



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

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

Φώτιος Γ. Φράγκος

Επιβλέπων καθηγητής : Γεώργιος Κοτσερίδης

Αθήνα

2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

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

Φώτιος Γ. Φράγκος

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

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας και
Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του
Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε ροζέ οίνο, που έχει προκύψει από την οινοποίηση σταφυλιών από την ποικιλία Μοσχοφίλερο. Το σταφύλι προήλθε από την αμπελουργική περιοχή της Μαντινείας, στην Τρίπολη. Σκοπός της μελέτης είναι η εύρεση χημικών και οργανοληπτικών διαφορών που σχετίζονται με τη μηλογαλακτική ζύμωση, εξετάζοντας τη διενέργειά της με τη χρήση τριών επιλεγμένων γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus Oeni* της εταιρείας CHR HANSEN, το Cine, το Oenos και το CH16, με οίνο που ολοκλήρωσε την μηλογαλακτική ζύμωση με γηγενή βακτήρια καθώς και με τον ίδιο οίνο στον οποίο είχε αποτραπεί η μηλογαλακτική ζύμωση.

Πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών συστατικών του αρώματος των δειγμάτων οίνου. Επίσης ελέγχθηκαν η πορεία της αλκοόλης και μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης αναλύθηκαν η γλυκερόλη, το μηλικό, το γαλακτικό και το κιτρικό οξύ στα τελικά δείγματα. Τέλος πραγματοποιήθηκε ο οργανοληπτικός έλεγχος των οίνων με χρήση κλίμακας με συνεχόμενες γραμμές από εξειδικευμένο πάνελ, για να αξιολογηθούν ποιοτικά οι οίνοι.

Από την έρευνα προέκυψε ότι η χρήση επιλεγμένων γαλακτικών βακτηρίων στη ροζέ οινοποίηση του Μοσχοφίλερου, επηρεάζει σημαντικά τα πτητικά συστατικά του αρώματος. Στον οίνο με τη χρήση του γαλακτικού βακτηρίου Cine παρατηρήθηκε αύξηση στους περισσότερους αιθυλικούς εστέρες και ανώτερες αλκοόλες, ενώ ακολουθεί ο οίνος που εμβολιάστηκε με το γαλακτικό βακτήριο CH16. Στο δείγμα Cine παρατηρήθηκε μικρότερη αύξηση της πτητικής οξύτητας, αφού το κιτρικό οξύ δε μεταβολίστηκε.

Οι οίνοι με το γαλακτικό βακτήριο CH16, έλαβαν τις μεγαλύτερες βαθμολογίες από το πάνελ των δοκιμαστών. Η μηλογαλακτική ζύμωση, οδηγεί στην αύξηση του χαρακτηριστικού αρώματος του βουτύρου, στο μειωμένο χορτώδη χαρακτήρα, στη βελτιστοποίηση του φρουτώδη χαρακτήρα και στη βελτιωμένη αίσθηση και καλύτερη επίγευση του στόματος και καλύτερο σώμα. Το Μοσχοφίλερο είναι μια ποικιλία που μπορεί να δεχθεί μηλογαλακτική ζύμωση με σκοπό την διαφοροποίηση.

Λέξεις κλειδιά : Μοσχοφίλερο, ροζέ οίνος, μηλογαλακτική ζύμωση, GC-FID, HPLC, οργανοληπτικός έλεγχος

ABSTRACT

In this review the effect of the malolactic fermentation on rose wines from Moschofilero variety has been examined. The grapes came from the wine region of Mantinia in Tripolis. In particular, the purpose of this study is the identification of the chemical and organoleptic differences associated with malolactic fermentation, looking to be dealt as controlled with the use of three selected lactic bacteria *Oenococcus Oeni*, *Cine*, *Oenos* and CH16, with wine held spontaneous malolactic fermentation and with the same wine that has prevented the malolactic fermentation.

During the fermentations conducted titratable acidity, pH and volatile acidity were examined daily. Quantitative determination of volatile compounds was done to the samples by means of gas chromatography with ionization detector (GC-FID), after the application of solid phase microextraction (SPME). By using high pressure liquid chromatography (HPLC), alcohol, glycerol, malic, lactic, and citric acid were quantified. Sensory analysis was applied to the wines in order to compare the samples.

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

Sensory evaluation of the samples revealed that the sample inoculated with CH16 strain, received the highest average score from the panel. Malolactic fermentation, leading to increase of the butter flavor characteristic, lowers the grassy character, optimizes the fruity character and improves the mouthfeel aftertaste and body. The Moshofilero is a variety that can accept malolactic fermentation in order to diversify.

Key words : Moschofilero, rose wine, malolactic acid, GC-FID, HPLC, sensory analysis

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οινολογίας του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Αμπελουργία-Οινολογία».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Γεώργιο Κοτσερίδη για την ευκαιρία που μου έδωσε, για την εμπιστοσύνη, την υπομονή και το αμείωτο ενδιαφέρον που εξέφρασε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σταματίνα Καλλίθρακα για τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε, ιδιαίτερα σε θέματα χημείας και οργανοληπτικού ελέγχου οίνων και για το αμέριστο ενδιαφέρον της. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σεραφείμ Παπανικολάου, που ως μέλος της τριμελούς επιτροπής διόρθωσε και βελτίωσε την πτυχιακή μου μελέτη.

Θερμές ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στο πρόσωπο της κ. Νίκης Προξενιά, μέλος Ε.ΔΙ.Π. για την αμέριστη βοήθεια, το ενδιαφέρον της και το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας που διατήρησε στο εργαστηριακό περιβάλλον. Επίσης, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Ιωάννη Βουκίδη για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση, υποστήριξη του και την άψογη συνεργασία που αναπτύχθηκε. Εν συνεχεία, ευχαριστώ τον κ. Ελευθέριο Δροσινό για την παραχώρηση του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων του Γ.Π.Α., στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις στον αέριο χρωματογράφο (GC-FID).

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τη σύζυγό μου Χριστίνα, τον γιο μου Γρηγόρη, τη μητέρα μου Δήμητρα και την αδερφή μου Αδαμαντία για την απόλυτη υποστήριξη, υπομονή και για την συνεχή ενθάρρυνση τους ώστε να πετύχω τους στόχους μου.

Φώτης Γ. Φράγκος

Αθήνα 2017

Στο Γρηγόρη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Η ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ	8
1.2 Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΜΑΝΤΙΝΕΙΑΣ.....	11
2 ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	15
2.1 ΓΕΝΙΚΑ	15
2.2 ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΜΓΖ	19
2.3 ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ ΤΗΣ ΜΓΖ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΙΝΩΝ.....	23
2.3.1.ΟΞΥΤΗΤΑ	24
2.3.2. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ	25
2.3.3. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΗΚΑ ΟΙΝΟΥ	26
2.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΜΓΖ.....	34
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
3.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	37
3.2 ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	37
3.3 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΟΙΝΟΥ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
3.3.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	40
3.3.2 ΔΕΙΚΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (ΔΦΟ)	41
3.3.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ (TLC) ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΗΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	41
3.3.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕ GC-FID.....	42
3.3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC).....	44

3.4 ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	45
3.5 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	46
3.5.1 ΤΡΟΠΟΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ.....	49
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
4.1 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ	51
4.2 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΟΙΝΟΥ	51
4.3 ΔΕΙΚΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	55
4.4 ΑΡΩΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΜΕΣΩ GC-FID.....	56
4.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΚΟΟΛΩΝ ΚΑΙ ΟΞΕΩΝ ΜΕΣΩ HPLC	62
4.6 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	66
5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75
ΔΙΑΔΥΚΤΙΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ.....	80

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ

Η ποικιλία **Μοσχοφίλερο** είναι μία από τις πιο διαδεδομένες ποικιλίες στην ελληνική αμπελοκαλλιέργεια. Η ποικιλία αυτή έχει υποστεί την επίδραση πολλών μεταλλαξογόνων παραγόντων, ώστε να παρουσιάζει σήμερα μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα σε πολλά μορφολογικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά, όπως το χρώμα των ραγών, ο χρόνος ωρίμανσης, η αρωματική γεύση, η περιεκτικότητα σε διάφορα συστατικά κ.α. Γνωστοί κλώνοι που καλλιεργούνται σήμερα είναι το Μαυροφίλερο, το Ξανθοφίλερο, το Ασπροφίλερο και το Κοκκινοφίλερο.

Σύμφωνα με ερευνητική εργασία με χρήση μοριακών δεικτών (RAPD-PCR), έδειξε ότι το Μοσχοφίλερο και το Μαυροφίλερο αποτελούν μία και αυτή ποικιλία και είναι η μοναδική που διαθέτει αυτόν τον μοσχάτο χαρακτήρα (Σταυρακάκης κ.α, 2010). Με τη ποικιλία αυτή συνδέονται στενά το Ασπροφίλερο και το Ξανθοφίλερο, όμως υστερούν σε αρωματικό δυναμικό.

Το Μοσχοφίλερο καλλιεργείται κυρίως στο νομό της Αρκαδίας, πιο συγκεκριμένα στην ευρύτερη περιοχή της Μαντινείας, όπου η έκταση καταλαμβάνει περίπου 7.500 στρέμματα. Συνιστάται κυρίως για το αμπελουργικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου και επιτρέπεται στους νομούς της Βοιωτίας, Ευβοίας και Κεφαλληνίας σε υψόμετρο άνω των 350 μέτρων και η συνολική έκταση αγγίζει περίπου τα 11.150 στρέμματα.

