



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μέθοδοι προσδιορισμού αζώτου σε δείγματα
οίνου και γλεύκους – Συγκριτική μελέτη

Ανδρέας Πρωτοπαπάς

A.M. : 18685026

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Αλεξάνδρα Ευαγγέλου

ΑΘΗΝΑ , 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCE
DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES

BACHELOR THESIS

**Methods for nitrogen determination in wine
and must samples – Comparative study**

Student: Andreas Protopapas

R. N.: 18685026

Supervisor: Alexandra Evangelou

ATHENS, 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:
“Μέθοδοι προσδιορισμού αζώτου σε δείγματα οίνου και γλεύκους – Συγκριτική μελέτη”
και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1 ^{ου} Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (2 ^{ου} Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (3 ^{ου} Μέλους Επιτροπής)	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογράφων **Ανδρέας Πρωτοπαπάς** του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου 18685026 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών



Ανδρέας Πρωτοπαπάς

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία σκοπός ήταν η συγκριτική μελέτη μεθόδων προσδιορισμού αζώτου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δείγματα γλεύκους και οίνου. Το άζωτο είναι από τα πιο σημαντικά στοιχεία για την υγεία ανάπτυξη και θρέψη του αμπελιού καθώς συμμετέχει σε ενώσεις καθοριστικής σημασίας για το φυτό, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Προσλαμβάνεται κυρίως στην νιτρική (NO_3^-) και στην αμμωνιακή (NH_4^+) μορφή. Η έλλειψη ή περίσσεια αζώτου μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές ασθένειες, οι οποίες έχουν οι επιπτώσεις και στην ανάπτυξη της ράγας αλλά και στον τελικό παραγόμενο οίνο.

Το αφομοιώσιμο άζωτο στο γλεύκος, οργανικό και ανόργανο, είναι απαραίτητο για την ομαλή διεξαγωγή της αλκοολικής ζύμωσης. Μειωμένες ποσότητες αφομοιώσιμου αζώτου σχετίζονται με κολλημένες και αργές ζυμώσεις, ενώ υπερβολικές ποσότητες του σχετίζονται με την έμφαση απλών αρωμάτων και πολύ γρήγορες ζυμώσεις. Η διαθεσιμότητα του αφομοιώσιμου αζώτου στο γλεύκος που ζυμώνεται καθορίζει τα αμινοξέα που θα δημιουργηθούν και κατά συνέπεια τις μονοαλκοόλες που θα σχηματιστούν και τον αρωματικό χαρακτήρα του οίνου.

Στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα και ως πρότυπα διαλύματα τρία αζωτούχα εμπορικά σκευάσματα, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην οινολογία με σκοπό την αζωτούχα θρέψη των ζυμομυκήτων για πιο αποτελεσματικές και με καλύτερη κινητική αλκοολικές ζυμώσεις. Τα σκευάσματα αυτά ήταν γνωστής συγκέντρωσης αζώτου. Το πρώτο σκεύασμα ήταν το DAP ή αλλιώς φωσφορούχο διαμμώνιο, συγκέντρωσης 212 mg/L. Το δεύτερο η θειική αμμωνία, συγκέντρωσης 212 mg/L και το τρίτο το Thiazote που αποτελείται από αμμωνιακά άλατα και θειαμίνη επίσης συγκέντρωσης 212 mg/L. Επίσης, μετρήθηκε και γλεύκος Μοσχοφίλερο από την Πειραματική Οينوποίηση του Τμήματος. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μέθοδος της φορμόλης, η οποία προσδιορίζει το ολικό αφομοιώσιμο άζωτο (YAN). Κατόπιν η μέθοδος NOPA και η μέθοδος της νινυδρίνης που προσδιορίζουν το ολικό ελεύθερο αμινοάζωτο (FAN). Η τρίτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου, με χρήση αυτόματου ενζυμικού αναλυτή. Από όλη την πειραματική πορεία που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία και από τα αποτελέσματα των μετρήσεων από όλες τις μεθόδους, διαπιστώθηκε πως για τον προσδιορισμό οργανικού αζώτου (α-αμινοαζώτου) φαίνεται να είναι καταλληλότερη η μέθοδος NOPA, ενώ για τον προσδιορισμό ολικού αζώτου σε δείγματα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε η μέθοδος νινυδρίνης είτε το άθροισμα NOPA+ NH_4^+ .

Λέξεις κλειδιά: Άζωτο, Αφομοιώσιμο άζωτο, YAN, FAN, NOPA, μέθοδος νινυδρίνης, μέθοδος φορμόλης

ABSTRACT

The purpose of the current thesis was the comparative study of nitrogen determination methods that can be used in samples, musts and wine.

Nitrogen is one of the most important elements for the health, growth and nutrition of the vine as it participates in compounds of crucial importance for the plant, such as proteins and nucleic acids. It is absorbed mainly in the nitrate (NO_3^-) and ammonia (NH_4^+) form. A lack or excess of nitrogen can lead to significant diseases, which affect both the growth of the vine and the wine.

The assimilable nitrogen in the wort, organic and inorganic, is necessary for the smooth conduct of the alcoholic fermentation. Reduced amounts of digestible nitrogen are associated with stuck and slow fermentations, while excessive amounts are associated with the emphasis on simple aromas and very fast fermentations. The availability of assimilable nitrogen in the fermenting must determine the amino acids that will be created and consequently the monoalcohols that will be formed and the aromatic character of the wine.

More specifically, in the present study three nitrogenous commercial preparations were used as samples and as standard solutions, which are widely used in oenology for nitrogenous nutrition of yeasts for more efficient and better kinetic alcoholic fermentations. These formulations were of known nitrogen concentrations. The first formulation was DAP or diammonium phosphate, with a concentration of 212 mg/L. The second is ammonium sulfate, with a concentration of 212 mg/L and the third is Thiazote, which consists of ammonium salts and thiamine, also with a concentration of 212 mg/L. Moschofilero wort from the Department's Experimental Winemaking was also measured.

The methods used were the formol method, which determines the total assimilable nitrogen (YAN). Then the NOPA method and the ninhydrin method which determine total free amino nitrogen (FAN). Finally, the third method used is the determination of ammonium nitrogen using an automatic enzyme analyzer.

Keywords: Nitrogen, Assimilable nitrogen, YAN, FAN, NOPA, ninhydrin method, formalin method,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια, κυρία Αλεξάνδρα Ευαγγέλου, για την πολύτιμη βοήθεια, τις συμβουλές, την παρακίνηση και πάνω από όλα για τον προσωπικό χρόνο και πόρους που διέθεσε για την εκπόνηση της Πτυχιακής. Χωρίς τη συνδρομή της η ολοκλήρωση δεν θα ήταν δυνατή.

Επίσης όλους του καθηγητές και καθηγήτριες της σχολής για τις γνώσεις που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια και για τον αγώνα που δίνουν για την άρτια επιστημονική και τεχνική εκπαίδευση των φοιτητών, σε δύσκολες συνθήκες.

Στη συνέχεια θέλω να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τους καθηγητές κυρία Δέσποινα Κεχαγιά και κύριο Ευάγγελο Μπερή για τη συνεισφορά τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που αδιάκοπα στέκεται στο πλευρό μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	8
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
Κεφάλαιο 1ο : Οίνος	13
1.1 Οίνος	13
1.2 Ιστορία οίνου	13
Κεφάλαιο 2ο : Πορεία οινοποίησης	15
2.1 Οινοποίηση	15
2.2 Λευκή οινοποίηση.....	16
2.3 Ερυθρή οινοποίηση	17
2.4 Ροζέ οινοποίηση	18
Κεφάλαιο 3ο: Άζωτο	20
3.1 Εδαφικό άζωτο.....	20
3.2 Άζωτο στο αμπέλι	20
3.3 Άζωτο στην αλκοολική ζύμωση	22
3.4 Άζωτο στον οίνο	25
3.5 Άζωτο στην παλαίωση του οίνου	26
Κεφάλαιο 4ο: Μέθοδοι προσδιορισμού αζώτου	27
4.1 Μέθοδοι και κατηγορίες.....	27
4.2 Μέθοδος της φορμόλης	27
4.3 Μέθοδος NOPA.....	28
4.4 Μέθοδος νινυδρίνης.....	28
4.5 Μέθοδος Sorensen	30
4.6 Μέθοδος προσδιορισμού αμμωνιακών ιόντων (Ανόργανο Άζωτο).....	30
4.6.1 Προσδιορισμός αμμωνιακών αλάτων	30
4.6.2 Ενζυμική μέθοδος προσδιορισμού αμμωνιακού αζώτου	30
Σκοπός της εργασίας.....	31
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	32
Κεφάλαιο 5ο: Πειραματική πορεία	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
5.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων	32
5.2 Μέθοδος φορμόλης.....	32

5.3 Μέθοδος NOPA.....	34
5.4 Μέθοδος νινυδρίνης.....	38
5.5 Μέθοδος προσδιορισμού αμμωνιακών αλάτων με ενζυμικό kit.....	40
Κεφάλαιο 6ο: Αποτελέσματα - συζήτηση.....	41
6.1 Μέθοδοι και δείγματα.....	41
6.2 Προσδιορισμός αφομοιώσιμου αζώτου (YAN).....	41
6.3 Προσδιορισμός α-αμινοαζώτου (FAN, Free Amino Nitrogen)	43
6.3.1 Μέθοδος NOPA.....	43
6.3.2 Μέθοδος νινυδρίνης.....	44
6.4 Σύγκριση μεθόδων FAN	45
6.5 Προσδιορισμός ανόργανου αζώτου (NH ₄ ⁺) με ενζυμική μέθοδο	45
6.6 Συγκριτικός σχολιασμός αποτελεσμάτων	47
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

ΕΥΡΕΥΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 : Κατανάλωση οίνου, Αρχαία Αίγυπτος. (www.medinova.gr)	14
Εικόνα 2: Σκηνή οινοποιίας , Αρχαία Ελλάδα (www.attikigi.com)	14
Εικόνα 3: Ο θεός Διόνυσος (www.hellenicmythology.com).....	15
Εικόνα 4:Λευκή οινοποίηση (www.infowine.gr)	16
Εικόνα 5:Ερυθρή οινοποίηση (https://oinologio.wordpress.com/).....	18
Εικόνα 6:Ροζέ οινοποίηση (https://vinologio.blogspot.com/)	19
Εικόνα 7: Κατανομή αζώτου κατά την συγκομιδή στα τμήματα του φυτού της αμπέλου (T. Verdenal, Á. Dienes-Nagy, 2021).....	21
Εικόνα 8: Δομή κυττάρου <i>saccharomyces cerevisiae</i> (www.researchgate.net).....	22
Εικόνα 9: Αντίδραση α-κετο-γλουρικού με αμμώνιο (www.toppr.com)	23
Εικόνα 10: Αφομοίωση από τις ζύμες άζωτο. (www.midwestwinepress.com)	24
Εικόνα 11: Οδός σχηματισμού ανώτερων αλκοολών από αμινοξέα (οδός Ehrlich) (www.researchgate.net)	25
Εικόνα 12: Ηλεκτρονικό πεχάμετρο, έχει σημασία η ακρίβεια.....	33
Εικόνα 13: Διάταξη τιτλοδότησης στη μεθοδό φορμόλης	34
Εικόνα 14: Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις.....	37
Εικόνα 15: Σχήμα αραίωσης ισολευκίνης.....	37
Εικόνα 16: Βρασμός δειγμάτων και σταδιακή αλλαγή χρώματος	
Εικόνα 17: Κυανωίδες χρώμα μετά τον βρασμό και την ψύξη	40
Εικόνα 18: Ενζυμικός αναλυτής.....	40

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1 : Μετρήσεις YAN με μέθοδο φορμόλης	42
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς μεθόδου NOPA.....	43
Διάγραμμα 3: Μετρήσεις FAN με μέθοδο φορμόλης	44
Διάγραμμα 4: Μετρήσεις αμμωνιακού αζώτου (mg/L N), ενζυμικό kit.....	46

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Παράγωγα μεταβολισμού κάποιων αμινοξέων και τυπικά αρώματα	25
Πίνακας 2: Μετρήσεις YAN(mg/L) , με μέθοδο φορμόλης.....	41
Πίνακας 3: Μετρήσεις FAN mg/L , μέθοδος NOPA	43
Πίνακας 4: Μετρήσεις FAN (mg/L N), μέθοδος νινυδρίνης	44
Πίνακας 5: Μετρήσεις αμμωνιακού αζώτου (mg/L N), ενζυμικό kit.....	46
Πίνακας 6: Τα αποτελέσματα συγκριτικά.....	47

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

YAN	Yeast Available Nitrogen
FAN	Free Amino Nitrogen
NOPA	Nitrogen by o-phthaldialdehyde

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1ο : Οίνος

1.1 Οίνος

Ο οίνος, ή αλλιώς κρασί, αποτελεί ένα αλκοολούχο ποτό το οποίο προκύπτει από τη ζύμωση του χυμού των σταφυλιών. Τεχνικά οίνος μπορεί να δημιουργηθεί και από τη ζύμωση άλλων φρούτων, όπως μήλο, φράουλα κ.α. Αλλά για να γραφτεί στην ετικέτα σκέτη η λέξη “οίνος” πρέπει να έχει ακολουθηθεί αλκοολική ζύμωση από σταφύλια.

1.2 Ιστορία οίνου

Το αμπέλι, από το οποίο προέρχεται το κρασί έχει σύμφωνα με τους παλαιοντολόγους, προϊστορία πολλών εκατομμυρίων ετών, το οποίο αποδεικνύεται από τα απολιθωμένα κλήματα που έχουν βρεθεί από τις επιστήμονες ακόμα και ηλικίας 60 εκατομμυρίων ετών. Η διαδικασία της αμπελουργίας εικάζεται πως έχει τις ρίζες της στην αγροτική επανάσταση και τη μόνιμη εγκατάσταση πληθυσμών με σκοπό την καλλιέργεια, χρονολογείται δηλαδή γύρω στο 5.000 π.Χ. Από τους πρώτους γνωστούς αμπελοκαλλιεργητές θεωρούνται οι αρχαίοι Πέρσες, οι Σημιτικοί λαοί και οι Ασσύριοι. Μεταγενέστερα οι γνώσεις αμπελουργίας και οινοποιίας μεταφέρθηκαν στους Αιγύπτιους, τους λαούς της Φοινίκης και τους πληθυσμούς της Μ. Ασίας και του Ελλαδικού χώρου (Τσακίρης, 1995).

