με φασματομετρία UV-VIS, έπειτα από ρύθμιση του pH, στα αντίστοιχα μέγιστα απορρόφησης των χαρακτηριστικών ομάδων (Cliff, 2007). Σύμφωνα με τη μέθοδο, προστίθενται 250 μL κατάλληλα αραιωμένου κρασιού/γλεύκους σε 250 μL διαλύματος 0.1% HCl σε 95% EtOH. Ακολουθεί προσθήκη 4.55 mL διαλύματος HCl 2%. Παρασκευάζεται, επίσης, το τυφλό δείγμα με 250 μL αιθανολικού διαλύματος 12.5% αντί κρασιού. Το δείγμα αφήνεται για 15 min, ώστε να έρθει το pH σε ισορροπία, και φωτομετρείται στα μέγιστα απορρόφησης της κάθε χαρακτηριστικής ομάδας. Οι ανθοκυάνες έχουν μέγιστο απορρόφησης τα 520 nm και εκφράζονται ως ισοδύναμα 3-γλυκοζιτη της μαλβιδίνης (mn-3-glc, mg/L), που προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς, η χάραξη της οποίας γίνεται με διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (25 - 50 - 100 - 150 - 200 mg/L Mn-3-glc). Οι φλαβονόλες έχουν μέγιστο απορρόφησης τα 360 nm και εκφράζονται ως ισοδύναμα κερκετίνης (quercetin, mg/L), με καμπύλη αναφοράς διαλυμάτων γνωστών

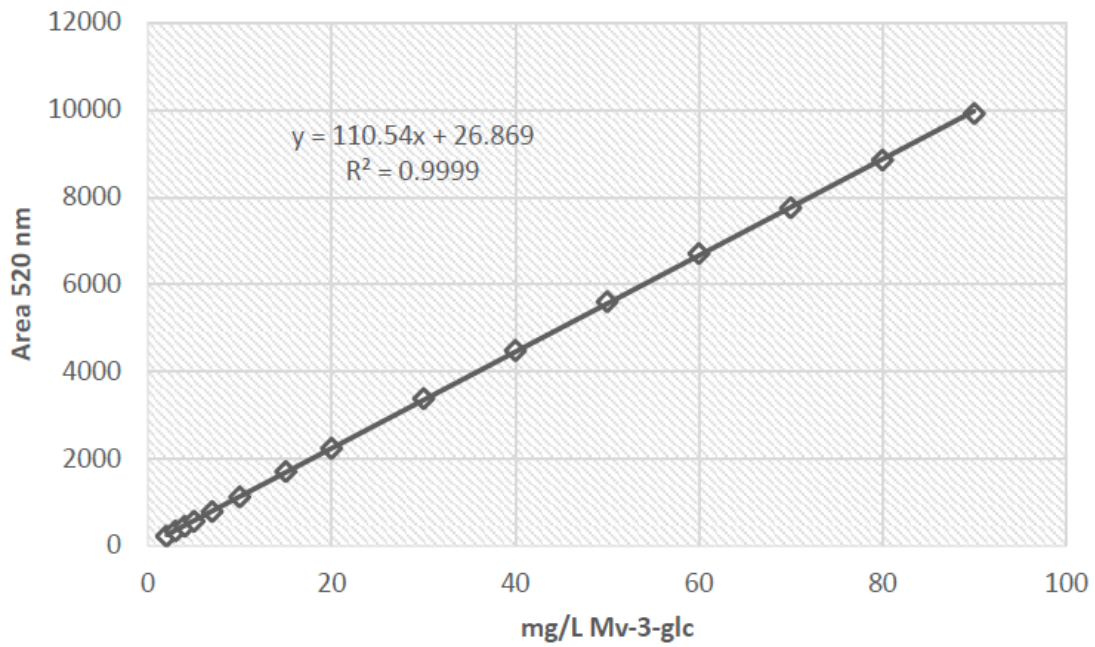
συγκεντρώσεων (50 - 100 - 150 - 200 - 250 mg/L quercetin). Οι τρυγικοί εστέρες έχουν μέγιστο απορρόφησης τα 320 nm και εκφράζονται ως ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (caffeic acid, mg/L) με καμπύλη αναφοράς διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων (10 - 20 - 40 - 60 - 80 - 100 mg/L caffeic acid).

Η καμπύλη αναφοράς του 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης έχει εξίσωση $ABS = 0.0013 \cdot C - 0.0078$ και $R^2 = 0.9998$ και ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.025 έως 0.270. Η καμπύλη αναφοράς της κερκετίνης έχει εξίσωση $ABS = 0.003 \cdot C + 0.0147$ και $R^2 = 0.9985$ και ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.150 έως 0.750. Η καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος έχει εξίσωση $ABS = 0.0047 \cdot C - 0.0003$ και $R^2 = 0.9999$ και ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.050 έως 0.500

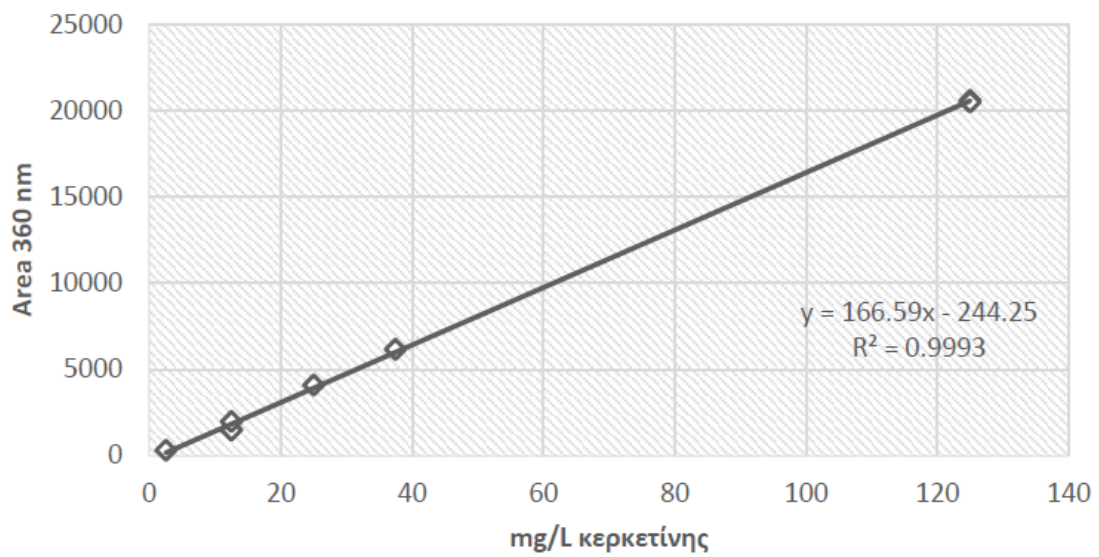
Ανάλυση φαινολικών συστατικών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο χαρακτηρισμός του φαινολικού προφίλ των κόκκινων κρασιών, των μούστων και των εκχυλισμάτων των φλοιών έγινε με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC (HP 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, California) σε σύνδεση με συστοιχία φωτοδιόδων (DAD) και φασματόμετρο μάζας (ESI-MS/MS). Η στήλη χρωματογραφίας που επιλέχθηκε ήταν η Hypersil C18 (ODS 5 μ m, 250x4.6 mm, MZ Analysentechnik, Mainz, Germany). Τα δείγματα κρασιού εγχύονταν έπειτα από φιλτράρισμα με φίλτρο χρωματογραφίας (0.2 μ m, PVDF syringe filters, Teknokroma, Barcelona, Spain). Ο όγκος του εγχυόμενου δείγματος ήταν 20 μ L. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης ήταν νερό/ακετονιτρίλιο/μυρμιγκικό οξύ (87/3/10 (v/v/v) διαλύτης A, 40/50/10 (v/v/v) διαλύτης B) και η ροή ρυθμίστηκε σε 0.4 mL/min. Το προφίλ της βαθμωτής έκλουσης του διαλύτη B είχε ως εξής: 6% στα 0 min, 30% στα 21.5 min, 50% στα 42 min, 60% στα 50 min. Όσον αφορά την ποσοτικοποίηση στον ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων έγινε για τις ανθοκυάνες στα 520 nm σε ισοδύναμα 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης, για τις φλαβονόλες στα 360 nm σε ισοδύναμα κερκετίνης, και για τα κινναμωμικά οξέα στα 320 nm σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος.

Η ταυτοποίηση των ανθοκυανών έγινε σύμφωνα με τα αποτελέσματα του διδακτορικού του Α.Μπιμπίλα κατά την οποία για να γίνει η ταυτοποίηση ρυθμίστηκαν οι ακόλουθοι παράμετροι στο φασματόμετρο μάζας: θετικός ιονισμός, φέρον αέριο άζωτο, θερμοκρασία 350 °C, διαφορά δυναμικού 2.5 kV, εύρος σάρωσης 100-1200 m/z. Για την ταυτοποίηση των φλαβονολών και τα φαινολικών οξέων, χρησιμοποιήθηκε αρνητικός ιονισμός (Μπιμπίλας, 2017).



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς του 3-γλυκοζιτης της μαλβιδίνης (Mv-3-glc) στα 520 nm



Διάγραμμα 3: Καμπύλη αναφοράς της κερκετίνης στα 360 nm

Ανάλυση αρωματικών ενώσεων του κρασιού με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GCMS)

Διαδικασία εκχύλισης με στήλη Vigreux

Για την ανάλυση των αρωματικών με αέρια χρωματογραφία πρέπει να προηγηθεί μια διαδικασία εκχύλισης. Στην εν λόγω εργασία επιλέχθηκε η εκχύλιση με στήλη Vigreux. Κατά τη μέθοδο αυτή οι ουσίες που θέλουμε να προσδιορίσουμε μέσω της χρωματογραφίας εκχυλίζονται σε ένα μίγμα οργανικών διαλυτών. Η φάση του διαλύτη συλλέγεται ενώ η φάση που περιέχει τα υδατοδιαλυτά συστατικά απορρίπτεται. Στη συνέχεια πραγματοποιείται συμπύκνωση του μίγματος σε στήλη Vigreux, κατά την οποία οι πιο πτητικοί διαλύτες απομακρύνονται και τελικά συλλέγεται ένα μίγμα το οποίο είναι πλούσιο σε ουσίες που σχετίζονται με το αρωματικό προφίλ του κρασιού. Το τελικό αυτό μίγμα αναλύθηκε σε GC-MS.

Μεθοδολογία:

- Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται 50 mL δείγματος 25 mL πεντάνιο και 25 mL αιθέρα.
- Το διάλυμα αφήνεται για 10 min υπό ήπια ανάδευση και στη συνέχεια τοποθετείται στη φυγόκεντρο για 10 min στις 3500 rpm.
- Μετά το πέρας των 10 min με την χρήση σιφονίου διαχωρίζεται η οργανική φάση από την υδατική φάση. Το διάλυμα των οργανικών διαλυτών που περιέχουν τις αρωματικές ενώσεις συλλέγεται.
- Στην υδατική φάση προστίθεται εκ νέου μίγμα διαλυτών και επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία.
- Σε διαχωριστική χοάνη τοποθετούνται οι οργανικές φάσεις που έχουν συλλεχθεί παραπάνω και προστίθενται περίπου 10 mL απιονισμένο νερό.
- Απορρίπτεται η κάτω φάση που είναι η υδατική και η οργανική τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως.
- Για την απορρόφηση της εναπομένουσας υγρασίας προστίθεται μικρή ποσότητα θειικού νατρίου στο δείγμα.
- Έπειτα από ήπια ανάδευση το δείγμα φιλτράρεται και τοποθετείται σε προζυγισμένη απιοειδή φιάλη.
- Η απιοειδής φιάλη συνδέεται με μία στήλη Vigreux και αφήνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 35-40°C για περίπου 2 h.
- Μετά το τέλος της απόσταξης το δείγμα μεταφέρεται σε δοχείο vial και προστίθενται σε αυτό 10 μL 3-οκτανόλη, ως εσωτερικό πρότυπο.
- Τέλος το δείγμα υφίσταται ταχεία συμπύκνωση με την χρήση αέριου αζώτου μέχρι τελική μάζα περίπου ίση με 100 mg και πραγματοποιείται ένεση του δείγματος στη συσκευή GC-MS.

Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Για τον προσδιορισμό του αρωματικού προφίλ χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος συνδεδεμένος με φασματόμετρο μάζας (Hewlett-Packard 6890 Agilent Technologies 5975C VL MSD). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μια τριχοειδή στήλη διοξειδίου του πυριτίου HP-1 (Agilent Technologies) με διαστάσεις 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται

ήλιο (He) με παροχή 1mL/min. Ποσότητα 1μL από κάθε εκχύλισμα εγχύεται στο χρωματογράφο με split ratio 100:1. Η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς είναι 38 °C. Στο φασματοόμετρο μάζας τα ηλεκτρόνια παράγονται στον θάλαμο ιονισμού από θερμαινόμενο μεταλλικό νήμα και έχουν δυναμικό της τάξεως των 70 eV στα 40-550 amu. Τέλος η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με το λογισμικό HP Chemstation rev.A.06.03.

Ζυμώσεις – Παστερίωση μούστου – Εμβολιασμός με επιλεγμένες ζύμες

Μετά την απόψυξη του μούστου ποσότητας 5 λίτρων, χρησιμοποιήθηκαν τα 4 λίτρα μούστου για τις ζυμώσεις και κρατήθηκε δείγμα από τον υπόλοιπο μούστο για αναλύσεις του γλεύκους πριν την ζύμωση. Από τα τέσσερα λίτρα μούστου που προορίζονται για τις ζυμώσεις κρατήθηκε το ένα άθικτο για την ζύμωση των γηγενών ζυμών, αυτών δηλαδή που υπάρχουν φυσικά στο μούστο από τις ποικιλίες των σταφυλιών. Στα τρία υπόλοιπα λίτρα, αφού τοποθετήθηκαν το κάθε ένα σε κωνική φιάλη του ενός λίτρου, πραγματοποιήθηκε παστερίωση στους 90 °C για 5 λεπτά ώστε να αδρανοποιηθούν όλες οι γηγενείς ζύμες. Στη συνέχεια έγινε ο εμβολιασμός με τις επιλεγμένες ζύμες υπό στείρες συνθήκες. Εμβολιάστηκε 1 g ζύμης στο κάθε λίτρο. Μετά το τέλος κάθε εμβολιασμού τοποθετήθηκε πώμα που επιτρέπει μερικό αερισμό στην κάθε μία κωνική φιάλη. Οι τέσσερις κωνικές φιάλες, η μία με τις γηγενείς ζύμες και οι άλλες τρεις με τις εμβολιασμένες ζύμες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 22 °C και αφέθηκαν να ζυμωθούν.

Μέθοδος Luff – Προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων

Για την εφαρμογή της μεθόδου τα δείγματα κρασιών ή γλευκών θα πρέπει να είναι κατάλληλα αραιωμένα με απεσταγμένο νερό έτσι ώστε η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων σε αυτό να μην ξεπερνά τα 2,5 g/L.

Στα κόκκινα κρασιά προστίθενται 50 mL απεσταγμένου νερού σε 50 mL δείγμα και στη συνέχεια γίνεται ο αποχρωματισμός με την χρήση ενεργού άνθρακα. Προστίθενται 0,2 g ενεργού άνθρακα για τα 100 mL αραιωμένου κρασιού, και μετά από 10 min αναμονή γίνεται διήθηση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται εις τριπλούν για τον καλύτερο αποχρωματισμό του διαλύματος. Στο δείγμα γλεύκους έγινε αραιώση 1:100 καθώς η συγκέντρωση των σακχάρων σε αυτό είναι της τάξης των 200 g/L. Επομένως μετά από τόσο μεγάλη αραιώση ο αποχρωματισμός δεν ήταν απαραίτητος.

Παραγωγή διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο:

- Διάλυμα θειικού χαλκού
25 g ένυδρου θειικού χαλκού ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) διαλύονται σε 100 mL απιονισμένο νερό, 50 g κιτρικού οξέος σε 300 mL νερό και 388 g ένυδρου ανθρακικού νατρίου ($\text{NaCO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) σε 300 mL νερό. Τα δύο τελευταία διαλύματα αναμειγνύονται και στο μείγμα αυτών προστίθεται το πρώτο διάλυμα με συνεχή ανάδευση. Το τελικό μείγμα συμπληρώνεται μέχρι ενός λίτρου και φυλάσσεται σε φιάλη για φωτοευαίσθητα διαλύματα.
- Διάλυμα ιωδιούχου καλίου 30%

30 g ιωδιούχου καλίου KI διαλύονται σε 100 mL νερού. Αποθήκευση σε φιάλη για φωτοευαίσθητα διαλύματα.

- Διάλυμα θειικού οξέος 25%
25 mL H₂SO₄ αραιώνονται υπό ψύξη σε 100 mL νερό.
- Διάλυμα αμύλου
5 g αμύλου διαλύονται σε 100 mL νερό με βρασμό.
- Θειοθειικό νάτριο Na₂S₂O₃ – 5H₂O N/10 (πρότυπο διάλυμα)

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

- Στη σφαιρική φιάλη βρασμού των 250 mL (A) προστίθενται 25 ml διαλύματος CuSO₄ 25% και 25 mL δείγματος (νερού για το τυφλό) μαζί με 4-5 πυρήνες βρασμού.
- Από την στιγμή που ξεκινάει ο βρασμός χρονομετρούνται 10 min ακριβώς.
- Στη συνέχεια η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε υδατόλουτρο για 5 min
- Αφού έρθει το διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου προστίθενται 10 mL διαλύματος KI 30 %, 25 mL διαλύματος H₂SO₄ και 5 mL διαλύματος αμύλου.
- Στη συνέχεια γίνεται ογκομέτρηση στο σύνολο με το διάλυμα Na₂S₂O₃ 0.1 N μέχρι αλλαγή χρώματος σε γαλακτερό λευκό.

Έστω n η κατανάλωση του δείγματος και n' η κατανάλωση του τυφλού. Υπολογίζεται η διαφορά ($n'-n$) και από τον παρακάτω πίνακα τιμών προσδιορίζεται η τιμή k , η οποία αντιπροσωπεύει την ποσότητα των αναγόντων σακχάρων σε mg στον όγκο του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε.

Πίνακας 5: Εύρεση της τιμής k

	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
	0,00	0,24	0,48	0,72	0,96	1,20	1,44	1,68	1,92	2,16
1	2,40	2,64	2,88	3,12	3,36	3,60	3,84	4,08	4,32	4,56
2	4,80	5,05	5,30	5,55	5,80	6,05	6,30	6,55	6,80	7,05
3	7,20	7,45	7,70	7,95	8,20	8,45	8,70	8,95	9,20	9,45
4	9,70	9,95	10,20	10,45	10,70	10,95	11,20	11,45	11,70	11,95
5	12,20	12,45	12,70	12,95	13,20	13,45	13,70	13,95	14,20	14,45
6	14,70	14,95	15,20	15,45	15,70	15,95	16,20	16,45	16,70	16,95
7	17,20	17,46	17,72	17,98	18,24	18,50	18,76	19,02	19,28	19,54
8	19,80	20,06	20,32	20,58	20,84	21,10	21,36	21,62	21,88	22,14
9	22,40	22,66	22,92	23,18	23,44	23,70	23,96	24,22	24,48	24,74
10	25,00	25,26	25,52	25,78	26,04	26,30	26,56	26,82	27,08	27,34
11	27,60	27,87	28,14	28,41	28,68	28,95	29,22	29,49	29,76	30,03
12	30,30	30,57	30,84	31,11	31,38	31,65	31,92	32,19	32,46	32,73
13	33,00	33,27	33,54	33,81	34,08	34,35	34,62	34,89	35,16	35,43
14	35,70	35,98	36,26	36,54	36,82	37,10	37,38	37,66	37,94	38,22
15	38,50	38,78	39,06	39,34	39,62	39,90	40,18	40,46	40,74	41,02
16	41,30	41,59	41,88	42,17	42,46	42,75	43,04	43,33	43,62	43,91
17	44,20	44,49	44,78	45,07	45,36	45,65	45,94	46,23	46,52	46,81
18	47,10	47,39	47,68	47,97	48,26	48,55	48,84	49,13	49,42	49,71
19	50,00	50,30	50,60	50,90	51,20	51,50	51,80	52,10	52,40	52,70
20	53,00	53,30	53,60	53,90	54,20	54,50	54,80	55,10	55,40	55,70
21	56,00	56,31	56,62	56,93	57,24	57,55	57,86	58,17	58,48	58,79
22	59,10	59,41	59,72	60,03	60,34	60,65	60,95	61,27	61,58	61,89
23	62,20	62,52	62,84							

Αφού βρεθεί η τιμή k, τα ανάγοντα σάκχαρα προσδιορίζονται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Ανάγοντα σάκχαρα (g/L)} = (f \times k) / 25$$

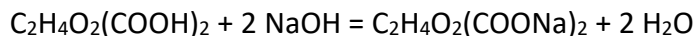
Ο συντελεστής f είναι ο συντελεστής αραιώσης για τα δείγματα κρασιού είναι ίσος με 5 και για τον μούστο ίσος με 100. Για τα δείγματα κρασιού είναι ίσος με 5 καθώς τα 25 mL που προστίθενται στη σφαιρική φιάλη βρασμού είναι 10 mL δείγμα (1:2) και 15 mL απεσταγμένου νερού.

Ολική Οξύτητα

Το γλεύκος και ο οίνος είναι διαλύματα με όξινη αντίδραση και γεύση λόγω των οργανικών οξέων που υπάρχουν ελεύθερα και τα οποία διίστανται ανάλογα με τη σταθερά ιονισμού τους. Τα κύρια οξέα του γλεύκους είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό και δημιουργούνται μέσα από μεταβολικά μονοπάτια στο φυτό της αμπέλου. Κατά τη σύνθλιψη και πίεση των σταφυλιών για την παραλαβή του γλεύκους περνάνε στην υγρή φάση και είναι υπεύθυνα για την όξινη σύσταση του. Όταν το γλεύκος ζυμώνεται σε οίνο, τα παραπάνω οξέα υφίστανται ποσοτικές μεταβολές ενώ παράλληλα εμφανίζονται και νέα (π.χ. ηλεκτρικό, γαλακτικό, οξικό κ.ά.) σαν

δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης ή σαν προϊόντα βακτηριακής ή ενζυμικής δράσης.

