



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ – ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Έρευνα για την επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε ερυθρό
οίνο ποικιλίας Αγιωργίτικο με χρήση γαλακτικών βακτηρίων

ΣΠΥΡΟΣ ΖΑΦΕΙΡΗΣ Θ. ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ

ΑΘΗΝΑ

2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Έρευνα για την επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε ερυθρό οίνο ποικιλίας Αγιωργίτικο με χρήση γαλακτικών βακτηρίων

ΣΠΥΡΟΣ ΖΑΦΕΙΡΗΣ Θ. ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ

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

Τσακαλίδου Έφη, Καθηγήτρια Γαλακτοκομίας, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

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 επίκουρου καθηγητή του τμήματος κύριο Dr Κοτσερίδη Γεώργιο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος για όλη την στήριξη, εμπιστοσύνη, υπομονή που μου έδειξε όσο και για το αμείωτο ενδιαφέρον αλλά και τέλος για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα θέμα ιδιαίτερο για μένα λόγω καταγωγής αλλά και επιστημονικού ενδιαφέροντος.

Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω την επίκουρο καθηγήτρια κυρία Dr Καλλίθρακα Σταματίνα για τις γνώσεις και τις συμβουλές που μου παρείχε ιδιαίτερα σε θέματα χημείας και για το αμέριστο ενδιαφέρον της.

Εν συνεχεία, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κύριο Δροσινό Ελευθέριο για την πολύτιμη βοήθεια του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων του Γ.Π.Α. για την παραχώρηση του αέριου χρωματογράφου (GC-FID) και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απορρόφησης (HPLC).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον MsC Γιάννη Λίγκα της εταιρείας Cadmion - I. Λίγκας & Σια Ο.Ε για την οργανοληπτική ανάλυση της μελέτης που έγινε υπό την εποπτεία του καθώς και για όλη την στήριξη, υπομονή και τις συμβουλές στην μέχρι τώρα οινολογική μου πορεία.

Επίσης ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον αμπελουργό-οινοποιό Ανδρέα Ζάββο και στην οινοποιό Κων/να Ζαφείρη για την αμέριστη στήριξη, υπομονή, εμπιστοσύνη και ενθάρρυνση να ασχοληθώ επαγγελματικά με τον οίνο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στο πρόσωπο της κυρίας Προξενιάς Νίκης και στον MsC Γιάννη Βουκίδη για την συνεχή βοήθεια και συμπαράστασή τους. Ακόμα ευχαριστώ θερμά τον Αχιλλέα Λαμψίδη για τις πολύτιμες συμβουλές και την στήριξη που μου παρέχει.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την οικογένεια μου, και κυρίως τον πατέρα μου Θεμιστοκλή, την μητέρα μου Κατερίνα και τον αδελφό μου Δημήτρη, για την αμέριστη στήριξη, υπομονή και εμπιστοσύνη.

Περίληψη

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης με χρήση διάφορων γαλακτικών βακτηρίων σε ερυθρό οίνο ποικιλίας Αγιωργίτικο. Η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε είτε πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης με την χρήση του γαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus plantarum* είτε μετά την αλκοολική ζύμωση με την χρήση τριών διαφορετικών στελεχών του γαλακτικού βακτηρίου *Oenococcus oeni*, και σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε οίνος στον οποίο δεν έγινε εμβολιασμός γαλακτικού βακτηρίου αλλά η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε αυθόρμητα από γηγενή βακτήρια. Σκοπός της μελέτης ήταν να εντοπιστούν και να εκφραστούν τυχόν διαφορές αναμεσα στους τελικούς οίνους ανάλογα με το γαλακτικό βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε και τον χρόνο περαίωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στις αναλύσεις που αφορούσαν τα φαινολικά συστατικά (τανίνες και ανθοκυάνες) , τα πτητικά συστατικά του αρώματος (εστέρες) και τα οξέα (μηλικό οξύ, γαλακτικό οξύ, κιτρικό οξύ) των τελικών οίνων. Επίσης διενεργήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος από εκπαιδευμένο πάνελ δοκιμαστών που αποσκοπούσε στην αξιολόγηση και σύγκριση των οίνων ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά (γεύση, άρωμα) του εκάστοτε οίνου αλλά και να συνδυαστεί με τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων.

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων προέκυψε ότι αναμφισβήτητα η ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση βελτιώνει και προστατεύει τον οίνο. Επίσης από τον οργανοληπτικό έλεγχο προκύπτει ότι η μηλογαλακτική ζύμωση πριν την αλκοολική οδηγεί σε οίνους πιο αρωματικούς με μικρότερη αίσθηση στυφάδας καθώς και ότι τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν δίνουν πιο ποιοτικούς οίνους σε σχέση με τον μάρτυρα.

Λέξεις – κλειδιά : Αγιωργίτικο , μηλογαλακτική ζύμωση , φαινολικά, εστέρες, οργανοληπτικός έλεγχος, HS-SPME/GC, HPLC

Abstract

The current thesis, elaborates the effect of malolactic fermentation using various lactic acid bacteria in red wine from Agiorgitiko variety. The malolactic fermentation was carried out either before the start of alcoholic fermentation using the lactic bacterium *Lactobacillus plantarum* or after the alcoholic fermentation with the use of three different strains of lactic bacteria *Oenococcus oeni*, as a controller was used wine which was not vaccinated with a lactic bacterium but the malolactic fermentation was carried out spontaneously by indigenous bacteria. The aim of the study was to identify and express any differences between the final wines depending on the lactic bacterium used and the completion time of the malolactic fermentation.

Particular attention was given to analyzes involving the phenolic compounds (tannins and anthocyanins), volatile compounds (esters) and acids (malic acid, lactic acid, citric acid) of the final wine. Also, a sensory analysis by a panel of trained tasters was conducted, aiming to the evaluation and comparison of the wines, regarding the quality characteristics (flavor, aroma) of each wine but also to combine the results of the applied analysis.

The analysis results undoubtedly showed that the controlled malolactic fermentation improves and protects the wine. Also the sensory analysis concludes that the malolactic fermentation before the alcoholic, results in more aromatic wines with less sense of astringency and that the lactic acid bacteria used, give more quality wines compared to the control.

Key words : Agiorgitiko, malolactic fermentation, phenols, esters, sensory analysis, HS-SPME/GC, HPLC

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Abstract	5
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Αγιωργίτικο	8
1.2 Γλεύκος και Οίνος.....	10
1.3 Ερυθρή Οινοποίηση.....	11
1.4 Αλκοολική ζύμωση.....	13
1.5 Μηλογαλακτική ζύμωση	16
1.5.1 Εισαγωγή.....	16
1.5.2 Μεταβολές που επιφέρει η μηλογαλακτική ζύμωση	18
1.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την μηλογαλακτική ζύμωση	22
1.5.4 Ανεπιθύμητες μεταβολές μηλογαλακτικής ζύμωσης.....	23
1.6 Η σύσταση του οίνου	25
1.6.1 Οξέα	26
1.6.2 Πτητικές ενώσεις.....	27
1.6.3 Φαινολική σύσταση	28
1.7 Τα γαλακτικά βακτήρια	30
2. Πειραματική Διαδικασία.....	32
2.1 Σκοπός πειράματος.....	32
2.2 Σχεδιασμός πειράματος.....	33
2.3 Αναλύσεις	35
2.3.1 Έλεγχος ΑΖ και ΜΓΖ	35
2.3.1.1 Μέτρηση διαθλασιμετρίας – Brix.....	35
2.3.1.2 Προσδιορισμός L-μηλικού οξέος	35
2.3.1.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)	35
2.3.1.2.2 Ενζυμική μέθοδος.....	36
2.3.2 Βασικές αναλύσεις	37
2.3.3 Εκτίμηση φαινολικών συστατικών	38
2.3.3.1 Δείκτης Φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ)	38
2.3.4 Εκτίμηση Ανθοκυανών	39
2.3.4.1 Ολικές Ανθοκυάνες.....	39
2.3.5 Εκτίμηση Τανινών	40

2.3.5.1 Ολικές Τανίνες	40
2.3.5.2 Μέτρηση συγκέντρωσης συμπυκνωμένων τανινών σε οίνο...	41
2.3.5.3 Μέθοδος Harbertson – δείκτης στυπτικότητας.....	42
2.3.6 Εκτίμηση αρωματικού χαρακτήρα με χρήση αέριας χρωματογραφίας GC -FID	43
2.3.7 Προσδιορισμός οξέων και αλκοολών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)	45
2.3.8 Οργανοληπτικός έλεγχος.....	47
3. Αποτελέσματα.....	48
3.1 Πορεία Αλκοολικής Ζύμωσης.....	48
3.2 Βασικές αναλύσεις	50
3.3 Ανάγοντα σάκχαρα	50
3.5 Πτητική οξύτητα	51
3.6 Ολική Οξύτητα	52
3.7 Ενεργός Οξύτητα	53
3.8 Ένταση – Απόχρωση	54
3.9 Δείκτης φαινολικών ουσιών	55
3.9 Ολικές Ανθοκυάνες.....	56
3.11 Ολικές τανίνες.....	57
3.12 Τανίνες με την μέθοδο Harbertson (BSA)	58
3.13 Μέθοδος μέτρησης συμπυκνωμένων τανινών	59
3.14 Αρωματικό προφίλ με GC – FID	60
3.15 Μέτρηση οξέων και αλκοολών (γλυκερόλης) με HPLC	65
3.15.1 Πορεία μηλογαλακτικής ζύμωσης.....	65
3.15.2 Πορεία σύνθεσης γαλακτικού οξέος	66
3.15.3 Συγκέντρωση γλυκερόλης στους οίνους	67
3.15.4 Συγκέντρωση κιτρικού οξέος.....	68
3.15.5 Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος.....	69
3.16 Οργανοληπτική ανάλυση.....	70
4. Συμπεράσματα	72
5. Βιβλιογραφία.....	76
5.1 Ελληνική βιβλιογραφία.....	76
5.2 Ξένη Βιβλιογραφία.....	76
6. Ηλεκτρονικές πηγές.....	80

1. Εισαγωγή

1.1 Αγιωργίτικο

Το Αγιωργίτικο είναι μια από τις σημαντικότερες ελληνικές ερυθρές ποικιλίες. Καλλιεργείται στην αμπελουργική περιοχή της Νεμέας σε μια έκταση μεγαλύτερη από 27.000 στρέμματα και υψόμετρο από 200 έως 850 μέτρα. Η ζώνη οριοθετήθηκε το 1971 και εκτός από την πόλη της Νεμέας, περιλαμβάνει ακόμα 16 χωριά: Αηδόνια, Αρχαία Νεμέα, Αρχαίες Κλεωνές, Ασπρόκαμπος, Γαλατάς, Γυμνό, Δάφνη, Καστράκι, Κεφαλάρι, Κούτσι, Λεόντιο, Μποζικάς, Μαλανδρένι, Πετρί και Ψάρι.



Εικόνα 1 : Χάρτης των αμπελουργικής ζώνης Νεμέας

Η Νεμέα κατατάσσεται ως η μεγαλύτερη αμπελουργική ζώνη των Βαλκανίων και συνεπώς η μεγαλύτερη ζώνη Π.Ο.Π. της χώρας. Η ζώνη της Νεμέας χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια εδαφικών και κλιματικών συνθηκών.

Τα τελευταία χρόνια, η ποικιλία καλλιεργείται και εκτός της ζώνης της Νεμέας με εξαιρετικά αποτελέσματα. Συνιστάται για τα αμπελουργικά διαμερίσματα της Πελοποννήσου, της Ν.Α. Αττικής, Πειραιώς, τους νομούς Αιτωλοακαρνανίας, Βοιωτίας και Εύβοιας και επιτρέπεται στους νομούς Δράμας, Πέλλας, Πιερίας. Η ποικιλία είναι μέτρια ζωηρή, εύρωστη, όψιμης ωρίμανσης και παραγωγική. Τα σταφύλια που προκύπτουν είναι μετρίου μεγέθους και πυκνόραγα και ο τρύγος είναι περίπου στο 2ο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου.



Εικόνα 2 : Σταφύλι από την ποικιλία Αγιωργίτικο

Οι νέοι αμπελώνες μορφώνονται σε γραμμικά σχήματα, αμφίπλευρο Royat. Η ποικιλία Αγιωργίτικο καλλιεργείται σε διάφορων ειδών εδάφη μεταξύ αυτών αργιλώδη, αργιλοπηλώδη και σχιστολιθικά.



Εικόνα 3 : Αμφίπλευρο γραμμικό πρέμνο ποικιλίας Αγιωργίτικο

1.2 Γλεύκος και Οίνος

Το γλεύκος της ποικιλίας αυτής έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (220- 240 g/L), χαμηλή οξύτητα (4,4 - 6,4 g/L σε τρυγικό οξύ) και pH 3.4 - 3.8. Επιπλέον θεωρείται από τις πιο πλούσιες ελληνικές ποικιλίες σε ανθοκυάνες και φαινόλες.

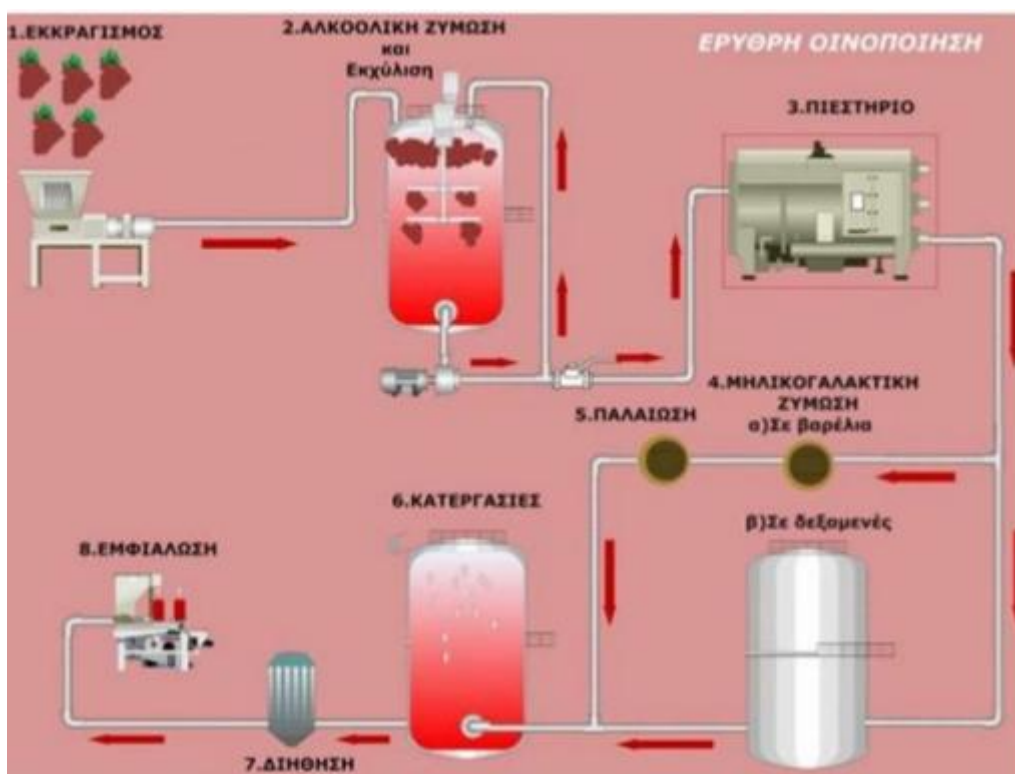
Οι οίνοι που παράγονται από την ποικιλία Αγιωργίτικο χαρακτηρίζονται από πλούσιο, βαθύ χρώμα με ιώδεις αποχρώσεις και παρουσιάζουν ικανότητα παλαίωσης. Το Αγιωργίτικο είναι μια «πολυδυναμική ποικιλία» και αυτό αιτιολογείται στο ότι μπορεί να δημιουργήσει διαφορετικούς τύπους οίνων με έμφαση στην υψηλή ποιότητα. Όπως αναφέρθηκε οι μεγάλες υψομετρικές διαφορές που χαρακτηρίζουν την ζώνη, αλλά και οι διαφορές στο ανάγλυφο και στη σύσταση του εδάφους των αμπελώνων, οδηγούν σε διαφορετική σταφυλική παραγωγή και κατ' επέκταση σε οίνους με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, τα πιο γνωστά στυλ κρασιών από Αγιωργίτικο είναι δύο: τα νεαρά (φρέσκα), ξηρά κόκκινα δεξαμενής και τα κόκκινα που έχουν ωριμάσει σε βαρέλι, τουλάχιστον για ένα έτος (Π.Ο.Π.,RESERVE,GRAND RESERVE). Τα νεαρά κρασιά από Αγιωργίτικο έχουν μετρίως βαθύ κόκκινο χρώμα, έντονα αρώματα φρέσκων κόκκινων φρούτων, μέτρια οξύτητα και μαλακές τανίνες. Τα κρασιά που έχουν ωριμάσει σε βαρέλι έχουν βαθύ χρώμα, ενώ η μύτη τους αποκαλύπτει συμπυκνωμένα και πολυσύνθετα αρώματα κόκκινων φρούτων. Στο

στόμα είναι πλούσια, με ώριμες-στρογγυλές τανίνες . Το Αγιωργίτικο είναι μια ποικιλία που μπορεί να δώσει και άλλους τύπους κρασιών, όπως εξαιρετα ροζέ ή επιδόρπια κρασιά από λιαστά σταφύλια. Συνοψίζοντας το Αγιωργίτικο είναι η ποικιλία του οίνου Π.Ο.Π. Νεμέα, από τη μεγαλύτερη ζώνη ονομασίας προέλευσης κόκκινου κρασιού στην Ελλάδα και παράλληλα, μια ποικιλία κορυφαίας ποιότητας. Τέλος το Αγιωργίτικο μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες ποικιλίες και συναντιέται σε ανάμειξη με Cabernet Sauvignon, Merlot ,Syrah κ.α δίνοντας οίνους ποιότητας.

1.3 Ερυθρή Οινοποίηση

Οινοποίηση θεωρείται η παραγωγή οίνου μέσω διαδικασιών οι οποίες ξεκινούν με την συλλογή των σταφυλιών μέχρι την εμφιάλωση του τελικού οίνου , εννοώντας το προϊόν στο οποίο έχει τελειώσει η μετατροπή σακχάρων προς αλκοόλη. (Τσακίρης,1998)

Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της ερυθρής οινοποίησης είναι ότι η ζύμωση γίνεται παρουσία στέμφυλων τα οποία είναι υπεύθυνα για τα χρωματικά, γευστικά, αρωματικά χαρακτηριστικά του τελικού οίνου.



Εικόνα 4 : Αναπαράσταση κλασικής ερυθρής οινοποίησης

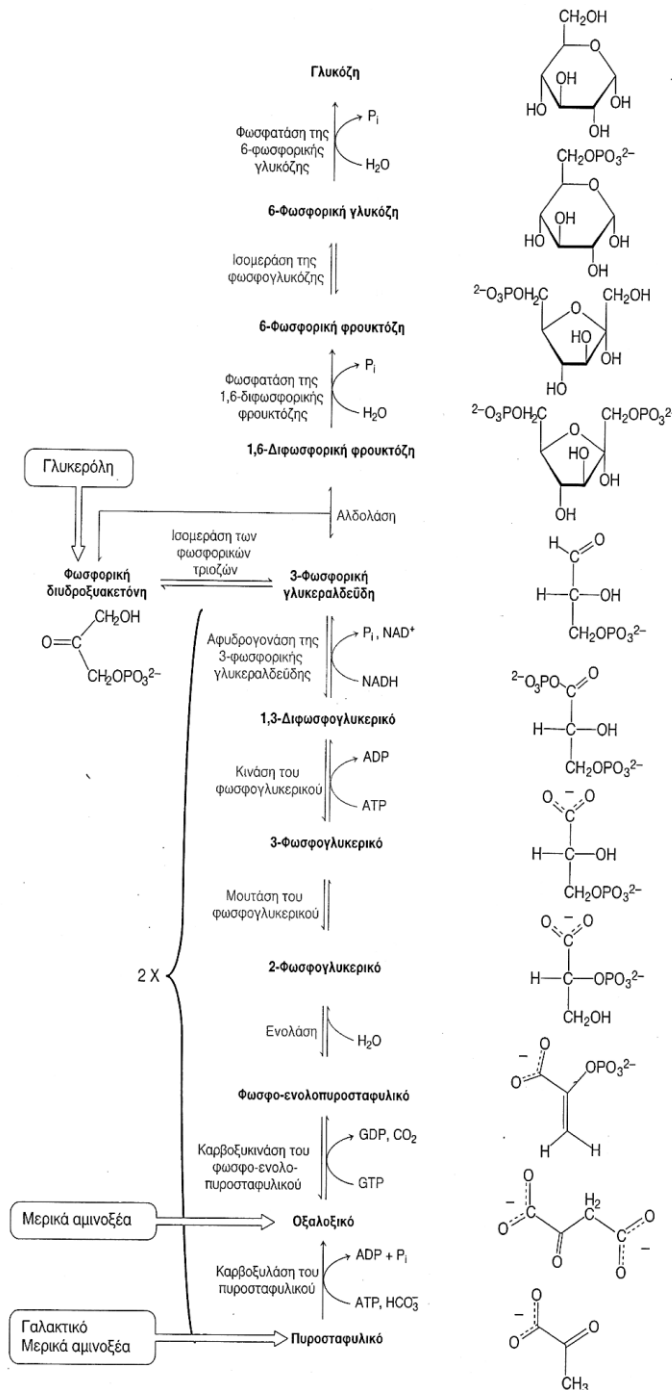
Τα βασικά στάδια στην ερυθρή οινοποίηση είναι :

- ο εκραγισμός δηλαδή η απομάκρυνση των κοτσανιών, που πραγματοποιείται στο εκραγιστήριο
- η έκθλιψη των ραγών στο θλιπτήριο, που συμβάλλει στο σπάσιμό τους και την απελευθέρωση του χυμού (με την κατάλληλη ρύθμιση της ταχύτητας περιστροφής των κυλίνδρων του θλιπτηρίου και της μεταξύ τους απόστασης, αποφεύγεται το σπάσιμο των κουκουτσιών, που θα έδινε πικρή γεύση στο κρασί)
- η σταφυλομάζα που δημιουργείται μεταφέρεται σε δεξαμενές (συνήθως ανοξειδωτες) η ακόμα και σε βαρέλια ώστε να ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση. Κατά την διάρκειά της αλκοολικής ζύμωσης υπάρχει παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂), και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την άνοδο των στέμφυλων στην επιφάνεια των δεξαμενών σχηματίζοντας μια πυκνή μάζα, το «καπέλο». Επόμενος εφόσον οι χρωστικές ουσίες (ανθοκυάνες, τανίνες) στις οποίες οφείλεται το κόκκινο χρώμα του κρασιού και όχι μόνο βρίσκονται τα στέμφυλα είναι αναγκαίο να γίνει σπάσιμο του καπέλου με ανακύκλωση δηλαδή άνοδο χυμού από τον πυθμένα της δεξαμενής στην κορυφή της με βοήθεια αντλίας συνήθως. Η εκχύλιση συνεχίζεται μέχρι ώσπου οι επιθυμητές ουσίες εκχυλιστούν στο κρασί, το οποίο χρωματίζεται και αποκτά την επιθυμητή γεύση, δομή και υφή. Η εκχύλιση διαρκεί από ελάχιστες ημέρες έως και αρκετές εβδομάδες
- μόλις ο χυμός αποκτήσει επιθυμητό χρώμα και γευστικό χαρακτήρα απομακρύνεται από τους φλοιούς και προκειμένου να ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση μεταφέρεται σε άλλον περιέκτη (συνήθως ανοξειδωτη δεξαμενή και άλλοτε βαρέλια)
- μεταφορά στέμφυλων στο πιεστήριο για εξαγωγή του οίνου που περιέχουν και μεταφορά του σε περιέκτη όπου θα ολοκληρώσει την αλκοολική ζύμωση εάν δεν έχει ολοκληρωθεί
- διαύγαση οίνου με στόχο την απαλλαγή από αιωρούμενα σωματίδια κ.α
- εμφιάλωση οίνου (Ronald, 2008)

Τέλος να τονίσω ότι η θερμοκρασία που διεξάγεται η αλκοολική ζύμωση παίζει σημαντικό ρόλο για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού οίνου και οι πιο συνήθεις θερμοκρασίες ζύμωσης είναι μεταξύ 22 °C και 28°C.

