

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη επίδρασης της μηλογαλακτικής ζύμωσης στα ποιοτικά
χαρακτηριστικά των λευκών οίνων ποικιλίας Μοσχοφίλερο με χρήση
διάφορων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων



Ευστάθιος Σ. Σίδερης

Επιβλέπων καθηγητής : Γεώργιος Κοτσερίδης

Αθήνα

2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη επίδρασης της μηλογαλακτικής ζύμωσης στα ποιοτικά
χαρακτηριστικά των λευκών οίνων ποικιλίας Μοσχοφίλερο με χρήση
διάφορων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων

Ευστάθιος Σ. Σίδερης

Εξεταστική επιτροπή

Κοτσερίδης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης
Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Καλλίθρακα Σταματίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης
Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Πανάγου Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων, Τμήματος
Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου
Αθηνών

Περίληψη

Στη παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε λευκούς οίνους, που έχουν προκύψει από την οινοποίηση σταφυλιών από τη ποικιλία Μοσχοφίλερο. Το σταφύλι προήλθε από την αμπελουργική περιοχή της Μαντινείας, στη Τρίπολη. Συγκεκριμένα, σκοπός της μελέτης είναι η εύρεση χημικών και οργανοληπτικών διαφορών που σχετίζονται με τη μηλογαλακτική ζύμωση, εξετάζοντας τη διενέργειά της με τη χρήση τριών επιλεγμένων γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus Oeni* της εταιρείας CHR HANSEN, το *Cine*, το *Oenos* και το *CH16* και οι παραχθέντες οίνοι να συγκριθούν μεταξύ τους, αλλά και τον οίνο που ολοκλήρωσε αυθόρμητα την μηλογαλακτική ζύμωση καθώς και με τον ίδιο οίνο που έχει αποτραπεί η μηλογαλακτική ζύμωση. Οι ζυμώσεις έγιναν εις διπλούν.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος διεξάγονταν οι κλασσικές αναλύσεις καθημερινά, όπως ογκομετρούμενη οξύτητα, το pH, η πτητική οξύτητα. Επιτελέστηκε επίσης ποσοτικός προσδιορισμός του αρωματικού δυναμικού των δειγμάτων με τη βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή ιονισμού (GC-FID), μετά από την εφαρμογή μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME). Με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC), ελέγχθηκαν η πορεία της αλκοόλης μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης και η γλυκερόλη, το μηλικό, το γαλακτικό και το κιτρικό οξύ στα τελικά δείγματα. Επίσης πραγματοποιήθηκε ο οργανοληπτικός έλεγχος των οίνων από εξειδικευμένο πάνελ, για να αξιολογηθούν ποιοτικά οι οίνοι.

Από την έρευνα προέκυψε ότι η χρήση επιλεγμένων γαλακτικών βακτηρίων στη λευκή οινοποίηση του Μοσχοφίλερου, επηρεάζει σημαντικά το αρωματικό δυναμικό τους. Για την ακρίβεια, κυρίως στον οίνο με τη χρήση του γαλακτικού βακτηρίου *Cine* παρατηρήθηκε αύξηση στους περισσότερους αιθυλικούς εστέρες και ανώτερες αλκοόλες που εξακριβώθηκαν, ενώ ακολουθεί ο οίνος που εμβολιάστηκε με το γαλακτικό βακτήριο *CH16*. Επίσης, στο δείγμα *Cine* παρατηρήθηκε μικρότερη αύξηση της πτητικής οξύτητας, αφού το κιτρικό οξύ δε μεταβολίστηκε.

Τέλος, από τον οργανοληπτικό έλεγχο του τελικού προϊόντος προέκυψε ότι το δείγμα που εμβολιάστηκε με το γαλακτικό βακτήριο *CH16*, έλαβε το μεγαλύτερο μέσο όρο της βαθμολογίας από το πάνελ.

Λέξεις κλειδιά : Μοσχοφίλερο, λευκός οίνος, μηλογαλακτική ζύμωση, *Oenococcus oeni*, GC-FID, HPLC, οργανοληπτικός έλεγχος

Abstract

In this thesis the effect of the malolactic fermentation on white wines from Moschofilero variety has been examined. The grapes came from the wine region of Mantinia in Tripolis. In particular, the purpose of this study is the identification of the chemical and organoleptic differences associated with malolactic fermentation, examining how it interacts with the use of three selected lactic bacteria *Oenococcus Oeni*, Cine, Oenos and CH16 and (as well as) the wines produced to be compared with each other, but also with the wine that has spontaneously completed malolactic fermentation as well as with the wine in which malolactic fermentation has been prevented. All the assays were done in duplicate.

During the fermentations classical/standard analysis such as titratable acidity, pH and volatile acidity were conducted on a daily basis. Quantitative determination of volatile compounds has also been done to the samples by means of gas chromatography with ionization detector (GC-FID), after the application of solid phase microextraction (SPME). By using high pressure liquid chromatography (HPLC), we examined the progress of alcohol after the end of alcoholic fermentation and we quantified glycerol, malic, lactic, and citric acid in the final samples. Sensory analysis was also applied to the wines in order to qualitatively evaluate the samples.

In this study we showed that the use of lactic bacteria in white vinification of Moschofilero, significantly affects their aromatic character. In fact, mainly in the wines fermented with the Cine strain we observed an increase in most of the ethyl esters and higher alcohols, followed by the wine which inoculated with lactic bacterium CH16. Also, at Cine sample we observed a minimal increase of volatile acidity, as citric acid was not metabolized.

Finally, sensory evaluation of the samples revealed that the sample inoculated with CH16 strain, received the highest average score from the panel.

Key words : Moschofilero, white wine, malolactic acid, *Oenococcus oeni*, GC-FID, HPLC, sensory analysis

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οινολογίας του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Αμπελουργία – Οινολογία» κάτω από την επίβλεψη του καθηγητή του τμήματος κύριο Κοτσερίδη Γεώργιο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη που μου προσέφερε στο μέγιστο βαθμό, αλλά και την ευκαιρία που μου δόθηκε να ακολουθήσω το συγκεκριμένο πρόγραμμα σπουδών.

Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κυρία Καλλίθρακα Σταματίνα για τις γνώσεις και τις συμβουλές που μου παρείχε, ιδιαίτερα σε θέματα χημείας και οργανοληπτικού ελέγχου οίνων κατά τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών.

Εν συνεχεία, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κύριο Πανάγου Ευστάθιου ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής, αλλά και τον καθηγητή κύριο Δροσινό Ελευθέριο για την παραχώρηση του αέριου χρωματογράφου (GC-FID) και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απορρόφησης (HPLC) του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, που δίχως την συνεισφορά τους, η έκβαση της μελέτης αυτής θα ήταν αμφίβολη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στο πρόσωπο της κυρίας Προξενιάς Νίκης για την συνεχή βοήθεια, υπομονή και συμπαράστασή της, καθώς επίσης στον Βουκίδη Ιωάννη, οινολόγο MsC και υποψήφιο διδάκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την αμέριστη καθοδήγηση και τη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα αγαπημένα μου πρόσωπα, και κυρίως τους γονείς μου και την κοπέλα μου Ουρανία, που με ενθάρρυναν και μου συμπαραστάθηκαν όλο αυτό το διάστημα.

Ευστάθιος Σ. Σίδερης

Αθήνα 2016

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract	4
Ευχαριστίες.....	5
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Αμπελουργική ζώνη Π.Ο.Π. Μαντινείας	7
1.2 Η ποικιλία Μοσχοφίλερο	9
2. Η Μηλογαλακτική ζύμωση	13
2.1 Εισαγωγή.....	13
2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μηλογαλακτική ζύμωση.....	15
2.3 Αλλαγές του οίνου μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση	19
2.4 Παρεμπόδιση της μηλογαλακτικής ζύμωσης	28
2.5 Εμπορικά σκευάσματα γαλακτικών βακτηρίων	29
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	31
3.1 Σκοπός & Πειραματικός Σχεδιασμός – Οινοποίηση.....	31
3.2 Συνολικές αναλύσεις οίνου	34
3.2.1 Βασικές αναλύσεις οίνου.....	34
3.2.2 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) για τον προσδιορισμό μηλικού οξέος	34
3.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός αρωματικού δυναμικού με GC-FID	35
3.2.4 Μέτρηση οξέων και αλκοολών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)	37
3.3 Ο Οργανοληπτικός έλεγχος.....	38
3.3.1 Τρόπος δοκιμής κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο	41
4. Αποτελέσματα	43
4.1 Πορεία ζύμωσης.....	43
4.2 Βασικές αναλύσεις οίνου.....	44
4.3 Αρωματικό προφίλ μέσω GC-FID	49
4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός αλκοολών και οξέων μέσω HPLC	56
4.5 Οργανοληπτικός έλεγχος.....	61
5. Συμπεράσματα.....	67
Βιβλιογραφία	70

1. Εισαγωγή

1.1 Αμπελουργική ζώνη Π.Ο.Π. Μαντινείας

Από την αρχαιότητα, η περιοχή της Μαντινείας ήταν και είναι γνωστή από τις πιο ισχυρές στον ελλαδικό χώρο. Σήμερα το γόητρό της δεν υφίσταται πλέον, παρ' όλα αυτά τα εξαιρετικά σε ποιότητα κρασιά της, την κατατάσσουν στις πιο ισχυρές αμπελουργικές ζώνες της Ελλάδας. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στη Μαντινεία βρέθηκε και σώζεται το αμπέλι του Πausanias, που από πολλούς θεωρείται από τα αρχαιότερα στην Ελλάδα.

Οι αμπελώνες της αμπελουργικής ζώνης της Μαντινείας, βρίσκονται βορειοανατολικά της Τρίπολης. Η έκτασή τους έχει υπολογιστεί περίπου στα 8.500 στρέμματα και εκτός από το οροπέδιο που τα εδάφη του είναι αμμοαργιλώδη, εκτείνεται και στις πλαγιές των βουνών. Η ζώνη των οίνων ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Μαντινείας είναι από τις ψυχρότερες στην Ελλάδα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αργή ωρίμανση των σταφυλιών και το όψιμο τρυγητό. Το υψόμετρο της περιοχής ξεπερνά τα 650 μέτρα και το έδαφος είναι σχετικά φτωχό και καλά στραγγιζόμενο. Όσον αφορά το κλίμα, χαρακτηρίζεται από πολλές βροχές και χιόνια το χειμώνα, συχνές καταιγίδες την άνοιξη και το καλοκαίρι και θερμοκρασίες χαμηλές, σε σχέση με την υπόλοιπη ηπειρωτική χώρα. Για αυτό η ωρίμανση των σταφυλιών παρατηρείται το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Σεπτεμβρίου, αρκετά αργά για μία νότια ελληνική περιοχή.

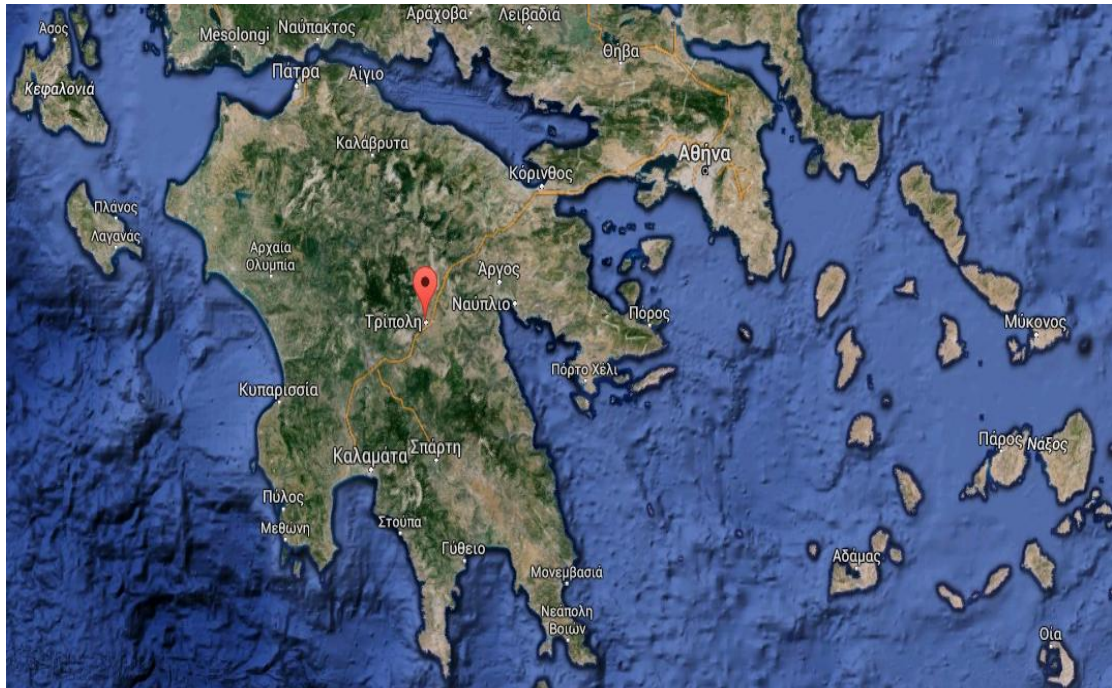


Εικόνα 1.1.1 : Αμπελώνας της ποικιλίας Μοσχοφίλερο στη περιοχή της Φτέρης Μαντινείας

Στο κεντρικό ανατολικό τμήμα της Αρκαδίας είναι το Μαντινειακό Πεδίο, ένα οροπέδιο με μέσο υψόμετρο 660 μέτρα που περιβάλλεται από τα βουνά Μαίναλο (1981 μέτρα, δυτικά), Ολίγυρτος (1935 μέτρα, βόρεια), Αρτεμίσιο (1772 μέτρα, βορειοανατολικά), Κτενιάς (1599 μέτρα, ανατολικά) και Πάρωνας (1936 μέτρα, ανατολικά - νοτιοανατολικά). Στη βασική του διεύθυνση βορράς - νότος έχει μήκος περί τα 36 χιλιόμετρα. Στο βορρά, στην περιοχή του Λεβιδίου, είναι στενό και προς το νότο ανοίγει με μέγιστο πλάτος 18 χιλιόμετρα. Αποτελείται από 500 εκτάρια, που εκτείνονται βορειοανατολικά και νοτιοανατολικά της Τρίπολης και περιλαμβάνει τους αμπελώνες της Τρίπολης, αλλά και τους αμπελώνες των γύρω χωριών ([196/A/12.10.1971](#)). Τα αμπέλια αυτά κυρίως, καλλιεργούνται με τις ποικιλίες του μοσχοφίλερου και τις ασπρούδες. Τα τελευταία χρόνια όμως η καλλιέργεια των ασπρούδων έχει μειωθεί αισθητά για χάρη του μοσχοφίλερου αφού το 1971 αναγνωρίστηκε ως οίνος Ονομασίας Προέλευσης Ανωτέρας Ποιότητας.

Σύμφωνα με το προεδρικό διάταγμα [224/A/26.10.2011](#) όπου και τροποποιήθηκε, η Ονομασία Προέλευσης Ανωτέρας Ποιότητας Μαντινείας, αναγνωρίζεται για τους λευκούς ξηρούς και τους λευκούς αφρώδεις οίνους ποιότητας, οι οποίοι παράγονται από σταφύλια της ποικιλίας μοσχοφίλερου τουλάχιστον κατά 85% και ασπρούδες. Η απόδοση των αμπελώνων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 1.100 κιλογραμμάρια ανά στρέμμα.

Προέρχονται από αμπέλια που καλλιεργούνται στη κτηματική περιοχή του Δήμου Τρίπολης και συγκεκριμένα στη Δημοτική Κοινότητα Τρίπολης και στις Τοπικές Κοινότητες Αγίου Βασιλείου Μαντινείας, Αγίου Κωνσταντίνου, Μερκοβουνίου, Πελάγους και Σκοπής της Δημοτικής Ενότητας Τρίπολης, στις Τοπικές Κοινότητες Λιθοβουνίων, Μαγούλας, Ριζών και Ψηλής Βρύσης της Δημοτικής Ενότητας Τεγέας, στις Τοπικές Κοινότητες Αρτεμισίου, Κάψα, Λουκά, Νεστάνης, Πικέρνη, Σάγκα και Σιμιάδων της Δημοτικής Ενότητας Μαντινείας, στις Τοπικές Κοινότητες Αγιωργίτικων, Ζευγολατειού, Νεοχωρίου, Μαντινείας, Παρθενίου και Στενού της Δημοτικής Ενότητας Κορυθίου, στις Τοπικές Κοινότητες Κανδήλας, Λεβιδίου, Ορχομενού και Παλαιόπυργου της Δημοτικής Ενότητας Λεβιδίου καθώς και στον οικισμό Κούβλι της Τοπικής Κοινότητας Δολιανών του Δήμου Βόρειας Κυνουρίας, εξαιρουμένων των βαλτωδών εδαφών.



Εικόνα 1.1.2 : Χάρτης Νότιας Ελλάδας (Πηγή: Google Earth)

1.2 Η ποικιλία Μοσχοφίλερο

Το Μοσχοφίλερο είναι μία από τις πιο σημαντικές ποικιλίες στον ελλαδικό χώρο. Ανήκει σε μία ομάδα ποικιλιών με τη γενική ονομασία Φιλέρι, όπως είναι το Φιλέρι μαύρο, Φιλέρι Τριπόλεως, Φιλέρι Αττικής και αρκετά συνώνυμα ή παραλλαγές όπως Ασπροφίλερο, Ξανθοφίλερο και Μαυροφίλερο.

Διάφορες έρευνες εμφανίζουν ότι το Μοσχοφίλερο και το Μαυροφίλερο αποτελούν μία και αυτή ποικιλία και είναι η μοναδική που διαθέτει αυτόν τον μοσχάτο χαρακτήρα. Με τη ποικιλία αυτή συνδέονται στενά το Ασπροφίλερο και το Ξανθοφίλερο, όμως υστερούν σε αρωματικό δυναμικό.

Το Μοσχοφίλερο καλλιεργείται κυρίως στο νομό της Αρκαδίας, πιο συγκεκριμένα στην ευρύτερη περιοχή της Μαντινείας, όπου η έκταση καταλαμβάνει περίπου 8.500 στρέμματα. Στη Τρίπολη, επίσης, εκτός της ζώνης της Μαντινείας, η ποικιλία καλλιεργείται σε έκταση περίπου 1.000 στρεμμάτων. Συνιστάται κυρίως για το αμπελουργικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου και επιτρέπεται στους νομούς της Βοιωτίας, Ευβοίας και Κεφαλληνίας σε υψόμετρο άνω των 350 μέτρων και η συνολική έκταση αγγίζει περίπου τα 11.150 στρέμματα.



Εικόνα 1.2.1 : Σταφυλή ποικιλίας Μοσχοφίλερου

Πρόκειται για τη μόνη γηγενή ερυθρωπή αρωματική ποικιλία που καλλιεργείται στη χώρα μας. Επίσης, το πρέμνο είναι πολύ παραγωγικό και ζωηρό. Ο καρποφόρος βλαστός εμφανίζει συνήθως δύο σταφυλές, από τον 3ο έως τον 6ο κόμβο. Παλαιότερα η διαμόρφωση των πρέμνων ήταν σε κυπελλοειδές, ενώ σε νέους αμπελώνες μορφώνεται σε αμφίπλευρο γραμμικό Royat. Το κλάδεμα καρποφορίας είναι βραχύ με 2 έως 3 οφθαλμούς αναπαραγωγική μονάδα.

Στη ζώνη της Μαντινείας χρησιμοποιούνται με επιτυχία τα υποκείμενα 110 R (90%) και 41 B (10%). Επιπλέον, καλά αποτελέσματα έχουμε με δύο νέα υποκείμενα, το 1103 P και το 140 Ru.

Ιδανικές συνθήκες για καλύτερη ανάπτυξη του πρέμνου είναι σε εδάφη μέτριας γονιμότητας με υψηλό συντελεστή υδατοχωρητικότητας. Από γεωλογική άποψη αποτελούνται από ανοιχτόχρωμους και μαύρους ασβεστόλιθους με λεπτή αργιλώδη ύλη στα κατώτερα στρώματα και αργιλοαμμώδη ιλύ στα ανώτερα στρώματα. Τα εδάφη γενικά είναι αργιλοπηλώδη, αμμοπηλώδη, αμμοαργιλοπηλώδη με μικρή περιεκτικότητα σε CaCO_3 (Σταύρακας, 2011).

Είναι μία ποικιλία μετρίως ευαίσθητη στον περονόσπορο, περιορισμένη ευαισθησίας στο ωίδιο και πολύ ευαίσθητη στις προσβολές του βοτρυτή και τις ιώσεις, ιδιαίτερα

όταν κατά την ωρίμανση επικρατούν πολλές βροχοπτώσεις και υψηλή σχετική υγρασία.

Οι αποδόσεις γενικά ξεπερνούν τα 1.000 kg/ στρέμμα, χωρίς να αποκλείονται και περιπτώσεις που η απόδοση φτάνει τα 2.000 kg/ στρέμμα, το οποίο δεν είναι αποδεκτό.

Συνήθως το γλεύκος του Μοσχοφίλερου περιέχει σάκχαρα από 210 – 220 g/ l, οξύτητα 5,4 – 6,8 g/ l σε τρυγικό οξύ και pH 3,3 – 3,5. Εκτός από οίνους με 100 % Μοσχοφίλερο, παράγονται εξαιρετικοί τοπικοί οίνοι ποιότητας, όπως ο Πελοποννησιακός, ξηροί λευκοί με τη συνινοποίηση σταφυλιών από τις ποικιλίες Ροδίτης και Ασπρούδια, ή ροζέ με ελαφρύ άρωμα μοσχάτου. Με ανάμειξη γλεύκους άλλων ποικιλιών με μικρό ποσοστό, όπως Γλυκερύθρα, άσπρη Βολίτσα και Ασπρούδια, παρασκευάζεται ο οίνος ΟΠΑΠ «Μαντινεία». Τέλος, υπάρχει η δυνατότητα παρασκευής αφρωδών οίνων εξαιρετικής ποιότητας.

Οι αμπελουργικοί χαρακτήρες και τα φαινολογικά στάδια του Μοσχοφίλερου είναι τα εξής :

- Η κορυφή νεαρής βλάστησης είναι μέση, έντονα βαμβακώδης, λευκωπή με πολύ ελαφρά ρόδινη παρυφή.
- Τα νεαρά φύλλα είναι κιτρινοπράσινα έως φαιοπράσινα, έντονα βαμβακώδη μεταξύ και των νευρώσεων.
- Ο πόωδης βλαστός είναι χνοώδης, πράσινος με ερυθρές ραβδώσεις στη νωτιαία πλευρά και πράσινος με ρόδινες περιοχές στη κοιλιακή πλευρά.
- Οι κόμβοι είναι πράσινοι με ερυθρές περιοχές, ενώ οι οφθαλμοί πράσινοι με ρόδινη κορυφή.
- Το ανεπτυγμένο φύλλο είναι πολύ μεγάλο, πλήρες ή τρίκολπο, σφηνοειδές με το μεσαίο λοβό περισσότερο ανεπτυγμένο.
- Ο μισχικός κόλπος είναι συνήθως σχήματος V είτε λύρας, με επικαλυπτόμενα χείλη, ενώ ο μίσχος είναι βραχύς, πράσινος με ρόδινες αποχρώσεις, αραχνοϋφής ή χνοώδης.
- Η σταφυλή είναι συνήθως μεγάλη, κυλινδρική έως κυλινδροκωνική, κανονικής πυκνότητας έως πυκνή.

- Η ράγα είναι μέτρια, σφαιρική με παχύ φλοιό, ερυθροϊώδης, όπου καλύπτεται με πυκνή, λευκωπή κέρινη ανθηρότητα, ανθεκτικός και πλούσιος σε ταννίνες. Η σάρκα μετρίως μαλακή, χυμώδης, άχρωμη και εύγευστη με χαρακτηριστικό ελαφρό μοσχάτο άρωμα.
- Έχει 2 έως 3 γίγαρτα ανά ράγα, μέτρια, κυρτά με μακρύ και αιχμηρό ράμφος.

Η έναρξη της βλάστησης συνήθως εμφανίζεται το 3ο δεκαήμερο του Μαρτίου, ενώ πλήρης βλάστηση έχουμε το 2^ο δεκαήμερο του Απριλίου. Επιπλέον, η έναρξη της άνθησης έως τη πλήρη άνθηση παρατηρείται από 20– 25 Μαΐου. Τέλος η πλήρης ωρίμανση της σταφυλής εμφανίζεται από το 3ο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου έως το 3^ο δεκαήμερο του Οκτωβρίου.

2. Η Μηλογαλακτική ζύμωση

2.1 Εισαγωγή

Υπάρχουν δύο κύριες ζυμώσεις που έχουν σχέση με την οινοποίηση. Η αλκοολική ζύμωση, η οποία προέρχεται από τη καλλιέργεια ζυμομυκήτων και η μηλογαλακτική ζύμωση, η οποία προέρχεται από τη δράση γαλακτικών βακτηρίων, ειδικότερα από τα γένη *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc*. (Lerm E. et al., 2010). Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι μία περίπλοκη διαδικασία, η οποία συνήθως ακολουθείται μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης από τους ζυμομύκητες. Επίσης, χρησιμοποιείται ως μία δεύτερη ζύμωση, που έχει σαν ειδικό ρόλο να συμβάλλει στην ωριμότητα των κόκκινων οίνων, καθώς χρησιμοποιείται και σε λευκές ποικιλίες όπως είναι το Chardonnay, το Riesling και σε αφρώδεις οίνους. Υπάρχουν τρεις κύριοι λόγοι για τη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής στον οίνο. Πρώτον, είναι η μείωση της οξύτητας του οίνου, όπου έχει σαν συνακόλουθο την αύξηση του pH, δεύτερον, συμβάλλει στη μικροβιακή σταθερότητα με την αποχώρηση του μηλικού οξέος ως ένα πιθανό υπόστρωμα άνθρακα και τρίτον, η τροποποίηση του αρωματικού προφίλ του οίνου. (Ugliano et al., 2003).