Τόσο στο σύνολο τους, όσο και το καθένα ξεχωριστά, συμβάλλουν στη διαμόρφωση των γευστικών χαρακτήρων των οίνων αλλά και τους προσδίδουν ιδιότητες που θα πρέπει να λάβει υπόψη του ο οινολόγος για την τεχνολογικά σωστή παραγωγή, επεξεργασία και συντήρηση των οίνων. Το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται στο γλεύκος και τον οίνο, είτε σε μοριακή κατάσταση είτε σε μορφή ανιόντων, αποτελεί την ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα. Εξαρτάται από την περιεκτικότητα του γλεύκους ή του οίνου σε ελεύθερα οργανικά οξέα, ενώ το είδος τους ουσιαστικά δεν παίζει ρόλο στη διαμόρφωση της τιμής, π.χ. είναι αδιάφορο αν ο οίνος περιέχει τρυγικό ή ηλεκτρικό οξύ. Ο προσδιορισμός της ολικής οξύτητας βασίζεται στην εξουδετέρωση των όξινων ομάδων του δείγματος με πρότυπο διάλυμα αλκάλειας (συνήθως 0.1 M NaOH) παρουσία ενός δείκτη. Για μια μεγάλη χρονική περίοδο, σαν δείκτης χρησιμοποιούνταν η φαινολοφθαλεΐνη με περιοχή εξουδετέρωσης (pH αλλαγής χρώματος) 8.0-9.8. Όμως στον προσδιορισμό της οξύτητας στους ερυθρούς οίνους η μέτρηση ήταν ασαφής γιατί στην αλλαγή του χρώματος του δείκτη παρεμβάλλεται και η αντίδραση των χρωστικών του οίνου με το αλκάλι. Έτσι η αρμόδια επιτροπή του OIV όρισε σαν 'ολική οξύτητα': το σύνολο των όξινων ομάδων που τιτλοδοτούνται όταν το pH του οίνου φέρεται στην τιμή 7 με προσθήκη πρότυπου διαλύματος αλκάλειας. Το CO₂ δεν λαμβάνεται υπόψη στον υπολογισμό. Για τον καθορισμό του τέλους της αντίδρασης χρησιμοποιείται σαν δείκτης το κυανό της βρωμοθυμόλης που έχει περιοχή αλλαγής χρώματος το pH 7. Σε μια κωνική φιάλη τοποθετούμε 10 mL δείγματος, 1 mL δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης. Ανακατεύουμε και τιτλοδοτούμε με το διάλυμα του NaOH, αναδεύοντας συνεχώς, μέχρι την αλλαγή του χρώματος (κυανοπράσινη χροιά). Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε g τρυγικού οξέος/L οίνου ή γλεύκους μέσω της παρακάτω αντίδρασης:



pH και Πυκνότητα

Ως ενεργή οξύτητα ή pH καλείται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση και δίνουν H⁺. Εξαρτάται όχι μόνο από τη συγκέντρωση αλλά και από το είδος των οργανικών οξέων, π.χ. ο οίνος που περιέχει μια ορισμένη ποσότητα τρυγικού οξέος είναι πιο όξινος από τον οίνο που περιέχει ισόποσο ηλεκτρικό οξύ λόγω του διαφορετικού βαθμού διάστασης των ελεύθερων καρβοξυλομάδων. Το pH των οίνων, ανάλογα με την αμπελουργική περιοχή, την ποικιλία της αμπέλου και την τεχνική παρασκευής τους κυμαίνεται από 2,8 μέχρι 4,2. Η πυκνότητα μετρήθηκε με πυκνόμετρο δίνοντας αποτελέσματα σε g/L.

Προσδιορισμός της Χρωματικής Έντασης (E) και της Χρωματικής Απόχρωσης (A) των οίνων

Σε περίπτωση που τα δείγματα κρασιών ή γλευκών είναι θολά, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση πριν από τον προσδιορισμό, ο οποίος γίνεται φασματοφωτομετρικά. Παρατηρώντας το φάσμα ενός ερυθρού οίνου στην περιοχή του ορατού φαίνεται ότι παρουσιάζει μία χαρακτηριστική καμπύλη στην περιοχή των 420 nm, μία υψηλή κορυφή στην περιοχή των 520 nm και μία πολύ μικρή κορυφή στην περιοχή των 620 nm. Η περιοχή των 420 nm αντιστοιχεί στην περιοχή απορρόφησης του κίτρινου φωτός ενώ οι περιοχές των 520 και 620 nm στις περιοχές του ερυθρού και του κυανού, αντίστοιχα. Ως Χρωματική Ένταση (E) ενός ερυθρού οίνου θεωρούμε το άθροισμα των οπτικών πυκνοτήτων σε αυτά τα τρία διακριτά μήκη κύματος. Συνήθως το εύρος τιμών της E κυμαίνεται μεταξύ 4 και 20. Όσο υψηλότερη η τιμή του E τόσο πιο σκουρόχρωμος εμφανίζεται ο οίνος. Ως Χρωματική Απόχρωση (A) ενός ερυθρού οίνου θεωρούμε το πηλίκο της οπτικής πυκνότητας στα 420 nm προς αυτή των 520 nm. Συνήθως το εύρος τιμών της A κυμαίνεται μεταξύ 0.5 και 1.5. Όσο υψηλότερη η τιμή του A τόσο πιο καφέ (άρα χρωματικά εξελιγμένος) εμφανίζεται ο οίνος. Εστω a η απορρόφηση στα 420 nm, b η απορρόφηση στα 520 nm, και c η απορρόφηση στα 620 nm. Τα E και A υπολογίζονται ως εξής:

$$E = a + b + c$$

$$A = a \div b$$

Σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί κυψελίδα οπτικής διαδρομής 2 mm οι συντελεστές a,b,c πολλαπλασιάζονται με 5, σε περίπτωση κυψελίδας οπτικής διαδρομής 1mm οι συντελεστές πολλαπλασιάζονται με 10.

Μέθοδος FAN (Free Amino Nitrogen)- Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου

Η μέτρηση του αμμωνιακού αζώτου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο νινυδρίνης όπως περιγράφεται στο ASBC Methods of Analysis.

a. Παρασκευή αντιδραστηρίων:

Για την μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου πρέπει πρώτα να παρασκευαστούν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Αντιδραστήριο νινυδρίνης: Σε κωνική φιάλη των 100 mL προστίθενται 10 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6.0 g KH_2PO_4 , 0.5 g νινυδρίνης και 0.3 g φρουκτόζης. Στη συνέχεια η κωνική φιάλη πληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή.

- Διάλυμα αραιώσης: Ζυγίζονται 2 g KIO_3 και διαλύονται σε 600 mL απιονισμένου νερού και στη συνέχεια προστίθενται 400 mL αιθανόλης (96%). Αποθήκευση στους 5 °C.
- Πρότυπο πυκνό διάλυμα γλυκίνης (stock solution): Ζυγίζονται 107.2 g γλυκίνης και διαλύονται σε 100 mL απιονισμένου νερού. Αποθήκευση στους 0 °C.
- Πρότυπο αραιό διάλυμα γλυκίνης: 1 mL από το παραπάνω διάλυμα διαλύεται σε 100 mL απιονισμένο νερό. Το πρότυπο αυτό διάλυμα περιέχει 2 mg αμμωνιακού αζώτου/L.

b. Μεθοδολογία:

- Αρχικά για κάθε ένα από τα δείγματα πραγματοποιείται κατάλληλη αραιώση με απιονισμένο νερό.
- Σε δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρονται 2 mL αραιωμένου δείγματος, 2 mL πρότυπου διαλύματος γλυκίνης και 2 mL απιονισμένου νερού. Για κάθε ένα από τα παραπάνω η μέθοδος πραγματοποιείται εις τριπλούν.
- Στη συνέχεια σε κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται 1 mL από το αντιδραστήριο νινυδρίνης που έχει ήδη παρασκευασθεί.
- Οι δοκιμαστικοί σωλήνες σφραγίζονται καλά, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση και θερμαίνονται σε νερό που βράζει για 16 min.
- Μετά από ακριβώς 16 min τα δείγματα απομακρύνονται από το θερμό μέσο και αφήνονται να κρυώσουν για 20 min σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 20 °C.
- Στη συνέχεια σε κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 5 mL από το διάλυμα αραιώσης.
- Ρυθμίζεται το φωτόμετρο στα 570 nm και μετά τον μηδενισμό του με απιονισμένο νερό διάλυμα πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων.

c. Υπολογισμοί:

- Υπολογίζεται ο μέσος όρος απορρόφησης των τριών επαναλήψεων κάθε δείγματος.
- Στη συνέχεια ο μέσος όρος των ενδείξεων του φωτόμετρου για το τυφλό διάλυμα αφαιρείται τόσο από τους μέσους όρους των δειγμάτων γλεύκους όσο και από το πρότυπο διάλυμα γλυκίνης.
- Τελικά υπολογίζεται το ελεύθερο αμμωνιακό άζωτο σύμφωνα σε mg/L με την παρακάτω σχέση:

$$FAN = \frac{\text{απορρόφηση δείγματος}}{\text{απορρόφηση του πρότυπου γλυκίνης}} \times 2 \times \text{βαθμός αραιώσης}$$

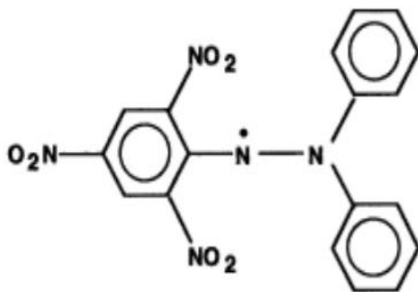
Μέτρηση αλκοολικών βαθμών

Η μέτρηση του αλκοολικού βαθμού των δειγμάτων εργαστηριακής οινοποίησης έγινε με αλκοολόμετρο. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι σύμφωνη με τις συνήθειες αναλύσεις που γίνονται για το καθορισμό της ποιότητας του οίνου. Ακολουθήθηκε η μέθοδος που αναφέρεται στον κανονισμό της ΕΟΚ 1108/82 (L 133) τροποποιημένη για τις ανάγκες τις παρούσας εργασίας. Αφού τοποθετήθηκαν 100 mL δείγματος προς απόσταξη και συλλέχθηκαν περί τα 75 mL διαλύματος, αραιώθηκαν μέχρι τα 100 mL σε ογκομετρική φιάλη με απιονισμένο νερό. Εν συνεχεία το αραιωμένο απόσταγμα τοποθετήθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 mL και βυθίστηκε το αλκοολόμετρο υπό περιστροφή. Η ένδειξη του αλκοολόμετρου διορθώθηκε σύμφωνα με την θερμοκρασία του διαλύματος με τον αντίστοιχο πίνακα του αλκοολόμετρου για τους 15 °C.

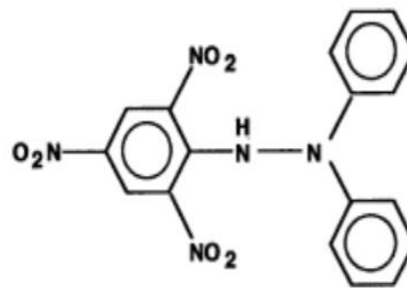
DPPH – Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η μέθοδος DPPH προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Marsden Blois το 1958. Το μόριο του διφαινυλο-πικρυλ-υδραζιίου (diphenylpicrylhydrazyl) ή σε συντομογραφία DPPH, αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα της οποίας το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει την ικανότητα να διασπείρεται σε όλο το μήκος του μορίου με αποτέλεσμα να μην διμερίζεται η ελεύθερη ρίζα και να χαρακτηρίζεται πολύ σταθερή σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ρίζες. Επίσης, αυτή η διασπορά και μετεγκατάσταση του φορτίου δίνει στο μεθανολικό διάλυμα του DPPH το βαθύ μωβ χρώμα που έχει μέγιστο απορρόφησης στο ορατό φάσμα στα 515 nm.

Ο μηχανισμός του συστήματος DPPH-αντιοξειδωτικού παράγοντα προσομοιάζει τα πραγματικά συστήματα στα οποία είναι πιθανό να προκύψουν ελεύθερες ρίζες όπως στην οξείδωση των λιπαρών. Το αντιοξειδωτικό θα δώσει ένα άτομο πρωτονίου στην ελεύθερη ρίζα με αποτέλεσμα αυτή να αναχθεί. Όμως η ανηγμένη μορφή του DPPH δεν χαρακτηρίζεται από βαθύ μωβ χρώμα όπως η ρίζα, αλλά από ένα ελαφρύ κίτρινο που δεν απορροφά σε σημαντικό βαθμό στο ορατό. Συνεπώς, ο βαθμός αποχρωματισμού του διαλύματος DPPH, είναι ανάλογος της αντιοξειδωτικής δράσης του αντιοξειδωτικού παράγοντα.



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)



2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

Εικόνα 15: 1:Ελεύθερη ρίζα DPPH 2:ανηγμένη μορφή DPPH

Το Efficient Concentration (EC_{50}) είναι ένας σημαντικός δείκτης που εκτιμούμε στη μέθοδο DPPH. Το EC_{50} αντιπροσωπεύει την τιμή της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού που απαιτείται προκειμένου να απενεργοποιηθεί το 50% της ρίζας DPPH. Είναι αναμενόμενο ότι όσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική δράση μίας ουσίας, τόσο μικρότερος θα είναι ο δείκτης EC_{50} , διότι απαιτείται μικρότερη ποσότητα αντιοξειδωτικού για να απενεργοποιηθεί η ίδια ποσότητα ρίζας (Molyneux, 2004). Εναλλακτικά η μείωση της απορρόφησης του DPPH μπορεί να συσχετισθεί με τη μείωση που παρατηρείται από ένα γνωστό αντιοξειδωτικό, συνήθως το trolox και η αντιοξειδωτική ικανότητα του μετρούμενου δείγματος να εκφραστεί σε ισοδύναμη συγκέντρωση trolox.

Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν στην πειραματική διαδικασία για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH ήταν:

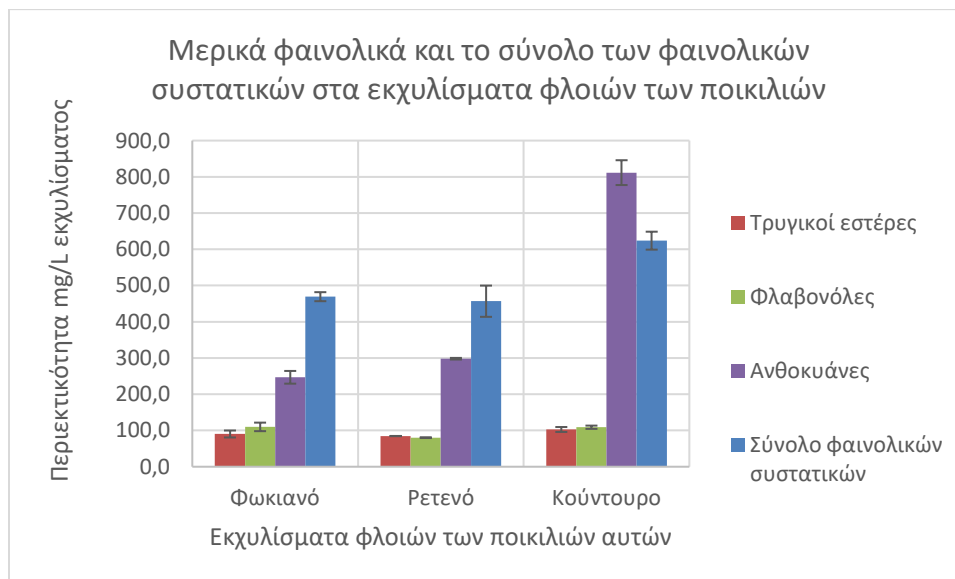
- Παρασκευή του διαλύματος DPPH: Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, διαλύονται 0,0025 g DPPH σε περίπου 50 mL μεθανόλης. Αφού γίνει καλή ανακίνηση με το vortex, συμπληρώνεται η φιάλη με μεθανόλη μέχρι τη χαραγή. Στη συνέχεια, αναδεύεται καλά και αφήνεται σε σκιερό μέρος. Το διάλυμα που προέκυψε έχει συγκέντρωση 25 mg/L.
- Αντίδραση διαλυμάτων DPPH-αντιοξειδωτικού: Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται 3.9 mL διαλύματος DPPH 25ppm και 100 μ L κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος δεντρολίβανου. Παρασκευάζεται και το τυφλό που έχει 4 mL διαλύματος DPPH χωρίς αντιοξειδωτικό. Ακολουθεί ανάδευση και επώση των δειγμάτων για 30 min σε σκιερό μέρος.
- Φωτομέτρηση: Ακολουθεί φωτομέτρηση των δειγμάτων στο φωτόμετρο στα 515 nm. Το φωτόμετρο μηδενίζεται με καθαρή μεθανόλη.
- Η έκφραση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων έγινε σε ισοδύναμα trolox. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, ζυγίστηκαν 0,01 g 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox) και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL με μεθανόλη. Από αυτό το διάλυμα προστέθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL 1, 2, 3, 4 και 5 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη. Οι συγκεντρώσεις που προέκυψαν ήταν αντίστοιχα 40, 80, 120, 160 και 200 ppm.
- Η καμπύλη αναφοράς δίνει αποτελέσματα σε mg trolox/ L δείγματος και είναι η παρακάτω, $y = 0.0024x + 0.0105$. Όπου y είναι η διαφορά των μετρήσεων του φασματοφωτόμετρου (των ABS) του δείγματος από του τυφλού και x είναι η ζητούμενη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού σε ισοδύναμα trolox C_{trolox} (mg/L) (Τσιμόγιαννης, 2008).

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Α. Αναλύσεις στα εκχυλίσματα φλοιών των τριών ποικιλιών

Ποσοτικοποίηση ολικών και μερικών φαινολικών με την μέθοδο Folin Ciocalteu και την μέθοδο του Φωτομετρικού προσδιορισμού στα εκχυλίσματα των φλοιών

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin, η οποία προσδιορίζει την περιεκτικότητα του ολικού φαινολικού φορτίου, και του ποσοτικού προσδιορισμού των επιμέρους ομάδων φαινολικών συστατικών με την φασματοφωτομετρική μέθοδο στα εκχυλίσματα των φλοιών των τριών ποικιλιών παρουσιάζονται στο διάγραμμα 4. Η μέθοδος Folin ποσοτικοποιεί το ολικό φαινολικό φορτίο σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και ο φωτομετρικός προσδιορισμός ποσοτικοποιεί τους τρυγικούς εστέρες σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος, τις φλαβονόλες σε ισοδύναμα κερκετίνης και τις ανθοκυάνες σε ισοδύναμα 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης.



Διάγραμμα 4: Περιεκτικότητες ολικών και μερικών φαινολικών στα εκχυλίσματα των φλοιών

Όπως είναι φανερό από το διάγραμμα το Κούντουρο είναι μία ποικιλία εμπλουτισμένη με ανθοκυάνες και αυτό φαίνεται τόσο από την περιεκτικότητα των ανθοκυανών που προκύπτει από τον φωτομετρικό προσδιορισμό όσο και από το σύνολο των φαινολικών συστατικών της ανάλυσης Folin που είναι φανερά υψηλότερο από τις άλλες δύο ποικιλίες. Το γεγονός ότι οι ανθοκυάνες φαίνεται να είναι περισσότερες από το σύνολο των φαινολικών δεν σημαίνει ότι οφείλεται σε σφάλμα της μεθόδου, αλλά έγκειται στο γεγονός ότι είναι δύο διαφορετικές αναλύσεις που δεν μπορούν να συγκριθούν ποσοτικά παρά μόνο ποιοτικά. Επομένως το

συμπέρασμα είναι ότι το κούντουρο έχει αυξημένο φαινολικό φορτίο και αυτό οφείλεται στην αυξημένη περιεκτικότητα του σε ανθοκυάνες.

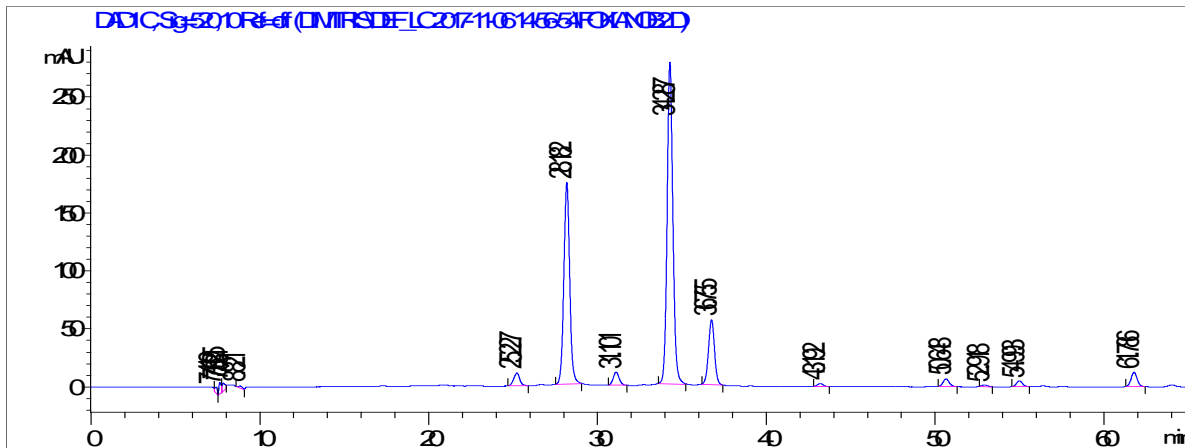
Ποσοτικοποίηση ανθοκυανών με HPLC στους φλοιούς των σταφυλιών

Ο πίνακας 6 δίνει την περιεκτικότητα των φλοιών των τριών ποικιλιών σε ανθοκυάνες, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC με βάση το αντίστοιχο εύρος της κορυφής (εικ.16). Το εύρος κάθε κορυφής έχει αναχθεί μέσω της καμπύλης αναφοράς του 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης σε ισοδύναμα αυτής και μέσω της μέτρησης του ξηρού βάρους των φλοιών, και του όγκου του παραλαμβανόμενου εκχυλίσματος, τα αποτελέσματα ανάχθηκαν σε ξηρή μάζα φλοιών. Η HPLC ανάλυση παρέχει και τα φάσματα της κάθε κορυφής (εικ.17) και έτσι, σε συνδυασμό με το χρόνο έκλουσης, είναι εφικτή η ταυτοποίησή των ουσιών μέσω του πίνακα 7 αντιστοιχίζοντας για την κάθε κορυφή τον χρόνο έκλουσης και τις κορυφές των φασμάτων τους στην αντίστοιχη ουσία.

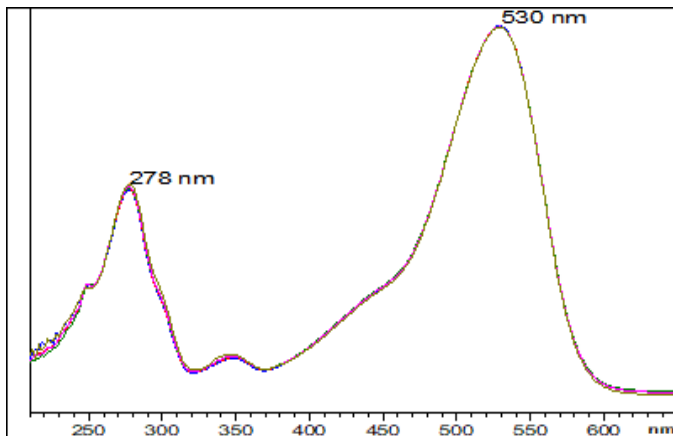
Πίνακας 6: Περιεκτικότητες ανθοκυανών στους ξηρούς φλοιούς των τριών ποικιλιών

Ανθοκυάνες	Περιεκτικότητα φλοιών σε ανθοκυάνες (mg/kg ξηρών φλοιών)					
	ΦΩΚΙΑΝΟ	SD	PETENO	SD	ΚΟΥΝΤΟΥΡΟ	SD
3-(6''-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Δελφινιδίνης	0.0	0.0	733.4	58.4	0.0	0.0
3-γλυκοζίτης της Δελφινιδίνης	127.1	20.3	208.8	8.0	873.5	254.0
3-γλυκοζίτης της Κυανιδίνης	2074.3	448.2	0.0	0.0	171.4	94.7
3-(6''-trans-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	0.0	0.0	514.7	1.1	745.4	200.1
3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	0.0	0.0	0.0	0.0	779.1	230.7
3-(6''-καφέυλ)γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	72.9	22.8	101.1	21.4	77.5	12.3
3-γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	3668.2	124.1	4621.7	220.6	16527.3	2266.4
3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης της Πεονιδίνης	94.2	13.1	191.1	16.4	169.6	46.9
3-(6''-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Πεονιδίνης	188.2	31.8	514.7	1.1	745.4	200.1
3-γλυκοζίτης της Πεονιδίνης	716.7	95.9	1330.5	179.8	2553.7	776.7
3-(6''-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Πετουινιδίνης	0.0	0.0	0.0	0.0	322.6	26.7
3-γλυκοζίτης της Πετουινιδίνης	132.3	18.8	336.0	11.6	1228.3	336.2
Σύνολο ανθοκυανών για την κάθε ποικιλία	7073.8		8552.0		24194.0	

Το ενδιαφέρον στον πίνακα 6 έγκειται στο γεγονός ότι ταυτοποιήθηκαν ποιες ανθοκυάνες περιέχονται στην κάθε ποικιλία και σε ποια περιεκτικότητα. Επιπλέον είναι φανερό ότι και στις τρεις ποικιλίες η ανθοκυάνη με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα είναι ο 3-γλυκοζίτης της μαλβιδίνης, και αυτό έχει επιβεβαιωθεί και σε προηγούμενες αναλύσεις όπως στο διδακτορικό του Α. Μπιμπίλα (Μπιμπίλας, 2017) και επίσης δικαιολογεί και την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε ισοδύναμα 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης. Από το σύνολο των ανθοκυανών της κάθε ποικιλίας επιβεβαιώνονται και οι προηγούμενες αναλύσεις της Folin και του φωτομετρικού προσδιορισμού για το ότι το κούντουρο είναι η πιο εμπλουτισμένη σε ανθοκυάνες ποικιλία.