Για τους Αρχαίους Έλληνες, ο οίνος αποτελεί ένα τεράστιο κεφάλαιο. Αυτό αποδεικνύεται από τη μυθολογία, την καθημερινή χρήση και την πολιτισμική σύνδεση που υπήρχε με το κρασί. Από διάφορες ανασκαφές, διαπιστώνεται πως υπάρχει συστηματική καλλιέργεια της αμπέλου στον ελλαδικό χώρο από το 4000 π.Χ. Πιο συγκεκριμένα το 2000 π.Χ., παρατηρείται πως η αμπελουργία έχει εξελιχθεί και υπήρχε διάκριση σε διαφορετικές ποικιλίες, ενώ συστηματική καλλιέργεια συναντάται στην Κρήτη την περίοδο 1750-1450 π.Χ.

Αργότερα στα κείμενα του Θεόφραστου (372-287 π.Χ., διαπιστώνεται η τεχνολογική εξέλιξη των αρχαίων Ελλήνων σε θέματα οινοποίησης. Μάλιστα, οι αρχαίοι Έλληνες είναι από τους καινοτόμους στην παλαίωση και διατήρηση του κρασιού, με τα πιθάρια που έθαβαν στη γη και τη χρήση βοτάνων και ρετσινιού (Τσακίρης, 1995).



Εικόνα 1 : Κατανάλωση οίνου, Αρχαία Αίγυπτος. (www.medinova.gr)



Εικόνα 2:Σκηνή οινοποισίας, Αρχαία Ελλάδα (www.attikigi.com)

Στη μυθολογία, ο Διόνυσος ήταν ο Θεός του κρασιού και σε κάθε ευκαιρία οι αρχαίοι τον τιμούσαν συνδυάζοντας τις λατρευτικές εκδηλώσεις με την οινοποισία. Γνωστές γιορτές προς τιμή του ήταν τα μικρά και μεγάλα Διονύσια, τα Ανθεστήρια και τα Λήναια.



Εικόνα 3: Ο θεός Διόνυσος (www.hellenicmythology.com)

Κατά την περίοδο της ρωμαϊκής κυριαρχίας, το κρασί συνέχισε να παίζει κυρίαρχο ρόλο στη ζωή των ανθρώπων. Κατά τα βυζαντινά και μεσαιωνικά χρόνια το μεγαλύτερο κομμάτι της αμπελουργίας και της οινοποίησης είχε περάσει στο κομμάτι της εκκλησίας. Η πλειοψηφία της παραγωγής γινότανε από ορθόδοξους και καθολικούς μοναχούς, οι οποίοι χρησιμοποιούσαν τον οίνο στα τελετουργικά της χριστιανικής πίστης. Εκείνη την χρονολογική περίοδο παρουσιάζονται και τα πρώτα αποστάγματα, καθώς και τα πρώτα οινοπωλεία με τη μορφή που τα ξέρουμε σήμερα (Τσακίρης, 1995).

Μετά τον 15ο αιώνα παρουσιάζεται μια άνθηση στην παραγωγή κρασιού και μια κλιμακωτή αύξηση στην κατανάλωση του. Με πρωτοπόρες χώρες της Κεντρικής Ευρώπης, όπως η Γαλλία, η Γερμανία και η Ιταλία αναπτύσσονται συνεχώς καινούργιες τεχνικές για την δημιουργία πιο ποιοτικών οίνων. Μετά την επιδημία της φυλλοξήρας που στιγματίσει την Ευρώπη στα τέλη του 19ου αιώνα και τις αρχές του 20ου, οι ευρωπαϊκοί αμπελώνες ανέκαμψαν και δημιουργήθηκαν οι σύγχρονοι οινικοί χάρτες.

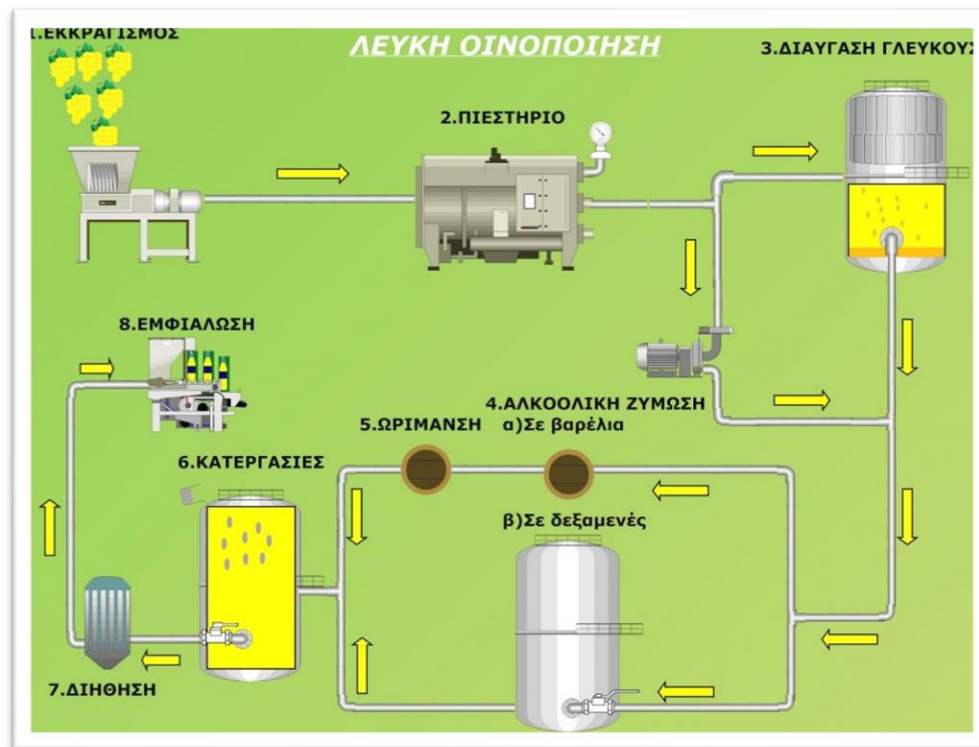
Κεφάλαιο 2ο : Πορεία οινοποίησης

2.1 Οινοποίηση

Ο όρος οινοποίηση σε γενικές γραμμές περικλείει όλες τις διαδικασίες που ξεκινούν από τη συλλογή της πρώτης ύλης για τον οίνο, τα σταφύλια, μέχρι τη στιγμή που τελειώνει η μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη μέσω της διαδικασίας της αλκοολικής ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια της επιτελούνται όλες οι κρίσιμες επεμβάσεις για να ληφθούν τα ευεργετικά στοιχεία που διαθέτει το σταφύλι και να απομονωθούν τα επιζήμια τα οποία θα επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα του οίνου.

Ανάλογα με το σταφύλι που υπάρχει ως πρώτη ύλη και με το κρασί που πρόκειται να παραχθεί, διακρίνονται διαφορετικά είδη οινοποίησης, τα οποία έχουν διαφορετικά στάδια και βήματα. Τα τρία βασικά είδη είναι η λευκή, η ερυθρή και η ροζέ οινοποίηση.

2.2 Λευκή οινοποίηση



Εικόνα 4: Λευκή οινοποίηση (www.infowine.gr)

Οι λευκοί οίνοι, κατά κανόνα, παράγονται με τη ζύμωση του γλεύκους από λευκά σταφύλια, η οποία συμβαίνει μόνο στο χυμό, δεν χαρακτηρίζεται δηλαδή από τη συμπαράμονή των στεμφύλων με το χυμό, γεγονός που περιορίζει στο ελάχιστο την εκχύλιση των διαφόρων συστατικών των στερεών μερών του σταφυλιού. Κατά συνέπεια ο διαχωρισμός του γλεύκους οφείλει να γίνεται το γρηγορότερο δυνατό. Ο χρόνος συλλογής των σταφυλιών διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία, την περιοχή, το φορτίο του αμπελώνα κλπ. Μετά τη συγκομιδή, είναι σημαντικό τα σταφύλια να μεταφερθούν όσο πιο γρήγορα και ανέπαφα, χωρίς να αναπτυχθούν μεγάλες θερμοκρασίες στο οινοποιείο. Αφού μεταφερθούν στο οινοποιείο αδειάζονται στον σταφυλοδόχο και από εκεί με την ταινία μεταφοράς οδηγούνται στον εκκραγιστήρα-σπαστήρα. Εκεί γίνεται ο απορραγισμός και η έκθλιψη (σπάσιμο) της ράγας. Τις περισσότερες φορές σε αυτό το στάδιο γίνεται και προσθήκη θειώδους ανυδρίτη, που διαδραματίζει αντιοξειδωτικό και αντιοξειδασικό ρόλο. Ο θειωμένος σταφυλοπολτός μεταφέρεται με αντλία στο πιεστήριο. Τα περισσότερα οινοποιεία πλέον χρησιμοποιούν πνευματικά πιεστήρια, όπου η πίεση ασκείται χάρη στη διόγκωση μιας ελαστικής μεμβράνης με τη βοήθεια αέρα ή νερού υπό πίεση. Το γλεύκος ρέει μέσα από τις οπές και στη συνέχεια συγκεντρώνεται σε μια λεκάνη στο κάτω μέρος του πιεστηρίου, στο οποίο συλλέγεται. Από το πιεστήριο σε μια πίεση 0,2 bar λαμβάνεται ο πρόργωγος, ο οποίος είναι και ο μούστος

καλύτερης ποιότητας. Στη συνέχεια ασκούνται σταδιακά ήρεμες πιέσεις ώσπου να φτάσει 1,8 bar. Από τις πρώτες πιέσεις συλλέγεται το γλεύκος που βρίσκεται στη μεσαία ζώνη της σάρκας και από τις δεύτερες πιέσεις το γλεύκος που βρίσκεται στη κεντρική ζώνη της σάρκας. Στη συνέχεια το γλεύκος μεταφέρεται από το πιεστήριο στη δεξαμενή απολάσπωσης (Τσακίρης, 1988), που είναι μια ανοξειδωτή ψυχόμενη δεξαμενή. Εκεί το γλεύκος αφήνεται για 12-24 ώρες όπου καθιζάνει η οινολάσπη.

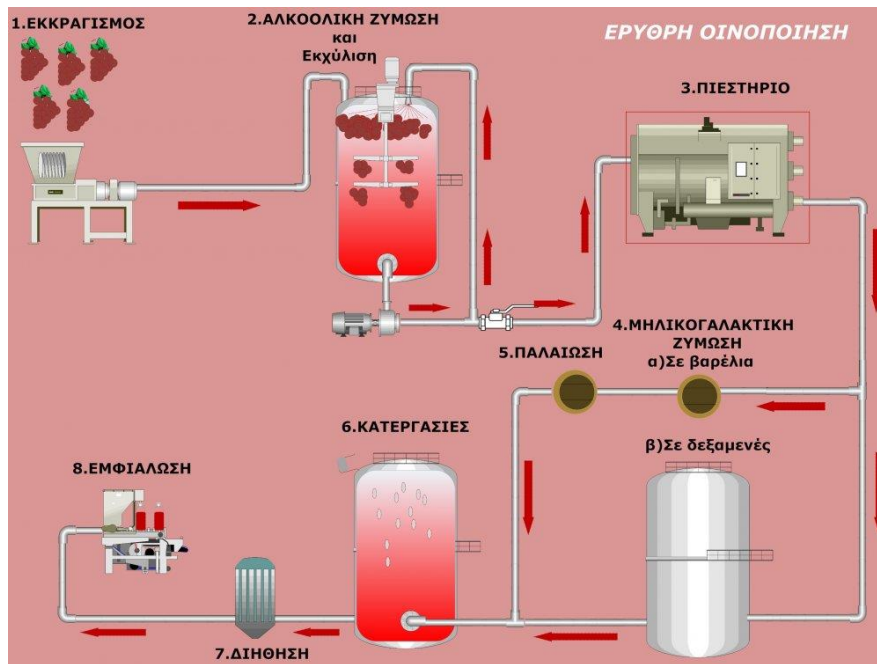
Μετά την απολάσπωση το διαυγές πλέον γλεύκος μεταφέρεται στη δεξαμενή ζύμωσης, αφού έχουν προηγηθεί όλες οι απαραίτητες διορθώσεις του γλεύκους, όπως η διόρθωση της οξύτητας (αύξηση ή μείωση) και η προσθήκη μπετονίτη (άργιλος, κολλοειδούς μορφής), ο οποίος προσροφά τις πρωτεΐνες που μπορούν να προκαλέσουν πρωτεϊνικό θόλωμα (Τσακίρης, 1988). Έπειτα αρχίζει η αλκοολική ζύμωση, η οποία μπορεί να είναι είτε φυσική (με χρήση ιθαγενών ζυμών) είτε ελεγχόμενη (με επιλογή στελεχών ζυμών). Η αλκοολική ζύμωση είναι μια εξώθερμη αντίδραση κάτι το οποίο συνεπάγεται πρόκληση ενέργειας και αύξηση της θερμοκρασίας, η οποία πρέπει να παρακολουθείται συχνά. Η κατάλληλη θερμοκρασία για μια λευκή οινοποίηση είναι 16-20°C και για αυτό η δεξαμενή ζύμωσης είναι ψυχόμενη. Τη δεύτερη ή τρίτη μέρα γίνεται αερισμός της ζύμωσης που έχει ως αποτέλεσμα τον διπλασιασμό των ζυμών και την εκ νέου ενεργοποίησή της. Σε καθημερινή βάση πραγματοποιείται έλεγχος ογκομετρούμενης και πτητικής οξύτητας, σακχάρων, αλκοόλ, θερμοκρασίας και ολικού θειώδους. Το γλεύκος θεωρείται ότι αποζυμώθηκε όταν τα ανάγοντα σάκχαρα είναι σε ποσοστό μικρότερο από 1,5 g/L, η λεγόμενη φάση της αποζύμωσης (Τσακίρης, 1988). Ακολουθεί φιλτράρισμα και το κρασί μεταγγίζεται σε μια δεξαμενή αποθήκευσης. Ύστερα ή θα εμφιαλωθεί κατευθείαν ή θα κάνει ένα μικρό πέρασμα από δρύινα βαρέλια για παλαίωση και άρωμα. Τα λευκά κρασιά γενικά δεν έχουν μεγάλο δυναμικό παλαίωσης και για αυτό το λόγο στη συντριπτική πλειοψηφία τους καταναλώνονται φρέσκα και όχι μετά από 2 χρόνια.