1.4 Αλκοολική ζύμωση

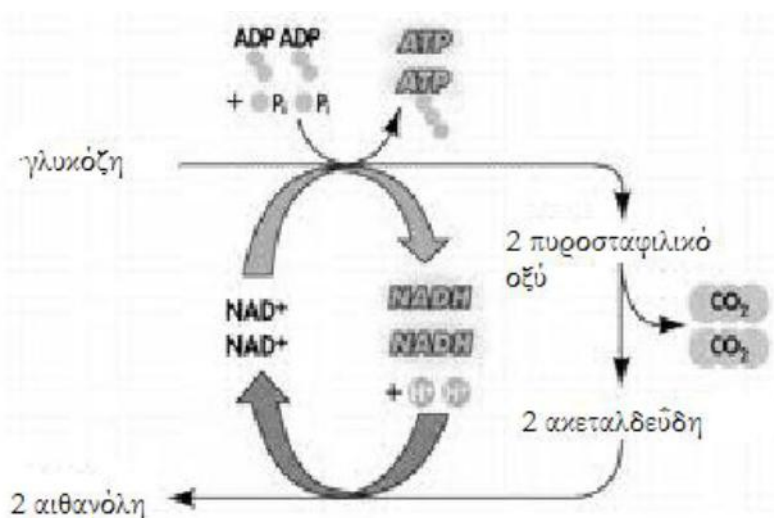
Το 1864 ο Luis Pasteur απέδειξε πειραματικά ότι η αλκοολική ζύμωση είναι αποτέλεσμα της αναερόβιας μεταβολικής δραστηριότητας των ζυμών. Κατά την αλκοολική ζύμωση μετατρέπονται τα σάκχαρα που έχουν την μορφή της γλυκόζης $C_6H_{12}O_6$ από τα ένζυμα των μυκήτων, κατά κύριο λόγο προς αιθανόλη. Οι αντιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα στην αλκοολική ζύμωση είναι:



Σχήμα 1 : Απεικόνιση της μετατροπής της γλυκόζης προς πυροσταφυλικό

Μετέπειτα για την παραγωγή αλκοόλης το πυροσταφυλικό που παράγεται από την πορεία της γλυκόλυσης μετατρέπεται με μια αποκαρβοξυλίωση προς ακεταλδεΐδη και στην συνέχεια αυτή ανάγεται προς αιθανόλη.

Συνοψίζοντας μπορεί να θεωρηθεί ότι η αλκοολική ζύμωση στον οίνο είναι η αναερόβια εξώθερμη αντίδραση μετασχηματισμού των σακχάρων, κυρίως της γλυκόζης και της φρουκτόζης, σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα :

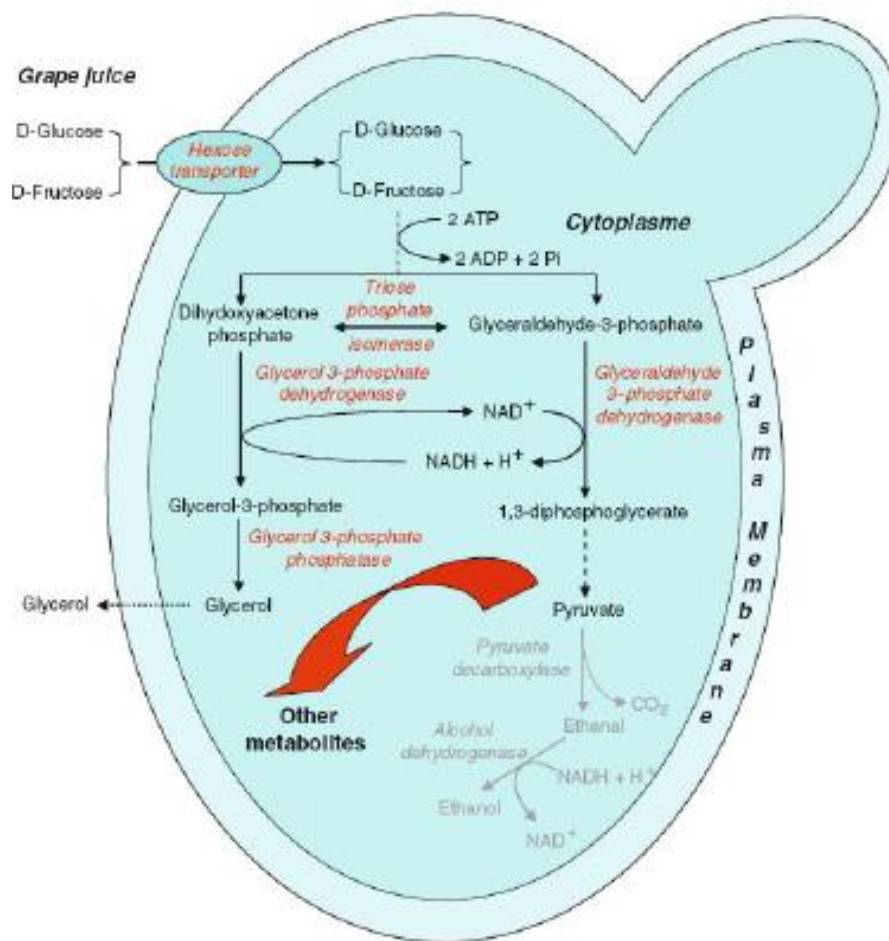


Σχήμα 2 : Απεικόνιση της μετατροπής της γλυκόζης προς αιθανόλη

Παρόλα αυτά, η αλκοολική ζύμωση στο οίνο δεν είναι μια αυστηρή διεργασία με την έννοια ότι κατά την διάρκεια της, ένα πλήθος άλλων βιοχημικών, χημικών και φυσικοχημικών διεργασιών όπως για παράδειγμα ο κύκλος του κιτρικού οξέος πραγματοποιούνται παράλληλα ώστε το γλεύκος να μετατραπεί τελικά σε οίνο. Εκτός της αιθανόλης, πολλές άλλες ενώσεις παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση όπως ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, γλυκερόλη, διακετύλιο, ακετοΐνη και 2,3-βουτανεδιόλη. Ταυτόχρονα, και ορισμένα άλλα συστατικά του γλεύκους, εκτός των σακχάρων, μετασχηματίζονται από το μεταβολισμό των ζυμών. Μάλιστα χωρίς την παρουσία αυτών των παραπροϊόντων, το τελικό προϊόν θα είχε πολύ περιορισμένο οργανοληπτικό ενδιαφέρον (Zamora, 2009).

Ίσως το πιο σημαντικό δευτερεύον προϊόν της ζύμωσης είναι η γλυκερόλη που παράγεται μέσω της μεταβολικής διαδικασίας της πυροσταφυλικής ζύμωσης. Το κρασί περιέχει περίπου 6 έως 10 g γλυκερόλης ανά 100 g αιθανόλης. Το μεγαλύτερο

ποσοστό της γλυκερόλης παράγεται κατά το πρώτο στάδιο της ζύμωσης και σε χαμηλή θερμοκρασία και στη συνέχεια ο ρυθμός της μειώνεται ανάλογα το στέλεχος της ζύμης που υπερισχύει, χωρίς όμως ποτέ να μηδενιστεί. Η γλυκερόλη οργανοληπτικά είναι κατά έναν βαθμό υπεύθυνη για την γλυκά γεύση που μπορεί να υπάρχει στον οίνο και μέχρι ένα όριο μπορεί να βελτιώσει το τελικό προϊόν. (Ribéreau-Gayon et al., 2006)



Σχήμα 3 : Σχηματισμός γλυκερόλης κατά την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης

1.5 Μηλογαλακτική ζύμωση

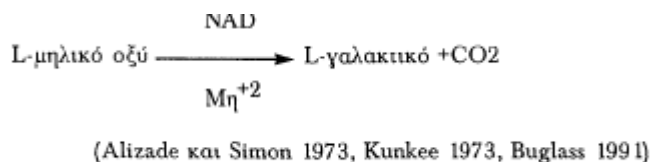
1.5.1 Εισαγωγή

Σύμφωνα με τον Kunkee (1967), η μηλογαλακτική ζύμωση (Malo-Lactic Fermentation, (MLF)) παρατηρήθηκε για πρώτη φορά, από τους Berthelot και Fleurieu το 1864 και ορίσθηκε σαν μια διεργασία κατά την οποία παρατηρείται μείωση της οξύτητας του οίνου. Μετέπειτα έρευνες που πραγματοποιήθηκαν απέδειξαν ότι η μηλογαλακτική ζύμωση προέρχεται από την δράση γαλακτικών βακτηρίων και ειδικότερα από τα γένη *Oenococcus*, *Lactobacillus* και *Pediococcus*. (E. Lerm et al., 2010)

Ουσιαστικά η μηλογαλακτική ζύμωση στο κρασί είναι μια ενζυμική βιομετατροπή του L-μηλικού οξέος προς L-γαλακτικού οξέος με απελευθέρωση CO₂. Θεωρείται ότι είναι μια δευτερεύουσα ζύμωση που συνήθως ακολουθεί την αλκοολική ζύμωση, σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να συμβαίνουν παράλληλα (προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης μπορεί να αρχίσει η MLF). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι τα τελευταία χρόνια στην Γαλλία και στην Αυστραλία κάποιοι οινολόγοι προτιμούν να την πραγματοποιούν πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης ούτως ώστε να εκμεταλλευθούν όλη την ποσότητα του μηλικού για την αποφυγή του να μεταβολιστεί μια μικρή ποσότητα αυτού κατά την αρχή της ζύμωσης καθώς επίσης και την πιο γρήγορη ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. (Kunkee ,1991)(Abrahamse et al., 2011). Επομένως ένας από τους λόγους που διενεργείται η μηλογαλακτική ζύμωση και θεωρείται ως δεύτερη ζύμωση είναι ότι συμβάλει στην ωριμότητα των ερυθρών οίνων και επίσης δρα ευεργετικά για λευκούς οίνους που έχουν υψηλή οξύτητα καθώς και σε αφρώδεις οίνους. Ειδικότερα η ΜΓΖ εφαρμόζεται κυρίως για τρεις λόγους οι οποίοι είναι :

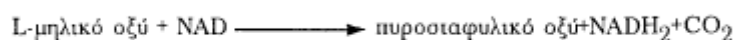
- I. η μείωση της οξύτητας του οίνου, όπου έχει σαν συνακόλουθο την αύξηση του pH
- II. συμβάλλει στη μικροβιακή σταθερότητα με την αποχώρηση του μηλικού οξέος ως ένα πιθανό υπόστρωμα άνθρακα
- III. η τροποποίηση του αρωματικού προφίλ του οίνου. (Ugliano et al., 2003), (Lerm et al. 2010)

Η μετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ δεν είναι πραγματική ζύμωση αλλά μια ενζυμική αντίδραση που πραγματοποιείται από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, όταν έχει ολοκληρωθεί η εκθετική φάση ανάπτυξής τους, για αυτόν τον λόγο σε πολλά ερευνητικά άρθρα αναφέρεται και ως βιομετατροπή αντί για ζύμωση. (Constantini et al., 2009)



Σχήμα: 4α : Απεικόνιση της μετατροπής του L-μηλικού οξέος προς L-γαλακτικού οξέος

Παράλληλα μαζί με την κύρια ενζυμική αντίδραση που προκαλούν τα γαλακτικά βακτήρια έχει παρατηρηθεί και μικρή συγκέντρωση πυροσταφυλικού η οποία στην συνέχεια αποικοδομείται από το ένζυμο γαλακτική αφυδρογονάση για την σύνθεση L-γαλακτικού οξέος.. (Morenzonei, 1974)



Σχήμα 4β : Απεικόνιση της μετατροπής του L-μηλικού οξέος προς πυροσταφυλικό οξύ

Τέλος μια ακόμη πιθανή μεταβολική οδός του L-μηλικού οξέος είναι ο σχηματισμός οξαλοξικού από την μηλική αφυδρογονάση ακολουθούμενο από την αποκαρβοξυλίωση του πυρουβικού οξέος και την μείωση του γαλακτικού οξέος. (Lonvaud-Funel, 1999)

Η συγκέντρωση του μηλικού οξέος στον οίνο κυμαίνεται κυρίως μεταξύ 1 - 4 g/l ανάλογα την ποικιλία, τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής καθώς και την τεχνολογική ωρίμανση της σταφυλής (Handbook of enology volume 1, 2006). Τις περισσότερες φορές η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιείται κυρίως από το γαλακτικό βακτήριο *Oenococcus oeni* το οποίο είναι ανθεκτικό στο χαμηλό pH (<3,5), στην υψηλή αλκοόλη (>10 vol. %) καθώς και στα υψηλά επίπεδα διοξειδίου του θείου (50 mg/L), συνθήκες που υπάρχουν στο κρασί. Επίσης τα πιο ανθεκτικά στελέχη του *Lactobacillus*, και του *Pediococcus* μπορούν να αναπτυχθούν στο κρασί και να πραγματοποιήσουν αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση. Βέβαια η δράση τους εξαρτάται άμεσα από το pH του κρασιού και όταν αυτό υπερβαίνει την τιμή του 3,5

δρουν πιο ευνοϊκά.(Davis et al., 1986). Όμως η αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη για την ασφάλεια και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Αυτό αιτιολογείται στο ότι δεν γνωρίζουμε ποιο γαλακτικό βακτήριο και ποιο στέλεχος του θα υπερισχύσει με αποτέλεσμα να είναι πιθανή η αποικοδόμηση και άλλων συστατικών του οίνου που θα οδηγήσει σε υποβάθμιση του τελικού προϊόντος. Για παράδειγμα κατά την ΜΓΖ η αποικοδόμηση των σακχάρων μπορεί να επιτελέσει μεγάλη αύξηση της πτητικής οξύτητας (Κοτσερίδης, 2015). Επίσης μπορούν δημιουργηθούν πτητικές ενώσεις όπως οι αιθύλ και βινύλ φαινόλες οι οποίες θεωρούνται ελλαπτωματικές οσμές για τον οίνο.

Για αυτό η εισαγωγή των εμπορικών βακτηρίων για άμεσο εμβολιασμό 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 του αρώματος και μειώνει το κίνδυνο στη παραγωγή βιογενών αμινών που μπορεί να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία. (Lonvaud-Funel, 2001)

Γενικότερα, η μηλογαλακτική ζύμωση χρήζει μεγάλης προσοχής για να υπάρξει χημικά και οργανοληπτικά το κατάλληλο αποτέλεσμα. Σε ένα οινοποιείο πολύ σημαντικό είναι να αποφευχθεί η υπερβολική μόλυνση από αλλοιογόνα βακτήρια όσο αυτό είναι εφικτό. Για να επιτευχθεί αυτό η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι η χρήση της θερμότητας για παράδειγμα η αποστείρωση των γυάλινων μπουκαλιών κατά την εμφιάλωση ή των δεξαμενών πριν την πλήρωση τους. Από τις χημικές μεθόδους, η πιο αποτελεσματική είναι η επαρκής θείωση, καθώς έχει αντιβακτηριακή δράση και η προσθήκη λυσοζύμης η οποία αναστέλλει τελείως τα γαλακτικά βακτήρια. Επιπλέον, ως αναστολείς των γαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιούνται το φουμαρικό οξύ και η νισίνη. Σε κάθε περίπτωση, η υψηλή αντοχή ορισμένων γαλακτικών στελεχών στον οίνο θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη, ειδικά όταν το pH του οίνου είναι υψηλό. (Handbook of Oenology volume 1, 2006)

1.5.2 Μεταβολές που επιφέρει η μηλογαλακτική ζύμωση

Όπως γίνεται κατανοητό η μηλογαλακτική ζύμωση είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον οίνο και επηρεάζει σε πολύ μεγάλο βαθμό οργανοληπτικά και όχι μόνο το τελικό

προϊόν. Η περαιώση η και μη αυτής έχει ως αποτέλεσμα μεγάλες αλλαγές οι οποίες είναι:

A) Ελάττωση της ολικής οξύτητας

Όπως γίνεται κατανοητό υπάρχει μείωση της ολικής οξύτητας έως και 0.1 - 0.3% gr/l τρυγικού οξέος ανάλογα με την ποσότητα του μηλικού οξέος (η συγκέντρωση του μηλικού ποικίλει ανάλογα με την ωριμότητα, την ποικιλία κλπ., έχουν παρατηρηθεί τιμές από 0.7 έως 8.6 g/L (Cabanis and Cabanis 1998)) καθώς και μικρή αύξηση της ενεργούς οξύτητας (0.1 - 0.2 μονάδες). Αυτό γίνεται εξαιτίας της αποικοδόμησης του L-μηλικού οξέος προς L-γαλακτικού οξέος αφού θεωρητικά απο 1 gr μηλικό παράγονται 0,67 gr γαλακτικό οξύ και 0,33 gr CO₂. Έτσι σε βόρειες χώρες της Ευρώπης όπως η Γερμανία λόγω υψηλής οξύτητας η μηλογαλακτική ζύμωση είναι επιθυμητή. Αντίθετά, σε θερμές χώρες όπως η Αυστραλία, Καλιφόρνια όπου η οξύτητα είναι χαμηλή μια επιπλέον πτώση της οξύτητας θα υποβαθμίσει τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες του οίνου και θα βοηθούσε στην ανάπτυξη διαφόρων βακτηρίων. Όμως και σε τέτοιες χώρες που η οξύτητα είναι χαμηλές μπορεί να γίνει διόρθωση της οξύτητας μετά την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης έτσι ώστε να αποκτήσει πολυπλοκότητα οργανοληπτικά ο τελικός οίνος.

B) Αύξηση πτητικής οξύτητας

Παρατηρείται μικρή αύξηση του οξικού οξέος που κυμαίνεται μεταξύ 0,01 – 0,05 % οξικού οξέος υπό φυσιολογικές συνθήκες και ελεγχόμενης μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αυτή η αύξηση είναι απόλυτα φυσιολογική και οφείλεται στην δράση των γαλακτικών βακτηρίων στο κιτρικό οξύ.

Γ) Επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης στους οργανοληπτικούς χαρακτήρες του οίνου

Η μηλογαλακτική ζύμωση επιδρά σημαντικά στο δευτερογενές άρωμα του οίνου και σε συνεργασία με την αλκοολική ζύμωση θεωρείτε ότι προσδίδει μια πολυπλοκότητα στον οίνο. Τα βασικότερα από τα αρωματικά συστατικά του δευτερογενούς αρώματος ανήκουν σε ανώτερες αλκοόλες (προπανόλη-1, ισοβουτανόλη κ.λ.π), εστέρες (οξικός, καπρινικός, καπρυλικός, αιθυλεστέρας, γαλακτικός αιθυλεστέρας, το ηλεκτρικό διαιθύλιο κ.α), αλδεΐδες, κετόνες κ.λ.π.

Το διακετύλιο, η ακετοΐνη και η 2,3 -βουτανοδιόλη είναι χαρακτηριστικά αρώματά της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Το διακετύλιο σε συγκεντρώσεις μεταξύ 1- 4 mg/l προσθέτει και βελτιώνει τον αρωματικό χαρακτήρα του οίνου προδίδοντας αρώματα καραμέλας βουτύρου. Αν όμως η συγκέντρωση αυξηθεί (>5 mg/l), τότε υποβαθμίζει την ποιότητά του προδίνοντας μια γεύση βουτύρου η λάχανου (Rankine 1977).

Το διακετύλιο και η ακετοΐνη παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση αλλά η συγκέντρωσή τους αυξάνει με την μηλογαλακτική ζύμωση. Ειδικότερα βρέθηκε ότι κατά την αλκοολική ζύμωση η συγκέντρωση του διακετυλίου και της ακετοΐνης είναι 0,4 και 15 mg/l αντίστοιχα τα οποία όμως μετά το τέλος της ζύμωσης μεταβολίζονται (με ενδιάμεσο προϊόν την 2,3 βουτανοδιόλη) και η συγκέντρωσή τους πέφτει στο 0 και 2 mg/l αντίστοιχα. Στη συνέχεια με την εκδήλωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης οι συγκεντρώσεις του επανέρχονται στα επίπεδα που προαναφέρθηκαν. Έτσι η παραγωγή του διακετυλίου φαίνεται να εξαρτάται και από το είδος των βακτηρίων που κάνουν την μηλογαλακτική ζύμωση. Επίσης εξαιτίας του γεγονότος ότι το διακετύλιο είναι χημικά ασταθές, μπορεί να μειωθεί σε ακετοΐνη, η οποία με τη σειρά της να μειωθεί σε 2,3-βουτανοδιόλη μέσω της αποικοδόμησης του κιτρικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια (σχήμα 6) (Bartowsky et al., 2002b; Costello, 2006). Αυτή η μετατροπή έχει άμεση επίδραση στο άρωμα του οίνου, εξαιτίας του γεγονότος ότι η 2,3-βουτανοδιόλη και η ακετοΐνη έχουν υψηλότερο κατώφλι αντίληψης, περίπου στα 150 mg /l (Francis and Newton, 2005) και 600 mg/l (Bartowsky and Henschke, 2004) αντίστοιχα, ενώ θεωρείται ότι συμβάλλουν λιγότερο στα βουτυρώδη αρώματα.

Επίσης στη μηλογαλακτική ζύμωση παρατηρείται αύξηση των συγκεντρώσεων των εστέρων (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) και του ηλεκτρικού διαιθυλίου). Οι εστέρες που παίζουν τον πιο 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 τα 110 mg/l. (Lloret et al., 2002) (Sumbly et al., 2013) 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. (Peinado et al., 2004) Επιπλέον ανάλογα την επιλογή βακτηριακών στελεχών, βρέθηκαν αυξήσεις ή μειώσεις στη συγκέντρωση και άλλων εστέρων και πιο συγκεκριμένα του οξικού ισοαμυλικού, του καπροϊκού αιθυλίου και του οξικού 2-φαινυλ-αιθυλίου. (Maicas et al., 1999). Επίσης, οι Gambaro et al. το 2001 διαπίστωσαν το ίδιο συμπέρασμα με τους Maicas et al., 1999 για τους αιθυλικούς και οξικούς εστέρες. Γενικότερα, ένα στέλεχος βακτηρίου που εμφανίζει δραστηριότητα στη παραγωγή εστέρων (περιέχει μεγάλο αριθμό εστερασών) συμβάλλει στην αύξηση του φρουτώδους αρώματος. (Matthews et al., 2006)

Τέλος σύμφωνα με τελευταίες μελέτες επισημάνθηκε ότι τα γαλακτικά βακτήρια που δρουν κατά την μηλογαλακτική ζύμωση επιδρούν έμμεσα και στο πρωτογενές άρωμα. Αυτό συμβαίνει καθώς πολλές πτητικές ενώσεις δεσμεύονται μέσω γλυκοζιτικών δεσμών με σάκχαρα οπότε καθίστανται μη πτητικές. Τα γαλακτικά βακτήρια έχουν την δυνατότητα να διασπούν αυτόν τον γλυκοζιτικό δεσμό με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της εκάστοτε πτητικής ένωσης και επομένως τον εμπλουτισμό του πρωτογενούς αρώματος του οίνου. (D'Incecco et al., 2004, Matthews et al., 2004, Grimaldi et al., 2005)

Ουσιαστικά θεωρούμε ότι η μηλογαλακτική ζύμωση προσδίδει μια αρωματική πολυπλοκότητα στον οίνο εμπλουτίζοντας τον με αρώματα βουτύρου, καπνού, ξηρών καρπών, φρούτων κ.α ανάλογα με το γένος και στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου. Όμως όπως προαναφέρθηκε εκτός από τις μεταβολές στον άρωμα παρατηρούνται και αλλαγές στο στόμα καθώς μαλακώνει οίνους με υψηλή οξύτητα και επίσης δημιουργείται και μια μικρή καταβύθιση φαινολικών οπότε η στυφή αίσθηση μειώνεται.