Εικόνα 16: Αποτελέσματα HPLC ανάλυσης του εκχυλίσματος φλοιών του φωκιανού

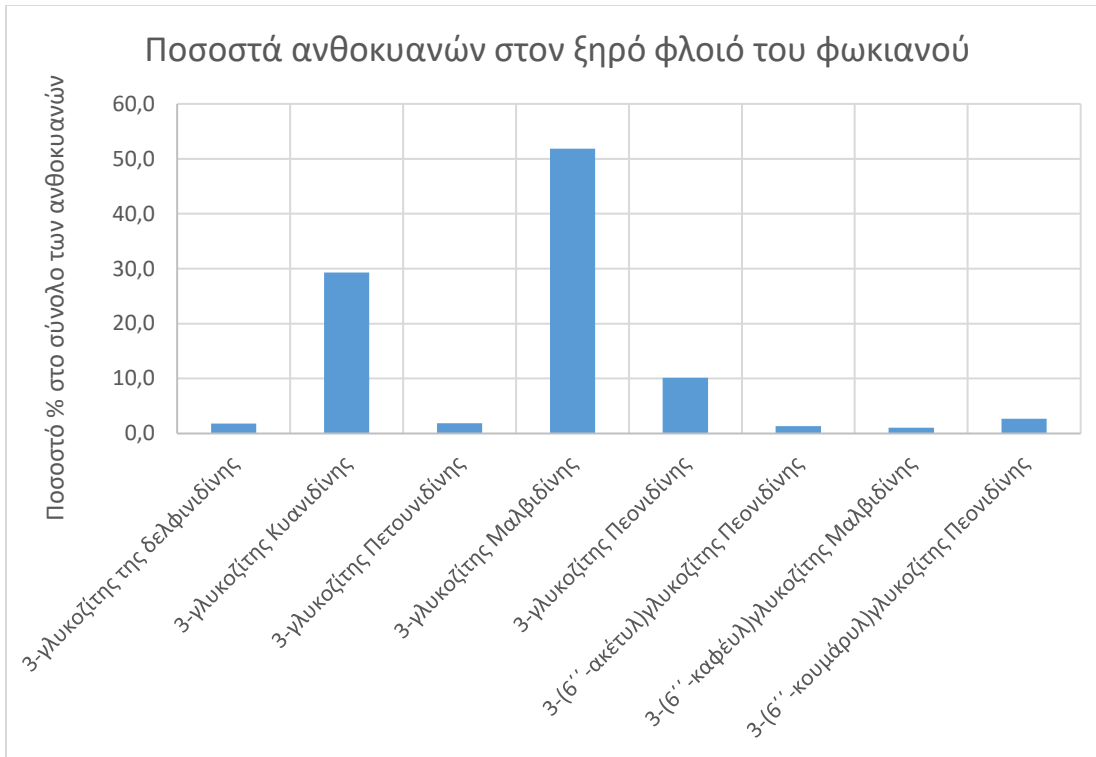


Εικόνα 17: Φάσμα του 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης στο 36,7 min από τον φλοιό της ποικιλίας Κούντουρο

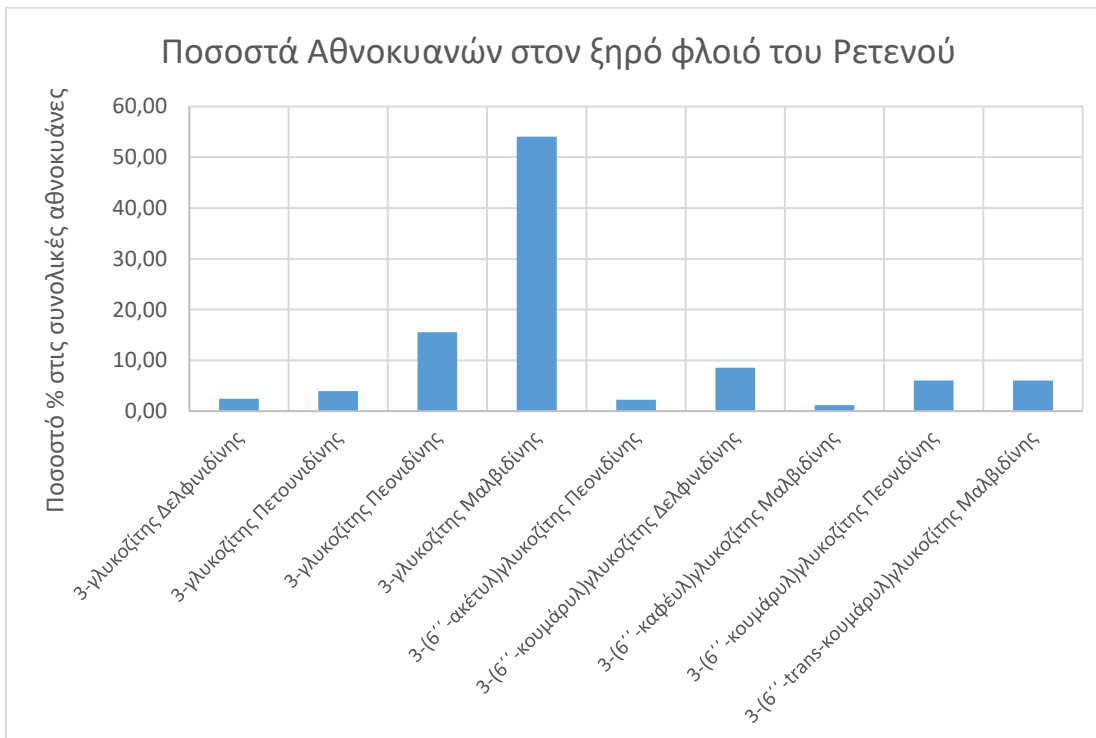
Πίνακας 7: Ταυτοποιημένες ανθοκυάνες με τον χρόνο έκλουσης αυτών και τις κορυφές των φασμάτων τους (Μπιμπίλας, 2017)

Φαινολικό συστατικό	Χρόνος έκλουσης [min]	λ_{\max} [nm]	M+ θραύσμα (m/z) και
3-γλυκοζίτης της Δελφινιδίνης	24.1	526, 346, 278	465, 303
3-γλυκοζίτης της Κυανιδίνης	27.1	516, 280	449, 287
3-γλυκοζίτης της Πετουνιδίνης	29.7	526, 350, 276	479, 317
3-γλυκοζίτης της Πεονιδίνης	33.1	518, 362, 278	463, 301
3-γλυκοζίτης Μαλβιδίνης	35.1	530, 350, 278	493, 331
3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης της Δελφινιδίνης	36.9	533, 280	507, 303
3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης της Κυανιδίνης	38.7	216, 281	491, 287
3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης της Πετουνιδίνης	41.5	528, 278	521, 317
3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης της Πεονιδίνης	48.5	526, 372, 282	505, 301
3-(6''-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Δελφινιδίνης	49.3	532, 281	611, 303
3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	50.3	530, 350, 278	535, 331
3-(6''-καφέυλ)γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	54.0	532, 282	655, 331
3-(6''-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Πετουνιδίνης	54.9	532, 282	625, 317
3-(6''-cis-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	55.5	537, 284	639, 331
3-(6''-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Πεονιδίνης	59.4	522, 282	609, 301
3-(6''-trans-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	60.9	536, 284	639, 331

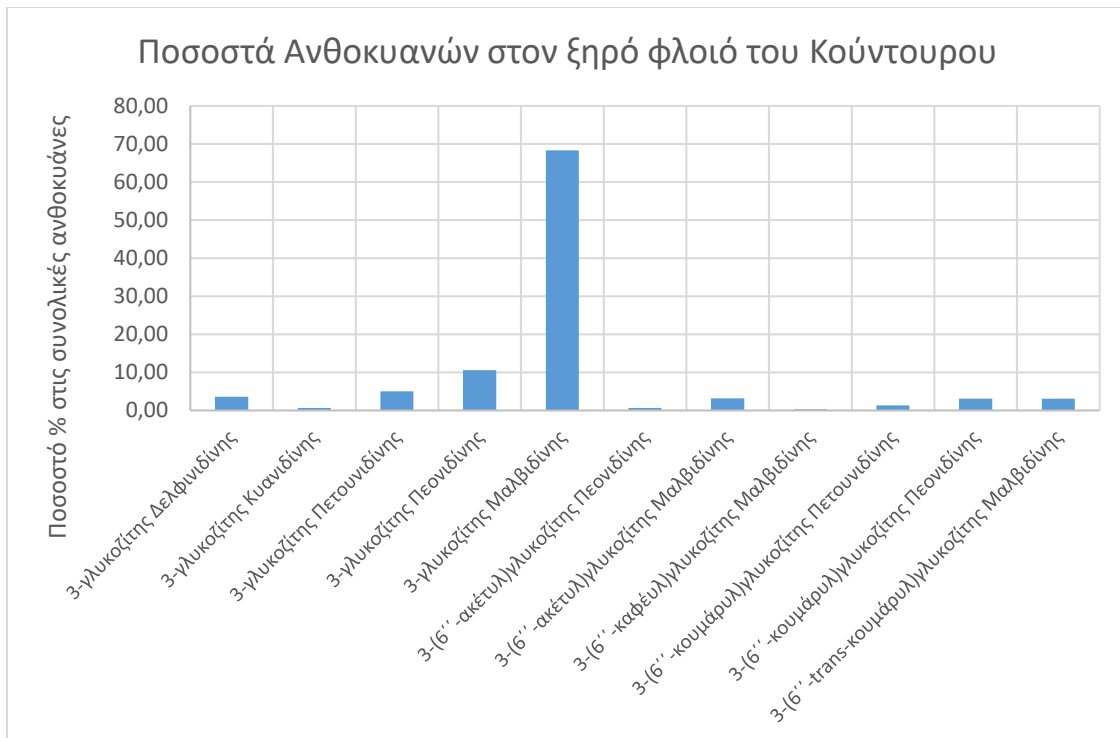
Στα διαγράμματα 4, 5 και 6 φαίνονται τα ποσοστά των ανθοκυανών στην κάθε ποικιλία όπως προέκυψαν από τον πίνακα 6.



Διάγραμμα 5: Ποσοστά ανθοκυανών στον φλοιό του φωκιανού



Διάγραμμα 6: Ποσοστά ανθοκυανών στο φλοιό του Ρετενού



Διάγραμμα 7: Ποσοστά ανθοκυανών στο φλοιό του Κούντουρου

Από τα παραπάνω διαγράμματα συμπεραίνουμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό σε ανθοκυάνες στο Κούντουρο προκύπτει σχεδόν αποκλειστικά από την αυξημένη συγκέντρωση του 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης και όχι τόσο από τον πλήθος των ανθοκυανών, το οποίο είναι αυξημένο συγκριτικά (11 διαφορετικές ενώσεις) με τις άλλες ποικιλίες (8 και 9). Συγκεκριμένα όλες οι άλλες ανθοκυάνες στο Κούντουρο εκτός του 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης, είναι σε ποσοστό χαμηλότερο ή ίσο του 10 % και προσδίδουν το 32% των συνολικών ανθοκυανών. Αντίθετα, στο φωκιανό και στο ρετενό οι υπόλοιπες ανθοκυάνες εκτός του 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης δίνουν το 48% και το 46% των συνολικών ανθοκυανών, αντίστοιχα. Επομένως το κούντουρο μπορεί να έχει πιο πολλές ανθοκυάνες αλλά αυτές βρίσκονται σε μικρά ποσοστά καθώς το προβάδισμα στη συνολική περιεκτικότητα ανθοκυανών το δίνει ο 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης.

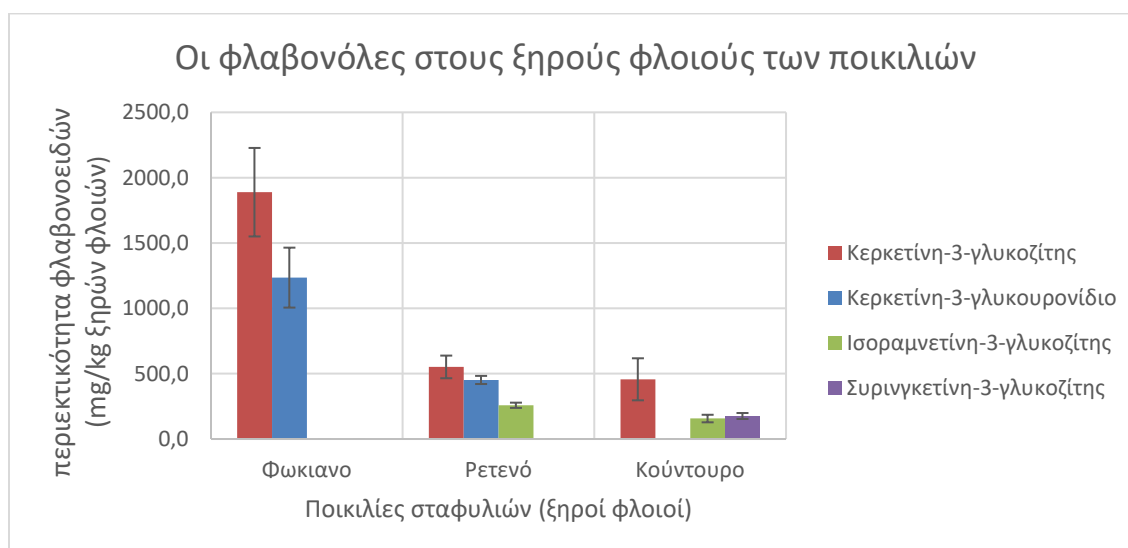
Ποσοτικοποίηση φλαβονολών με HPLC στους φλοιούς των σταφυλιών

Ο πίνακας 8 προκύπτει από τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC για τις φλαβονόλες, οι οποίες έχουν μέγιστο απορρόφησης στα 360 nm. Στα αποτελέσματα το εύρος έχει αναχθεί μέσω της καμπύλης αναφοράς της κερκετίνης σε ισοδύναμα αυτής. Οι χρόνοι έκλουσης και τα φάσματα των ουσιών χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση με τις αντίστοιχες φλαβονόλες από τον πίνακα 9.

Πίνακας 8: Περιεκτικότητες φλαβονολών (mg/kg) στους ξηρούς φλοιούς των τριών ποικιλιών

Φλαβονόλες	Φωκιανό		Ρετενό		Κούντουρο	
	mg/kg	SD	mg/kg	SD	mg/kg	SD
3-γλυκουρονίδιο της Κερκετίνης	1235.1	229.3	452.0	31.2	0.0	0.0
3-γλυκοζίτης της Κερκετίνης	1888.9	338.7	551.8	86.6	457.0	160.9
3-γλυκοζίτης της Ισοραμνετίνης	0.0	0.0	258.2	19.9	156.7	28.9
3-γλυκοζίτης της Συριγγκετίνης	0.0	0.0	0.0	0.0	176.2	22.9
Σύνολο φλαβονολών φλοιών	3124.0		1262.1		789.8	

Στο διάγραμμα 8 φαίνονται τα αποτελέσματα του πίνακα 8. Εύκολα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ποικιλία φωκιανό υπερिशύει σε περιεκτικότητα φλαβονολών, αλλά στις άλλες δύο ποικιλίες ταυτοποιήθηκαν 3 φλαβονόλες έναντι του φωκιανού όπου ταυτοποιήθηκαν δύο.



Διάγραμμα 8: Περιεκτικότητες φλαβονολών στους ξηρούς φλοιούς των τριών ποικιλιών

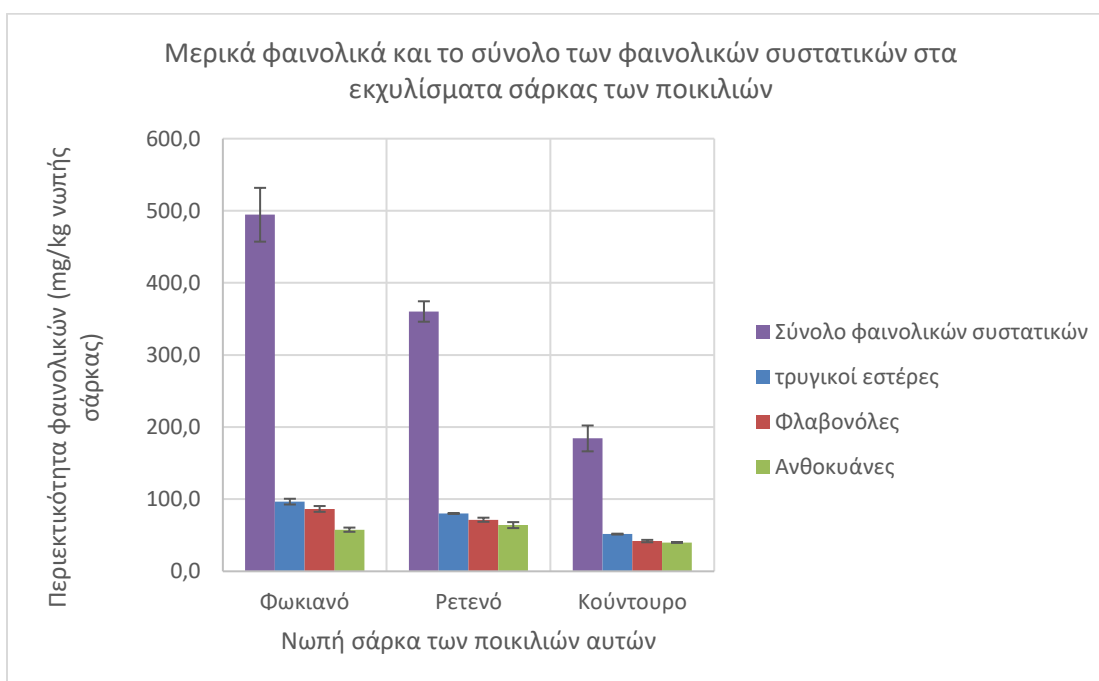
Πίνακας 9: Ταυτοποιημένες φλαβονόλες με τον χρόνο έκλουσης αυτών και τις κορυφές των φασμάτων τους (Μπιμπίλας, 2017)

Φαινολικό συστατικό Φλαβονόλες	Χρόνος έκλουσης [min]	λ_{\max} [nm]	[M-H]- και θραύσμα (m/z)
3-γλυκουρονίδιο Μυρισετίνης	27.1	260, 356	493, 317
3-γλυκοζίτης Μυρισετίνης	27.8	260, 257	479, 317
3-γλυκουρονίδιο Κερκετίνης	32.5	257, 355	477, 301
3-γλυκοζίτης Κερκετίνης	33.2	258, 354	463, 301
3-γλυκοζίτης Λαρικιτρίνης	34.5	258, 357	493, 331
Μυρισετίνη	39.0	255, 374	317
3-γλυκοζίτης Ισοραμνετίνης	40.2	255, 356	477, 315
3-γλυκοζίτης Συριγκετίνης	41.0	256, 358	507, 345
Κερκετίνη	49.4	256, 372	301

B. Αναλύσεις στα εκχυλίσματα σάρκας των τριών ποικιλιών

Ποσοτικοποίηση ολικών και μερικών φαινολικών με την μέθοδο Folin Ciocalteu και την μέθοδο του Φωτομετρικού προσδιορισμού στα εκχυλίσματα της σάρκας

Το διάγραμμα 9 προκύπτει από τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin και από τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των επιμέρους ομάδων φαινολικών συστατικών με την φασματοφωτομετρική μέθοδο στα εκχυλίσματα σάρκας των τριών ποικιλιών.



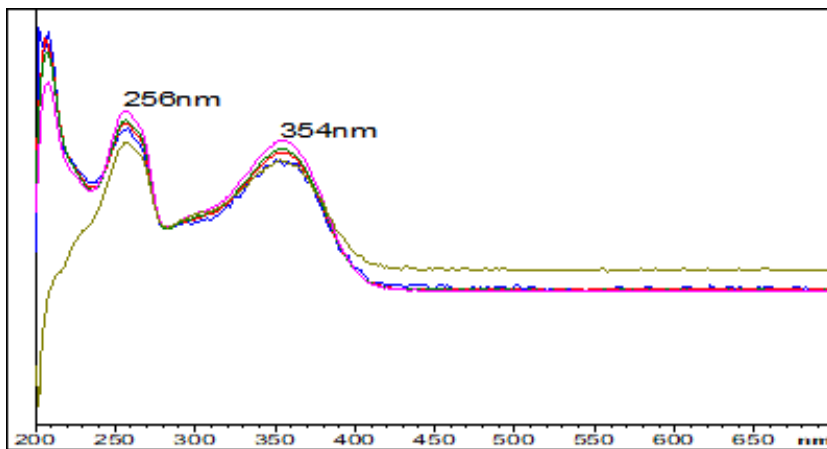
Διάγραμμα 9: Περιεκτικότητες ολικών και μερικών φαινολικών στα εκχυλίσματα σάρκας των ποικιλιών

Όπως παρατηρούμε από το διάγραμμα 9 οι ανθοκυάνες είναι σημαντικά μειωμένες στη σάρκα και για την ακρίβεια έχουν την μικρότερη περιεκτικότητα από όλα τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά. Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα την έχουν οι τρυγικοί εστέρες, με 97 mg/kg στο εκχύλισμα σάρκας του φωκιανού. Είναι φανερό επίσης ότι η ανάλυση Folin ακολουθεί την κατάταξη της φωτομετρικής μεθόδου χωρίς απαραίτητα να είναι συγκρίσιμες οι περιεκτικότητες καθώς πρόκειται για δυο διαφορετικές μεθόδους όπως προαναφέρθηκε. Οι ανθοκυάνες που ποσοτικοποιήθηκαν στη σάρκα είτε υπάρχουν φυσικά σε αυτή, καθώς όπως αναφέρθηκε παραπάνω κατ' εξαίρεση κάποιες ποικιλίες κόκκινων κρασιών έχουν ένα μικρό ποσοστό ανθοκυάνης στη σάρκα τους, είτε μεταφέρθηκαν σε αυτή κατά την χειρωνακτική απομάκρυνση

του φλοιού κατά την παραλαβή των δειγμάτων. Οι περιεκτικότητές τους πάντως είναι πολύ μικρές και δεν επιτρέπουν ποσοτικοποίηση μέσω της ανάλυσης HPLC.

Ποσοτικοποίηση φλαβονολών με HPLC στις σάρκες των σταφυλιών

Από την ανάλυση των φλαβονολών με την HPLC στα 360 nm για τις σάρκες των ποικιλιών, ταυτοποιήθηκε μόνο ο 3-γλυκοζίτης της κερκετίνης. Και ενώ για το φωκιανό και το ρετενό προέκυψαν οι συγκεντρώσεις των 2.2 ± 0.4 mg/kg και $1.653 \pm 0,001$ mg/kg εκχυλίσματος σάρκας αντίστοιχα, παρατηρείται ότι για το κούντουρο δεν ανιχνεύθηκε συγκέντρωση αυτής. Αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι δεν υπάρχει ο 3-γλυκοζίτης της κερκετίνης στο κούντουρο, απλά η συγκέντρωση του είναι μικρότερη από τα όρια ανίχνευσης αυτής της μεθόδου. Και αυτό επιβεβαιώνεται από το διάγραμμα 9 στο οποίο είναι φανερό ότι υπάρχουν φλαβονόλες στη σάρκα του Κούντουρου αλλά σε μικρότερη συγκέντρωση από τις άλλες δύο ποικιλίες.