Είναι η μοναδική γηγενής μοσχάτη, ερυθρή ποικιλία που καλλιεργείται στη χώρα μας. Το πρέμνο είναι πολύ παραγωγικό και ζωνρό. Ο καρποφόρος βλαστός εμφανίζει συνήθως δύο σταφυλές, από τον 3ο έως τον 6ο κόμβο. Παλαιότερα η διαμόρφωση των πρέμνων ήταν κυπελλοειδής, ενώ σε νέους αμπελώνες μορφώνεται σε αμφίπλευρο γραμμικό Royat. Το κλάδεμα καρποφορίας είναι βραχύ με 2 έως 3 οφθαλμούς ανά παραγωγική μονάδα.

Η ποικιλία συμβιώνει πολύ καλά με τα κυριότερα υποκείμενα αμπέλου. Σε παλαιότερους αμπελώνες χρησιμοποιούνται με επιτυχία τα υποκείμενα 110 R (90%) και 41 B (10%). Επιπλέον, καλά αποτελέσματα έχουμε με δύο νέα υποκείμενα, το 1103 P και το 140 Ru.

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



Εικόνα 1.1 : Το μοσχοφίλερο (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

Τα σταφύλια της ποικιλίας είναι πυκνά, μεγάλου μεγέθους, με συνήθως μεγάλη πυκνότητα ραγών, σφαιρικές και μετρίου μεγέθους, με χονδρή επιδερμίδα, χρώματος ερυθρωπού, με σάρκα χυμώδη και μαλακή, με έντονο άρωμα μοσχάτου.

Είναι μία ποικιλία μετρίως ευαίσθητη στον περονόσπορο, περιορισμένης ευαισθησίας στο ωίδιο και πολύ ευαίσθητη στις προσβολές του βοτρύτη και τις ιώσεις, ιδιαίτερα όταν κατά την ωρίμανση επικρατούν πολλές βροχοπτώσεις και υψηλή σχετική υγρασία.

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

Συνήθως το γλεύκος του Μοσχοφίλερου περιέχει σάκχαρα από 210 – 220 g/ l, οξύτητα 5,4 – 6,8 g/ l σε τρυγικό οξύ και pH 3,3 – 3,5. Η ποικιλία δίνει χαρακτηριστικά λευκά και ροζέ κρασιά υψηλής ποιότητας, με υψηλή συνήθως οξύτητα και χαμηλό αλκοόλ, με λεπτό αλλά έντονο άρωμα ροδοπέταλων,

εσπεριδοειδών, αλλά και αχλαδιού με ίχνη τριαντάφυλλου, ανάλογα με την οينوποίηση και τον τύπο του κρασιού.

Εκτός από οίνους με 100 % Μοσχοφίλερο, παράγονται εξαιρετικοί τοπικοί οίνοι ποιότητας, όπως ο Πελοποννησιακός, ξηροί λευκοί με τη συνοינוποίηση σταφυλιών από τις ποικιλίες Ροδίτης και Ασπρούδια, ή ροζέ με ελαφρύ άρωμα μοσχάτου. Με ανάμειξη γλεύκους άλλων ποικιλιών με μικρό ποσοστό, όπως Γλυκερύθρα, άσπρη Βολίτσα και Ασπρούδια, παρασκευάζεται ο οίνος ΠΟΠ «Μαντινεία». Τέλος, υπάρχει η δυνατότητα παρασκευής αφρωδών οίνων εξαιρετικής ποιότητας.

Οι αμπελουργικοί χαρακτήρες και τα φαινολογικά στάδια του Μοσχοφίλερου συνοψίζονται στα παρακάτω:



Εικόνα 1.2 : Βλαστός μοσχοφίλερου, νεαρή κορυφή (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

✓ Η κορυφή νεαρής βλάστησης είναι μέση, έντονα βαμβακώδης, λευκωπή με πολύ ελαφρά ρόδινη παρυφή.

✓ Τα νεαρά φύλλα είναι κιτρινοπράσινα έως φαιοπράσινα, έντονα βαμβακώδη μεταξύ των νευρώσεων.

- ✓ Ο ποώδης βλαστός είναι χνοώδης, πράσινος με ερυθρές ραβδώσεις στη νωτιαία πλευρά και πράσινος με ρόδινες περιοχές στη κοιλιακή πλευρά.
- ✓ Οι κόμβοι είναι πράσινοι με ερυθρές περιοχές, ενώ οι οφθαλμοί πράσινοι με ρόδινη κορυφή.
- ✓ Το ανεπτυγμένο φύλλο είναι πολύ μεγάλο, πλήρες ή τρίκολπο, σφηνοειδές με το μεσαίο λοβό περισσότερο ανεπτυγμένο.
- ✓ Ο μισχικός κόλπος είναι συνήθως σχήματος V είτε λύρας, με επικαλυπτόμενα χείλη, ενώ ο μίσχος είναι βραχύς, πράσινος με ρόδινες αποχρώσεις, αραχνοϋφής ή χνοώδης.

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

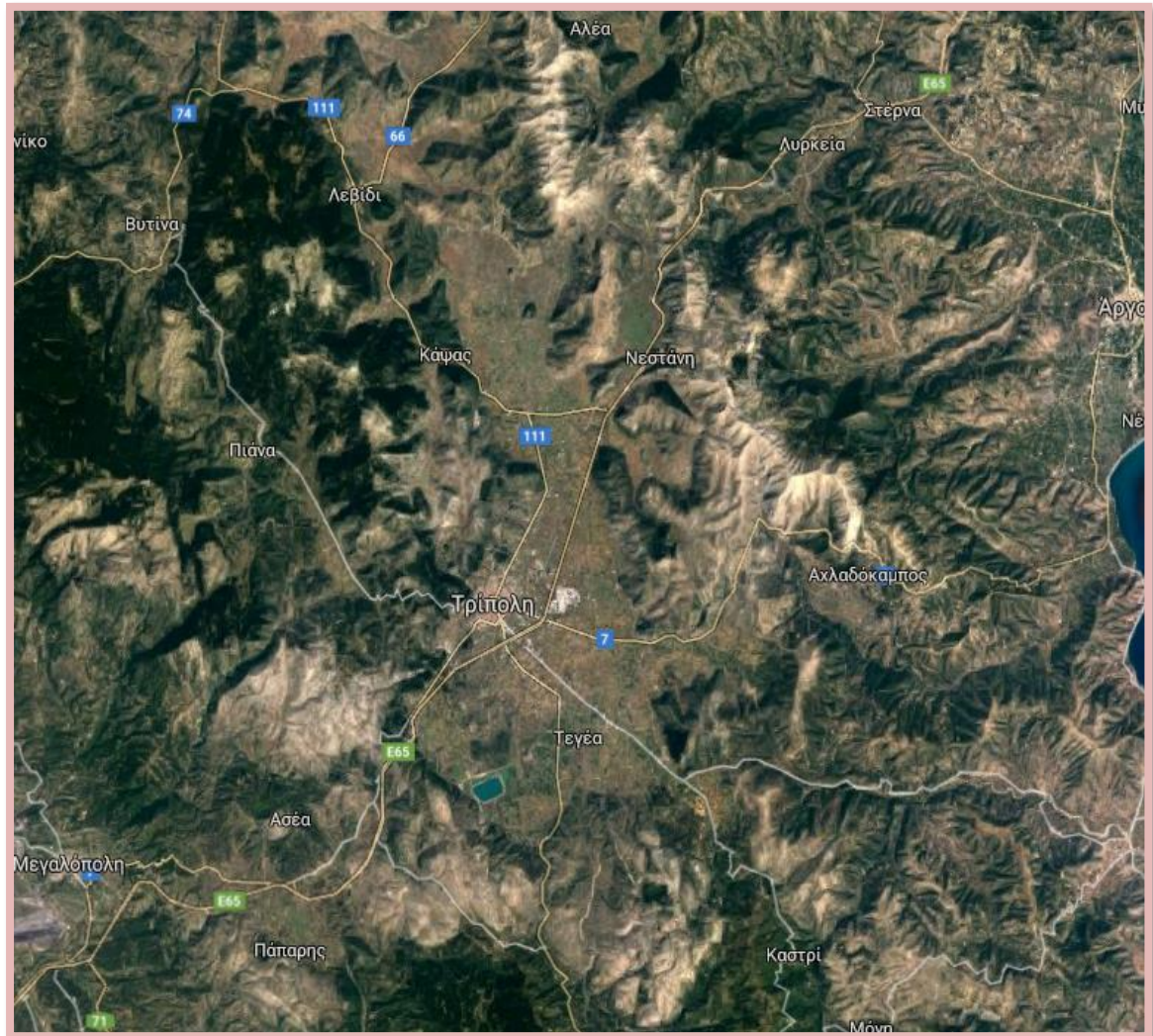
Η έναρξη της βλάστησης συνήθως εμφανίζεται το 3ο δεκαήμερο του Μαρτίου, ενώ πλήρης βλάστηση έχουμε το 2^ο δεκαήμερο του Απριλίου. Επιπλέον, η έναρξη της άνθησης έως την πλήρη άνθηση παρατηρείται μεταξύ 20 και 25 Μαΐου. Τέλος η πλήρης ωρίμανση της σταφυλής εμφανίζεται από το 3ο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου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

1.2 Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΜΑΝΤΙΝΕΙΑΣ

Η περιοχή του οροπεδίου της Μαντινείας βρίσκεται στο κεντρικό ανατολικό τμήμα της Αρκαδίας, ένα πλάτωμα με μέσο υψόμετρο 660 μέτρα που περιβάλλεται δυτικά από τον ορεινό όγκο του Μαινάλου (1981 μέτρα), βόρεια το βουνό του Ολίγυρτου (1935 μέτρα), βορειοανατολικά από την οροσειρά του Αρτεμισίου (1772 μέτρα), ανατολικά από το όρος Κτενιάς (1599 μέτρα) και ανατολικά - νοτιοανατολικά από την οροσειρά του Πάρνωνα (1936 μέτρα). Στη βασική του διεύθυνση βορράς - νότος έχει μήκος περί τα 36χλμ. Στο βορρά, στην περιοχή του Λεβιδίου, είναι στενό και προς το νότο ανοίγει με μέγιστο πλάτος 18χλμ. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται η ζώνη των οίνων ΠΟΠ Μαντίνεια.