Δ) Βιολογική σταθερότητα του οίνου

Ένα από τα σημαντικότερα αποτελέσματα της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι η βιολογική σταθερότητα που αποκτά ο οίνος μετά την ολοκλήρωση της. Αν η MLF δεν εκδηλωθεί πριν την εμφιάλωση του οίνου, υπάρχει κίνδυνος να εκδηλωθεί αργότερα στον εμφιαλωμένο με αποτέλεσμα την εμφάνιση ιζήματος και θολώματος, καθώς και έκλυση CO₂. Και στην περίπτωση που γίνεται η μηλογαλακτική ζύμωση η μικροβιακή σταθερότητα δεν είναι απόλυτη καθώς θρεπτικές ουσίες υπάρχουν ακόμα έτσι ώστε να τροφοδοτήσουν αλλοιογόνα βακτήρια. (Handbook of Oenology volume 1, 2006)

1.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την μηλογαλακτική ζύμωση

Για την περαίωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης υπάρχουν πολλοί παράγοντες οποίοι επηρεάζουν αρνητικά ή θετικά την διενέργεια της.

Για την ασφαλή και ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση πρέπει :

- A) Εμβολιασμός με γαλακτικά βακτήρια αμέσως μετά την αλκοολική ζύμωση.
 - B) Επάρκεια θρεπτικών (κυρίως αμινοξέων και ανόργανων στοιχείων)
 - Γ) Περιεκτικότητα σε θειώδη ανυδρίτη < 50 mg/l
 - Δ) Παρακολούθηση θερμοκρασίας ζύμωσης ούτως ώστε $T=18-25\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - E) Οξύτητα ούτως ώστε να μην είναι πολύ υψηλή ($\text{pH} > 3,2$).
- (Handbook of Oenology volume 1, 2006), (Costello et al., 2012), (Lerm et al., 2010)

Παρεμποδιστικοί παράγοντες της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι :

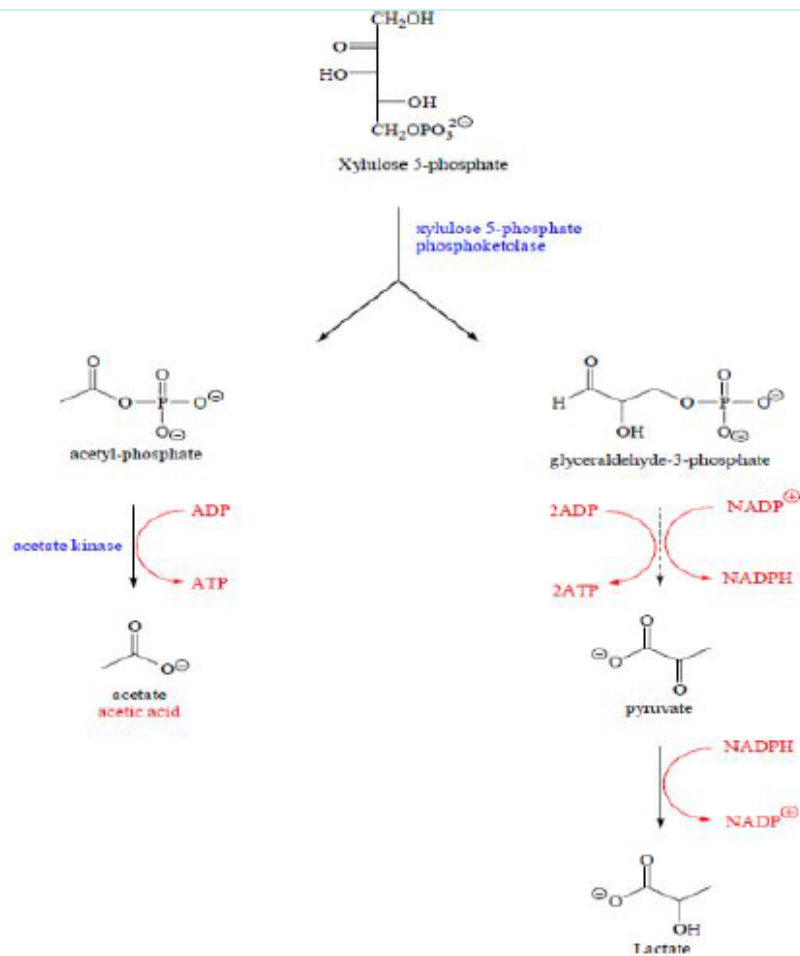
- A) Χαμηλό pH ($\text{pH} < 3,2$).
 - B) Υψηλή συγκέντρωση αλκοόλη ($> 14\%$).
 - Γ) Χαμηλή θερμοκρασία $T < 15^{\circ}\text{C}$
 - Δ) Περιεκτικότητα σε θειώδη ανυδρίτη $> 50\text{ mg/l}$
 - E) Γρήγορη μετάγγιση του οίνου μετά την αλκοολική ζύμωση (αποχωρισμός από τις λάσπες)
 - ΣΤ) Αλκοόλη: Σε υψηλή συγκέντρωση τα γαλακτικά βακτήρια είναι πιθανόν να «σοκαριστούν»
 - Z) Υπερβολική οξυγόνωση οίνου.
- (Handbook of Oenology volume 1, 2006), (Costello et al., 2012), (Lerm et al., 2010)

1.5.4 Ανεπιθύμητες μεταβολές μηλογαλακτικής ζύμωσης

Τα γαλακτικά βακτήρια όμως είναι ικανά να προκαλέσουν και ανεπιθύμητες μεταβολές στα συστατικά του οίνου. Κάτω από ορισμένες συνθήκες (ανεπιθύμητο στέλεχος γαλακτικού βακτηρίου, σύσταση οίνου, οινολογικές πρακτικές κ.α) είναι ικανά να αποικοδομήσουν και άλλα συστατικά του οίνου εκτός από το μηλικό.

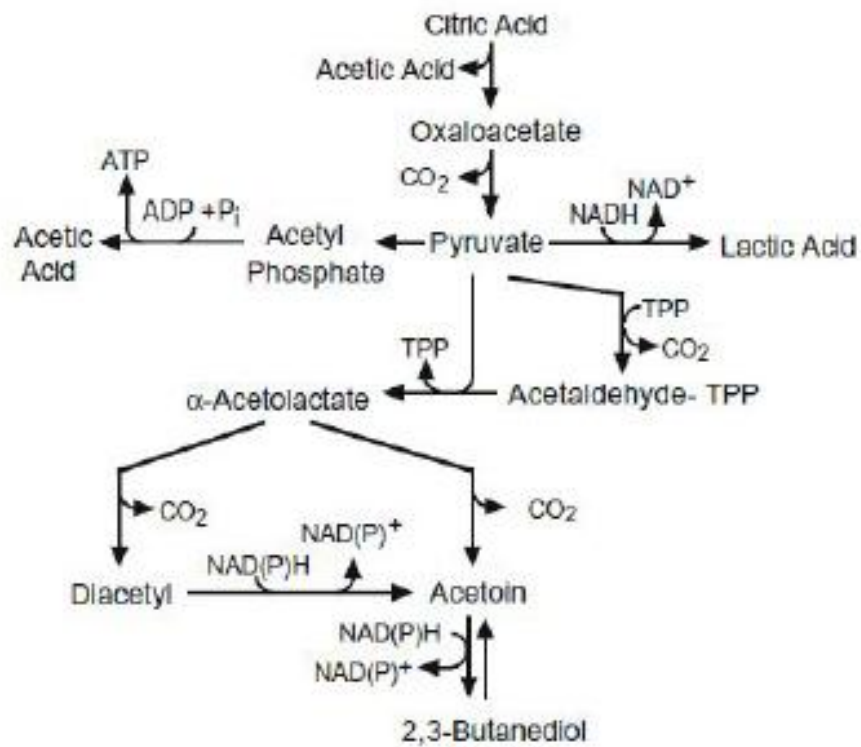
Αυτά μπορεί να είναι:

A) τα αζύμωτα σάκχαρα της αλκοολικής ζύμωσης προκαλώντας μεγάλη αύξηση της πτητικής οξύτητας



Σχήμα 5 : Αποικοδόμηση πεντοζών από γαλακτικά βακτήρια

B) το κιτρικό οξύ που υπάρχει στον οίνο προκαλώντας αύξηση της πτητικής οξύτητας καθώς από την αποικοδόμηση του δημιουργείται οξικό οξύ



Σχήμα 6 : Αποικοδόμηση κιτρικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια

Γ) το τρυγικό οξύ από γαλακτικά βακτήρια του γένους *Lactobacillus plantarum* προς οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ και CO₂.

Δ) η γλυκερόλη η οποία είναι δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και κάποια γαλακτικά βακτήρια την αποικοδομούν προς ακρολείνη (πικρή γεύση).

(Handbook of Oenology volume 1, 2006)

1.6 Η σύσταση του οίνου

1.6.1 Οξέα

Τα οργανικά οξέα τα οποία συναντιούνται στον οίνο διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο για το τελικό προϊόν. Κάποια οξέα προϋπάρχουν από την πρώτη ύλη και κάποια άλλα σχηματίζονται κατά την αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση.

Τα πιο σημαντικά οξέα που υπάρχουν στο σταφύλι είναι :

A) Τρυγικό : Ίσως το πιο σημαντικό οξύ της σταφυλής καθώς υπάρχει σε συγκέντρωση 7,5 - 15 gr/lit και στον οίνο σε συγκέντρωση 1,5 - 2,5 gr/lit.

B) Μηλικό : Στο σταφύλι στην Ελλάδα κατά την ωρίμανση, η συγκέντρωση του είναι περίπου 2 - 4 gr/lit και στον οίνο η συγκέντρωση εξαρτάται από την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Γ) Κιτρικό : Βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες 2,25 - 0,30 gr/lit

Δ) Γλυκονικό: Παρατηρείται όταν η πρώτη ύλη έχει προσβληθεί από *Botrytis cinerea* και γι' αυτό θεωρείται κριτήριο ποιότητας της πρώτης ύλης.

E) Ασκορβικό: Διαδραματίζει τον ρόλο του αντιοξειδωτικού στα αρωματικά και στα φαινορικά συστατικά του οίνου και στο γλεύκος περιέχεται σε συγκεντρώσεις 50 - 100 gr/lit

Επίσης κατά την αλκοολική ζύμωση διαδραματίζεται η σύνθεση οξέων τα οποία καθορίζουν το τελικό προϊόν, τα πιο σημαντικά οξέα είναι:

A) Κιτρομηλικό : Είναι δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και παράγεται σε συγκέντρωση 0,1 - 0,25 gr/lit. Μέσω αυτού μπορεί να γίνει διάκριση φυσικών γλυκών κρασιών με μιστέλια (προσθήκη αλκοόλης)

B) Γαλακτικό : Υπάρχει μόνο στον οίνο και είναι προϊόν της αλκοολικής (D (-)) σε συγκέντρωση 0,1 - 0,4 gr/lit αλλά και της μηλογαλακτικής ζύμωσης (L(+)) σε συγκέντρωση 3 gr/lit

Γ) Οξικό: Προέρχεται τόσο από την αλκοολική ζύμωση σε συγκέντρωση που εξαρτάται από το στέλεχος των ζυμών που υπερισχύουν τόσο και από την μηλογαλακτική ζύμωση σε συγκέντρωση 0,2 - 0,4 gr/lit. Εάν η τιμή του υπερβαίνει το 0,5 gr/lit τότε πιθανόν να υπάρχει προσβολή από αλλοιογόνα βακτήρια στον οίνο.

Αναμφίβολα τα οξέα καθορίζουν κυρίαρχο ρόλο σε ένα κρασί καθώς αυτά μπορούν να επηρεάσουν τους οργανοληπτικούς του χαρακτήρες, την μικροβιακή σταθερότητα του καθώς και την δυνατότητα παλαίωσης του.

1.6.2 Πτητικές ενώσεις

Τα αρώματα που συναντιόνται σε ένα κρασί αναμφίβολα το χαρακτηρίζουν. Οι πτητικές ενώσεις αυτές είτε προυπαρχουν στο σταφύλι και ονομάζονται πρωτογενή αρώματα , είτε δημιουργούνται κατά την αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση και αποκαλούνται δευτερογενή αρώματα είτε τέλος αποκτώνται κατά την παλαίωση - ωρίμανση και ονομάζονται τριτογενή η μπουκέτο οίνου.(RAPP and MANDERY 1986)

Πιο συγκεκριμένα στα πρωτογενή αρώματα τα οποία εξαρτώνται αποκλειστικά από την πρώτη ύλη συναντάμε :

- i. Τερπένια (εξωτικά φρούτα, τριαντάφυλλο)
- ii. Τερπενόλες (αρώματα λουλουδιών)
- iii. Πυραζίνες (οσμές λαχανικών)
- iv. Θιόλες (φρούτα του πάθους κ.α)

Κατά την ζύμωση από την δράση ζυμών ή βακτηρίων συντίθενται το δευτερογενές άρωμα στο οποίο είναι δυνατόν να υπάρχουν :

- i. Ανώτερες αλκοόλες (βαριά μυρωδιά)
- ii. Εστέρες (φρούτα)
- iii. Πτητικά λιπαρά οξέα (ταγγισμένο βούτυρο)
- iv. Αλδεύδες (π.χ. οξειδωση, πικραμύγδαλο)
- v. Θειούχες ενώσεις (σκόρδο, κλούβιο αυγό)

Τέλος κατά την ωρίμανση και παλαίωση των οίνων (βαρέλια-μπουκάλια) δημιουργείται το τριτογενές η μπουκέτο το οποίο είναι δυνατόν να αποτελείται από :

- i. Εστέρες (φρούτα αποξηραμένα)
- ii. Λακτόνες (καρύδα)
- iii. Φουρανικές ενώσεις (ψημένα αμύγδαλα)
- iv. Αλδεύδες (βανίλια)

1.6.3 Φαινολική σύσταση

Το χρώμα των οίνων οφείλεται κατά κύριο λόγο στις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν σ' αυτόν. Οι φαινολικές ενώσεις διαδραματίζουν πρωταρχικό παράγοντα στην ποιότητα των παραγόμενων οίνων καθώς επηρεάζουν τόσο τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες (στυφή αίσθηση, πικρή γεύση, χρώμα κ.α.) του οίνου όσο και την δυνατότητα παλαίωσης του. Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν τις μη φλαβονοειδείς και τις φλαβονοειδείς ενώσεις.

Οι μη φλαβονοειδείς ενώσεις περιλαμβάνουν τα βενζοϊκά και κινναμωνικά οξέα τα οποία δεν διαδραματίζουν τόσο σημαντικό ρόλο στον οίνο. Τα βενζοϊκά οξέα βρίσκονται στα σταφύλια με την μορφή συνθέτων χημικών ενώσεων στις οποίες φαίνεται να συμμετέχουν και ανθοκυάνες και η μερική αποικοδόμηση αυτών οδηγεί στην εμφάνιση ελεύθερων βενζοϊκών οξέων. Κατά την παλαίωση παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης τους. Τα κινναμωνικά οξέα περιέχονται και αυτά στα σταφύλια και στους οίνους με την μορφή ενώσεων με ανθοκυάνες και τρυγικό οξύ.

Αντίθετα οι φλαβονοειδείς ενώσεις που περιλαμβάνουν τις ανθοκυάνες, φλαβονόλες και τις τανίνες είναι υπεύθυνες για το χρώμα των οίνων.

Οι ανθοκυάνες εντοπίζονται στον φλοιό των ραγών κυρίως, περιέχονται στον οίνο μέσω της εκχύλισης που γίνεται κατά την οινοποίηση και έχουν μεγάλο μερίδιο ευθύνης για το χρώμα των οίνων. Η συγκέντρωσή τους στις ελληνικές ποικιλίες κυμαίνεται από 100 - 1500 mg/kg ραγών (Κουράκου Σ, 1998). Οι ανθοκυάνες χαρακτηρίζονται από κάποιες ιδιότητες οι οποίες έχουν μεγάλο οινολογικό ενδιαφέρον. Ανάλογα με το pH έχουμε μεταβολή από άχρωμη σε έγχρωμη κατάσταση (λόγω σταθεροποίησης), δηλαδή για παράδειγμα η μαλβιδίνη όταν το pH αυξάνεται είναι άχρωμη ενώ αντίθετα σε χαμηλό pH έχει ερυθρό χρώμα. Επίσης τα όξινα θειώδη δημιουργούν μαζί με τις ανθοκυάνες άχρωμες ενώσεις και αυτό εξηγεί τον αποχρωματισμό κατά την προθήκη θειώδους, όμως η αντίδραση είναι προσωρινή και με την μείωση του ελεύθερου θειώδους ο χρωματισμός επανέρχεται. Επίσης οι ανθοκυάνες αποχρωματίζονται και με αναγωγή όμως με την μετέπειτα οξειδωση τους αποκτούν τον χρωματισμό τους.

Οι φλαβονόλες είναι ενώσεις που περιέχονται στον φλοιό των ραγών με την μορφή μονογλυκοζιτών-3 και όχι μόνο. Στον οίνο μέσω της εύκολης υδρόλυσης τους συναντιόνται ελεύθερα τα άγλυκα συστατικά τους. Μάλιστα έχει αποκαλυφθεί ότι η παρουσία αυτών συμβάλει σημαντικά στην σταθερότητα του χρώματος. (Zafrilla et al, 2003)

Οι τανίνες απαντούν στα στερεά μέρη της σταφυλής όπως τα γίγαρτα στους βόστρυχες και ένα μικρό ποσοστό στην σάρκα. Αυτές διακρίνονται σε υδρολυόμενες οι οποίες αποτελούνται από ένα γλυκίδιο επάνω στο οποίο προσκολλώνται φαινολικές ενώσεις όπως το γαλλικό και ελλαγικό οξύ και συμπυκνωμένες οι οποίες αποτελούνται από τον πολυμερισμό της κατεχίνης και λευκοανθυκυανιδίνης. Η συμπεριφορά τους εξαρτάται από το μοριακό βάρος τους και για αυτόν τον λόγο είναι αναγκαίος ο ποσοτικός προσδιορισμός τους όσο και ο προσδιορισμός της κατάστασης συμπύκνωσης τους. Από το ποσοστό που βρίσκεται στο σταφύλι ένα πολύ μικρό ποσοστό εισέρχεται στον οίνο και η ποσότητα τους ανέρχεται μεταξύ 1,5 και 4 g/l. Κάποια από τα χαρακτηριστικά των τανινών είναι ότι ενώνονται με πρωτεΐνες ή άλλα πολυμερή σχηματίζοντας αδιάλυτες ενώσεις και ότι καθιζάνουν με τις πρωτεΐνες της σιέλου που είναι πλούσιες σε προλίνη δημιουργώντας το αίσθημα της στυφάδας και πικρής γεύσης (Ribereau-Gayon, 2006). Επιπλέον στην παλαίωση διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο καθώς δρουν αντιοξειδωτικά προστατεύοντας έτσι τον οίνο. Επίσης συμπυκνώνονται (πολυμερίζονται) δημιουργώντας μεγαλομοριακά σύμπλοκα τα οποία καταβυθίζονται με συνέπεια την οργανοληπτική αλλαγή του οίνου (μείωση στυφής αίσθησης κ.α.) (Σουφλερός 2012).

1.7 Τα γαλακτικά βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διατριβής είναι από την εταιρεία Chr Hansen και μερικές πληροφορίες για το καθένα ξεχωριστά παρουσιάζονται παρακάτω :

- *Viniflora Nova*: Το συγκεκριμένο γαλακτικό βακτήριο είναι στέλεχος του *Lactobacillus plantarum* και χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια για την πραγματοποίηση μηλογαλακτικής ζύμωσης πριν την αλκοολική. Από την στιγμή που θα εμβολιαστεί στον μούστο μετά από 24 – 48 ώρες μπορεί να γίνει ο εμβολιασμός με τον ζυμομύκητα. Θεωρείται ομοζυμωτικός (σχηματίζει ακεταλδεύδη, ακετοΐνη, 2,3-μέθυλο-1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη) σε συνθήκες οίνου και αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει ο κίνδυνος μεταβολισμού σακχάρων ή άλλων συστατικών του γλεύκους που θα επιφέρει μεγάλη αύξηση της πτητικής οξύτητας και γενικότερα αλλοίωση του τελικού προϊόντος. Συνιστάται σε μούστους με χαμηλό μηλικό οξύ όπου υπάρχει κίνδυνος έναρξης αυθόρμητης μηλογαλακτικής ζύμωσης με αποτέλεσμα την υψηλή τιμή πτητικής οξύτητας. Επίσης προκαλεί μικρή αύξηση του pH και οδηγεί σε περισσότερο αρωματικά κρασιά αφού βοηθάει στον σχηματισμό πτητικών ενώσεων που παραπέμπουν σε αρώματα κερασιού , μούρου , κόκκινων φρούτων κλπ.

Κατά την εφαρμογή του συγκεκριμένου σκευάσματος είναι αναγκαίο να υπάρχει ελάχιστη έως καθόλου προθήκη θειώδους (<10ppm) με θερμοκρασία εμβολιασμού 18 – 24 °C, και pH μεγαλύτερο από 3,2. Επίσης είναι απαραίτητο να εφαρμόζεται σε υγιή σταφύλια.

- *Viniflora Cine* : Είναι ένα γαλακτικό βακτήριο του γένους *Oenococcus oeni* που συνιστάται για ΜΓΖ χωρίς την παραγωγή διακετυλίου. Προσδίδει στους οίνους αρωματική πολυπλοκότητα με έμφαση στον φρουτώδη χαρακτήρα και τους βοηθάει να αποκτήσουν οργανοληπτική ισορροπία. Το συγκεκριμένο στέλεχος δεν μεταβολίζει το κιτρικό οξύ που υπάρχει στον οίνο εφόσον δεν έχει τα ένζυμα που απαιτούνται και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην έχουμε παράγωγη διακετυλίου και συνεπώς αρωμάτων βουτύρου. Χρησιμοποιείται σε λευκά, ροζέ και ερυθρά κρασιά τα οποία προορίζονται για φρέσκα. 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 14 % vol.. Ο εμβολιασμός του πραγματοποιείται είτε πριν, είτε κατά τη διάρκεια, είτε μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Viniflora Oenos : Είναι από τα πρώτα γαλακτικά βακτήρια *Oenococcus oeni* που παρήχθησαν για την ασφαλή, εύκολη και εφαρμόσιμη σε μεγάλο φάσμα κρασιών μηλογαλακτική ζύμωση. Παράγει διακετύλιο σε μέτρια συγκέντρωση και εφαρμόζεται σε πολλές ποικιλίες (Cabernet Sauvignon, Syrah (Shiraz), Merlot, Malbec, Pinot noir, Gamay, Nebbiolo, Carignan and Tempranillo) Η θερμοκρασία εμβολιασμού 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.. Ο εμβολιασμός του πραγματοποιείται είτε πριν, είτε κατά τη διάρκεια, είτε μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Viniflora Ch16 : Είναι ένα στέλεχος του *Oenococcus oeni* που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε οίνους με υψηλό αλκοολικό βαθμό, παρουσιάζει αλκοολ-ανθεκτικότητα έως 16% (v/v) αιθανόλη. Χρησιμοποιείται σε θέρμες περιοχής και σε ερυθρούς οίνους με ποσοστό αλκοόλης μεταξύ 14–16% (v/v) . Ο χρόνος περαιώσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι γρήγορος και οδηγεί σε μέτριες συγκέντρωσης διακετυλίου και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κρασιά παλαίωσης. Χρησιμοποιείται σε ποικιλίες όπως Cabernet Sauvignon, Merlot, Corvina, Nebbiolo, Nero D'Avola, Tempranillo, Syrah, Grenache, Carmenera and 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.

www.chr-hansen.com

2. Πειραματική Διαδικασία

2.1 Σκοπός πειράματος

Σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής είναι η μελέτη της μηλογαλακτικής ζύμωσης με χρήση διάφορων γαλακτικών βακτηρίων σε ερυθρό οίνο ποικιλίας Αγιωργίτικο. Η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης καθώς και μετά την αλκοολική ζύμωση.