Διάγραμμα 10: Το φάσμα του 3-γλυκοζίτη της κερκετίνης της σάρκας του Φωκιανού στο 33.5 min

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται το φάσμα της φλαβονόλης του 3-γλυκοζίτη της κερκετίνης όπως αυτό προέκυψε στην HPLC ανάλυση από το εκχύλισμα σάρκας του φωκιανού. Ο χρόνος έκλουσης ήταν 33.5 min και η ταυτοποίηση έγινε με την χρήση του πίνακα 9.

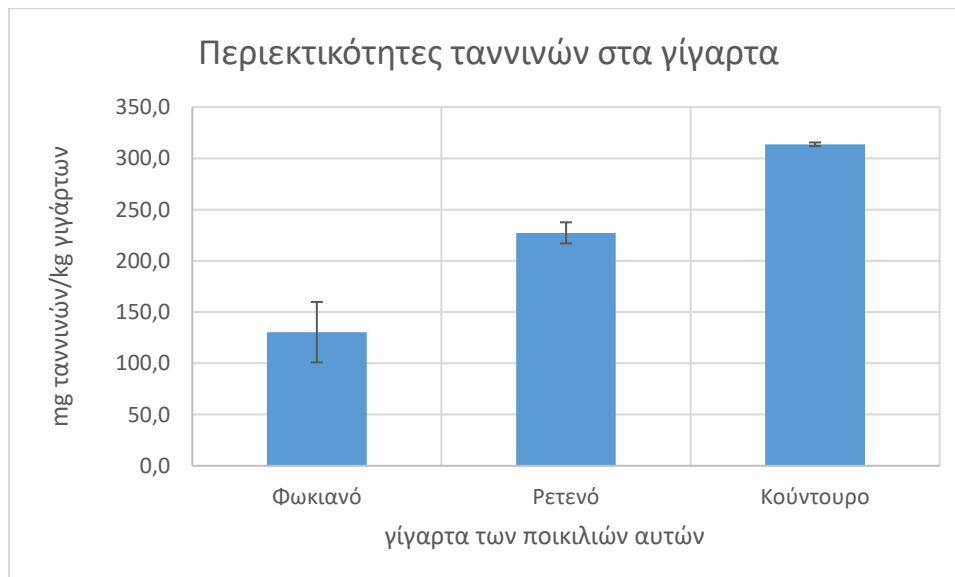
Γ. Αναλύσεις στα γίγαρτα των τριών ποικιλιών

Περιεκτικότητα γιγάρτων σε λιπαρά

Μετά την απόχυση του διαλύματος λιπιδίων και την φυσική εξάτμιση του διαλύτη εξαίνιου στον απαγωγό έγινε η ζύγιση του εναπομείναντος ελαίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τρεις ποικιλίες δεν έχουν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό του γιγαρτέλαιου που υπολογίστηκε. Το φωκιανό είχε $2.0 \pm 0.1\%$, το ρετενό είχε $1.8 \pm 0.3\%$ και το κούντουρο $3.2 \pm 0.8\%$.

Προσδιορισμός ταννινών στα γίγαρτα των ποικιλιών

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 11 το Κούντουρο είναι μια ποικιλία πιο εμπλουτισμένη σε ταννίνες συγκριτικά με τις άλλες δύο. Και σε συνδυασμό με τα προηγούμενα συμπεράσματα για αυτή την ποικιλία καταλήγουμε στο ότι το Κούντουρο είναι γενικότερα μία ποικιλία εμπλουτισμένη σε φαινολικά συστατικά.

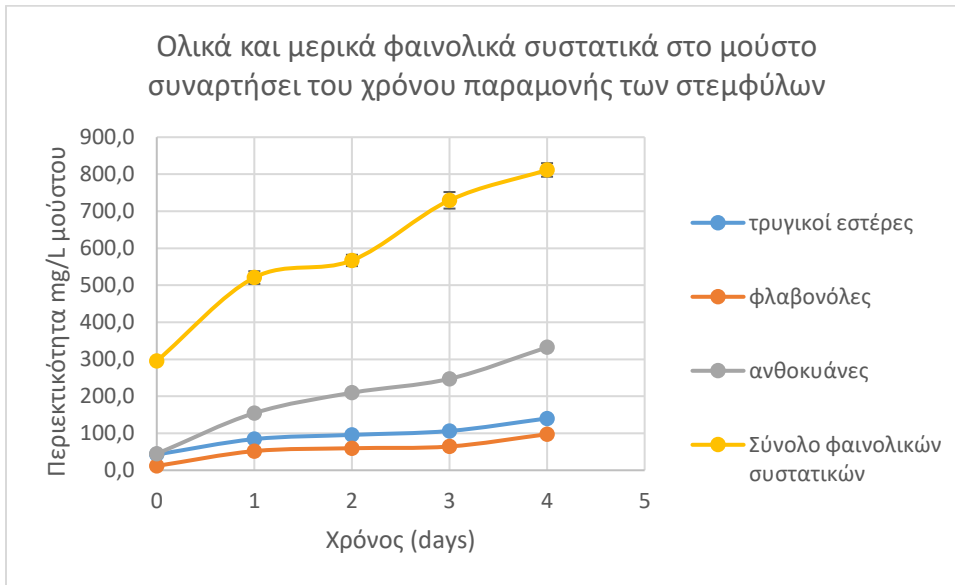


Διάγραμμα 11: Περιεκτικότητες ταννινών στα γίγαρτα των ποικιλιών

Δ. Αναλύσεις στο κοινό μούστο των τριών αυτών ποικιλιών

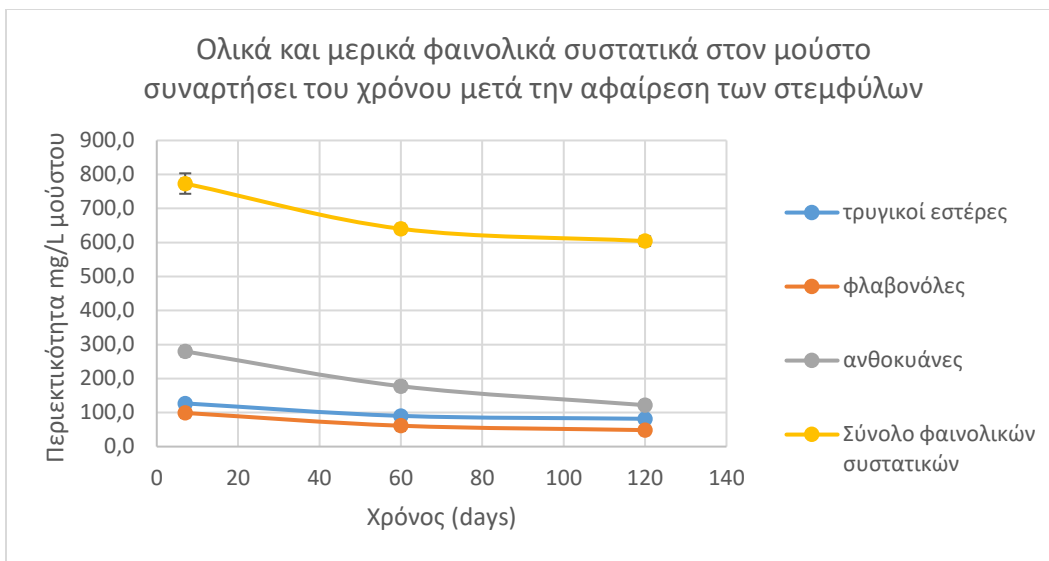
Ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών στο μούστο με την μέθοδο Folin Ciocalteu και την μέθοδο του Φωτομετρικού προσδιορισμού.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν φαίνονται οι περιεκτικότητες επί μέρους ομάδων και των ολικών φαινολικών συστατικών κατά την διάρκεια του χρόνου παραμονής των στεμφύλων στο ζυμούμενο γλεύκος, αλλά και μετά την αφαίρεση αυτών μέχρι διάστημα 120 ημερών.



Διάγραμμα 12: Περιεκτικότητες ολικών και μερικών φαινολικών συστατικών στο μούστο συναρτήσει του χρόνου παραμονής των στεμφύλων

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 12 η μέγιστη περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών είναι πράγματι την τέταρτη ημέρα παραμονής των στεμφύλων. Πιο συγκεκριμένα οι τρυγικοί εστέρες και οι φλαβονόλες φαίνονται να έχουν εκχυλιστεί στο μεγαλύτερο ποσοστό τους από την πρώτη κιόλας ημέρα, ενώ οι ανθοκυάνες έχουν σταδιακή αύξηση με μέγιστη περιεκτικότητα την τέταρτη ημέρα.



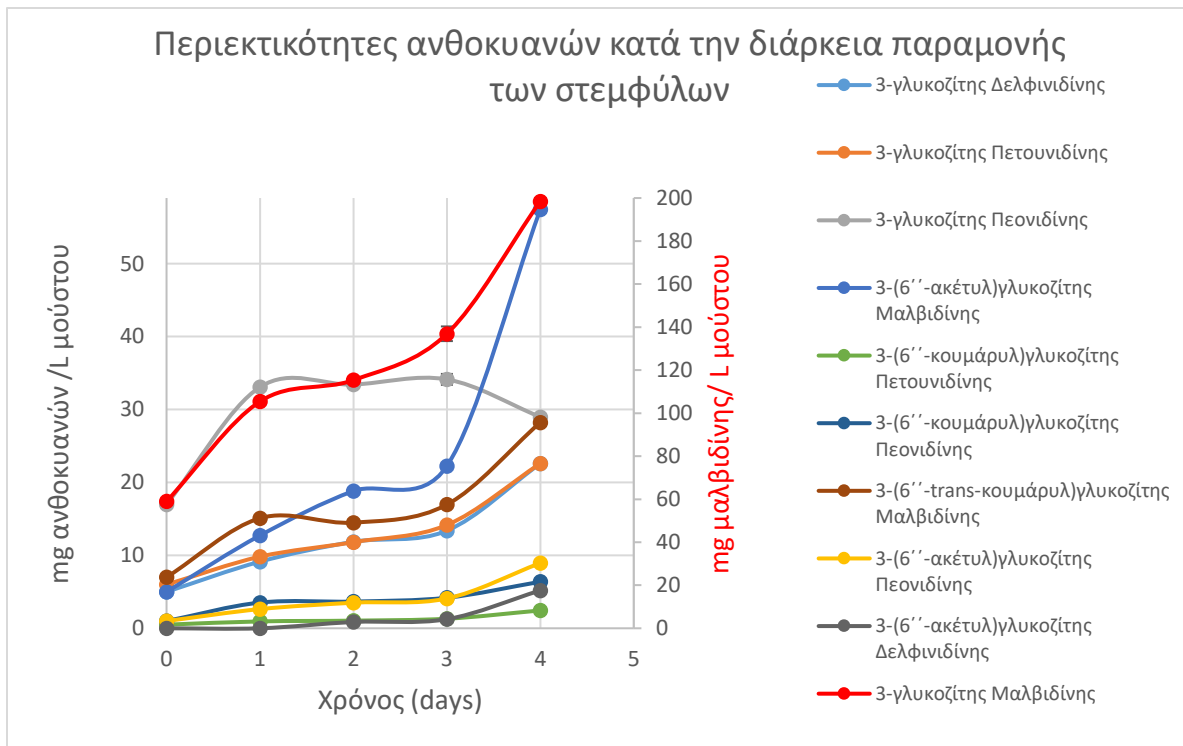
Διάγραμμα 13: Περιεκτικότητες ολικών και μερικών φαινολικών συστατικών στον μούστο συναρτήσεως του χρόνου μετά την αφαίρεση των στεμφύλων

Στο διάγραμμα 13 παρατηρείται ότι τα ολικά και μερικά συστατικά στο γλεύκος μετά την αφαίρεση των στεμφύλων μειώνονται σε περιεκτικότητα και αυτό οφείλεται σε μία σειρά αντιδράσεων που συμβαίνουν κατά την ζύμωση του γλεύκους και κυρίως κατά την ωρίμανση του κρασιού, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω:

Η μείωση των ελεύθερων ανθοκυανών οφείλεται σε αντιδράσεις πολυμερισμού και σε συμπλοκοποιήσεις των ελεύθερων ανθοκυανών και μόνο σε ένα πολύ μικρό ποσοστό σε οξειδωτικά φαινόμενα. Οι αντιδράσεις αυτές είναι οι εξής: οι μονομερείς ανθοκυάνες αντιδρούν με συμπάροντες προς σχηματισμό συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών. Μία δεύτερη αντίδραση προκύπτει όταν οι μονομερείς ανθοκυάνες αντιδρούν με φλαβαν-3-όλες (π.χ. προκυανιδίνες) προς σχηματισμό έγχρωμων πολυμερών. Η τελευταία αντίδραση μάλιστα ξεκινάει άμεσα στο κρασί. Η ακεταλδεΐδη, η οποία παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση ενεργοποιεί τις αντιδράσεις πολυμερισμού ανθοκυανών με ταννίνες. Μάλιστα παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωσή των ανθοκυανών στο κρασί υποδεκαπλασιάστηκε σε διάστημα λίγων μηνών, ακολουθώντας κινητική πρώτης τάξης. Επίσης παρατηρείται και το φαινόμενο της ενζυμικής υδρόλυσης άλλων φαινολικών συστατικών, όπως είναι οι γλυκοζίτες των φλαβονολών και οι τρυγικοί εστέρες του κρασιού, οδηγώντας στην αύξηση των συγκεντρώσεων των αντιστοίχων αγλυκονών και των κινναμικών οξέων (Μπιμπίλας, 2017).

Ποσοτικοποίηση των ανθοκυανών στο μούστο με την μέθοδο HPLC

Στα παρακάτω διαγράμματα έγινε η ποσοτικοποίηση των διάφορων ανθοκυανών κατά την διάρκεια του χρόνου παραμονής των στεμφύλων αλλά και μετά την αφαίρεση αυτών.



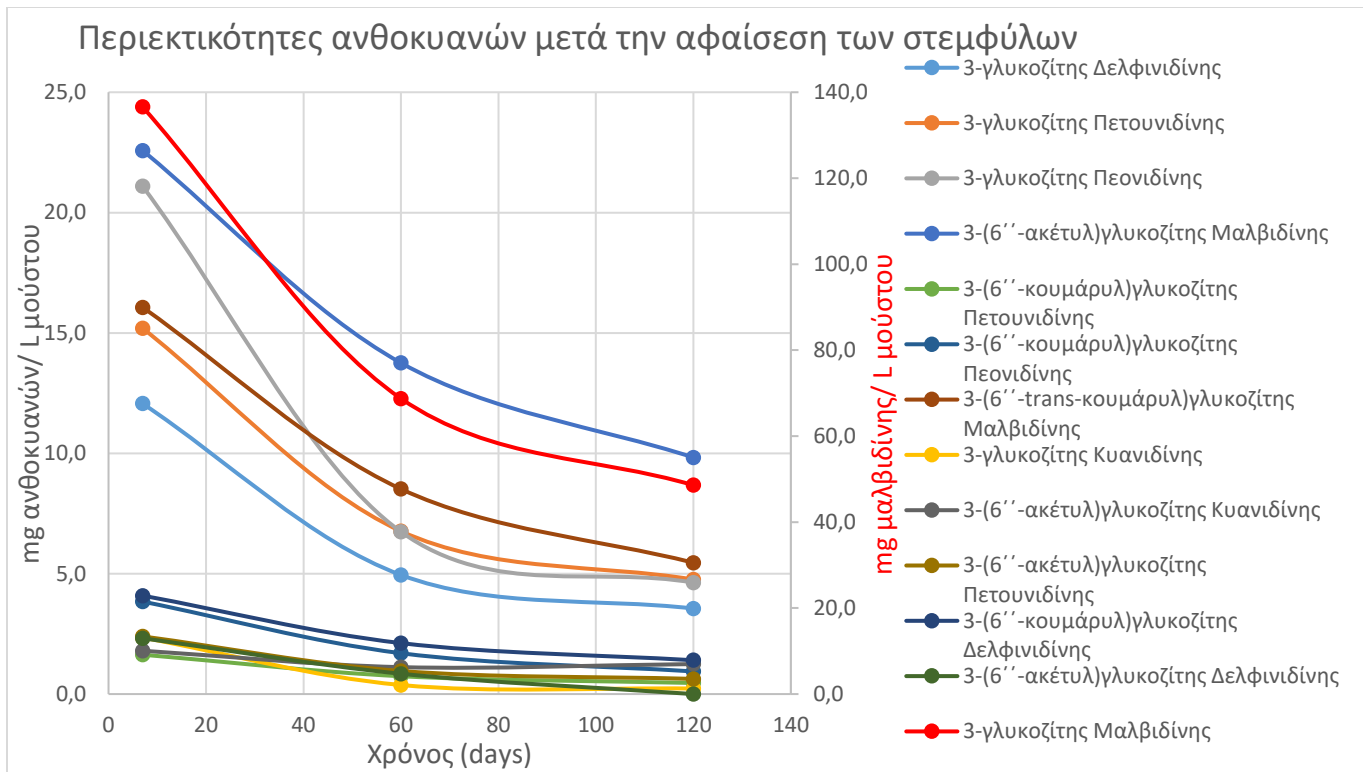
Διάγραμμα 14: Περιεκτικότητες ανθοκυανών στο μούστο κατά την διάρκεια παραμονής των στεμφύλων

Στο διάγραμμα 14 πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση κάθε ανθοκυανής στο μούστο κατά την διάρκεια παραμονής των στεμφύλων στη δεξαμενή. Παρατηρείται ότι κάποιες ανθοκυανές έχουν ταχύτερο ρυθμό εκχύλισης μετά την τρίτη ημέρα, γεγονός που σημαίνει ότι σε μεγαλύτερο χρόνο παραμονής θα μπορούσε να εκχυλιζόταν μεγαλύτερο ποσοστό αυτών. Αυτές είναι ο 3-γλυκοζίτης της μαλβιδίνης, ο 3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης της μαλβιδίνης, ο 3-γλυκοζίτης της Πετουνιδίνης και ο 3-γλυκοζίτης της Δελφινιδίνης. Στις υπόλοιπες ανθοκυανές παρατηρείται ότι από την δεύτερη ή ακόμη και την πρώτη ημέρα παραμονής σε κάποιες από αυτές έχει εκχυλιστεί το μεγαλύτερο ποσοστό. Δεδομένου ότι ο 3-γλυκοζίτης της μαλβιδίνης έχει πολύ μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες ανθοκυανές, χρησιμοποιήθηκε δευτερεύον άξονας για αυτήν. Ο άξονας αυτός είναι ο δεξιός άξονας του διαγράμματος 14 που επισημαίνεται με κόκκινο χρώμα. Ο 3-γλυκοζίτης της πεονιδίνης παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά από όλες τις υπόλοιπες ανθοκυανές. Την τέταρτη ημέρα παραμονής των στεμφύλων η περιεκτικότητά του φαίνεται να έχει μειωθεί και αυτό είτε οφείλεται σε σφάλμα των μετρήσεων είτε σε αντιδράσεις πολυμερισμού που ξεκίνησαν ήδη από την τρίτη ημέρα παραμονής των στεμφύλων. Το κοινό χαρακτηριστικό σε όλες τις υπόλοιπες τις καμπύλες του διαγράμματος 14 είναι το γεγονός ότι την τέταρτη ημέρα του χρόνου παραμονής παρατηρείται η μεγαλύτερη περιεκτικότητα του μούστου σε όλες αυτές τις ανθοκυανές. Αυτό όμως δεν σημαίνει απαραίτητα ότι την τέταρτη ημέρα εκχυλίζεται και η μέγιστη δυνατή περιεκτικότητα των ανθοκυανών στο γλεύκος.

Πίνακας 10: Ποσοστά των ανθοκυανών των φλοιών που εκχυλίστηκαν στο μούστο την τέταρτη ημέρα παραμονής των στεμφύλων πριν από την αφαίρεση των στεμφύλων.

Ανθοκυάνες	Μούστος 4 ^η ημέρα		Θεωρητική περιεκτικότητα mg ανθοκυάνης/ L μούστου			Άθροισμα	Ποσοστό που εκχυλίστηκε
	mg/kg	SD	ΦΩΚΙΑΝΟ	ΡΕΤΕΝΟ	ΚΟΥΝΤΟΥΡΟ		
3-γλυκοζίτης Δελφινιδίνης	22.6	0.1	1.9	4.2	14.6	20.7	100%
3-(6''-trans κουμάρυλ) γλυκοζίτης Μαλβιδίνης	28.2	0.2	0.0	10.5	12.4	22.9	100%
3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης Μαλβιδίνης	57.4	0.5	0.0	0.0	13.0	13.0	100%
3-γλυκοζίτης Μαλβιδίνης	198.5	1.6	55.0	94.0	275.5	424.5	47%
3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης Πεονιδίνης	8.9	0.1	1.4	3.9	2.8	8.1	100%
3-(6''-κουμάρυλ) γλυκοζίτης Πεονιδίνης	6.4	0.1	2.8	10.5	12.4	25.7	25%
3-γλυκοζίτης Πεονιδίνης	29.0	0.2	10.8	27.1	42.6	80.4	36%
3-(6''-κουμάρυλ) γλυκοζίτης Πετουνιδίνης	2.45	0.01	0.0	0.0	5.4	5.4	46%
3-γλυκοζίτης Πετουνιδίνης	22.6	0.1	2.0	6.8	20.5	29.3	77%
Σύνολο ανθοκυανών	376.1		73.9	156.9	399.1	629.9	60%

Κάτι τέτοιο φαίνεται στον πίνακα 10 όπου υπολογίστηκε το ποσοστό των ανθοκυανών που εκχυλίστηκαν στο μούστο την τέταρτη ημέρα παραμονής των στεμφύλων με μέγιστη δυνατή, την περιεκτικότητα ανθοκυανών στους ξηρούς φλοιούς. Για την θεωρητική τιμή της περιεκτικότητας κάθε ανθοκυάνης από κάθε ποικιλία στον συνολικό μούστο (Πίνακας 10,στήλη 4,5,6) χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα ποσοστών των φλοιών της ράγας κάθε ποικιλίας και θεωρήθηκε ότι κάθε ποικιλία συνεισφέρει ισόποσα στο συνολικό μούστο, ότι δηλαδή εκχυλίζει το 100% των ανθοκυανών της. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 10 το ποσοστό της κάθε ανθοκυάνης που εκχυλίζεται στο μούστο διαφέρει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ αυτών. Επιπλέον παρατηρείται ότι το συνολικό ποσοστό των ανθοκυανών που εκχυλίστηκε στο μούστο την τέταρτη ημέρα είναι το 60 % αυτών. Επομένως μία περαιτέρω παραμονή, μία ή δύο ημερών, των στεμφύλων θα εμπλούτιζε ακόμη περισσότερο το γλεύκος όχι μόνο με ανθοκυάνες αλλά και με τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά των μερών του σταφυλιού.



Διάγραμμα 15: Περιεκτικότητες ανθοκυανών μετά την αφαίρεση των στεμφύλων

Στο διάγραμμα 15 πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση κάθε ανθοκυανής στο μούστο μετά την αφαίρεση των στεμφύλων από την δεξαμενή. Όπως είναι φανερό οι περιεκτικότητες όλων των ανθοκυανών έχουν καθοδική πορεία καθώς συμβαίνουν οι αντιδράσεις πολυμερισμού όπως προαναφέρθηκε. Είναι εμφανές ότι οι ανθοκυανές με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα εμφανίζουν ταχύτερο ρυθμό πολυμερισμού και αυτό είναι λογικό, καθώς ο ρυθμός πολυμερισμού εξαρτάται από τη συγκέντρωση.