Η ιστορία της είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το αμπέλι και το κρασί από αρχαιοτάτων χρόνων και δεν είναι λίγες οι αναφορές που αποκαλύπτουν τη στενή σχέση της περιοχής με τον Διόνυσο και τον Πάνα. Σύμφωνα με την μυθολογία, ειδικό τάγμα, οι Μελιαστές, ήταν υπεύθυνοι για τις γιορτές προς τιμήν του θεού, όπου έρεε άφθονο τοπικό κρασί. Σε αυτά, προσθέτουμε τα πολλά ευρήματα της περιοχής, που συνυπογράφουν την μακραίωνη ύπαρξη της αμπελοκαλλιέργειας και της παραγωγής του αρκαδινού οίνου. Εδώ, συναντάμε το αμπέλι του Παυσανία, το κατά πολλούς, αρχαιότερο αμπέλι στον κόσμο και ανακαλύπτουμε στον Όμηρο τον

χαρακτηρισμό της Αρκαδίας ως Πολυάμπελου, καθώς και αρκετές αναφορές από τον Αριστοτέλη και τον Θεόφραστο για τους αρκαδινούς οίνους. Σήμερα, η ενδιαφέρουσα αυτή αμπελουργική ζώνη της, είναι γνωστή στην υπόλοιπη Ελλάδα και στο εξωτερικό. Η αναγνωρισιμότητά της οφείλεται στην αυτόχθονη ποικιλία Μοσχοφίλερο.



Εικόνα 1.3 : Χάρτης ευρύτερης περιοχής Μαντινείας. (Πηγή: googlemaps)

Η οινολογική ζώνη καλύπτει έκταση περίπου 15.000 στρέμματα στη συντριπτική τους πλειονότητα με Μοσχοφίλερο, το οποίο έχει καθιερωθεί στην περιοχή της Μαντινείας λόγω της άριστης σχέσης του με το μικροκλίμα της περιοχής. Ευνοείται από το μεγάλο υψόμετρο της Αρκαδίας και το ψυχρό κλίμα. Ο βαρύς χειμώνας με τις πολλές βροχές το καθιστούν ανθεκτικό στις ασθένειες. Η ηλιοφάνεια και οι υψηλές

θερμοκρασίες του καλοκαιριού εξασφαλίζουν την καλή ωρίμανσή του. Επίσης η πτώση της θερμοκρασίας κατά τις καλοκαιρινές νύχτες βοηθά στη διατήρηση της υψηλής οξύτητας και του αρωματικού δυναμικού της ποικιλίας. Η οινολογική ζώνη είναι από τις ψυχρότερες στην Ελλάδα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αργή ωρίμανση των σταφυλιών και τον όψιμο τρυγητό κατά το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Σεπτεμβρίου, αρκετά αργά για μία νότια ελληνική περιοχή.

Η οριοθετημένη περιοχή για την παραγωγή οίνων Π.Ο.Π. Μαντίνεια καθορίστηκε με το Βασιλικό Διάταγμα αριθμ. 625/4.10.1971 που στη συνέχεια τροποποιήθηκε. Η αμπελουργική ζώνη μέσα στην οποία μπορεί να παραχθεί ο Π.Ο.Π. Μαντίνεια περιλαμβάνει τους αμπελώνες που καλλιεργούνται με τις ποικιλίες του μοσχοφίλερου και τις ασπρούδες στη κτηματική περιοχή του Δήμου Τρίπολης και συγκεκριμένα στη Δημοτική Κοινότητα Τρίπολης και στις Τοπικές Κοινότητες Αγίου Βασιλείου Μαντινείας, Αγίου Κωνσταντίνου, Μερκοβουνίου, Πελάγους και Σκοπής της Δημοτικής Ενότητας Τρίπολης, στις Τοπικές Κοινότητες Λιθοβουνίων, Μαγούλας, Ριζών και Ψηλής Βρύσης της Δημοτικής Ενότητας Τεγέας, στις Τοπικές Κοινότητες Αρτεμισίου, Κάψα, Λουκά, Νεστάνης, Πικέρνη, Σάγκα και Σιμιάδων της Δημοτικής Ενότητας Μαντινείας, στις Τοπικές Κοινότητες Αγιωργίτικων, Ζευγολατειού, Νεοχωρίου Μαντινείας, Παρθενίου και Στενού της Δημοτικής Ενότητας Κορυθίου, στις Τοπικές Κοινότητες Κανδήλας, Λεβιδίου, Ορχομενού και Παλαιόπυργου της Δημοτικής Ενότητας Λεβιδίου καθώς και στον οικισμό Κούβλι της Τοπικής Κοινότητας Δολιανών του Δήμου Βόρειας Κυνουρίας, εξαιρουμένων των βαλτωδών εδαφών.

Σύμφωνα με το προεδρικό διάταγμα 224/Α/26.10.2011 όπου και τροποποιήθηκε, η Ονομασία Προέλευσης Ανωτέρας Ποιότητας Μαντινείας, αναγνωρίζεται για τους λευκούς ξηρούς και τους λευκούς αφρώδεις οίνους ποιότητας, οι οποίοι παράγονται από σταφύλια της ποικιλίας μοσχοφίλερου τουλάχιστον κατά 85% και ασπρούδες. Η απόδοση των αμπελώνων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 11.000 κιλογραμμάρια ανά εκτάριο.

Ο οίνος που παράγεται θα πρέπει να έχει τα κάτωθι χαρακτηριστικά:

- Ελάχιστος φυσικός αλκοολικός τίτλος: 11,0 % vol.
- Ελάχιστος ολικός αλκοολικός τίτλος: 11,0 % vol.

- Ελάχιστος αποκτημένος αλκοολικός τίτλος: 11,0 % vol.
- Περιεκτικότητα σε ολικά σάκχαρα : 0-4 g/l
- Ελάχιστη ολική οξύτητα έκφραση σε τρυγικό οξύ: 5 .0 g/l
- Μέγιστη πτητική οξύτητα έκφραση σε οξικό οξύ: 1.08 g/l
- Μέγιστη περιεκτικότητα των οίνων σε διοξείδιο του θείου: 200 mg/l

Όψη: Αχρρόχρουν (απαλό κίτρινο) με πράσινες ανταύγειες το οποίο μπορεί να γίνει βαθύ κίτρινο μετά από παλαίωση.

Οσμή: Σύνθετη έντονη μύτη με νότες φρούτων και λουλουδιών (τριαντάφυλλο κ.α.) τυπικά των ποικιλιών από τις οποίες παράγεται και αναλόγως των ποσοστών της κάθε μίας. Ανόργανες νότες εμφανίζονται με την παλαίωση.

Γεύση: Ισορροπημένη γεύση με πλούσιο και γεμάτο σώμα και οξύτητα χαρακτηριστική της περιοχής. Επίγευση αρωματική με αρκετά μεγάλη διάρκεια.

2 ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η οينوποίηση συνήθως περιλαμβάνει δύο διαδικασίες ζύμωσης την αλκοολική ζύμωση που διεξάγεται από μία καλλιέργεια ζυμομυκήτων, η οποία μετατρέπει τα σάκχαρα σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, και η μηλογαλακτική ζύμωση που πραγματοποιείται από τη δράση των γαλακτικών βακτηρίων, των γενών *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc*, τα οποία μεταβολίζουν το μηλικό οξύ προς γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Η μηλογαλακτική ζύμωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για τον καθορισμό της τελικής ποιότητας του οίνου. (Z. Genisheva et al., 2012). Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι μία περίπλοκη διαδικασία, η οποία πραγματοποιείται μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης ή ταυτόχρονα με αυτή. Επίσης, χρησιμοποιείται ως μία δεύτερη ζύμωση, που έχει σαν ειδικό ρόλο να συμβάλλει στην ωριμότητα των κόκκινων οίνων, καθώς χρησιμοποιείται και σε λευκές ποικιλίες όπως είναι το Chardonnay, το Riesling και σε αφρώδεις οίνους. Υπάρχουν τρεις κύριοι λόγοι για τη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής στον οίνο. Πρώτον, είναι η μείωση της οξύτητας του οίνου, όπου έχει σαν συνακόλουθο την αύξηση του pH, δεύτερον, συμβάλλει στη μικροβιακή σταθερότητα με την αποχώρηση του μηλικού οξέος ως ένα πιθανό υπόστρωμα άνθρακα και τρίτον, η τροποποίηση του αρωματικού προφίλ του οίνου. (Ugliano et al., 2003).