2.3 Ερυθρή οινοποίηση

Το κύριο χαρακτηριστικό που διαχωρίζει την ερυθρή από τη λευκή οινοποίηση είναι πως η ζύμωση γίνεται παρουσία των στεμφύλων που αποσκοπεί στην παραλαβή χρωστικών (κόκκινο χρώμα), γευστικών και αρωματικών συστατικών (Τσακίρης 1988).

Μετά τη συγκομιδή, αφού τα σταφύλια έχουν μεταφερθεί με ποιοτικές προδιαγραφές στο οινοποιείο, όπως και στη λευκή οινοποίηση, το πρώτο βήμα είναι να γίνει η έκθλιψη των ραγών για να απελευθερωθεί το γλεύκος στον εκκραγιστήρα-σπαστήρα.

Στη συνέχεια ο σταφυλοπολτός μεταφέρεται με αντλία σε μια μεγάλη δεξαμενή ζύμωσης τον **οινοποιητή**. Ταυτόχρονα γίνεται προσθήκη θειώδους ανυδρίτη κατά ομοιογενή τρόπο. Κατά την παραμονή του σταφυλοπολτού στον οινοποιητή επιλέγεται αν θα γίνει προσθήκη ζυμών με τη μορφή εμβολίου, όπως και στη λευκή οινοποίηση. Η πρόκληση είναι ότι πρέπει να γίνει καλή ομογενοποίηση για να κατανεμηθούν οι ζύμες σε όλη τη σταφυλομάζα.



Εικόνα 5:Ερυθρή οινοποίηση (<https://oinologio.wordpress.com/>)

Μετά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, η στερεά μάζα του σταφυλοπολτού ενώνεται σε μία μάζα στο πάνω μέρος της δεξαμενής δημιουργώντας το καπέλο. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης γίνεται ανακύκλωση του γλεύκους και διαβροχή του καπέλου. Αυτό πραγματοποιείται με τράβηγμα του γλεύκους από τον πυθμένα της δεξαμενής, με βοήθεια αντλίας, και επαναφορά του στο επάνω μέρος, βρέχοντας τα στέμφυλα. Με αυτό το τρόπο εξασφαλίζεται το κατάλληλο χρώμα και λαμβάνονται τα επιθυμητά φαινολικά συστατικά (Τσακίρης, 1988). Οι διαδικασίες αυτές και ο χρόνος εκχύλισης μπορεί να διαρκέσουν από λίγες μέρες έως και πολλές εβδομάδες. Η ιδανική θερμοκρασία ζύμωσης για τη γεύση και τα αρώματα στην ερυθρή οινοποίηση είναι 25-28°C.

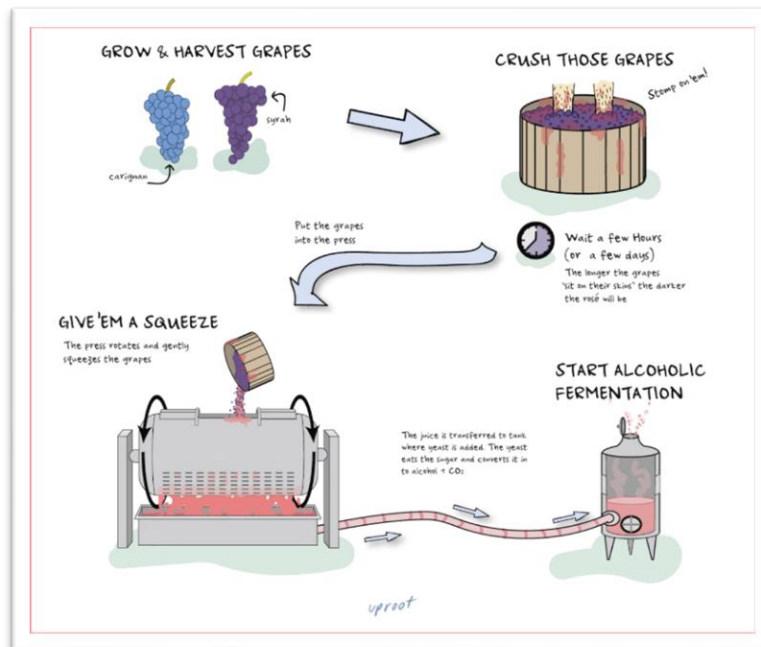
Στη συνέχεια για να συνεχιστεί η ζύμωση, το γλεύκος μεταγγίζεται χωρίς τα στέμφυλα σε μια άλλη ψυχόμενη δεξαμενή ζύμωσης. Εκεί ιδανικά πραγματοποιείται ένα άλλο είδος ζύμωσης που προκαλείται από βακτήρια και όχι από ζυμομύκητες, η μηλογαλακτική ζύμωση, η οποία περιλαμβάνει τη μετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ, από τα γαλακτικά βακτήρια. Μετά το τέλος της ζύμωσης, ο παραγόμενος ερυθρός οίνος οδηγείται σε δεξαμενή αποθήκευσης για να εμφιαλωθεί και να καταναλωθεί φρέσκος. Διαφορετικά, οδηγείται σε δρύινα βαρέλια για ωρίμανση και της παλαίωση.

2.4 Ροζέ οινοποίηση

Ο ροζέ οίνος μπορεί να προέλθει από ερυθρές ή ερυθρωπές ποικιλίες σταφυλιών. Υπάρχουν διαφορετικές τεχνολογίες για την παραγωγή ροζέ κρασιών. Πολύ διαδεδομένη μέθοδος είναι να ακολουθείται η πορεία της λευκής οινοποίησης. Δηλαδή μετά την έκθλιψη των ραγών, ο σταφυλοπολτός να οδηγείται στο πνευματικό πιεστήριο. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός πως επιλέγεται ένα πρόγραμμα πίεσης για να επιτευχθεί ο ζητούμενος βαθμός

εκχύλισης και το επιθυμητό χρώμα. Επίσης απομακρύνονται οι τελευταίες πιέσεις που περιέχουν τις περισσότερες ταννίνες.

Άλλη μέθοδος είναι να ακολουθηθεί τεχνική ερυθρής οινοποίησης. Στον οινοποιητή, όμως, η εκχύλιση διαρκεί μόλις 5-24 ώρες (Τσακίρης, 1988). Παλιότερα υπήρχε και η αντίληψη ότι ένα ροζέ κρασί μπορεί να παραχθεί από την ανάμιξη ενός λευκού και ενός ερυθρού οίνου, όμως κάτι τέτοιο επιτρέπεται μόνο στην παραγωγή της σαμπάνιας.



Εικόνα 6: Ροζέ οινοποίηση (<https://vinologio.blogspot.com/>)

Κεφάλαιο 3ο: Άζωτο

Το άζωτο είναι το πιο άφθονο ελεύθερο χημικό στοιχείο στον πλανήτη, καθώς αποτελεί και το 78% της ατμόσφαιρας σε μορφή διατομικού αζώτου N_2 . Το άζωτο είναι πηγή ζωής και απαραίτητο για τα ζωντανά κύτταρα, καθώς σχηματίζει πολλές κρίσιμες ενώσεις για τη λειτουργία τους, όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα και άλλες.

3.1 Εδαφικό άζωτο

Το εδαφικό άζωτο έχει προέλευση από το ατμοσφαιρικό μοριακό άζωτο που δεν χρησιμοποιείται από τα φυτά. Το άζωτο στο έδαφος υπάρχει σε 2 μορφές:

Α) **Ανόργανο άζωτο:** Ανόργανες μορφές είναι τα νιτρώδη, το αμμώνιο, τα οξείδια του αζώτου και το μοριακό άζωτο. Οι πρώτες 2 μορφές αντιπροσωπεύουν το 2-5% του συνολικού εδαφικού αζώτου.

Β) **Οργανικό άζωτο:** Είναι κυρίως ελεύθερα αμινοξέα (20-40%), πρωτεΐνες, αμινοσάκχαρα (5-10%) και άλλα πολύπλοκα μείγματα αζώτου. Το 90% του εδάφους είναι οργανικής μορφής. Το οργανικό άζωτο δεν είναι διαθέσιμο στα φυτά, για να καταστεί αφομοιώσιμο θα πρέπει να υποστεί επεξεργασία που ονομάζεται ορυκτοποίηση, κατά την οποία απελευθερώνονται οι ανόργανες μορφές αζώτου από την οργανική ουσία του εδάφους (Καλύβας, 2009).

3.2 Άζωτο στο αμπέλι

Το άζωτο αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία, καθώς συμμετέχει σε ενώσεις καθοριστικής σημασίας για το φυτό, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Προσλαμβάνεται κυρίως στην νιτρική (NO_3^-) και στην αμμωνιακή (NH_4^+) μορφή. Σε αμπελώνα με εδάφη υγρά, θερμά, καλώς αεριζόμενα και με $pH > 5$ κυριαρχεί το νιτρικό άζωτο. Για να αξιοποιηθεί και να ενσωματωθεί στις πρωτεΐνες απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας σε μια αναγωγική διαδικασία που περιλαμβάνει δύο ενζυμικές αντιδράσεις. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα στα φύλλα ή στις ρίζες. Η ενέργεια που δαπανάται είναι περισσότερη από 100 kcal/mole και εξασφαλίζεται από τη φωτοσύνθεση (Νικολάου, 2020).

Σε συνθήκες μειωμένης πρόσληψης νιτρικών υπάρχει μειωμένο επίπεδο των νιτρικών οξέων στα φύλλα, που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή τους. Σε συνθήκη υπερσυγκέντρωσης νιτρικού αζώτου αποθηκεύεται στο χυμοτόπιο και απορροφάται από τις ρίζες. Διαφορετικά ανάγεται σε αμμωνία και συνθέτει οργανικές ενώσεις όπως πρωτεΐνες, με τη βοήθεια ενός κατάλληλου ενζυμικού συστήματος.

Το αμπέλι για να αναπτυχθεί έχει ανάγκη και άλλα στοιχεία της φύσης όπως κάλιο, φώσφορο, ασβέστιο, θείο και μαγνήσιο. Η σωστή αζωτούχος θρέψη στην αρχή της εκβλάστησης αυξάνει κυρίως το μαγνήσιο και το μαγγάνιο στους μίσχους της αμπέλου (S. Bell, I. Francis 2013).

Η επάρκεια αζώτου σε συνδυασμό με ευνοϊκές συνθήκες είναι καίριας σημασίας για την ανάπτυξη του φυτού. Πιο συγκεκριμένα, η υπερβολική ζηρότητα που προσδίδει το

άζωτο μεγαλώνει την ταχύτητα αύξησης των βλαστών, καθώς αυξάνει το μήκος και το πάχος τους. Επίσης βελτιστοποιεί το μέγεθος των φύλλων και της φυλλικής επιφάνειας και καθυστερεί η διακοπή αύξησης των βλαστών και της ωρίμανσης των καρπών. Σημαντικό είναι ότι καθυστερεί η εκβλάστηση και αυξάνει τον αριθμό των βλαστανόντων οφθαλμών. Το τυπικό πράσινο χρώμα των φύλλων έχει σχέση με την περιεκτικότητα σε άζωτο, καθώς υπάρχει στο μόριο της χλωροφύλλης και συγκεκριμένα στο δακτύλιο της πορφυρίνης (Νικολάου, 2020).

Σε περιπτώσεις έλλειψης αζώτου, τα φύλλα χάνουν το καθοριστικό τους χρώμα, γίνονται ωχρά και κίτρινα, οι κληματίδες έχουν μειωμένη ζωηρότητα και εμφανίζεται ως γενικευμένη κατάσταση στον αμπελώνα ή ανθόρροια. Επίσης, υπάρχει προβληματική παραγωγή αμινοξέων και πρωτεϊνών που οδηγεί σε προβληματικές ζυμώσεις. Και σε αντίθετη περίπτωση αυξημένης αζωτούχας θρέψης υπάρχουν επίσης αρνητικά αποτελέσματα. Αρχικά αυξάνεται η απορρόφηση του νερού από το έδαφος, δημιουργούνται φύλλα χυμώδη και λιγότερο ανθεκτικά με μειωμένη περιεκτικότητα σε ασβέστιο. Έτσι προσβάλλονται πιο εύκολα από μύκητες, έντομα και από τις καιρικές συνθήκες. Επίσης, αυξημένη ζωηρότητα συνεπάγεται καθυστερημένη ωρίμανση και μείωση ποιότητας της ράγας. Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί μείωση των ανθοκυανών και μείωση της εκχυλισματικότητας τους στα κόκκινα κρασιά. Τέλος, όταν υπάρχει περίσσεια αζώτου, το αμπέλι προσβάλλεται πιο εύκολα από μυκητολογικές ασθένειες όπως βοτρυτή , ωίδιο και σχηματίζονται ισταμίνη και θειαμίνη που συνδέονται με αλλεργικά φαινόμενα. Συνεπώς, η θρεπτική δράση του αζώτου πρέπει να μειώνεται προς την ωρίμανση και τη συγκομιδή.

12 tons/ha of grapes.	
N allocation at harvest	Nitrogen kg/ha per year
Wood and roots	27
Grapes	23
Total exported and immobilised	50
Shoots	5
Leaves	37
Total	92

Εικόνα 7: Κατανομή αζώτου κατά την συγκομιδή στα τμήματα του φυτού της αμπέλου (T. Verdenal, Á. Dienes-Nag, 2021).