Ε. Μελέτη της ζύμωσης με 4 είδη ζυμών και σύγκριση των τεσσάρων φρέσκων κρασιών

Ημέρες Ζύμωσης, αλκοολικοί βαθμοί, ανάγοντα σάκχαρα, διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο και Πυκνότητα στα τέσσερα φρέσκα κρασιά

Για την απλοποίηση της παρουσίασης των αποτελεσμάτων τα φρέσκα κρασιά θα σημειώνονται στους πίνακες των αποτελεσμάτων ως εξής: το κρασί που προκύπτει με την ζύμωση των γηγενών ζυμών θα συμβολίζεται ως Γ.Ζ, ενώ τα κρασιά που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των επιλεγμένων ζυμών *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima* και *Torulasporea delbrueckii* θα συμβολίζονται ως S.C, M.P, και T.P αντίστοιχα, δηλαδή με τα αρχικά της κάθε ζύμης. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω προκύπτουν από μετρήσεις που έγιναν πριν την έναρξη και μετά την λήξη της ζύμωσης. Στον πίνακα 11 παρουσιάζονται διάφορα χαρακτηριστικά των φρέσκων κρασιών.

Πίνακας 11: Ημέρες Ζύμωσης, αλκοολικός βαθμός, ανάγοντα σάκχαρα, διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο και πυκνότητα των τεσσάρων φρέσκων κρασιών

Δείγμα	Ημέρες Ζύμωσης	Αλκοολικοί βαθμοί (% v/v)	Ανάγοντα σάκχαρα (g/L)	Διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο (mg/L)	Πυκνότητα (ειδικό βάρος) (g/L)
T.D	28	13.0	4.4±0.0	33.1±6.4	0.997
S.C	24	12.8	1.6±0.0	24.1±2.6	0.992
Γ.Ζ	24	13.4	4.6±0.4	21.4±3.9	0.992
M.P	25	13.4	2.2±0.6	13.7±0.9	0.990

Το κρασί που προκύπτει με την ζύμωση των γηγενών ζυμών συμβολίζεται ως Γ.Ζ, ενώ τα κρασιά που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των επιλεγμένων ζυμών *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* συμβολίζονται ως S.C, M.P, και T.P, αντίστοιχα.

Όπως παρατηρείται το κρασί που ζυμώθηκε με τις γηγενείς ζύμες και το κρασί που ζυμώθηκε με την *M. pulcherrima* κατάφεραν να φτάσουν στο ίδιο και μεγαλύτερο από τα άλλα δύο κρασιά αλκοολικό βαθμό, στους 13.4 % (v/v), γεγονός που επιβεβαιώνει το δυνατότητα των γηγενών ζυμών να δημιουργήσουν υψηλόβαθμο κρασί. Το γεγονός αυτό επίσης αποδεικνύει ότι σε αντίθεση με την βιβλιογραφία οι *non-Saccharomyces* ζύμες δείχνουν αντοχή στην αιθανόλη και έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν σε ζυμώσεις μέχρι και 13.4% (v/v). Παρατηρείται επίσης ότι το κρασί που ζυμώθηκε με τις γηγενείς ζύμες και το κρασί που ζυμώθηκε με την *M. pulcherrima* χαρακτηρίζονται και από τη μικρότερη περιεκτικότητα σε διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο. Αυτό σημαίνει ότι η περιεκτικότητα των μεμονωμένων αμινοξέων και των μικρών πεπτιδίων, τα οποία χρησιμοποιούνται από τις ζύμες για κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό, έχουν εξαντληθεί σε μεγαλύτερο βαθμό από αυτές τις ζύμες. Η πυκνότητα είναι παρόμοια και στα τέσσερα κρασιά, ενώ τα ανάγοντα σάκχαρα σημειώνουν μεγαλύτερες περιεκτικότητες στο κρασί που ζυμώθηκε με την *T. delbrueckii* και στο κρασί που ζυμώθηκε με τις γηγενείς ζύμες. Οι αρχικές τιμές της περιεκτικότητας του μούστου σε ανάγοντα σάκχαρα και

διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο ήταν 206.0 ± 0.0 g/L και 68.2 ± 8.6 mg/L, αντίστοιχα, ενώ η πυκνότητα ήταν 1.083 g/L. Οι ημέρες ζύμωσης υπολογίστηκαν παρατηρώντας τις φιάλες και σημειώνοντας την ημέρα που σταματάει ο αφρισμός, προέκυψαν δηλαδή παρατηρώντας την ζύμωση και όχι μετρώντας την κατανάλωση των σακχάρων καθημερινά, και αυτό έγινε για την αποφυγή επιμόλυνσης της ζύμωσης. Βέβαια οι ημέρες ζύμωσης και το ελεύθερο αμμωνιακό άζωτο όπως υπολογίστηκαν συμφωνούν και με άλλες έρευνες που έγιναν στο εργαστήριο με ζυμώσεις των ίδιων ζυμών. Παρακάτω παρατίθενται δεδομένα για την ζύμωση μπύρας με τις ίδιες ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική (Αναστασάκου-Παρασκευοπούλου, 2018).

Πίνακας 12: Ημερήσια καταγραφή της πυκνότητας των σακχάρων και του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου σε ζύμωση μπύρας με τις τρεις ζύμες της παρούσας διπλωματικής

	S.C	T.D	M.P	S.C	T.D	M.P
Χρόνος (h)	Πυκνότητα των σακχάρων g/L			Διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο mg/L		
0	12.6	12.6	12.6	124.37	124.37	124.37
14	10.3	11.5	12.6	44.16	123.76	74.62
38	4.6	11	12.1	28.33	121.80	44.67
61	3.7	10.7	6.5	31.60	108.62	44.60
86	3.4	10.8	5.6	26.96	121.88	37.13
110	3.7	10.7	5.7	23.96	117.84	39.23
133	3.3	10.7	5.7	34.20	118.54	38.14
156	3.3	10.2	5.7	33.38	102.95	37.71
180	-	8.1	-	-	99.38	-
208	-	5.25	-	-	80.92	-
232	-	5.1	-	-	73.62	-
256	-	4.3	-	-	74.94	-
280	-	4.3	-	-	72.85	-

Το κρασί που προκύπτει με την ζύμωση των γηγενών ζυμών συμβολίζεται ως Γ.Ζ, ενώ τα κρασιά που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των επιλεγμένων ζυμών *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* συμβολίζονται ως S.C, M.P, και T.P, αντίστοιχα

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 12 η ζύμη *T. delbrueckii* έχει αργό ρυθμό ζύμωσης καθώς χρειάστηκε πολύ περισσότερο χρόνο για να μετατρέψει την ίδια ποσότητα σακχάρων σε αλκοόλ συγκριτικά με τις άλλες ζύμες, συγκεκριμένα χρειάστηκε 208 ώρες για να φτάσει στην ίδια συγκέντρωση που η *M. Pulcherrima* έφτασε σε 86 ώρες. Επίσης η ίδια αφήνει και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο συγκριτικά με τις υπόλοιπες ζύμες, και για την ακρίβεια 72.85 mg/L έναντι 33-38 που άφησαν οι άλλες ζύμες. Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και στο πείραμα της παρούσας διπλωματικής καθώς η ζύμη *T. Delbrueckii* ζύμωσε πιο αργά το κρασί συγκριτικά με τις άλλες ζύμες και για την ακρίβεια χρειάστηκαν 28 ημέρες έναντι των 24-25 που χρειάστηκαν οι υπόλοιπες ζύμες για να ολοκληρώσουν την αλκοολική ζύμωση. Επίσης η *T. Delbrueckii* άφησε και την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο και συγκεκριμένα 33.1 mg/L.

pH, ολική οξύτητα, φαινολικά και αντιοξειδωτικά συστατικά, και χρώμα των φρέσκων κρασιών

Στον πίνακα 13 αναγράφονται τα αποτελέσματα για το pH και την ολική οξύτητα των κρασιών που παράχθηκαν εργαστηριακά.

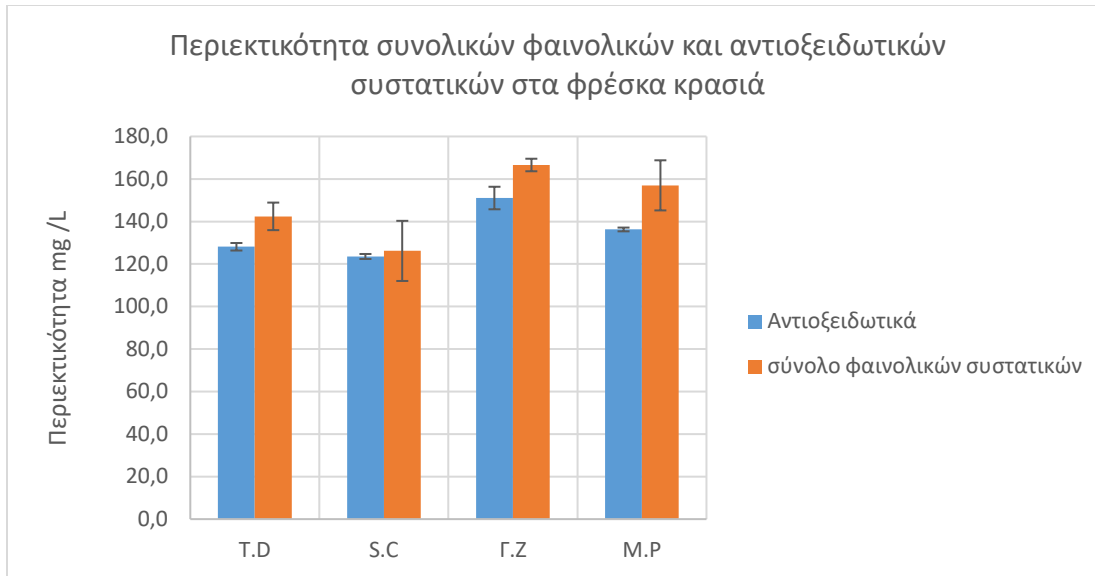
Πίνακας 13: pH και ολική οξύτητα των τεσσάρων φρέσκων κρασιών

Δείγμα	pH	Ολική Οξύτητα
T.D	3.4	164.2±1.3
S.C	3.5	139.3±0.7
Γ.Z	3.4	135.1±2.7
M.P	3.5	143.5±0.0

Το κρασί που προκύπτει με την ζύμωση των γηγενών ζυμών συμβολίζεται ως Γ.Ζ, ενώ τα κρασιά που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των επιλεγμένων ζυμών *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* συμβολίζονται ως S.C, M.P, και T.P, αντίστοιχα.

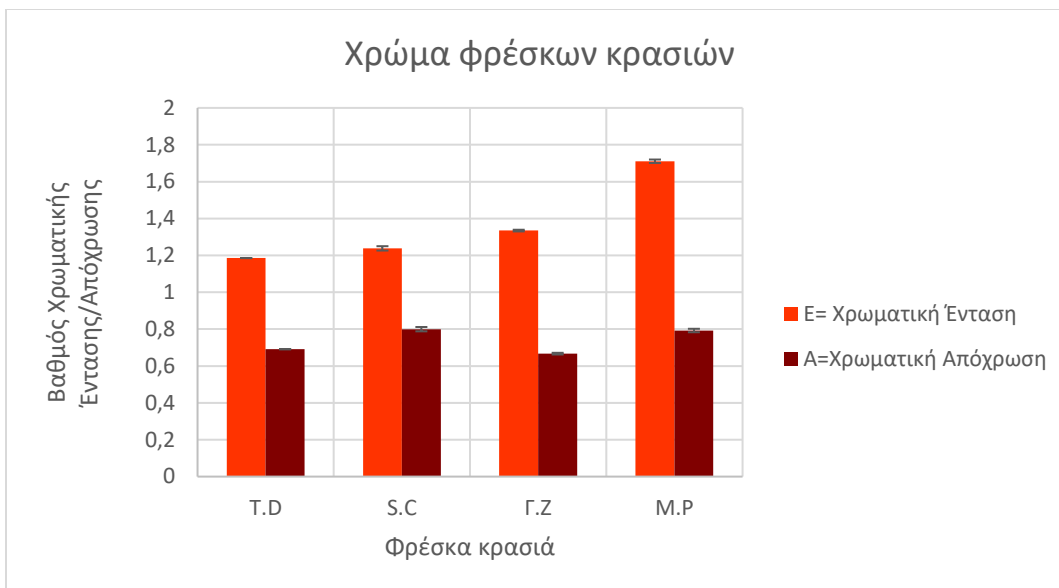
Στον πίνακα 13 παρατηρείται όμοιο pH και στα τέσσερα κρασιά, καθώς και στον αρχικό μούστο που βρέθηκε ίσο με 3.4. Η ολική οξύτητα παρατηρείται φανερά αυξημένη στο κρασί που ζυμώθηκε με την *T. Delbrueckii*, αμέσως μετά μεγαλύτερη έρχεται η ολική οξύτητα του κρασιού που ζυμώθηκε με την *M. Pulcherrima*, ενώ το κρασί που ζυμώθηκε με τις γηγενείς ζύμες και το κρασί που ζυμώθηκε με τον *S. cerevisiae* κυμαίνονται στο ίδιο επίπεδο. Αυτό σημαίνει ότι η περιεκτικότητα του τρυγικού οξέος στο κρασί με τις γηγενείς ζύμες είναι συγκριτικά χαμηλότερη από τα κρασιά με τις επιλεγμένες ζύμες, με το κρασί που ζυμώθηκε με τον *S. cerevisiae* να το πλησιάζει.

Στο διάγραμμα 16 παρουσιάζονται για τα ολικά φαινολικά και τα αντιοξειδωτικά συστατικά που μετρήθηκαν στα κρασιά που παράχθηκαν εργαστηριακά.



Διάγραμμα 16: Περιεκτικότητες συνολικών φαινολικών (mg GAE/L) και αντιοξειδωτικών συστατικών στα φρέσκα κρασιά

Είναι φανερό ότι το κρασί που προκύπτει από τις γηγενείς ζύμες έχει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ενώ το κρασί που ζυμώθηκε με την *M. pulcherrima* το πλησιάζει. Γεγονός που για ακόμη μία φορά επιβεβαιώνει την ιδιαιτερότητα των γηγενών ζυμών. Τα φαινολικά συστατικά έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα δύο προαναφερόμενα κρασιά ενώ το κρασί που ζυμώθηκε με την *T. delbrueckii* και το κρασί που ζυμώθηκε με τον *S. cerevisiae* έχουν μικρότερες και συγκρίσιμες μεταξύ τους περιεκτικότητες σε φαινολικά συστατικά. Οι διαφοροποιήσεις σε αυτές τις περιεκτικότητες έγκεινται στη δραστηριότητα των ζυμών καθώς και τα τέσσερα κρασιά προήλθαν από κοινό μούστο με ίδια ποσότητα φαινολικών συστατικών.



Διάγραμμα 17: Χρωματική Ένταση και Απόχρωση στα φρέσκα κρασιά

Στο διάγραμμα 17 είναι φανερό ότι το κρασί που ζυμώθηκε με την *M. pulcherrima* έχει τον μεγαλύτερο βαθμό χρωματικής έντασης και χρωματικής απόχρωσης, αυτό σημαίνει ότι ο οίνος αυτός είναι και πιο σκουρόχρωμος αλλά και πιο καφέ, δηλαδή χρωματικά εξελιγμένος, συγκριτικά με τα υπόλοιπα φρέσκα κρασιά. Συνήθως το εύρος τιμών της Έντασης κυμαίνεται μεταξύ 4 και 20. Στο διάγραμμα 17 όμως παρατηρούνται τιμές μικρότερες του 4 γεγονός που οφείλεται στο ότι τα κρασιά είναι πολύ φρέσκα και δεν έχουν προλάβει να εξελιχθούν χρωματικά. Το εύρος τιμών της Απόχρωσης κυμαίνεται μεταξύ 0.5 και 1.5. Οι τιμές του διαγράμματος για τα τέσσερα κρασιά είναι εντός των ορίων και μάλιστα είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους.

Ποσοτικοποίηση ανθοκυανών με HPLC στα τέσσερα φρέσκα κρασιά

Στον πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση HPLC που έγινε στα κρασιά που παράχθηκαν εργαστηριακά. Πιο συγκεκριμένα έγινε η ποσοτικοποίηση των διαφόρων ανθοκυανών και η σύγκρισή τους μεταξύ των τεσσάρων κρασιών.

Πίνακας 14: Περιεκτικότητες ανθοκυανών στα τέσσερα φρέσκα κρασιά

Ανθοκυάνες	Περιεκτικότητες ανθοκυανών (mg/L κρασιού)							
	M.P	SD	S.C	SD	T.D	SD	Γ.Z	SD
3-γλυκοζίτης της Δελφινιδίνης	0.28	0.02	0.54	0.02	0.68	0.01	0.58	0.03
3-(6''-trans-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	2.06	0.06	2.66	0.07	2.47	0.02	1.91	0.09
3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	0.00	0.00	1.39	0.01	0.98	0.01	0.51	0.70
3-(6''-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Πεονιδίνης	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.01
3-γλυκοζίτης Μαλβιδίνης	17.08	0.19	20.50	0.27	16.73	0.01	16.72	0.35
3-γλυκοζίτης της Κυανιδίνης	0.00	0.00	0.00	0.00	0.95	0.01	0.12	0.01
3-γλυκοζίτης της Πεονιδίνης	1.41	0.02	2.05	0.03	4.77	0.02	2.46	0.06
3-γλυκοζίτης της Πετουνιδίνης	0.79	0.02	1.14	0.04	1.04	0.01	0.98	0.03
Σύνολο	21.62		28.28		27.62		23.46	

Το κρασί που προκύπτει με την ζύμωση των γηγενών ζυμών συμβολίζεται ως Γ.Ζ, ενώ τα κρασιά που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των επιλεγμένων ζυμών *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* συμβολίζονται ως S.C, M.P, και T.P, αντίστοιχα.

Στον πίνακα 14 παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες την έχει το κρασί που ζυμώθηκε με τον *S. Cerevisiae*, κάτι μη αναμενόμενο καθώς από την ανάλυση Folin (διάγραμμα 16) είχε βρεθεί ότι το κρασί με τις γηγενείς ζύμες ήταν το πιο πλούσιο σε φαινολικά συστατικά. Η διαφοροποίηση επομένως οφείλεται στα υπόλοιπα φαινολικά εκτός των ανθοκυανών. Ωστόσο το κρασί των γηγενών ζυμών υπερέχει σε αριθμό ανθοκυανών καθώς έχει ταυτοποιηθεί με 8 ανθοκυάνες σε σχέση με τα άλλα κρασιά στα οποία ταυτοποιήθηκαν με μικρότερο πλήθος ανθοκυανών.

Πίνακας 15: Σύγκριση περιεκτικότητας σε ανθοκυάνες στο κρασί του εργαστηρίου και στο κρασί του οινοποιείου.

Ανθοκυάνες	Περιεκτικότητες ανθοκυανών (mg/L κρασιού)			
	Γ.Ζ(εργαστηρίου)	Σφάλμα	Γ.Ζ(οινοποιείου)	Σφάλμα
3-γλυκοζίτης της Δελφινιδίνης	0.58	0.03	4.95	0.01
3-(6''-trans-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	1.91	0.09	8.52	0.04
3-(6''-ακέτυλ)γλυκοζίτης της Μαλβιδίνης	0.51	0.70	13.76	0.01
3-(6''-κουμάρυλ)γλυκοζίτης της Πεονιδίνης	0.19	0.01	1.70	0.03
3-γλυκοζίτης Μαλβιδίνης	16.72	0.35	68.75	0.02
3-γλυκοζίτης της Κυανιδίνης	0.12	0.01	0.38	0.01
3-γλυκοζίτης της Πεονιδίνης	2.46	0.06	6.74	0.00
3-γλυκοζίτης της Πετουνιδίνης	0.98	0.03	6.77	0.02
Σύνολο	23.46		111.56	
Ποσοστό	21%			

Το κρασί που προκύπτει με την ζύμωση των γηγενών ζυμών συμβολίζεται ως Γ.Ζ.

Το φρέσκο κρασί των γηγενών ζυμών ενός μήνα του εργαστηρίου συγκρίθηκε με το φρέσκο κρασί των γηγενών ζυμών δύο μηνών του οινοποιείου. Η σύγκριση αυτή φαίνεται παρακάτω στον πίνακα 15. Η δραστηριότητα των ζυμών επηρεάζει την περιεκτικότητα και την ποικιλία των ανθοκυανών καθώς τα δυο κρασιά παρουσιάζουν την ίδια ποικιλία ανθοκυανών άλλα σε διαφορετική περιεκτικότητα. Όπως είναι φανερό, όλες οι ανθοκυάνες στο κρασί του εργαστηρίου έχουν αρκετά μειωμένες περιεκτικότητες σε σχέση με αυτό του οινοποιείου. Το ποσοστό των ανθοκυανών που τελικά παρέμεινε στα εργαστηριακά κρασιά ήταν μόλις το 21% σε σχέση με το ποσοστό των ανθοκυανών που παράχθηκε στο οινοποιείο. Αυτή η διαφορά έγκειται στο γεγονός τόσο της ποσότητας του γλεύκους που ζυμώθηκε εργαστηριακά (1 L) όσο και στο γεγονός την εξάμηνη αποθήκευση του μούστου στην κατάψυξη πριν την έναρξη της εργαστηριακής του ζύμωσης. Αυτό πιθανώς να κατέστρεψε ένα ποσοστό των ανθοκυανών. Επιπλέον μπορεί να οφείλεται και σε εργαστηριακό σφάλμα καθώς δεν συνάδει με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της Folin για τα ολικά φαινολικά συστατικά και της ανάλυσης του χρώματος των κρασιών η οποία συνδέεται άμεσα με το ποσοστό των ανθοκυανών.

Αρωματικά συστατικά στα τέσσερα κρασιά

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι περιεκτικότητες των αρωματικών συστατικών σε mg/L διαχωρισμένες σε ομάδες χημικών ενώσεων για τα τέσσερα φρέσκα κρασιά που παράχθηκαν εργαστηριακά. Οι πιο βασικές ομάδες αρωματικών χημικών ενώσεων στα κρασιά είναι όπως προαναφέρθηκε, οι αλκοόλες, οι εστέρες και τα λιπαρά οξέα.

Στον πίνακα 16 παρουσιάζεται η πρώτη και μεγαλύτερη κατηγορία αρωματικών ενώσεων του κρασιού, κι αυτή είναι οι αλκοόλες, οι οποίες αποτελούν περίπου το 50 % των αρωματικών ενώσεων, μη συμπεριλαμβανομένης της αιθανόλης. Όπως προαναφέρθηκε οι αλκοόλες συνεισφέρουν περισσότερο στην ένταση του αρώματος του οίνου παρά στην ποιότητά του. Αυτό σημαίνει ότι μεγαλύτερη συγκέντρωση αλκοολών προκαλεί αρνητικά αποτελέσματα στο άρωμα του οίνου.