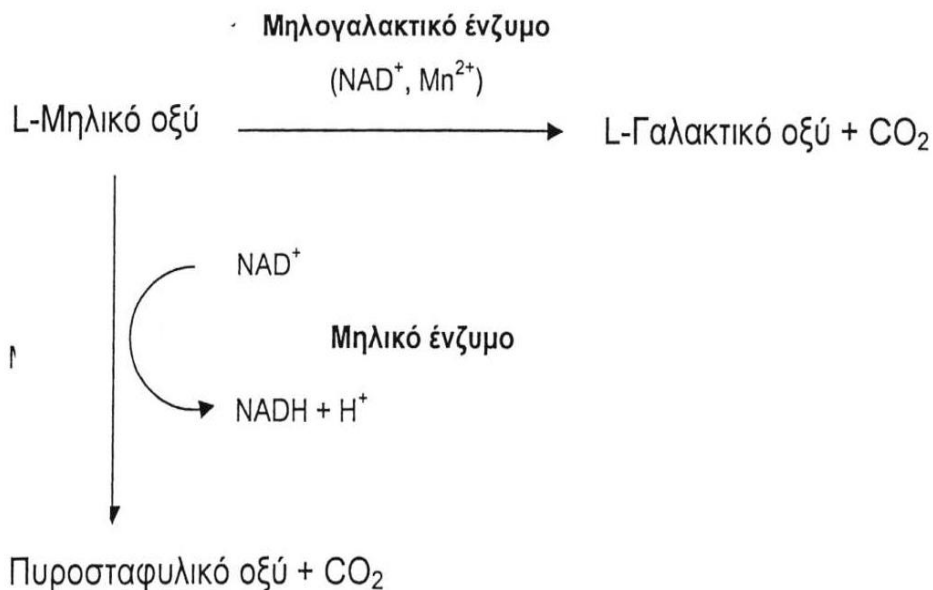
Σύμφωνα με τον Kunkee (1967), η σημαντική μείωση της ολικής οξύτητας στους οίνους σε σχέση με τα αρχικά γλεύκη και μάλιστα πολύ μεγαλύτερη από εκείνη που οφείλεται συνήθως στην πτώση του όξινου τρυγικού καλίου, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Berthelot και Fleurieu το 1864 και ορίστηκε σαν μία διεργασία (δεύτερη ζύμωση) κατά την οποία λαμβάνει χώρα, η μείωση της οξύτητας του οίνου. Ο Koch το 1900 κατάφερε να απομονώσει γαλακτικά βακτήρια και να προκαλέσει ζύμωση με αυτά. Ο Moslinger το 1901, παρουσίασε πρώτος μία γενική περιγραφή της μηλογαλακτικής ζύμωσης σαν μία διεργασία μετατροπής του μηλικού σε γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Το 1943, ο Gruess δημοσίευσε μία ανασκόπηση της μικροχλωρίδας του κρασιού και ανέφερε ότι υπάρχουν γηγενή βακτήρια ικανά να χρησιμοποιήσουν το μηλικό οξύ. Από τότε άρχισε να μελετάται σοβαρά η βιοχημεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Ο Peynaud (1984) αναφέρει ότι ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων κατά την διάρκεια της οиноποίησης γίνεται σε δυο φάσεις οι οποίες διαχωρίζονται από μια περίοδο ηρεμίας. Η πρώτη φάση αύξησης, αρχίζει τις πρώτες ώρες από την έκθλιψη των σταφυλίων, παράλληλα με την αύξηση των μυκήτων. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης παρατηρείται ελάττωση του πληθυσμού των βακτηρίων, η οποία οφείλεται στην ανασταλτική δράση της παραγόμενης αλκοόλης. Τέλος, μετά την αλκοολική ζύμωση, και σε χρόνο που εξαρτάται από διάφορους παράγοντες αρχίζει η δεύτερη φάση πολλαπλασιασμού των γαλακτικών βακτηρίων οπότε πραγματοποιείται η μηλογαλακτική ζύμωση.

Είναι γνωστό ότι η μηλογαλακτική ζύμωση αφορά την αποικοδόμηση του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα, με βάση τη δραστηριότητα, πλέον, του μηλο-γαλακτικού ενζύμου που καθοδηγεί το μεταβολισμό των γαλακτικών βακτηρίων, ιδιαίτερα του είδους *Oenococcus oeni*.

Σύμφωνα με την Guillux-Benatier M., 1997, αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα γαλακτικά βακτήρια αναπτύσσουν ένα σύστημα αυτοάμυνας έναντι χαμηλών pH των οίνων, εξασκώντας μια πρωτοκίνητική δύναμη στην κυτταρική τους μεμβράνη, με εναλλαγή πρώτης ύλης (μηλικό οξύ) και μεταβολιτών (γαλακτικό οξύ, διοξείδιο του άνθρακα, διακετύλιο κτλ.).

Ως μηλογαλακτική ζύμωση ορίζεται η μικροβιακή (βακτηριακή) μετατροπή του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό με σύγχρονη απελευθέρωση CO₂. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος έχουν τρεις πιθανές ενζυματικές οδούς για τη μετατροπή του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό οξύ και CO₂. Η πρώτη γίνεται με την άμεση μετατροπή του μηλικού σε γαλακτικό οξύ με τη βοήθεια της μηλικής αποκαρβοξυλάσης, γνωστό ως μηλογαλακτικό ένζυμο. Το μηλογαλακτικό ένζυμο απομονώθηκε για πρώτη φορά από κύτταρα του *Lactobacillus planatrum* από τους Schutz and Radler το 1974 και Lonvaud το 1975. Στα επόμενα χρόνια το ένζυμο αυτό απομονώθηκε και από άλλα βακτήρια όπως *L. murinus*, *L. mesenteroides*, *O. Oeni*, και *L. lactis* που περιέχονται στον οίνο (Lonvaud-Funel, 1995).



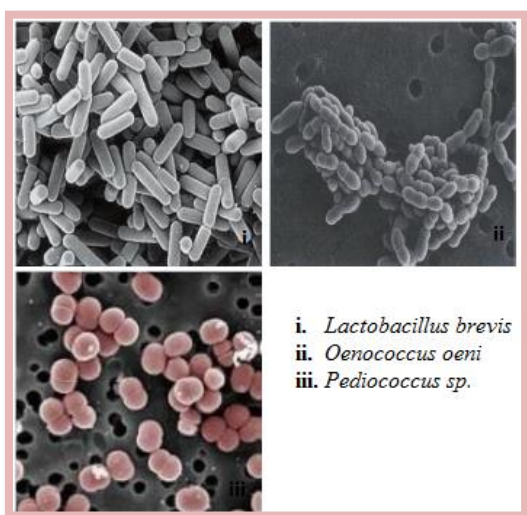
Σχήμα 2.1 : Μηχανισμός μείωσης του μηλικού της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Lonvaud-Funel, 1999)

Το δεύτερο μονοπάτι χρησιμοποιεί το μηλικό ένζυμο για τη μετατροπή του L-μηλικού σε πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο ακολούθως ανάγεται σε L-γαλακτικό οξύ από τη γαλακτική αφυδρογονάση. Η τρίτη πιθανή οδός είναι η μείωση του μηλικού σε οξαλοξικό οξύ από τη μηλική αφυδρογονάση, ακολουθούμενο από αποκαρβοξυλίωση του οξαλοξικού εστέρα προς παραγωγή γαλακτικού οξέος. (Lonvaud-Funel, 1999). (Σχήμα 2.1)

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

1993) καθώς επίσης να παραχθούν βιογενείς αμίνες (Lonvaud-Funel & Joyeux, 1994).