Η μηλογαλακτική ζύμωση παρατηρήθηκε για πρώτη φορά, σύμφωνα με τον Kunkee (1967), από τους Berthelot και Fleurieu (1864) και ορίστηκε σαν μία διεργασία (δεύτερη ζύμωση) κατά την οποία λαμβάνει χώρα, η μείωση της οξύτητας του οίνου. Ο Koch το 1900 κατάφερε να απομονώσει γαλακτικά βακτήρια και να προκαλέσει ζύμωση με αυτά. Ο Moslinger το 1901, παρουσίασε πρώτος μία γενική περιγραφή της μηλογαλακτικής ζύμωσης σαν μία διεργασία μετατροπής του μηλικού σε γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Το 1943, ο Gruess δημοσίευσε μία ανασκόπηση της μικροχλωρίδας του κρασιού και ανέφερε ότι υπάρχουν γηγενή βακτήρια ικανά να χρησιμοποιήσουν το μηλικό οξύ. Από τότε άρχισε να μελετάται σοβαρά η βιοχημεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος έχουν τρεις πιθανές ενζυματικές οδούς για τη μετατροπή του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικού οξέος και CO₂. Η πρώτη γίνεται με την άμεση μετατροπή του μηλικού σε γαλακτικό οξύ με τη βοήθεια της μηλικής αποκαρβοξυλάσης, γνωστό ως μηλογαλακτικό ένζυμο. Το δεύτερο μονοπάτι χρησιμοποιεί το μηλικό ένζυμο για τη μετατροπή του L-μηλικού σε πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο ακολούθως ανάγεται σε L-γαλακτικό οξύ από τη γαλακτική

αφυδρογονάση. Η τρίτη πιθανή οδός είναι η μείωση του μηλικού σε οξαλοοξικό οξύ από τη μηλική αφυδρογονάση, ακολουθούμενο από την αποκαρβοξυλίωση του πυρουβικού οξέος και την μετατροπή του, με τη βοήθεια της γαλακτικής αφυδρογονάσης, σε γαλακτικό οξύ. (Lonvaud-Funel, 1999).

Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι προτιμότερο να διεξάγεται σε πιο δροσερές αμπελουργικές περιοχές, στις οποίες τα σταφύλια μπορεί να έχουν υψηλά επίπεδα μηλικού οξέος. Για την ακρίβεια στα πράσινα σταφύλια η περιεκτικότητά του κυμαίνεται από 15–25 g/l, ενώ στα ώριμα κατέρχεται στα 2-4 g/l. Δηλαδή κατά την διόγκωση και την ωρίμανση των σταφυλιών, το μηλικό οξύ μειώνεται μέσω της καύσης του, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών. (Handbook of enology volume 1, 2006). Το μηλικό οξύ είναι πιο ευπαθές από το τρυγικό και προσβάλλεται από τους μικροοργανισμούς (ζύμες και βακτήρια). Πολλές φορές, η μηλογαλακτική θεωρείται αλλοίωση, ιδίως σε θερμότερες περιοχές με σταφύλια που περιέχουν μικρή ποσότητα μηλικού οξέος. Εκτός από τις ανεπιθύμητες οργανοληπτικές μεταβολές, μπορεί να μειωθεί το χρώμα των κόκκινων οίνων κατά 30 %. (Van Vuuren & Dicks, 1993) καθώς επίσης να παραχθούν βιογενείς αμίνες (Lonvaud-Funel & Joyeux, 1994).

Η μηλογαλακτική ζύμωση θα μπορούσε να συμβεί αυθόρμητα στον οίνο μέσω των αυτοχθόνων ειδών βακτηρίων, όπως είναι τα *Oenococcus Oeni*, τα *Pediococcus* και τα *Lactobacillus*, τα οποία περιέχονται είτε στο σταφύλι, είτε μέσα στον οίνο (Wibowo et al., 1985; Du Toit et al., 2010). Ωστόσο, δεν εξασφαλίζει συνεπή αποτελέσματα όσον αφορά τη σωστή ολοκλήρωσή της, το οργανοληπτικό προφίλ και την προκύπτουσα ποιότητά του οίνου. Η αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση είναι απρόβλεπτη, δεδομένου ότι μπορεί να συμβεί οποιαδήποτε στιγμή, δηλαδή κατά τη διάρκεια ή μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τα ίδια γαλακτικά βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του μηλικού οξέος, να αποικοδομήσουν δηλαδή ένα άλλο συστατικό του οίνου, όπως τα σάκχαρα, αυξάνοντας έτσι την πτητική οξύτητα και συνεπώς υποβαθμίζεται η ποιότητα των οίνων (Κοτσερίδης, 2015). Η εισαγωγή των εμπορικών βακτηριακών καλλιέργειών με άμεσο εμβολιασμό τους στον οίνο, έχει βελτιώσει τη διαχείριση της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Nielsen et al., 1996). Αυτό εξασφαλίζει καλύτερο έλεγχο του χρόνου έναρξης και ρυθμού ανάπτυξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης, μειώνει τη πιθανή παρεμβολή από βακτηριοφάγους, δίνει καλύτερο έλεγχο στη συνεισφορά της

γεύσης και μειώνει το κίνδυνο στη παραγωγή βιογενών αμινών που μπορεί να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία. (Lonvaud-Funel, 2001).

Γενικότερα, η ανεξέλεγκτη μηλογαλακτική ζύμωση χρήζει μεγάλης προσοχής για πιο ασφαλή αποτελέσματα στο τελικό προϊόν. Σε ένα οινοποιείο, το πρώτο βήμα είναι να αποφευχθεί η υπερβολική μόλυνση, παρότι η απόλυτη στειρότητα είναι σχεδόν αδύνατον να αποκτηθεί. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος, η οποία είναι φυσική για την εξάλειψη των γαλακτικών βακτηρίων, είναι η θερμότητα, όπως για παράδειγμα είναι η αποστείρωση των γυάλινων μπουκαλιών κατά την εμφιάλωση. Από τις χημικές μεθόδους, η πιο αποτελεσματική είναι η επαρκής θείωση, καθώς έχει αντιβακτηριακή δράση του δεσμευμένου διοξειδίου του άνθρακα. Επιπλέον, ως αναστολείς των γαλακτικών βακτηρίων λειτουργούν η λυσοζύμη, το φουμαρικό οξύ και η νισίνη. Βέβαια, αυτές οι ουσίες δεν είναι πάντα αποτελεσματικές και απόλυτα σταθερές. Σε κάθε περίπτωση, η υψηλή αντοχή ορισμένων στελεχών στον οίνο θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη, ειδικά όταν το pH του οίνου είναι υψηλό. (Handbook of Oenology volume 1, 2006).

2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μηλογαλακτική ζύμωση

Κατά τις πρώτες ώρες, μετά το σπάσιμο των σταφυλιών στον οινοποιητή, τα βακτήρια που προέρχονται από τα σταφύλια μπορούν να αναπτυχθούν με ταχύ ρυθμό. Μόλις ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση και η αιθανόλη αρχίζει να σχηματίζεται, ο πληθυσμός των βακτηρίων μειώνεται σημαντικά και οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνονται όλο και πιο εχθρικές. Βέβαια τα πιο ανθεκτικά στελέχη μπορούν να επιβιώσουν. Όταν ο εν δυνάμει οίνος έρθει σε επαφή με μολυσμένο εξοπλισμό μπορεί να έχουμε αύξηση των ανθεκτικών αυτών στελεχών. Αυτά τα ανθεκτικά στελέχη έχουν την ικανότητα να ξεκινήσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση όταν ο πληθυσμός φτάσει σε επίπεδα της τάξης των 10⁶ κύτταρα/ml. (Handbook of oenology volume 1, 2006).

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές που μπορούν να επηρεάσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση, αλλά οι ιδανικές συνθήκες παραμένουν ασαφείς. Η μηλογαλακτική ζύμωση του οίνου ποικίλει, ανάλογα με τη περιοχή, το αμπέλι και το χρόνο. Αυτά τα γεγονότα είναι δύσκολο να ερμηνευθούν, αλλά οι περιβαλλοντικές και οι θεραπευτικές συνθήκες των βακτηρίων φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο. Η βακτηριακή ανάπτυξη

περιορίζεται από την αιθανόλη και την οξύτητα στον οίνο. Επιπλέον, τα βακτήρια δεν είναι ικανά να συνθέσουν ορισμένες βασικές ουσίες που είναι απαραίτητες για την επιβίωσή τους, όπως είναι οι αζωτούχες ενώσεις και τα αμινοξέα. Επομένως ειδικές ελλείψεις μπορούν να δυσκολέψουν τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ωστόσο σε πρακτικό επίπεδο, τροποποιώντας τη σύνθεση του οίνου δεν βελτιώνεται η μηλογαλακτική ζύμωση σε σημαντικό βαθμό, εκτός από την αύξηση του pH. Κάθε βακτηριακό στέλεχος έχει πιθανώς ένα βέλτιστο θρεπτικό μέσον.

Το αλκοόλ (α) είναι ο πρώτος περιοριστικός παράγοντας για τη μηλογαλακτική ζύμωση. Η συγκέντρωση του μηλικού οξέος συχνά μειώνεται με ταχύτερο ρυθμό σε δεξαμενές που περιέχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης. Το *Oenococcus oeni* είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνο για τη μηλογαλακτική ζύμωση στους ερυθρούς οίνους και δε μπορεί να αναπτυχθεί σε συγκεντρώσεις αιθανόλης που υπερβαίνουν το 14%. Εξίσου, οι ακόλουθοι παράγοντες συμμετέχουν στον έλεγχο της μηλογαλακτικής ζύμωσης :

- ✓ β) Οξύτητα
- ✓ γ) Θερμοκρασία
- ✓ δ) Οξυγόνο
- ✓ ε) Θείωση
- ✓ στ) Είδος γαλακτικού βακτηρίου

α) Καθώς αυξάνεται η οξύτητα, η ανάπτυξη των βακτηρίων αναστέλλεται. Η μηλογαλακτική ζύμωση γίνεται όλο και πιο δύσκολη. Το μηλικό οξύ κατά κύριο λόγο υποβαθμίζεται. Η υποβάθμιση των υπόλοιπων συστατικών του οίνου είναι μειωμένη, περιορίζοντας έτσι την αύξηση της πτητικής οξύτητας. Η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων είναι βέλτιστη σε pH μεταξύ 4,2 και 4,5. Στο pH του οίνου (3,0-4,0), η ταχύτητα της μηλογαλακτικής ζύμωσης αυξάνεται, όσο αυξάνεται το pH. Από 2,9 έως και 3,2, η βακτηριακή ανάπτυξη είναι περιορισμένη. Η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιείται ευκολότερα σε τιμή pH 3,3 και άνω. Είναι απαραίτητο να μην είναι υπερώριμα τα σταφύλια, αλλά οι υψηλές συγκεντρώσεις μηλικού οξέος εμποδίζουν αυτή τη ζύμωση. Με πολύ ώριμα σταφύλια που έχουν χαμηλή οξύτητα, η μηλογαλακτική ζύμωση διεξάγεται ευκολότερα αλλά ο κίνδυνος για βακτηριακή προσβολή είναι πολύ υψηλός. Όταν το pH είναι αρκετά χαμηλό, θα πρέπει να ελαττωθεί η οξύτητά του για να διευκολυνθεί η έναρξη της μηλογαλακτικής

ζύμωσης. Η λύση του προβλήματος είναι η χρησιμοποίηση CaCO_3 , που έχει σαν στόχο να διορθώσει τη τιμή του pH χωρίς να αφαιρεθεί υπερβολική συγκέντρωση τρυγικού οξέος.

β) Η επίδραση της θερμοκρασίας είναι διττή. Πρώτον, μία υψηλή θερμοκρασία, άνω των $30\text{ }^\circ\text{C}$, μπορεί να επηρεάσει τα βακτήρια. Δεύτερον, η ανάπτυξη των βακτηρίων και η έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης απαιτούν ένα ορισμένο εύρος θερμοκρασίας. Η επίδραση της θερμοκρασίας επί της ανάπτυξης των βακτηρίων εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε οινόπνευμα στον οίνο. Από 0-4% κατ' όγκο αιθανόλη, η βέλτιστη ανάπτυξή τους πραγματοποιείται σε θερμοκρασία $30\text{ }^\circ\text{C}$, ενώ από 10-14% αλκοολικό βαθμό η κατάλληλη θερμοκρασία είναι $18\text{-}25\text{ }^\circ\text{C}$. (Henick-Kling, 1992). Στη πράξη η βέλτιστη θερμοκρασία για τη μηλογαλακτική ζύμωση είναι μεταξύ 20 και $25\text{ }^\circ\text{C}$. Η ζύμωση επιβραδύνεται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Στους νέους οίνους, συνεπώς, θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία τουλάχιστον $18\text{ }^\circ\text{C}$.

Η θερμοκρασία είναι ο απλούστερος λόγος που επηρεάζει τη μηλογαλακτική ζύμωση. Στο παρελθόν, τα κελάρια δεν ήταν ελεγχόμενα θερμοκρασιακά, με αποτέλεσμα το ψυχρό φθινόπωρο να είναι ο σημαντικότερος παράγοντας περιορισμού της ζύμωσης. Η ζύμωση του μηλικού οξέος είναι πολύ αργή στους $15\text{ }^\circ\text{C}$, ενώ έχει ολοκληρωθεί σε λίγες μέρες στους $20\text{ }^\circ\text{C}$. Όταν ξεκινήσει η μηλογαλακτική ζύμωση σε μία κατάλληλη θερμοκρασία, αυτή ολοκληρώνεται κανονικά ακόμα και εάν μειωθεί στους $10\text{ }^\circ\text{C}$. Επιπλέον η θείωση θα πρέπει να εκτελεστεί στον κατάλληλο χρόνο, ώστε να αποφευχθεί η παρεμπόδιση αυτού του φαινομένου. Η ζύμωση πρέπει να διεξάγεται σε όσο το δυνατόν χαμηλότερη θερμοκρασία, δηλαδή της τάξεως $18\text{-}20\text{ }^\circ\text{C}$. Η χαμηλή θερμοκρασία κάνει τη μηλογαλακτική ζύμωση πιο αργή, αλλά περιορίζει τον κίνδυνο βακτηριακής αλλοίωσης, όπως είναι η παραγωγή υπερβολικής πτητικής οξύτητας λόγω της μετατροπής ουσιών εκτός από το μηλικό οξύ.

γ) Κάθε βακτηριακό είδος έχει συγκεκριμένες ανάγκες ως προς το οξυγόνο. Στην πράξη, οι διαφορετικές ανάγκες δεν είναι γνωστές. Όσον αφορά τη μηλογαλακτική ζύμωση, ο αερισμός δεν είναι πρωταρχικός σκοπός. Γενικότερα, η οξυγόνωση του οίνου με αέρα, επιταχύνει την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, αλλά και ο υπερβολικός αερισμός μπορεί να μπλοκάρει τη ζύμωση. Σαν συμπέρασμα, ένας

μέτριος αερισμός του οίνου κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι συχνά επωφελής. (Reynaud, 1981).

δ) Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια είναι πολύ ευαίσθητα στο διοξείδιο του θείου, περισσότερο και από τους ζυμομύκητες. Μέτριες συγκεντρώσεις διοξειδίου του θείου διαβεβαιώνουν καθαρή αλκοολική ζύμωση χωρίς καμία βακτηριακή μόλυνση, όπου τα βακτήρια είναι επικίνδυνα με τη παρουσία τους σε μόλυνση των σακχάρων. Τόσο το ελεύθερο, όσο και το δεσμευμένο διοξείδιο του θείου έχουν το ίδιο αποτέλεσμα στα βακτήρια. Όταν ο οίνος είναι αποθηκευμένος για αρκετούς μήνες, θειώνεται τακτικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του SO₂ και η μηλογαλακτική ζύμωση γίνεται δύσκολη, αν όχι αδύνατη, ακόμη και με μία χαμηλή συγκέντρωση ελεύθερου SO₂. Η θειώση επηρεάζει τη μηλογαλακτική ζύμωση κυρίως σε δύο περιπτώσεις, δηλαδή κατά τη διάρκεια σπασίματος των σταφυλιών και κατά το διαχωρισμό των φλοιών με το γλεύκος.

Υπό κανονικές συνθήκες οινοποίησης, ο οίνος θα πρέπει να είναι ελάχιστα θειωμένος, ώστε να μην υπάρχει πρόβλημα με τη μηλογαλακτική ζύμωση. Μόνο σε δύο περιπτώσεις πρέπει να προστίθεται SO₂ : στη συγκομιδή μολυσμένων σταφυλιών και σε ζυμώσεις που δυσκολεύονται να ολοκληρωθούν. Μετά από θειώση 2,5 g /hl, έχει παρατηρηθεί ότι η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να ξεκινήσει το επόμενο καλοκαίρι, ενώ με δόση 5 g/hl σίγουρα μπλοκάρει ολοκληρωτικά τη ζύμωση. Σε αυτή τη περίπτωση, είναι αναγκαία η προσθήκη νέου οίνου που δεν είναι θειωμένος. Τα νέα κόκκινα κρασιά δεν πρέπει να θειώνονται αμέσως, γιατί μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα η αργή έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης λόγω οξειδωσης του οίνου και άρα υποβάθμιση της ποιότητάς του.

Επίσης, στο καθαρό γλεύκος, η προσθήκη διοξειδίου του θείου έχει αντίκτυπο στη μηλογαλακτική ζύμωση. Δηλαδή, η συγκέντρωση που επιλέγεται πρέπει να γίνεται προσεκτικά, ώστε να επιβραδύνεται προσωρινά η μηλογαλακτική ζύμωση αλλά όχι υπερβολική για να ολοκληρωθεί σε εύλογο χρονικό διάστημα και να μην επηρεάζει την αλκοολική ζύμωση.

Η δράση του διοξειδίου του θείου δεν εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση που επιλέγεται, αλλά και από τη σύνθεση των σταφυλιών. Ειδικότερα το pH και η υγιεινή κατάσταση των σταφυλιών, επηρεάζουν το ρυθμό δέσμευσης του διοξειδίου του θείου. Άλλος ένας σημαντικός παράγοντας είναι η θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε

αμπελώνες με πιο ψυχρό κλίμα, μία θείωση της τάξης των 5 g/hl μπορεί να είναι αρκετή για να την εμποδίσει, αλλά σε πιο θερμές περιοχές η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να ξεκινήσει με 20 g/hl. Γενικότερα, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της προσθήκης διοξειδίου του θείου είναι αρκετά περίπλοκος. Η σωστή θείωση επιτρέπει μία ολοκληρωμένη αλκοολική ζύμωση, αποφεύγοντας την αλλοίωση της ποιότητας, χωρίς να διακυβεύεται ή να καθυστερεί υπερβολικά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Τέλος, έχει προταθεί η χρήση λυσοζύμης ώστε να συμπληρώνει την επίδραση του διοξειδίου του θείου.

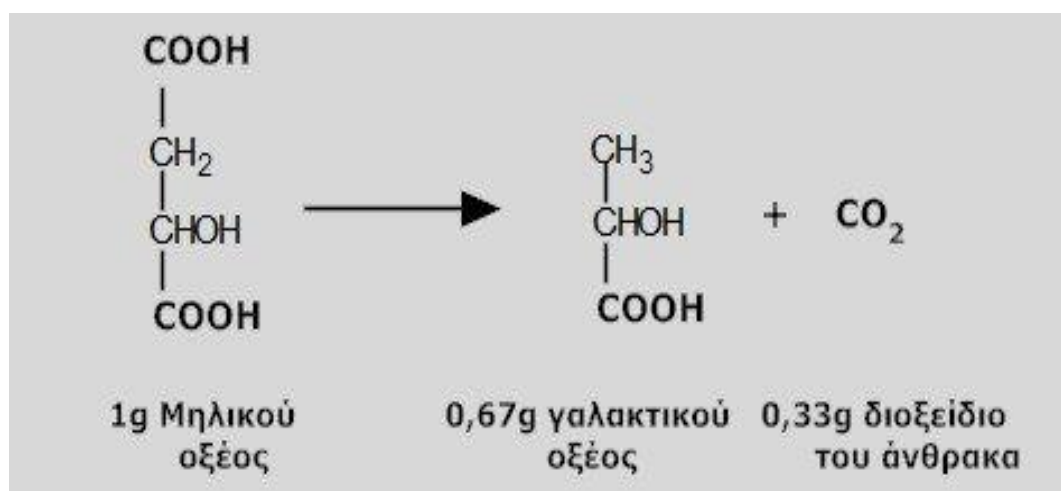
ε) Η μηλογαλακτική ζύμωση δεν είναι πάντα ευεργετική και μπορεί να είναι υπεύθυνη για τις ανεπιθύμητες αλλαγές στο αρωματικό και στο γευστικό προφίλ του οίνου. Υπεύθυνα για το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να είναι τα διαφορετικά είδη γαλακτικών βακτηρίων που μπορεί να συμμετέχουν. Γενικότερα είναι γνωστό ότι σε pH μικρότερο από 3,5 μόνο το *Oenococcus Oeni* μπορεί να αναπτυχθεί, ενώ σε pH μεγαλύτερο από 3,5 δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων *Pediococcus* και *Lactobacillus*. Όταν το pH του οίνου είναι μικρότερο από 3,5 έχει αποδειχτεί ότι το *Oenococcus Oeni* είναι λιγότερο πιθανό να παράξει κακές οσμές από αυτόχθονα βακτηριακά στελέχη. Υπερβολικές ποσότητες οξικού οξέος, όπως και αρώματα βουτύρου, τυριού, μεταλλικών ή γήινων οσμών συνήθως εμφανίζονται όταν αυτόχθονα είδη *Pediococcus* ή/ και *Lactobacillus* sp. είναι υπεύθυνα για τη μηλογαλακτική ζύμωση σε pH μεγαλύτερο από 3,5. Επιπλέον, μπορούν να παραχθούν βιογενείς αμίνες από την αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων. Τα *Pediococcus* sp. και τα *Lactobacillus brevis* θεωρούνται ως οι δύο μεγαλύτεροι παραγωγοί της ισταμίνης (Lonvaud-Funel, 2001). Η ισταμίνη, που προέρχεται από την αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης, είναι ικανή να προκαλέσει προβλήματα υγείας (πονοκέφαλος, υπόταση, κοιλιακοί πόνοι, διάρροια), σε ευαίσθητους ανθρώπους, ιδιαίτερα όταν η περιεκτικότητά της στον οίνο ξεπερνάει το 0,1 mg/l.

2.3 Αλλαγές του οίνου μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση

Κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ως προς τη χημική σύσταση και το άρωμα του οίνου. Τα κύρια υποστρώματα για τα γαλακτικά βακτήρια στον οίνο είναι τα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα. Επίσης, πιο σύνθετα συστατικά του οίνου, όπως οι διάφορες φαινολικές ενώσεις και οι αρωματικές

ενώσεις που βρίσκονται σε μικρότερη ποσότητα, μεταβολίζονται χωρίς αμφιβολία και είναι εξίσου σημαντικό.

Το μόνο υπόστρωμα που πάντα μεταβολίζεται με το ίδιο μονοπάτι, με όλα τα είδη γαλακτικών βακτηρίων, είναι το **L-μηλικό οξύ**. Αυτή η αντίδραση έχει την ικανότητα να ‘αποσκληραίνει’ τον οίνο που προκαλείται από τη μείωση της οξύτητας, δηλαδή την αντικατάσταση του μηλικού με το γαλακτικό οξύ, ένα οξύ με λιγότερο επιθετική γεύση. Στην ουσία είναι μία απλή αποκαρβοξυλίωση, εξηγώντας την απώλεια της λειτουργίας του οξέος. Στη πράξη, στο pH του οίνου, το μηλικό οξύ εξουδετερώνεται μερικώς με τη μορφή των διαχωρισμένων αλάτων, άρα σε μία ιοντική μορφή. Κάθε φορά ένα μόριο του μηλικού οξέος σε ελεύθερο οξύ ή σε ιοντική μορφή αποικοδομείται. Μόνο μία μικρή ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα απελευθερώνεται. Αυτό είναι το πρώτο σημάδι έναρξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης.



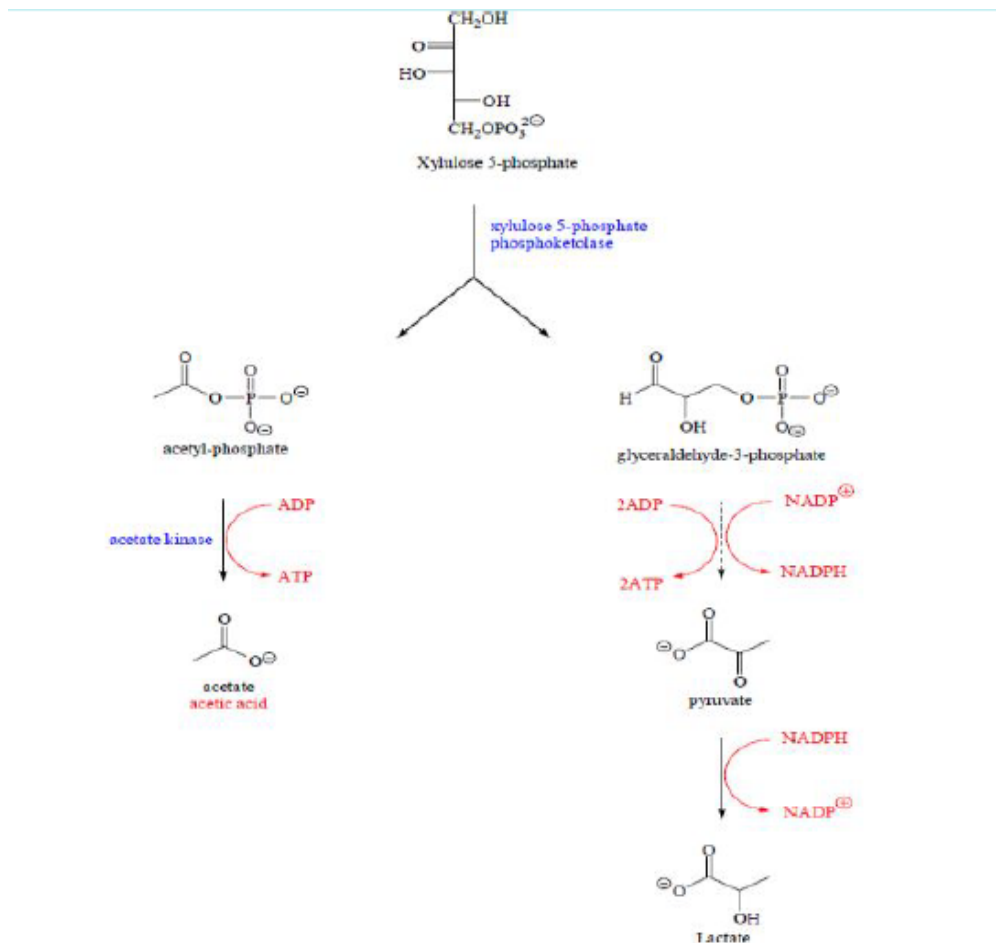
Σχήμα 2.3.1 : Η μετατροπή του μηλικού οξέος κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση

Η μείωση της οξύτητας μετά από τη μηλογαλακτική μορφή ποικίλλει ανάλογα τη συγκέντρωση του μηλικού οξέος και ως εκ τούτου την ωριμότητα των σταφυλιών. Η μείωση της οξύτητας μπορεί να είναι 3 έως 4,5 g /l σε τρυγικό οξύ. Η μείωση της ολική οξύτητας είναι από 6,75 - 9,75 g /l σε 4,5 – 6 g /l σε τρυγικό οξύ. Η ζύμωση 1 g /l μηλικού οξέος μειώνει την ολική οξύτητα κατά περίπου 0,67 g /l σε τρυγικό οξύ.