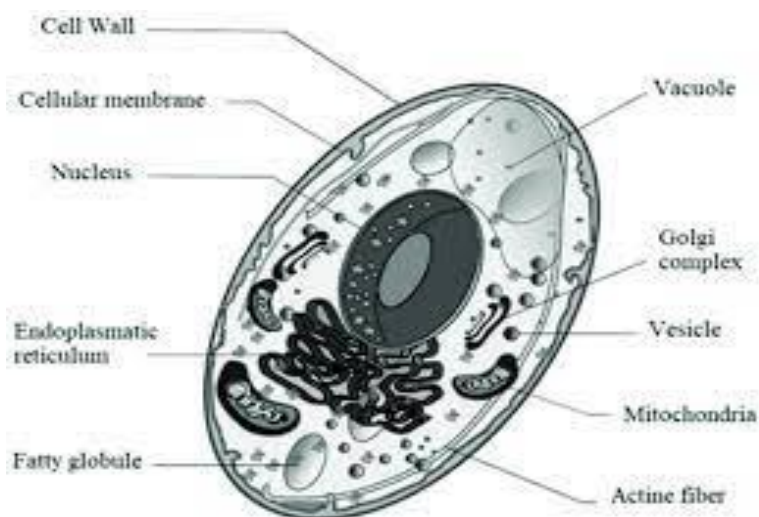
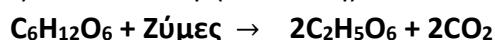
3.3 Άζωτο στην αλκοολική ζύμωση

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, όταν το γλεύκος μεταφέρεται στη δεξαμενή ζύμωσης, αρχίζει η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης. Αυτό μπορεί να γίνεται ή αυθόρμητα με τις γηγενείς ζύμες ή με ελεγχόμενη ζύμωση με το εμβόλιο που έχει προετοιμαστεί.

Οι ζυμομύκητες είναι ελλειψοειδείς, ραβδοειδείς ή και σφαιρικοί, συνήθως μονοκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι βρίσκονται στο έδαφος, στους καρπούς και στα φύλλα των οπωροφόρων δέντρων και ιδιαίτερα στα σταφύλια. Είναι πολύ μεγαλύτερα κύτταρα από τα μονοκύτταρα βακτήρια.

Στα σταφύλια υπάρχουν πολλά και διαφορετικά στελέχη ζυμών. Όπως *Saccharomyces cerevisiae*, *ellipsoideus*, *pastorianus*, *bayanus*, *rompre* κλπ. Τις περισσότερες φορές ο οινολόγος διαλέγει ένα στέλεχος για να προβεί σε ελεγχόμενη ζύμωση. Πολύ κοινή επιλογή είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, καθώς πληροί ορισμένες ιδιότητες. Συγκεκριμένα, πραγματοποιεί γρήγορες και υψηλής αποτελεσματικότητας ζυμώσεις, υψηλή αντοχή σε αιθανόλη και θειώδη, χαμηλή βέλτιστη θερμοκρασία, ικανότητα αυτόλυσης, μέτρια παραγωγή βιομάζας και παραγωγή συμπαγών ιζημάτων.

Οι ζυμομύκητες κυρίως μετατρέπουν τα αρχικά σάκχαρα που υπάρχουν στο γλεύκος (και μετριοούνται σε βαθμούς brix) σε αλκοόλη (αιθανόλη) και σε CO₂ με την αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης:



Εικόνα 8: Δομή κυττάρου *saccharomyces cerevisiae* (www.researchgate.net)

Όπως όλοι οι μικροοργανισμοί, έτσι και οι ζυμομύκητες, έχουν ανάγκη μια σειρά θρεπτικών συστατικών για να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν, όπως άνθρακα, βιταμίνες, μέταλλα και πρωτίστως άζωτο σε οργανική και ανόργανη μορφή (αμμωνία και αμινοξέα).

βιομάζας, δηλαδή αργών ή ακόμα και κολλημένων ζυμώσεων. Οι ζύμες αφομοιώνουν σε γλεύκη πλούσια σε άζωτο περίπου 400 mg/L και δημιουργούν ποιοτικά κρασιά. Ενώ έχει αποδειχθεί πως σε γλεύκη φτωχά σε άζωτο (<140 mg/L) το αποτέλεσμα είναι κρασιά πιο στυπτικά, πικρά και λιγότερο φρουτώδη (A. Dienes- Nagy, G. Marti, L. Breant 2020). Για αυτό τον λόγο είναι σημαντικό να προσδιορίζουμε το άζωτο στην οινοποίηση.

$$\mathbf{YAN = FAN + NH_3}$$

YAN: Yeast Assimilable Nitrogen
FAN : Free Amino Nitrogen
NH₃: Ammonia Nitrogen

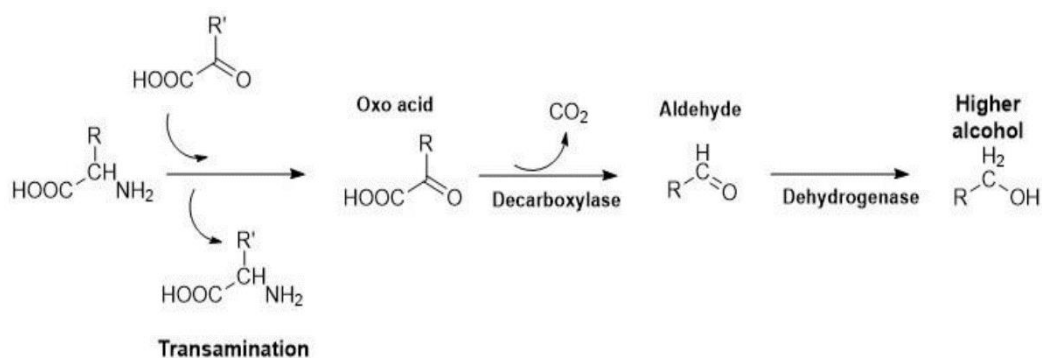
Εικόνα 10: Αφομοίωσιμο από τις ζύμες άζωτο. (www.midwestwinepress.com)

Πολλές φορές σε περίπτωση έλλειψης αζώτου γίνεται προσθήκη φωσφορικού διαμμωνίου (DAP) στο γλέυκος πριν τον εμβολιασμό. Η αλόγιστη χρήση DAP όμως μπορεί να αυξήσει την παραγωγή οξικών εστέρων, και ειδικά οξικού αιθυλεστέρα, αυξάνοντας την πτητική οξύτητα και καταστέλλοντας τον ποικιλιακό χαρακτήρα σε περιπτώσεις που $YAN > 450-500$ mg/L (Ugliano, Henscke, Herderich, 2007).

Ο υπολογισμός του YAN γίνεται με συσχέτισμό των ελεύθερων α-αμινοξέων, και αναφέρεται ως ελεύθερο άζωτο (FAN).

Ο μεταβολισμός των αζωτούχων ενώσεων, εκτός από τη θρέψη των ζυμών, αποδίδουν κατά τη ζύμωση προϊόντα τα οποία προσδίδουν ποιότητα και αρωματικό χαρακτήρα. Όταν οι ζύμες απαμινώνουν τα αμινοξέα για να απελευθερώσουν τα συστατικά του αζώτου που χρειάζονται, αφήνουν πίσω σκελετούς άνθρακα ως υποπροϊόντα της ζύμωσης.

Η απομίνωση των αμινοξέων, μέσω μιας μεταβολικής διαδικασίας (οδός Ehrlich, Εικόνα 11), οδηγεί στον σχηματισμό α-κετο-οξέων τα οποία με την σειρά τους ανάγονται σε ανώτερες αλκοόλες, οι οποίες προσδίδουν πολλά χαρακτηριστικά στον οίνο. Στον *Saccharomyces cerevisiae* έχει διαπιστωθεί πως υπάρχει ένα σύστημα τρανσαμινάσης, εξειδικευμένο για τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, το οποίο αποφεύγει τη μεταβολική οδό Ehrlich ή το πρώτο μέρος της (Dickinson, Norte 1993).



Εικόνα 11: Οδός σχηματισμού ανώτερων αλκοολών από αμινοξέα (οδός Ehrlich)

Συνεπώς, καταδεικνύεται πως η σύνθεση αζώτου στο σταφύλι και στη συνέχεια στο γλεύκος, διαμορφώνει τα αμινοξέα του γλεύκους, των οποίων η συγκέντρωση και το είδος καθορίζουν το ποικιλιακό αρωματικό χαρακτήρα της κάθε ποικιλίας και κατά συνέπεια του οίνου (G. Stygger, B. Prior, F.F. Bauer 2011).

Πίνακας 1: Παράγωγα μεταβολισμού κάποιων αμινοξέων και τυπικά αρώματα

Αμινοξύ	Ανώτερη αλκοόλη	Άρωμα
Λευκίνη	3-μεθυλβουτανόλη	Φρούτο, καρπός
Ισολευκίνη	2-μεθυλβουτανόλη	Πράσινο, βότανο
Βαλίνη	Ισοβουτανόλη	φρούτο
Φαινυλαλίνη	Φαινύλ-αιθύλ-αλκοόλη	Τριαντάφυλλο, μέλι
Θρεονίνη	Προπανόλη	
Τυροσίνη	Τυροσόλη	Μέλι

Το άζωτο έχει άμεση επιρροή στο ρυθμό της ζύμωσης καθώς ελέγχει τη διαθεσιμότητα πρόδρομων αμινοξέων για τη βιοσύνθεση της γλυκόλυσης και της βιομάζας των κυττάρων του ζυμομύκητα και επηρεάζοντας τη ροή μέσω της γλυκολυτικής οδού. Η απουσία αζώτου επιφέρει επιτάχυνση της μεταβολής των παρμεασών της γλυκόζης, μειώνοντας τη ζυμωτική ικανότητα. Αυτή η μείωση της δραστηριότητας της παρμεάσης του σακχάρου οδηγεί σε αργές ζυμώσεις και υψηλή υπολειμματικότητα σακχάρων (Boulton, Singleton, Bisson, Kunkee 2018).

3.4 Άζωτο στον οίνο

Σταφύλια, τα οποία περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις αζώτου ή η υπέρμετρη προσθήκη αζωτούχων οινολογικών σκευασμάτων, όπως φωσφορούχο διαμμώνιο, αλλά και η επιλογή στελέχους ζύμης, η θερμοκρασία, ο αερισμός, η διαύγαση και διάφορες οινολογικές τεχνικές, μπορεί να οδηγήσουν σε οίνους με υψηλή συγκέντρωση σε υπολειμματικό άζωτο. Αυτό μπορεί να διαδραματίσει διαφορετικούς ρόλους στον οίνο. Από τη μια πλευρά η υψηλή υπολειμματικότητα σε άζωτο ευνοεί σημαντικές διαδικασίες της οينوποίησης, όπως είναι η μηλογαλακτική ζύμωση. Πέρα από το υπολειμματικό άζωτο η διατήρηση του οίνου με τις οινολάσπες παρέχουν αρκετά θρεπτικά που ευνοούν την

εκδήλωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Patynowski et al 2002). Από την άλλη όμως, μπορεί να ευνοηθεί η μικροβιακή αστάθεια και ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος.

Επίσης, πολύ σημαντικό είναι πως ενώ το αφομοιώσιμο άζωτο από τις ζύμες είναι αναγκαίο, το άζωτο που δεν μεταβολίζεται μπορεί να συνδεθεί με την προσβολή και την παρουσία του *Brettanomyces Bruxellensis* στον οίνο (Bisson and Butzke, 2000, Bell and Henschke 2005). Ο *Brettanomyces Bruxellensis* μπορεί να μεταβολίσει μια ποικιλία αζωτούχων και ανθρακούχων πηγών. Ωστόσο, οι θρεπτικές απαιτήσεις για την ανάπτυξη στο κρασί δεν είναι πλήρως κατανοητές (Aguillar-Uscang et al. 2000, Conterno et al. 2006). Ο συγκεκριμένος μύκητας σχηματίζει πτητικές φαινόλες από τα φαινολικά οξέα, καθώς και ετεροκυκλικές ενώσεις αζώτου, στις οποίες αποδίδονται και τα αναγωγικά αρώματα που θυμίζουν ποντίκι, άλογο, καπνό, ιδρώτα.

Ο *Brettanomyces* μπορεί να θραφεί από διάφορες πηγές αζώτου, ακόμα και με μόνη πηγή, αμμωνιακά άλατα, όπως και γενικά η διάθεση αζώτου και οξυγόνου στη ζύμωση. Όταν γίνεται αζωτούχα θρέψη στον αμπελώνα, διαπιστώθηκε πως το ποσοστό αζώτου ήταν κατά μέσο όρο 1,4 φορές μεγαλύτερο σε οίνους. Επίσης η προλίνη, που δεν μεταβολίζεται από τους ζυμομύκητες, βρέθηκε στους οίνους 1,8 φορές υψηλότερη (Ough and Bell 1980). Η προλίνη υποστηρίζει την ανάπτυξη του *Brettanomyces Bruxellensis*.

Οι αζωτούχες ενώσεις παίζουν ρόλο και στην οργανοληπτικό χαρακτήρα ενός οίνου. Η σύνθεση αζώτου επηρεάζει την παραγωγή αρωματικών ενώσεων, επεμβαίνοντας στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Επίσης, μερικές αζωτούχες ενώσεις που προέρχονται από την αυτόλυση κυττάρων ζύμης επιδρούν απευθείας στο άρωμα και τη γεύση. Όπως έχει αναφερθεί ο ποικιλιακός αρωματικός χαρακτήρας των ποικιλιών, οφείλεται εν πολλοίς στη σύνθεση αμινοξέων στο γλεύκος και γι' αυτό η προσθήκη αζώτου στο γλεύκος είναι παράγοντας διαφοροποίησης του αρωματικού προφίλ με τον σχηματισμό ανώτερων αλκοολών και εστέρων.

Τέλος, πολλά κύτταρα αυτολύονται και δίνουν συστατικά που περιέχουν άζωτο, όπως αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες είναι μαννοπρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στη σταθεροποίηση του χρώματος του κρασιού.