Οι αναλύσεις που έγιναν είναι οι κλασικές αναλύσεις σύμφωνα με τον ΟΙV (μέτρηση σακχάρων κατά την αλκοολική ζύμωση, μέτρηση ολικής οξύτητας, μέτρηση ενεργούς οξύτητας, μέτρηση έντασης και απόχρωσης χρώματος, μέτρηση ολικών ανθοκυανών, μέτρηση πτητικής οξύτητας, μέτρηση αλκοόλης, μέτρηση αναγόντων σακχάρων) καθώς και μέτρηση ολικών τανινών, μέτρηση δείκτη φαιολικών ουσιών, μέτρηση συγκέντρωσης συμπυκνωμένων τανινών με Methyl cellulose, μέτρηση στυπτικότητας με την μέθοδο Harbertson, μέτρηση μηλικού οξέος, μέτρηση οξέων και σακχάρων με χρήση υγρής χρωματογραφίας HPLC τόσο κατά την αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση όσο και στον οίνο καθώς και GC/MS για το αρωματικό δυναμικό του εκάστοτε οίνου. Τέλος πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική ανάλυση του οίνου σε συνεργασία με την εταιρεία ανάλυσης τροφίμων Cadmion - I. Λιγκας & Σια Ο.Ε. η οποία εδρεύει στο Κιάτο, Κορινθίας.

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

2.2 Σχεδιασμός πειράματος

Τα σταφύλια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διατριβής προέρχονταν από την περιοχή Ψάρι που υπάγεται στην ζώνη της Νεμέας. Ο αμπελώνας από όπου προήλθαν έχει σύστημα μόρφωσης αμφίπλευρη γραμμική, δεν είναι αρδευόμενος και έχει στρεμματική απόδοση 1.200 kg/στρέμμα. Η κατάσταση υγιεινής των σταφυλιών κρίθηκε πολύ καλή, με καλή φαινολική και τεχνολογική ωρίμανση.

Η οινοποίηση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο οιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Κατά την οινοποίηση ακολουθήθηκαν δυο διαφορετικά πρωτόκολλα τα οποία διαφέρουν ως προς τον χρόνο και τρόπο περαιώσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Αρχικά όσον αφορά την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης πριν την αλκοολική ζύμωση ακολουθήθηκε ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο οινοποίησης. Αρχικά υπήρξε η παραλαβή των σταφυλιών, ο εκραγισμός τους και η πλήρωση δυο δεξαμενών των 200L με περίπου 120kg σταφυλομάζας. Την ίδια μέρα έγινε ο εμβολιασμός με τα γαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus plantarum* για την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Η δοσολογία στους οινοποιητές ήταν η αναγραφόμενη και συνιστάμενη από την εταιρεία που προμηθεύτηκαν τα γαλακτικά βακτήρια (Chr Hansen). Ο ποιοτικός έλεγχος για την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης έγινε με την χρήση της μεθόδου της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) και για τον ποσοτικό προσδιορισμό του L-μηλικού οξέος χρησιμοποιήθηκε ενζυμική μέθοδος με χρήση φωτόμετρου. Με την συμπλήρωση 48 ωρών από τον εμβολιασμό με τα γαλακτικά βακτήρια πραγματοποιήθηκε και ο εμβολιασμός με τον ζυμομύκητα για την πραγματοποίηση της αλκοολικής ζύμωσης. Το πρωτόκολλο της αλκοολικής ζύμωσης που ακολουθήθηκε ήταν κλασικής ερυθρής οινοποίησης. Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης και τον διαχωρισμό των στεμφύλων από τον εν δυνάμει οίνο πραγματοποιήθηκε θείωση των οινοποιητών και κλείσιμο τους με πνευματικό καπάκι ούτως ώστε να αποφευχθεί η αρνητική επίδραση του οξυγόνου. (Η ΜΓΖ διενεργήθηκε σε $T=20^{\circ}\text{C}$ / Η ΑΖ διενεργήθηκε σε $T=24-26^{\circ}\text{C}$)

Για την περαιώση της μηλογαλακτικής ζύμωσης μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης ακολουθήθηκε ένα πιο απλό πρωτόκολλο ερυθρής οινοποίησης. Αρχικά υπήρξε η παραλαβή των σταφυλιών, ο εκραγισμός τους και η πλήρωση μιας δεξαμενής των 300L με περίπου 250kg σταφυλομάζας. Σε αυτήν την δεξαμενή έγινε

θείωση και την ίδια μέρα μετά από 2 ώρες από την θείωση πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με ζυμομύκητα. Μόλις τέλειωσε η αλκοολική ζύμωση έγινε ο διαχωρισμός των στέμφυλων από τον εν δυνάμει οίνο. Μετέπειτα πραγματοποιήθηκε μετάγγιση της δεξαμενής σε 8 δοχεία των 25L για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης με χρήση 3 διαφορετικών στελεχών γαλακτικού βακτηρίου (με την συνιστάμενη δοσολογία της εταιρείας που προμηθεύτηκαν τα γαλακτικά βακτήρια (Chr Hansen)) και αυθόρμητη από γηγενής γαλακτικά βακτήρια. Ο ποιοτικός έλεγχος για την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης έγινε με την χρήση της μεθόδου της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) και για τον ποσοτικό προσδιορισμό του L-μηλικού οξέος χρησιμοποιήθηκε ενζυμική μέθοδος με χρήση φωτόμετρου. Μετά την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης το κάθε δοχείο θειώθηκε και έκλεισε αεροστεγώς.

(Η ΑΖ διενεργήθηκε σε $T=24-26^{\circ}C$ / Η ΜΓΖ διενεργήθηκε σε $T=20^{\circ}C$)

Μετά το τέλος της διαδικασίας της οινοποίησης άρχισαν να πραγματοποιούνται οι αναλύσεις που αναλύθηκαν στο προηγούμενο υποκεφάλαιο.

Προς ευκολία οι οίνοι οι οποίοι παρήχθησαν ονομάστηκαν σύμφωνα με το γαλακτικό βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Χρόνος διεξαγωγής ΜΓΖ	Ονομασία
Πριν την αλκοολική ζύμωση	nova
Μετά την αλκοολική ζύμωση(αυθόρμητα)(ΜΑΡΤΥΡΑΣ)	spontaneous
Μετά την αλκοολική ζύμωση	cine
Μετά την αλκοολική ζύμωση	ch16
Μετά την αλκοολική ζύμωση	oenos

Πίνακας 1 : Ονομασία των δειγμάτων – οίνων

2.3 Αναλύσεις

2.3.1 Έλεγχος AZ και ΜΓΖ

2.3.1.1 Μέτρηση διαθλασιμετρίας – Brix

Η μέτρηση των σακχάρων κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης πραγματοποιήθηκε μετρώντας τα σάκχαρα μέσω διαθλασιμετρίας και εκφράστηκαν σε βαθμούς Brix.

2.3.1.2 Προσδιορισμός L-μηλικού οξέος

2.3.1.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)

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

Υλικά και εξοπλισμός

- Δύο δοχεία που να κλείνουν ερμητικά, διαστάσεων περίπου 20x20x30 cm
- Πλακίδια TLC
 - Διαλύτης στον οποίο αναμιγνύονται η mL τολουένιο, η/2 mL οξικού οξέος και η/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 5x10 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.

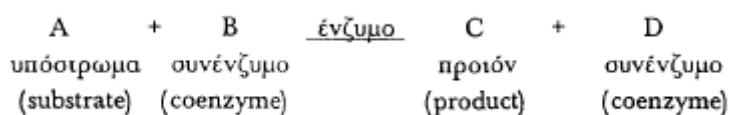
Το χαρτί αφού στεγνώσουν οι κηλίδες τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει το διάλυμα και κλείνει ερμητικά. Μετά από 20 λεπτά περίπου (το διάλυμα έχει φθάσει στα 9cm) αφαιρούμε το χαρτί και το αφήνουμε να εξατμισθεί ο διαλύτης. Μετέπειτά εμβαπτίζουμε τα πλακίδια μέσα στο δοχείο με τον δείκτη και περιμένουμε 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.

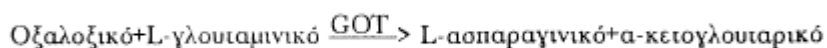
2.3.1.2.2 Ενζυμική μέθοδος

Για τον προσδιορισμό του L-μηλικού οξέος χρησιμοποιήθηκε ενζυμική μέθοδος προσδιορισμού. Οι ενζυμικές μέθοδοι προσδιορισμού είναι πιο απλές από τις χημικές και χαρακτηρίζονται από την ακρίβεια και την υψηλή εξειδίκευση.

Ο μηχανισμός που περιγράφει την στοιχειομετρική ενζυμική αντίδραση περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα.



Για τον προσδιορισμό του L-μηλικού οξέος τον ρόλο του συνενζύμου διαδραματίζει το NAD⁺ καθώς η αντίδραση καταλύεται με την παρουσία L-μηλικής αφυδρογονάσης και σαν ενδιάμεσων προϊόν παράγεται οξαλοξικό. Στην συνέχεια το οξαλοξικό μετατρέπεται σε ασπαραγινικό με την βοήθεια του γλουταμινικού καθώς η αντίδραση καταλύεται από την γλουτάμινο - οξαλοξική – τρανσαμινάση.



Η ποσότητα του NADH που σχηματίζεται είναι στοιχειομετρικά ανάλογη του L-μηλικού οξέος και προσδιορίζεται με την απορρόφηση στα 340nm.

Υλικά και εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα μέτρησης απορρόφησης στα 340 nm
- Κυψελίδες υάλου με οπτική διαδρομή 1 cm
- Διάλυμα NAD⁺ συγκέντρωσης 0,047 M
- Εναιώρημα GOT συγκέντρωσης 2 mg/ml
- Διάλυμα L-μηλικής αφυδρογονάσης συγκέντρωσεως 5 mg/ml

Πορεία: Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας τις οδηγίες του παρακάτω πίνακα :

Φέρουμε εντός της κυψελίδας	Μαρτυρας	Δείγμα
Διάλυμα 1	1,00 ml	1,00 ml
Διάλυμα 2	0,20 ml	0,20 ml
Διοσπεσιαγμένο νερό	1,00 ml	0,90 ml
Εναιώρημα 3	0,01 ml	0,01 ml
Δείγμα	-	0,10 ml
Αναμιγνύουμε και παίρνουμε τις απορροφήσεις (A1) μετά από τρία λεπτά περίπου. Κατόπιν προκαλούμε την αντίδραση με την πρόσθεση:		
Διάλυμα 4	0,01 ml	0,01 ml
Αναμιγνύουμε και παίρνουμε τις απορροφήσεις (A2) μετά από την συμπλήρωση της αντίδρασης (5-10 λεπτά)		

Για την εξαγωγή αποτελέσματος γίνονται οι εξής υπολογισμοί :

1. $A = A2 - A1$
2. $\Delta A = \Delta A_{\text{ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}} - \Delta A_{\text{ΜΑΡΤΥΡΑ}}$
3. $C = [(V \cdot MW) / (\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000)] \cdot \Delta A$ όπου: $\epsilon = 6,3 / MW = 134,09 / d=1 / v=\text{όγκος δείγματος} / V= \text{τελικός όγκος}$

2.3.2 Βασικές αναλύσεις

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 - ολικής 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)
- ζ) Μέτρηση ελεύθερου και ολικού θειώδη ανυδρίτη

2.3.3 Εκτίμηση φαινολικών συστατικών

2.3.3.1 Δείκτης Φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ)

Ο προσδιορισμός βασίζεται στην ισχυρή απορρόφηση που παρουσιάζουν οι βενζολικοί δακτύλιοι των φαινολικών ενώσεων στο υπεριώδες φως, το μέγιστο της οποίας παρατηρείται γύρω στα 280 nm. Μετρά την περιεκτικότητα των φλαβονοειδών φαινολών (ανθοκυάνες, τανίνες), των μη φλαβονοειδών (φαινολικά οξέα) και κάποιων μη φαινολικών ουσιών που απορροφούν στα 280 nm. Ο ΔΦΟ είναι γρήγορη και εύκολη μέθοδος και δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι ορισμένες ενώσεις όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες, δεν παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 280 nm. Το σφάλμα αυτό θεωρείται μικρό, μια και η περιεκτικότητα των παραπάνω ουσιών στα σταφύλια και τους οίνους είναι χαμηλή.

Υλικά και εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο μέτρησης απορρόφησης στα 280 nm
- Κυψελίδες χαλαζία μήκους οπτικής διαδρομής 1cm

Πορεία : Το δείγμα του γλεύκους ή του οίνου φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 5 min. Στην συνέχεια λαμβάνεται με σιφώνιο 1 mL από αυτό και μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL όπου αραιώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή των 100 mL (αραίωση 1:100). Μετρείται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.

Ο ΔΦΟ προκύπτει από την ακόλουθη σχέση:

$$\Delta\Phi\text{O} = \text{OD} \times \text{Αραίωση δείγματος (εδώ 100)}$$

Όπου OD: η ένδειξη του οργάνου

2.3.4 Εκτίμηση Ανθοκυανών

2.3.4.1 Ολικές Ανθοκυάνες

Η μέθοδος προσδιορισμού των ολικών ανθοκυανών στηρίζεται στην ιδιότητά τους να δίνουν άχρωμες ενώσεις με το HSO_3^- . Μετά την προσθήκη ικανής περίσσειας όξινου θειικού άλατος, η αλλαγή του χρώματος του οίνου είναι ανάλογη της περιεκτικότητας των ανθοκυανών.

Υλικά και εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα μέτρησης απορρόφησης από 300 ως 700 nm.
- Κυψελίδες υάλου με οπτική διαδρομή 10 mm
- Διαλυμα HCL 2%
- Διαλυμα HCL 0,1%
- Διαλυμα NaHSO_3 15%

Πορεία : Αρχικά, δημιουργείται ένα κύριο διάλυμα με 1mL οίνου, 1mL αλκοολικού διαλύματος HCL 0,1% και 20 mL υδατικού διαλύματος HCL 2%. Από το κύριο διάλυμα παρασκευάζονται δύο δείγματα, το μεν πρώτο αποτελείται από 5 mL κύριου διαλύματος και 2 mL απεσταγμένου νερού, το δε δεύτερο από 5 mL κύριου διαλύματος και 2 mL διαλύματος όξινου θειώδους νατρίου (NaHSO_3) 15%. Έπειτα από 20 min μετρώνται οι απορροφήσεις (d_1 , d_2) των δύο δειγμάτων στα 520 nm. Η συγκέντρωση των ανθοκυανών δίνεται από τη σχέση :

$(d_2 - d_1) * 885,3$ και εκφράζεται σε mg/L. (Ribéreau–Gayon ,et al.,2006)

2.3.5 Εκτίμηση Τανινών

2.3.5.1 Ολικές Τανίνες

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα των τανινών να μετατρέπονται σε ανθοκυανιδίνες όταν θερμαίνονται σε όξινο περιβάλλον.

Υλικά και εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα μέτρησης απορρόφησης από 300 ως 700 nm.
- Κυψελίδες υάλου με οπτική διαδρομή 10 mm
- Διάλυμα πυκνού HCL 37%
- Αιθανόλη 95%

Πορεία : Αρχικά προετοιμάζονται 2 δείγματα , καθένα από τα οποία περιέχει 2mL οίνου αραιωμένου 1/50, 1 mL απεσταγμένου νερού και 3 mL πυκνού HCL 37%. Το ένα από τα δύο δείγματα θερμαίνεται στους 100° C σε υδατόλουτρο για 45 min και αφού ψυχθεί προστίθεται 0,5 mL αιθανόλης 95% για τη σταθεροποίηση του χρώματος. Το άλλο δείγμα δεν θερμαίνεται, αλλά δέχεται την προσθήκη 0,5 mL αιθανόλης 95% . Μετράται η διαφορά στην οπτική πυκνότητα στα 550nm και η συγκέντρωση των τανινών προκύπτει από τη σχέση:

$$(d_2-d_1) \cdot 19,35 \text{ αν } (d_2-d_1) \geq 0,07$$

$$(d_2-d_1) \cdot 20,83 \text{ αν } (d_2-d_1) \leq 0,07, \text{ εκφρασμένη σε mg/L.}$$

Η μέθοδος αυτή είναι εξαιρετικά αξιόπιστη, αφού δίνει αποτελέσματα με μικρές διακυμάνσεις, ωστόσο δίνει ένα αποτέλεσμα κατ' εκτίμηση καθώς δε λαμβάνει υπόψη τη διαφορά των δομών των τανινών του οίνου, το βαθμό πολυμερισμού, ούτε τα άλλα συστατικά του οίνου που αντιδρούν με το χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο. (Ribéreau-Gayon ,et al.,2006)

2.3.5.2 Μέτρηση συγκέντρωσης συμπυκνωμένων τανινών σε οίνο

Η μέτρηση συγκέντρωσης συμπυκνωμένων τανινών με Methyl cellulose είναι ένα μέσο μέτρησης της συγκέντρωσης τανινών μετά από ομογενοποίηση και εκχύλιση στο κρασί και στα σταφύλια, αλλά και σε άλλα υδατικά διαλύματα (Sarneckis et al.2005, Smith et al.2005, Mercurio και Smith 2006). Η μέθοδος βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις του πολυμερούς και της τανίνης με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αδιάλυτων συμπλοκών πολυμερούς - τανίνης τα οποία στη συνέχεια καθιζάνουν. Το πολυμερές που χρησιμοποιείται είναι η methyl cellulose και ως εκ τούτου, η συγκεκριμένη μέθοδος μετρά τις τανίνες που καθιζάνουν με την methyl cellulose, δηλαδή, μετρά την MCP -τανίνη. Η μέθοδος βασίζεται στην αφαίρεση των τιμών απορρόφησης στα 280nm (A280) των διαλυμάτων με και χωρίς καθίζηση που μετρήθηκαν με την χρήση φασματοφωτόμετρου. Η methyl cellulose δεν απορροφά στα 280nm, και συνεπώς δεν εμποδίζει τις μετρήσεις.

Υλικά και εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα μέτρησης απορρόφησης στα 280 nm.
- Κυψελίδες υάλου με οπτική διαδρομή 1 cm
- Διάλυμα methyl cellulose 0,04 %
- Κορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου

Πορεία : Η μέθοδος απαιτεί ένα control δείγμα (χωρίς methyl cellulose) το οποίο αποτελείται από 250μL δείγματος 2ml κορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου και 7,75ml H₂O και ένα δείγμα treatment (με methyl cellulose) το οποίο αποτελείται από 250μL δείγματος 2ml κορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου, 4,75ml H₂O, 250 μl διαλύματος methyl cellulose 0,04 % . Η τιμή A280 του δείγματος control υποδεικνύει την τιμή για όλες τις φαινολικές ενώσεις (ολικά φαινολικά), ενώ η τιμή A280 του δείγματος treatment δείχνει την τιμή για τις φαινολικές ενώσεις που παραμένουν στο διάλυμα μετά την καθίζηση του συμπλόκου MCP -τανινών. Αφαιρώντας αυτές τις δύο τιμές, μπορεί να προσδιοριστεί το A280 (Ac-At) του συμπλόκου MCP - τανινών, στη συνέχεια, γίνεται αντιστοιχία των τιμών με την βοήθεια πρότυπης καμπύλης με κατεχίνη (mg/L). Για να βρεθεί η τελική συγκέντρωση τανινών το A280 πολλαπλασιάζεται με το 40.

2.3.5.3 Μέθοδος Harbertson – δείκτης στυπτικότητας

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα των τανινών να κατακρημνίζουν το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση και την αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) κι έμμεσα προσδιορίζεται η συγκέντρωση των τανινών.

Υλικά και εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα μέτρησης απορρόφησης από 300 ως 700 nm.
- Κυψελίδες υάλου με οπτική διαδρομή 1 cm
- Πρωτεϊνικό διάλυμα BSA 1 g/l
- Διάλυμα TEA-SDS
- Διάλυμα FeCl₃
- Model wine
- Διάλυμα A (200 mM οξικό οξύ, 170 mM NaCl , NaOH (pH= 4.9)

Πορεία : Αρχικά γίνεται αραιώση του δείγματος σε πρότυπο ρυθμιστικό διάλυμα, από το οποίο παίρνουμε 0,5 mL και προσθέτουμε 1 mL πρωτεϊνικού διαλύματος BSA. Ακολουθεί ανάδευση για 15 min και φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm.

Στο ίζημα που μένει προσθέτουμε 250 μl διαλυμα A και ακολουθεί για 5 min στις 13500 rpm.

Στο ίζημα που μένει προσθέτουμε 875μL διαλύματος TEA – SDS, αφήνεται σε ηρεμία 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί το ίζημα. Παραμένει επιπλέον 10 λεπτά σε ηρεμία και μετράται η απορρόφηση στα 510 nm. Έπειτα προστίθενται 125μL διαλύματος FeCl₃ και μετά από 10 min μετράται πάλι η απορρόφηση στα 510 nm. Η συγκέντρωση των τανινών υπολογίζεται από τη διαφορά των δύο απορροφήσεων ($A = A_2 - A_1$) και με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς επί την αραιώση και εκφράζεται σε mg/L οίνου. (Harbertson and Sprayd ,2006)

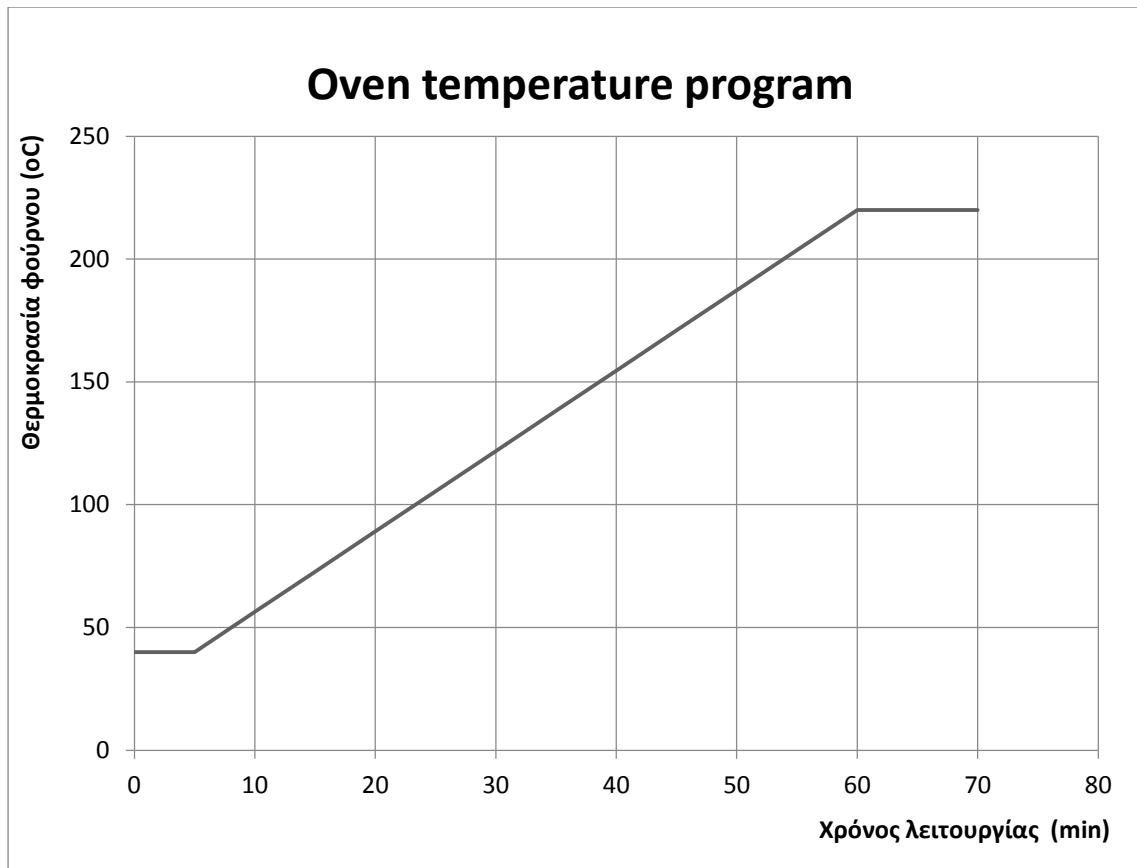
2.3.6 Εκτίμηση αρωματικού χαρακτήρα με χρήση αέριας χρωματογραφίας GC-FID

Για την ανάλυση των αρωματικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SPME (Solid Phase Micro Extraction) που θεωρείται απλή και χαρακτηρίζεται από επαναληψιμότητα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αρωματικών ενώσεων έγινε με GC-FID (Gas-Chromatography-Flame Ionization Detector), της εταιρείας Hewlett-Packard series II 5890. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το Ήλιο (He) με ρυθμό ροής $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν πολική DB-WAX (length 30m x 0.320mm I.D.), επικαλυμμένη με film 0.25 μm , στατικής φάσης.