Τα βακτήρια αποδομούν το γλεύκος και τα σάκχαρα με διαφορετικό τρόπο, ανάλογα το είδος και ίσως ακόμη και το στέλεχος. Οι εξόζες μπορούν να υποστούν ζύμωση σε L- και D-γαλακτικό οξύ ή και τα δύο μαζί ανάλογα με το είδος. Γενικά, η βακτηριακή ανάπτυξη εμφανίζεται μετά την ανάπτυξη των ζυμών. Ωστόσο, το γαλακτικό οξύ που

σχηματίζεται από τα σάκχαρα είναι σε αμελητέες ποσότητες σε σχέση με τη ποσότητα που προέρχεται από το μηλικό οξύ.

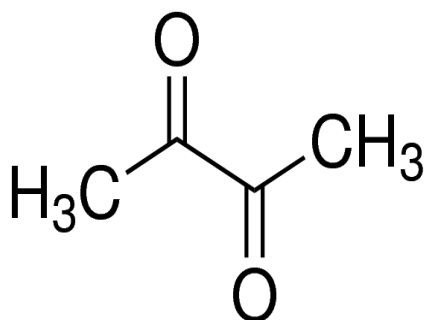
Άλλη μία σημαντική αλλαγή είναι η αύξηση της **πτητικής οξύτητας**, η οποία αυξάνεται κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αυτή η παραγωγή οφείλεται, τουλάχιστον εν' μέρει, στην **αποικοδόμηση του κιτρικού οξέος**. Αν και ένα μόριο του κιτρικού οξέος παράγει δύο μόρια οξικού οξέος (0,2-0,4 g /l), αυτή η υποβάθμιση είναι πάντα περιορισμένη επειδή στα σταφύλια δε περιέχεται μεγάλη ποσότητα αυτού του οξέος. Τα βακτήρια, επίσης, αυξάνουν τη πτητική οξύτητα μέσω της υποβάθμισης των πεντοζών. Στη πραγματικότητα αυτά τα σάκχαρα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθούν ως πηγή ενέργειας. Η υποβάθμιση του μηλικού οξέος δεν φαίνεται να επαρκεί για την εξασφάλιση των ενεργειακών αναγκών των κυττάρων. (Henick-Kling, 1992). Όλες οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η αύξηση της πτητικής οξύτητας πραγματοποιείται όταν το μηλικό οξύ έχει εξ' ολοκλήρου εξαντληθεί. Επιπλέον, η αύξηση αυτή είναι ακόμα μεγαλύτερη όταν η μηλογαλακτική ζύμωση διευκολύνεται, όπως για παράδειγμα η χαμηλή οξύτητα γλεύκους. Γενικότερα, η πτητική οξύτητα αυξάνεται κατά τη προσβολή των συστατικών του οίνου, όπως τα σάκχαρα, η γλυκερίνη και το τρυγικό οξύ, από τα γαλακτικά βακτήρια και μπορεί να παρατηρηθεί ο παράλληλος σχηματισμός και άλλων οξέων της αλειφατικής σειράς όπως είναι το βουτυρικό και το μυρμηκικό οξύ. Το οξικό οξύ αποτελεί το 90-95% της συνολικής πτητικής οξύτητας.



Σχήμα 2.3.2 : Αποικοδόμηση πεντοζών από τα γαλακτικά βακτήρια

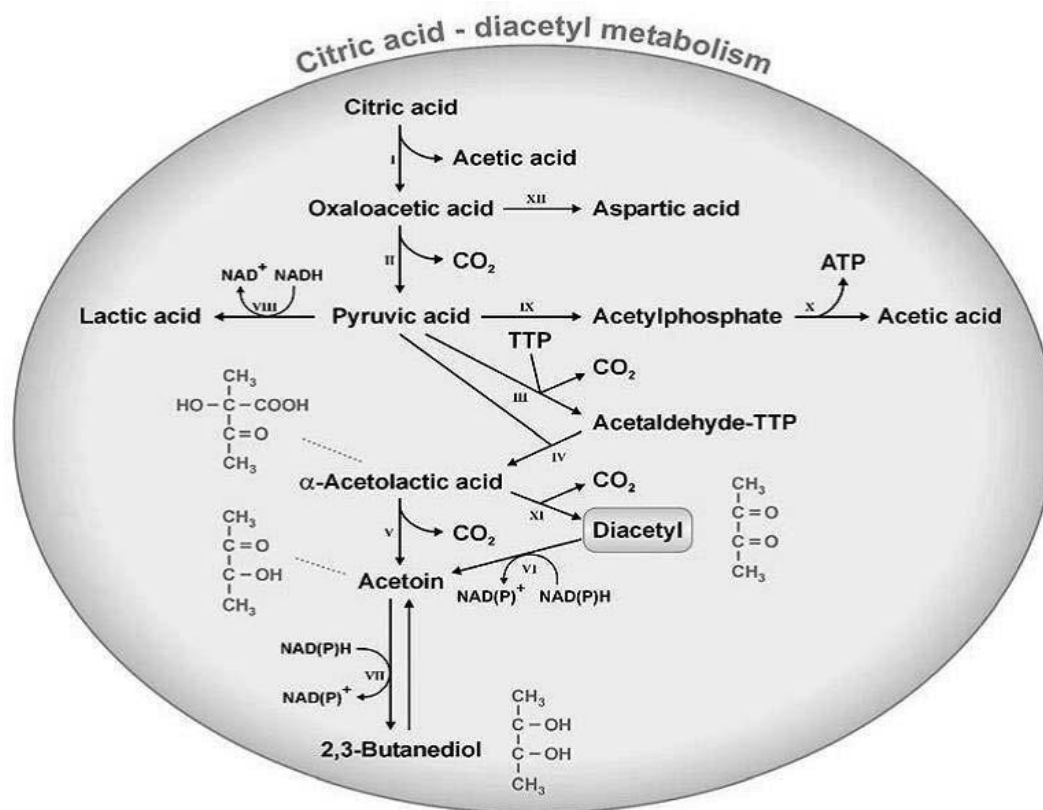
Εκτός από τη μηλογαλακτική, το οξικό οξύ προέρχεται και από την αλκοολική ζύμωση. Είτε μέσω της χημικής οξείδωσης της αλκοόλης από το οξυγόνο του αέρα, είτε μέσω της ενζυματικής οξείδωσης της αλκοόλης από τα οξικά βακτήρια. Η συγκέντρωση της πτητικής οξύτητας στον οίνο αποτελεί κριτήριο για την υγιεινή του κατάσταση, καθώς και για τις συνθήκες οινοποίησης και διατήρησής του. Η παρουσία του οξικού οξέος πέρα από μία ποσότητα υποβαθμίζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του και του δίνει οσμή και γεύση ξυδιού. Η βακτηριακή προσβολή του οίνου επιβεβαιώνεται από τη μέτρηση, είτε της συγκέντρωσης του οξικού αιθυλεστέρα εάν ξεπερνάει τα 160 mg /l, είτε της συγκέντρωσης του D-γαλακτικού οξέος εάν είναι μεγαλύτερη των 100 mg /l. Η πτητική οξύτητα δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 0,5-0,6 g /l σε οξικό οξύ για να θεωρείται υγιεινή η κατάσταση του οίνου. Πιο συγκεκριμένα, η διάθεση του λευκού οίνου στην κατανάλωση δεν επιτρέπεται με πτητική οξύτητα μεγαλύτερη των 0,98 g /l έως και 1,2 g /l οξικού οξέος.

Οι χημικοί μετασχηματισμοί του οίνου από τη μηλογαλακτική ζύμωση είναι πιο πολύπλοκοι στη πραγματικότητα. Πολλά δευτερεύοντα προϊόντα έχουν ταυτοποιηθεί, ιδιαίτερα μέσω του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος, που τα πιο σημαντικά είναι **το διακετύλιο, ακετοΐνη και η βουτανοδιόλη**. Το διακετύλιο είναι μία δικετόνη που συμβάλλει στο χαρακτήρα του οίνου με αρώματα βουτύρου, καραμέλας και καρύδας,



καθώς και ένα χαρακτήρα ‘ζύμης’ στους αφρώδεις οίνους. (λίγα χιλιοστογραμμάρια ανά λίτρο). Σε μέτρια συγκέντρωση δηλαδή από 1-4 mg /l, αυτό το δευτερογενές προϊόν συμβάλλει στην αρωματική πολυπλοκότητα με αρώματα βουτύρου, αλλά πάνω από 4 mg /l κυριαρχεί το χαρακτηριστικό άρωμα του βουτύρου, το οποίο

θεωρείται ανεπιθύμητο. (Bartowsky-Henschke, 2004). Το διακετύλιο είναι διαμορφωμένο ως ένα ενδιάμεσο του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού των υδατανθράκων, το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται σε γαλακτικό οξύ για να διατηρηθεί η ισορροπία της οξειδοαναγωγής του βακτηρίου. Όταν, επιπλέον, το πυροσταφυλικό παράγεται ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος, εν τη απουσία του σακχάρου, κατευθύνεται στη παραγωγή ακετοΐνης και βουτανοδιόλης. Επίσης, το πυρουβικό οξύ μπορεί να αποκαρβοξυλιώνεται προς διακετύλιο μέσω του α-ακετογαλακτικού. Λόγω του γεγονότος ότι το διακετύλιο είναι χημικά ασταθές, μπορεί να μειωθεί σε ακετοΐνη, η οποία με τη σειράς της να μειωθεί σε 2,3-βουτανοδιόλη. (Bartowsky et al., 2002b; Costello, 2006).



Σχήμα 2.3.3 : Ο μεταβολισμός του κιτρικού οξέος κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση

Η συσσώρευση του διακετυλίου και της ακετοΐνης εξαρτάται από το ποσοστό της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Δηλαδή, χαμηλότερα επίπεδα διακετυλίου και ακετοΐνης παράγονται από υψηλότερο ποσοστό μηλογαλακτικής ζύμωσης. Σε μελέτη βρέθηκε μειωμένη συγκέντρωση διακετυλίου μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση, αλλά αυξημένη συγκέντρωση 2,3-βουτανодиόλη το οποίο οφείλεται στην ενζυματική μείωση του διακετυλίου. (Maicas et al., 1999). Αυτή η μετατροπή έχει άμεση επίδραση στο άρωμα του οίνου, εξαιτίας του γεγονότος ότι η ακετοΐνη και η 2,3-βουτανодиόλη έχουν υψηλότερο κατώφλι αντίληψης, περίπου στα 150 mg /l (Francis & Newton, 2005) και 600 mg /l (Bartowsky & Henschke, 2004) αντίστοιχα, ενώ θεωρείται ότι συμβάλλουν στα βουτυρώδη αρώματα σε μικρότερο βαθμό. Η οργανοληπτική αντίληψη του διακετυλίου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι ο ποικιλία, το στυλ και η ηλικία του οίνου (Swiegers et al.; Costello, 2006), καθώς και η παρουσία άλλων ενώσεων, όπως είναι το SO₂. Μία έρευνα των Nielsen και Richelieu το 1999, αναφέρθηκε στη σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων του διακετυλίου και του SO₂ στον οίνο κατά τη διάρκεια και μετά τη μηλογαλακτική

ζύμωση. Με την αρχική προσθήκη του SO₂ κατά την ολοκλήρωση, συνδέεται με το διακετυλίο, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση της ουσίας αυτής. Κατά την αποθήκευση του οίνου, η αντίδραση αυτή αντιστρέφεται με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του διακετυλίου.

Οι εστέρες είναι σημαντικοί στη πολυπλοκότητα του αρώματος, ενώ συμβάλλουν στο φρουτώδη χαρακτήρα στον οίνο (Ebeler, 2001). Σχηματίζονται από την εστεροποίηση μίας αλκοόλης, ενός καρβοξυλικού οξέος και με την εξάλειψη ενός μορίου νερού, είτε ενζυματικά, είτε κατά τη παλαίωση του οίνου (Etiévant, 1991). Οι εστέρες παράγονται κυρίως ως δευτερογενή προϊόντα κατά την αλκοολική ζύμωση (Lambrechts & Pretorius, 2000) και γενικά κατηγοριοποιούνται ως αιθυλικοί εστέρες των λιπαρών οξέων, οξικοί εστέρες υψηλών αλκοολών ή εστέρες οργανικών οξέων. Οι δύο κύριες ομάδες εστέρων που προέρχονται από τη ζύμωση και σχετίζονται με το φρουτώδη χαρακτήρα είναι οι οξικοί εστέρες και οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Γενικά, στη μηλογαλακτική ζύμωση παρατηρείται αύξηση των συγκεντρώσεων των εστέρων, συμπεριλαμβανομένων του γαλακτικού αιθυλεστέρα, του οξικού αιθυλεστέρα, του εξανοϊκού αιθυλεστέρα, του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα (De Revel et al., 1999; Delaquis et al., 2000; Liu, 2002; Swiegers et al., 2005; Jeromel et al., 2008), καθώς και του ηλεκτρικού διαιθυλίου.

Οι εστέρες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη μηλογαλακτική ζύμωση είναι ο γαλακτικός αιθυλεστέρας και το ηλεκτρικό διαιθύλιο. (Maicas et al., 1999, Herjavec et al., 2001, Ugliano & Moio, 2005). Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας που σχηματίζεται κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, συμβάλλει στην αίσθηση του σώματος στον οίνο. (Henick-Kling, 1992). Επίσης, είναι ωφέλιμος επειδή προσδίδει φρουτώδη, λιπαρώδη και κρεμώδη αρώματα, ενώ το κατώφλι αντίληψης στον οίνο καθορίστηκε έως τα 110 mg /l. (Lloret et al., 2002). Οι οίνοι που δεν έχουν υποβληθεί στη διαδικασία της μηλογαλακτικής ανιχνεύονται με 5-8 mg /l, σε αντίθεση με τους οίνους που εμβολιάστηκαν με γαλακτικά βακτήρια είχαν επίπεδα 90-150 mg /l. Από την άλλη, το ηλεκτρικό διαιθύλιο συμβάλλει επίσης στο φρουτώδη χαρακτήρα και σε αρώματα πεπονιού, με κατώφλι αντίληψης έως τα 1,2 mg /l. (Peinado et al., 2004).

Ανάλογα την επιλογή βακτηριακών στελεχών, βρέθηκαν αυξήσεις ή μειώσεις στη συγκέντρωση των εστέρων. (Maicas et al., 1999). Συγκεκριμένα ανέφεραν αύξηση του οξικού ισοαμλικού, του καπροϊκού αιθυλίου και του οξικού 2-φαινυλ-αιθυλίου.

Επίσης, οι Gambaro et al. το 2001 διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα των αιθυλικών και οξικών εστέρων μειώθηκαν κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, αλλά οι αλλαγές αυτές εξαρτώνται από την επιλογή των γαλακτικών βακτηρίων. Γενικότερα, ένα στέλεχος βακτηρίου που εμφανίζει δραστηριότητα στη παραγωγή εστέρων συμβάλλει στην αύξηση του φρουτώδους αρώματος. Η μεγαλύτερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε από τα στελέχη των *Oenococcus oeni*, ενώ ακολουθούν τα στελέχη των *Lactobacillus* και των *Pediococcus*, αντίστοιχα. (Matthews et al., 2006).

Πολλές πτητικές αρωματικές ενώσεις είναι παρούσες στο σταφύλι, οι οποίες δεσμεύονται από μία χαρακτηριστική ομάδα σακχάρου. (D'Incecco et al., 2004). Συνδέονται με ένα **γλυκοζιτικό δεσμό**, με αποτέλεσμα να είναι μη πτητικές και αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο δυναμικό αρωματικών ενώσεων που μπορούν να συμβάλλουν στο άρωμα του οίνου, εφ' όσον αυτές απελευθερωθούν. Αυτές αποτελούνται από τα μονοτερπένια, τα C16-νορισοπρενοειδή, τα παράγωγα βενζολίου και διάφορες αλειφατικές ενώσεις. (Sefton et al., 1993). Τα γαλακτικά βακτήρια, κυρίως τα *Oenococcus oeni*, έχουν την ικανότητα να διασπών τον γλυκοζιτικό δεσμό, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των πτητικών ενώσεων και άρα την ενδυνάμωση του αρώματος. (Grimaldi et al., 2000; Boido et al., 2002; Liu, 2002; Barbagallo et al., 2004; D'Incecco et al., 2004; Matthews et al., 2004). Πρόσφατα έχει αποδειχτεί ότι τα *Lactobacillus* και τα *Pediococcus* έχουν την ικανότητα να διασπών το γλυκοζιτικό δεσμό. (Grimaldi et al., 2005a, Spano et al., 2005).

Πριν το 2004 δεν είχε ταυτοποιηθεί καμία θειούχα ένωση που να σχετίζεται με τη μηλογαλακτική ζύμωση. Οι Pripis-Nicolau et al. το 2004, ήταν οι πρώτοι που ανακάλυψαν το μεταβολισμό της μεθειονίνης για τη παραγωγή πτητικών ενώσεων του θείου στον οίνο κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Ο ακριβής μηχανισμός και τα βιοχημικά μονοπάτια δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Οι Vallet et al. το 2008, πρότειναν τη πιθανή οδό για το σχηματισμό των ενώσεων αυτών με τη βοήθεια των *Oenococcus oeni*. Ο μεταβολισμός της μεθειονίνης οδήγησε στο σχηματισμό της μεθανοθειόλης, του διμέθυλο δισουλφίδιο, της 3-προπαν-1-όλη (γνωστής ως μεθειονόλη) και του 3-προπιονικού οξέος. Ο σχηματισμός των ενώσεων αυτών παίζουν σημαντικό ρόλο στη πολυπλοκότητα του αρώματος, λόγω της ισχυρής οσμής που εκλύουν, το οποίο βέβαια εξαρτάται από το κατώφλι αντίληψης. Αυξημένες συγκεντρώσεις από αυτές τις θειούχες ενώσεις μεταδίδουν αρνητικά

αποτελέσματα, ενώ συγκεντρώσεις κάτω ή κοντά στο κατώφλι αντίληψης, θα δώσουν πολυπλοκότητα στον οίνο. Παρακάτω παρατίθενται περισσότερες λεπτομέρειες ως προς τα αρώματα και το κατώφλι αντίληψης. (Landaud et al., 2008).

Ένωση	Περιγραφή αρώματος	Κατώφλι αντίληψης στον οίνο (ppb)	Συγκέντρωση στον οίνο (ppb)
Μεθανοθειόλη	κρεμμύδι, ψημένο λάχανο	0,3	2,1 - 5,1
Διμέθυλο δισουλφίδιο	κρεμμύδι, ψημένο λάχανο	15 - 29	2
3-προπαν-1-όλη	κουνουπίδι, λάχανο	500	140 - 5000
3-προπιονικό οξύ	σοκολάτα, ψημένο	244	0 - 1811

Πίνακας 2.3.4 : Λεπτομέρειες των ενώσεων του θείου μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση

Στον οίνο περιέχονται διάφορες φαινολικές ενώσεις, όπως είναι τα φαινολικά οξέα και ειδικότερα το ρ-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ. Τα γαλακτικά βακτήρια μέσω ενός μηχανισμού μεταφέρουν τα φαινολικά οξέα στο κύτταρό τους, στο οποίο το ένζυμο αποκαρβοξυλάση υδροξυκιναμωνικού οξέος είναι ικανό να προκαλέσουν την αποκαρβοξυλίωση των φαινολικών οξέων σε παράγωγα, όπως είναι η 4-βινύλ-γουαϊακόλη και η 4-βινύλ-φαινόλη. Με τη σειρά τους, τα παράγωγα αυτά μπορούν να αναχθούν ενζυμικά σε αντίστοιχα παράγωγα του αιθυλεστέρα. Αυτοί οι μηχανισμοί συνδέονται με τη παρουσία των *Brettanomyces*. Παρ' όλα αυτά, σε μία μελέτη αποδείχτηκε ότι διάφορα γαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να παράγουν σημαντικές συγκεντρώσεις πτητικών φαινολών. (Nelson, 2008). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι στην αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση οδήγησε στη παραγωγή υψηλότερων συγκεντρώσεων πτητικών φαινολών. Βέβαια είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η έρευνα βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο και χρειάζεται αρκετός χρόνος για πιο ακριβή αποτελέσματα.

Οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται από την αποκαρβοξυλίωση και την αναγωγή των α-κετο-οξέων. Τα α-κετο-οξέα παράγονται από τα ενδιάμεσα προϊόντα κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης των αμινοξέων. Η βιοσύνθεση των αμινοξέων είναι υπεύθυνη για τη παραγωγή των περισσότερων ανωτέρων αλκοολών, που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής σύνθεσης. (Ugliano & Henschke, 2008). Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (λιγότερο από 300 mg/l), οι ανώτερες αλκοόλες συμβάλλουν στη πολυπλοκότητα και στο φρουτώδη χαρακτήρα, ενώ σε

υψηλότερες αλκοόλες (πάνω από 400 mg /l), συνήθως είναι επιζήμιες στον οίνο. (Swiegers et al., 2005). Σε μία μελέτη βρέθηκε ότι κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, η αύξηση των ανωτέρων αλκοολών ήταν αμελητέα, σε οίνο με υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, εκτός από μία σημαντική αύξηση στην ισοβουτανόλη και στην 2-φαινυλαιθανόλη. (Jerome et al., 2008). Παρ' όλα αυτά, άλλες μελέτες δεν έδειξαν καμία μεταβολή όσον αφορά τις ανώτερες αλκοόλες.

Συμπερασματικά, είναι σαφές ότι η μηλογαλακτική ζύμωση έχει μία αισθητή επίδραση στο χαρακτήρα του οίνου. Η επίδραση αυτή είναι πολλές φορές αντιφατική, γιατί οφείλεται από πολλούς παράγοντες παράλληλα. Συνοπτικά, εξαρτάται από το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου, τη παρουσία και τη διαθεσιμότητα των πρόδρομων ενώσεων, την ενζυματική δραστηριότητα, τον τύπο του οίνου, την γηγενή γεύση και άρωμα του οίνου, καθώς και τον τρόπο οινοποίησης που έχει επιλεγεί .

Η μηλογαλακτική ζύμωση, γενικά, οδηγεί στην αύξηση του χαρακτηριστικού αρώματος του βουτύρου, στο μειωμένο χορτώδη χαρακτήρα, στη βελτιστοποίηση του φρουτώδη χαρακτήρα και στη βελτιωμένη αίσθηση και καλύτερη επίγευση του στόματος.

2.4 Παρεμπόδιση της μηλογαλακτικής ζύμωσης

Η δράση των γαλακτικών βακτηρίων, κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να παρεμποδιστεί κάτω από ορισμένες συνθήκες (Beelman & Gallander, 1970, Kunkee, 1967, Kunkee, 1974, Lafon – Lafourcade & Reynaud, 1974) και διεργασίες (Cofman & al., 1974) :

- Χαμηλό pH (pH < 3,2)
- Υψηλή συγκέντρωση αλκοόλης (> 14%)
- Χαμηλή θερμοκρασία
- Περιεκτικότητα σε θειώδη ανυδρίτη > 50 ppm

Οι παρακάτω διεργασίες μπορούν να παρεμποδίσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση :

- Γρήγορη μετάγγιση του οίνου μετά την αλκοολική ζύμωση
- Παστερίωση του οίνου
- Αποστείρωση του οίνου με διήθηση

Υπάρχουν επίσης αναφορές όπου παρεμποδίστηκε η μηλογαλακτική ζύμωση με χρήση φουμαρικού οξέος. Δηλαδή, οι Cofran και Mayer το 1970, υποστήριξαν ότι μία συγκέντρωση 480 mg/l φουμαρικού οξέος μπορεί να παρεμποδίσει τη μηλογαλακτική ζύμωση. Επίσης, το σορβικό οξύ το οποίο όμως μπορεί να μεταβολιστεί εν μέρει από τα γαλακτικά βακτήρια προσδίδοντας στον οίνο οσμή γερανίου μπορεί επίσης να παρεμποδίσει τη μηλογαλακτική ζύμωση.

2.5 Εμπορικά σκευάσματα γαλακτικών βακτηρίων

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν 3 στελέχη εμπορικών γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus Oeni* και πιο συγκεκριμένα τα *Viniflora Cine*, *Viniflora Oenos* και *Viniflora CH16*. Τα παραπάνω στελέχη, σύμφωνα με την εταιρία παραγωγής τους, δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα σε συγκεκριμένες συνθήκες στον οίνο.

Πιο συγκεκριμένα, το *Viniflora Cine* είναι ένα γαλακτικό βακτήριο που επιλέγεται για μηλογαλακτική ζύμωση χωρίς να παράγει διακετύλιο. Χρησιμοποιείται κυρίως για φρουτώδεις οίνους, χωρίς να χάσουν το αρωματικό προφίλ και δεν εμφανίζει αρώματα βουτύρου. Ωστόσο δεν είναι σε θέση να μετατρέψει το κιτρικό οξύ σε διακετύλιο, αφού στερείται των απαιτούμενων ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή αυτή. Επίσης, χρησιμοποιείται κυρίως σε λευκούς και ροζέ οίνους, δίχως να απολεσθεί ο φρουτώδης χαρακτήρας και δίνοντας δομή και σώμα. Ο εμβολιασμός του μπορεί να πραγματοποιηθεί πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την αλκοολική ζύμωση. Η θερμοκρασία εμβολιασμού που συνιστάται είναι 17 – 25 °C, το pH μεγαλύτερο από 3,2, το ολικό SO₂ πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης να είναι μικρότερο από 30 ppm και η μέγιστη αλκοολική περιεκτικότητα να είναι μικρότερη από 14 % vol.