Η μηλογαλακτική ζύμωση θα μπορούσε να συμβεί αυθόρμητα στον οίνο μέσω των αυτοχθόνων ειδών βακτηρίων, όπως είναι τα *Oenococcus Oeni*, τα *Pediococcus* sp. και τα *Lactobacillus* sp., τα οποία περιέχονται είτε στο σταφύλι, είτε μέσα στον οίνο (Wibowo et al., 1985; Du Toit et al., 2010). Ωστόσο, δεν εξασφαλίζει συνεπή αποτελέσματα όσον αφορά τη σωστή ολοκλήρωσή της, το οργανοληπτικό προφίλ και την προκύπτουσα ποιότητά του οίνου. Η αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση είναι απρόβλεπτη, δεδομένου ότι μπορεί να συμβεί οποιαδήποτε στιγμή, δηλαδή κατά τη διάρκεια ή μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τα ίδια γαλακτικά βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του μηλικού οξέος, να αποικοδομήσουν δηλαδή ένα άλλο συστατικό του οίνου, όπως τα σάκχαρα, αυξάνοντας έτσι την πτητική οξύτητα και συνεπώς υποβαθμίζεται η



Εικόνα 2.1 : Είδη γαλακτικών βακτηρίων

ποιότητα των οίνων (Κοτσερίδης, 2015). Η εισαγωγή των εμπορικών βακτηριακών καλλιεργειών με άμεσο εμβολιασμό τους στον οίνο, έχει βελτιώσει τη διαχείριση της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Nielsen et al., 1996). Αυτό εξασφαλίζει καλύτερο έλεγχο του χρόνου έναρξης και ρυθμού ανάπτυξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης, μειώνει τη πιθανή παρεμβολή από βακτηριοφάγους, δίνει καλύτερο έλεγχο στη συνεισφορά της γεύσης και μειώνει το κίνδυνο στη

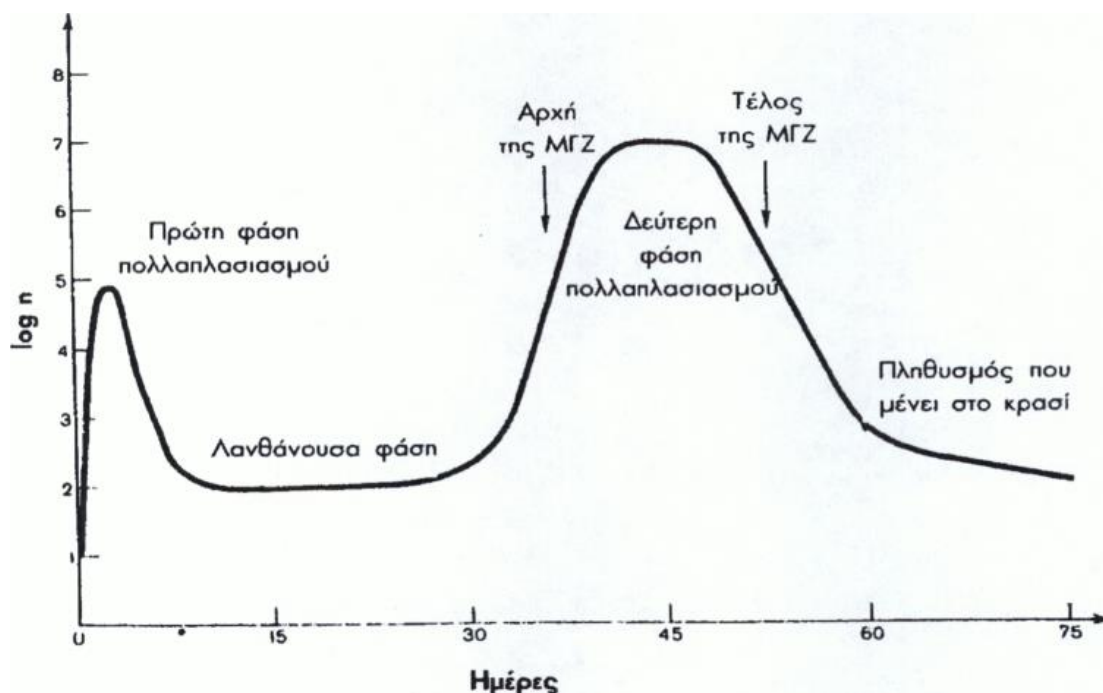
παραγωγή βιογενών αμινών που μπορεί να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία (Lonvaud-Funel, 2001).

Γενικότερα, η ανεξέλεγκτη μηλογαλακτική ζύμωση χρήζει μεγάλης προσοχής για πιο ασφαλή αποτελέσματα στο τελικό προϊόν. Σε ένα οινοποιείο, το πρώτο βήμα είναι να αποφευχθεί η υπερβολική μόλυνση, παρότι η απόλυτη στείριότητα είναι σχεδόν αδύνατον να αποκτηθεί. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος, η οποία είναι φυσική για την εξάλειψη των γαλακτικών βακτηρίων, είναι η θερμότητα, όπως για παράδειγμα είναι η αποστείρωση των γυάλινων μπουκαλιών κατά την εμφιάλωση. Από τις χημικές

μεθόδους, η πιο αποτελεσματική είναι η επαρκής θείωση, καθώς έχει αντιβακτηριακή δράση του δεσμευμένου διοξειδίου του άνθρακα. Επιπλέον, ως αναστολείς των γαλακτικών βακτηρίων λειτουργούν η λυσοζύμη, το φουμαρικό οξύ και η νισίνη. Βέβαια, αυτές οι ουσίες δεν είναι πάντα αποτελεσματικές και απόλυτα σταθερές. Σε κάθε περίπτωση, η υψηλή αντοχή ορισμένων στελεχών στον οίνο θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη, ειδικά όταν το pH του οίνου είναι υψηλό. (Handbook of Oenology volume 1, 2006).

2.2 ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΜΓΖ

Η εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης εξαρτάται σημαντικά από τον πολλαπλασιασμό των γαλακτικών βακτηρίων. Σύμφωνα με διάφορους ερευνητές, η ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού παρουσιάζει δύο διαδοχικούς κύκλους. Ο πρώτος αρχίζει από τις πρώτες στιγμές της οινοποίησης και συμβαδίζει με την ανάπτυξη των ζυμών. Ο σχηματισμός όμως της αλκοόλης, συντελεί στην παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των βακτηρίων για χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από μερικές ημέρες μέχρι μερικές εβδομάδες. Η περίοδος αυτή αποτελεί τη "λανθάνουσα φάση", στη διάρκεια της οποίας επιχειρείται η προσαρμογή του βακτηριακού πληθυσμού στις νέες συνθήκες. Μετά τη περίοδο της λανθάνουσας φάσης, ξαναρχίζει ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων και μαζί του ο δεύτερος κύκλος της ανάπτυξής τους. Όταν ο αριθμός τους φτάσει σε ένα ορισμένο μέγεθος (10^6 /cm³), τότε αρχίζει η πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Η εξέλιξη του βακτηριακού πληθυσμού και της μηλογαλακτικής ζύμωσης, κατά τη διάρκεια μιας ερυθρής οινοποίησης, φαίνεται παραστατικά στο διάγραμμα 2.1 (Ribereau-Gayon et al., 1975).



Διάγραμμα 2.1 : Εξέλιξη βακτηριακού πληθυσμού κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση (Ribereau-Gayon et al., 1975).

Η όλη πορεία του πολλαπλασιασμού των βακτηρίων και η εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες είναι:

ι. Η οξύτητα: Το άριστο pH, για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων του οίνου, είναι γύρω στα 4,5 με 4,8. Τα βακτήρια, όμως, αυτά μπορούν να αναπτυχθούν και σε χαμηλότερα pH (μέχρι 3,0). Οι κόκκοι παρουσιάζονται περισσότερο ανθεκτικοί σε χαμηλά pH σε σχέση με τους βακίλλους, γεγονός που εξηγεί την εμφάνιση περισσότερων κόκκων σε βόρειους αμπελώνες. Εκτός από την ανάπτυξη των βακτηρίων, και η δυνατότητα μεταβολισμού των διαφόρων συστατικών του οίνου επηρεάζεται από το pH. Έτσι, διακρίνουμε δύο οριακές τιμές pH, η μια που αναφέρεται στο μεταβολισμό των σακχάρων και η άλλη στο μεταβολισμό του μηλικού οξέος. Όσο πιο μεγάλη είναι η διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές τιμές pH, τόσο πιο καλά προσαρμόζονται τα βακτήρια στη μηλογαλακτική ζύμωση του οίνου. Καθώς αυξάνεται η οξύτητα, η ανάπτυξη των βακτηρίων αναστέλλεται. Η μηλογαλακτική ζύμωση γίνεται όλο και πιο δύσκολη. Το μηλικό οξύ κατά κύριο λόγο υποβαθμίζεται. Η υποβάθμιση των υπόλοιπων συστατικών του οίνου είναι μειωμένη περιορίζοντας έτσι την αύξηση της πτητικής οξύτητας.

ii. Η θερμοκρασία: Τα βακτήρια του οίνου δεν είναι θερμοφιλά. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους κυμαίνεται μεταξύ 20 και 25 °C. Η ικανότητα, όμως, να αναπτυχθούν παραμένει πάντοτε δυνατή ακόμη και ανάμεσα στους 15 και 35°C . Για μια ομαλή μηλογαλακτική ζύμωση η ενδεικνύομενη θερμοκρασία είναι 18-25 °C. Η θερμοκρασία επιδρά περισσότερο στη ταχύτητα των ζυμώσεων παρά στη ποσότητα των ζυμούμενων σακχάρων.

iii. Το οξυγόνο: Η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων ευνοείται, άλλοτε παρουσία και άλλοτε απουσία οξυγόνου. Αυτό συμβαίνει, διότι τα γαλακτικά βακτήρια είναι είτε προαιρετικά αναερόβια είτε μικροαερόφιλα απέναντι στο O₂ και αυτό εξαρτάται από την ομάδα ή το είδος του βακτηρίου στο οποίο ανήκουν. Γενικότερα, η οξυγόνωση του οίνου με αέρα, επιταχύνει την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, αλλά και ο υπερβολικός αερισμός μπορεί να μπλοκάρει τη ζύμωση. Ένας μέτριος αερισμός του οίνου κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι συχνά επωφελής. (Peynaud, 1981).