Υλικά και εξοπλισμός

- GC-FID (Gas-Chromatography-Flame Ionization Detector)
- SUPELCO Solid Phase Micro-extraction Holder (Bellefonte, PA, USA) με ίνα τριστρωματικής σύνθεσης (SUPELCO SPME Fiber assembly 2cm, 50/30 μm divinylbenzene-carboxen-poly(dimethylsiloxane) (DVB-CAR-PDMS, gray)
- Διάλυμα 3-octanol
- Χλωριούχου Νάτριο (NaCl)

Πορεία : Σε γυάλινο vial SPME των 20ml (βιδωτό πώμα με septum), προστέθηκαν 7 ml του προς ανάλυση δείγματος οίνου, 3ml απιονισμένο νερό, 10ml του εσωτερικού προτύπου 3-octanol και 3g χλωριούχου νατρίου (NaCl, Sigma Aldrich). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα και παρέμεινε υπό ανάδευση στις 400rpm, για 10min σε υδατόλουτρο 35°C. Με το πέρας των 10min, εισήχθη η ίνα στο εσωτερικό του vial και απελευθερώθηκε ώστε να προσροφήσει τις πτητικές ενώσεις, και παρέμεινε για 30min, υπό ανάδευση. Τέλος, η ίνα μεταφέρθηκε στην υποδοχή έγχυσης (injector), όπου παρέμεινε για 10min ώστε να αποκολληθούν από την ίνα οι αρωματικές ενώσεις αλλά και να γίνει ο καθαρισμός της ίνας ώστε να είναι έτοιμη για το επόμενο δείγμα. Το 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.



Γράφημα : Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα

Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν.

2.3.7 Προσδιορισμός οξέων και αλκοολών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)

Η μέτρηση των σακχάρων και αλκοολών πραγματοποιήθηκε με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.

Υλικά και εξοπλισμός

- Αντλία (σταθερής ροής ,σταθερής πίεσης)
- Μονάδα εισαγωγής δείγματος (βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, αυτόματος δειγματολήπτης)
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτής
- Καταγραφικό

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

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 50 μL , γεμίζοντας την μέχρι τέλους με σκοπό την παντελής αποφυγή φυσαλίδων.

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

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

Ε) 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.

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

2.3.8 Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οργανοληπτικός έλεγχος που διεξήχθη, είχε στόχο την αξιολόγηση των ερυθρών οίνων του πειράματος που προέρχονται από την ποικιλία Αγιωργίτικο. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε από εκπαιδευμένους δοκιμαστές για να διακρίνουν διαφορές ανάμεσα στα παραγόμενους οίνους. Η διεξαγωγή του οργανοληπτικού ελέγχου έλαβε χώρα στο πιστοποιημένο εργαστήριο Cadmion υπό την επίβλεψη του χημικού - MSc Γιάννη Λίγκα και εφαρμόστηκε δική τους (in-house) μέθοδος οργανοληπτικής ανάλυσης με 10 αναλυτές η οποία επαναλήφθηκε 3 φορές κάτω από τις ίδιες συνθήκες με τους ίδιους δοκιμαστές, με διαφορετική κωδικοποίηση των δειγμάτων. Τα χαρακτηριστικά του οίνου που μελετήθηκαν ήταν η γεύση, η αίσθηση (στυφότητα), το χρώμα και το άρωμα. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε :

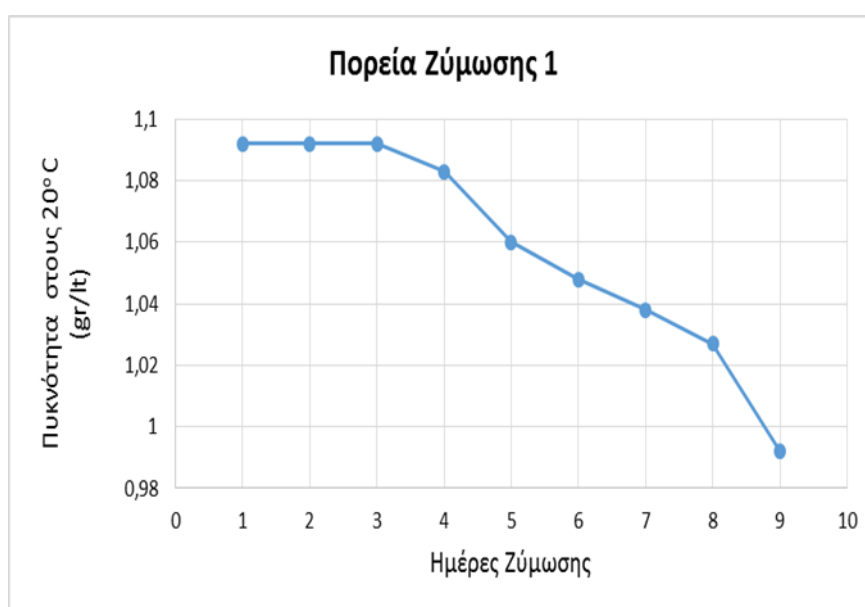
- α) ο φρουτώδης χαρακτήρας
- β) η οξύτητα
- γ) η στυφότητα
- δ) η επίγευση
- ε) το χρώμα

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.

3. Αποτελέσματα

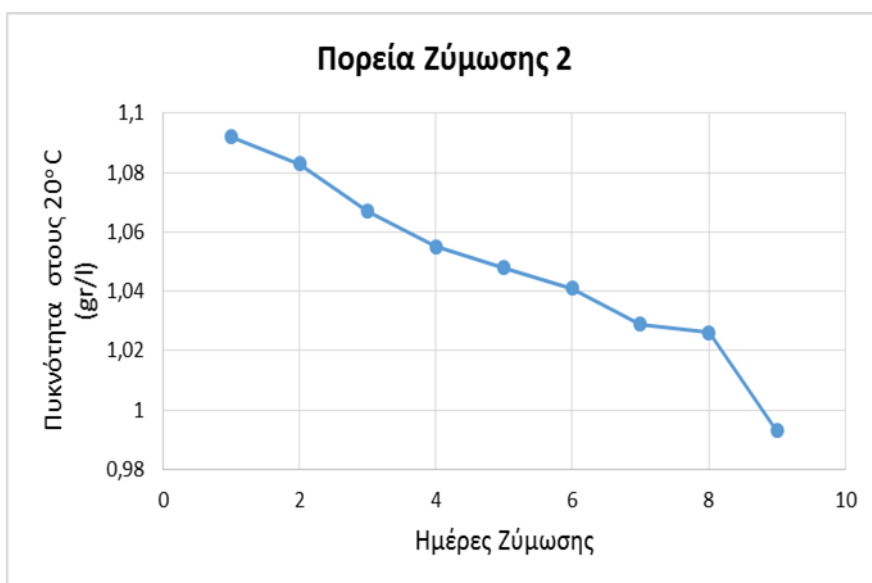
3.1 Πορεία Αλκοολικής Ζύμωσης

Η παρακολούθηση της πορείας της ζύμωσης έγινε με την παρακολούθηση της πυκνότητας μετρώντας το ειδικό βάρος. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται οι πορείες ζύμωσης ανάλογα με τον χρόνο περαιώσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης.



Διάγραμμα 1: Πορεία αλκοολικής ζύμωσης για τον οίνο που έγινε μηλογαλακτική πριν την αλκοολική ζύμωση

Στο διάγραμμα 1 αναπαρίσταται η πορεία του οινοποιητή όπου έγινε μηλογαλακτική ζύμωση πριν την αλκοολική ζύμωση. Αρχικά έγινε εμβολιασμός με τα γαλακτικά βακτήρια VINIFLORA NOVA της εταιρείας Chr Hansen (25 gr/hL) και με την πάροδο 48 ωρών ακολούθησε ο εμβολιασμός με τα επιλεγμένα στελέχη ζυμών SC22 της εταιρείας Fermentis (20 gr/hl). Για την θρέψη των ζυμομυκήτων την 2^η μέρα ζύμωσης προστέθηκε το θρεπτικό Fermicomplex organic της εταιρείας Dolmar (20 gr/hL) και την 5^η μέρα ζύμωσης προστέθηκε το θρεπτικό Fermicomplex All Road της εταιρείας Dolmar (20 gr/hL). Με τον αποχωρισμό των στέμφυλων ο οποίος πραγματοποιήθηκε με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης ο οίνος μεταφέρθηκε σε άλλον οινοποιητή ο οποίος θειώθηκε με πολύ μικρή ποσότητα μεταμπισουλφίτ (4 gr/hL) και κατόπιν σφραγίστηκε αεροστεγώς.



Διάγραμμα 2: Πορεία αλκοολικής ζύμωσης για τον οίνο που έγινε μηλογαλακτική μετά την αλκοολική ζύμωση

Στο διάγραμμα 2 αναπαρίσταται η πορεία του οινοποιητή όπου έγινε μηλογαλακτική ζύμωση μετά την αλκοολική ζύμωση. Αρχικά κατά την διαδικασία της αποβοστρύχωσης έγινε σταδιακά θείωση με μεταμπισουλφίτ (4 gr/ hL) για την αποφυγή οξειδώσεων. Μετέπειτα έγινε εμβολιασμός με τα επιλεγμένα στελέχη ζυμών SC22 της εταιρείας Fermentis (20 gr/hl). Για την θρέψη των ζυμομυκήτων την 2^η μέρα ζύμωσης προστέθηκε το θρεπτικό Fermicomplex organic της εταιρείας Dolmar (20 gr/hL) και την 5^η μέρα ζύμωσης προστέθηκε το θρεπτικό Fermicomplex All Road της εταιρείας Dolmar (20 gr/hL). Με τον αποχωρισμό των στέμφυλων ο οποίος πραγματοποιήθηκε με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης ο οίνος μεταφέρθηκε σε μικρότερους περιέκτες των 25L όπου σε αυτούς έγινε η μηλογαλακτική ζύμωση με εμβολιασμό η μη με εμπορικά γαλακτικά βακτήρια. Τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα VINIFLORA CINE (0.18gr/hL), VINIFLORA CH16 (0.15gr/hL), VINIFLORA OENOS (0,12gr/hL) της εταιρείας Chr Hansen. Με το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης οι οίνοι θειώθηκαν ελαφρώς με μεταμπισουλφίτ (8 gr/hL) και στην συνέχεια εμφιαλώθηκαν σε ασκούς.

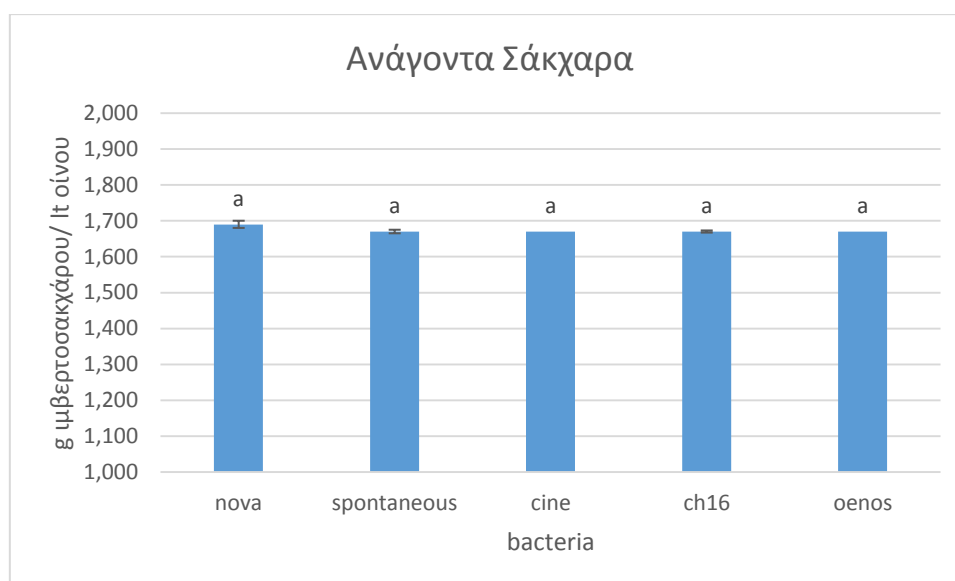
3.2 Βασικές αναλύσεις

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των βασικών αναλύσεων που διεκπεραιώθηκαν στους τελικούς οίνους

Δείγμα	Ε.Ο (Ph)	Ο.Ο. (g/l τρυγικό οξύ)	Πτητική Οξύτητα (g/l οξικό οξύ)	Αλκοολικός Βαθμός (%vol)	Ανάγοντα Σάκχαρα (g/l)
nova	3,75	4,7	0,27	12,56	1.69
spontaneous	3,75	4,7	0,17	12,56	1,67
cine	3,75	4,6	0,18	12,56	1,67
ch16	3,75	4,7	0,26	12,56	1,67
oenos	3,75	4,5	0,26	12,56	1,67

Πίνακας 2 : Πίνακας Βασικών Αναλύσεων

3.3 Ανάγοντα σάκχαρα



Γράφημα 1: Ανάγοντα σάκχαρα τελικών οίνων

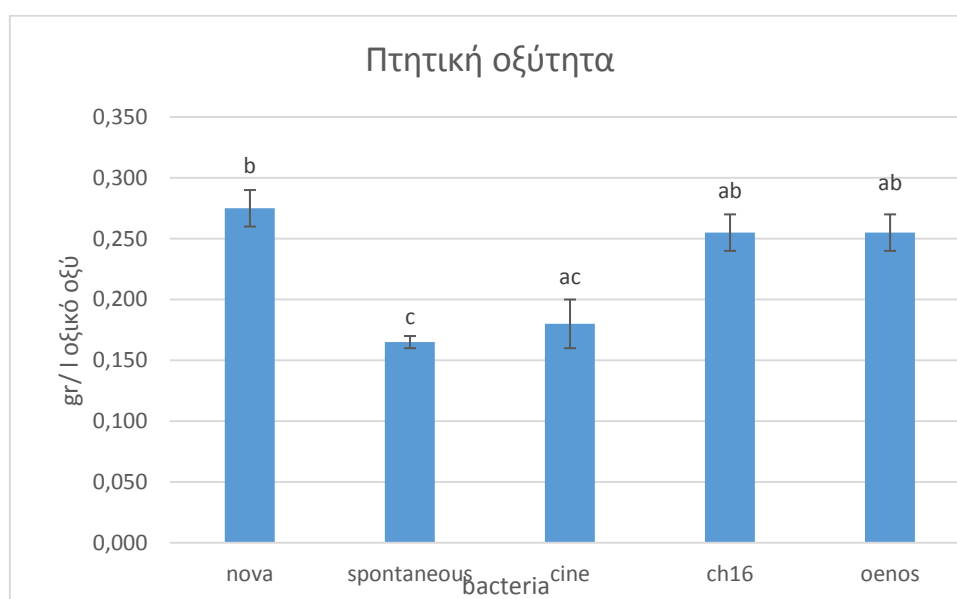
(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά. Όλοι οι οίνοι έχουν σχεδόν την ίδια συγκέντρωση αναγόντων σακχάρων. Αυτό σημαίνει ότι η αλκοολική ζύμωση στις διάφορες οινοποιήσεις έγινε το ίδιο

επιτυχημένα και η πραγματοποίησή της μηλογαλακτικής ζύμωσης πριν ή και μετά δεν είχε κάποιο αντίκτυπο στην αλκοόλη και τα ανάγοντα σάκχαρα. Επίσης αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει κάποιος ανασταλτικός ή παρεμποδιστικός παράγοντας όσον αφορά την οργανοληπτική ανάλυση και γενικότερα τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν.

3.5 Πτητική οξύτητα

Με το τέλος της αλκοολικής και μηλογαλακτικής ζύμωσης των πειραματικών οίνων ακολούθησε η ανάλυση της πτητικής οξύτητας.



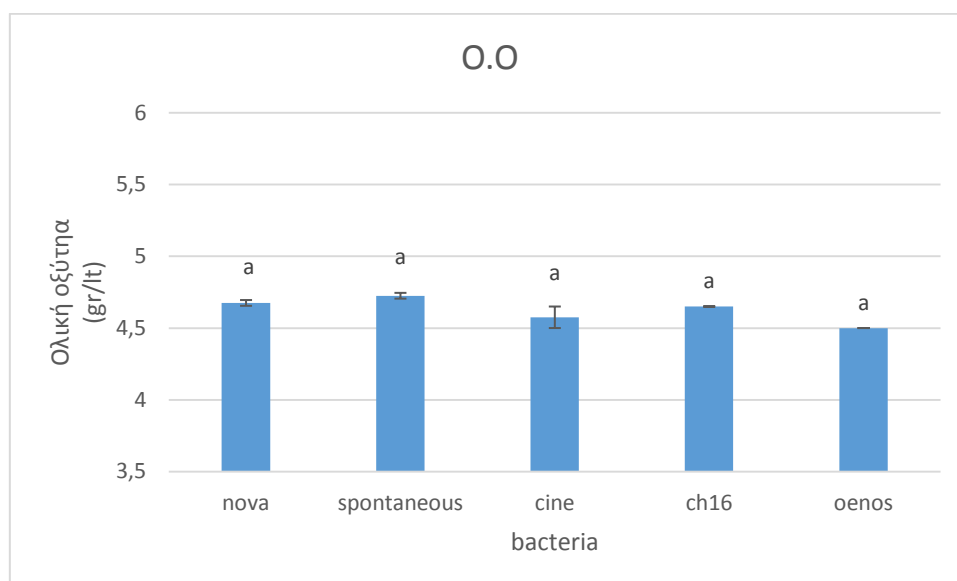
Γράφημα 2 : Πτητική οξύτητα τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε ότι ο οίνος nova έχει την πιο υψηλή μέτρηση πτητικής οξύτητας όμως είναι σε επιτρεπτά όρια , κάτι το οποίο αναμενόταν. Πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση αλλά και η αλκοολική ζύμωση χωρίς καθόλου προσθήκη θειώδους ανυδρίτη. Βέβαια εάν και στατιστικά διαφέρουν οι μετρήσεις είναι απολύτως λογικό καθώς κάθε γαλακτικό βακτήριο έχει διαφορετικά όρια παραγωγής οξικού οξέος ανάλογα με τον τρόπο λειτουργίας του. Σε όλες τις περιπτώσεις η πτητική οξύτητα είναι πολύ χαμηλή γεγονός που αποδεικνύει την ορθότητα των χειρισμών κατά την διάρκεια του πειράματος γεγονός πολύ δύσκολο κατά την διαχείριση τόσο μικρών ποσοτήτων.

3.6 Ολική Οξύτητα

Με τον όρο ολική οξύτητα ουσιαστικά αναφερόμαστε στο σύνολο των οξέων που περιέχονται στον οίνο. Όπως έχει αναφερθεί στην θεωρία το σύνολο των οξέων μπορούν να προέρχονται είτε από το σταφύλι είτε από την αλκοολική και την μηλογαλακτική ζύμωση. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται η Ο.Ο των οίνων με το τέλος της πειραματικής διαδικασίας.



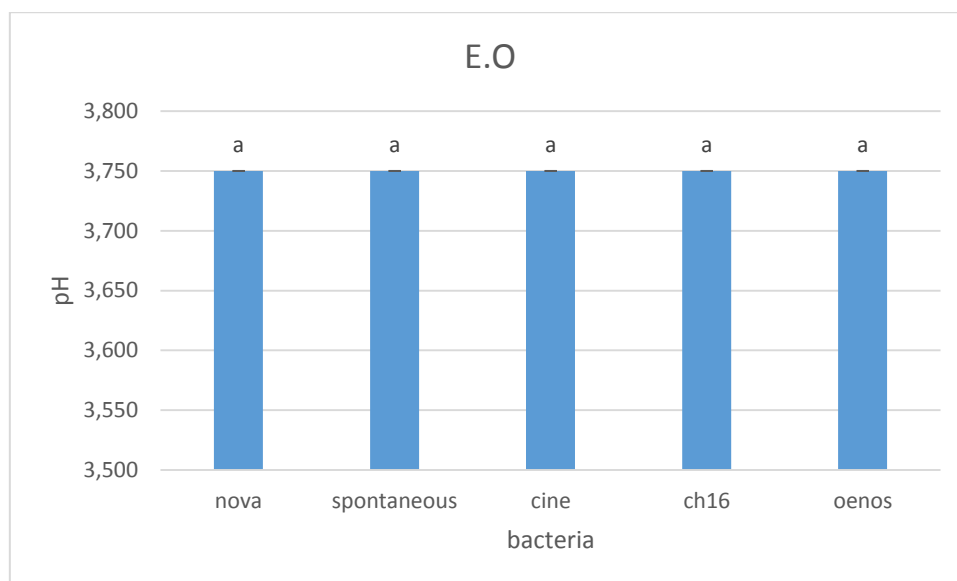
Γράφημα 3 : Ολική Οξύτητα τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Παρατηρείται ότι οι τιμές της ολικής οξύτητας των τελικών οίνων δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Ο οίνος ο οποίος έκανε μηλογαλακτική ζύμωση με γηγενή γαλακτικά βακτήρια (spontaneous) έχει την υψηλότερη τιμή Ο.Ο ενώ αντίθετα ο οίνος με την ονομασία oenos έχει την χαμηλότερη τιμή Ο.Ο.

3.7 Ενεργός Οξύτητα

Η ενεργός οξύτητα (pH) αναφέρεται κυρίως στην περιεκτικότητα του τρυγικού οξέος στον οίνο. Το pH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο χρώμα των οίνων και όταν είναι μικρό ασκεί και ευνοϊκή επίδραση στην ζωηρότητα του χρώματος. Η ποικιλία Αγιωργίτικο χαρακτηρίζεται από μέτριες εως υψηλές τιμές ενεργούς οξύτητας. Στο παρακάτω γράφημα πουριάζονται οι τελικές τιμές pH στους παραγόμενους οίνους.