3.5 Άζωτο στην παλαίωση του οίνου

Η παλαίωση είναι μια σημαντική διαδικασία που γίνεται στους οίνους. Πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό στους ερυθρούς οίνους και σε μικρότερο ποσοστό στους λευκούς οίνους. Η διαδικασία μπορεί να πάρει μέρος είτε στη δεξαμενή είτε σε δρύινα βαρέλια. Στα δρύινα βαρέλια, η διαδικασία γίνεται πιο γρήγορα λόγω της μικροοξυγόνωσης και το κρασί ωριμάζει. Επίσης αποκτάει αρώματα από το βαρέλι τα οποία γίνονται πιο έντονα εάν το βαρέλι είναι νέο και δεν έχει ξαναχρησιμοποιηθεί.

Υπάρχει σχέση μεταξύ των άτυπων αρωμάτων παλαίωσης στο γλεύκος και της συγκέντρωσης του αφομοιώσιμου αζώτου στις ζύμες (Sponholz et al. 2000). Το γλεύκος αυτό προέρχεται από σταφύλια αμπελώνα με μειωμένη αζωτούχα θρέψη.

Η ορθο-αμινοκετοφαινόνη (O- AAP) είναι μια αζωτούχα ένωση η οποία συνδέεται με οσμές μη τυπικής παλαιώσης σε λευκούς οίνους (Rapp et al. 1993). Οι ίδιοι χάνουν το τυπικό αρωματικό τους χαρακτήρα και παρουσιάζουν αναγωγικά αρώματα όπως άνθη ακακίας, ναφθαλίνης και γυαλιστικού πατωμάτων.

Κεφάλαιο 4ο: Μέθοδοι προσδιορισμού αζώτου

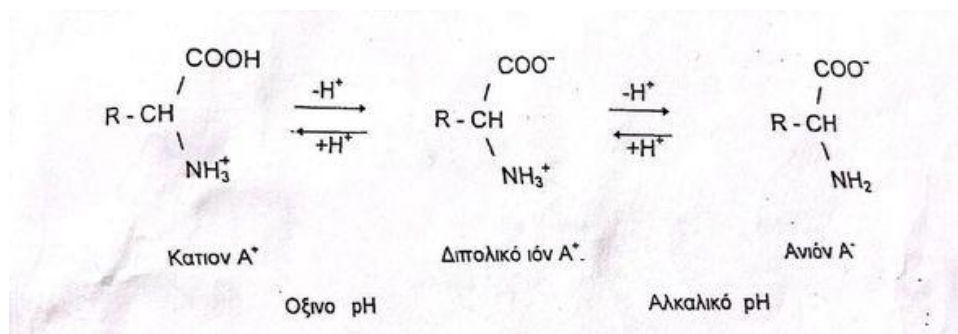
4.1 Μέθοδοι και κατηγορίες

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι για τον προσδιορισμό του αζώτου στα γλεύκη και τον οίνο. Κάποιες από αυτές τις μεθόδους είναι η μέθοδος φορμόλης η οποία προσδιορίζει το ολικό άζωτο (YAN), η μέθοδος NOPA και η μέθοδος της νινυδρίνης που προσδιορίζουν το άζωτο των α-αμινομάδων (FAN). Επίσης μπορεί να γίνει προσδιορισμός των αμμωνιακών ιόντων NH_4^+ με ενζυμικό kit ή αμμωνιακών αλάτων ή προσδιορισμός αμινοξέων με τη μέθοδο Sorensen.

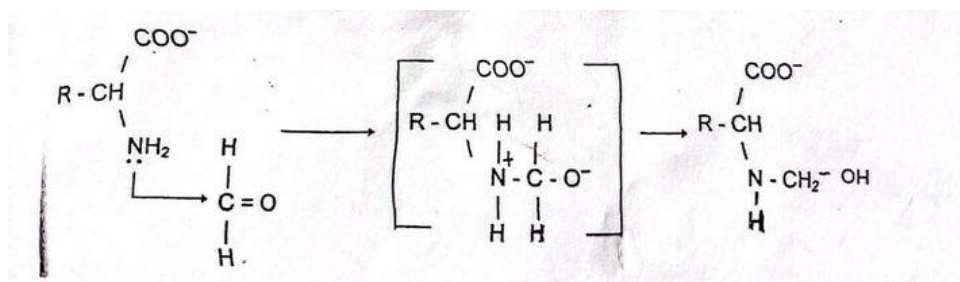
4.2 Μέθοδος της φορμόλης

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζεται το άζωτο που είναι διαθέσιμο στις ζύμες για να ξεκινήσουν την αλκοολική ζύμωση, το αφομοιώσιμο άζωτο (YAN). Αυτό αποτελείται από το σύνολο του αμμωνιακού αζώτου (NH_4^+) και του οργανικού αζώτου δηλαδή του αζώτου της ελεύθερης αμινομάδας των αμινοξέων (αποκλείοντας την προλίνη και το άζωτο των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών). Ο προσδιορισμός στηρίζεται στον μηχανισμό αντίδρασης της ελεύθερης αμινομάδας των αμινοξέων με τη μυρμηκική αλδεΰδη (φορμαλδεΰδη ή φορμόλη HCH=O) και το απελευθερούμενο υδρογόνο ογκομετρείται με μια βάση, πιο συχνά υδροξείδιο του νατρίου (NaOH). Τα ιόντα αμμωνίου τιτλοδοτούνται και αυτά με υδροξείδιο του νατρίου.

Ανάλογα με το pH, ένα αμινοξύ εμφανίζεται σε τρεις μορφές:



Με τη προσθήκη της φορμόλης σε αλκαλικό περιβάλλον πραγματοποιείται αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης:



Κατά την παραπάνω αντίδραση όταν καταναλώνεται η μορφή A^- , προκαλείται μετατόπιση της ισορροπίας προς τα δεξιά. Η φορμόλη επιτρέπει τον υπολογισμό της ολικής μετατροπής προς τη μορφή A^- , με την απελευθέρωση κάθε φορά ενός πρωτονίου H^+ το οποίο μετατρέπεται από την βάση κατά την ογκομέτρηση.

4.3 Μέθοδος NOPA

Τα αμινοξέα και τα μικρά πεπτίδια του γλεύκους (διπεπτίδια και τριπεπτίδια) είναι γνωστά συλλογικά ως ελεύθερο αμινο άζωτο (FAN), το οποίο θεωρείται ότι είναι ένα καλό κριτήριο για πιθανή αναπαραγωγή των ζυμών και αποτελεσματικότητα της αλκοολικής ζύμωσης.

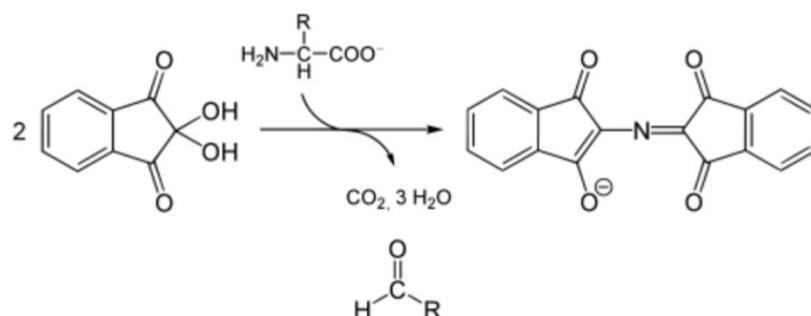
Με τη μέθοδο NOPA μπορούμε να μετρήσουμε φασματοφωτομετρικά το α -αμινο άζωτο σε γλεύκη οίνου και στον οίνο. Πιο συγκεκριμένα σε αυτή τη μέθοδο μετριέται φασματοφωτομετρικά η OPA (ο-φθαλιδαλδεΐδης) και της NAC (N-ακετυλοκυστεΐνη). Από τη μέθοδο υπολογίζουμε τις τελικές ομάδες α -αμινοαζώτου των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών και πραγματοποιείται εκτίμηση αμινοξέων. Δεν περιλαμβάνονται η προλίνη η αμμωνία και το αμμώνιο (Butzke, Dukes 1998).

4.4 Μέθοδος νινυδρίνης

Η μέθοδος νινυδρίνης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ποσότητας ελεύθερου αμινικού αζώτου (FAN) σε αζωτούχα δείγματα και χρησιμοποιείται ευρέως και στα γλεύκη και τους οίνους για την εξακρίβωση του αμινικού αζώτου το οποίο είναι διαθέσιμο στις ζύμες κατά την διάρκεια της ζύμωσης και της ποσότητας που παραμένει. Η μέθοδος μετρά τα α -αμινοξέα, την αμμωνία, τα διπεπτίδια και τα τριπεπτίδια και όχι την προλίνη (Annie E. Hill, Graham G. Stewart 2019) . Στα γεύκη οίνου η μέθοδος δεν είναι ειδική για το α -αμινοάζωτο καθώς υπάρχει γ -αμινοβουτυρικό οξύ το οποίο αντιδράει με την νινυδρίνη και αποδίδει ουσιαστικό χρώμα.

Η μέθοδος βασίζεται στην αλλαγή χρώματος που παρατηρείται κατόπιν βρασμού ουδέτερου διαλύματος πρωτεΐνης με μικρή ποσότητα νινυδρίνης. Πιο συγκεκριμένα, μετά τον βρασμό το άχρωμο διάλυμα αποκτάει ένα μπλε-ιώδες χρώμα το οποίο οφείλεται στην αντίδραση. Αυτή την δίνουν τα πεπτίδια, και τα αμινοξέα εκτός της προλίνης, αλλά και ενώσεις όπως αμίνες, αμμωνιακά άλατα. Την αντίδραση δίνουν επίσης, οι πρωτοταγείς αμίνες και αμμωνία, χωρίς όμως να απελευθερώνεται διοξείδιο του άνθρακα.

Η νινυδρίνη αποτελεί ένα ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα που αντιδρά με όλα τα α-αμινοξέα στην περιοχή pH 4-8, σχηματίζοντας ενώσεις ιώδους χρώματος. Το ιδανικό pH για την αντίδραση είναι 5,5 (D. Perret, N.K. Nayuni 2014). Στην περίπτωση αμινοξέων, όπως η προλίνη και υδροξυπρολίνη, κατά την αντίδραση νινυδρίνης σχηματίζονται παράγωγα κίτρινο χρώματος.



Ανάλογα με τη φύση της πρωτεΐνης, το εμφανιζόμενο χρώμα μπορεί να διαφοροποιηθεί και να είναι προς το κόκκινο ή προς το καφέ, με την αντίδραση νινυδρίνης επίσης και κυανωιδές χρώμα δίνουν οι αμμωνία και πρωτοταγείς αμίνες.



Η νινυδρίνη σχηματίζει με την αμινομάδα μια βάση Schiff η οποία αποκαρβοξυλιώνεται κατά την θέρμανση.

Στην συνέχεια ο διπλός δεσμός υφίσταται μετάθεση και διασπάται υδρολυτικά και παράγεται αλδεϋδη με ένα άτομο C λιγότερο από το αρχικό αμινοξύ.

Η αμίνη αντιδρά με ένα δεύτερο μόριο νινυδρίνης και προκύπτει μια διμοριακή ένωση νινυδρίνης κυανού χρώματος της οποίας το ανιόν σταθεροποιείται λόγω δομών συντονισμού.

4.5 Μέθοδος Sorensen

Στη συγκεκριμένη μέθοδο απενεργοποιούνται οι αμινομάδες των αμινοξέων του γλεύκους και του οίνου, όταν προστεθεί διάλυμα φορμόλης σε ορισμένο όγκο εξουδετερωμένο γλεύκους ή οίνου με pH 7. Ύστερα γίνεται ογκομέτρηση της οξύτητας που εμφανίζεται και οφείλεται στα αμινοξέα με υδροξείδιο του νατρίου. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την μέτρηση του αζώτου υπό μορφή αμινοξέων.

4.6 Μέθοδος προσδιορισμού αμμωνιακών ιόντων (Ανόργανο Άζωτο)

4.6.1 Προσδιορισμός αμμωνιακών αλάτων

Τα αμμωνιακά βρίσκονται στον οίνο σε μορφή αλάτων της βάσης NH_4OH . Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντικατάσταση της βάσης αυτής από μια πιο ισχυρή βάση, όπως το MgO , και στη συλλογή της απελευθερωμένης αμμωνίας σε γνωστή περίσσεια θειικού οξέος με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH 0,1 N), παρουσία δείκτη πράσινο της βρωμοκρεζόλης. Για την επιτυχία της μεθόδου δεν πρέπει να χρησιμοποιείται πολύ ισχυρή βάση ώστε να μην υδρολυθούν ορισμένες οργανικές ενώσεις. Επίσης, το δείγμα δεν πρέπει να έχει πολύ υψηλό pH, καθώς ορισμένες ουσίες σε αλκαλικό περιβάλλον αποσυντίθενται δίνοντας πτητικά οξέα που δεσμεύουν ποσότητα της MgO και της αμμωνίας.

4.6.2 Ενζυμική μέθοδος προσδιορισμού αμμωνιακού αζώτου

Ο προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου βασίζεται στην αντίδραση της, με το α-κετογλουρικό με την παρουσία NADH . Η αντίδραση καταλύεται με το ένζυμο, γλουταμινική αφυδρογονάση (GLDH). Η αντίδραση προκαλεί οξειδωση της NADH σε NAD και μετριέται φασματοφωτομετρικά στα 340nm.