Το *Viniflora Oenos* είναι το πρώτο γαλακτικό βακτήριο *Oenococcus Oeni* που εμφανίστηκε για άμεσο εμβολιασμό στον οίνο. Η ιδέα ήταν να κάνει μία εύκολη, και ασφαλή μηλογαλακτική ζύμωση για μεγάλο εύρος κρασιών. Γενικότερα θα δώσει μία σταθερή και αποτελεσματική μηλογαλακτική ζύμωση στα περισσότερα κρασιά. Για αυτό το λόγο είναι πολύ συχνή η εφαρμογή του. Με το *Oenos* έχουμε μία μεσαία παραγωγή διακετυλίου. Χρησιμοποιείται για ποικιλίες κυρίως κόκκινες, όπως είναι τα Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot, Malbec, Pinot Noir, Gamay, Nebbiolo, Carignan

και Tempranillo. Επίσης όπως στο προηγούμενο γαλακτικό βακτήριο, ο εμβολιασμός του μπορεί να γίνει πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την αλκοολική ζύμωση. Η θερμοκρασία που συνιστάται είναι περίπου 17 – 25 °C, το pH μεγαλύτερο από 3,3, το ολικό SO₂ πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης να είναι μικρότερο από 40 ppm για λευκούς και 70 ppm για κόκκινους οίνους και ο μέγιστος αλκοολικός τίτλος να μη ξεπερνάει το 14 % vol.

Τέλος, το Viniflora CH16 είναι ένα στέλεχος *Oenococcus Oeni* το οποίο έχει απομονωθεί από κόκκινο οίνο υψηλής αλκοολικής περιεκτικότητας. Επιλέγεται, συνήθως, για να εκτελέσει μηλογαλακτική ζύμωση σε οίνους με υψηλό αλκοολικό βαθμό (16 % vol.), από όπου και προέρχεται η ονομασία του. Χρησιμοποιείται κυρίως σε θερμότερα κλίματα για τους ερυθρούς οίνους με περιεκτικότητα 14 – 16 % (v/v), για πιο γρήγορη και αξιόπιστη μηλογαλακτική ζύμωση. Παράγεται μία μέτρια ποσότητα διακετυλίου και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οίνους που δέχονται μεγάλο χρονικό διάστημα παλαίωσης σε βαρέλι. Λειτουργεί πολύ καλά με μία μεγάλη ποικιλία στελεχών οίνου *Saccharomyces cerevisiae*. Το CH16 είναι ένα από τα καλύτερα στελέχη για μία γκάμα ερυθρών ποικιλιών όπως τα Cabernet Sauvignon, Merlot, Nebbiolo, Syrah, Corvina, Nero D' Avola, Tempranillo, Grenache και Malbec. Επίσης, ο εμβολιασμός του πραγματοποιείται είτε πριν, είτε κατά τη διάρκεια, είτε μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Το εύρος της θερμοκρασίας εμβολιασμού κυμαίνεται από 17 – 25 °C, το pH μεγαλύτερο από 3,4, το ολικό SO₂ να μην ξεπερνάει τα 70 ppm, ενώ τέλος η μέγιστη αλκοολική περιεκτικότητα να είναι 16 % vol. (<http://www.chr-hansen.com/en>).

3.Υλικά και Μέθοδοι

Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται αναλυτική περιγραφή των μεθόδων και των αναλύσεων που έλαβαν χώρα κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της μεταπτυχιακής εργασίας. Για την ακρίβεια, περιγράφονται οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στον παραγόμενο οίνο κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, μετά την μηλογαλακτική ζύμωση και τον οργανοληπτικό έλεγχο.

3.1 Σκοπός & Πειραματικός Σχεδιασμός – Οινοποίηση

Ο σκοπός της μελέτης είναι να αξιολογήσουμε το ενδιαφέρον ή μη της πραγματοποίησης μηλογαλακτικής ζύμωσης στους οίνους από Μοσχοφίλερο. Έτσι συγκρίνονται, ως προς τις χημικές και οργανοληπτικές παραμέτρους, οίνοι που εμβολιάστηκαν με επιλεγμένα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων αλλά και οίνοι που ολοκλήρωσαν την μηλογαλακτική ζύμωση αυθόρμητα ή και σε δείγματα που απετράπη αυτή.

Η μελέτη περιέχει στοιχεία πρωτοτυπίας λόγω της φύσης της ποικιλίας. Δηλαδή η ποικιλία Μοσχοφίλερο, όπως είναι γνωστό, δε συνηθίζεται μετά την αλκοολική ζύμωση στη χρησιμοποίηση γαλακτικών βακτηρίων για τη περαίωση της μηλογαλακτική ζύμωσης. Γενικότερα, από τη ποικιλία Μοσχοφίλερο παράγονται φρέσκοι και φρουτώδεις οίνοι, οι οποίοι είναι ευοξειδωτοι με ασταθές χρώμα, με αποτέλεσμα σε μικρό χρονικό διάστημα παρουσιάζει καστανές ανταύγειες γεγονός που προδίδει γήρανση του οίνου. Επίσης, λόγω της ευοξειδωτής φύσης τους, υπάρχει αλλαγή στον αρωματικό χαρακτήρα, με τη πάροδο του χρόνου.

Τα σταφύλια συλλέχθηκαν στο νομό της Αρκαδίας και πιο συγκεκριμένα από τη περιοχή Φτέρη, η οποία συγκαταλέγεται στην αμπελουργική ζώνη Π.Ο.Π. της Μαντινείας. Ο αμπελώνας από τον οποίο προέρχονται τα σταφύλια, είναι φυτεμένος σε υψόμετρο περίπου 670 μέτρων, είναι αρδευόμενος με στρεμματική απόδοση 1.100 kg/ στρέμμα και η ηλικία του αγγίζει τα 12 χρόνια. Το σύστημα μόρφωσης είναι γραμμικό, το κλάδεμα καρποφορίας βραχύ με 3 οφθαλμούς ανά παραγωγική μονάδα, ενώ το υποκείμενο που χρησιμοποιήθηκε είναι 110 R.

Αρχικά, στις 26/10/2015 υπήρξε η συγκομιδή 65 κιλά σταφυλιών της ποικιλίας Μοσχοφίλερο, ενώ είχαν αποκτήσει 11,79⁰ Baume ή αλλιώς 207 gr σακχάρων/ lt και

εν συνεχεία η μεταφορά τους σε πλαστικά τελάρα στο εργαστήριο Οινολογίας του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, τον Οκτώβριο του 2015. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η κλασική λευκής οινοποίησης.

Για την ακρίβεια, τοποθετήθηκαν σε ψυκτικό θάλαμο στους 1 °C, με στόχο τη μείωση της θερμοκρασίας των σταφυλιών για την αποφυγή οξείδωσής τους. Ύστερα από 24 ώρες ακολούθησε η αποβοστρύχωση χειρωνακτικά και ο εκραγισμός με χειροκίνητο θλιπτήρα. Εν συνεχεία, ο σταφυλοπολτός 45 λίτρων μεταφέρθηκε σε μία μικρή δεξαμενή οινοποίησης inox για την εκκίνηση και την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Κατά τον εκραγισμό και μετέπειτα στο γλεύκος πραγματοποιήθηκε θείωση με προσθήκη 3 g/ hl sodium metabisulfite, καθώς επίσης και η προσθήκη ενζύμων απολάσπωσης 30 g/ tn (polycel) και εν συνεχεία επανατοποθετήθηκε σε ψυκτικό θάλαμο για καλύτερη στατική απολάσπωση και αποφυγή έναρξης της αλκοολικής ζύμωσης λόγω μικρής ποσότητας θείωσης.

Ύστερα από 24 ώρες συλλέχθηκε το καθαρό γλεύκος και ακολούθησε ο εμβολιασμός με ζύμες *Saccharomyces cerevisiae* 20 g/ hl (UCLM S325, Fermentis, France) καθώς επίσης και θρεπτικά για τους ζυμομύκητες 20 g/ hl (bioferm 1, Fermentis, France). Κατά την αλκοολική ζύμωση, η μέση θερμοκρασία ήταν 20 °C, ενώ όποτε θεωρείτο απαραίτητο γινόταν ανάδευση για την χορήγηση επαρκούς οξυγόνου. Σε καθημερινή βάση για την παρακολούθησή της, γίνονταν οι απαραίτητες μετρήσεις του Baume, της πυκνότητας και της θερμοκρασίας. Επίσης γινόταν μέτρηση του pH και της ολικής οξύτητας του γλεύκους, όποτε κρινόταν απαραίτητο. Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε μετά από 22 ημέρες.

Με το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης έγινε μετάγγιση του οίνου σε 8 δοχεία των 4 λίτρων για την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Δηλαδή χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά στελέχη εμπορικών γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus Oeni* (Chr. Hansen, Denmark) με προσθήκη 20 g/ hl, για την ακρίβεια τα Cine, Oenos και CH16 με την επανάληψή τους, καθώς επίσης υπήρξε η προσπάθεια για αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση με γηγενή γαλακτικά βακτήρια, όπου η διαδικασία ολοκληρώθηκε μετά από 20 ημέρες. Για τον έλεγχο της πορείας της μηλογαλακτικής ζύμωσης γινόταν καθημερινά προσδιορισμός με τη μέθοδο TLC (Thin Layer Chromatography).

Σε δύο τελευταία δοχεία που πληρώθηκαν με 4 λίτρα επιτεύχθηκε θείωση με προσθήκη 8 g/ hl sodium metabisulfite για την ανακοπή αυθόρμητης μηλογαλακτικής ζύμωσης, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για τις αναλύσεις και την οργανοληπτική δοκιμή.

Επιπλέον, στα υπόλοιπα δείγματα μετά το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης προστέθηκαν 8 g/ hl sodium metabisulfite και ο οίνος μεταγγίστηκε σε ασκούς για να διατηρηθεί για τις υπόλοιπες αναλύσεις αλλά και σε γυάλινα μπουκάλια για τον οργανοληπτικό έλεγχο.

Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων ακολούθησε η κωδικοποίηση των δειγμάτων. Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων και η περιγραφή της συνθήκης οиноποίησης.

Κωδικός δείγματος	Περιγραφή Συνθήκης
S	Μόνο Αλκοολική Ζύμωση (Μάρτυρας)
M	Με αυθόρμητη ΜΛΖ
Cine	ΜΛΖ με βακτήρια Cine
Oenos	ΜΛΖ με βακτήρια Oenos
CH16	ΜΛΖ με βακτήρια CH16

Πίνακας 3.1.1 : Η ονομασία των δειγμάτων και η περιγραφή της συνθήκης

Συνοπτικά, οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο τέλος της αλκοολικής και μηλογαλακτικής ζύμωσης και θα περιγραφούν αναλυτικότερα παρακάτω είναι :

- βασικές αναλύσεις οίνων :
 - pH
 - ολική οξύτητα
 - ελεύθερος και ολικός SO₂
 - πτητική οξύτητα
 - ανάγοντα σάκχαρα
 - ένταση – απόχρωση

- ποσοτικός προσδιορισμός αρωματικού δυναμικού με χρήση GC-FID/ SPME
- ακριβής ανάλυση για έλεγχο της ποσότητας των οξέων με χρήση HPLC
- οργανοληπτικός έλεγχος του τελικού προϊόντος

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την ανάλυση της διακύμανσης (analysis of variance – ANOVA) για ένα παράγοντα, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$, του προγράμματος Statistica V.7 (Statsoft Inc, Tulsa, Ok). Για τη σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το Tukey's HSD test.

3.2 Συνολικές αναλύσεις οίνου

3.2.1 Βασικές αναλύσεις οίνου

Οι βασικές αναλύσεις του οίνου πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους οι οποίες προβλέπονται από την ευρωπαϊκή νομοθεσία και χρησιμοποιούνται κατά κόρων σε εργαστηριακό χώρο (International organization of vine and wine, 2006) και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής :

- α) Μέτρηση της ογκομετρούμενης οξύτητας
- β) Μέτρηση της ενεργούς οξύτητας
- γ) Μέτρηση της πτητικής οξύτητας
- δ) Μέτρηση αλκοολικού βαθμού
- ε) Μέτρηση αναγόντων σακχάρων
- στ) Προσδιορισμός χρωματικών χαρακτηριστικών (ένταση, απόχρωση)

3.2.2 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) για τον προσδιορισμό μηλικού οξέος

Μία ταχεία μέθοδος προσδιορισμού (κυρίως ποιοτικού) ύπαρξης ή όχι μηλικού οξέος στον οίνο είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη προκειμένου να διαπιστωθεί εάν έγινε ή όχι μηλογαλακτική ζύμωση, αφού

χρησιμοποιείται κατά τη διάρκειά της και εμφανίζει το τρυγικό, το μηλικό, το γαλακτικό και το ηλεκτρικό οξύ.

Χρησιμοποιούνται :

- Δύο δοχεία που να κλείνουν ερμητικά, διαστάσεων περίπου 20 x 20 x 30 cm
- Πλακίδια TLC
- Διαλύτης στον οποίο αναμιγνύονται n mL τολουένιο, n/2 mL οξικού οξέος και n/2 mL n-οξικού βουτυλεστέρα
- Διάλυμα δείκτη πράσινο της βρωμοκρεζόλης

Πορεία: Στο δοχείο φέρονται 50 ml από το διάλυμα ισοβουτανόλης και 25 ml από το διάλυμα οξικού οξέος. Το πλακίδια TLC κόβονται σε διαστάσεις 5 x 10 cm στη μια πλευρά, του οποίου τοποθετούνται οι κηλίδες των υπό εξέταση δειγμάτων οίνου. Οι κηλίδες απέχουν 0.5 cm από την άκρη του χαρτιού και 1 cm μεταξύ τους. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και μάρτυρας διάλυμα που περιέχει μηλικό οξύ 2 g/l. Το χαρτί, αφού στεγνώσουν οι κηλίδες, τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει το διάλυμα και κλείνει ερμητικά. Μετά από 20 λεπτά περίπου (το διάλυμα έχει φθάσει στα 9cm) αφαιρούμε το χαρτί και το αφήνουμε να εξατμισθεί ο διαλύτης. Μετέπειτα εμβαπτίζουμε τα πλακίδια μέσα στο δοχείο με τον δείκτη και περιμένουμε να στεγνώσει. Το χρώμα του πλακιδίου θα αλλάξει προς το κυανούν εκτός από τα σημεία, όπου θα υπάρχουν συγκεντρωμένα τα οξέα και τα οποία θα παραμένουν κίτρινα.

3.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός αρωματικού δυναμικού με GC-FID

Για να προσδιορίσουμε την ποσότητα των βασικών αρωματικών ενώσεων στο Μοσχοφίλερο, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SPME (Solid Phase Micro Extraction). Το βασικό της πλεονέκτημα είναι ότι είναι μία γρήγορη μέθοδος, απλή, σχετικά ακριβής και δεν απαιτεί χρήση διαλυτών.

Αρχικά, γίνεται ταυτοποίηση, βάση των προτύπων των αρωματικών ενώσεων, αφού γνωρίζουμε τον χρόνο που εμφανίζεται η κορυφή κάθε αρωματικής ουσίας. Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα των υπό μελέτη ουσιών και αναλύονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες με το άγνωστο δείγμα. Επιπλέον, κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, όπου ο λόγος της συγκέντρωσης της ουσίας προς τη συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου (3-οκτανόλη) είναι η συνάρτηση του λόγου,

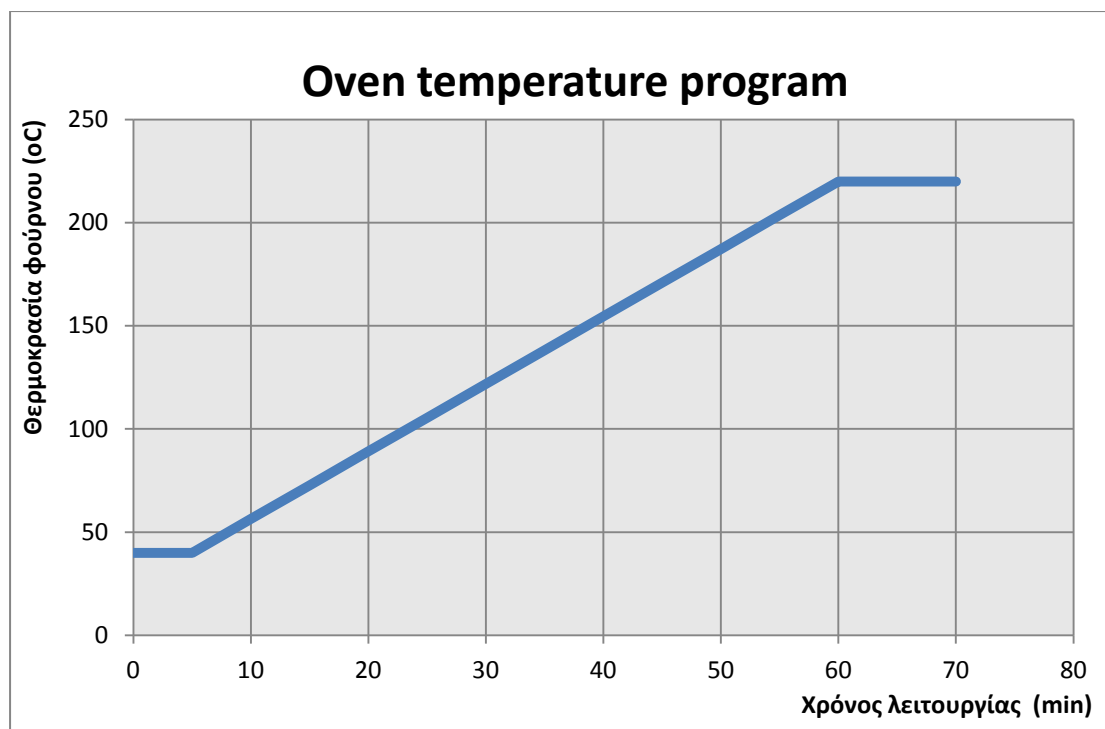
του εμβαδού της κορυφής της ουσίας προς το εμβαδόν του εσωτερικού προτύπου. Από αυτή τη καμπύλη βρίσκεται η συγκέντρωσή της στο δείγμα.

Αναλυτικότερα η προετοιμασία του δείγματος σε γυάλινο vial SPME των 20 ml είναι η εξής :

- 7 ml του δείγματος
- 3 ml απιονισμένο νερό
- 10 µl 3-οκτανόλη (εσωτερικό πρότυπο)
- 3 gr Sodium Chloride (NaCl)

Στη συνέχεια τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα στα 400 rpm, για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο 35 °C. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, τοποθετείται η ίνα τριστρωματικής σύνθεσης στο vial και απελευθερώνεται ώστε να γίνει η προσρόφηση των πτητικών ενώσεων για 30 λεπτά. Τέλος, η ίνα μεταφέρεται στην υποδοχή έγχυσης, όπου παραμένει για 10 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν από την ίνα οι αρωματικές ενώσεις αλλά και να γίνει καθαρισμός της ίνας ώστε να είναι έτοιμη για το επόμενο δείγμα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μαζί με την επανάληψή τους.

Στο θερμοστατικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε, υπό αρχικές συνθήκες η θερμοκρασία εισόδου είναι 220 °C, η θερμοκρασία ανιχνευτή 250 °C και η θερμοκρασία φούρνου 40 °C. Η θερμοκρασία φούρνου παραμένει σε αυτή τη θερμοκρασία για 5 λεπτά και στη συνέχεια ανεβαίνει σταδιακά στους 220 °C, όπου παραμένει για 5 λεπτά. Όλο το πρόγραμμα διαρκεί 70 λεπτά. Το GC-FID που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Hewlett Packard series II 5890 (HP), ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται Ήλιον (He). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν πολική DB-WAX, length 30m I.D. 0.320mm, film 0.25µm.



Γράφημα 3.2.3.1 : Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα

3.2.4 Μέτρηση οξέων και αλκοολών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)

Η οργανολογία της Υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης είναι η εξής:

- Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών
- Αντλία (σταθερής ροής, σταθερής πίεσης)
- Μονάδα εισαγωγής δείγματος (βαλβίδα εισαγωγής δείγματος)
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτής
- Καταγραφικό

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Aminex HPX-87H (organic acid analysis). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν H_2SO_4 συγκέντρωσης 5mM. (ο οποίος φιλτράρονταν υπό πίεση 300atm). Οι ανιχνευτές ήταν ορατού -υπεριώδους όπου στον UV (Υπεριώδους 190-400 nm λάμπα D2) εμφανίζονταν οι κορυφές για τα οξέα και στο RI (Υπερύθρου 2500-50000 nm) οι κορυφές για τις αλκοόλες. Το καταγραφικό ήταν ηλεκτρονικός υπολογιστής.

Τα συστατικά που ανιχνεύθηκαν και μετέπειτα αναλύθηκαν μέσω αυτής της μεθόδου είναι το τρυγικό οξύ, το μηλικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το κιτρικό οξύ και τέλος από τις αλκοόλες, η αιθανόλη και η γλυκερόλη.

Πορεία :

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

A) Αρχικά αποψύχθηκαν τα δείγματα με φυσικό τρόπο, αφήνοντας τα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ηρεμία. Έγινε ελαφριά ανακίνηση και φιλτράρισμα του δείγματος με φίλτρο 0.2 μm.

B) Παραλαβή του αναλυόμενου δείγματος μέσω σύριγγας χωρητικότητας 50μL, γεμίζοντας την μέχρι τέλους με σκοπό την παντελής αποφυγή φυσαλίδων.

Γ) Εισχώρηση του δείγματος μέσα από την ειδική εσοχή με ένεση και αφού το μηχανήμα κρατούσε συγκεκριμένη ποσότητα για τα τελικά αποτελέσματα (20μL) η υπόλοιπη ποσότητα απορρίπτονταν(INJECT).

Δ) Ακολουθεί η ενεργοποίηση των καναλιών ώστε να τρέξει το δείγμα και να φανερωθούν οι αντίστοιχες κορυφές.

E) Μετά από διάστημα 30 λεπτών λαμβάνεται το χρωματογράφημα.

Καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής πορείας η ροή και η πίεση ήταν ρυθμισμένες 0.6mL/min και 38kg/cm² αντίστοιχα. Η θερμοκρασία ήταν προγραμματισμένη στους 50 °C όπου και παρέμενε σταθερή μέσω φούρνου. Η ίδια διαδικασία για κάθε δείγμα εφαρμόστηκε 2 φορές με σκοπό την καλύτερη επαναληψιμότητα.

3.3 Ο Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οργανοληπτικός έλεγχος που διεξήχθη, είχε στόχο την αξιολόγηση των παραγόμενων λευκών οίνων, ποικιλίας Μοσχοφίλερου, από εκπαιδευμένους δοκιμαστές για να διακρίνουν τις διαφορές ανάμεσά τους. Η διεξαγωγή του οργανοληπτικού ελέγχου έλαβε χώρα στο εργαστήριο οινολογίας στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, σε κατάλληλα διαμορφωμένο χώρο, εξοπλισμένο με ξεχωριστούς λευκούς πάγκους και ποτήρια δοκιμής οίνων. Πραγματοποιήθηκαν 2 συνεδρίες με επικεφαλή και επιβλέπων, τον κύριο Κοτσερίδη Γεώργιο, για τον καθορισμό των χαρακτηριστικών του οίνου που θα εξεταστούν. Πιο συγκεκριμένα αποφασίστηκε :

α) η εξέταση της αξιολόγησης των αρωμάτων

- ✓ εσπεριδοειδή
- ✓ βανίλια
- ✓ πυρηνόκαρπα
- ✓ βούτυρο

β) η οξύτητα

γ) η ισορροπία

δ) το σώμα

Για πιο ασφαλή συμπεράσματα πραγματοποιήθηκε εκπαίδευση 14 δοκιμαστών σε 4 συνεδρίες (4 κανονικές και 2 επαναλήψεις). Παρακάτω παρατίθενται οι ασκήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση των δοκιμαστών.

Άσκηση 1 : Βασικές γεύσεις σε νερό

1Α : 2,0 g / lt αλάτι σε νερό

1Β : 20,0 g / lt ζάχαρη σε νερό

1Γ : 15,0 mg / lt θειική κινίνη

1Δ : 2,5 g / lt τρυγικό οξύ

Άσκηση 2 : Βασικές γεύσεις σε λευκό οίνο

2Α : Μάρτυρας

2Β : Μάρτυρας + 2,0 g / lt τρυγικό οξύ

2Γ : Μάρτυρας + 15,0 g / lt ζάχαρη

2Δ : Μάρτυρας + 20,0 mg / lt θειική κινίνη

Άσκηση 3 : Οξύτητα σε λευκό οίνο

3Α : Μάρτυρας + 1,0 g / lt τρυγικό οξύ

3Β : Μάρτυρας

3Γ : Μάρτυρας + 1,0 g / lt υδροξείδιο του καλίου

3Δ : Μάρτυρας + 2,0 g / lt τρυγικό οξύ

Άσκηση 4 : Ζάχαρη σε λευκό οίνο

4Α : Μάρτυρας + 8,0 g / lt ζάχαρη

4Β : Μάρτυρας

4Γ : Μάρτυρας + 15,0 g / lt ζάχαρη

4Δ : Μάρτυρας + 25,0 g / lt ζάχαρη

Άσκηση 5 : Ισορροπία οξύτητας / σακχάρων σε λευκό οίνο

5Α : Μάρτυρας

5Β : Μάρτυρας + 1,0 g / lt τρυγικό οξύ

5Γ : Μάρτυρας + 7,5 g / lt ζάχαρη

5Δ : Μάρτυρας + 1,0 g / lt τρυγικό οξύ + 7,5 g / lt ζάχαρη

Άσκηση 6 : Εξέταση σώματος σε λευκό οίνο

6Α : Μάρτυρας

6Β : Μάρτυρας + 7,5 g / lt γλυκερίνη + 1 ml αιθανόλη / 100 ml οίνου

6Γ : Μάρτυρας + 15,0 g / lt γλυκερίνη + 1 ml αιθανόλη / 100 ml οίνου

Άσκηση 7 : Αναγνώριση αρωμάτων

Πορτοκάλι : 1,5 g ρινίσματα πορτοκάλι σε 150 ml οίνου

Λεμόνι : 1,5 g ρινίσματα λεμόνι σε 150 ml οίνου

Εσπεριδοειδή : 1,5 g ρινίσματα πορτοκάλι + 1,5 g / lt ρινίσματα λεμόνι
σε 150 ml οίνου

Ροδάκινο : 12 ml χυμό ροδάκινο σε 300 ml οίνου

Βούτυρο : 0,7 ml άρωμα βούτυρο σε 200 ml οίνου

Βανίλια : 0,7 ml άρωμα βανίλια σε 200 ml οίνου

Μετά την εκπαίδευση ακολούθησε ο οργανοληπτικός έλεγχος των 5 δειγμάτων. Σε κάθε δοκιμαστή δόθηκε ένα φύλλο με τα χαρακτηριστικά του οίνου (άρωμα, οξύτητα, ισορροπία, σώμα) και τη κλίμακα με βάση την οποία θα γινόταν η βαθμολόγηση. Οι δοκιμαστές χρησιμοποίησαν μία κλίμακα με συνεχόμενες γραμμές από 0 – 10 για να

βαθμολογήσουν την ένταση του κάθε χαρακτηριστικού. Οι συνεχόμενες γραμμές έχουν μήκος 15 εκατοστά και στην αρχή και στο τέλος υπάρχουν τα δύο άκρα της έντασης του χαρακτηριστικού που μετρείται. Ο δοκιμαστής βάζει ένα σημάδι, ενώ ο αναλυτής το μετατρέπει σε νούμερο. Αυτή η κλίμακα δίνει τη δυνατότητα να μετρηθούν οι μικρές διαφορές, εάν υπάρχουν, μεταξύ των δειγμάτων. Βεβαίως είναι πιο δύσκολη στη χρήση, για αυτό απαιτείται η επανάληψη, για ακριβέστερα συμπεράσματα. Ο οργανοληπτικός έλεγχος έγινε εις τριπλούν κάτω υπό τις ίδιες συνθήκες, με τους ίδιους δοκιμαστές, με διαφορετική τριπήφια κωδικοποίηση των δειγμάτων.