Πίνακας 16: Περιεκτικότητες αλκοολών ως αρωματικές ενώσεις στα κρασιά

Αλκοόλες	Περιεκτικότητα mg/L			
	M.P	S.C	T.D	Γ.Z
1-Heptanol	0.02	0.03		
1-Hexadecanol	0.06	0.15	0.07	0.04
1-Hexanethiol, 2-ethyl-			0.06	
1-Hexanol	0.36	0.55	0.68	0.52
Tryptophol Acetate			1.51	
2,3-Butanediol #		0.47		
2-Ethylhexanol				0.01
2-Hexadecanol	0.01	0.01		

2-Methylhexadecan-1-ol			0.01	0.06
3-(Methylthio)propanol, Methionol	0.27	0.47	0.75	0.10
3-Hexenol	0.03	0.07	0.08	0.07
3-Methylpentanol	0.02	0.03		0.03
3-Octanol	0.50	0.50	0.50	0.50
Active amyl alcohol	0.39	0.93	0.48	0.48
cis-3-Hexenol, E-3-Hexenol		0.07		
Ethylhexanol		0.02		
4-methyl-1-pentanol (Isohexyl alcohol)	0.004			0.01
Isoamyl alcohol	8.10	12.73	14.47	9.99
2,4-di-t-butylphenol				0.04
Phenylethyl Alcohol	16.67	23.26	40.46	22.60
Propylene glycol ethyl ether		0.05		
trans-3-Hexenol			0.03	0.03
Tryptophol	1.60	2.39	0.93	1.58

Το κρασί που προκύπτει με την ζύμωση των γηγενών ζυμών συμβολίζεται ως Γ.Ζ, ενώ τα κρασιά που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των επιλεγμένων ζυμών *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* συμβολίζονται ως Σ.Σ, Μ.Ρ, και Τ.Ρ, αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 16 τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε αλκοόλες τις έχει το κρασί Μ.Ρ και αυτό των γηγενών ζυμών. Για την ακρίβεια παρουσιάζουν αθροιστικά 28.04 mg/L και 36.05 mg/L, αντίστοιχα. Το κρασί που ζυμώθηκε με την *T. delbrueckii* σημειώνει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αλκοόλες και ίση με 60.03 mg/L. Επιπλέον εμφανίζει κάποιες ουσίες οι οποίες δεν βρέθηκαν στα άλλα κρασιά και αυτές είναι η 1-Hexanethiol, 2-ethyl- και η Tryptophol Acetate. Η τελευταία μάλιστα, η οποία συνεισφέρει αρνητικά στο άρωμα με οσμές ζωικές και κοπριάς (πίνακας 21), παρουσιάζει αξιοσημείωτη περιεκτικότητα, και ίση με 1.51 mg/L. Μια περιεκτικότητα αρκετά υψηλή, αν ληφθεί υπόψιν το γεγονός ότι η πλειοψηφία των ουσιών παρουσιάζει περιεκτικότητες κάτω των 0.5 mg/L. Σε αντίθεση με την πλειοψηφία υπάρχουν τρεις αλκοόλες που σημειώνουν μεγάλες συγκεντρώσεις και στα τέσσερα κρασιά. Αυτές είναι η ισοαμυλική αλκοόλη, η Phenylethyl Alcohol και η τρυπτοφόλη (Tryptophol). Ανάμεσα σε αυτές η Phenylethyl Alcohol έχει τις υψηλότερες περιεκτικότητες και στο κρασί που ζυμώθηκε με την *T. delbrueckii* φτάνει τα 40.46 mg/L. Αυτό σημαίνει ότι το 67% των συνολικών αλκοολών (εκτός αιθανόλης) σε αυτό το κρασί προέρχονται από αυτήν την αλκοόλη, η οποία προσδίδει στο κρασί (πίνακας 21) αρώματα από λουλούδια, τριαντάφυλλο και μέλι.

Στον πίνακα 17 παρουσιάζονται οι εστέρες που βρέθηκαν σαν αρωματικές ουσίες στα τέσσερα κρασιά.

Πίνακας 17: Περιεκτικότητες σε εστέρες ως αρωματικές ενώσεις στα κρασιά

Εστέρες	Περιεκτικότητα mg/L			
	M.P	S.C	T.D	Γ.Z
2-Methyl-3-thiolanone		0.04		
2-Methylbutyl acetate				0.19
4-Methyldecane			0.04	
5-Methyldecane			0.04	
Acetaldehyde ethyl amyl acetal	0.01			0.01
Active amyl acetate	0.07			
Banana oil	0.15	0.25	0.49	0.27
Bisomel , Isopropyl myristate	0.01	0.01	0.02	0.01
Butylated Hydroxytoluene	3.38	4.53	4.22	3.87
Butylphen				0.01
Ethyl butyrate, Ethyl butanoate	0.04	0.09		0.11
Ethyl caprate	0.06	0.12		0.27
Ethyl caproate	0.11	0.15	0.15	0.33
Ethyl caprylate	0.91	1.14	0.21	1,22
Ethyl dec-9-enoate	0.06			
Ethyl dodecanoate	0.02			0.05
Ethyl hexadecanoate		0.06		0.04
Ethyl isobutyrate			0.04	
Ethyl stearate		0.08		
Ethyl β-hydroxybutyrate	0.01	0.02		0.01
Geranyl isovalerate	0.02	0.06		
2-Octadecoxyethyl hexadecanoate				0.07
Hexyl acetate	0.03			
Isopropyl (propyl) disulfide		0.17	0.10	0.20
dodecanoic acid, 1-methylethyl ester (Isopropyl laurate)	0.01			
Methyl 10-octadecenoate		0.08		
Methyl hexadecanoate	0.08	0.09		0.07
Monoethyl succinate	0.09	0.51		0.20
Myristyl monoethoxylate		0.05		
Oleic acid, 3-(octadecyloxy)propyl ester	0.02	0.30		
(β) Phenethyl acetate	0.05	0.22	0.40	0.32
Actylol		0.07		

Το κρασί που προκύπτει με την ζύμωση των γηγενών ζυμών συμβολίζεται ως Γ.Ζ, ενώ τα κρασιά που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των επιλεγμένων ζυμών *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* συμβολίζονται ως S.C, M.P, και T.P, αντίστοιχα.

Οι εστέρες αποτελούν αριθμητικά το μεγαλύτερο μέρος των αρωματικών ενώσεων και παράγονται από τις διαφορετικές ζύμες. Γι' αυτό και από τον πίνακα βλέπουμε μία αυξημένη διαφοροποίηση αυτών καθώς πρόκειται για κρασιά τεσσάρων διαφορετικών ειδών ζυμών. Οι εστέρες προσδίδουν οσμές φρούτων και λουλουδιών, οι οποίες χρησιμοποιούνται συχνά για να περιγράψουν τους οίνους. Για παράδειγμα οι εστέρες με τις ονομασίες Banana oil, Ethyl caproate και Ethyl caprylate, οι οποίες ανιχνεύονται και στα τέσσερα κρασιά έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρουν στον οίνο με αρώματα φρούτων και λουλουδιών όπως φαίνεται και στον πίνακα 21. Συγκριτικά με τις αλκοόλες οι εστέρες στο σύνολό τους έχουν πολύ χαμηλότερες περιεκτικότητες, για την ακρίβεια κυμαίνονται από 5 μέχρι και 8 mg/L στον κάθε οίνο. Το κρασί που ζυμώθηκε με τον *S. cerevisiae* σημειώνει την μεγαλύτερη αθροιστική περιεκτικότητα αλλά και πλήθος ουσιών ενώ δεύτερο έρχεται το κρασί που παράχθηκε από τις γηγενείς ζύμες. Ο εστέρας με την ονομασία Butylated Hydroxytoluene (BHT) σημειώνει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα και στα τέσσερα κρασιά και σχετικά συγκρίσιμη μεταξύ αυτών. Το κρασί που ζυμώθηκε με την *T. delbrueckii* έχει και την μικρότερη αθροιστική περιεκτικότητα αλλά και το μικρότερο πλήθος ουσιών, κάτι που συμπερασματικά σημαίνει ότι το κρασί αυτό στερείται σε αρώματα φρούτων και λουλουδιών.

Πίνακας 18: Περιεκτικότητες οξέων ως αρωματικές ενώσεις στα κρασιά

Οξέα	Περιεκτικότητα mg/L			
	M.P	S.C	T.D	Γ.Z
Active valeric acid, Ethylmethylacetic acid	0.07	0.11	0.10	
Butanoic acid	0.06	0.10	0.12	
Butyric acid	0.23			0.05
Caproic acid	0.33	0.62		
Decanoic acid	0.29	0.57		0.55
Dodecanoic acid		0.22		0.04
Hexanoic acid	0.02			0.27
Isoleucic acid			0.10	
Isobutyric acid	0.23		3.87	0.14
Isopropylpyruvic acid	0.00	0.01		
Isovaleric acid	0.02	0.26	0.10	0.10
Nonanoic acid			0.01	
Octanoic acid	0.26		0.20	1.38
Palmitic acid		0.22		
Tetradecanoic acid , Myristic acid		0.21		
α-Hydroxymyristic acid		0.02		
β-Hydroxylauric acid		0.02		
2-Monopalmitin			2.61	0.20
Diethyl adipate , Hexanedioic acid, diethyl ester			0.26	

Το κρασί που προκύπτει με την ζύμωση των γηγενών ζυμών συμβολίζεται ως Γ.Ζ, ενώ τα κρασιά που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των επιλεγμένων ζυμών *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* συμβολίζονται ως S.C, M.P, και T.P αντίστοιχα.

Στον πίνακα 18 καταγράφονται τα οξέα που βρέθηκαν ως αρωματικά στα παραγώμενα κρασιά. Το άρωμα των οξέων έχει περιγραφεί να μοιάζει με αυτό του ξυδιού, βουτύρου, τυριού, λαχανικών, και σάπωνα (πίνακα 21). Για παράδειγμα το ισοβαλερικό οξύ, το οποίο βρέθηκε και στα τέσσερα κρασιά δίνει οσμές τυριού, ξυδιού και λιπαρού (πίνακας 21). Το κρασί που ζυμώθηκε με τον *S. cerevisiae* παρουσιάζει οξέα που δεν ταυτοποιούνται στα άλλα κρασιά, αυτά τα οξέα φαίνονται στο τέλος του πίνακα 18. Παρόλο που αυτό το κρασί έχει τα περισσότερα σε πλήθος οξέα, παρουσιάζει χαμηλή αθροιστική συγκέντρωση αυτών. Πρώτο στην αθροιστική συγκέντρωση έρχεται το κρασί που ζυμώθηκε με την *T. delbrueckii* και αυτό οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στο ισοβουτυρικό οξύ, το οποίο σημειώνει περιεκτικότητα 3.87 mg/L και στο 2-Monoalmitin το οποίο είναι σε περιεκτικότητα 2.61 mg/L. Τα δύο αυτά οξέα μαζί αποτελούν το 91% του συνόλου των οξέων στο κρασί που ζυμώθηκε με την *T. delbrueckii*. Το ισοβουτυρικό οξύ εκτός από την μυρωδιά τυριού και βουτύρου δίνει και γλυκιές οσμές καθώς και άρωμα φράουλας (πίνακας 21) στο κρασί που ζυμώθηκε με την *T. delbrueckii*.

Πίνακας 19: Περιεκτικότητες υδρογονανθράκων και ετεροκυκλικών οργανικών ενώσεων ως αρωματικές ενώσεις στα κρασιά

Υδρογονάνθρακες	M.P	S.C	T.D	Γ.Z
Acetal	0.23	0.10	0.30	0.40
Tyrosol	1.33	1.93	0.50	0.99
Ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις	M.P	S.C	T.D	Γ.Z
Coumaran	0.06	0.06	0.03	0.06

Το κρασί που προκύπτει με την ζύμωση των γηγενών ζυμών συμβολίζεται ως Γ.Ζ, ενώ τα κρασιά που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των επιλεγμένων ζυμών *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* συμβολίζονται ως S.C, M.P, και T.P, αντίστοιχα.

Στον πίνακα 19 καταγράφονται δύο υδρογονάνθρακες και μία ετεροκυκλική οργανική ένωση το Coumaran τα οποία ταυτοποιήθηκαν και στα τέσσερα κρασιά, γεγονός που προϋποθέτει για προέλευση αυτών των ουσιών καθαρά από το σταφύλι και όχι από την δράση των ζυμών. Ωστόσο το tyrosol παρατηρείται σε αυξημένη περιεκτικότητα στο κρασί που ζυμώθηκε με το *S. cerevisiae* και ίση με 1.93 mg/L. Αντίθετα το Coumaran είναι μία ουσία που βρίσκεται σε ίχνη και στα τέσσερα κρασιά αλλά έχει αποδειχθεί ότι είναι μία ουσία που προσφέρει γλυκιές οσμές καθώς και άρωμα από πράσινο τσάι (πίνακας 21).

Στον πίνακα 20 καταγράφονται τα αλκάνια, τα οποία είναι ενώσεις που γενικά θεωρούνται ασήμαντες για το άρωμα των οίνων, επειδή η διαλυτότητά τους στο νερό είναι πολύ μικρή και δεν εκχυλίζονται σε σημαντικό ποσοστό στο γλεύκος. Επίσης, καθιζάνουν πολύ εύκολα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Πίνακας 20: Περιεκτικότητες αλκανίων ως αρωματικές ενώσεις στα κρασιά

Αλκάνια	M.P	S.C	T.D	Γ.Z
Heptacosane			0.20	
Hexadecane	0.06	0.06		0.07
Nonadecane				0.01
Pentadecane			0.17	
Tetradecane	0.07	0.08		
Undecane		0.07		0.05

Το κρασί που προκύπτει με την ζύμωση των γηγενών ζυμών συμβολίζεται ως Γ.Ζ, ενώ τα κρασιά που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των επιλεγμένων ζυμών *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* συμβολίζονται ως S.C, M.P, και T.P, αντίστοιχα.

Από το πίνακα 20 παρατηρείται ότι πράγματι αυτές οι ουσίες εντοπίστηκαν σε ίχνη. Από τον πίνακα 21 φαίνεται ότι τα αλκάνια είναι ουσίες με ήπια αρώματα και κηρώδη οσμές.

Επιπλέον στο κρασί των γηγενών ζυμών ανιχνεύτηκε ένα τερπένιο, το p-Cymene σε ίχνη δηλαδή σε συγκέντρωση 0.01 mg/L. Τα τερπένια αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ενώσεων, διότι καθορίζουν τον αρωματικό χαρακτήρα ορισμένων ποικιλιών. Το συγκεκριμένο έχει αρώματα εσπεριδοειδών, φρεσκάδας, βενζίνης, μπαχαρικού, και ξυλώδους.

Στο κρασί που ζυμώθηκε με την *M. pulcherrima* ανιχνεύτηκε και μια λακτόνη, η Peach lactone. Γενικά οι λακτόνες προέρχονται από το μεταβολισμό των ζυμών επομένως η ουσία αυτή πρέπει να προήλθε από την ζύμη *M. Pulcherrima*. Η ουσία αυτή προσφέρει φρουτώδης οσμές από βερίκοκο, καρύδα, ροδάκινο καθώς και αρώματα λιπαρού.

Σύγκριση των αποτελεσμάτων των αρωματικών συστατικών με την δοκιμή έμπειρου δοκιμαστή

Τα αποτελέσματα των αρωματικών ενώσεων όπως προέκυψαν από τις αναλυτικές μεθόδους και των αρωμάτων που αυτές προσδίδουν στο κρασί σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, συσχετίστηκαν με τα σχόλια ενός έμπειρου δοκιμαστή.

Το κρασί που ζυμώθηκε με την *T. delbrueckii* σημειώνει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αρωματικές αλκοόλες εκτός της αιθανόλης, μεταξύ αυτών η ισοαμυλική αλκοόλη (Isoamyl alcohol), η φαινύλ-αιθυλική αλκοόλη (Phenylethyl Alcohol) και η τρυπτοφόλη (Tryptophol) υπερισχύουν. Ανάμεσα σε αυτές η φαινύλ-αιθυλική αλκοόλη έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα όλων και φτάνει τα 40.46 mg/L. Αυτό σημαίνει ότι το 67% των συνολικών αλκοολών (εκτός αιθανόλης) σε αυτό το κρασί προέρχονται από αυτήν την αλκοόλη, η οποία προσδίδει στο κρασί (πίνακας 21) αρώματα από λουλούδια και μέλι. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τον δοκιμαστή ο οποίος ανίχνευσε ήπια αρώματα και οσμές από τριαντάφυλλο. Το ίδιο κρασί παρουσίασε και τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε οξέα, ουσίες που προσφέρουν στο κρασί αρώματα τυριού και βουτύρου, και αυτό οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στο ισοβουτυρικό οξύ,

το οποίο σημειώνει περιεκτικότητα 3.87 mg/L και στο 2-Monopalmitin το οποίο είναι σε περιεκτικότητα 2.61 mg/L. Τα δύο αυτά οξέα μαζί αποτελούν το 91% του συνόλου των οξέων στο κρασί που ζυμώθηκε με την *T. delbrueckii*. Παρ' όλα αυτά ο δοκιμαστής δεν ανίχνευσε κάθολου βουτυρικά αρώματα σε αυτό το κρασί και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το κατώφλι ανίχνευσης για να μπορέσει ο έμπειρος δοκιμαστής να εντοπίσει τα αρώματα του ισοβουτυρικού είναι στα 8.1 mg/L (Koehler, 1971), συγκέντρωση αρκετά μεγαλύτερη από αυτή που υπολογίστηκε που σημαίνει ότι θα ήταν αδύνατο από τον δοκιμαστή να εντοπίσει τα αρώματα του ισοβουτυρικού. Το κρασί αυτό έχει και την μικρότερη αθροιστική περιεκτικότητα σε εστέρες αλλά και το μικρότερο πλήθος των ουσιών αυτών. Ωστόσο ταυτοποιήθηκε μία ουσία που δεν βρέθηκε στα υπόλοιπα κρασιά και αυτή είναι ο αιθυλικός ισοβουτυλεστέρας (Ethyl isobutyrate) σε περιεκτικότητα 0.04 mg/L, ο οποίος έδωσε οσμές από λάστιχο, τις οποίες κατάφερε να τις ανιχνεύσει και ο δοκιμαστής, καθώς το κατώφλι αυτού του εστέρα είναι αρκετά χαμηλό και ίσο με 0.0001 mg/L (Palamand, 1968).

Το κρασί που ζυμώθηκε με τον *S.cerevisiae* σημειώνει την μεγαλύτερη αθροιστική περιεκτικότητα σε εστέρες αλλά και πλήθος ουσιών. Ο εστέρας με την ονομασία Butylated Hydroxytoluene (BHT) σημειώνει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα ανάμεσα σε αυτούς. Οι εστέρες εμπλουτίζουν το κρασί με αρώματα λουλουδιών και φρούτων αλλά σύμφωνα με τον δοκιμαστή οι οσμές αυτές καλύπτονται από βουτυρικά και λιπαρά αρώματα. Ανάμεσα στους εστέρες που ταυτοποιήθηκαν μόνο σε αυτό το κρασί βρέθηκε και ο Methyl 10-octadecenoate ο οποίος σε αντίθεση με την χαρακτηριστική του ομάδα, προσφέρει αρώματα λιπαρού καθώς και το Actylol με τα βουτυρικά του αρώματα. Στο συγκεκριμένο κρασί βρέθηκε επίσης το Tyrosol, ένας υδρογονάνθρακας που δίνει αρώματα λιπαρού και κηρώδη, στη μεγαλύτερη του συγκέντρωση. Επίσης στο κρασί αυτό εντοπίστηκαν αρκετά οξέα τα οποία δεν ταυτοποιήθηκαν στα υπόλοιπα κρασιά, και γενικά τα οξέα δίνουν αρώματα βούτυρου, γάλακτος και τυριού. Συγκεκριμένα εντοπίστηκε η 2,3-Butanediol αλκοόλη η οποία χαρακτηρίζεται με οσμές από βούτυρο, κρεμώδεις, επίσης οι cis-3-Hexenol (E-3-Hexenol) και Ethylhexanol αλκοόλες, οι οποίες δίνουν κι αυτές αρώματα λιπαρού. Επομένως σύμφωνα με τα παραπάνω τα θετικά αρώματα που θα μπορούσαν να προσφέρουν οι εστέρες καλύπτονται από τα αρώματα των παραπάνω ουσιών με αποτέλεσμα ο δοκιμαστής να χαρακτηρίσει το κρασί αυτό με βουτυρικές, γαλακτικές και λιπαρές οσμές.

Στο κρασί που ζυμώθηκε με την *M. pulcherrima* ανιχνεύτηκε μια λακτόνη, η Peach lactone, η οποία προσφέρει φρουτώδεις οσμές από βερίκοκο, καρύδα, ροδάκινο καθώς και αρώματα λιπαρού. Επίσης εντοπίστηκε και το Tyrosol σε εξίσου αυξημένη περιεκτικότητα όπως στο προηγούμενο κρασί. Ο δοκιμαστής πράγματι χαρακτήρισε το κρασί αυτό με αρώματα λιπαρού τα οποία μπορεί να προέρχονται και από τις δύο ουσίες. Επίσης ανιχνεύτηκαν οι εστέρες Active amyl acetate και Hexyl acetate, οι οποίοι δίνουν αρώματα μπανάνας, γλυκά, φρουτώδη και χυμώδη.

Τέλος στο κρασί των γηγενών ζυμών εντοπίστηκε η αλκοόλη 2-Ethylhexanol, η οποία προσφέρει οσμές από φρέσκο, εσπεριδοειδές, λουλουδάτο, γλυκό, λιπαρό και γενικά ήπια αρώματα. Επιπροσθέτως παρουσίασε και αυξημένη περιεκτικότητα στο Octanoic acid συγκριτικά με τα υπόλοιπα κρασιά και συγκεκριμένα παρουσίασε περιεκτικότητα 1.38 mg/L. Το οξύ αυτό έχει οσμές τυριού, λιπαρού, ταγγού, λαχανικών και κηρώδη. Ο εντοπισμός του όμως από τον δοκιμαστή είναι αδύνατος καθώς το κατώφλι ανίχνευσης του οξέος αυτού είναι τα 3 mg/L

(Koebler, 1971). Το κρασί των γηγενών ζυμών έχει την δεύτερη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε εστέρες, οι οποίοι είναι ουσίες που προσδίδουν οσμές φρούτων και λουλουδιών, οι οποίες χρησιμοποιούνται συχνά για να περιγράψουν τους οίνους. Συγκεκριμένα εμφανίζει εστέρες οι οποίοι δεν βρέθηκαν στα υπόλοιπα κρασιά ένας από αυτούς είναι ο 2-Octadecoxyethyl hexadecanoate, ο οποίος δίνει αρώματα βάλσαμου, κρεμώδη, φρουτώδη, και ήπια γαλακτερά. Ο δεύτερος εστέρας είναι ο 2-Methylbutyl acetate, ο οποίος προσφέρει αρώματα μπανάνας, φρουτώδη, χυμώδη και γλυκού. Σύμφωνα με το κατώφλι ανίχνευσης αυτής της ουσίας πράγματι είναι εφικτό να την εντοπίσει ο δοκιμαστής καθώς το όριο είναι 0.005 mg/L (Fazzalari, 1978) και στην ανάλυση βρέθηκε σε πολύ μεγαλύτερη περιεκτικότητα και συγκεκριμένα σε 0.19 mg/L.

Πίνακας 21: Το χαρακτηριστικό άρωμα και οι προελεύσεις των ουσιών που προέκυψαν από την αέρια χρωματογραφία μάζας.