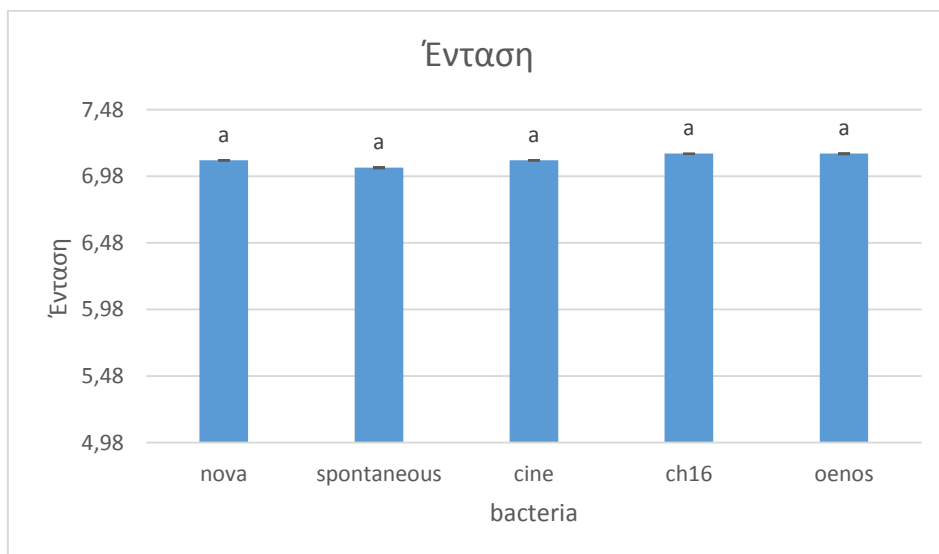
Γράφημα 4 : Ενεργός οξύτητα τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Η ενεργός οξύτητα στους τελικούς οίνους είναι ίδια (3,75). Επομένως δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

3.8 Ένταση – Απόχρωση

A) Ένταση

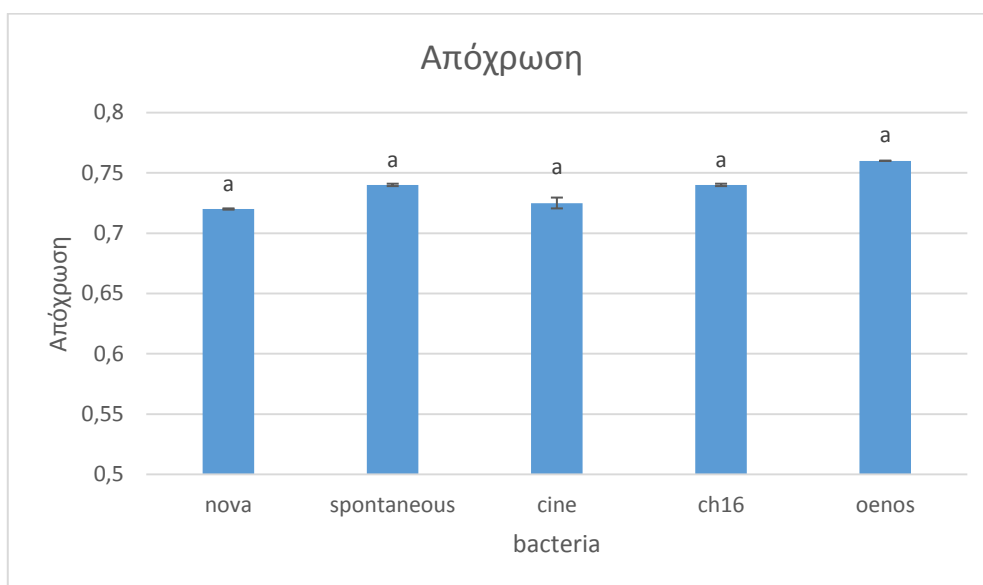


Γράφημα 5 : Ένταση χρώματος τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Η ένταση χρώματος των οίνων κυμαίνεται μεταξύ 7,045 και 7,1. Στατιστικά δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές. Την πιο μικρή ένταση χρώματος την παρατηρούμε στον οίνο με ονομασία spontaneous ενώ αντίθετα την πιο υψηλή στους οίνους με ονομασία ch16 , oenos.

B) Απόχρωση



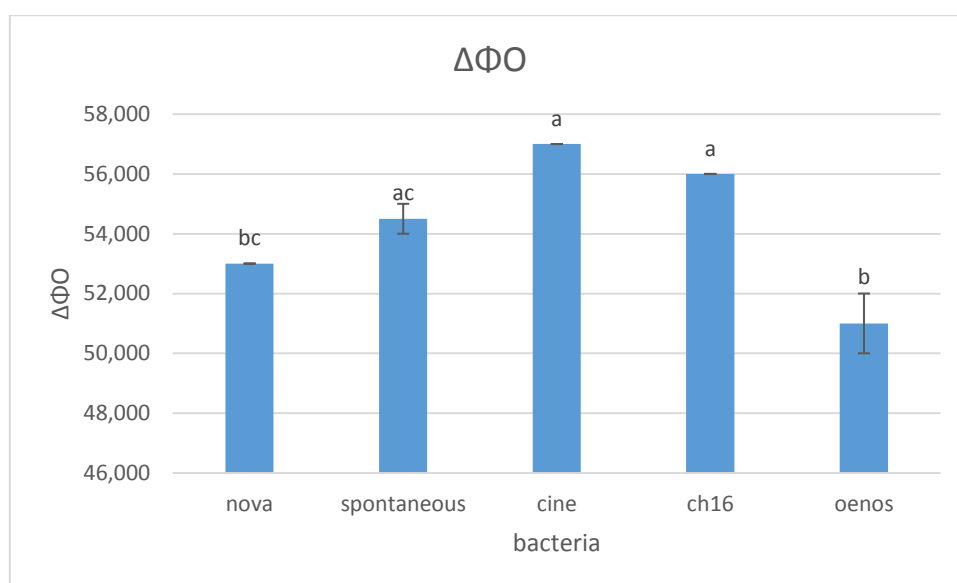
Γράφημα 6: Απόχρωση χρώματος τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Παρατηρείται ότι στατιστικά δεν υπάρχει σημαντική διαφορά. Η απόχρωση των οίνων κυμαίνεται από 0,725 έως 0,76. Την μεγαλύτερη τιμή απόχρωσης την παρουσιάζει ο οίνος με ονομασία oenos ενώ αντίθετα την χαμηλότερη τιμή ο οίνος με ονομασία nova.

3.9 Δείκτης φαινολικών ουσιών

Ο δείκτης φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ) αποτελεί μια εύκολη , γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο η οποία δίνει εκτίμηση της περιεκτικότητας των φαινολικών που περιέχει ένας οίνος χωρίς όμως να δίνει πληροφορίες για την κατηγορία των φαινολικών. Πρακτικά χρησιμοποιείται για να δείξει πόσο έντονο είναι το χρώμα σε ένα οίνο. Οι περιεκτικότητες των οίνων σε φαινολικές ουσίες παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα.

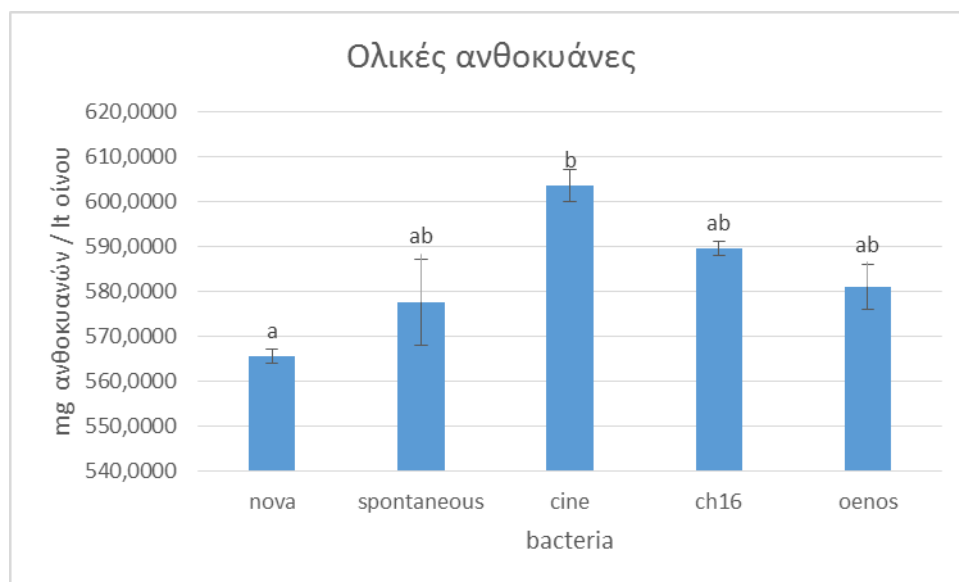


Γράφημα 7 : ΔΦΟ τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Παρατηρείται ότι όσον αφορά τις φαινολικές ουσίες υπάρχουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι τιμές του δείκτη κυμαίνονται σε ένα φάσμα από 51 έως 57 , με την μικρότερη τιμή να παρατηρείται στον οίνο με ονομασία oenos (51) ενώ αντίθετα η υψηλότερη στον οίνο ch16 (57) και cine (56). Οι διαφορές αυτές οφείλονται πιθανόν σε συσσωματώσεις και πολυμερισμούς που έγιναν κατά την διάρκεια της ΜΓΖ.

3.9 Ολικές Ανθοκυάνες

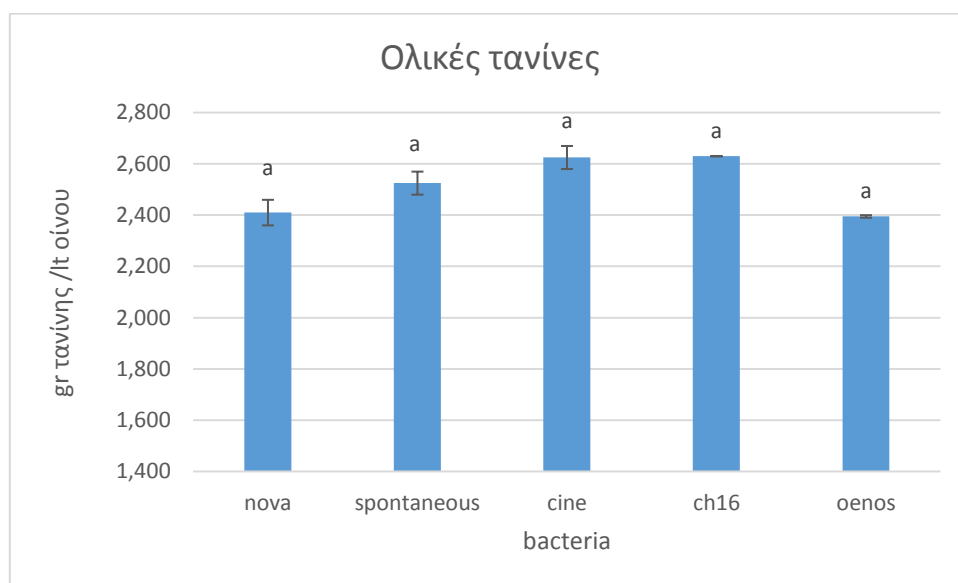


Γράφημα 8 : Ολικές ανθοκυάνες τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Παρατηρούμε ότι η υψηλότερη συγκέντρωση ανθοκυανών είναι στον οίνο cine ενώ αντίθετα η μικρότερη συγκέντρωση στον οίνο nova. Επίσης παρατηρείται στατιστική διαφορά μεταξύ των οίνων. Επομένως πιθανόν ο χρόνος διεξαγωγής καθώς και το γαλακτικό βακτήριο που επιτελεί την ΜΓΖ επηρεάζουν τις ολικές ανθοκυάνες στον οίνο.

3.11 Ολικές τανίνες



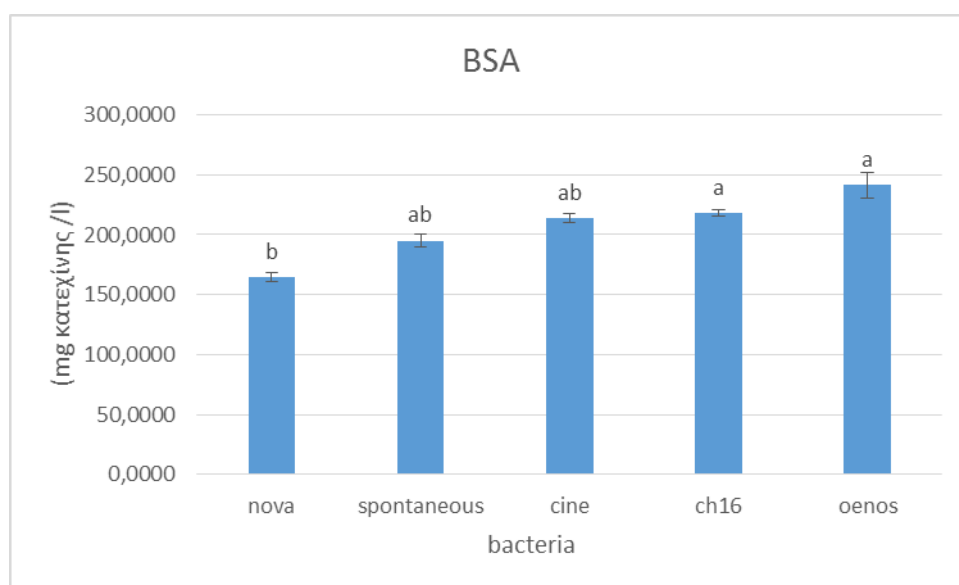
Γράφημα 9 : Ολικές τανίνες τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Όσον αφορά το σύνολο των τανινών δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Την υψηλότερη τιμή τανινών την εντοπίζουμε στους οίνους με ονομασία cine (2.625 gr τανίνης/ lt) και ch16 (2.63 gr/lt) ενώ οι οίνους oenos (2.39 gr τανίνης/ lt) και nova (2.41 gr τανίνης/ lt) παρουσιάζουν την χαμηλότερη συγκέντρωση τανινών.

3.12 Τανίνες με την μέθοδο Harbertson (BSA)

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου σχετίζονται με την στυφή αίσθηση στο στόμα και για αυτόν τον λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χημική εκτίμηση της στυπτικότητας ενός οίνου. Τα αποτελέσματα της μεθόδου αναπαρίστανται στο παρακάτω γράφημα.



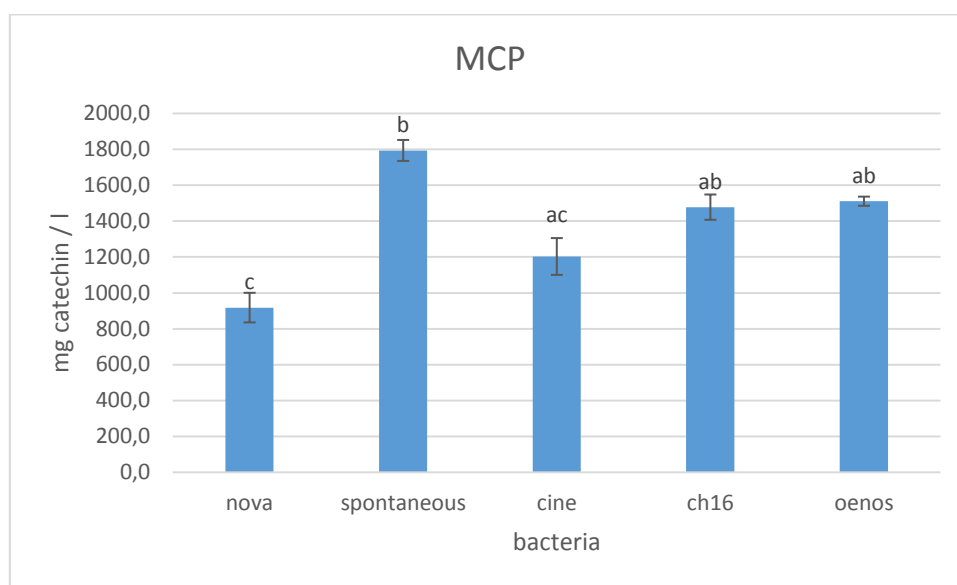
Γράφημα 11 : Τανίνες με την μέθοδο Harbertson τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Παρατηρείται ότι τα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Ο οίνος με oenos παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση οπότε αναμένουμε να είναι και πιο στυφός σε σχέση με τους άλλους. Αντίθετα ο οίνος με την χαμηλότερη συγκέντρωση είναι ο nova και αναμένεται να υπάρχει η μικρότερη αίσθηση στυφάδας στο στόμα. Βέβαια αυτά τα αποτελέσματα αναμένεται να εξακριβωθούν και από την οργανοληπτική ανάλυση.

3.13 Μέθοδος μέτρησης συμπυκνωμένων τανινών

Όπως έχει προαναφερθεί η συγκεκριμένη μέθοδος προσκοπεί στην καταβύθιση των τανινών με την βοήθεια ενός πολυμερούς το οποίο είναι η methyl cellulose. Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.



Γράφημα 10 : Αποτελέσματα μεθόδου methyl cellulose τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Μελετώντας τον παραπάνω γράφημα διαφαίνεται ότι ο οίνος στον οποίο έγινε μηλογαλακτική ζύμωση πριν την αλκοολική έχει πολύ μικρότερο αριθμό συμπυκνωμένων τανινών σε σχέση με τους άλλους. Μάλιστα μεταξύ των δειγμάτων παρατηρούνται στατιστικά διαφορές. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της μεθόδου BSA αναμένουμε ότι ο οίνος nova είναι αρκετά πιο «μαλακός» στο στόμα σε σύγκριση με τους άλλους. Την πιο υψηλή συγκέντρωση σε συμπυκνωμένες τανίνες την παρουσιάζει ο οίνος στο οποίο περαιώθηκε μηλογαλακτική ζύμωση με γηγενή γαλακτικά βακτήρια.

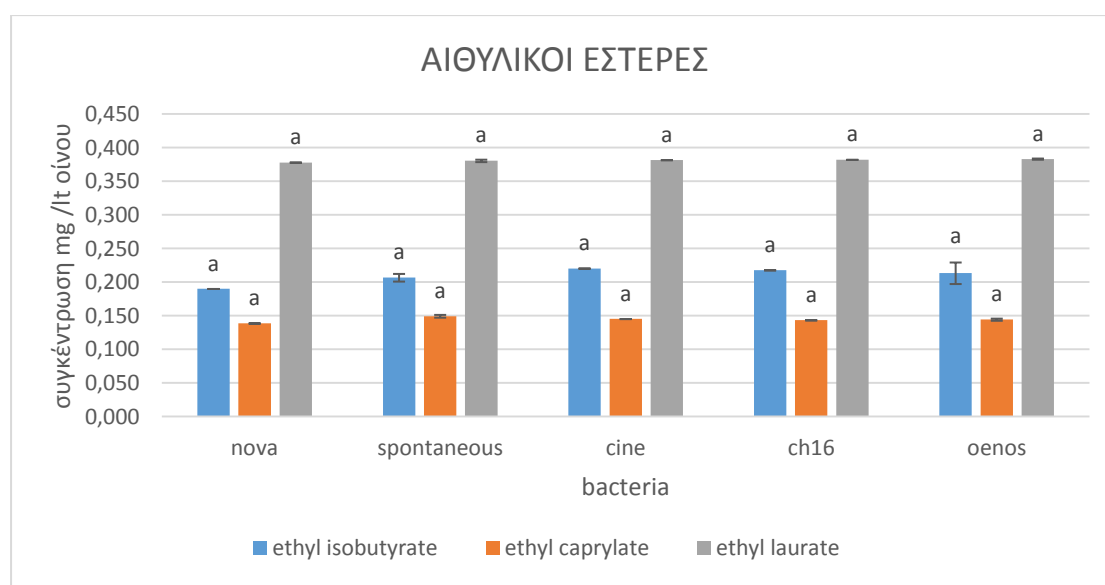
3.14 Αρωματικό προφίλ με GC – FID

Μετά την ανάλυση για το αρωματικό προφίλ με GC – FID οι ενώσεις οι οποίες ανιχνευθήκαν και τακτοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Ομάδα Αρωματικών Ενώσεων	Ενώσεις	
Αιθυλικοί Εστέρες ευθείας αλύσου	Ethyl butyrate (fresh fruits)	Ethyl caproate (fruity, strawberry)
	Ethyl caprylate (fruity)	Ethyl laurate (creamy)
Αιθυλικοί Εστέρες διακλαδωμένης αλύσου	Ethyl isobutyrate (pungent , fruity)	Ethyl -2-methyl butyrate (cherry , berry)
Οξικοί Εστέρες	Isoamyl acetate (sweet fruit)	

Πίνακας 3 : Ομάδες αρωματικών ενώσεων και ενώσεις αυτών, οι οποίες περιέχονται στους οίνους

Τα τελικά αποτελέσματα από την αέρια χρωματογραφία όσον αφορά τους αιθυλικούς εστέρες και πιο συγκεκριμένα το ethyl isobutyrate, ethyl caprylate , ethyl laurate αναπαρίστανται στο παρακάτω γράφημα.



Γράφημα 12 : Αιθυλικοί εστέρες τελικών οίνων

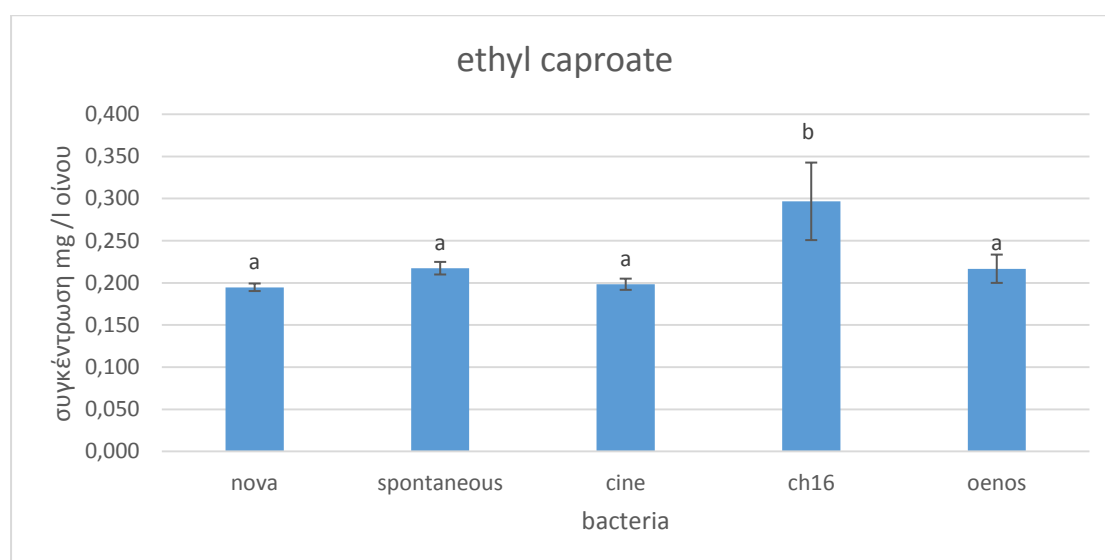
(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Όσον αφορά το ethyl isobutyrate (γράφημα 12) δεν παρατηρείται καμία στατιστική διαφορά. Την πιο χαμηλή συγκέντρωση την παρατηρούμε στον οίνο nova ενώ αντίθετα μπορούμε να πούμε ότι στους άλλους τέσσερις οίνους είναι περίπου στις ίδιες συγκεντρώσεις με μια απόκλιση τις τάξεως των 0,02 mg/ l οίνου.

Το ethyl caprylate (γράφημα 12) που είναι υπεύθυνο όπως αναφέρεται και στον πίνακα 3 για φρουτώδη αρώματα είναι περίπου στην ίδια συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα.

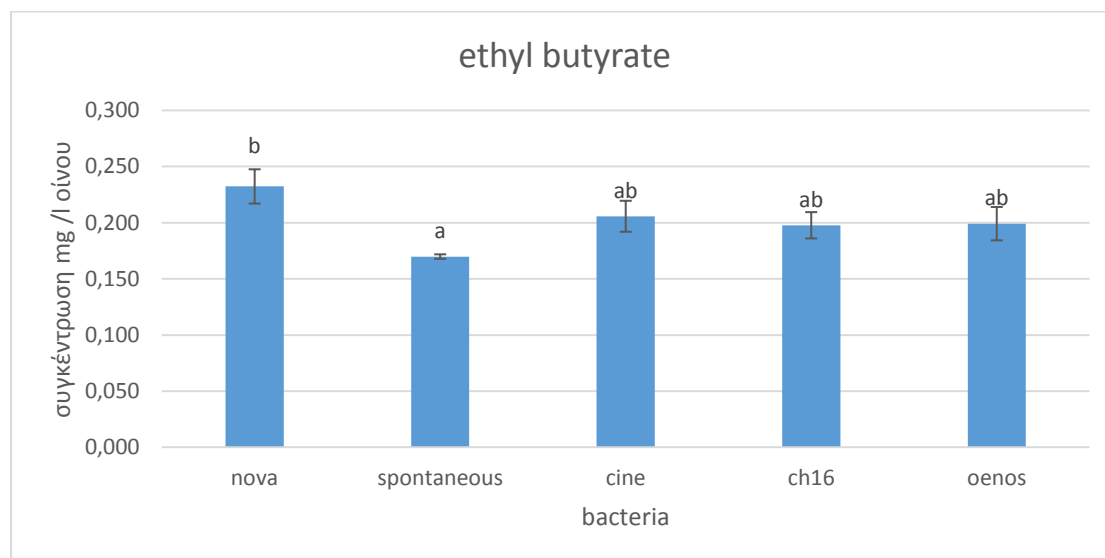
Τέλος το ethyl laurate (γράφημα 12) που είναι υπεύθυνο για πιο λιπαρά αρώματα είναι και αυτό περίπου στην ίδια συγκέντρωση σε όλους τους οίνους. Συνοψίζοντας να τονίσω ότι δεν παρατηρείται καμία στατιστική διαφορά ανάμεσα στα δείγματα .