Για τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου υπολογίστηκε ο μέσος όρος του κάθε χαρακτηριστικού, αλλά και ο μέσος όρος της συνολικής βαθμολογίας όλων των χαρακτηριστικών για κάθε δείγμα. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο Statistica V. 7.

3.3.1 Τρόπος δοκιμής κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο

Ο τρόπος δοκιμής σε στάδια είναι ο ακόλουθος :

Κάθε δείγμα εισάγεται σε πανομοιότυπα, καθαρά και σε σχήμα τουλίπας, ποτήρια κρασιού. Θα πρέπει να γεμίζει το 1/4 έως το 1/3 του ποτηριού, δηλαδή 8–10 ml. Το δείγμα φέρεται σε μία γωνία 30° έως 45° και παρατηρείται πάνω σε ένα φωτεινό, λευκό φόντο. Αυτό είναι σημαντικό για την ολοκληρωμένη παρατήρηση των σχηματιζόμενων “δακρύων”, της έντασης και της απόχρωσης του εξεταζόμενου οίνου. (OIV 2009).

Ακολουθεί οσφρητική εξέταση επί μακρόν, πριν να γίνει ανάδευση του οίνου.

Και σε μία δεύτερη φάση της οσφρητικής εκτίμησης, να γίνεται και ανάδευση του κρασιού με περιστροφικές κινήσεις, μία διαδικασία μέσω της οποίας επιτρέπει τη μεγέθυνση της επιφάνειας εξάτμισης και συνεπώς τη μεγαλύτερη απελευθέρωση αρώματος. (OIV 2009).

Ακολουθεί εισαγωγή μικρής ποσότητας δείγματος, 6 έως 10 ml, στο στόμα. Το κρασί “μετακινείται” στο στόμα για να καλυφθούν όλες οι επιφάνειες στο στόμα, όπως η γλώσσα, τα μάγουλα και ο ουρανίσκος. Οι διάφορες διαταραχές της γεύσης (γλυκιά,

ξινή, γλυκιά) οι οποίες γίνονται αντιληπτές, σχετίζονται με τη διάρκεια του χρόνου αλλά και το πώς αλλάζουν στην αντίληψη και την ένταση.

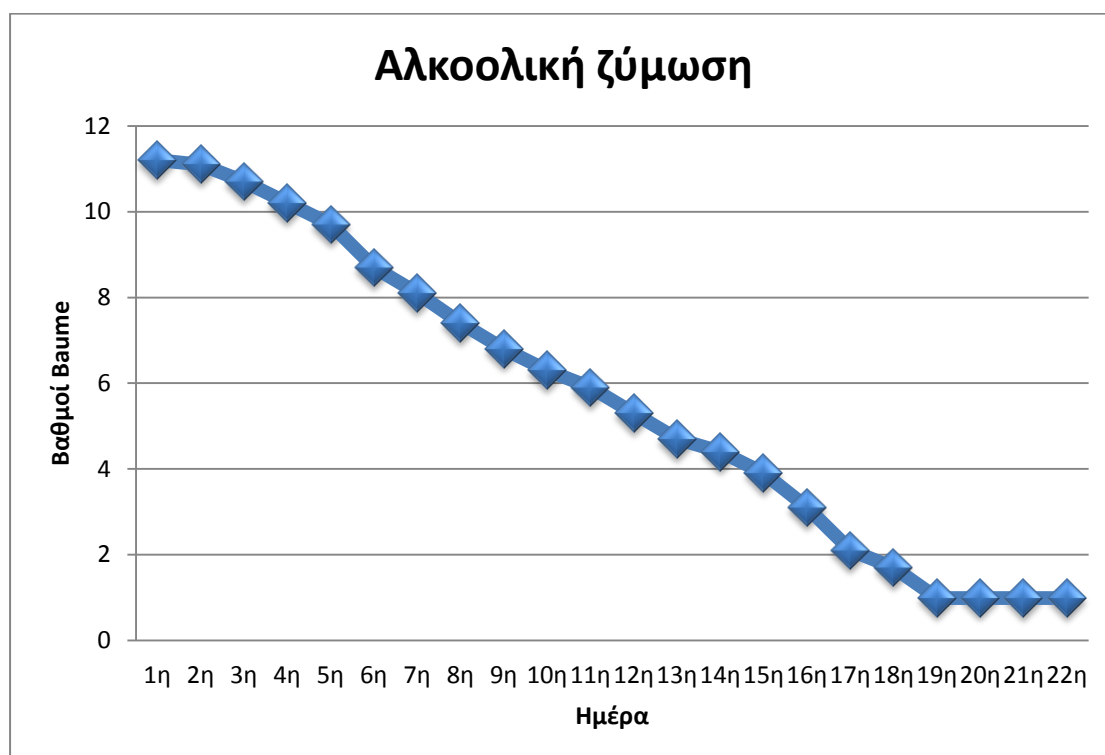
Όσον αφορά την αφή (αίσθηση του στόματος), θα μπορούσαν να διαχωριστούν στη στυπτικότητα, το σώμα, το μούδιασμα, η θερμοκρασία και το κάψιμο. Οπότε το κρασί θα πρέπει να παραμείνει στο στόμα για 15 δευτερόλεπτα. (Ronald S.J., 2002).

Επιπλέον γίνεται αναρρόφηση του κρασιού στο στόμα μαζί με αέρα, για να ενισχυθεί η απελευθέρωση των αρωματικών συστατικών, ενώ κατά την εκπνοή οι αναθυμιάσεις περνούν από τη μύτη. Πρέπει να δοθεί βαρύτητα στη φύση, την ανάπτυξη και τη διάρκεια του αρώματος. Σημειώνεται και καταγράφεται οποιαδήποτε διαφορά κατά την εξέλιξη των αρωμάτων. Τέλος εντοπίζονται οι οσφρητικές και γευστικές αισθήσεις που παραμένουν στο στόμα, ενώ ο δοκιμαστής προβαίνει και σε συνολική αξιολόγηση των ελαττωμάτων, της πολυπλοκότητας, της κομψότητας και της ισορροπίας του οίνου. (Ronald S.J., 2002).

4. Αποτελέσματα

4.1 Πορεία ζύμωσης

Η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους έγινε με τη παρακολούθηση της εξέλιξης της πυκνότητάς του, μετρώντας το ειδικό του βάρος σε θερμοκρασία 20 °C. Η πυκνότητα μετριέται σε gr/ ml. Η τιμή της επηρεάζεται από τη περιεκτικότητα σε αλκοόλη, σάκχαρα, γλυκερόλη και άλλα διαλυτά στερεά. Χρησιμοποιείται και ως ένδειξη, όχι απόδειξη, της ξηρότητας του οίνου. Όπως προαναφέρθηκε, η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε μετά από 22 μέρες. Παρουσιάζεται σχηματικά στο παρακάτω διάγραμμα 4.1.1.



Διάγραμμα 4.1.1 : Γραφική απεικόνιση Αλκοολικής ζύμωσης

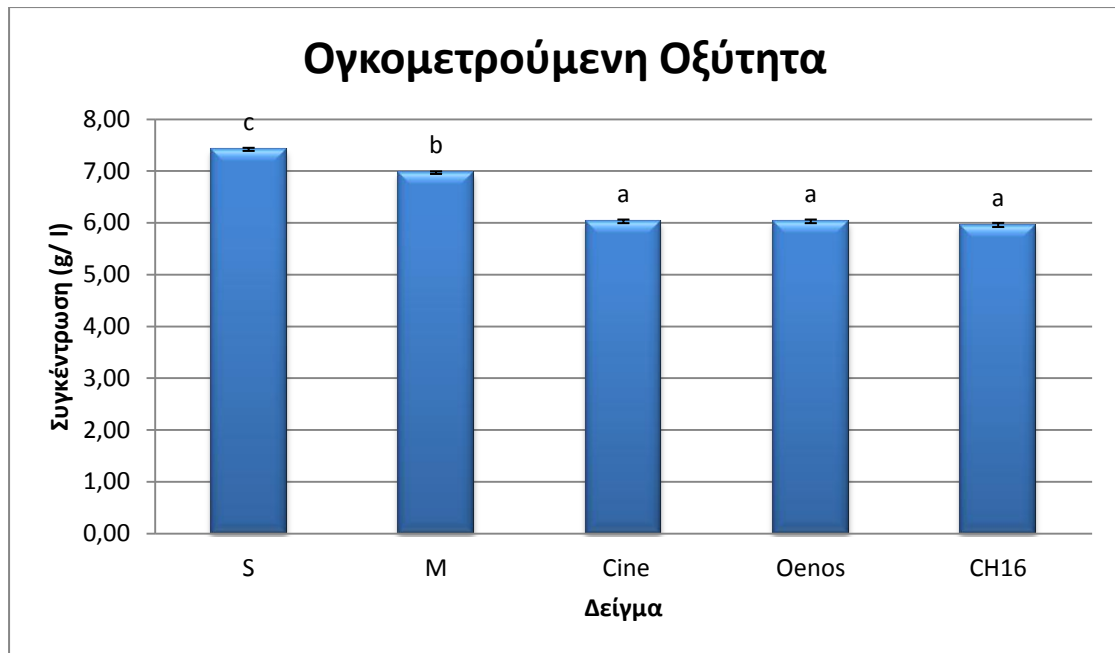
4.2 Βασικές αναλύσεις οίνου

Όπως ήδη έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, στη παρούσα ερευνητική εργασία έλαβαν χώρα όλες οι βασικές οινολογικές αναλύσεις. Τα παρακάτω αποτελέσματα συλλέχθηκαν μετά τη περαιώση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζονται η ολική οξύτητα, η ενεργός οξύτητα (pH), η πτητική οξύτητα, ο αλκοολικός βαθμός και τα ανάγοντα σάκχαρα (Διάγραμμα 4.2.1).

Δείγμα	pH	Ο.Ο.(g/l)	Πτητική Οξύτητα (g/l)	Αλκοολικός Βαθμός (% vol.)	Ανάγοντα Σάκχαρα (g/l)
<i>S</i>	3,26	7,42	0,228	11,36	0,996
<i>M</i>	3,29	6,97	0,303		
<i>Cine</i>	3,35	6,03	0,251		
<i>Oenos</i>	3,36	6,03	0,316		
<i>CH16</i>	3,38	5,96	0,303		

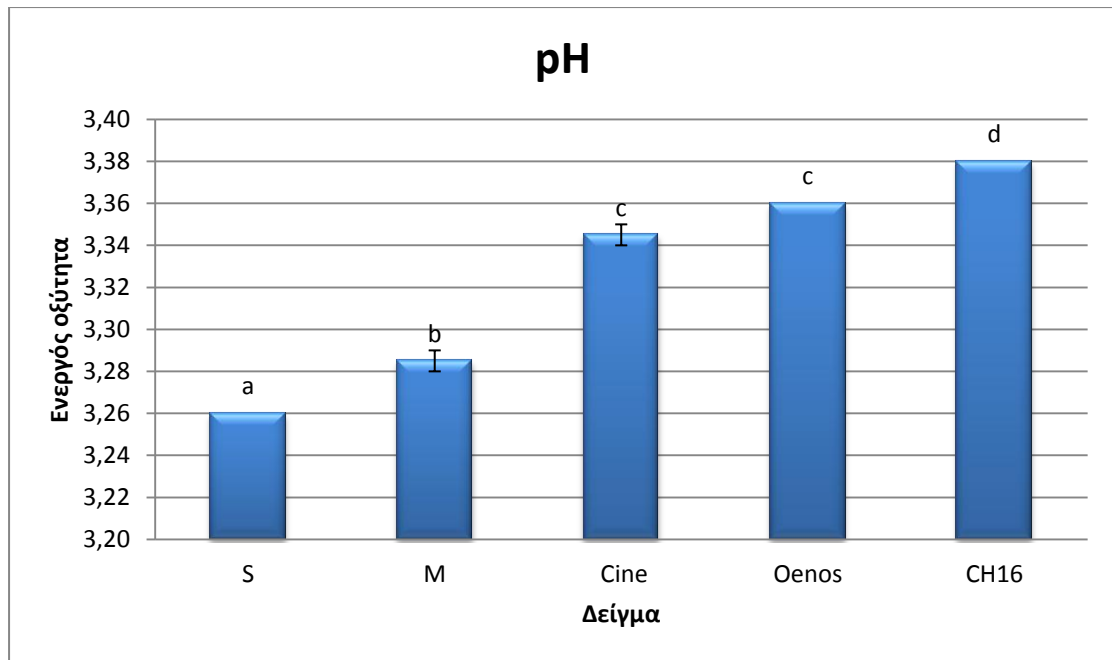
Διάγραμμα 4.2.1 : Πίνακας Βασικών Αναλύσεων του Μοσχοφίλερου

Η ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4.2.2, δείχνει μεγαλύτερη στο δείγμα *S* που έχει αποτραπεί η μηλογαλακτική ζύμωση. Αυτό είναι φυσιολογικό, καθώς κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση το L-μηλικό οξύ μετατρέπεται σε L-γαλακτικό οξύ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αισθητή μείωση της ολικής οξύτητας. (Davis et al., 1985; Lonvaud-Funel, 1999). Δηλαδή, 1 g/l μηλικού οξέος έχει την ικανότητα να μετατρέπεται σε 0,67 g/l γαλακτικού οξέος. Με το μεταβολισμό αυτό, ο οίνος αποκτά μικρότερη ογκομετρούμενη οξύτητα συνολικά. Οι τιμές των δειγμάτων κυμαίνονται από 5,96 έως 7,42 g/l τρυγικού οξέος. Τα δείγματα *Cine*, *Oenos* και *CH16* δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, κάτι που δεν ισχύει με τα άλλα 2 δείγματα, ενώ χαμηλότερη τιμή εμφανίζει το δείγμα *CH16*.



Διάγραμμα 4.2.2 : Ολική οξύτητα μετά τη Μηλογαλακτική ζύμωση εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ (g / l) (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Στο διάγραμμα 4.2.3 παρουσιάζεται το pH – ενεργή οξύτητα των δειγμάτων, μετρημένο στους 20 °C. Όπως γίνεται αντιληπτό, εξίσου το pH των οίνων που ολοκλήρωσαν τη μηλογαλακτική ζύμωση είναι αυξημένο σε σχέση πρωτίστως με το δείγμα S και μετέπειτα το δείγμα M με την αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση. Η ανώτερη τιμή είναι 3,38 στο δείγμα CH16, ενώ η χαμηλότερη 3,26 στο δείγμα S. Στις μετρήσεις των δειγμάτων S, Oenos και CH16 με την επανάληψή τους δεν υπάρχουν διαφορές και για αυτό το λόγο δεν εμφανίζονται οι τυπικές αποκλίσεις τους. Όπως φαίνεται δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους τα δείγματα Cine και Oenos, ενώ διαφέρουν ελάχιστα με το δείγμα CH16 και ακόμα περισσότερο με τα δείγματα S και M.

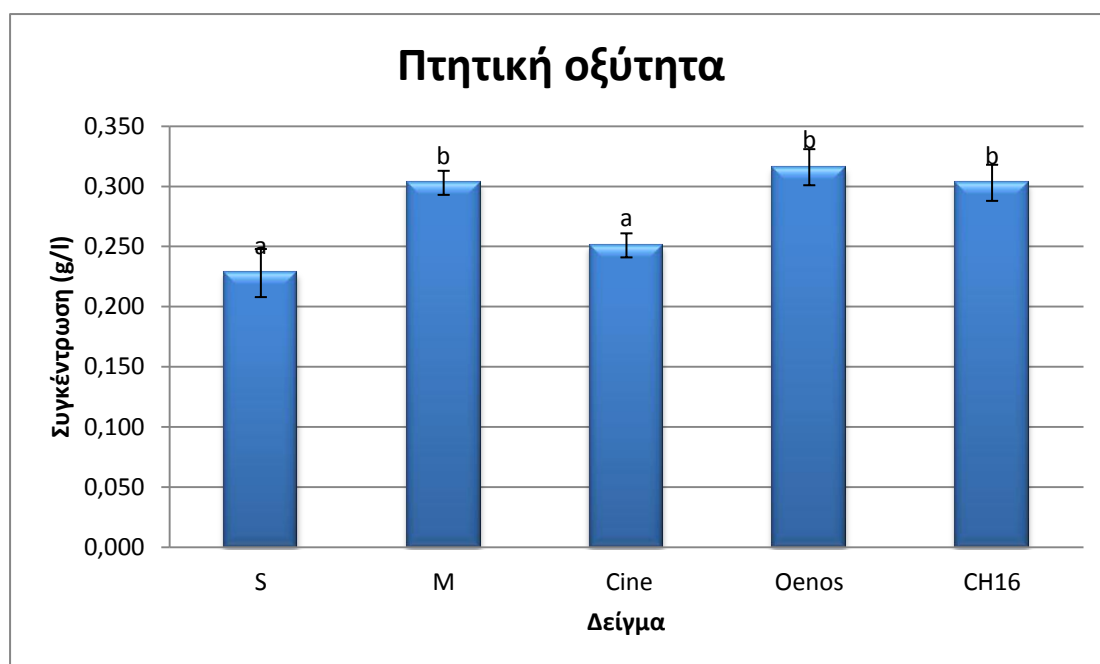


Διάγραμμα 4.2.3 : Η ενεργός οξύτητα μετά τη Μηλογαλακτική ζύμωση (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Όπως έχει σημειωθεί, το οξικό οξύ είναι το πιο σημαντικό πτητικό οξύ που παράγεται κατά την αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση, τόσο ποσοτικά όσο και αισθητικά. Το κατώφλι αντίληψης εξαρτάται από τη ποικιλία και το τύπο του οίνου (Bartowsky & Henschke, 1995; Lonvaud-Funel, 1999; Ugliano & Henschke, 2008). Το οξικό οξύ οδηγεί σε όξινο άρωμα και άρωμα ξυδιού (Francis & Newton, 2005) σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τα 0,7 g /l (Swiegers et al., 2005). Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, από 0,2-0,6 g /l, συμμετέχει στη πολυπλοκότητα του αρώματος στον οίνο. Συνήθως, κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση συμβάλλει σε μία αύξηση της τάξεως από 0,1 έως 0,2 g /l οξικού οξέος (Bartowsky & Henschke, 1995). Γενικότερα, μία σημαντική αύξηση της πτητικής οξύτητας (0,15 - 0,20 gr/ lt σε οξικό οξύ) παράγεται κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση ως αναπόφευκτο αποτέλεσμα του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος από τα μηλογαλακτικά βακτήρια.

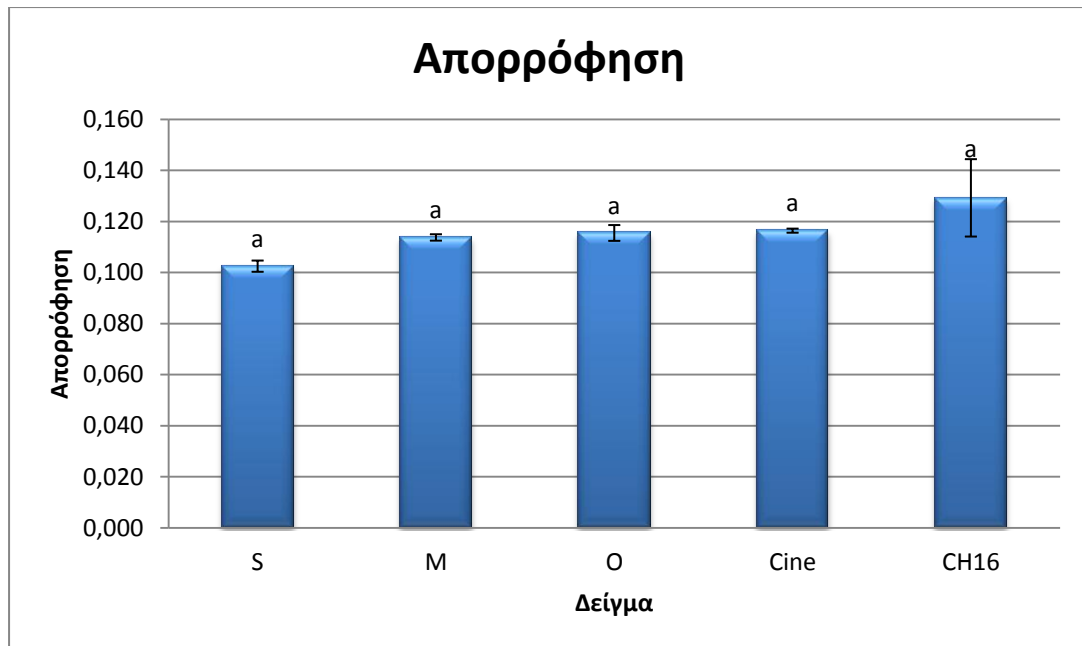
Όπως παρατηρείται, στο διάγραμμα 4.2.4, γενικά σε όλα τα δείγματα παρατηρείται πολύ χαμηλή πτητική οξύτητα. Το δείγμα S έχει τη χαμηλότερη πτητική οξύτητα και ισούται με 0,228 g /l οξικού οξέος, καθώς έχει αποτραπεί η μηλογαλακτική ζύμωση, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα υπάρχει μία μικρή αύξηση από 0,08 έως 0,10 g /l οξικού οξέος, εκτός του δείγματος Cine. Το εμπορικό γαλακτικό βακτήριο Cine, έχει την

ικανότητα να μην αποικοδομεί το κιτρικό οξύ σχεδόν καθόλου, με αποτέλεσμα τη μικρότερη παραγωγή οξικού οξέος. Για τα υπόλοιπα δείγματα αυτό είναι φυσιολογικό, αφού τα γαλακτικά βακτήρια συμβάλλουν σε αυτή τη μικρή αύξηση. Παρ' όλα αυτά, η πτητική οξύτητα είναι χαμηλή σε όλα τα δείγματα, που αποδεικνύει τον σωστό χειρισμό κατά τη διάρκεια του πειράματος, ενώ συμβάλλει στην πολυπλοκότητα του αρώματος.



Διάγραμμα 4.2.4 : Η πτητική οξύτητα μετά τη Μηλογαλακτική ζύμωση (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Στο διάγραμμα 4.2.5 παρουσιάζεται η απορρόφηση των δειγμάτων με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου. Λόγω του λευκού χρώματος του οίνου, δεν ενδιαφέρει να εξεταστεί η ένταση και η απορρόφηση του. Επί της ουσίας, εξετάστηκε η απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 420 nm, το οποίο δείχνει το βαθμό της οξειδωσης των οίνων και εάν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Όσο μεγαλώνει η απορρόφηση, τόσο μεγαλύτερη οξειδωση έχει υποστεί ο οίνος. Όπως παρατηρείται, δεν υπάρχει καμία σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Η μικρότερη απορρόφηση εμφανίστηκε στο δείγμα S με τιμή 0,102, όπως είναι φυσιολογικό, αφού μετά την αλκοολική ζύμωση ο οίνος θειώθηκε και σφραγίστηκε για την αποφυγή παρουσίας οξυγόνου, ενώ η μεγαλύτερη εμφανίστηκε στο δείγμα CH16.



Διάγραμμα 4.2.5 : Η απορρόφηση μετά τη Μηλογαλακτική ζύμωση (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Σύμφωνα με το διάγραμμα 4.2.1, παρατηρείται ότι ο αλκοολικός βαθμός, όπου οι μονάδες μέτρησης της αλκοόλης στους οίνους είναι % vol που υποδηλώνει τα ml άνυδρης καθαρής αλκοόλης που περιέχονται σε 100 ml οίνου (vol/ vol), υπολογίστηκε στα 11,36 % vol. Τέλος, τα ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκαν στα 0,996 g/ l, το οποίο δηλώνει πως επρόκειτο για ξηρό οίνο, καθώς δεν ξεπερνάει τα 2 g/ l ανάγοντα σάκχαρα.

4.3 Αρωματικό προφίλ μέσω GC-FID

Η αναλυτική μέθοδος μέσω GC-FID εφαρμόστηκε στα 5 δείγματα για να καθοριστεί το αρωματικό τους προφίλ, μετά τη περαιώση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν. Αναγνωρίστηκαν 10 πτητικές ενώσεις οι οποίες θα παρουσιαστούν αναλυτικά στο πίνακα 4.3.1. Πιο συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν 6 αιθυλικοί εστέρες ευθείας και διακλαδωμένης αλύσου, 1 οξικός εστέρας, 2 ανώτερες αλκοόλες και 1 τερπενόλη.

Ομάδα Αρωματικών Ουσιών	Αρωματικές Ενώσεις	Όριο ανίχνευσης (μg /l)
Αιθυλικοί εστέρες	Ethyl butyrate (fresh fruits)	20
	Ethyl caproate (fruity, apple peel, pineapple)	14
	Ethyl isobutyrate (pungent, fruity)	15
	Ethyl-2-methyl butyrate (green apple, kiwi, cherry,)	3 – 18
	Ethyl laurate (floral, fruit, leaf)	1500
	Ethyl decanoate (grape,pear)	200
Οξικοί εστέρες	Isoamyl acetate (apple, banana, pear)	30
Ανώτερες αλκοόλες	Isoamyl alcohol (floral, malt)	30000
	Phenethyl alcohol (fruit, rose, honey)	10000
Τερπενόλες	Linalool (citrus, lemon)	7

Πίνακας 4.3.1 : Ομάδες αρωματικών ενώσεων

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να συμβάλλει στο αρωματικό προφίλ του οίνου, όσον αφορά τους εστέρες. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι κατά την ενζυματική δραστηριότητα θα μπορούσε, είτε να συνθέσει, είτε να υδρολύσει εστέρες, ανάλογα βέβαια το βακτηριακό στέλεχος που θα χρησιμοποιηθεί, τη ποικιλία και τις συνθήκες οινοποίησης (Pozo-Bayón et al., 2005).