iv. Η διάρκεια παραμονής του οίνου με τα στέμφυλα: Πρώιμος αποχωρισμός του οίνου από τα στέμφυλα απομακρύνει το μεγαλύτερο μέρος των γαλακτικών βακτηρίων, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της εκδήλωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

v. Το N₂ ως θρεπτικό στοιχείο: Ορισμένα αμινοξέα όπως τα : αλανίνη, αργινίνη, ιστιδίνη, λεύκινη, φαινυλαλανίνη, σερίνη, γλουταμινικό οξύ, κλπ. θεωρούνται απαραίτητα για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων, παρά το γεγονός ότι οι ανάγκες αυτές, εξαρτώνται πολύ από το είδος και το στέλεχος του καθενός. Σε γενικές γραμμές οι κόκκοι έχουν μεγαλύτερες ανάγκες σε αμινοξέα, επειδή παρουσιάζουν το φαινόμενο της ετεροτροφίας πιο έντονο από τους βακίλλους.

vi. Οι βιταμίνες: Οι ανάγκες σε βιταμίνες, όπως είναι : η θειαμίνη, το παντοθενικό οξύ, το νικοτινικό οξύ, η πυριδοξίνη, η βιοτίνη και η μεσοϊνοσιτόλη ποικίλουν ανάλογα με τα βακτήρια. Αντίθετα από ότι συμβαίνει με τα αμινοξέα, οι βάκιλλοι είναι πιο πολύ απαιτητικοί σε βιταμίνες σε σχέση με τους κόκκους.

vii. Η αλκοόλη: Γενικά, τα γαλακτικά βακτήρια που βρίσκονται στον οίνο είναι ανθεκτικά στην αλκοόλη, όχι όμως και εκείνα που συναντιούνται στα σταφύλια.

Παρόλη την αυξημένη ανθεκτικότητα τους, η αλκοόλη ασκεί δυσμενή επίδραση στην ανάπτυξη τους η οποία και πάλι βέβαια εξαρτάται από το είδος και το στέλεχος του καθενός. Κατά κανόνα οι βάκιλοι φαίνονται πιο ανθεκτικοί στην αλκοόλη σε σχέση με τους κόκκους. Το γεγονός αυτό εξηγεί τη πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, στα θερμά μέρη, από τους γαλακτοβάκιλλους.

viii. Το SO_2 : Τα γαλακτικά βακτήρια είναι περισσότερο ευαίσθητα στον ανυδρίτη του θειώδους οξέος από ότι οι ζύμες. . Μέτριες συγκεντρώσεις διοξειδίου του θείου διαβεβαιώνουν καθαρή αλκοολική ζύμωση χωρίς καμία βακτηριακή μόλυνση, όπου τα βακτήρια είναι επικίνδυνα με τη παρουσία τους σε μόλυνση των σακχάρων. Στις περιπτώσεις που επιθυμούμε την εκδήλωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, οφείλουμε να είμαστε πολύ προσεκτικοί στις ποσότητες του προστιθέμενου SO_2 . Μόνο σε δύο περιπτώσεις πρέπει να προστίθεται SO_2 : στη συγκομιδή μολυσμένων σταφυλιών και σε ζυμώσεις που δυσκολεύονται να ολοκληρωθούν. Μετά από θείωση 2,5 g/hl, έχει παρατηρηθεί ότι η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να ξεκινήσει το επόμενο καλοκαίρι, ενώ με δόση 5 g/hl σίγουρα εμποδίζει ολοκληρωτικά τη ζύμωση. Σε αυτή τη περίπτωση, είναι αναγκαία η προσθήκη νέου οίνου που δεν είναι θειωμένος. Η τοξικότητα του εξαρτάται από το pH του υποστρώματος και βρέθηκε πιο ισχυρή σε υψηλότερες οξύτητες. Οι κόκκοι είναι λιγότερο ανθεκτικοί από τους βακίλους. Η δράση του διοξειδίου του θείου δεν εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση που επιλέγεται, αλλά και από τη σύνθεση των σταφυλιών. Ειδικότερα το pH και η υγιεινή κατάσταση των σταφυλιών, επηρεάζουν το ρυθμό δέσμευσης του διοξειδίου του θείου. Άλλος ένας σημαντικός παράγοντας είναι η θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε αμπελώνες με πιο ψυχρό κλίμα, μία θείωση της τάξης των 5 g/hl μπορεί να είναι αρκετή για να την εμποδίσει, αλλά σε πιο θερμές περιοχές η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να ξεκινήσει με 20 g/hl. Γενικότερα, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της προσθήκης διοξειδίου του θείου είναι αρκετά περίπλοκος. Η σωστή θείωση επιτρέπει μία ολοκληρωμένη αλκοολική ζύμωση, αποφεύγοντας την αλλοίωση της ποιότητας, χωρίς να διακυβεύεται ή να καθυστερεί υπερβολικά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Τέλος, έχει προταθεί η χρήση λυσοζύμης ώστε να συμπληρώνει την επίδραση του διοξειδίου του θείου.

ix. Άλλοι ανασταλτικοί παράγοντες στην ανάπτυξη των βακτηρίων είναι διάφορες ενώσεις με μεταβολική δραστηριότητα, όπως το H_2 O_2 , οργανικά οξέα και βακτηριοκίνες που μπορεί να παραχθούν από άλλα βακτήρια.

x. Τέλος, υπάρχει ο ανταγωνισμός ανάμεσα στις ζύμες και τα βακτήρια, που επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα την εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Οι ζύμες παράγουν ένα αγνώστου ταυτότητας ανασταλτικό παράγοντα (ίσως ένα τοξικό μεταβολίτη) που θα μπορούσε να είναι υπεύθυνος για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης (Patynowski et al., 2002). Αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να εξηγήσουν τον ανταγωνισμό μεταξύ ζυμών και βακτηρίων, δεδομένου ότι οι ζύμες είναι γνωστό ότι παράγουν ενώσεις κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης όπως αιθανόλη, SO_2 , λιπαρά οξέα μέσης αλύσου και αντιβακτηριακών πρωτεϊνών (Osborne και Edwards, 2007). Έχει αποδειχτεί ότι ο χρόνος εκδήλωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης επηρεάζεται από το είδος των ζυμών, που προκάλεσαν την αλκοολική ζύμωση. Υπάρχουν στελέχη ζυμομυκήτων που παρεμποδίζουν τη γρήγορη ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων, με αποτέλεσμα η μηλογαλακτική ζύμωση να διαρκεί από 3 μέχρι 6 μήνες.

Η ρύθμιση των παραγόντων αυτών και η εξασφάλιση στους μικροοργανισμούς τέτοιων συνθηκών, ώστε η δραστηριότητά τους να αποβεί ωφέλιμη στην ποιότητα του οίνου, παρουσιάζει μεγάλο τεχνολογικό ενδιαφέρον.

2.3 ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ ΤΗΣ ΜΓΖ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΙΝΩΝ

Η σπουδαιότητα της μηλογαλακτικής ζύμωσης θεωρήθηκε τόσο μεγάλη, που ορισμένοι Γάλλοι ερευνητές και συγγραφείς, όπως οι J. RIBEREAU- GAYON και E. PEYNAUD, διατύπωσαν την άποψη ότι:

"είναι απόλυτα ανακριβές να θεωρούμε ότι ένας οίνος υψηλής ποιότητας είναι αποτέλεσμα μιας καθαρής αλκοολικής ζύμωσης. Δεν είναι καθόλου υπερβολή, να πούμε ότι δε θα υπήρχαν υψηλής ποιότητας οίνοι (grands vins), ακόμη και στο Bordeaux, χωρίς τη μηλογαλακτική ζύμωση. Όλοι οι "μεγάλοι οίνοι" δεν περιέχουν καθόλου ή περιέχουν πολύ λίγο μηλικό οξύ, ενώ αντίθετα είναι πλούσιοι σε γαλακτικό οξύ".

Η παρουσία του μηλικού οξέος στους οίνους, τους προσδίδει γεύση και οσμή πράσινων μη ώριμων φρούτων, ένα είδος σταφίδας και μια τραχύτητα ανεπιθύμητη. Τα χαρακτηριστικά αυτά αποτελούν ένα σοβαρό μειονέκτημα στην ποιότητα των λεπτών ερυθρών οίνων. Ο καταναλωτής ακόμη και για τους οίνους κοινής κατανάλωσης, προτιμά εκείνους που είναι απαλοί και με χαμηλή οξύτητα.

Το CO₂ που σχηματίζεται κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση και ελευθερώνεται, γίνεται η αιτία για τη μείωση της οξύτητας. Το μηλικό οξύ έχει δύο ομάδες καρβοξυλίου, ενώ το γαλακτικό οξύ έχει μόνο μία. Αποτέλεσμα αυτής της μετατροπής είναι, επομένως, η μείωση της σταθερής οξύτητας που υπολογίζεται ίση με το ποσό που αντιστοιχεί στο μισό μηλικό οξύ που χάθηκε.