Ο τελευταίος αιθυλικός εστέρας ευθείας αλυσίδας ο οποίος ταυτοποιήθηκε είναι ο ethyl caproate. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων όπου αναπαρίστανται στο παρακάτω (γράφημα 13) παρατηρείται ότι προκύπτει στατιστική διαφορά καθώς και ότι οι συγκεντρώσεις στους οίνους υπερβαίνουν το κατώφλι αντίληψης (0,014mg/l). Πιο συγκεκριμένα ο οίνος ch16 φαίνεται να διαφέρει στατιστικά σε σχέση με τους άλλους ως προς αυτήν την αρωματική ένωση. Οπότε αναμένεται το συγκεκριμένο δείγμα να έχει λίγο περισσότερο σε σχέση με τους άλλους το άρωμα της φράουλας και του φρούτου γενικότερα.



Γράφημα 13 : Αιθυλικός εστέρας ευθείας αλυσίδας, ethyl caproate τελικών οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

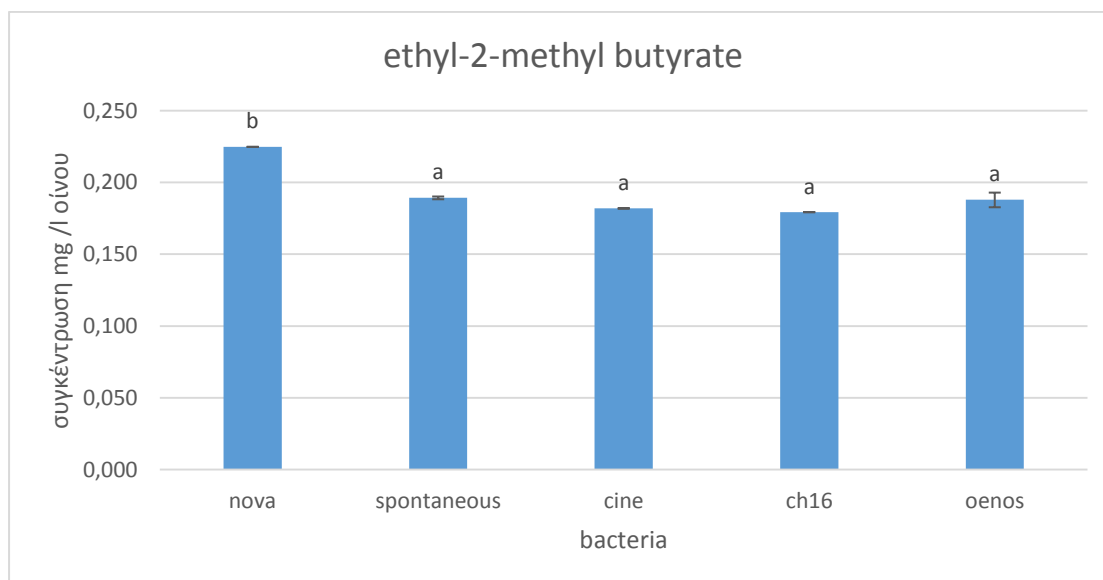
Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων όσον αφορά τους αιθυλικούς εστέρες ethyl butyrate και ethyl-2-methyl butyrate προκύπτει ότι υπάρχει στατιστική διαφορά. Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται στα παρακάτω διαγράμματα για κάθε ένωση ξεχωριστά.



Γράφημα 14 : Αιθυλικός εστέρας ευθείας αλύσου, ethyl butyrate τελικών οίνων (τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Το ethyl butyrate είναι μια αρωματική ένωση η οποία παραπέμπει σε αρώματα φρέσκων φρούτων. Όπως φαίνεται και στο παραπάνω γράφημα (14) υπάρχει στατιστική διαφορά η οποία παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και επιπλέον οι τελικές συγκεντρώσεις υπερβαίνουν το κατώφλι αντίληψης της εξεταζόμενης ένωσης (0,02mg/l). Αρχικά παρατηρείται ότι την μικρότερη συγκέντρωση την παρουσιάζει ο οίνος ο οποίος διενεργήθει αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση οπότε αναμένεται να είναι ο λιγότερο φρουτώδης. Στην συνέχεια παρατηρείται ότι στα δείγματα στα οποία διενεργήθει μηλογαλακτική ζύμωση μετά την αλκοολική ζύμωση με εμβολιασμό γαλακτικού βακτηρίου δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ τους όμως υπάρχει με τα άλλα δυο δείγματα. Η συγκέντρωση της αναλυμένης ουσίας είναι περίπου και στους τρεις οίνους ίδια και είναι μεγαλύτερη από τον οίνο spontaneous. Τέλος η υψηλότερη συγκέντρωση της συγκεκριμένης ένωσης βρίσκεται στον οίνο nova και

διαφέρει στατιστικά με όλα τα δείγματα. Συνοψίζοντας αναμένεται ο φρουτώδης χαρακτήρας να διαφέρει ανάλογα με τον χρόνο περαίωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης και τον εμβολιασμό η όχι για την διενέργεια της.

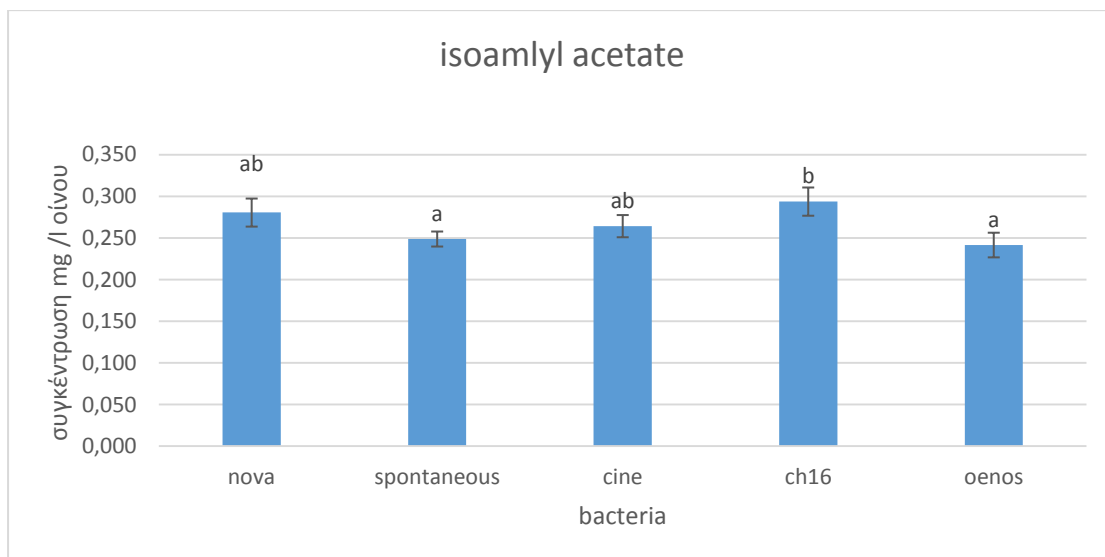


Γράφημα 15 : Αιθυλικός εστέρας διακλαδωμένης αλύσου, ethyl-2-methyl butyrate τελικών οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Όπως παρατηρείται στο παραπάνω γράφημα (15) παρουσιάζεται στατιστική διαφορά ανάμεσα στα αποτελέσματα για την συγκεκριμένη ένωση και επιπλέον οι τελικές συγκεντρώσεις υπερβαίνουν το κατώφλι αντίληψης της (0,003-0,018mg/l). Ο οίνος nova διαφέρει σε σχέση με τους άλλους οίνους. Η συγκέντρωση της αναλυμένης ένωσης είναι η πιο υψηλή και αυτό παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον εάν αναλογιστούμε τον χρόνο περαίωσης την μηλογαλακτικής ζύμωσης στο συγκεκριμένο δείγμα.

Από την κατηγορία των οξικών εστέρων ταυτοποιήθηκε η ένωση isoamyl acetate , τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα.



Γράφημα 16 : Οξικός εστέρας isoamyl acetate τελικών οίνων

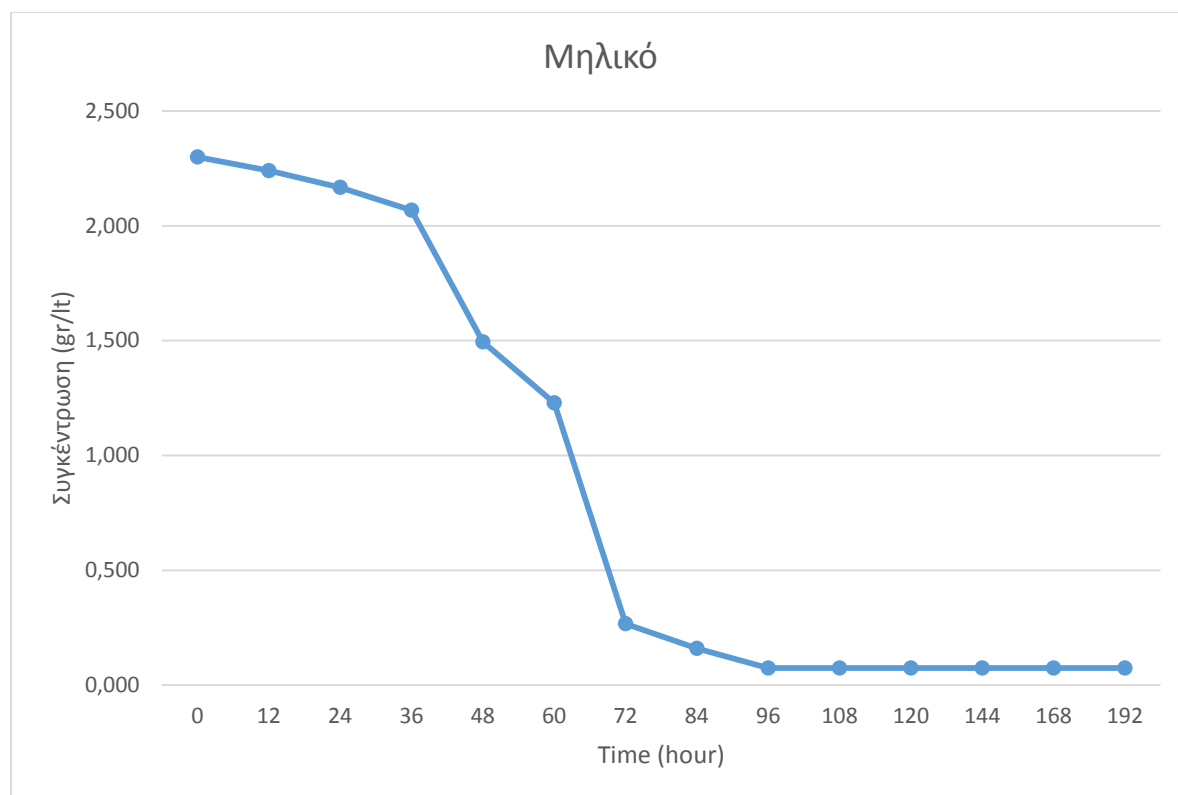
(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Εντοπίζεται ότι παρουσιάζονται στατιστικές διαφορές για την συγκεκριμένη ένωση (γράφημα 16). Την υψηλότερη συγκέντρωση την παρατηρούμε στον οίνο ch16 ενώ αντίθετα την χαμηλότερη στον οίνο oenos.

3.15 Μέτρηση οξέων και αλκοολών (γλυκερόλης) με HPLC

3.15.1 Πορεία μηλογαλακτικής ζύμωσης

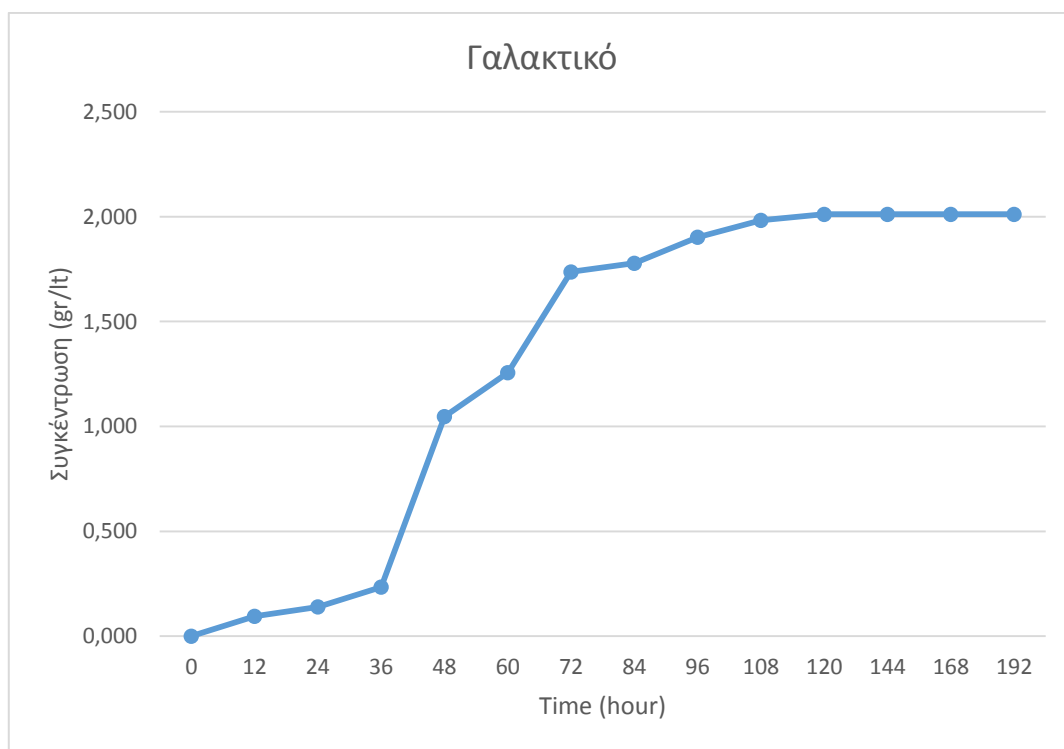
Στο παρακάτω διάγραμμα αναπαρίστανται η πορεία αποικοδόμησης του μηλικού οξέος για το δείγμα νονα στο οποίο έγινε ΜΓΖ πριν την ΑΖ. Παρατηρείται ότι η μηλογαλακτική ζύμωση ολοκληρώνεται με την πάροδο 84 ωρών και ουσιαστικά για περίπου 36 ώρες συνυπήρχε μαζί με την αλκοολική ζύμωση.



Διάγραμμα 3 : Αποικοδόμηση μηλικού οξέος για το δείγμα νονα

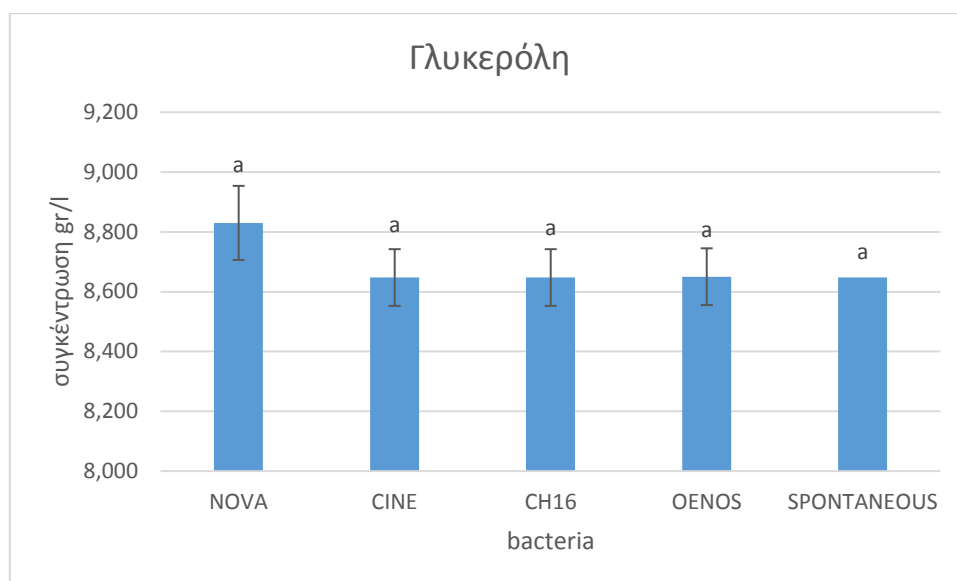
3.15.2 Πορεία σύνθεσης γαλακτικού οξέος

Στο παρακάτω διάγραμμα αναπαρίσταται η πορεία σύνθεσης του γαλακτικού οξέος για το δείγμα νονα στο οποίο έγινε ΜΓΖ πριν την ΑΖ. Παρατηρείται ότι σύνθεση γαλακτικού οξέος έχουμε και κατά την αλκοολική ζύμωση όμως σε πολύ μικρότερο ποσοστό απ' αυτό που παράγεται κατά την μηλογαλακτική ζύμωση. Ουσιαστικά παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο μέρος γαλακτικού οξέος παράγεται από την 36^η έως την 72^η ώρα ζύμωσης.



Διάγραμμα 4 : Σύνθεση γαλακτικού οξέος για το δείγμα νονα

3.15.3 Συγκέντρωση γλυκερόλης στους οίνους



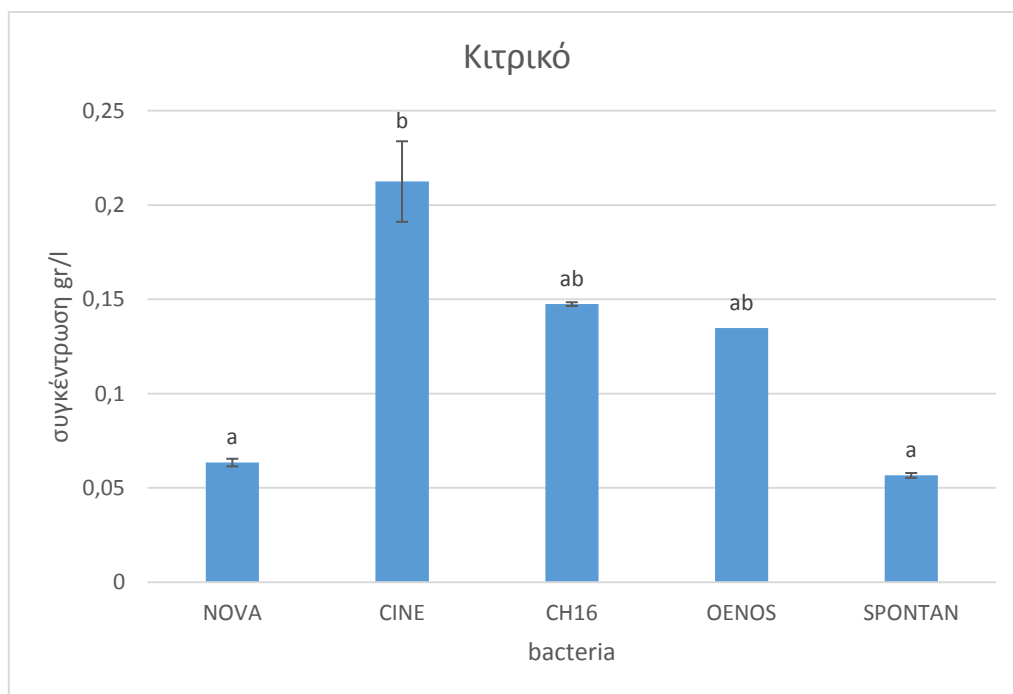
Γράφημα 17 : Συγκέντρωση γλυκερόλης στα τελικά δείγματα

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα παρατηρείται ότι η τελική συγκέντρωση γλυκερόλης δεν εμφανίζει σημαντικά στατιστική διαφορά. Η πιο μεγάλη συγκέντρωση γλυκερόλης παρατηρείται στον οίνο nova και αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η ζύμωση αργήσκει να ξεκινήσει εφόσον περαιώθηκε ΜΓΖ πρώτα. Αντίθετα στους υπολοίπους οίνους παρουσιάζει περίπου ίδια συγκέντρωση, που σημαίνει ότι η μηλογαλακτική ζύμωση στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν επηρεάζει την συγκέντρωση γλυκερόλης στον οίνο.

3.15.4 Συγκέντρωση κιτρικού οξέος

Η τελική συγκέντρωση κιτρικού οξέος στους τελικούς οίνου φαίνεται στον γράφημα που ακολουθεί.



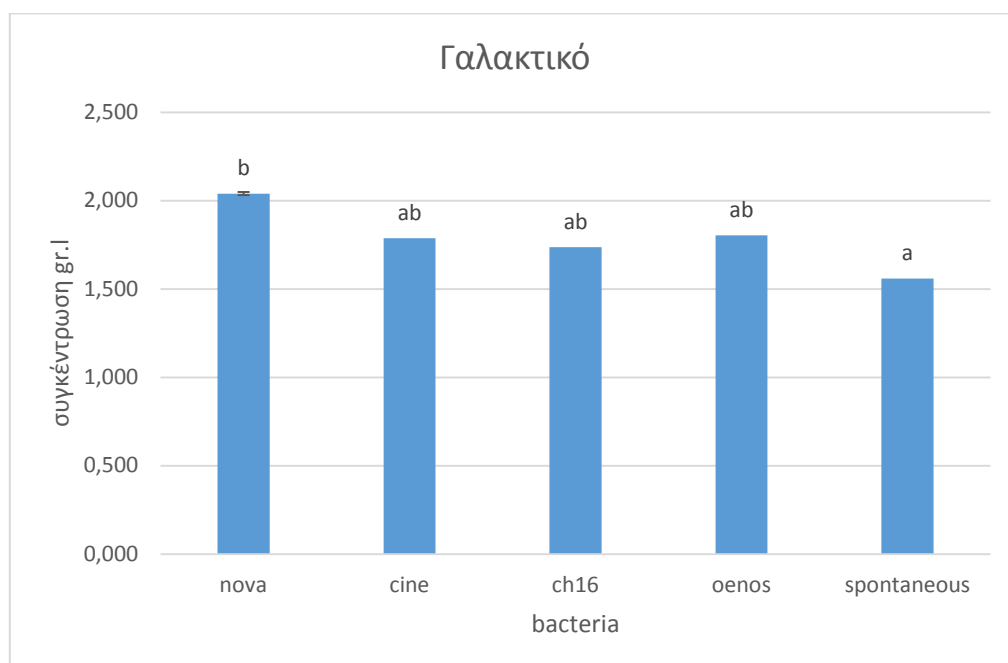
Γράφημα 18 : Συγκέντρωση κιτρικού οξέος στα τελικά δείγματα

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Παρατηρείται ότι το δείγμα cine διαφέρει στατιστικά με τα υπόλοιπα. Η συγκέντρωση στον οίνο cine είναι πολύ υψηλότερη σε σχέση με τους άλλους οίνους. Αυτό ερμηνεύεται στο ότι το γαλακτικό βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε δεν αποικοδομεί κιτρικό οξύ και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μικρή τιμή πτητικής οξύτητας καθώς και την μηδαμινή συγκέντρωση διακετυλίου. Επίσης τα γαλακτικά βακτήρια ch16 και oenos δεν αποικοδομούν ολόκληρη την ποσότητα κιτρικού οξέος οπότε αναμένεται να υπάρχει μικρότερη συγκέντρωση διακετυλίου καθώς και οξικού οξέος.

3.15.5 Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος

Στο ακόλουθο γράφημα παρουσιάζεται η τελική συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στους τελικούς οίνους.