Παρατηρώντας το διάγραμμα 4.3.1, παρουσιάζονται 6 αιθυλικοί εστέρες που εντοπίστηκαν. Όσον αφορά τους αιθυλικούς εστέρες, ο ethyl laurate βρέθηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τους υπόλοιπους εστέρες, από 0,370 έως

0,393 mg /l, ενώ ο ethyl decanoate είναι αυτός με τη μικρότερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα, της τάξεως από 0,014 έως 0,023 mg /l.

Ο ethyl butyrate διαφέρει στατιστικά σημαντικά μόνο στο δείγμα Cine, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα δεν διαφέρουν. Το δείγμα Cine παρουσίασε τη μεγαλύτερη ποσότητα, συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Σε όλα τα άλλα, η διαφορά είναι μικρή μεταξύ τους. Το ethyl butyrate είναι μία πτητική ένωση που παραπέμπει σε αρώματα φρέσκων φρούτων. Οπότε, είναι λογικό να περιμένουμε θεωρητικά πιο φρουτώδη οίνο με τον εμβολιασμό με το γαλακτικό βακτήριο Cine.

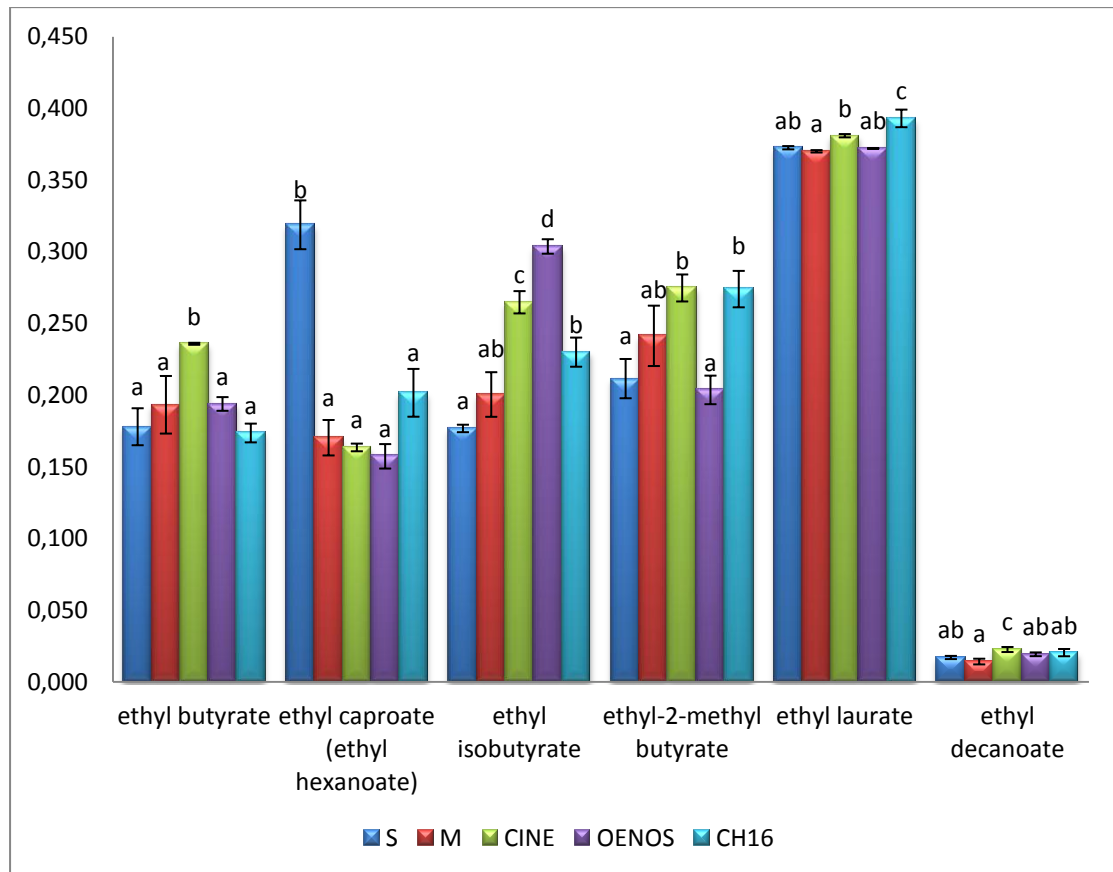
Για τον ethyl caproate, μόνο το δείγμα S παρατηρείται ότι διαφέρει στατιστικά σημαντικά και είναι σχεδόν διπλάσιος ως προς τις συγκεντρώσεις του, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Δηλαδή, στα υπόλοιπα δείγματα που πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση, στη πραγματικότητα ο συγκεκριμένος εστέρας μειώθηκε σημαντικά. Οπότε, όσον αφορά τα φρουτώδη αρώματα όπως γκρέιπφρουτ και ανανά, αναμένεται να είναι λίγο πιο έντονα στο δείγμα S.

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις του ethyl isobutyrate, διαπιστώνεται ότι το δείγμα που εμβολιάστηκε με το εμπορικό παρασκεύασμα Oenos παρουσίασε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις και ακολουθεί το δείγμα Cine, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Βέβαια σε αυτή τη περίπτωση το δείγμα S φαίνεται να διαθέτει τις μικρότερες συγκεντρώσεις ως προς τον ethyl isobutyrate.

Τα δείγματα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ως προς τον ethyl-2-methyl butyrate είναι τα Cine και CH16, τα οποία βεβαίως δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με το δείγμα M, ενώ αντίστοιχα τα δείγματα S και Oenos περιέχουν τη μικρότερη ποσότητα τα οποία εξίσου δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά με το δείγμα M.

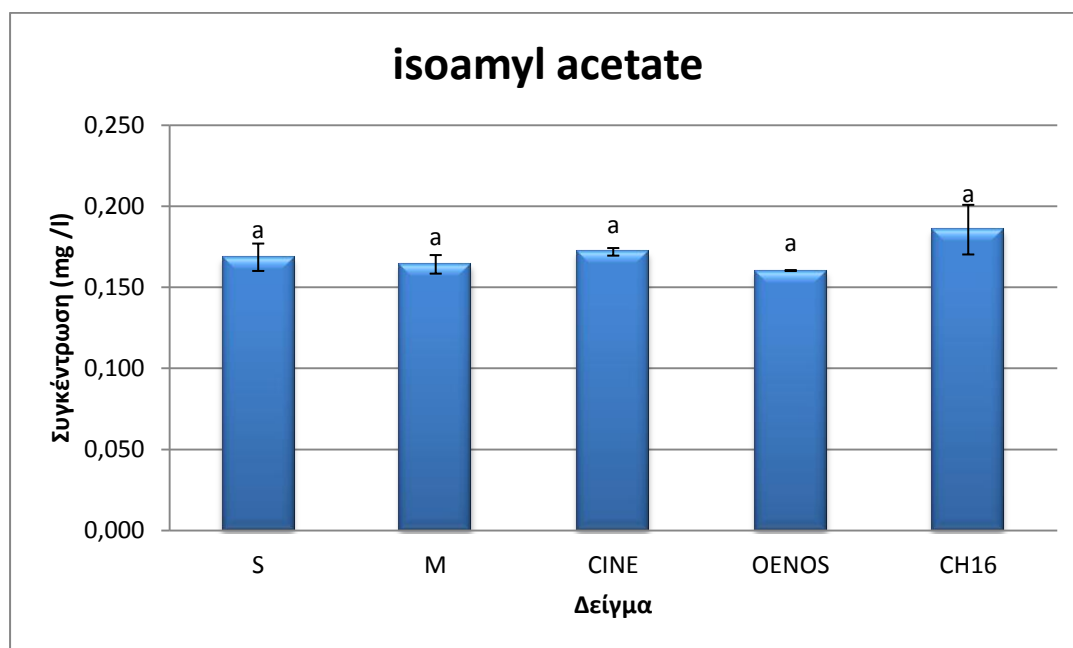
Όπως αναφέρθηκε, ο ethyl laurate, ο οποίος επίσης ευθύνεται για τα αρώματα φρούτων και λουλουδιών, βρέθηκε με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε όλους τους οίνους υπό εξέταση, αλλά πιο συγκεκριμένα το δείγμα με τη μεγαλύτερη ποσότητα, που παρουσιάζει σημαντική στατιστική διαφορά, είναι το CH16 και ακολουθεί το δείγμα Cine. Τα υπόλοιπα δείγματα δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

Το ethyl decanoate, το οποίο βρέθηκε σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τους υπόλοιπους αιθυλικούς εστέρες, παρουσιάζει μεγαλύτερη ποσότητα στο δείγμα Cine, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους, σύμφωνα με το ποσοτικό προσδιορισμό των αιθυλικών εστέρων μέσω της GC-FID.



Διάγραμμα 4.3.1 : Συγκέντρωση εστέρων (mg /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Οι συγκεντρώσεις του οξικού εστέρα isoamyl acetate στο διαγραμμα 4.3.2, δεν παρουσιάζουν καμία σημαντική στατιστική διαφορά σε όλα τα δείγματα. Αυτό δείχνει ότι η μηλογαλακτική ζύμωση δε μετάβαλλε σημαντικά τη συγκέντρωσή του σε κανένα δείγμα. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζει το δείγμα CH16 της τάξεως των 0,186 mg /l, παρ' όλα αυτά η αύξησή του είναι ελάχιστη.



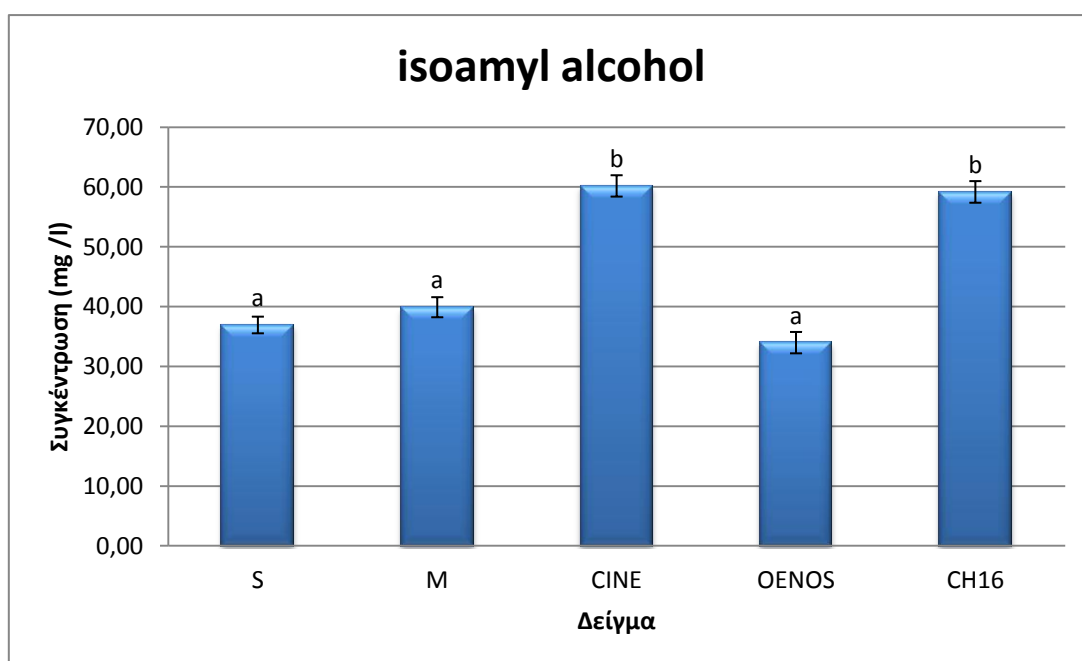
Διάγραμμα 4.3.2 : Η συγκέντρωση της isoamyl acetate (mg /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι συγκεντρώσεις των εστέρων αυξομειώνονται ανάλογα το στέλεχος γαλακτικού βακτηρίου. Γενικότερα έχει αποδειχθεί από διάφορες μελέτες ότι μεγαλύτερη δραστηριότητα ως προς την ποσοτική αύξηση των εστέρων προέρχεται από βακτήρια γαλακτικού οξέος *Oenococcus Oeni*. (De Revel et al., 1999; Delaquis et al., 2000; Liu, 2002; Swiegers et al., 2005; Jeromel et al., 2008).

Σε πολλές μελέτες, οι ανώτερες αλκοόλες απέδειξαν ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στο αρωματικό προφίλ των οίνων. Εξαρτάται βέβαια από τη συγκέντρωσή τους. Για να προσδώσει φρουτώδη χαρακτήρα, πρέπει η ποσότητά τους να μην ξεπερνάει τα 300 mg /l. Επίσης, πολλά αποτελέσματα μελετών, είτε δείχνουν μικρή ασήμαντη αύξηση, είτε καμία αλλαγή, είτε ότι επηρεάζεται από την επιλογή βακτηριακών στελεχών, είτε ότι δεν υπάρχει καμία μεταβολή σε οίνους με υψηλή περιεκτικότητα αλκοόλης, εξαιρουμένου των σημαντικών αυξήσεων στις συγκεντρώσεις των isoamyl alcohol,

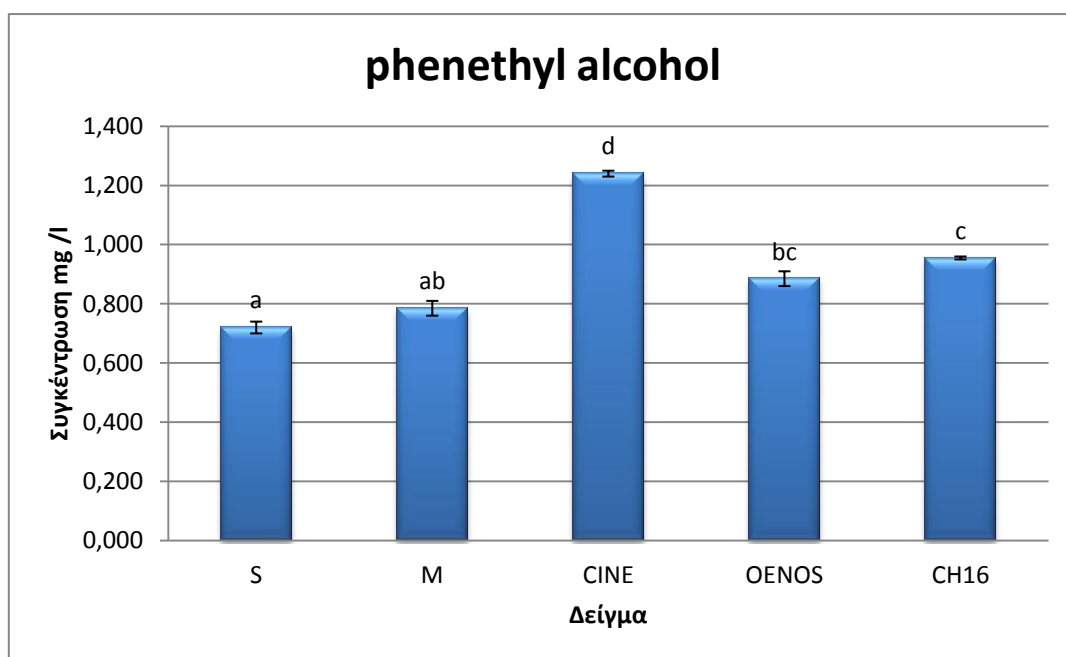
isobutanol και 2-phenylethanol. Άρα, γενικότερα τα συμπεράσματα είναι συγκεχυμένα (de Revel et al., 1999? Jeromel et al., 2008).

Στο διάγραμμα 4.3.3 παρουσιάζεται η συγκέντρωση του isoamyl alcohol. Στα δείγματα Cine και CH16 παρατηρείται σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ποσότητα σχεδόν διπλασιάστηκε, με αποτέλεσμα να προσδώσει στον φρουτώδη χαρακτήρα των δειγμάτων. Τα υπόλοιπα δείγματα δε παρουσιάζουν στατιστική διαφορά μεταξύ τους.



Διάγραμμα 4.3.3 : Η συγκέντρωση της isoamyl alcohol (mg /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

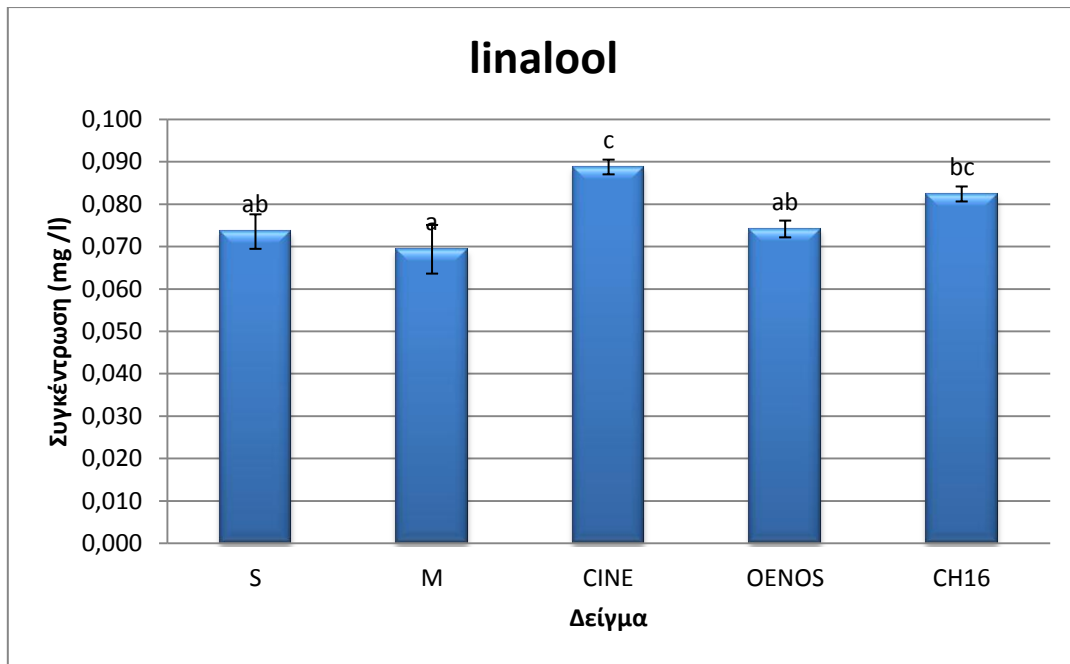
Και στην περίπτωση της phenethyl alcohol, στο διάγραμμα 4.3.4, παρατίθεται η σημαντική αύξηση στη συγκέντρωσή της στο δείγμα Cine, αφού διαφέρει στατιστικά σημαντικά από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Στο Cine η ποσότητα του σχεδόν διπλασιάστηκε σε σύγκριση με το δείγμα S. Και στις υπόλοιπες περιπτώσεις οι συγκεντρώσεις τους αυξήθηκαν, αλλά δεν είναι τόσο σημαντική ώστε να είναι άξιο αναφοράς.



Διάγραμμα 4.3.4 : Η συγκέντρωση της phenethyl alcohol (mg /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Στη μελέτη αυτή παρατηρείται αύξηση στις 2 ανώτερες αλκοόλες που ταυτοποιήθηκαν, συμπέρασμα που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που έχουν ολοκληρωθεί.

Όσον αφορά την τερπενόλη linalool στο διάγραμμα 4.3.5, και σε αυτή τη περίπτωση, έχουμε μία μικρή αύξηση στο δείγμα Cine που δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το δείγμα CH16. Επίσης, το δείγμα CH16 δεν έχει στατιστική διαφορά με τα δείγματα Oenos και S.



Διάγραμμα 4.3.5 : Η συγκέντρωση της linalool (mg /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Τα αποτελέσματά αυτά μπορούν να στηριχθούν και σε παλαιότερες μελέτες που έχουν ολοκληρωθεί. Δηλαδή τα γαλακτικά βακτήρια, κυρίως τα *Oenococcus oeni*, έχουν την ικανότητα να διασπούν τον γλυκοζιτικό δεσμό, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των πτητικών ενώσεων και άρα την ενδυνάμωση του αρώματος. (Grimaldi et al., 2000; Boido et al., 2002; Liu, 2002; Barbagallo et al., 2004; D'Incecco et al., 2004; Matthews et al., 2004).

Τέλος, να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις των περισσότερων ενώσεων, σύμφωνα με την αέρια χρωματογραφία GC-FID, ξεπερνούν το κατώφλι αντίληψης. Δηλαδή, εξαιρουμένων των ethyl decanoate, ethyl laurate και phenethyl alcohol, στις υπόλοιπες πτητικές ενώσεις παρατηρούνται πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το όριο ανίχνευσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ethyl butyrate (αρώματα φρούτων) που σαν κατώφλι αντίληψης έχουν οριστεί τα 20 $\mu\text{g/l}$ και στον οίνο Cine έχει ανιχνευτεί στα 236 $\mu\text{g/l}$. Επίσης, στην isoamyl alcohol (αρώματα ανθέων) το κατώφλι αντίληψης είναι 30000 $\mu\text{g/l}$ και συγκρίνοντας τα δείγματα S και Cine, οι συγκεντρώσεις τους ανιχνεύτηκαν στα 36.950 και 60.200 $\mu\text{g/l}$ αντίστοιχα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενδυνάμωση και τη πολυπλοκότητα του αρωματικού προφίλ κυρίως των οίνων Cine.

4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός αλκοολών και οξέων μέσω HPLC

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται κατά σειρά τα εξής αποτελέσματα :

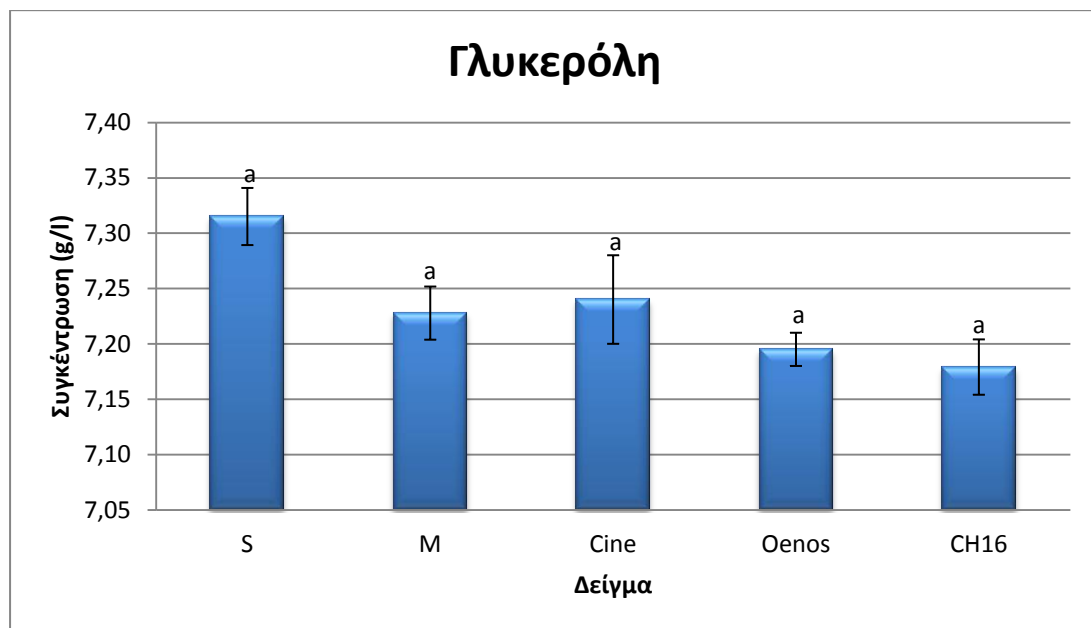
- Αλκοόλες : Αιθανόλη, Γλυκερόλη
- Οξέα : Μηλικό οξύ, Γαλακτικό οξύ, Κιτρικό οξύ

Στο διάγραμμα 4.4.1 καταγράφεται η πορεία της αιθανόλης κατά την αλκοολική ζύμωση. Όπως προαναφέρθηκε, η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε μετά από 22 μέρες. Η παραγόμενη αιθυλική αλκοόλη υπολογίστηκε στα 11,36 % Vol. Μέχρι την 14 ημέρα ζύμωσης, η συγκέντρωσή της αυξάνεται σταδιακά. Την 15 ημέρα και μετά, η αποζύμωση ολοκληρώνεται με πιο αργό ρυθμό, λόγω της παραγόμενης αλκοόλης που δυσκολεύει την επιβίωση των ζυμομυκήτων, καθώς και την συνεχή μείωση θρεπτικών συστατικών (αμμωνιακά, θειαμίνη) που χρησιμοποιούνται κατά τη θρέψη των ζυμομυκήτων.



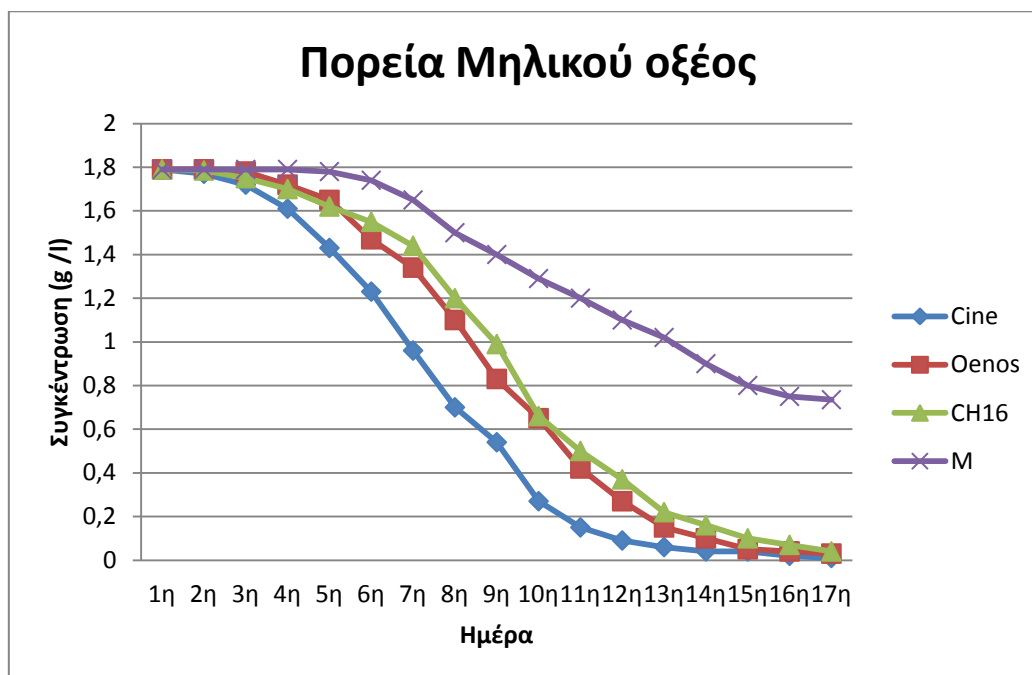
Διάγραμμα 4.4.1 : Η πορεία της αιθανόλης κατά την αλκοολική ζύμωση του Μοσχοφίλερου

Η γλυκερόλη, η οποία είναι η τρίτη κατά σειρά ουσία σε ποσότητα στον οίνο, παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4.4.2. Όπως παρατηρείται, το δείγμα με τη μεγαλύτερη ποσότητα σε γλυκερόλη εμφανίζεται το δείγμα S, ποσότητα ίση με 7,32 g /l, αλλά χωρίς να διαφέρει στατιστικά σημαντικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν περίπου την ίδια ποσότητα γλυκερόλης, αφού δεν έχει μεταβληθεί ιδιαίτερα μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Συνεπώς η μηλογαλακτική ζύμωση δεν έχει επηρεάσει την ουσία αυτή.