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων προσδιορισμού αζώτου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δείγματα γλεύκους και οίνου και η μεταξύ τους σύγκριση και αξιολόγηση. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ως δείγματα τρία αζωτούχα εμπορικά σκευάσματα, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην οινολογία με σκοπό την αζωτούχα θρέψη των ζυμομυκήτων για πιο αποτελεσματικές και με καλύτερη κινητική αλκοολικές ζυμώσεις. Τα σκευάσματα αυτά ήταν γνωστής συγκέντρωσης αζώτου. Το πρώτο σκεύασμα ήταν το DAP ή αλλιώς φωσφορούχο διαμμώνιο, συγκέντρωσης 212 mg/L. Το δεύτερο η θειική αμμωνία, συγκέντρωσης 212 mg/L και το τρίτο το Thiazote που αποτελείται από αμμωνιακά άλατα και θειαμίνη επίσης συγκέντρωσης 212 mg/L. Επίσης, μετρήθηκε και γλεύκος Μοσχοφίλερο από την Πειραματική Οινοποίηση του Τμήματος.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μέθοδος της φορμόλης, η οποία προσδιορίζει το ολικό αφομοιώσιμο άζωτο (YAN). Ύστερα η μέθοδος NOPA και η μέθοδος της νινυδρίνης που προσδιορίζουν το ολικό ελεύθερο αμινοάζωτο (FAN). Τέλος, η τρίτη και τελευταία μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι ο προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου από ενζυμικό kit στον ενζυμικό αναλυτή.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος των μεθόδων, που θα μπορούν να εφαρμοστούν με ακρίβεια μελλοντικά στο Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών στο πλαίσιο πειραματικών αναγκών σε γλεύκη και οίνους, καθώς και η σύγκριση μεταξύ τους ως προς την αποτελεσματικότητά τους και την πρακτικότητά τους

Κεφάλαιο 5°. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα που ευρέως χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα αζώτου σε μούστο, ενώ προσδιορίστηκε και το περιεχόμενο σε άζωτο δείγματος γλεύκους Μοσχοφίλερου, από την Πειραματική Οينوποίηση του Τμήματος του έτους 2022. Όλες οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν εις τριπλούν και λήφθηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων.

5.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Αρχικά, πριν ξεκινήσει η πειραματική πορεία των μεθόδων, παρασκευάζονται τα πρότυπα διαλύματα από τα σκευάσματα που αναφέρθηκαν τα οποία χρειάζονται σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Οπότε σε τρεις ογκομετρικές φιάλες των 500 mL παρασκευάζεται πρότυπο υδατικό διάλυμα DAP 1g/L, πρότυπο υδατικό διάλυμα θειικής αμμωνίας 1g/L και πρότυπο υδατικό διάλυμα Thiazote 0,1g/L, ώστε σε καθένα να περιέχεται ποσότητα αζώτου περίπου 212mg/L.

5.2 Μέθοδος φορμόλης

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει το αφομοιώσιμο άζωτο (YAN), που αποτελείται από το άθροισμα του αμμωνιακού αζώτου και του οργανικού αζώτου δηλαδή της ελεύθερης αμινομάδας των αμινοξέων. Βασίζεται στην αντίδραση της αμινομάδας με τη μυρμηκική αλδεΐδη, που απελευθερώνει υδρογόνο που τιτλοδοτείται με NaOH (Gump 2000).

Αντιδραστήρια και υλικά:

- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο
- NaOH 1 N , NaOH 0,05 N
- Μυρμηκική αλδεΐδη (φορμόλη) 40% σε pH=8
- Ογκομετρικές φιάλες των 500, 100 και 50 mL
- Σιφώνια των 20 και 5 mL και πουαρ
- Ποτήρια ζέσεως 100 και 250 mL
- Αναλυτικός ζυγός
- Προχοΐδα

Πορεία:

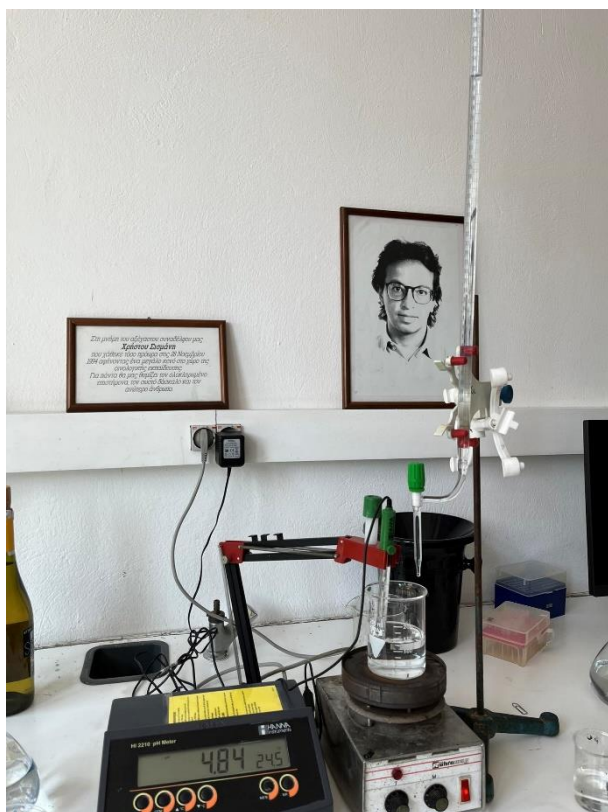
1. Σε ποτήρι ζέσεως εισάγεται ποσότητα φορμόλης, στην οποία πολύ προσεκτικά προστίθεται NaOH 1N για να ρυθμιστεί σε pH = 8
2. Σε διαφορετικό ποτήρι ζέσεως εισάγονται 100 ml δείγματος ρυθμίζεται σε pH =8 .
3. Με σιφώνι μεταφέρονται 20 ml του ρυθμισμένου δείγματος σε ογκομετρική των 50 ml, κάνοντας αραιώση.
4. Μεταφέρονται 10 ml από το αραιωμένο δείγμα σε ποτήρι ζέσεως και γίνεται ρύθμιση ξανά σε pH=8.
5. Με σιφώνι προστίθενται 2 mL της ρυθμισμένης φορμόλης σε pH=8 και αναμονή 1-2 λεπτά.
6. Ακολουθεί ογκομέτρηση με NaOH 0,05 N έως ότου pH=8 (ογκομέτρηση με συνεχή μέτρηση του pH με ηλεκτρονικό πεχάμετρο) και καταγράφεται η κατανάλωση του όγκου.
7. Επαναλαμβάνεται η πορεία άλλες δύο φορές, υπολογίζεται ο μέσος όρος κατανάλωσης όγκου $V_{\text{NaOH } 0,05 \text{ N}}$.

Η συγκέντρωση αφομοιώσιμου αζώτου υπολογίζεται από τη σχέση:

$$(\text{YAN}) \text{ mg/L} = V_{\text{NaOH } 0,05 \text{ N}} \times 175$$



Εικόνα 12: Ηλεκτρονικό πεχάμετρο για τη ρύθμιση του pH



Εικόνα 13: Διάταξη τιτλοδότησης στη μεθοδό φορμόλης

5.3 Μέθοδος NORA

Με αυτή τη μέθοδο υπολογίζεται το ολικό ελεύθερο άζωτο (FAN) και ειδικά το αμινοάζωτο. Η μέθοδος στηρίζεται στην φασματοφωτομετρική μέτρηση της OPA (οφθαλαδεΰδης και της NAC (N-ακετυλοκυστεΐνης) .

Συσκευές και υλικά:

- Ογκομετρικές φιάλες των 250 mL , 25 mL
- Ποτήρια ζέσεως των 100 mL
- Μικροπιπέτες μεταβλητού όγκου 5-50 μL , 100-1.000 μL
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες και στατώ
- Φασματοφωτόμετρο
- Κυψελίδα χαλαζία
- Αναλυτικός ζυγός

Παρασκευή αντιδραστηρίων:

Αντιδραστήριο A:

Ζυγίζονται στον αναλυτικό ζυγό 0,168g OPA , τα οποία διαλύονται σε ένα ποτήρι ζέσεως με αιθανόλη 95%. Μετάγγιση σε ογκομετρική των 25 mL και συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη.

Στη συνέχεια στον αναλυτικό ζυγό μετριοούνται :

- 0,9593g NaOH
- 2,117g βορικό οξύ
- 0,204g NAC

Τα οποία διαλύονται σε απιονισμένο νερό σε ποτήρι ζέσεως και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL. Σε αυτή μεταγγίζεται και η ογκομετρική των 25 mL και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό και δημιουργείται υδατικό διάλυμα.

Αντιδραστήριο B:

Στο αντιδραστήριο B ακολουθείται ακριβώς η ίδια πορεία με το αντιδραστήριο A, με τη διαφορά ότι στο πρώτο διάλυμα αιθανόλης δεν προστίθεται OPA. Δηλαδή στην ογκομετρική των 25 mL υπάρχει σκέτη αιθανόλη 95%.

Πρότυπο διάλυμα ισολευκίνης:

Ζυγίζονται στον αναλυτικό ζυγό 0,328g ισολευκίνης ,τα οποία διαλύονται σε ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό , και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη 250 mL , δημιουργώντας υδατικό διάλυμα.

Πειραματική πορεία:

Αφού παραχθεί το πρότυπο διάλυμα ισολευκίνης, ακολουθείται ένα σχήμα αραιώσεων, το οποίο φαίνεται στον επόμενο πίνακα.

Tube	blank	1	2	3	4	5
10 mM ile (μL)	0	10	20	30	40	50
DI water (μL)	50	40	30	20	10	0
OPA reagent (μL)	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Absorbance _{335nm}						
= Nitrogen (mg/L)	0	28	56	84	112	140

Ακολουθείται αυτή η πορεία για κάθε ένα πρότυπο διάλυμα λευκίνης που δημιουργείται. Γίνεται και για το Αντιδραστήριο A και για το αντιδραστήριο B.

Η πορεία που ακολουθείται για τα δείγματα είναι:

ΤΥΦΛΟ

1. Σε κυψελίδα χαλαζία εισάγονται 50 μL απιονισμένου νερού
2. Προστίθενται 3.000 μL του αντιδραστηρίου A
3. Μηδενίζεται το φασματοφωτόμετρο στα 335nm

ΔΕΙΓΜΑ

1. 50μL από το δείγμα εισάγονται στην κυψελίδα
2. Προστίθενται 3.000 μL του αντιδραστηρίου A
3. Καλή ανάμειξη
4. Μετά από 10 λεπτά, μετρείται η απορρόφηση στα 335nm (A1)

ΤΥΦΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

1. 50 μL από το δείγμα εισάγονται στην κυψελίδα
2. Προστίθενται 3.000 μL του αντιδραστηρίου B
3. Καλή ανάμειξη
4. Μετά από 10 λεπτά, μετρείται η απορρόφηση στα 335nm (A2)

Υπολογίζεται η απορρόφηση: **A= A1-A2**

Μετρείται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 335nm με κυψελίδα χαλαζία και κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς, από την οποία προκύπτει η εξίσωση της ευθείας που υπολογίζεται το άζωτο.

FAN(mgN/L) = (a*A+b)* συντελεστή αραίωσης



Εικόνα 14: Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις



Εικόνα 15: Σχήμα αραιώσης ισολευκίνης

5.4 Μέθοδος νινυδρίνης

Η μέθοδος μετράει τα α-αμινοξέα, την αμμωνία και διπεπτιδια, τριπεπτίδια, εξειδικεύεται για το ελεύθερο άζωτο (FAN). Βασίζεται στην αντίδραση της νινυδρίνης με τα αζωτούχα μέρη και δίνει κυανοιώδες χρώμα.

Υλικά και συσκευές:

- Ογκομετρικές φιάλες των 100mL , 600 ml και 1L
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Parafilm
- Μικροπιπέτα 10-1.000 μL
- Αναλυτικός ζυγός
- Θερμαντική πλάκα
- Υδατόλουτρο
- Ποτήρια ζέσεως
- Φασματοφωτόμετρο
- Πλαστική κυψελίδα

Παρασκευή αντιδραστηρίων:

Αντιδραστήριο Α: Αντιδραστήριο χρώματος νινυδρίνης

Με αναλυτικό ζυγό γίνεται μέτρηση:

- 5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 6g KH_2PO_4
- 0,5 g νινυδρίνη
- 0,3g φρουκτόζη

Διαλύονται σε ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό και δημιουργείται υδατικό διάλυμα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Το pH του αντιδραστηρίου πρέπει να είναι 6,6-6,8 και η αποθήκευση του στο ψυγείο σε σκουρόχρωμη φιάλη.

Αντιδραστήριο Β: Διάλυμα αραιώσης

Διαλύονται 2g KIO_3 σε 600 ml αποσταγμένο νερό, και απογέμιση με 400ml αιθανόλης 96% από ογκομετρικό κύλινδρο , μέχρι να φτασει το 1L. Αποθηκεύεται στο ψυγείο στους 5° C.

Αντιδραστήριο Γ: Αποθεματικό πρότυπο διάλυμα γλυκίνης

Διαλύονται 0,1072g γλυκίνης μέχρι το 1L με απεσταγμένο νερό. Διατηρείται στο ψυγείο για μία εβδομάδα.

Αντιδραστήριο Δ: Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης

Πραγματοποιείται αραιώση 1:1.000 στο αντιδραστήριο Γ. Το πρότυπο διάλυμα γλυκίνης περιέχει 2 mg/L αμινοάζωτο.

Πειραματική πορεία:

Για το τυφλό:

1. Με χρήση πιπέτας, μεταφέρονται 2 ml απιονισμένο νερό
2. Και 2 ml αντιδραστήριο Δ
3. Αφού μηδενιστεί το φασματοφωτόμετρο με απιονισμένο νερό, μετρείται την απορρόφηση του τυφλού σε 570nm σε πλαστική κυψελίδα.

Για το δείγμα:

1. Πραγματοποιείται αραιώση 1:100 του δείγματος , για να υπάρξει αποτέλεσμα επιτρεπτό στα όρια του οργάνου.
2. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται με πιπέτα 2 ml του αραιωμένου δείγματος και 1 ml αντιδραστηρίου Α.
3. Κλείνονται καλά με parafilm οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τα δείγματα και τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως με βραστό νερό πάνω σε θερμαντική πλάκα για 15 λεπτά ακριβώς.
4. Ύστερα ψύχονται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C) για 20 λεπτά.
5. Μετά το πέρας του χρόνου προστίθεται με σιφόνι 5 ml αντιδραστήριο Β
6. Καλή ανάμειξη και μέτρηση απορρόφησης με πλαστική κυψελίδα στα 570nm εντός μισής ώρας
7. Υπολογίζεται το FAN

$$\text{FAN} = \frac{A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{τυφλού}}} \times 2 \times \text{συντελεστή αραιώσης}$$



Εικόνα 16: Βρασμός δειγμάτων και σταδιακή αλλαγή χρώματος



Εικόνα 17: Κυανωίδες χρώμα μετά τον βρασμό και την ψύξη

5.5 Μέθοδος προσδιορισμού αμμωνιακών αλάτων με αυτόματο ενζυμικό αναλυτή

Ο προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου πραγματοποιήθηκε με χρήση του αυτόματου ενζυμικού αναλυτή Hyperlab της Steroglass, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή και το κατάλληλο ενζυμικό kit.