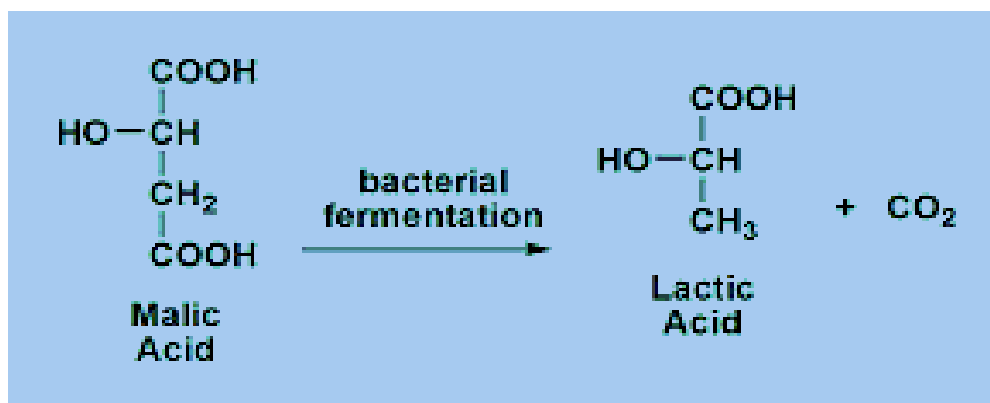
Η μηλογαλακτική ζύμωση με τη μετατροπή του μηλικού οξέος, που έχει έντονη γεύση, σε ένα άλλο οξύ, το γαλακτικό, που είναι λιγότερο "επιθετικό" πάνω στους γευστικούς κάλυκες της γλώσσας για ίσιες οξύτητες, εξαλείφει τα μειονεκτήματα αυτά από τους οίνους και καθιστά τη κατανάλωσή τους πιο ευχάριστη. Το άρωμα του μεταβάλλεται βαθιά, εμπλουτίζεται σε αποχρώσεις και γίνεται ευχάριστο. Οι νέοι ερυθροί οίνοι γίνονται απαλοί, μυελώδεις, σαρκώδεις και δημιουργούν άρωμα και γεύση με «σώμα», χαρακτηριστικά που συνθέτουν την ποιότητα ενός καλού οίνου.

Η μηλογαλακτική ζύμωση έχει τρεις διακριτές αλλά, αλληλένδετες, επιπτώσεις στην ποιότητα του οίνου. Μειώνει την οξύτητα, επηρεάζει τη μικροβιακή σταθερότητα, καθώς και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου.

2.3.1.ΟΞΥΤΗΤΑ

Η μείωση της οξύτητας, και η αύξηση του pH, είναι οι πιο σημαντικές επιδράσεις της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αυτή η ρύθμιση συνήθως δεν αρχίζει έως ότου ο βακτηριακός πληθυσμός έχει φτάσει σε ένα όριο των περίπου 10⁸ κυττάρων ανά ml. Το μόνο υπόστρωμα που πάντα μεταβολίζεται με το ίδιο μονοπάτι, με όλα τα είδη γαλακτικών βακτηρίων, είναι το **L-μηλικό οξύ**. Αυτή η αντίδραση έχει την ικανότητα να 'αποσκληραίνει' τον οίνο που προκαλείται από τη μείωση της οξύτητας, δηλαδή την αντικατάσταση του μηλικού με το γαλακτικό οξύ, ένα οξύ με λιγότερο επιθετική γεύση. Στην ουσία είναι μία απλή αποκαρβοξυλίωση, εξηγώντας την απώλεια της λειτουργίας του οξέος. Η μείωση της οξύτητας αυξάνει την απαλότητα των ερυθρών οίνων, αλλά η υπερβολική μείωση παράγει μια επίπεδη

γεύση. Στη πράξη, στο pH του οίνου, το μηλικό οξύ εξουδετερώνεται μερικώς με τη μορφή των διαχωρισμένων αλάτων, άρα σε μία ιοντική μορφή. Κάθε φορά ένα μόριο του μηλικού οξέος σε ελεύθερο οξύ ή σε ιοντική μορφή αποικοδομείται. Μόνο μία μικρή ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα απελευθερώνεται. Αυτό είναι το πρώτο σημάδι έναρξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης.



Σχήμα 2.2 : Η μετατροπή του μηλικού οξέος κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση (Πηγή: Carboxylic acids in wine, Chem News, October, 2006, No 341, pg 12)

Η σκοπιμότητα της μείωσης της οξύτητας εξαρτάται κυρίως από το αρχικό pH και την οξύτητα των σταφυλιών. Σε γενικές γραμμές, όσο υψηλότερη είναι η οξύτητα και χαμηλότερο το pH, τόσο μεγαλύτερο είναι το όφελος. Αντιστρόφως, όσο χαμηλότερη είναι η οξύτητα και όσο υψηλότερο το pH, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα ανεπιθύμητων συνεπειών. Επιπλέον, όσο υψηλότερη είναι η σχετική συγκέντρωση του τρυγικού οξέος στο χυμό, είναι λιγότερο πιθανό η μηλογαλακτική ζύμωση να επηρεάσει σημαντικά την οξύτητα και το pH του οίνου. Καθώς αλλάζει το pH στον οίνο, έτσι μεταβάλλεται η αναλογία των διαφόρων μορφών έγχρωμης και άχρωμης μορφής των ανθοκυανών. Σε γενικές γραμμές, η απώλεια της έντασης του χρώματος που συνδέεται με τη μηλογαλακτική ζύμωση συμβαίνει σε οίνους με ένα αρχικά πολύ υψηλό pH. Αυτό κυρίως οφείλεται σε απορρόφηση ανθοκυανών στα τοιχώματα των βακτηρίων, ενώ επίσης βοηθούν η αύξηση του pH και τα χαμηλά επίπεδα θειώδη ανυδρίτη.

2.3.2. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Αν η μηλογαλακτική ζύμωση δεν εκδηλωθεί πριν την εμφιάλωση του οίνου, υπάρχει κίνδυνος να εκδηλωθεί αργότερα στον εμφιαλωμένο οίνο με αποτέλεσμα την εμφάνιση ιζήματος και θολώματος, καθώς και έκλυσης αερίου. Πρέπει να σημειωθεί

ότι η σταθερότητα δεν είναι απόλυτη, ο οίνος συνεχίζει να περιέχει, και μετά την μηλογαλακτική ζύμωση, θρεπτικές ουσίες που μπορούν να υποβοηθήσουν την ανάπτυξη βακτηρίων.

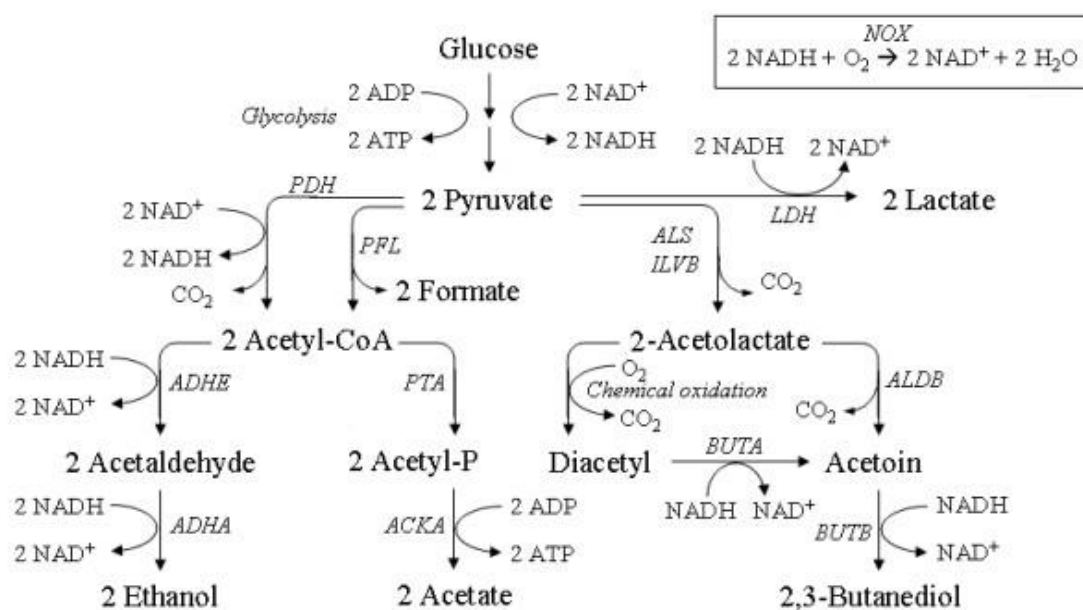
Παλαιότερα, η αυξημένη μικροβιακή σταθερότητα θεωρήθηκε ένα από τα κυριότερα οφέλη της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αυτή η άποψη έχει αλλάξει σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Η βελτιωμένη μικροβιακή σταθερότητα θεωρήθηκε ότι προκύπτει από το μεταβολισμό των υπολειμμάτων θρεπτικών συστατικών μετά την αλκοολική ζύμωση. Ο μεταβολισμός του μηλικού και κιτρικού οξέος άφηνε τη θέση του στα πιο μικροβιακά σταθερά τρυγικό και γαλακτικό οξύ. Επιπλέον, οι πολύπλοκες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος πιστεύεται ότι μειώνει τη συγκέντρωση αμινοξέων, αζώτου, και βιταμινών. Παρότι τα επίπεδά τους έχουν την τάση να μειώνονται, σε οίνους που έχει πραγματοποιηθεί μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να συνεχίσουν να υποστηρίζουν την ανάπτυξη του *Oenococcus oeni*, γαλακτοβάκιλλων και πεδιοκόκκων (Costello et al., 1983), καθώς και άλλων μικροοργανισμών αλλοίωσης. Σε αντίθεση με την κοινή πεποίθηση, η μηλογαλακτική ζύμωση περιστασιακά μειώνει τη μικροβιακή σταθερότητα. Αυτό μπορεί να συμβεί όταν το pH του οίνου είναι πολύ υψηλό. Η προκύπτουσα αύξηση του pH μπορεί να ευνοήσει την μετέπειτα ανάπτυξη βακτηρίων αλλοίωσης του γαλακτικού οξέος. Οργανισμοί που προκαλούν αλλοιώσεις γενικά δεν αναπτύσσονται σε κρασιά με pH κάτω του 3,5, αλλά η ικανότητά τους να αναπτύσσονται αυξάνει ταχέως καθώς το pH αυξάνεται από το 3,5 στο 4,0 και άνω. Έτσι, η σταθεροποιητική επίδραση που σχετίζεται με τη μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να προέλθει περισσότερο από τις πρακτικές που εφαρμόζονται μετά την ολοκλήρωσή της, και όχι ως άμεση συνέπεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Η έγκαιρη έναρξη και ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης επιτρέπει την εφαρμογή των διαδικασιών, όπως το SO₂ και η εμφυάλωση. Καθυστερημένη έναρξη εκθέτει το κρασί σε πιθανές μολύνσεις από βακτήρια οξικού οξέος, αλλοιωγόνα βακτήρια γαλακτικού οξέος, και αλλοίωσης από ζύμες (κυρίως Βρεττανομύκητες / *Dekkera* spp.).