Ουσίες:	Αρώματα:	Που συναντώνται στη φύση:	Βιβλιογραφία:	
Αλκοόλες				
1-Heptanol	καρύδα, άγουρο, βότανα, φυλλώδη, μούχλα, Παιώνια(λουλούδι), φράουλας, γλυκό, βιολέτα(λουλούδι)	Αλκοολούχα ποτά, μήλο, μαύρα καρύδια, δημητριακά, εσπεριδοειδή, μαλακό σιτάρι, καλαμπόκι, φρούτα, ξηροί καρποί	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.), (James, 2004)	(James, 2004)
2,4-di-t-butylphenol	Δεν είναι διαθέσιμο	κρασί	Δεν είναι διαθέσιμο	(T.G.S.C, 2015)
Ethylhexanol	Εσπεριδοειδή, γλυκό, λουλούδια, λιπαρό	Δεν είναι διαθέσιμο	(T.G.S.C, 2015)	Δεν είναι διαθέσιμο
4-methyl-1-pentanol	Αρώματα ξηρών καρπών	Μπράντυ, κρασί	(T.G.S.C, 2015)	(T.G.S.C, 2015)
1-Hexadecanol	λουλουδάτο, κερι, κηρώδη	Πικρό πεπόνι, γογγυλοκράμβη, πατάτα, ρόκα, σκόρδο	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(James, 2004)
3-Methylpentanol	κακάο, πρασινάδα, κονιάκ, φρουτώδη	Δεν είναι διαθέσιμο	(T.G.S.C, 2015)	Δεν είναι διαθέσιμο
1-Hexanol	αλκοόλ, ήπια, λουλούδια, φρουτώδη, ελαφρά καμμένο, άγουρο, έλαιο, ρετσίνα, γλυκό	Αλκοολούχα ποτά, μπαχάρι, μήλο, μύρτιλο, σαμπούκος, μαύρα καρύδια, μαύρη σταφίδα, δημητριακά, κανέλλα, τσιριμόγια	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(James, 2004)
2,3-Butanediol	φρουτώδη, βούτυρο, κρεμώδης, κρεμμύδι	Καρύδα, πιπεριές	(Leffingwell & Associates, 2018)	(M. Dunkel, 2008)
2-Ethylhexanol	φρέσκο, λιπαρό, εσπεριδοειδές, λουλουδάτο, γλυκό, ήπια αρώματα, λιπαρό	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock, 2005)	Δεν είναι διαθέσιμο
3-(Methylthio)propanol, Methionol	κρεμμύδι, πατάτα, σούπα, θειώδης, γλυκό, λαχανικά	Αλκοολούχα ποτά, καφές, καρκινοειδή, φρούτα, τομάτα, πράσινα λαχανικά, βότανα και μπαχαρικά, γαλακτοκομικά, μαλάκια, μήλο	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(James, 2004)
3-Hexenol	φυλλώδη, άγουρο	σαμπούκος, μαύρα καρύδια, κανέλλα, λεμόνι	(Shinbo, 2006.)	(James, 2004)
3-Octanol	εσπεριδοειδές, γαιώδης, βότανα, πεπόνι, μέντας, βρύα, μανιτάρι, ξηρών καρπών, πικάντικος, ξυλώδη	Αλκοολούχα ποτά, ρίγανη, βότανα και μπαχαρικά, ύσσωπος, μελισσόχορτο, μανιτάρια, μέντα, παπάγια, όσπρια, ρόκα, δεντρολίβανο, σόγια, δυόσμος, θρούμπι, τσάι	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.), (James, 2004)	(James, 2004)
Active amyl alcohol	βύνη	φρούτα, τομάτα, μήλο, αμύγδαλο, κράνμπερι, άγαρ, αγαύη, μπανάνα	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(James, 2004)
cis-3-Hexenol, E-3-Hexenol	πικρό, γαιώδης, λιπαρό, φρέσκο, άγουρο, έντονα, βρύα	αμύγδαλο, μήλο, αβοκάντο, μπανάνα, μπρόκολο, κίτρινη κολοκύθα, καρότο, κανέλλα, καρύδα, μελιτζάνα, φρούτα, σκόρδο, τζιντζερ, γκρέιπφρουτ, βανίλια	(FoodB, 2008)	(FoodB, 2008)

Isoamyl alcohol	αλκοόλ, μπανάνα, φρουτώδη, ελαφρά καμμένο, βύνη, έλαιο, ούισκι	Αλκοολούχα ποτά, δεντρολίβανο, τσάι, καρπούζι, άγρια σέλερι, αμύγδαλο, μήλο, κριθάρι, καναδέζικο μύρτιλο	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(M. Dunkel, 2008)
Phenylethyl Alcohol	πικρό, λουλουδάτο, μέλι, πασχαλιά(δέντρο), τριαντάφυλλο, ροδόνερο, μπαχαρικό	αμύγδαλο, μύρτιλο, σαμπούκος, μαύρα καρύδια, κανέλλα, , Δενδρώδες μύρτιλο, ύσσωπος, λεμόνι	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(SigmaAldrich , 2013)
Propylene glycol ethyl ether	φρουτώδη	Δεν είναι διαθέσιμο	(E. Saxholt, 2008)	Δεν είναι διαθέσιμο
trans-3-Hexenol	πικρό, γαιώδης, λιπαρό, φρέσκο, άγουρο, έντονα, βρύα	αμύγδαλο, μήλο, αβοκάντο, μπανάνα, μπρόκολο, κίτρινη κολοκύθα, καρότο, κανέλλα, καρύδα, μελιτζάνα, φρούτα, σκόρδο, τζιντζερ, γκρέιπφρουτ, βανίλια	(FooDB, 2008)	(FooDB, 2008)
Tryptophol	αμύγδαλο, ήπια φρουτώδη	αγγούρι, σταφύλι, ηλιάνθος	(T.G.S.C, 2015)	(FooDB, 2008)
Εστέρες				
2-Methyl-3-thiolanone	τυρί, καφές, κρεατικό, ξηρών καρπών, πικάντικος, θειώδης	Δεν είναι διαθέσιμο	(FooDB, 2008)	Δεν είναι διαθέσιμο
dodecanoic acid, 1-methylethyl ester	Δεν είναι διαθέσιμο	γλεύκος πεπόνι, μπλέ τυρί	Δεν είναι διαθέσιμο	(T.G.S.C, 2015)
Ethyl 9-decenoate	Φρουτώδες, λιπαρό	Δεν είναι διαθέσιμο	(T.G.S.C, 2015)	Δεν είναι διαθέσιμο
Tryptophol Acetate	Ζωικό, κοπριά	Δεν είναι διαθέσιμο	(T.G.S.C, 2015)	Δεν είναι διαθέσιμο
2-Methylbutyl acetate	μπανάνα, φρουτώδη, χυμώδη, παραγινωμένα φρούτα, φυστίκια, γλυκό	μπαχάρι, σύκα, μήλο	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.) (James, 2004)	(James, 2004)
4-Methyldecane	Δεν είναι διαθέσιμο	δημητριακά, ξηροί καρποί, όσπρια	Δεν είναι διαθέσιμο	(James, 2004)
Active amyl acetate	μπανάνα, φρουτώδη, χυμώδη, παραγινωμένα φρούτα, φυστίκια, γλυκό	μπαχάρι, σύκα, μήλο	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.), (James, 2004)	(James, 2004)
Banana oil	μπανάνα, πικρό, φρουτώδη, διαλύτης, γλυκό	μήλο, σαμπούκος, σύκα, φρούτα, γκουάβα, παπάγια, τσάι	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(James, 2004)
Bisomel , Isopropyl myristate	κανέλλα, ανεπαίσθητο, λιπαρό	Δεν είναι διαθέσιμο	(Shinbo, 2006.) (James, 2004)	Δεν είναι διαθέσιμο

Butylated Hydroxytoluene	καμφορά, ήπια αρώματα μούχλα, φαινολική, βανίλια	σκόρδο	(Shinbo, 2006.) (James, 2004)	(James, 2004)
Butylphen	δέρμα, Εβερνία η προυνοφυής (μύκητας)	βότανα και μπαχαρικά	(Shinbo, 2006.)	(James, 2004)
Ethyl butyrate, Ethyl butanoate	μήλο, μπανάνα, κονιάκ, φρουτώδη, χυμώδη, ανανάς, κρεμώδης	μαύρη σταφίδα, εσπεριδοειδή, σύκα, φρούτα, παπάγια, φρούτα του πάθους, ανανάς, μήλο	(Laskin Allen, 2005), (E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.), (James, 2004)	(FooDB, 2008)
Ethyl caprate	μήλο, μπράντυ, φρουτώδη, σταφύλι, λιπαρό, αχλάδι, γλυκό, κηρώδη, κερι	Αλκοολούχα ποτά, δημητριακά, φρούτα, χαμομήλι, γκουάβα, πεπόνι, ξηροί καρποί, ματζουράνα	(Mas Albert, 2017) (E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.), (James, 2004)	(M. Dunkel, 2008)
Ethyl caproate	Φλούδα μήλου, μπανάνα, φρουτώδη, άγουρο, ανανάς, γλυκό, κηρώδη	Αλκοολούχα ποτά, μήλο, εσπεριδοειδή, γαρίφαλο, λίπη και λάδια, φρούτα, γκουάβα, βότανα και μπαχαρικά, γαλακτοκομικά, φρούτα του πάθους	(Mas Albert, 2017) (E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.), (James, 2004)	(M. Dunkel, 2008)
Ethyl caprylate	φρουτώδη, βερίκοκο, μπανάνα, μπράντυ, αχλάδι, λιπαρό, γλυκό, κηρώδη	Αλκοολούχα ποτά, μήλο, δημητριακά, εσπεριδοειδή, γαρίφαλο, φρούτα, γκουάβα, γαλακτοκομικά, παπάγια, πιπεριά	(Laskin Allen, 2005), (E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(M. Dunkel, 2008)
Ethyl dodecanoate	καθαρό, λουλουδάτο, φυλλωσιά, σαπουνώδης, γλυκό, κηρώδη	Αλκοολούχα ποτά, δημητριακά, φρούτα, γκουάβα, βότανα και μπαχαρικά, μήλο, ματζουράνα	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(FooDB, 2008)
Ethyl hexadecanoate	βάλσαμο, κρεμώδης, φρουτώδη, ήπια αρώματα, γαλακτερό, κερι, κηρώδη	Αλκοολούχα ποτά, δημητριακά, εσπεριδοειδή, κόλιανδρος, φρούτα, χαμομήλι, γκουάβα, βότανα και μπαχαρικά, όσπρια	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(FooDB, 2008)
Ethyl isobutyrate	αλκοόλ, ήπια, φρουτώδη, ελαφρά καμμένο, λάστιχο, ρούμι, φράουλας, γλυκό	Αλκοολούχα ποτά, μήλο, εσπεριδοειδή, σύκα, φρούτα, ανανάς, μήλο, δυόσμος, γλυκιά μανόλια	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.) (James, 2004)	(FooDB, 2008)
Ethyl stearate	ήπια αρώματα, κηρώδη	ματζουράνα	(Shinbo, 2006.)	(FooDB, 2008)
Ethyl β-hydroxybutyrate	σταφύλι, άγουρο, φρουτώδη	Δεν είναι διαθέσιμο	(SigmaAldrich , 2013)	Δεν είναι διαθέσιμο
Geranyl isovalerate	μήλο, φρουτώδη, μύρτιλο, άγουρο, ανανάς, τριαντάφυλλο	εσπεριδοειδή, φρούτα, βότανα και μπαχαρικά	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(FooDB, 2008)
Hexadecanoic acid, 2-(octadecyloxy) ethyl ester (2-	βάλσαμο, κρεμώδης, φρουτώδη, ήπια αρώματα, γαλακτερό, κερι, κηρώδη	Αλκοολούχα ποτά, δημητριακά, εσπεριδοειδή, κόλιανδρος, φρούτα, χαμομήλι, γκουάβα, βότανα και μπαχαρικά, όσπρια, ματζουράνα	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(M. Dunkel, 2008)

Octadecoxetyl hexadecanoate)				
Hexyl acetate	μήλο, μπανάνα, πικρό, φρουτώδη, άγουρο, βότανα, γλυκό	Αλκοολούχα ποτά, μήλο, μπρόκολο, φρούτα, γκουάβα, Δενδρώδες μύρτιλο, πεπόνι, βρώμη, παπάγια, ροδάκινο	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(FoodB, 2008)
Isopropyl (propyl) disulfide	Κρεατικού, θειώδης	κρεμμύδι	(FoodB, 2008)	(M. Dunkel, 2008)
Isopropyl glycidyl ether	ανεπαίσθητο, λιπαρό, λιπαρό	Δεν είναι διαθέσιμο	(FoodB, 2008)	Δεν είναι διαθέσιμο
Methyl 10-octadecenoate	λιπαρό, κηρώδη	γαρίφαλο	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(M. Dunkel, 2008)
Methyl hexadecanoate	λιπαρό, κηρώδη	γαρίφαλο	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(M. Dunkel, 2008)
Oleic acid, 3-(octadecyloxy) propyl ester	Ανεπαίσθητο, λιπαρό, τηγανιτό, ξύγκι, κηρώδη	Αλκοολούχα ποτά, κριθάρι, αβοκάντο, σπαράγγι, Arabica καφές, βερίκοκο, μήλο, γλυκάνισος, αμύγδαλο	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(FoodB, 2008)
(β) Phenethyl acetate	μπανάνα, μήλο, λουλουδάτο, φρουτώδη, μέλι, τριαντάφυλλο, γλυκό, καπνός, τροπικό φρούτο	μήλο, μύρτιλο, κανέλλα, γαρίφαλο, αμερικάνικος λωτός	(Laskin Allen, 2005), (E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(M. Dunkel, 2008)
Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester, (S)- (Acetylol)	βούτυρο, Μπάτερσκοτς, βουτυρικό, φρουτώδη, οξύ, συφό	Αλκοολούχα ποτά, κράμβη, φρούτα, γαλακτοκομικά, ανανάς, όσπρια, τσάι	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.), (James, 2004)	(FoodB, 2008)
Οξέα				
Active valeric acid, Ethylmethylacetic acid	όξινο, τυρί, πικάντικο, Ροκφόρ, ξινισμένο, φράουλας, ιδρώτας	φίγγι, βερίκοκο, μύρτιλο, άρκτιο, κανέλλα, πράσινη πιπεριά, Δενδρώδες μύρτιλο, πιπεριές, κενταύριο (φυτό)	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.) (James, 2004)	(James, 2004)
Isoaleprolic acid	Δεν είναι διαθέσιμο	καφέ	Δεν είναι διαθέσιμο	(T.G.S.C, 2015)
α-Hydroxymyristic acid	Λιπαρό, καρύδα	Δεν είναι διαθέσιμο	(T.G.S.C, 2015)	Δεν είναι διαθέσιμο

β-Hydroxyauric acid	Κερί, καρύδα	Δεν είναι διαθέσιμο	(T.G.S.C, 2015)	Δεν είναι διαθέσιμο
Butanoic acid	οξικό, βούτυρο, τυρί, φρουτώδη, ταγγό, οξύ, ιδρώτας	βούτυρο, δημητριακά, τυρί, τσίλι, σοκολάτα, βουτυρόγαλα, καφές, αυγά	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.) (James, 2004)	(H. Arn, 1998) (T.G.S.C, 2015) (A. Wiener, 2012)
Butyric acid	οξικό, βούτυρο, τυρί, φρουτώδη, ταγγό, οξύ, ιδρώτας	βούτυρο, τυρί, καφές, κακάο, γάλα εβαπορέ, φρούτα, μέντα	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.) (James, 2004)	(H. Arn, 1998) (T.G.S.C, 2015) (A. Wiener, 2012)
Caproleic acid	λιπαρό, φρουτώδη, άγουρο, σαπουνώδης, κηρώδη	Αλκοολούχα ποτά, γαλακτοκομικά, μαλάκια	(Shinbo, 2006.)	(FooDB, 2008)
Decanoic acid	εσπεριδοειδή, λιπαρό, ταγγό, ξινισμένο, δυσάρεστο	μήλο, Arabica καφές, μπανάνα, βούτυρο, καφές, κακάο	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(FooDB, 2008)
Dodecanoic acid	δαφνέλαιο, καρύδας, λιπαρό, μεταλλικό, ήπια αρώματα	αμύγδαλο, μήλο, μπανάνα, γιαούρτι, γλυκοπατάτα, φιστίκια	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(FooDB, 2008)
Hexanoic acid	τυρί, λιπαρό, ξινισμένο, ιδρώτας	βούτυρο, κάρδαμο, καζεΐνη, προζύμι, χαμομήλι, τυρί, σοκολάτα, καρύδα, καφές	(Shinbo, 2006.) (James, 2004)	(H. Arn, 1998) (T.G.S.C, 2015) (A. Wiener, 2012)
Isobutyric acid	γλυκό, φράουλας, βούτυρο, τυρί, ταγγό	Αλκοολούχα ποτά, βερίκοκο, άρκτιο, χαρουπιά, καρότο, φρούτα, πράσινη πιπεριά, γαλακτοκομικά, μαλάκια, μέντα, μήλο, φραμπουάζ, γλυκιά μανόλια, άγριο καρότο, άγρια σέλερι, πιπεριές	(Tao & Zhang, 2010), (E. Saxholt, 2008)	(M. Dunkel, 2008)
Isopropylpyruvic acid	φρουτώδη	Αλκοολούχα ποτά, κακάο, φρούτα, πράσινα λαχανικά, βότανα και μπαχαρικά, γαλακτοκομικά	(Shinbo, 2006.)	(FooDB, 2008)
Isovaleric acid	τυρί, όξινο, πικάντικος, λιπαρό, ποδαρίλα, ζωικό, ταγγό, ξινισμένο, βρομερό, ιδρώτας	γάλα, άρκτιο, κανέλλα, μέντα, μπανάνα Αντιλλών, πράσινη πιπεριά, πράσινα λαχανικά, λεμονόχορτο, λεβιστικό, ροδάκινο, πιπεριές	(Laskin Allen, 2005), (E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.), (James, 2004)	(M. Dunkel, 2008)

Nonanoic acid	τυρί, γαλακτοκομικά, βρώμικο, λιπαρό, άγουρο, κηρώδη	μήλο, κανέλλα, κακάο, ρίγανη, ύσσωπος, ρύζι, ρόκα, ιβίσκος, σόγια, γλυκιά μανόλια, λευκό σινάπι, πιπεριά	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(M. Dunkel, 2008)
Octanoic acid	τυρί, λιπαρό, ταγγό, ιδρώτας, λαχανικά, κηρώδη	Αλκοολούχα ποτά, κρεμμύδι, μήλο, αρέπα, αβοκάντο, μπαμπασού, τροφές για βρέφη, μπανάνα, μπισκότα, σαμπούκος	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(H. Arn, 1998) (T.G.S.C, 2015)7.8
Palmitic acid	κρεμώδης, κερι, λιπαρό, ελαφρώς κηρώδη	Σπαράγγι, Arabica καφές, βερίκοκο, μήλο, γλυκάνισος, αμύγδαλο, γιαούρτι, ούισκι	(Mas Albert, 2017)	(FoodB, 2008)
Tetradecanoic acid , Myristic acid	κερί, καρύδας	Δεν είναι διαθέσιμο	(Mas Albert, 2017)	Δεν είναι διαθέσιμο
Υδρογονάνθρακες				
Acetal	Κρεμώδες, γαιώδης, αιθέρας, φρουτώδη, άγουρο, μέλι, άρωμα ξηρών καρπών, γλυκό, στυφό, λαχανικά	κρεμμύδι	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.) (James, 2004)	(James, 2004)
p-Xylene	Γλυκό	Δεν είναι διαθέσιμο	(T.G.S.C, 2015)	Δεν είναι διαθέσιμο
Λιπαρά οξέα				
2-Monopalmitin	Δεν είναι διαθέσιμο	λίπη και λάδια	Δεν είναι διαθέσιμο	(James, 2004)
Dioctyl adipate , Hexanedioic acid, dioctyl ester	άοσμος	Παντζάρι, λίπη και λάδια, φρούτα, λαχανικά ρίζες, φραμπούζ	(Shinbo, 2006.)	(T.G.S.C, 2015) (M. Dunkel, 2008)
ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις				
Coumaran	Πράσινο τσάι, καμένο, γλυκό	τριγωνέλλα	(Preedy, 2012)	(M. Dunkel, 2008)
Αλκάνια				
Heptacosane	Δεν είναι διαθέσιμο	μήλο, αβοκάντο, σαμπούκος, κάρδαμο, καρότο, καρύδα, ξηροί καρποί, γκίγκο, φιλύρα, παπάγια, παστινάκι(λαχανικό)	Δεν είναι διαθέσιμο	(M. Dunkel, 2008)
Hexadecane	αλκαλικό	μπαχάρι, μαύρα καρύδια, άνηθος, τριγωνέλλα, πράσινη πιπεριά, βότανα και μπαχαρικά, μελισσόχορτο, παπάγια, πιπεριά	(E. Saxholt, 2008)	(M. Dunkel, 2008)

Nonadecane	ήπια αρώματα, αλκαλικό	μπαχάρι, μήλο, σαμπούκος, καρύδα, άνηθος, πράσινη πιπεριά, γογγυλοκράμβη, μελισσόχορτο, φιλύρα , πιπεριά	(Zhao, et al., 2016), (E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(FooDB, 2008)
Pentadecane	αλκαλικό, κηρώδη	μπαχάρι, άνηθος, λεμόνι, μελισσόχορτο, παπάγια, πιπεριές	(E. Saxholt, 2008)	(M. Dunkel, 2008)
Tetradecane	αλκαλικό, ήπια αρώματα, κηρώδη	μπαχάρι, σαμπούκος, μαύρα καρύδια, φαγόπυρο, άνηθος, πιπεριά, ύσσωπος , λεμόνι, μελισσόχορτο, πιπεριές, θρούμπι, γλυκιά μανόλια	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(M. Dunkel, 2008)
Undecane	αλκαλικό	μπαχάρι, μαύρα καρύδια, ρίγανη, άνηθος, τριγωνέλλα, μοσχολέμονο, γλυκιά μανόλια	(E. Saxholt, 2008)	(M. Dunkel, 2008)
Τερπένια				
p-Cymene	εσπεριδοειδή, φρέσκο, βενζίνη, διαλύτης, μπαχαρικά, ξυλώδη	δεντρολίβανο, άγριο σέλινο, άγριο καρότο, κουρκουμάς, Μοσχοκάρυδο, γλυκάνισο, δυόσμος, Κρόκος Σαφράν, ματζουράνα, μέντα	(E. Saxholt, 2008) (Shinbo, 2006.)	(M. Dunkel, 2008)
Λακτόνες				
Peach lactone	βερίκοκο, καρύδας, κρεμώδης, λιπαρό, φρουτώδη, κετονικό, λακτονικό, ροδάκινο	ροδάκινο	(E. Saxholt, 2008), (Shinbo, 2006.)	(T.G.S.C, 2015)
Πτητικές φαινόλες				
Tyrosol	Δυσάρεστο άρωμα, λιπαρό, κηρώδη	αμύγδαλο, μήλο, μπανάνα, κίτρινη κολοκύθα, κανέλλα, καρύδα, φρούτα, γκρέιπφρούτ, βανίλια, αβοκάντο, μπρόκολο, καρότο, σκόρδο, τζίντερ, μελιτζάνα	(T.G.S.C, 2015)	(FooDB, 2008)
Ακετάλες				
Acetaldehyde ethyl amyl acetal	Δεν είναι διαθέσιμο	κρασί	Δεν είναι διαθέσιμο	(T.G.S.C, 2015)

Συμπεράσματα

Από τις αναλύσεις των φλοιών των τριών ποικιλιών αμπέλου της Ικαρίας καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι μεταξύ των ποικιλιών το Κούντουρο (Μαντηλάρι Ικαρίας) είναι μία ποικιλία εμπλουτισμένη σε ανθοκυάνες και μάλιστα βρέθηκε ότι η συνολική περιεκτικότητα φτάνει και τα 24.2 g/kg ξηρών φλοιών ενώ οι άλλες δύο έχουν μόλις 7-8.5 g/kg ξηρών φλοιών. Γεγονός που σημαίνει ότι, εφόσον οι ανθοκυάνες είναι οι κόκκινες χρωστικές του κρασιού, το μεγαλύτερο ποσοστό στο χρώμα του τελικού κρασιού προκύπτει από το Κούντουρο καθώς στο σύνολο των ανθοκυανών κατέχει το 61% αυτών. Στο Κούντουρο επίσης βρέθηκε ότι εκτός από την αυξημένη ποσότητα σε ανθοκυάνες έχει και μεγαλύτερη ποικιλία, καθώς ταυτοποιήθηκε με 11 ανθοκυάνες έναντι των 8 και 9 των άλλων ποικιλιών. Η αυξημένη όμως περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες τελικά οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στον 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης παρά στις δύο τρεις περισσότερες ανθοκυάνες που εμφάνισε. Και αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι το 68% των ανθοκυανών στο κούντουρο προέρχεται από τον 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης. Σε αντίθεση με τις ανθοκυάνες το κούντουρο αποδείχτηκε φτωχή ποικιλία σε φλαβονόλες με μόλις 0.8 g/kg ξηρών φλοιών. Την έλλειψη σε φλαβονόλες καλύπτει το φωκιανό καθώς αποδείχτηκε ότι περιέχει 3.1 g/L φλαβονόλες. Στο κρασί οι φλαβονόλες, που κατά βάση προέρχονται από το φωκιανό, παίρνουν μέρος στη δημιουργία έγχρωμων συμπλόκων με τις ανθοκυάνες, οι οποίες στο μεγαλύτερο ποσοστό τους προέρχονται από το κούντουρο, μέσω των αντιδράσεων πολυμερισμού.