Εικόνα 18: Ενζυμικός αναλυτής

Κεφάλαιο 6ο: Αποτελέσματα - συζήτηση

6.1 Μέθοδοι και δείγματα

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αζωτούχων συστατικών, σε διαφορετικά δείγματα, τα οποία προέκυψαν από οινολογικά σκευάσματα του εμπορίου, τα οποία έχουν γνωστή περιεκτικότητα σε άζωτο. Τα δείγματα αυτά είναι το DAP (φωσφορούχο διαμμώνιο), η θειική αμμωνία και το Thiazote. Όλα έχουν συγκέντρωση 212 mg/L. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρθηκαν στην πειραματική πορεία, ακολουθήθηκαν επιμελώς και έγιναν 2-3 επαναλήψεις στην κάθε μία. Στόχος αποτελεί η συγκριτική τους μελέτη και η πρακτικότητα και η εγκυρότητα τους ώστε να εφαρμοστούν σε δείγματα γλεύκους και οίνου.

Κάθε μέθοδος ανιχνεύει διαφορετικά αζωτούχα συστατικά. Η μέθοδος φορμόλης το αφομοιώσιμο άζωτο (YAN), η μέθοδος NOPA και η μέθοδος νινυδρίνης το ολικό ελεύθερο άζωτο (FAN) και το ενζυμικό kit, το αμμωνιακό άζωτο.

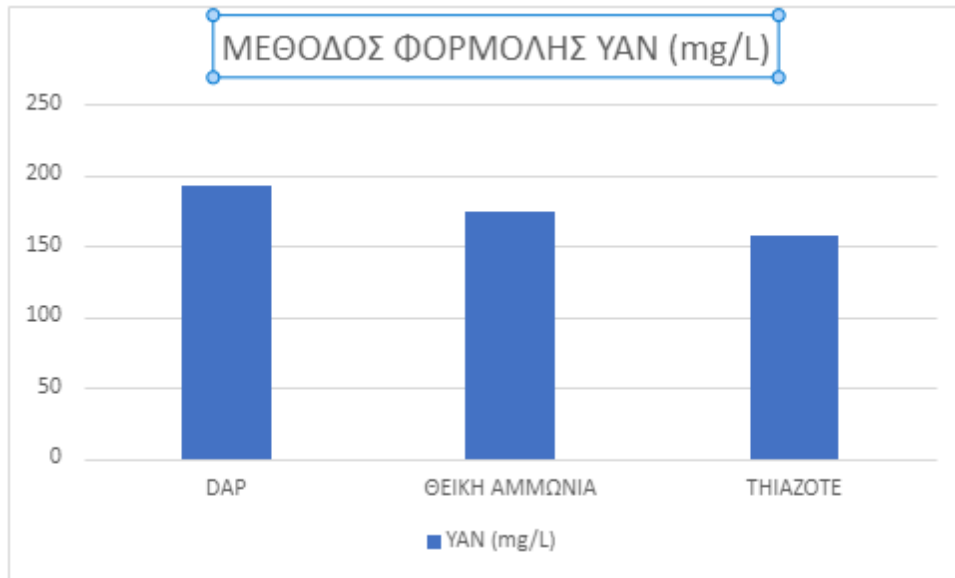
6.2 Προσδιορισμός αφομοιώσιμου αζώτου (YAN)

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων με τη μέθοδο της φορμόλης φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Μετρήσεις YAN(mg/L), με μέθοδο φορμόλης

Δείγμα	YAN (mg N/L)
DAP	192,5
Θειική αμμωνία	175
Thiazote	157,5
γλεύκος	280

Όπως παρατηρούμε, στα εμπορικά σκευάσματα αζώτου υπάρχει απόκλιση στις μετρήσεις από την θεωρητική συγκέντρωση των δειγμάτων (212 mg N/L), σε κάθε περίπτωση μετρήθηκε χαμηλότερη τιμή. Στο γλεύκος η ποσότητα αφομοιώσιμου αζώτου βρέθηκε πάνω από το όριο των 140 mg N/L που εξασφαλίζει την ομαλή ζύμωση.



Διάγραμμα 1 : Μετρήσεις YAN με μέθοδο φορμόλης

Η απόκλιση που παρατηρείται μπορεί να εξηγηθεί από διάφορους παράγοντες ή συνδυασμό αυτών. Συγκεκριμένα:

1. Από πειραματικό σφάλμα. Η τιτλοδότηση είναι μια διαδικασία που απαιτεί ακρίβεια και δεξιότητα ώστε να μετρηθεί η κατανάλωση ακριβώς μόλις το pH γίνει 8. Η συγκεκριμένη μέθοδος ακολουθεί ένα σχήμα αραίωσης και συνεχή ρύθμιση σε pH=8. Οπότε είναι πιθανόν να έχουν υπάρξει μικρές αποκλίσεις. Επίσης, η συγκέντρωση του NaOH που χρησιμοποιήθηκε ίσως δεν ήταν ακριβής, απαιτείται συνεχής τιτλοδότηση. Τέλος, η φορμόλη που χρησιμοποιείται μπορεί με το πέρασμα του χρόνου ένα ποσοστό να οξειδώνεται σε μυρμηκικό οξύ και απαιτείται τιτλοδότηση της φορμόλης.
2. Από μεταβολές που μπορεί να έχουν υποστεί τα δείγματα. Όπως για παράδειγμα η υγροποίηση, ή κρυστάλλωση με την πάροδο του χρόνου και μείωση της ισχύς τους και της συγκέντρωσής τους σε άζωτο.

Η μέθοδος φορμόλης είναι μια καλή οικονομική μέθοδος που μπορεί να στηθεί εύκολα, χωρίς κόστος, με υλικά και αντιδραστήρια, τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα. Η φορμόλη όμως απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή στον χειρισμό της λόγω τοξικότητας.

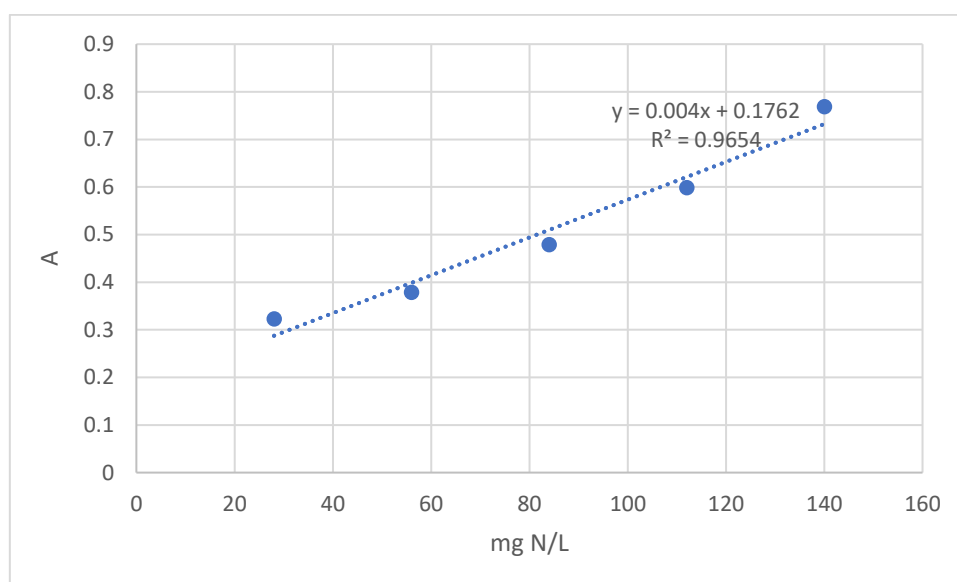
Από την άλλη, η δυσκολία της συγκεκριμένης μεθόδου έγκειται στο γεγονός πως η ρύθμιση της φορμόλης και του δείγματος σε pH=8 είναι μια διαδικασία χρονοβόρα και πιθανόν να χρειαστούν αρκετές επαναλήψεις και τιτλοδοτήσεις, με πιθανότητες σφάλματος.

6.3 Προσδιορισμός α-αμινοαζώτου (FAN, Free Amino Nitrogen)

6.3.1 Μέθοδος NOPA

Η μέθοδος NOPA εξειδικεύεται για τον προσδιορισμό του α-αμινοαζώτου, των μικρών πεπτιδίων και των αμινοξέων που είναι γνωστά ως ελεύθερο αμινοάζωτο (Free Amino Nitrogen, FAN). Βασίζεται στην φασματοφωτομετρική μέτρηση της ο-φθαλαλδεΐδης (OPA) και της N-ακετυλοκυστεΐνης (NAC).

Από τις μετρήσεις των πρότυπων δειγμάτων ισολευκίνης, δημιουργήθηκε η παρακάτω καμπύλη αναφοράς και από την εξίσωση της ευθείας υπολογίστηκε η συγκέντρωση σε α-αμινοάζωτο των δειγμάτων.



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς μεθόδου NOPA

Έτσι υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις σε FAN στο κάθε δείγμα.

Πίνακας 3: Μετρήσεις FAN mg/L, μέθοδος NOPA

Δείγμα	FAN mg N/L
DAP	-
Θειική αμμωνία	-
Thiazote	-
Γλεύκος	98,70

Με τη μέθοδο NORA δεν μπόρεσε να προσδιοριστεί ποσότητα α-αμνοαζώτου, όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς τα εμπορικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αμμωνιακά. Στο γλεύκος, η ποσότητα που μετρήθηκε ήταν 98,7 mg N/L.

6.3.2 Μέθοδος νινυδρίνης

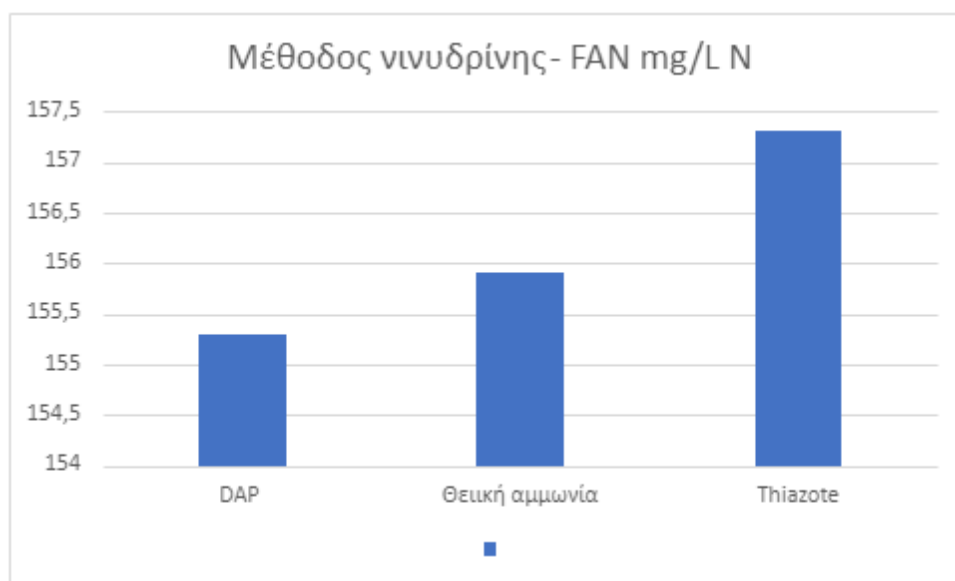
Η μέθοδος μετράει τα α-αμινοξέα, την αμμωνία και διπεπτιδια, τριπεπτίδια, εξειδικεύεται για το ελεύθερο άζωτο (FAN). Βασίζεται στην αντίδραση της νινυδρίνης και δίνει κυανοιώδες χρώμα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα

Πίνακας 4: Μετρήσεις FAN (mg/L N), μέθοδος νινυδρίνης

Δείγμα	FAN Mg/L N
DAP	155,3
Θειική αμμωνία	155,91
Thiazote	157,31
Γλεύκος	273,5

Παρατηρούμε πώς και τα τρία δείγματα, έχουν υψηλές τιμές FAN με μεγαλύτερο το Thiazote. Επίσης οι μετρήσεις δείχνουν πως και τα τρία δείγματα έχουν τιμές FAN που κυμαίνονται σε ίδια επίπεδα, το οποίο καταδεικνύει μια αξιόπιστη μέθοδο και ένα πείραμα το οποίο είχε μικρά σφάλματα και αποκλίσεις.



Διάγραμμα 3: Μετρήσεις FAN με μέθοδο φορμόλης

Η μέθοδος της νινυδρίνης είναι ακριβής και παρέχει γρήγορα αποτελέσματα. Μάλιστα λόγω της αλλαγής του χρώματος γίνεται διαπίστωση για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Πολύ σημαντική είναι η επαναληψιμότητα της .

6.4 Σύγκριση μεθόδων FAN

Στη βιβλιογραφία υπάρχει μερικές φορές σύγχυση ως προς το αν με τη μέθοδο νινυδρίνης προσδιορίζεται μόνο το α-αμινοάζωτο ή και η αμμωνία. Από τις μετρήσεις στην παρούσα εργασία φαίνεται ότι με τη μέθοδο της νινυδρίνης προσδιορίζεται και η συγκέντρωση σε αμμωνιακά και όχι μόνο το α-αμινοάζωτο. Στα αμμωνιακά δείγματα που μετρήθηκαν ήταν επομένως λογικό που με τη μέθοδο νινυδρίνης προσδιορίστηκαν υψηλές τιμές αζώτου, παραπλήσιες με αυτές που βρέθηκαν με τη μέθοδο της φορμόλης. Για τον προσδιορισμό συνεπώς του οργανικού αζώτου (α-αμινοαζώτου) κατάλληλη είναι η μέθοδος NOPA. Στα αμμωνιακά δείγματα του εμπορίου που μετρήθηκαν ήταν αναμενόμενο να μην υπολογιστεί συγκέντρωση ως προς α-αμινοάζωτο με τη μέθοδο NOPA, καθώς τα δείγματα περιέχουν μόνο ανόργανο άζωτο και η NOPA δεν μπορεί να μετρήσει ανόργανο άζωτο.