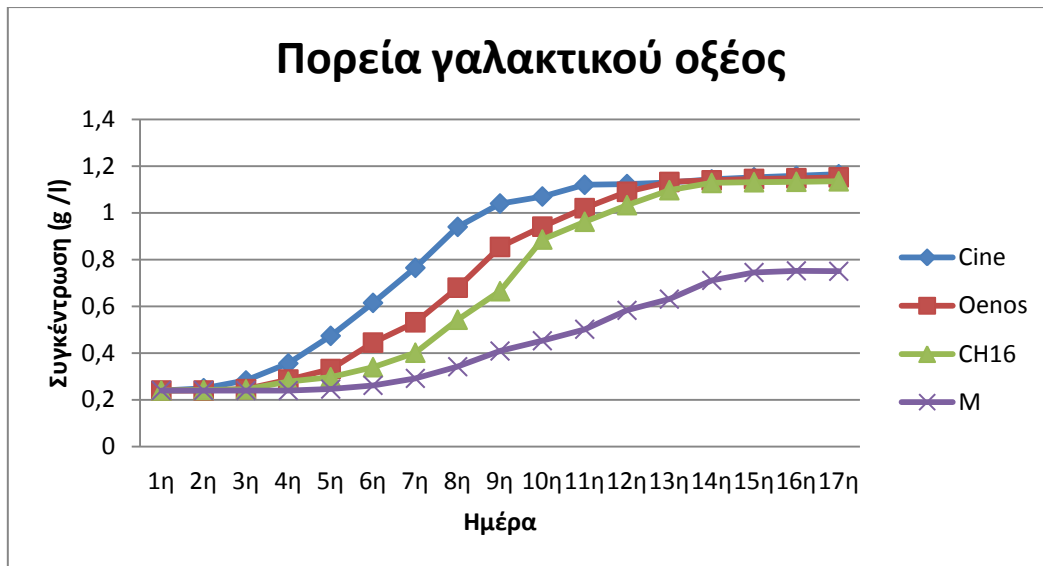
Διάγραμμα 4.4.2 : Η συγκέντρωση της γλυκερόλης (g /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η πορεία του μηλικού οξέος κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Όπως παρατηρείται, το γαλακτικό βακτήριο Cine ξεκίνησε νωρίτερα τη μηλογαλακτική ζύμωση, για την ακρίβεια από τη 2 ημέρα, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Επιπλέον η αποικοδόμησή του πραγματοποιείται με ταχύτερο ρυθμό μέχρι τη 10 ημέρα. Η αυθόρμητη ζύμωση ξεκίνησε περίπου μετά από 5 ημέρες, ενώ δεν κατάφερε να ολοκληρώσει τη διαδικασία μέχρι και την 17 ημέρα.



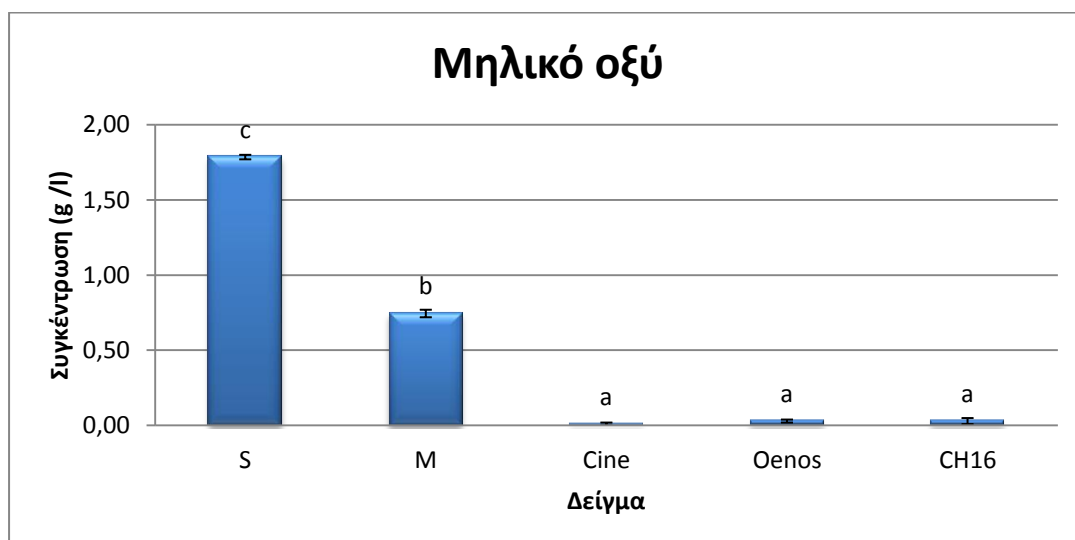
Διάγραμμα 4.4.3 : Η πορεία του μηλικού οξέος (g /l) ανά επέμβαση κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης

Η πορεία του γαλακτικού οξέος, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4.4.4, βρίσκεται σε συνάρτηση με τη πορεία του μηλικού οξέος στους οίνους. Όπως παρατηρείται κατά την αλκοολική ζύμωση έχει παραχθεί μία μικρή ποσότητα γαλακτικού οξέος. Και σε αυτήν τη περίπτωση, όπως είναι λογικό, η παραγωγή γαλακτικού οξέος εμφανίζεται πιο γρήγορα και με ταχύτερο ρυθμό στο γαλακτικό βακτήριο Cine, αν και η τελική του συγκέντρωση είναι σχεδόν ίση με τις άλλες δύο επεμβάσεις Oenos και CH16. Παρόμοια, η πορεία του γαλακτικού οξέος στον οίνο M δείχνει τη δυσκολία έναρξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης και τη μικρότερη παραγωγή του οξέος αυτού.



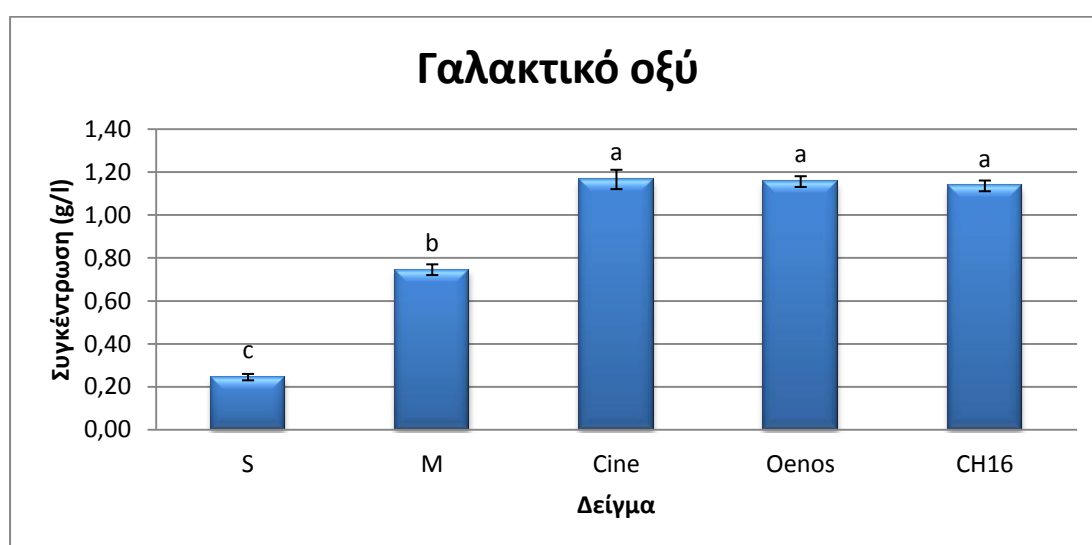
Διάγραμμα 4.4.4 : Η πορεία του γαλακτικού οξέος (g /l) ανά επέμβαση κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης

Η τελική συγκέντρωση του μηλικού οξέος στους τελικούς οίνους παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4.4.5. Στα δείγματα που έχουν ολοκληρώσει τη μηλογαλακτική ζύμωση η ποσότητα του μηλικού οξέος είναι σχεδόν μηδενική. Στο δείγμα M, στο οποίο πραγματοποιήθηκε με γηγενή γαλακτικά βακτήρια δε κατάφερε να μεταβολίσει όλη τη ποσότητα του μηλικού οξέος. Στον οίνο παρέμεινε 0,75 g /l μηλικό οξύ. Τέλος, το δείγμα S όπως είναι λογικό το μηλικό οξύ παρέμεινε στην αρχική του ποσότητα, ίση με 1,79 g/ l. Μόνο τα δείγματα Cine, Oenos και CH16 δεν έχουν στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ τους.



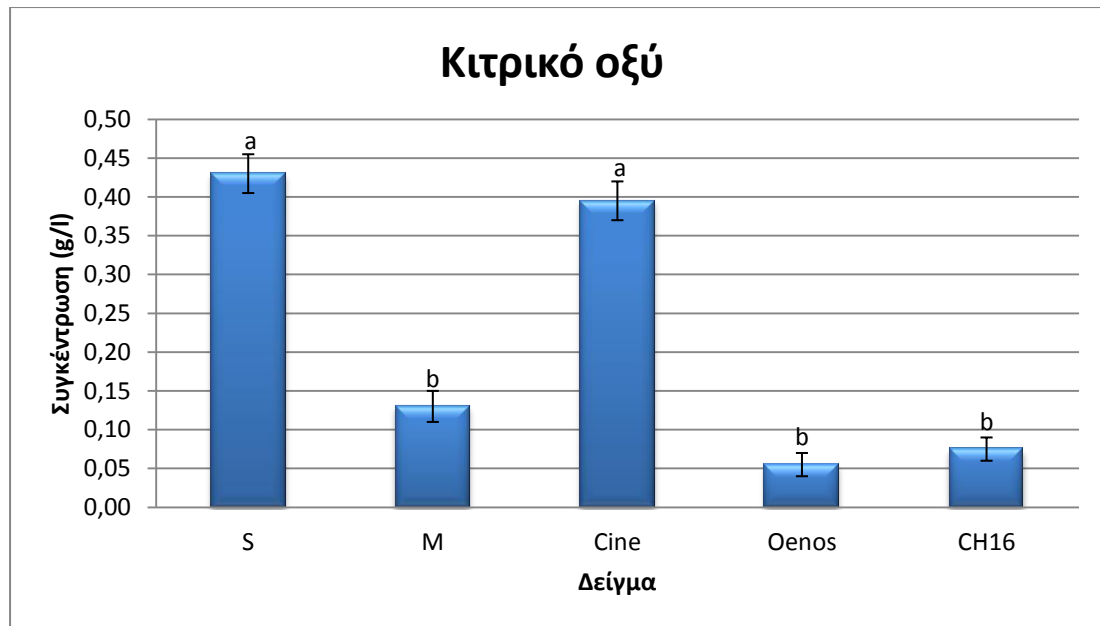
Διάγραμμα 4.4.5 : Η συγκέντρωση του μηλικού οξέος (g /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Στο διάγραμμα 4.4.6 εμφανίζονται οι συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος σε όλα τα δείγματα. Όπως είναι φυσιολογικό οι μεγαλύτερες ποσότητες εμφανίζονται στα δείγματα που έχει ολοκληρωθεί η μηλογαλακτική ζύμωση, Cine, Oenos και CH16, τα οποία δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Οι ποσότητές τους καταγράφηκαν σε 1.17, 1.16 και 1.14 g /l αντίστοιχα. Επιπλέον η μικρότερη συγκέντρωση εμφανίστηκε στο δείγμα S, για την ακρίβεια 0,25 g /l, ενώ στο δείγμα M η ποσότητά του ισούται με 0,75 g /l. Αυτό μας δείχνει τη δυσκολία ολοκλήρωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης από τα γηγενή γαλακτικά βακτήρια που βρέθηκαν στο μοσχοφίλερο.



4.4.6 : Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Τέλος, στο διάγραμμα 4.4.7 συμπεραίνετε ότι το δείγμα S και το δείγμα Cine παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κιτρικού οξέος, ενώ επίσης υπάρχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές με τα υπόλοιπα δείγματα. Για το δείγμα Cine, αυτό εξηγείται αφού αυτό το γαλακτικό βακτήριο δεν έχει την ικανότητα να αποικοδομήσει το κιτρικό οξύ και να μεταβολιστεί κυρίως σε διακετύλιο, καθώς και να αυξήσει τη πτητική οξύτητα με παραγωγή οξικού οξέος. Στο δείγμα S είναι φυσιολογικό να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αφού δεν πραγματοποιείται η δεύτερη ζύμωση.



4.4.7 : Η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος (g/l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

4.5 Οργανοληπτικός έλεγχος

Παρακάτω παρατίθενται όλα τα διαγράμματα, που απεικονίζουν τα χαρακτηριστικά των 5 δειγμάτων που εξετάστηκαν, για την ακρίβεια τα τέσσερα αρώματα (βανίλια, βούτυρο, εσπεριδοειδή, πυρηνόκαρπα), η οξύτητα, η ισορροπία και το σώμα.

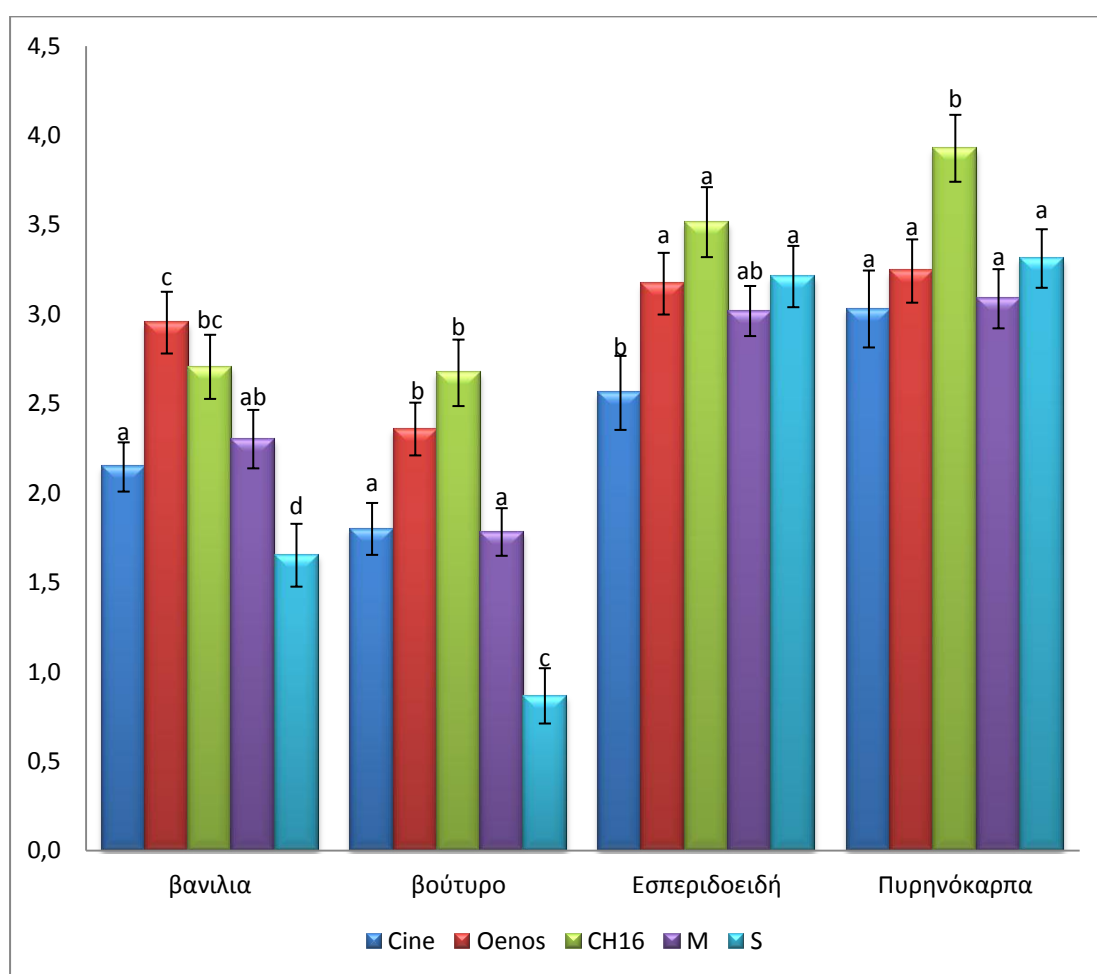
Στο διάγραμμα 4.5.1 παρουσιάζονται όλα τα αρώματα που εξετάστηκαν στα δείγματα. Για το άρωμα βανίλια, τη μεγαλύτερη βαθμολογία συγκεντρώνει το δείγμα Oenos, το οποίο, βέβαια, δε διαφέρει στατιστικά με το δείγμα CH16. Τη χαμηλότερη βαθμολογία συγκέντρωσε το δείγμα S το οποίο έχει στατιστικά σημαντικές διαφορές από τα υπόλοιπα, όπως είναι φυσιολογικό, αφού έχει αποτραπεί η μηλογαλακτική ζύμωση και το άρωμα βανίλια είναι χαρακτηριστικό άρωμα της ζύμωσης αυτής.

Στη συνέχεια, όπου παρουσιάζεται το άρωμα του βούτυρου, παρατηρείται ότι το CH16 έχει τη μεγαλύτερη βαθμολογία, ενώ ακολουθεί το δείγμα Oenos. Όπως και στη προηγούμενη περίπτωση δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά τα δύο δείγματα, ενώ και το δείγμα S έχει τη μικρότερη βαθμολογία που διαφέρει στατιστικά από τα υπόλοιπα για τον ίδιο λόγο ακριβώς.

Όσον αφορά το άρωμα των εσπεριδοειδών, τη μεγαλύτερη βαθμολογία συγκεντρώνει το δείγμα CH16, το οποίο βέβαια δε διαφέρει στατιστικά με όλα τα υπόλοιπα

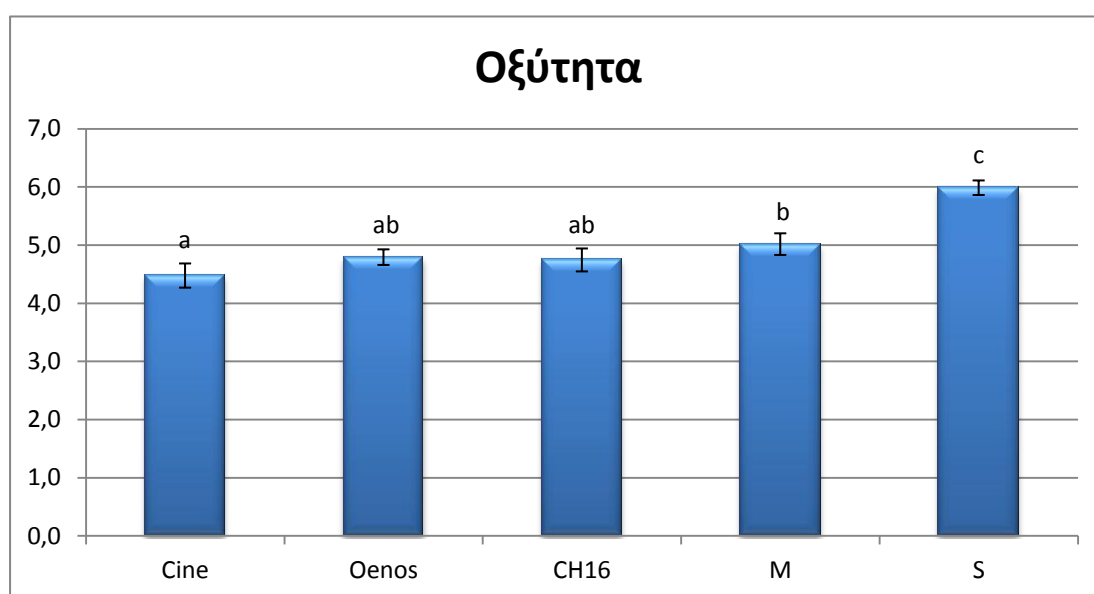
δείγματα εκτός του δείγματος Cine που συγκέντρωσε τη μικρότερη βαθμολογία. Επίσης, το δείγμα Cine δε διαφέρει στατιστικά με το δείγμα M.

Για το άρωμα των πυρηνόκαρπων, και σε αυτή τη περίπτωση, η υψηλότερη βαθμολογία εντοπίστηκε στο δείγμα CH16 το οποίο είναι το μόνο που έχει σημαντική στατιστική διαφορά με τα υπόλοιπα δείγματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα δύο τελευταία αρώματα, δηλαδή τα εσπεριδοειδή και τα πυρηνόκαρπα που χαρακτηρίζουν τη ποικιλία Μοσχοφίλερο, συγκέντρωσαν αρκετά υψηλή βαθμολογία για το δείγμα S, σε σύγκριση με τα δύο πρώτα αρώματα, που είναι χαρακτηριστικά για τη μηλογαλακτική ζύμωση.



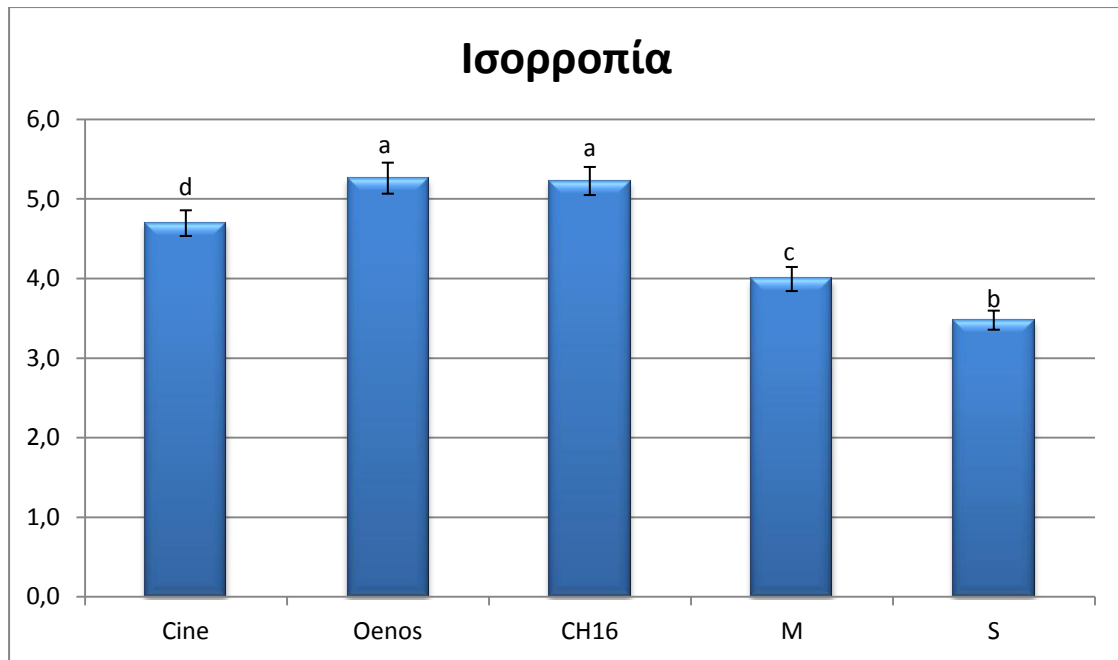
Διάγραμμα 4.5.1 : Η βαθμολογία των αρωμάτων ανά δείγμα επέμβασης (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Στο διάγραμμα 4.5.2 παρουσιάζεται η βαθμολογία της οξύτητας των πέντε δειγμάτων. Παρατηρείται ότι την υψηλότερη βαθμολογία απέκτησε το δείγμα S, ενώ είναι σημαντική η στατιστική διαφορά με τα υπόλοιπα. Αυτό είναι λογικό καθώς με τη μηλογαλακτική ζύμωση, το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό με αποτέλεσμα να ‘μαλακώνει’ ο οίνος και να μειώνεται η οξύτητά του. Το δείγμα Cine παρουσιάζει τη μικρότερη οξύτητα, το οποίο δε διαφέρει στατιστικά με τα δείγματα Oenos και CH16. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων συμπίπτουν με αυτά του πάνελ των γευσιγνωστών.