Στις σάρκες των τριών ποικιλιών αμπέλου της Ικαρίας επιβεβαιώθηκε η χαμηλή περιεκτικότητα φλαβονολών στο κούντουρο, και η υψηλή περιεκτικότητα αυτών στο φωκιανό, επομένως η εικόνα που είχαμε για τις φλαβονόλες στους φλοιούς επιβεβαιώνεται και στη σάρκα και καθιστά το φωκιανό την πλουσιότερη ποικιλία σε φλαβονόλες στο σύνολό της και όχι μόνο στα διαφορετικά μέρη της ράγας των σταφυλιών. Κατά την ανάλυση των γιγάρτων προσδιορίστηκαν περισσότερες ταννίνες στο κούντουρο σε σχέση με τις άλλες δύο ποικιλίες, με το φωκιανό να προσεγγίζει σχεδόν τις μισές από το κούντουρο. Η κοινή ιδιότητα των ταννινών είναι η ικανότητα τους να ενώνονται με πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή όπως οι πολυσακχαρίτες και με αυτό τον τρόπο να επηρεάζουν τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του τελικού κρασιού. Επομένως το κούντουρο και το φωκιανό δείχνουν να διαφέρουν τόσο πολύ στις περιεκτικότητες των φαινολικών τους συστατικών, που ο συνδυασμός τους καλύπτει στο ένα της ελλείψεις του άλλου. Όταν αυτά τα δύο συνδυαστούν με το ρετενό, που έχει ενδιάμεσες περιεκτικότητες τόσο στις ταννίνες όσο και στις φλαβονόλες και τις ανθοκυάνες, δημιουργούν ένα γλεύκος με ισορροπημένα όλα τα φαινολικά του συστατικά, έτσι ώστε να παράγει οίνο με ενδιαφέροντα οργανοληπτικό χαρακτήρα.

Στη μέτρηση των σακχάρων του μούστου υπολογίστηκε η τιμή των 206 g/L. Η μεγάλη συγκέντρωση των σακχάρων στο μούστο για την παραγωγή του κρασιού από αυτές τις τρεις ποικιλίες επιδιώκεται στο οινοποιείο, καθώς ο στόχος είναι η παραγωγή ενός υψηλόβαθμου κρασιού. Αυτός είναι και ο λόγος άλλωστε που η συγκομιδή των σταφυλιών γίνεται στις αρχές με μέσα Σεπτεμβρίου. Η έναρξη του τρύγου επιλέχθηκε να γίνεται τότε καθώς ταυτίζεται με την χρονική στιγμή που τα σταφύλια φτάνουν τη μέγιστη περιεκτικότητα τους σε σάκχαρα και πριν φυσικά ξεκινήσει η υπερωρίμανση αυτών. Εκτός από τον προσδιορισμό των σακχάρων στο

μούστο, από τις αναλύσεις του μούστου κατά την διάρκεια παραμονής των στεμφύλων προέκυψαν δεδομένα για την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών σε αυτόν. Πράγματι η τέταρτη ημέρα παραμονής βρέθηκε με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά αλλά όχι με τα μέγιστα δυνατά καθώς από την ποσοτικοποίηση των ανθοκυανών στα εκχυλίσματα των φλοιών εργαστηριακά βρέθηκε ότι η ποσότητα που εκχυλίστηκε ήταν το 60% αυτών. Επεκτείνοντας τον χρόνο παραμονής των στεμφύλων θα μπορούσε μεν να γίνει μία μεγαλύτερη ποσοτικά εκχύλιση των φαινολικών στο γλεύκος αλλά πιθανώς να επηρέαζε αρνητικά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (στιφάδα). Από τη στιγμή που αφαιρούνται τα στέμφυλα και σταματά η εκχύλιση οι αντιδράσεις πολυμερισμού των ανθοκυανών με τις φλαβαν-3-όλες (προκυανιδίνες) ξεκινούν άμεσα. Αυτό φαίνεται και στα διαγράμματα των φαινολικών του ζυμούμενου γλεύκους συναρτήσει του χρόνου, καθώς από την πρώτη κιάλας εβδομάδα παρατηρείται μείωση αυτών.

Μελετώντας τις ζυμώσεις των τεσσάρων κρασιών προέκυψε το συμπέρασμα ότι η ζύμη *T. Delbrueckii* ζύμωσε πιο αργά το κρασί συγκριτικά με τις άλλες ζύμες και για την ακρίβεια χρειάστηκαν 28 ημέρες έναντι των 24-25 που χρειάστηκαν οι υπόλοιπες ζύμες για να ολοκληρώσουν την αλκοολική ζύμωση. Σημαντικό χαρακτηριστικό της αλκοολικής ζύμωσης είναι η κατανάλωση αζώτου από τους μύκητες. Η *T. Delbrueckii* είχε την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο και συγκεκριμένα 33.1 mg/L. Επίσης βρέθηκε ότι ο μικροοργανισμός που χρειάστηκε μεγαλύτερη ποσότητα αζώτου για την ανάπτυξη του είναι ο συμβατικός ζυμομύκητας, γεγονός θετικό για τους *non-Saccharomyces*. Επίσης ένα σημαντικό συμπέρασμα από τις ζυμώσεις είναι το γεγονός ότι οι γηγενείς ζύμες κατάφεραν να παράγουν το μεγαλύτερο ποσοστό αλκοόλης μαζί με το κρασί που ζυμώθηκε με την *M. Pulcherrima* με τη διαφορά ότι στους γηγενείς παρέμεινε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα συγκριτικά με το κρασί που ζυμώθηκε με την *M. Pulcherrima*. Συγκεκριμένα οι γηγενείς ζύμες άφησαν στο κρασί 4.6 ± 0.4 g αναγόντων σακχάρων /L κρασιού ενώ το κρασί που ζυμώθηκε με την *M. Pulcherrima* μετρήθηκε με 2.2 ± 0.6 g αναγόντων σακχάρων /L κρασιού. Η δυνατότητα αυτή των γηγενών ζυμών να παράγουν κρασί με υψηλό αλκοολικό βαθμό αφήνοντας ένα ποσοστό αναγόντων σακχάρων να εμπλουτίζουν την γεύση του κρασιού, αποτελεί πλεονέκτημα του παραγόμενου οίνου και προστίθεται στις ιδιαιτερότητες των γηγενών ζυμών. Τα συμπεράσματα αυτά επιβεβαιώνονται με την χαμηλή ολική οξύτητα του κρασιού αυτού, κάτι που σημαίνει ότι η όξινη γεύση του οίνου, που οφείλεται σε οργανικά οξέα και κυρίως στο τρυγικό οξύ, είναι περιορισμένη. Επομένως οι γηγενείς ζύμες πετυχαίνουν μεγαλύτερο ποσοστό αιθανόλης και ταυτόχρονα ισορροπημένη περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα και τρυγικό οξύ, τα οποία αποσκοπούν σε οργανοληπτικά ανώτερο κρασί. Επιπροσθέτως της γεύσης, το κρασί των γηγενών ζυμών παρουσίασε αυξημένη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά καθώς επίσης και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά και τα υπόλοιπα κρασιά. Όλα τα προαναφερόμενα προτερήματα αυτού του κρασιού αποδεικνύουν την υπόθεση που είχε γίνει αρχικά για την ιδιαιτερότητα των γηγενών ζυμών των ικαριώτικων ποικιλιών και την ικανότητα τους να παράγουν τοπικό οίνο υψηλής ποιότητας.

Συμπερασματικά με τα αποτελέσματα των αρωματικών θα λέγαμε ότι οι ζύμες *non-Saccharomyces* δημιούργησαν οίνους με ενδιαφέρον αρωματικό προφίλ και εντελώς διαφορετικό από αυτό των γηγενών ζυμών. Το κρασί που ζυμώθηκε με την *T. Delbrueckii* χαρακτηρίστηκε από ήπια αρώματα και οσμές από λουλούδια και τριαντάφυλλο, ενώ εμφάνισε

και οσμές από λάστιχο. Το κρασί που ζυμώθηκε με την *M. Pulcherrima* χαρακτηρίστηκε με φρουτώδη οσμή αλλά με μία νότα λιπαρού. Το κρασί των γηγενών ζυμών ταυτοποιήθηκε με γλυκά αρώματα και οσμές χνουδάτων φρούτων. Τέλος το κρασί που ζυμώθηκε με τον *S. Cerevisiae* σημείωσε το πιο κακό οργανοληπτικό προφίλ καθώς χαρακτηρίστηκε με βουτυρικά, λιπαρά αρώματα και οσμές γάλακτος και τυριού.

Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι τόσο οι γηγενείς ζύμες όσο και τα στελέχη των *non-Saccharomyces* μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία δίνουν πολύ θετικά αποτελέσματα και ιδιαίτερα αρωματικά χαρακτηριστικά στο τελικό κρασί. Σε κάθε περίπτωση, για το σχηματισμό πληρέστερης εικόνας σχετικά με τα χαρακτηριστικά των ζυμών και το προφίλ των τελικών προϊόντων απαιτούνται επιπλέον μελέτες για την ταυτοποίηση και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Για μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη των χαρακτηριστικών των γηγενών ζυμών, θα είχε ενδιαφέρον η απομόνωση των μικροοργανισμών αυτών και η ταυτοποίηση των ειδών που τις αποτελούν.

Βιβλιογραφία

- A. Wiener, M. S. (2012). Nucleic Acids Res. *BitterDB: a database of bitter compounds*, σσ. 40(Database issue):D413-419. DOI:10.1093/nar/gkr755.
- Albertin W, C. L. (2014). Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulasporea delbrueckii*. *PLoS ONE*, σ. 9 (4): e94246.
- Antonia Llobera, J. C. (2007). Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Elsevier Ltd Food Chemistry*, σσ. 659-666.
- B. Zoecklein, K. F. (1999). *Wine Analysis and Production*. New York: Kluwer Academic Publishers pgs. 281–290.
- Belitz D., G. W. (2006). *Χημεία τροφίμων*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Τζιόλα.
- Beltran, G. N. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS yeast research*,, σσ. 4(6), 625–632.
- Bely M, S. P.-P.-P. (2008). Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol.*, σσ. 122 (3): 312–20.
- Betrand, A. A.-S. (1987). Incidence du debourbage et role des liquids sur la formation par les levures des produits secondaires lors de la vinification en biane. *Act. Rech. Inst. Oenol Bordeaux.*, σσ. 67-71.
- Bird, D. (2005). *Understanding Wine Technology*, pg 67–73. DBQA Publishing.
- Burdock, G. (. (2005). odor reminiscent of rose. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. 5th ed.* Boca Raton, FL , σ. p. 575.
- Butler, A. E. (1981, May 10). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, σσ. 256, 4494-4497.
- Canals, R. L. (2005). Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, σσ. 4019–4025.
- Cheyrier, V. (2006). Flavonoids in wine. In Ø. M. Andersen, & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton: CRC Taylor and Francis Group., σσ. 273–299.
- Conde, E. C.-V. (1998). Polyphenolic composition of *Quercus suber* cork from different Spanish provenances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,, σσ. 46(8), 3166–3171.
- Constantí, M. P. (1997). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *American Journal of Enology and Viticulture*,, σσ. 48(3), 339–344.
- Contreras A, C. C. (2015). Yeast population dynamics reveal a potential 'collaboration' between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, σσ. 99: 1885–95.

- Davis campus, T. R. (2017). *UC DAVIS*. Ανάκτηση από http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/metschnikowia_pulcherrima.html
- De Santis, D. &. (2010). Effect of prefermentative cold maceration on the aroma and phenolic profiles of a merlot red wine. *Italian Journal of Food Science* 22 (1), σσ. 47–54.
- Downey M.O, M. M. (2007). Development of a stable extract for anthocyanins and flavonols from grapes skin. *American journal of enology and viticulture*.
- E. Saxholt, e. a. (2008). *FoodDB*. Ανάκτηση από Danish food composition databank, revision 7, Department of Nutrition, National Food Institute, Technical University of Denmark (2008): <http://foodb.ca/compounds/>
- Erasmus, D. V. (2003). Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *Ferns Yeast Research*. 3,, σσ. 375-399.
- Fazzalari, F. A. (1978). *Compilation of Odor and Taste Threshold Data*. ASTM Data Series DS 48A.
- Feldmann, H. (2010). *Yeast. Molecular and Cell bio*. Wiley-Blackwell. .
- FoodB. (2008). *Food Component Database*. Ανάκτηση από FoodB: <http://foodb.ca/compounds/>
- H. Arn, A. T. (1998). “Flavornet: A database of aroma compounds based on odor potency in natural products”. *Developments in Food Science* 40, σσ. doi:10.1016/S0167-4501(98)80029-0.
- Jackson, R. S. (2008). *Wine science: principles and applications*. San Diego: Academic Press.
- James F. Harbertson, E. A. (2003, January). Measurement of Polymeric Pigments in Grape Berry Extract sand Wines Using a Protein Precipitation Assay Combined with Bisulfite Bleaching. *American Journal of Enology and Viticulture*, σσ. 54: 301-306.
- James, D. (2004, April 27). *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases*. United States Department of Agriculture. 'Agricultural Research Service. Ανάκτηση από FoodB: <http://foodb.ca/compounds/>
- K. Fugelsang, C. E. (2010). Springer Science and Business Media . *Wine Microbiology Second Edition, New York*, σσ. 3–28.
- Kapasakalidis P.G, R. R. (2006). Extraction of polyphenols from processed blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *J. Agri. Food Chem.*, σσ. 54, 4016-4021.
- Koehler, P. E. (1971). ODOR THRESHOLD LEVELS OF PYRAZINE COMPOUNDS AND ASSESSMENT OF THEIR ROLE IN THE FLAVOR OF ROASTED FOODS. *J. Food Sci*, 36, σσ. 816-818.
- Lagace, L. a. (1990). Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction. *Am. J. Enol. Vitic.*, σσ. 41:147-155.
- Lan Ping, N. B. (2011, January). Extraction of condensed tannins from grape pomace for use as wood adhesives. *Elsevier B.V. Industrial Crops and Products*, σσ. 253-257.

- Laskin Allen, J. B. (2005). *Advances in Applied Microbiology*. San Diego, California: EL SEVIER Academic Press.
- Leffingwell & Associates. (2018, 3 21). *Leffingwell & Associates, Odor Thresholds*. Ανάκτηση από <http://www.leffingwell.com/odorthre.htm>
- M. Dunkel, e. a. (2008). Nucleic Acids Research. *SuperScent – a database of flavors and scents*, σ. doi:10.1093/nar/gkn695.
- María C. Llaudy, R. C.-M. (2004). New Method for Evaluating Astringency in Red Wine. *J. Agric. Food Chem.*, σσ. 52 (4), 742–746.
- Mas Albert, G. J. (2017). *Non-conventional Teast in the Wine Industry*. Lausanne: Frontiers Media SA.
- Masneuf-Pomarede I., C. M.-L. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *Journal of food microbiology 108*, σσ. 385-390.
- Minussi, R. C. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, σσ. 82(3), 409–416.
- Miriam Ortega-Heras, S. P.-M.-M.-S. (2010). Differences in the phenolic composition and sensory profile between red wines aged in oak barrels and wines aged with oak chips. *LWT - Food Science and Technology*, σσ. 1533-1541.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol, Songklanakarin*, 26(2), , σσ. 211-219.
- Monagas, M. &. (2009). Anthocyanins and anthocyanin-derived compounds. In *Wine chemistry and biochemistry*. Springer New York., σσ. 439-462.
- Mortimer, R. &. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in microbiology*, σσ. 150(3), 199–204.
- Nguyen N. H., S. S., Suh, Erbil, & Blackwell. (2006). *Metschnikowia noctiluminum* sp. nov., *Metschnikowia corniflorae* sp. nov., and *Candida chrysolidarum* sp. nov., isolated from green lacewings and beetles. *Mycol Res.*, σσ. 110 (3): 346–56.
- Nguyen Nhu H., S. S.-O., Suh, & Blackwell. (2007). Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. *Mycologia*, σσ. 99 (6): 842–858.
- Oro L, C. M. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.*, σσ. 116: 1209–17.
- Pacheco A, S. J. (2012). The Emerging Role of the Yeast *Torulaspota delbrueckii* in Bread and Wine Production: Using Genetic Manipulation to Study Molecular Basis of Physiological Responses. *Structure and Function of Food Engineering*.
- Palamand, S. a. (1968). Master Brewing Assn., 6. *Am. Tech. Quart.*, σσ. 117-128 .

- Preedy, V. R. (2012). *Tea in Health and Disease Prevention 1 edition*. Academic Press.
- Rentzsch, M. W. (2009). Non-flavonoid phenolic compounds. In *Wine chemistry and biochemistry*. Springer New York., σσ. 509-527.
- Ribereau-Gayon, P. G. (2006). The chemistry of wine stabilization and treatments (Vol. 2). *Handbook of Enology*. West Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd., σσ. 141-204.
- Robinson, J. (2006). *The Oxford Companion to Wine, Third Edition, pgs 778–780*. Oxford University Press.
- Sapis-domercq, S. (1980). Etude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins. Expérimentation 1978–1979. Comparaison avec les résultats de 1975, 1976 et 1977. *OENO One*, 14(3), σσ. 155–181.
- Sezai Türkel, M. K. (2014). Biocontrol Activity of the Local Strain of *Metschnikowia pulcherrima* on Different Postharvest Pathogens. *Biotechnology Research International*, σσ. Article ID 397167, 6 pages.
- Shinbo, Y. e. (2006.). KNApSACK: a comprehensive species-metabolite relationship database . *Plant Metabolomics*. Springer Berlin Heidelberg, σσ. 165-181.
- SigmaAldrich . (2013, January 9). *Sigma Aldrich*. Ανάκτηση από <https://www.sigmaaldrich.com/european-export.html>
- SMITH, M. H. (2005). Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, σσ. 205-214.
- T.G.S.C. (2015, 10 23). *The Good Scents Company Information System (T.G.S.C)*. Ανάκτηση από <http://www.thegoodscentcompany.com/>
- Tao, Y., & Zhang, L. (2010, June 2). Intensity prediction of typical aroma characters of cabernet sauvignon wine. *LWT - Food Science and Technology*, σσ. 1550-1556.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. (2008). *USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21*. Ανάκτηση από Nutrient Data Laboratory Home Page.: <http://foodb.ca/compounds/>
- Valmaryvan Bredaa, N. J. (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspota delbrueckii* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, σσ. 80-88.
- Verdugo Valdez A, S. G., & Garcia, S. K. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. *Antonie van Leeuwenhoek.*, σσ. 100 (4): 497–506.
- Waterhouse, A. L. (2005). Determination of total phenolics. Στο T. E. In R. E. Wrolstad, *Handbook of food analytical chemistry* (σσ. 463–471). Hoboken: John Wiley & Sons.
- A. Τσακίρης. (1994). *Οινολογία από το σταφύλι στο κρασί*. Αθήνα: Εκδόσεις Ψύχαλου.
- Αλεξάκης, Α. (2000). *Το κρασί και η παραγωγή του*. Εκδόσεις Σιδερά.

- Αναστασάκου-Παρασκευοπούλου, Κ. (2018). *Διπλωματική Εργασία: Μελέτη παραγωγής μπύρας με χρήση ζυμών non-Sacharomyces*. Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Βαχλιώτης, Χ. (2009). *Μελέτη του πολλαπλασιασμού με σπόρο της αμπέλου σε συνθήκες μη θερμαινόμενου θερμοκηπίου με χρήση διαφόρων υποστρωμάτων και λίπανσης*. Καλαμάτα: ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ.
- Γιαννίρης, Η. (2006). *Το κρασί και τα αμπέλια των αρχαίων Ικαρίων. Μια σπουδαία ιστορία που δεν γράφτηκε ακόμη*. Αθήνα: Πολεοδόμος, Χωροτάκτης, Δρ. ΕΜΠ.
- Κουράκου-Δραγώνα, Σ. (1998). *Θέματα Οινολογίας*. Αθήνα: Τροχαλία.
- Κούσουλας, Κ. (2002). *Αμπελουργία 2η έκδοση*. ιδιωτική.
- Μπιμπίλιας, Α. (2017). *Επίδραση διεργασιών οινοποίησης στα φαινολικά συστατικά του οίνου*. Αθήνα.
- Νεοφύτου, Σ. (n.d.). *Αμπελογραφική Περιγραφή Ορισμένων Ελληνικών Ποικιλιών Αμπέλου (Vitis vinifera L.) με τον κώδικα Αμπελογραφικής Περιγραφής του Ο.Ι.Ν.* Αθήνα.
- Π. Τσέτουρας. (2003). *Οινοτεχνία, η επιστήμη του κρασιού στην πράξη*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη.
- ΠΑΛΗΟΓΙΑΝΝΗ, Α. Π. (2007). *ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ: Μελέτη Πτητικών Συστατικών Ελληνικών Οίνων & Αποσταγμάτων – Παραγωγή Βιολειτουργικών Οίνων με Βάση Φυτά του Γένους Sideritis*. Αθήνα: ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ.
- Πέτση, Α. (2008). *ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: Ο Ελληνικός αμπελοοινικός τομέας μπροστά στη μεταρρύθμιση της κοινής οργάνωσης αγοράς οίνου στην Ε.Ε*. Καλαμάτα: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Α. ΛΟΥΜΟΥ.
- Πολίτης, Γ. (1997). *Φτιάχνοντας το κρασί μας*. Σταμούλης ΑΕ.
- Σκάρου, Α.-Κ. (2013). *Αμπελοοινική ζώνη γλυκών οίνων-Διαδικασία παραγωγής-Νομοθεσία-Παλαίωση*. Σάμος.
- Σουφλερός, Ε. (1997). *Οινολογία, επιστήμη και τεχνογνωσία*. Θεσσαλονίκη: Τόμος Ι.
- Σουφλερός, Ε. (2000). *Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία Τομός Ι*. Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.
- Σταυρακάκης, Μ. Ν. (2010). *Αμπελογραφία*. Εκδόσεις Τροπή.
- Τσακίρης, Α. (2005). *Οινολογία, έρευνα και εφαρμογές*. Αθήνα: Εκδόσεις ψύχαλου.
- Τσέτουρας, Π. (2003). *Οινοτεχνία, η επιστήμη του κρασιού στην πράξη*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη.
- Τσιβεριώτου, Ι. Ζ.-Μ. (2003). *Στοιχεία αμπελουργίας και οινολογίας*. Εκδόσεις Ίων.

Τσιμόγιαννης, Δ. (2008). *Διδακτορική διατριβή: Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών νώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών. Αναγωγή ελευθέρων ριζών και προστασία φυτικών ελαίων*. Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Τομέας ΙV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων.

Εικόνα εξωφύλλου: από την ζωγράφο Ζωή Θεοφάνους-Τσιμπίδου