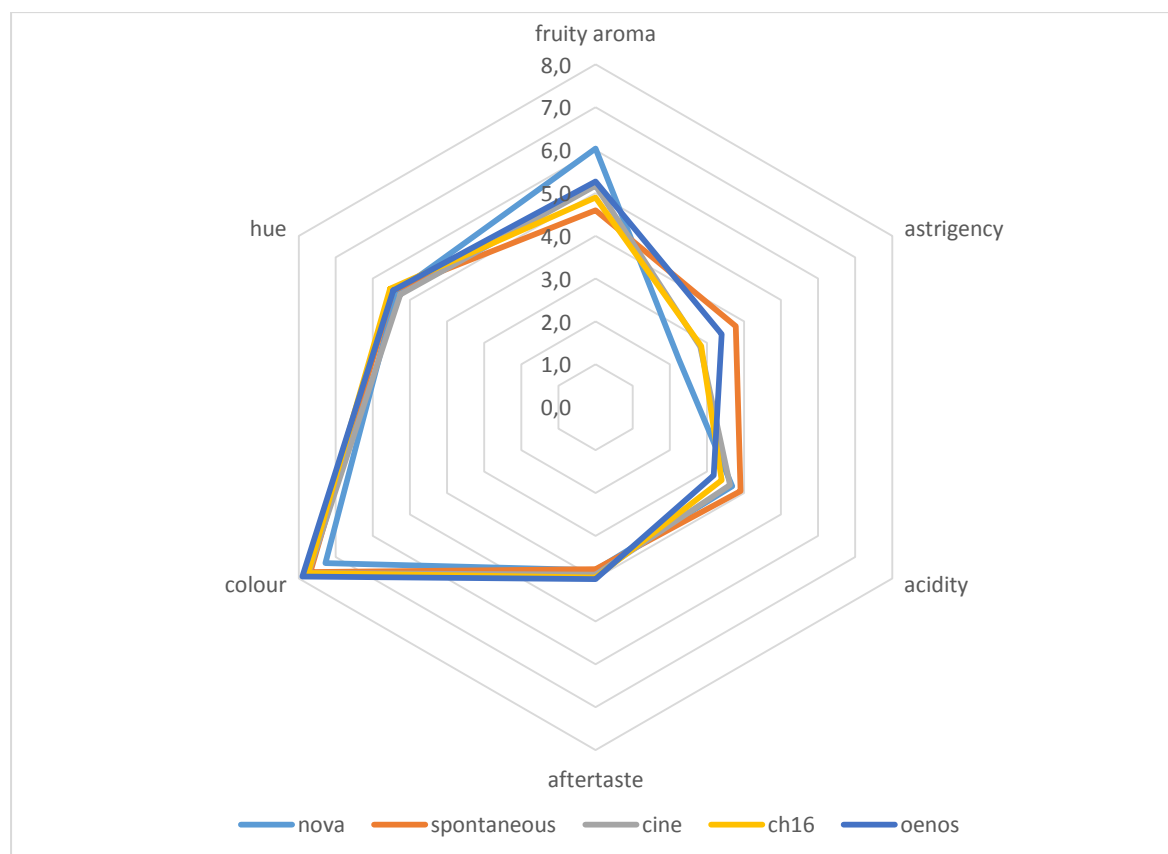
Γράφημα 19 : Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στα τελικά δείγματα

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Παρατηρείται ότι ανάμεσα στα δείγματα υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αρχικά παρατηρείται ότι την υψηλότερη συγκέντρωση την παρουσιάζει το δείγμα nova ενώ την χαμηλότερη το δείγμα spontaneous. Οι διαφορές ανάμεσα στις συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος οφείλονται στην διαφορετική δυνατότητα αποικοδόμησης του μηλικού οξέος από τα χρησιμοποιηθέν γαλακτικά βακτήρια

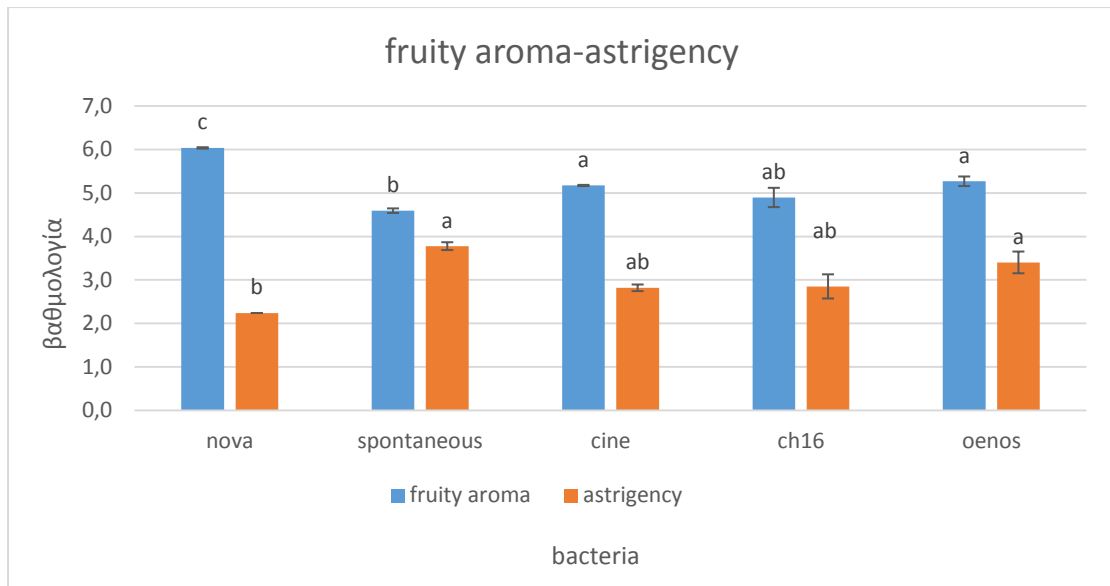
3.16 Οργανοληπτική ανάλυση

Στους παραχθέντες οίνους έγινε οργανοληπτικός έλεγχος με σκοπό να διαπιστωθούν διαφορές ανάμεσα στα δείγματα. Τα αποτελέσματα παρίστανται στο παρακάτω γράφημα και διάγραμμα.



Διάγραμμα 5 : Παρουσίαση οργανοληπτικών αποτελεσμάτων των οίνων

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα παρατηρείται ότι οι οίνοι παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες διαφορές όσο αφορά την στυφότητα και το φρουτώδες άρωμα. Επίσης ο οίνος spontaneous παρουσιάζει την μεγαλύτερη οξύτητα σύμφωνα με τους δοκιμαστές. Όσον αφορά το χρώμα παρατηρείται ότι ο οίνος nova κρίθηκε από τους αναλυτές ως ο πιο ανοιχτός ερυθρός χωρίς ωστόσο να διαφέρει ιδιαίτερα από τα άλλα δείγματα. Ενώ αντίθετα ο οίνος oenos παρουσιάζει το πιο βαθύ ερυθρό χρώμα. Τέλος δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές ως προς την επίγευση και την απόχρωση των αναλυθέντων δειγμάτων.



Γράφημα 20: Παρουσίαση οργανοληπτικών αποτελεσμάτων όσον αφορά των φρουτώδη χαρακτήρα και την αίσθηση στυφότητας των οίνων

(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b,c,d... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι υπάρχουν στατιστικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα όσον αφορά το φρουτώδες άρωμα και την αίσθηση στυφότητας.

Ο οίνος nova φαίνεται ότι κρίθηκε σύμφωνα με τους δοκιμαστές ως ο πιο φρουτώδες σε σχέση με τους άλλους οίνους. Ακολουθούν κατά σειρά οι οίνοι oenos , cine και ch16 ως προ το άρωμα φρούτου. Αντίθετα ο λιγότερο φρουτώδες κρίθηκε ο spontaneous.

Όσον αφορά την αίσθηση στυφότητας ο οίνος nova κρίθηκε και πάλι ως ο λιγότερος στυφός στο στόμα χωρίς όμως να επηρεαστεί η επίγευση του σε σχέση με τους άλλους οίνους. Ακολουθούν κατά αυξανόμενη σειρά οι οίνοι cine, ch16 και oenos. Ενώ ο πιο στυφός κατατάσσεται ο οίνος spontaneous.

4. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό να μελετήσει την επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε οίνο που προέρχεται από την ποικιλία Αγιωργίτικο. Επιπλέον στα πλαίσια αυτής της διατριβής εφαρμόστηκε και μια νέα τάση που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια και αυτή είναι η διενέργεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης πριν την αλκοολική ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα εφαρμόστηκαν τρία (3) διαφορετικά στελέχη του *Oenococcus Oeni* (εμπορικά ονόματα : ch16, cine, oenos) για την περαίωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης μετά την αλκοολική ζύμωση. Αντίθετα για την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης πριν την αλκοολική χρησιμοποιήθηκε το γαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus Plantarum* (εμπορικό όνομα : nova). Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο έλαβε χώρα η μηλογαλακτική ζύμωση αυθόρμητα από γηγενή γαλακτικά βακτήρια.

Όλες οι επεμβάσεις έγιναν εις διπλούν και οι δοσολογίες εμβολιασμού που εφαρμόστηκαν ήταν οι προτεινόμενες ποσότητες από την εταιρεία Chr Hansen. Επίσης ο χρόνος εκχύλισης (skin contact) κατά την οινοποίηση είναι ίδιος για όλες τις επεμβάσεις.

Οι αναλύσεις οι οποίες έγιναν αποσκοπούσαν στην πλήρη εξακρίβωση των χημικών αλλαγών οι οποίες προκύπτουν από την μηλογαλακτική ζύμωση και ειδικότερα από κάθε στέλεχος γαλακτικού βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε. Επίσης διενεργήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος από το εκπαιδευμένο πάνελ δοκιμαστών της εταιρείας Cadmion - I. Λιγκας & Σια Ο.Ε. με σκοπό τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων των αναλύσεων που έγιναν καθώς και την εύρεση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των τελικών οίνων.

Συνοψίζοντας σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων που διενεργήθηκαν μπορούν να εκφραστούν τα εξής αποτελέσματα :

Ξεκινώντας από την αλκοολική ζύμωση που όπως έχει προ ειπωθεί έγινε σύμφωνα με τις ίδιες συνθήκες για όλες τις επεμβάσεις – δείγματα. Δεν παρατηρήθηκε καμία ανωμαλία κατά την διάρκεια της και πρέπει να τονιστεί ότι η προσθήκη του γαλακτικού βακτηρίου στον οινοποιητή στο οποίον περαιώθηκε μηλογαλακτική ζύμωση πριν την αλκοολική δεν είχε κανένα αντίκτυπο στην αλκοολική ζύμωση και την ομαλή πορεία της.

Με την ολοκλήρωση των βασικών αναλύσεων προκύπτει ότι τα τελικά προϊόντα δεν διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά το ειδικό βάρος, τα ανάγοντα σάκχαρα και τον αλκοολικό τίτλο. Επίσης όσον αφορά την ενεργό οξύτητα και την ολική οξύτητα δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων των τελικών οίνων.

Όσον αφορά την ένταση και απόχρωση των τελικών οίνων δεν παρατηρείται καμία στατιστική διαφορά μεταξύ των τελικών οίνων. Επίσης δεν παρατηρείται καμία διαφορά μεταξύ των τελικών οίνων όσον αφορά τα αποτελέσματα από την ανάλυση των ολικών τανινών. Όμως σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης για τις ολικές ανθοκυάνες παρατηρούνται σημαντικά στατιστικές διαφορές αναμεσα στα δείγματα. Ειδικότερα ο οίνος στον οποίο έγινε μηλογαλακτική ζύμωση έχει την μικρότερη συγκέντρωση σε ανθοκυάνες κάτι που είναι πιθανόν να οφείλεται στο χρόνο διεξαγωγής της μηλογαλακτικής ζύμωσης καθώς κατά την διάρκεια αυτής είναι πιθανόν να δημιουργηθεί κατακρήμνιση τρυγικών αλάτων που είναι δεσμευμένα με φαινολικά. Αυτό συμβαίνει καθώς πολλές φορές κατά την αποικοδόμηση του L-μηλικού οξέος ελευθερώνεται ποσότητα καλίου που στην συνέχεια ενώνεται με τρυγικό οξύ και κατά την καταβύθιση τους συμπαρασύρουν και φαινολικά. Η ποσότητα του L-μηλικού οξέος που αποικοδομήθηκε κατά την ΜΓΖ πριν την ΑΖ είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την συμβατική διενέργεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης καθώς κατά την διενέργεια της ΑΖ παρατηρείται μικρή μείωση της συγκέντρωσης του L-μηλικού οξέος από βακτήρια κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Την υψηλότερη συγκέντρωση ανθοκυανών την παρατηρούμε στον οίνο μάρτυρα.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την μέτρηση των συμπυκνωμένων τανινών με Methyl cellulose μπορούμε να πούμε ότι αλληλοσυνδέονται με τα αποτελέσματα για τις ολικές ανθοκυάνες. Επίσης είναι πιθανόν η εκχύλιση φαινολικών από τον φλοιό των ραγών κατά την οινοποίηση στον οίνο να είναι μειωμένη σε σύγκριση με τους άλλους οίνους καθώς δεν είχαμε παραγωγή αλκοόλης από την πρώτη μέρα, οπότε υπήρξε πιο «φιλική» εκχύλιση στον οίνο καθώς η αλκοόλη δρα ως «καταλύτης» στην συγκεκριμένη διεργασία. Την χαμηλότερη συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών την παρατηρούμε στον οίνο στον οποίο έγινε μηλογαλακτική πριν την αλκοολική ζύμωση. Αντίθετα η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρείται στον οίνο μάρτυρα ενώ στους οίνους που εμβολιάστηκαν με γαλακτικά βακτήρια εντοπίζεται ότι έχουν ενδιάμεσες τιμές σε σχέση με τους προαναφερόμενους που δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

Η χημική εκτίμηση της στυπτικότητας έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Harbertson. Την μικρότερη τιμή στυπτικότητας την παρουσίασε ο οίνος στο οποίο έγινε ΜΓΖ πριν την αλκοολική ζύμωση. Επομένως ο συγκεκριμένος οίνος αναμένεται να έχει την μικρότερη αίσθηση στυφάδας σε σχέση με τους υπόλοιπους οίνους. Οι διαφορές αυτές μεταξύ των δειγμάτων όσον αφορά την χημική εκτίμηση των τανινών αλλά και των ανθοκυανών είναι πιθανόν να οφείλονται σε συσσωματώσεις και πολυμερισμούς που έγιναν κατά την διάρκεια της ΜΓΖ.

Για τον προσδιορισμό και ποσοτικοποίηση του αρωματικού χαρακτήρα των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού (GC-FID). Από την έκφραση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι ο οίνος με το γαλακτικό βακτήριο ch16 παρουσιάζει σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τους άλλους οίνους ως προς την αρωματική ένωση ethyl caproate η οποία παραπέμπει σε αρώματα φράουλας. Επίσης στον οίνο με το γαλακτικό βακτήριο nona αναμένεται είναι πιο έντονο το άρωμα του κερασιού και μούρου καθώς η ένωση που τα εκφράζει (ethyl-2-methyl butyrate) υπερισχύει σε σύγκριση με τα άλλα δείγματα. Γενικότερα ερμηνεύοντας τα αποτελέσματα, οι οίνοι στους οποίους έγινε ελεγχόμενη ΜΓΖ παρουσιάζονται πιο πλούσιοι και πολύπλοκοι αρωματικά με πιο έντονα τα αρώματα φρούτων κάτι το οποίο επιζητάτε από οίνους που προέρχονται από την ποικιλία Αγιωργίτικο.

Για τον προσδιορισμό των οξέων χρησιμοποιήθηκε μέθοδος που βασίζεται στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Το πιο ενδιαφέρον αποτέλεσμα σχετίζεται με την παρουσία κιτρικού οξέος που βρίσκεται στους τελικούς οίνους. Ουσιαστικά γνωρίζουμε ότι οίνοι στους οποίους έχει γίνει ΜΓΖ η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος είναι σχεδόν μηδαμινή διότι αυτό αποικοδομείται από τα γαλακτικά βακτήρια με αποτέλεσμα την παραγωγή οξικού οξέος και συνεπώς αύξηση της πτητικής οξύτητας καθώς επίσης και την παραγωγή διακετυλίου που προσδίδει αρώματα βουτύρου, καραμέλας. Το γαλακτικό βακτήριο με την εμπορική ονομασία cine όμως δεν αποικοδόμησε σχεδόν καθόλου κιτρικό οξύ και αυτό εκφράστηκε ως αποτέλεσμα με την μικρή τιμή της πτητικής οξύτητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτήν την πληροφορία την δηλώνει και η εταιρεία που το παράγει όμως επαληθεύθηκε και πειραματικά. Επίσης τα γαλακτικά βακτήρια ch16 και oenos δεν αποικοδομούν ολόκληρη την ποσότητα κιτρικού οξέος οπότε παράγεται μικρότερη συγκέντρωση διακετυλίου. Τα παραπάνω αποτελέσματα για τα γαλακτικά βακτήρια με ονομασία cine, ch16, oenos μπορούν να αιτιολογηθούν, καθώς κατά την εργαστηριακή επιλογή και απομόνωση τους που έγινε από την εταιρεία παραγωγής τους, πιθανότατα να επιλέχθηκαν

στελέχη του *Oenococcus oeni* στα οποία απουσιάζει μερικώς ή ολικώς η παρουσία των ενζύμων που ευθύνονται για την αποικοδόμηση του κιτρικού οξέος.

Τέλος όσον αφορά τον οργανοληπτικό έλεγχο προκύπτει ότι τα δείγματα στο οποία έγινε ελεγχόμενη ΜΓΖ είναι πιο φρουτώδη όσον αφορά το άρωμα και επίσης έχουν μικρότερη αίσθηση στυφάδας. Πιο συγκεκριμένα ο οίνος με το γαλακτικό βακτήριο *Oenococcus oeni* προκύπτει ότι είναι πιο φρουτώδης σε σχέση με τους άλλους και λιγότερο στυφός. Αντίθετα ο μάρτυρας είναι ο λιγότερο φρουτώδης και ο περισσότερο στυφός σε σύγκριση με τους άλλους. Όσον αφορά τα γαλακτικά βακτήρια *ch16*, *cine*, *Oenococcus oeni* προκύπτει ότι περισσότερο στυφό και φρουτώδες είναι το δείγμα *Oenococcus oeni*.

Συνεπώς από την παρούσα διπλωματική διατριβή μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα :

- Η ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση συνίσταται καθώς δημιουργεί πιο προσεγμένους οίνους τόσο οργανοληπτικά (αρωματικά, γευστικά) όσο και μικροβιολογικά.
- Η μηλογαλακτική ζύμωση πριν την αλκοολική ζύμωση δημιουργεί οίνους φρουτώδης και με χαμηλή αίσθηση στυφάδας οπότε θα ήταν ιδανική τεχνική για φρέσκους οίνους. Επιπλέον θα ήταν δυνατόν να παραχθούν οίνοι χωρίς την παρουσία θειώδους με την συγκεκριμένη τεχνική. Επίσης δεν παρατηρήθηκε κάποια αρνητική λειτουργία των γαλακτικών βακτηρίων στο γλεύκος που θα επέφερε ανεπανόρθωτες βλάβες στο τελικό προϊόν.
- Το γαλακτικό βακτήριο *cine* είναι ιδανικό για φρέσκους οίνους και για οίνους που μετά την αλκοολική ζύμωση παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση οξικού οξέος καθώς δεν αποικοδομεί το κιτρικό και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή δημιουργίας διακετυλίου και οξικού οξέος.
- Τα γαλακτικά βακτήρια *Oenococcus oeni* και *ch16* θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για οίνους παλαιώσης και για φρέσκους οίνους δίνοντας εξαιρετικά αποτελέσματα καθώς δεν αποικοδομούν ολόκληρη την ποσότητα κιτρικού οξέος δημιουργώντας οίνους με μέτρια συγκέντρωση διακετυλίου.

5. Βιβλιογραφία

5.1 Ελληνική βιβλιογραφία

Berg J.M., Tymoczko J.L. L. And Stryer (2001) Βιοχημεία Τόμος I , Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Κουράκου–Δραγώνα, Σ. (1998). Θέματα Οινολογίας. Αθήνα: Τροχαλία.

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

Τσακίρης (1998). Οινολογία.. Εκδόσεις Ψυχάλου , Αθήνα

Τσέτουρας, Π. (2008). Οινοτεχνία, Η Επιστήμη του κρασιού στην πράξη. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.

Σταυρακάκης Μ. (2010) Αμπελογραφία , Εκδόσεις Τροπή , Αθήνα

Σουφλερός, Ε. (1997). Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τομός Ι. Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.

Σουφλερός, Ε. (1997). Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τομός ΙΙ. Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.

5.2 Ξένη Βιβλιογραφία

Caroline E. Abrahamse, Eveline J. Bartowsky (2011). Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: influence on chemical composition

Bartowsky, E.J., Costello, P. & Henschke, P.A., (2002b). Management of malolactic fermentation - wine flavour manipulation.

Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., (2004). The 'buttery' attribute of wine-diacetyl desirability, spoilage and beyond.

Costantini, A., García-Moruno, E., & Moreno-Arribas, M. V. (2009). Biochemical transformations produced by malolactic fermentation. In *Wine chemistry and biochemistry*. Springer New York.

P.J. Costello, I.L. Francis and E.J. Bartowsky. (2012). Variations in the effect of malolactic fermentation on the chemical and sensory properties of Cabernet Sauvignon wine: interactive influences of *Oenococcus oeni* strain and wine matrix composition.

Davis, C. R., Wibowo, D. J., Lee, T. H., & Fleet, G. H. (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Applied and Environmental Microbiology*.

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.

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.

Grimaldi, A., Bartowsky, E. and Jiranek, V. (2005) A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*.

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

Harbertson F. and Adams J.A. (2002). Tannins in skins and seeds of Cabernet Sauvignon , Syrah , Pinot noiri berries during ripening

Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology 1 & 2* . West Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd.

Herjavec, S., Tupajić, P. & Majdak, A., (2001). Influence of malolactic fermentation on the quality of Riesling wine

Kunkee , R.E. (1967) Malo-lactic fermentation.

Kunkee, R.E. (1974) malo-lactic fermentation and winemaking. In:Chemistry of winemaking , Washington, DC

Kunkee, R.E., C.S. Ough and M.A.Amerine. (1964) Induction of malo-lactic fermentation by inoculation of must and wine with bacteria.

Lerm E, Engelbrecht L, du Toit M (2010) Malolactic fermentation: the ABC's of MLF.

Lonvaud-Funel, A., (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria.

Lonvaud-Funel, A., (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine.

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.

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

Matthews, A.H., Grbin, P.R. & Jiranek, V., (2006). A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology.

Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). Wine chemistry and biochemistry , New York: Springer.

Morenzoni R. (1974). The Enzymology of Malo-Lactic Fermentation. In:Chemistry of winemaking, Washington, DC

Krista M. Sumbly ¹, Vladimir Jiranek ¹, Paul R. Grbin (2013). Ester synthesis and hydrolysis in an aqueous environment, and strain specific changes during malolactic fermentation in wine with *Oenococcus oeni*.

Rankine , B.C. (1977) Developments in malo-lactic fermentation of Australian red table wines.

Rapp , A . and Mandery. "Wine aroma". Experimentia 1986

Ronald S. Jackson. (2008) Wine Science. Principles and Applications. Third Edition Elsevier Inc Canada

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

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. & Pretorius, I.S., (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour.

Zafrilla P. , Morillas J., Mulero J., Cayuela J .M., Marinez-Cacha A., Pardo F. (2003) . Change during storage in conventional and ecological wine : Phenolic content and antioxidant activity.

Ugliano, M., Genovese, A. & Moio, L., (2003). Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*.

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*.

Zamora, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation. In Wine Chemistry and Biochemistry (pp. 3-26). Springer New York.

6. Ηλεκτρονικές πηγές

www.nemeawineland.com

www.newwinesofgreece.com

www.wikipedia.org

www.chr-hansen.com

www.lallemandwine.com

www.oiv.int