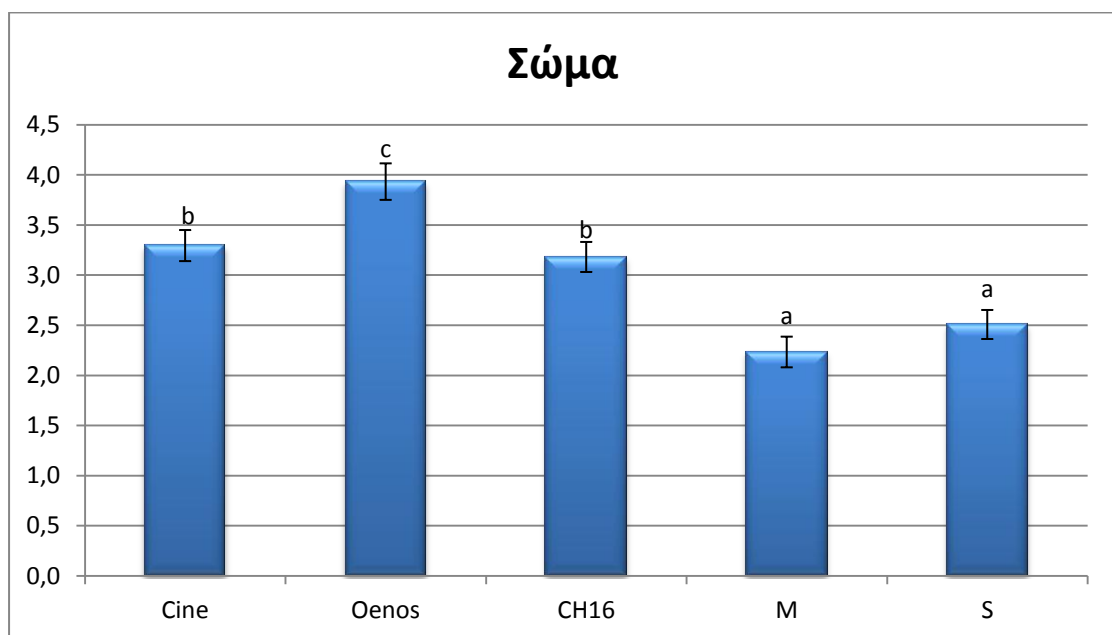
Διάγραμμα 4.5.2 : Η βαθμολογία της οξύτητας ανά δείγμα επέμβασης (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Στο διάγραμμα 4.5.3 παρουσιάζεται η βαθμολογία της ισορροπίας των δειγμάτων. Οι δοκιμαστές αξιολόγησαν τα δείγματα CH16 και Oenos, ως τα καλύτερα όσον αφορά την ισορροπία, τα οποία δε διαφέρουν στατιστικά. Επιπλέον, κατά φθίνουσα βαθμολογία ακολουθούν τα δείγματα Cine, M και S, αφού διαφέρουν στατιστικά όλα μεταξύ τους.



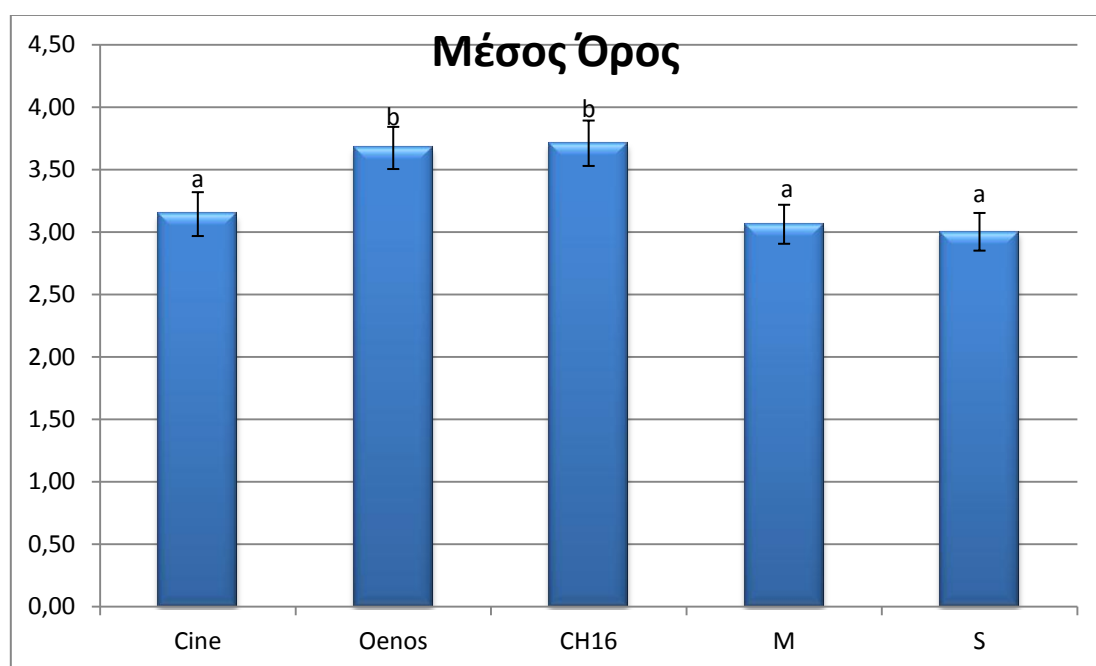
Διάγραμμα 4.5.3 : Η βαθμολογία της οξύτητας ανά δείγμα επέμβασης (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Επίσης, οι δοκιμαστές αξιολόγησαν με τη μεγαλύτερη βαθμολογία ως προς το σώμα, που παρατηρείται στο διάγραμμα 4.5.4, το δείγμα Oenos που ξεχωρίζει στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Ακολουθούν τα δείγματα Cine και CH16 που δεν έχουν στατιστικά διαφορές, ενώ καταλήγοντας το δείγμα M και S παρουσιάζουν τη μικρότερη βαθμολογία.



Διάγραμμα 4.5.4 : Η βαθμολογία του σώματος ανά δείγμα επέμβασης (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

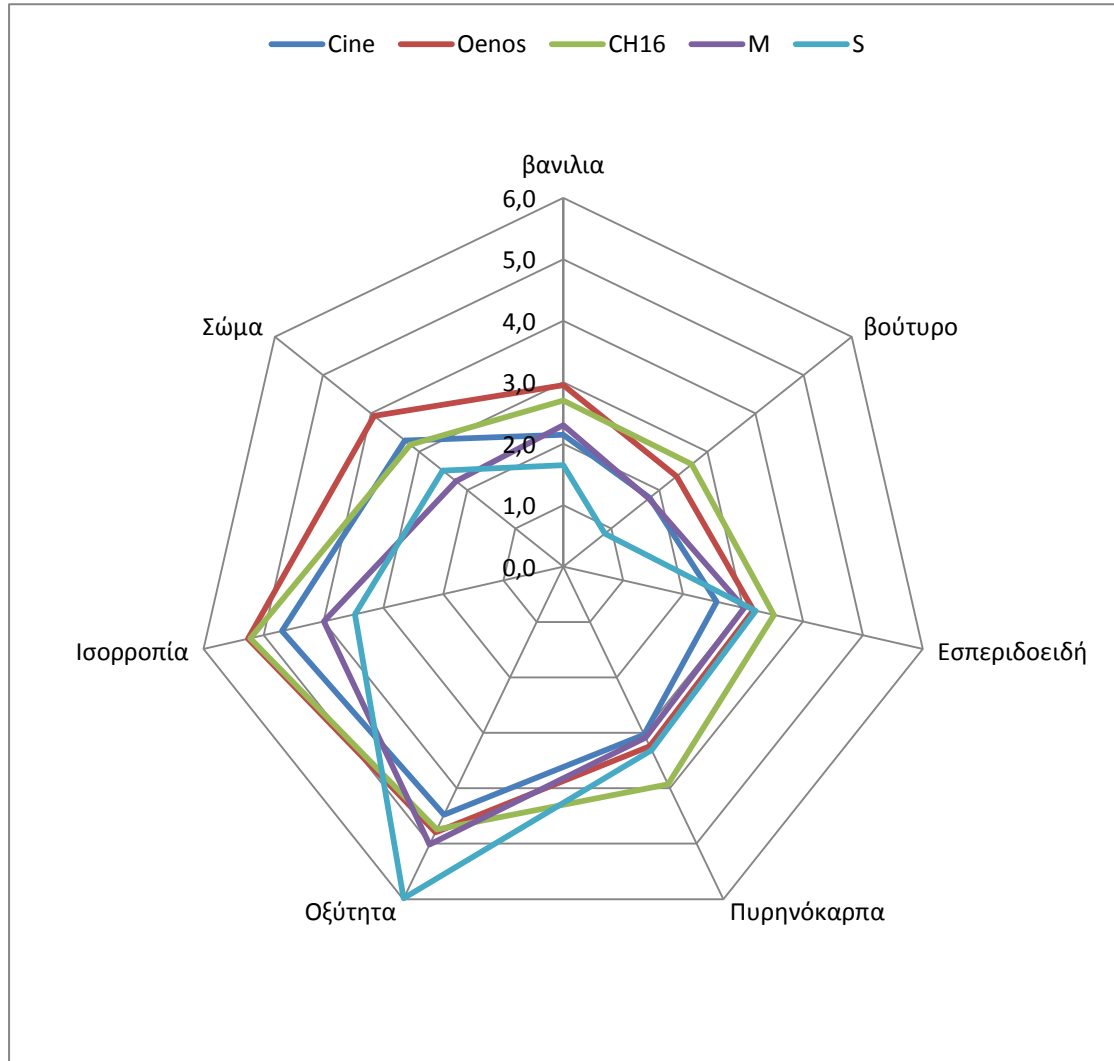
Τέλος, στο διάγραμμα 4.5.5 παρουσιάζεται ο μέσος όρος του οργανοληπτικού ελέγχου, δηλαδή μία συνολική αξιολόγηση όλων των κατηγοριών από το εκπαιδευμένο πάνελ. Για την ακρίβεια, ο υψηλότερος μέσος όρος εμφανίζεται στο δείγμα CH16 με βαθμολογία 3,71, ενώ ακολουθεί με πολύ μικρή διαφορά το δείγμα Oenos που ισούται με 3,67. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα δύο δείγματα, επίσης, δε διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Κατά φθίνουσα βαθμολογία ακολουθούν τα δείγματα Cine, M και S με 3,14, 3,06 και 3,00 αντίστοιχα. Εξίσου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.



Διάγραμμα 4.5.5 : Ο μέσος όρος ανά δείγμα επέμβασης (οι τιμές με διαφορετικά a, b είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Συνοψίζοντας, για καλύτερη κατανόηση των συνολικών αποτελεσμάτων του οργανοληπτικού ελέγχου παρουσιάζεται το παρακάτω γράφημα 4.5.6. Σύμφωνα με αυτό, οι οίνοι παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους σχεδόν σε όλες τις κατηγορίες, ιδιαίτερα στο άρωμα βουτύρου, στην ισορροπία και την οξύτητα. Ο οίνος S παρουσιάζει τη μεγαλύτερη οξύτητα, αφού οι υπόλοιποι οίνοι έχουν μικρή απόκλιση μεταξύ τους. Πιο ισορροπημένοι αξιολογήθηκαν οι οίνοι Oenos και CH16, ενώ ακολουθεί ο οίνος Cine. Ως προς το σώμα ξεχωρίζει ο οίνος Oenos, ενώ ακολουθούν οι δύο οίνοι που έχουν υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση. Τέλος, πιο

αρωματικός οίνος συνολικά, δηλαδή τα αρώματα εσπεριδοειδή, πυρηνόκαρπα και βουτύρου, παρουσιάζεται ο οίνος CH16 σε σύγκριση με τους υπόλοιπους παραχθέντες οίνους.



Γράφημα 4.5.6 : Παρουσίαση οργανοληπτικών αποτελεσμάτων του οίνου

5. Συμπεράσματα

Η μελέτη περιέχει στοιχεία πρωτοτυπίας λόγω του γεγονότος ότι συνήθως δεν εφαρμόζεται η μηλογαλακτική ζύμωση στους οίνους της ποικιλίας Μοσχοφίλερο, Όμως οι οίνοι από τη ποικιλία Μοσχοφίλερο συχνά έχουν υψηλή οξύτητα, χαμηλή αλκοόλη και γενικότερα οι οίνοι από την ποικιλία αυτοί χαρακτηρίζονται ως ελλειμματικοί όσον αφορά το σώμα και την επίγευση. Ο λόγος είναι η ελλιπής ωρίμανση λόγω του γεγονότος ότι η ποικιλία αυτή είναι όψιμη και δεν προλαβαίνει συνήθως να φτάσει στο optimum της ωρίμανσης. Οι συγκεντρώσεις μηλικού οξέος αγγίζουν τα 2-3 g/L πολύ πάνω από τον μέσο όρο των ελληνικών ερυθρών και λευκών οίνων.

Η παρούσα εργασία μελετά την επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης στα χημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, στον παραγόμενο οίνο της ποικιλίας Μοσχοφίλερο που προέκυψε : α) με τον εμβολιασμό με εμπορικά γαλακτικά βακτήρια *Oenococcus Oeni*, β) με αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση από γηγενή βακτήρια, και γ) χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση. Τα γαλακτικά βακτήρια

- 1) Cine
- 2) Oenos
- 3) CH16

προστέθηκαν μετά την αλκοολική ζύμωση την ίδια χρονική στιγμή στα δείγματα στις ελάχιστες προτεινόμενες ποσότητες και υπό τις συνθήκες που προτείνει ο προμηθευτής.

Οι τιμές της **ογκομετρούμενης οξύτητας**, συνεπώς και του pH, μεταβλήθηκαν. Δηλαδή, η ολική οξύτητα, στους οίνους που υπέστησαν μηλογαλακτική ζύμωση, μειώθηκαν περίπου κατά 1,5 g /l σε σύγκριση με τον οίνο που αποτράπηκε. Στην αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση δεν ολοκληρώθηκε ο μεταβολισμός του μηλικού οξέος λόγω του χαμηλού pH, με αποτέλεσμα να υπάρχει μικρότερη μείωση της οξύτητας κατά 0,45 g /l. Επίσης οι τιμές **pH** των οίνων με προσθήκη γαλακτικών βακτηρίων Cine, Oenos και CH16 αυξήθηκαν σε 3.35, 3.36 και 3.38 αντίστοιχα, ενώ η τελική τιμή pH του οίνου S είναι χαμηλότερη σε 3.26.

Η **πτητική οξύτητα** αυξήθηκε κατά 0,088 και 0,075 g /l στα δείγματα Oenos και CH16, αύξηση πολύ μικρή στα επιτρεπτά όρια από τη νομοθεσία του οίνου. Επίσης,

στον οίνο Cine η αύξηση είναι ακόμα μικρότερη, αφού σύμφωνα με τον προμηθευτή, το συγκεκριμένο στέλεχος δεν έχει την ικανότητα να μεταβολίσει το κιτρικό οξύ (όπως αποδείχτηκε και από τα αποτελέσματά μας) και να παραχθεί είτε διακετύλιο, είτε να ακολουθήσει το άλλο μεταβολικό μονοπάτι, δηλαδή να αυξήσει τη συγκέντρωση του οξικού οξέος.

Οι συγκεντρώσεις των αρωματικών ουσιών που προέκυψαν μετά το ποσοτικό προσδιορισμό είναι η γενικότερη αύξηση της συγκέντρωσης στις περισσότερες πτητικές ενώσεις, στο δείγμα Cine και μετέπειτα στο δείγμα CH16, σε σύγκριση με το μάρτυρα S. Πιο συγκεκριμένα για το δείγμα Cine παρατηρήθηκε αύξηση στο ethyl butyrate, στο ethyl-2methyl butyrate, στο ethyl decanoate, στο isoamyl alcohol, στο phenethyl alcohol και στη linalool. Το δείγμα CH16 ακολουθεί με ελάχιστα μικρότερη συγκέντρωση σε αυτές τις ενώσεις. Από την άλλη, στο δείγμα Oenos δεν σημειώθηκε σχεδόν καμία σοβαρή διαφοροποίηση σε σύγκριση με το δείγμα S, με εξαίρεση το ethyl isobutyrate. Και στον οίνο M, που πραγματοποιήθηκε αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση, δεν σημειώθηκε κάποια σημαντική αλλαγή στο αρωματικό δυναμικό του. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι δεν ολοκληρώθηκε η αποικοδόμηση του μηλικού οξέος. Τέλος, όσον αφορά το οίνο μάρτυρα S η μόνη αρωματική ουσία που η συγκέντρωσή της ανιχνεύτηκε διπλάσια, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις, είναι στον ethyl caproate. Βάσει των αποτελεσμάτων και την ποσοτική ανάλυση των συγκεκριμένων συστατικών συμπεραίνεται ότι η ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση με τα γαλακτικά βακτήρια Cine συνέβαλε στον εμπλουτισμό του αρωματικού δυναμικού των οίνων της ποικιλίας Μοσχοφίλερου, ιδιαίτερα με πτητικές ουσίες που προαγάγουν φρουτώδη και αρώματα ανθέων.

Σχετικά με την ποσοτική ανάλυση των οξέων το συμπέρασμα που χρήζει ιδιαίτερη σημασία είναι η ποσότητα του κιτρικού οξέος στα τελικά δείγματα. Δηλαδή, παρατηρήθηκε ότι το κιτρικό οξύ υπέστη σοβαρή μείωση στους οίνους Oenos και CH16, ενώ στον Cine **η μείωσή του είναι ελάχιστη**. Και αυτό το συμπέρασμα είναι λογικό, καθώς ο προμηθευτής του σκευάσματος Cine αναφέρει ότι δεν παράγεται καθόλου διακετύλιο το οποίο προέρχεται από το μεταβολικό μονοπάτι του κιτρικού οξέος. Άρα δεν υπάρχει ούτε σημαντική αύξηση της πτητικής οξύτητας, κάτι το οποίο μπορεί να ήταν δυσάρεστο και αυτός είναι ένας τρόπος αποφυγής της. Στους οίνους που εμβολιάστηκαν με γαλακτικά βακτήρια, παρατηρήθηκε η μηδενική συγκέντρωση μηλικού οξέος, που σημαίνει ότι ολοκληρώθηκε επιτυχώς η μηλογαλακτική ζύμωση.

Στον οίνο M δεν ολοκληρώθηκε η ζύμωση αυτή με τη συγκέντρωση του μηλικού να αγγίζει τα 0,75 g /l.

Βάσει του **οργανοληπτικού ελέγχου**, αυτό που γίνεται εύκολα αντιληπτό είναι ότι με τη μηλογαλακτική ζύμωση στο μοσχοφίλερο βελτιώνονται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του των οίνων της ποικιλίας αυτής. Πιο συγκεκριμένα, ο εμβολιασμός με γαλακτικά βακτήρια CH16 ήταν αυτός που συγκέντρωσε το μεγαλύτερο μέρος συνολικά όλων των οργανοληπτικών κατηγοριών που εξετάστηκαν από το συγκεκριμένο εκπαιδευμένο πάνελ, ενώ ακολουθούν με πολύ μικρή διαφορά το Oenos και το Cine, ενώ το δείγμα S έρχεται τελευταίο.

Πιο συγκεκριμένα στα αρώματα βουτύρου και βανίλιας υψηλότερη βαθμολογία δόθηκε στα δείγμα CH16 και Oenos, καθώς τα συγκεκριμένα αρώματα είναι αποτελέσματα κυρίως της μηλογαλακτικής ζύμωσης, χαρακτηριστικά αρώματα του παραγόμενου διακετυλίου. Επίσης, πιο αρεστό στο πάνελ, ως προς τα εσπεριδοειδή και τα αρώματα πυρηνόκαρπων και τη συνολική ισορροπία του, είναι ο οίνος CH16. Τέλος, το δείγμα Oenos συγκέντρωσε τη μεγαλύτερη βαθμολογία ως προς το σώμα.

Συμπερασματικά η μηλογαλακτική ζύμωση, οδηγεί στην αύξηση του χαρακτηριστικού αρώματος του βουτύρου, στο μείωση χορτώδη χαρακτήρα που υποδηλώνει αγουρίλα, στη βελτίωση του φρουτώδους χαρακτήρα, στη βελτιωμένη αίσθηση και καλύτερη επίγευση του στόματος αλλά επιπλέον και σε καλύτερο σώμα.

Συνεπώς η εφαρμογή της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε οίνους της ποικιλίας Μοσχοφίλερου μπορεί να δώσει διαφορετικό χαρακτήρα από ότι συνηθίζεται να εμφανίζεται στην αγορά. Σύμφωνα δε με τον οργανοληπτικό έλεγχο μπορεί να γίνει εύκολα αρεστός και να βελτιώσει την εμπορευσιμότητα των οίνων της ποικιλίας.

Βιβλιογραφία

- Barbagallo, R.N., Spagna, G., Palmeri, R. & Torriani, S., (2004). Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme Microb. Tech.* 34, 292-296.
- Bartowsky, E.J. & Henschke, P.A., (1995). Malolactic fermentation and wine flavour. *Aust. Grapegrow. Winemak.* 378, 83-94.
- Bartowsky, E.J., Costello, P. & Henschke, P.A., (2002b). Management of malolactic fermentation - wine flavour manipulation. *Aust. N.Z. Grapegrow. Winemak.* 461, 7-8 and 10-12.
- Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., (2004). The 'buttery' attribute of wine-diacetyldesirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 235-252.
- BEELMAN R.B. and J.F. GALLANER. (1970). The effect of grape skin treatments on induced malo-lactic fermentation in Ohio wines. *American Journal of Enology and Viticulture.* 21:193-200.
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Carrau, F. & Dellacassa, E., (2002). Effect of β -glucosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2344- 2349.
- Cofran, L. and J. Mayer (1970). The effect of fumaric acid on malo-lactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 21:189-92.
- De Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A. & Bertrand, A., (1999). Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4003-4008.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. & Fleet, G.M., (1985). Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 290-301.
- D'Incecco, N., Bartowsky, E., Kassara, S., Lante, A., Spettoli, P. & Henschke, P., (2004). Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiol.* 21, 257-265.
- Ebeler, S.E., (2001). Analytical chemistry: unlocking the secrets of wine flavour. *Food Rev. Int.* 17, 45-64.
- Etiévant, P., (1991). Wine. In: Maarse, H. (ed). *Volatile compounds in food and beverages*. Marcel Dekker, New York, pp 483-546.
- Francis, I.L. & Newton, J.L., (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 114-126.

Gámbaro, A., Boido, E., Zlotejablko, A., Medina, K., Lloret, A., Dellacassa, E. & Carrau, F., (2001). Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7, 27-32.

Glorie, Y. (1984). *La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interpretation.* Partie I. *Connaiss. Vigne Vin*, 18, 195-217.

Grimaldi, A., McLean, H. & Jiranek, V., (2000). Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 362-369.

Grimaldi, A., Bartowsky, E. & Jiranek, V., (2005a). Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1061-1069.

Henick-Kling T. (1992). *In Wine Microbiology and Biotechnology* (ed. G.H. Fleet). Hartwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

Herjavec, S., Tupajić, P. & Majdak, A., (2001). Influence of malolactic fermentation on the quality of Riesling wine. *Agric. Conspec. Sci.* 66, 59-64.

<http://www.chr-hansen.com/en>. 2016

Jeromel, A., Herjavec, S., Orlić, S., Redžepović, S. & Wondra, M., (2008). Changes in volatile composition of Kraljevina wines by controlled malolactic fermentation. *J. Cent. Eur. Agric.* 9, 363-372.

Κοτσερίδης Γ., Καλλίθρακα Σ., Προξενιά Ν. (2012). *Εργαστηριακές Ασκήσεις. Οινολογία I & II.* Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Αθήνα.

Kunkee, R.E. (1967) *Malo-lactic fermentation.* *Adv. Appi. Microbiol.*9:235-79.

Kunkee, R.E. (1974) *malo-lactic fermentation and winemaking.* *In:Chemistry of winemaking.* A.D.Webb (Ed.). *Adv. Chem. Ser.* 137, pp 151-70. American Chemical Society, Washington, DC

Lafon-Lafourcade, S. and E.Peynaud, (1974). *Sur l'action antibacterienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée.* *Connaiss. Vigne Vin* 8:187-203.

Lambrechts, M.G. & Pretorius, I.S., (2000). Yeast and its importance to wine aroma - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97-129.

Landaud, S., Helinck, S. & Bonnarme, P., (2008). Formation of volatile sulphur compounds and metabolism of methionine and other sulphur compounds in fermented food. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1191-1205.

Lloret, A., Boido, E., Lorenzo, D., Medina, K., Carrau, F. & Dellacassa, E., (2002). Aroma variation in Tannat wines: Effect of malolactic fermentation on ethyl lactate level and its enantiomeric distribution. *Ital. J. Food. Sci.* 14, 175-180.

Lonvaud-Funel, A. & Joyeux, A., (1994). Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 401-407.

Lonvaud-Funel, A., (1999). *Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine*. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 317-331.

Lonvaud-Funel, A., (2001). *Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria*. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 9-13.

Maicas, S., Gil, J-V., Pardo, I. & Ferrer, S., (1999). *Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria*. *Food Res. Int.* 32, 491.

Malolactic Fermentation: *The ABC's of MLF*, 2010

Matthews, A.H., Grbin, P.R. & Jiranek, V., (2006). A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 235-244.

Nelson, L., 2008. The production of volatile phenols by wine microorganisms. Thesis, Stellenbosch University, Private Bag X1, 7602 Matieland (Stellenbosch), South Africa.

Nielsen, J.C., Prahl, C. & Lonvaud-Funel, A., (1996). Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 42-48.

Nielsen, J.C. & Richelieu, M., (1999). Control of flavour development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 740-745.

Peinado, R.A., Moreno, J., Bueno, J.E., Moreno, J.A. & Mauricio, J.C., (2004). *Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration*. *Food Chem.* 84, 589-590.

Peynaud E., (1981), *Connaissance et Travail du Vin*. Dunod, Paris.

Pozo-Bayón, M.A., Alegría, E.G., Polo, M.C., Tenorio, C., Martín-Álvarez, P.J., Calvo de la Banda, M.T., Ruiz-Larrea, F. & Moreno-Arribas, M.V., (2005). Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8729-8735.

Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Bertrand, A. & Lonvaud-Funel, A., (2004). Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1176-1184.

Ribereau P.-Gayon, Dubourdieu D., Doneche B. and Lonvaud A., (2006), *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition.*, John Wiley & Sons Ltd, Bordeaux, France.

Ronald S.J., (2002), *Wine Tasting: A Professional Handbook*. Elsevier Academic Press

Σουφλερός Ε., (2015), *Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία*, Τρίτη Έκδοση, Θεσσαλονίκη.

Sefton, M.A., Francis, I.L. & Williams, P.J., (1993). The volatile composition of Chardonnay juices: a study by flavor precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 359-370.

Spano, G., Rinaldi, A., Ugliano, L., Moio, L., Beneduce, L. & Massa, S., (2005). A β -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses. *J. Appl. Microbiol.* 98, 855-861.

Σταύρακας Ε.Δ., (2011), *Αμπελογραφία*, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. & Pretorius, I.S., (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139-173.

Ugliano, M., Genovese, A. & Moio, L., (2003). Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5073-5078.

Ugliano, M. & Moio, L., (2005). Changes in the concentration of yeast-derived volatile compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10134- 10139.

Ugliano, M. & Henschke, P.A., (2008). Yeast and wine flavour. In: Moreno-Arribas, M.V. and Polo, C. (eds). *Wine chemistry and biochemistry*. Springer, New York. pp. 328-348.

Vallet, A., Lucas, P., Lonvaud-Funel, A. & De Revel, G., (2008). Pathways that produce volatile sulphur compounds from methionine in *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1833-1840.

Van Vuuren, H.J. & Dicks, L.M.T., (1993). *Leuconostoc oenos*: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 99-112.

www.oiv.int

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H. & Lee, T.H., (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 301-313.