Η μέθοδος NOPA και η μέθοδος νινυδρίνης προσδιορίζουν το ελεύθερο αμινοάζωτο (FAN). Το ελεύθερο αμινο άζωτο είναι ένας καλός δείκτης για την πιθανή αύξηση της ζύμης και την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης. Τα επαρκή επίπεδα του εξασφαλίζουν την αποτελεσματική ανάπτυξη των κυττάρων των ζυμομυκήτων και συνεπώς επιθυμητή απόδοση ζύμωσης.

Η μέθοδος NOPA εκτιμά τα αμινοξέα μετρώντας τις τελικές ομάδες α-αμινοαζώτου των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Είναι ειδική για το α-αμινοάζωτο.

Από την άλλη, η μέθοδος νινυδρίνης διαφοροποιείται στο γεγονός ότι εκτός από τα αμινοξέα και το α-μινοάζωτο μέτρα και την αμμωνία. Μάλιστα σε γλεύκη και οίνους δεν θεωρείται ειδική για το α-αμινοάζωτο.

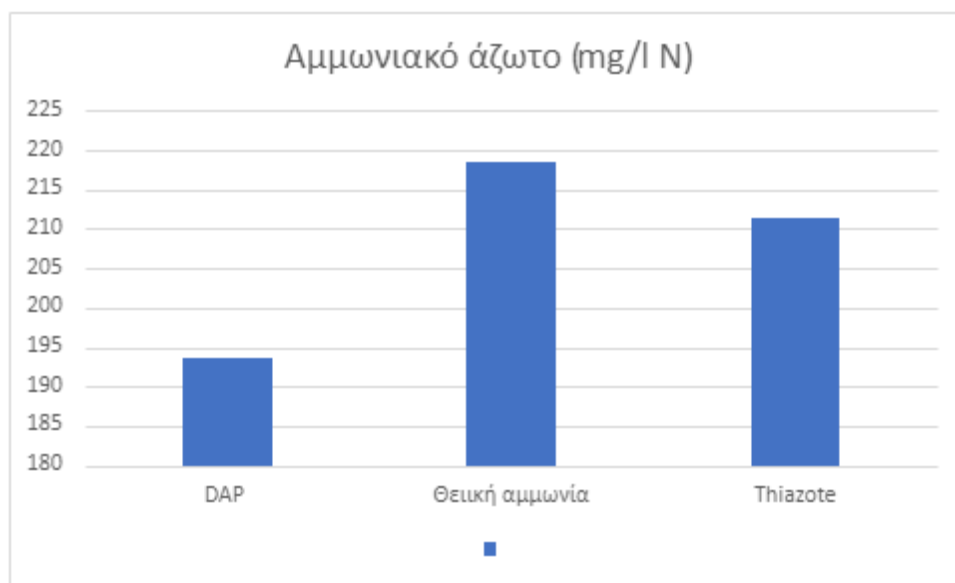
6.5 Προσδιορισμός ανόργανου αζώτου (NH_4^+) με ενζυμική μέθοδο

Ο ενζυμικός προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου βασίζεται γενικά σε ενζυμικές αντιδράσεις όπου προκαλείται οξείδωση του NADH σε NAD⁺, και μετριέται η απορρόφηση φασματοφωτομετρικά στα 340nm.

Οι μετρήσεις που έγιναν στον ενζυμικό αναλυτή φαίνονται στον πίνακα 5:

Πίνακας 5: Μετρήσεις αμμωνιακού αζώτου (mg/L N)

Δείγμα	mg N/L (Αμμωνιακό άζωτο)
DAP	193,56
Θειική αμμωνία	218,42
Thiazote	211,52
Γλεύκος	165,00



Διάγραμμα 4: Μετρήσεις αμμωνιακού αζώτου (mg/L N), ενζυμικό kit

Οι μετρήσεις του ενζυμικού αναλυτή για το αμμωνιακό άζωτο επιβεβαιώνουν την αμμωνιακή σύσταση των δειγμάτων που αναλύθηκαν, με τιμές αρκετά κοντά με τις θεωρητικές, αν και με αποκλίσεις. Η μέτρηση στον ενζυμικό αναλυτή είναι εύκολη και ακριβής, με αρνητικό ίσως το υψηλό κόστος των ενζυμικών κτι που θα πρέπει ο αναλυτής να προμηθεύεται.

6.6 Συγκριτικός σχολιασμός αποτελεσμάτων

Στον ακόλουθο πίνακα φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα από κάθε μέθοδο (mg N/L)

Πίνακας 6: Τα αποτελέσματα συγκριτικά

Δείγματα	YAN (φορμόλη)	FAN(NOPA)	FAN(νινυδρίνη)	NH ₄ ⁺
DAP (212mgN / L)	192,5	-	155,3	193,6
Θειική αμμωνία (212mgN / L)	175	-	155,9	218,4
Thiazote (212mgN / L)	157,5	-	157,3	211,52
Γλεύκος	280	98,7	273,5	165

Όπως αναφέρθηκε, το αφομοιώσιμο άζωτο (YAN) αποτελεί το σύνολο του οργανικού (FAN) και ανόργανου (NH₄⁺) αζώτου. Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα, στην περίπτωση του γλεύκους έγινε έλεγχος ως προς το εάν το άθροισμα των μετρήσεων από τις μεθόδους προσδιορισμού FAN(NOPA) και αμμωνιακών θα είναι ίσο με αυτό του YAN που προσδιορίστηκε. Παρατηρείται ότι $98,7 + 165 = 263,7 < 280(\text{YAN})$, υπάρχει δηλαδή μία μικρή απόκλιση ως προς τις μετρούμενες ποσότητες ολικού αζώτου. Παρόλα αυτά, για την προσδιορισμό του αφομοιώσιμου αζώτου προκειμένου να εκτιμηθεί η δυνατότητα ομαλούς ζύμωσης ή μη σε ένα δείγμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε η μέθοδος φορμόλη είτε το άθροισμα των μεθόδων NOPA και αμμωνιακών.

Όσον αφορά το προσδιορισμό του οργανικού αζώτου (α-αμινο αζώτου), η μέθοδος που ενδείκνυται για εξειδίκευση είναι η NOPA.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αζωτούχος θρέψη στον αμπελώνα είναι πάρα πολύ σημαντική για την ανάπτυξη σταφυλιών, τα οποία θα έχουν τα κατάλληλα ποιοτικά χαρακτηριστικά ώστε να δώσουν ένα αξιοποιήσιμο γλεύκος ώστε να παραχθεί ένας οίνος ποιότητας. Το άζωτο που υπάρχει στο γλεύκος προσδιορίζει τον αρωματικό χαρακτήρα του κρασιού και είναι πολύ σημαντικό για την θρέψη των ζυμομυκήτων, οι οποίοι επιτελούν την αλκοολική ζύμωση. Για αυτό το λόγο είναι σημαντικό ο προσδιορισμός του αζώτου στο γλεύκος ώστε να υπάρχει γνώση για την κινητική της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά και για τον αρωματικό χαρακτήρα που θα αποκτήσει ο οίνος.

Από όλη την πειραματική πορεία που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία και από τα αποτελέσματα των μετρήσεων από όλες τις μεθόδους, διαπιστώθηκε πως για τον προσδιορισμό ολικού αζώτου σε δείγματα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε η μέθοδος νινυδρίνης είτε το άθροισμα $\text{NOPA} + \text{NH}_4^+$ (φαίνεται από τις μετρήσεις σε γλεύκος), ενώ για τον προσδιορισμό οργανικού αζώτου (α-αμινοαζώτου) φαίνεται να είναι καταλληλότερη η μέθοδος NOPA και όχι της νινυδρίνης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Καγκελάρη Ι. Ευαγγελία, Επίδραση του οργανικού αζώτου στην αύξηση διαφορετικών στελεχών ζυμομυκήτων αναφορικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου οίνου, Αθήνα 2021

Καλύβας Διονύσης, Εδαφολογία, αξιολόγηση εδαφών, τοποκλιματικές συνθήκες, εκδόσεις ΙΩΝ, Αθήνα 2009

Καρανάσου Γεωργία, Τζάκη Αντζουλέτα, Μέτρηση Αζώτου με διάφορες τεχνικές σε γλεύκη και οίνους, Αθήνα 2020

Κατσάμπα Α. Φωτεινή, Επίδραση της αζωτούχου θρέψης των ζυμομυκήτων στο χημικό και οργανοληπτικό προφίλ των κρασιών της ποικιλίας Ασύρτικο, Αθήνα 2017 (31-35).

Νικολάου Ν. Α. Αμπελουργία, εκδ. Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη 2020

Πετρίδης Π. Αναστάσιος, Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών επιπέδων αζώτου στην πρόσληψη του βορίου από το έδαφος σε φυτά μαρουλιού. Αθήνα 2012

Τοροσίδης Ευστάθιος, Εκτίμηση της αζωτούχου θρέψης των ποικιλιών επιτραπέζιας χρήσης Σουλτανίνας και Βικτώρια με τη χρήση μετρητών Χλωροφύλλης SPAD – SO₂, CCM - 200, Θεσσαλονίκη 2011.

Τσακίρης Αργύρης, Ελληνική Οινογνωσία, εκδ. Ψυχάλου, Αθήνα, 2003

Τσακίρης Αργύρης, Οινολογία, από το σταφύλι στο κρασί, εκδ. Ψυχάλου, Αθήνα 2017

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ágnes Dienes-Nagy, Guillaume Marti and others, Identification of putative chemical markers in white wine (Chasselas) related to nitrogen deficiencies in vineyards, *OENO One* Vol. 54 No. 3 2020

Bach Benoît, François-Xavier Sauvage, Sylvie Dequin, Carole Camarasa, Role of γ -Aminobutyric Acid as a Source of Nitrogen and Succinate in Wine, *Am J Enology and Viticulture*, 2009 60:508-516

Conterno Lorenza, C.M. Lucy Joseph, Torey J. Arvik, Thomas Henick-Kling, Linda F. Bisson, Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Wines, *Am J Enology and Viticulture*. 2006 57:139-147

Crépin Lucie, Thibault Nidelet, Isabelle Sanchez, Sylvie Dequin, Carole Camarasa, Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases, *Applied and Environmental Microbiology*. 2012 Nov;78(22):8102-11

Daeschel Mark A., Dong-Sun Jung, Barney T. Watson, Controlling Wine Malolactic Fermentation with Nisin and Nisin-Resistant Strains of *Leuconostoc oenos*, *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 57, No. 2 1991

Dickinson J. Richard, Valia Norte, A study of branched-chain amino acid aminotransferase and isolation of mutations affecting the catabolism of branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters* Volume 326, Issues 1–3, July 1993, Pages 29-32

Dukes Bruce C., Christian E. Butzke, Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay, *Am J Enology and Viticulture*. 1998 49:125-134

Gabriella Petrovic, Jose-Luis Aleixandre-Tudo and Astrid Buica Unravelling the complexities of wine: A big data approach to yeast assimilable nitrogen using InfraRed spectroscopy and chemometrics, 2019

Hill Annie E. and Graham G. Stewart, Free Amino Nitrogen in Brewing, *Fermentation* 2019, 5(1), 22

Lalli Nykänen, Formation and Occurrence of Flavor Compounds in Wine and Distilled Alcoholic Beverages, *Am J Enology and Viticulture*. 1986 37:84-96

Linda F. Bisson, Christian E. Butzke, Diagnosis and Rectification of Stuck and Sluggish Fermentations, *Am J Enology and Viticulture*. 2000 51:168-177

Maurizio Ugliano, Paul A. Henschke, Markus J. Herderich, Isak S. Pretorius, Nitrogen management is critical for wine flavor and style, The Australian Wine Research Institute 2007

Oluyemi O. Famuyiwa, C. S. Ough, Modification of Acid Urease Activity by Fluoride Ions and Malic Acid in Wines, Am J Enology and Viticulture, 1991 42:79-80

Ough C. S., A. A. Bell, Effects of Nitrogen Fertilization of Grapevines on Amino Acid Metabolism and Higher-Alcohol Formation during Grape Juice Fermentation, Am J Enology and Viticulture. 1980 31:122-123 Pages 2393-2401

PATYNOWSKI ROBERT J., VLADIMIR JIRANEK, ANDREW J. MARKIDES Yeast viability during fermentation and *sur lie* ageing of a defined medium and subsequent growth of *Oenococcus oeni* Volume8, Issue1 April 2002 Pages 62-69

Rapp A. a b, G. Versini, Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines, Developments in Food Science, Volume 37, 1995, Pages 1659-1694

Roger B. Boulton , Vernon L. Singleton, Linda F. Bisson, Ralph E. Kunkee, Οινολογία, Βασικές αρχές και μέθοδοι οινοποίησης, εκδ. Π.Χ. Πασχαλίδης, Broken Hill, 1999

Sally-Jean Bell, I. Leigh Francis, Manipulating vineyard nitrogen on a saline site: 1. Effect of nitrogen on growth, grape yield and nutrients of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz. Journal of the Food and Science Agriculture Volume93, Issue10, 15 August 2013

Sally-Jean Bell, Paul A. Henschke, Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. Australian Journal of Grape and Wine Research11,242–295, 2005
Skoutalas D, Jorge M. Ricardo-da-Silva, O. Louyerano. Validation and comparison of formol and FT – IR methods for Assimable Nitrogen in vine Grapes, 2011

Styger Gustav 1, Bernard Prior, Florian F Bauer, Wine flavor and aroma Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2011 Sep;38(9)

Thibaut Verdenal, Ágnes Dienes-Nagy and others, Understanding and managing nitrogen nutrition in grapevine: a review, OENO One Vol. 55 No. 1 2021

Tian, T., Ruppel, M., Osborne, J., Tomasino, E., Schreiner, R.P. 2022. Fertilize or supplement: The impact of nitrogen on vine productivity and wine sensory properties in Chardonnay. American Journal of Enology and Viticulture, 73(3):148-161.

Uscanga M Guadalupe Aguilar, Marie-Line Delia, and Pierre Strehaiano, Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: Growth and physiology in batch and chemostat cultures, Canadian Journal of Microbiology November 2000