2.3.3. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΗΚΑ ΟΙΝΟΥ

Τα βασικότερα από τα αρωματικά συστατικά του δευτερογενούς αρώματος ανήκουν σε: ανώτερες αλκοόλες (προπανόλη-1, ισοβουιανόλη κ.λ.π), εστέρες (οξικός, καπρινικός, καπρυλικός, αιθυλεστέρας κ.α), αλδεΐδες (π.χ. ακεταλδεΐδη), κετόνες

κ.λ.π. Το διακετύλιο, η ακετοΐνη και η 2,3 -βουτανοδιόλη είναι χαρακτηριστικά αρώματα της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Άλλες ενώσεις, οι οποίες προσδιορίστηκαν στον οίνο μετά την εκδήλωσή της και οι οποίες επηρεάζουν το "μπουκέτο" του είναι: το ηλεκτρικό διαιθύλιο, οι πτητικοί εστέρες, το οξικό αιθύλιο, οι n-προπανόλες, η 2-βουτανόλη, η n-εξανόλη, το γαλακτικό αιθύλιο και η 2,3 βουτανοδιόλη.

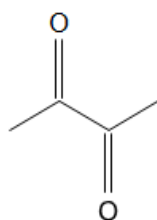
Οι χημικοί μετασχηματισμοί του οίνου από τη μηλογαλακτική ζύμωση είναι πολύπλοκοι στη πραγματικότητα. Μέσω αυτών των μετασχηματισμών προσδίδονται καινούργια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στον οίνο με την εμφάνιση νέων πτητικών παραπροϊόντων όπως το διακετύλιο. Ως δευτερεύοντα παραπροϊόντα παράγονται η ακετοΐνη και 2,3-βουτανοδιόλη που μαζί με το διακετύλιο αποτελούν προϊόντα του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια (Hugenholtz,1993, Liu, 2002, Bartowsky & Henschke, 2004).



Σχήμα 2.3 : Η μετατροπή του κιτρικού οξέος κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση (Πηγή: Hoefnagel et al. (2002), Metabolic Control Analysis)

Το διακετύλιο σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις προσφέρει θετικά στοιχεία στην

πολυπλοκότητα του αρώματος του οίνου (5-10 mg/L), αλλά σε συγκεντρώσεις πάνω από 10 mg/L προσδίδει το ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό βουτυρώδες του άρωμα (Martineau & Henick-Kling, 1995; Moreno-

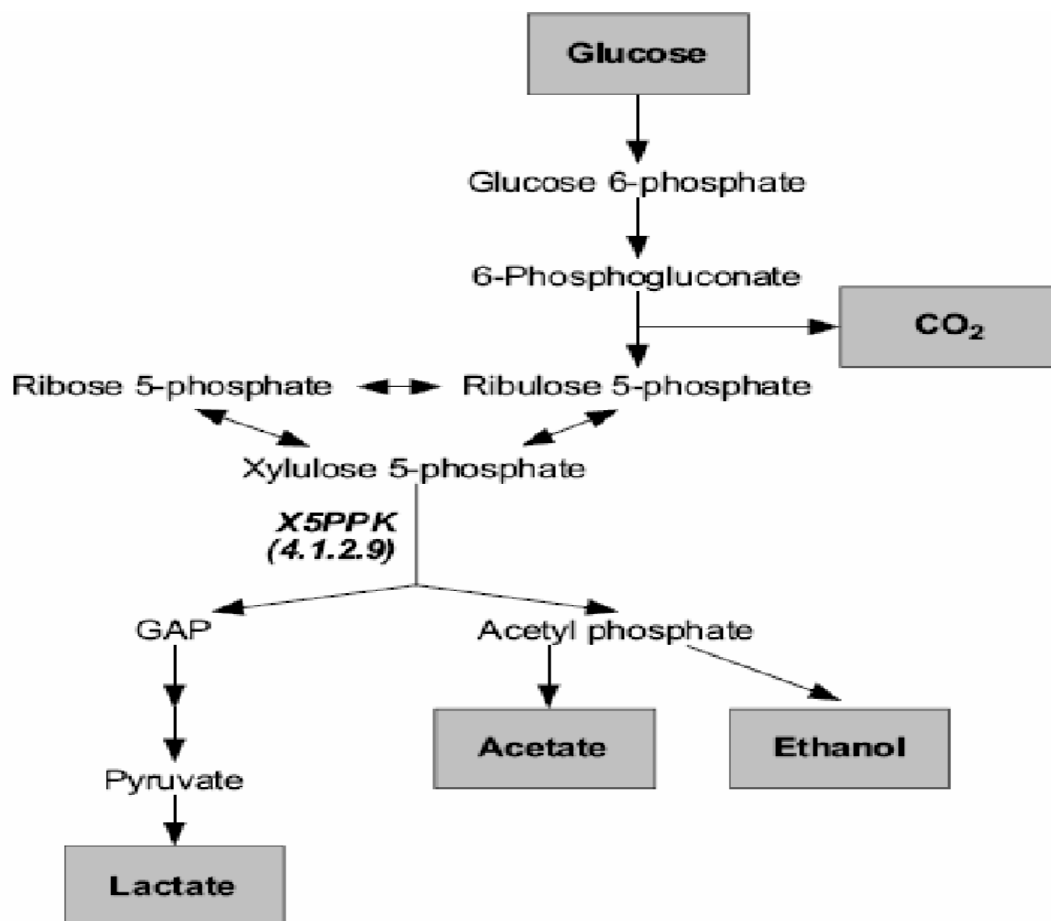


Σχήμα 2.4 : Το διακετύλιο (Πηγή: Wikipedia)

Arribas & Polo, 2005). Το διακετύλιο παράγεται σε μικρές ποσότητες και από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση ($<1\text{mg/L}$). Όμως οι μεγαλύτερες ποσότητες παράγονται από τα γαλακτικά βακτήρια και αυτό εξαρτάται από τα διάφορα γένη των βακτηρίων. Επίσης ο χρόνος ανάπτυξης των βακτηρίων επηρεάζει την παραγόμενη ποσότητα διακετυλίου. Αν η ανάπτυξη γίνει στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης και πριν την πρώτη μετάγγιση οι ποσότητες που παράγονται είναι μικρές. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ορισμένες ζύμες μπορούν να μεταβολίζουν το διακετύλιο (Zoecklein, 1995). Το διακετύλιο είναι μία δικετόνη που συμβάλλει στο χαρακτήρα του οίνου με αρώματα βουτύρου, καραμέλας και καρύδας, καθώς και ένα χαρακτήρα ‘ζύμης’ στους αφρώδεις οίνους. Σε μέτρια συγκέντρωση δηλαδή από $1\text{-}4\text{ mg/L}$, αυτό το δευτερογενές προϊόν συμβάλλει στην αρωματική πολυπλοκότητα με αρώματα βουτύρου, αλλά πάνω από 4 mg/L κυριαρχεί το χαρακτηριστικό άρωμα του βουτύρου, το οποίο θεωρείται ανεπιθύμητο. (Bartowsky-Henschke, 2004). Το διακετύλιο είναι διαμορφωμένο ως ένα ενδιάμεσο του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού των υδατανθράκων, το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται σε γαλακτικό οξύ για να διατηρηθεί η ισορροπία της οξειδοαναγωγής του βακτηρίου. Όταν, επιπλέον, το πυροσταφυλικό παράγεται ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος, εν τη απουσία του σακχάρου, κατευθύνεται στην παραγωγή ακετοΐνης και βουτανοδιόλης. Επίσης, το πυρουβικό οξύ μπορεί να αποκαρβοξυλιώνεται προς διακετύλιο μέσω του α-ακετογαλακτικού. Λόγω του γεγονότος ότι το διακετύλιο είναι χημικά ασταθές, μπορεί να μειωθεί σε ακετοΐνη, η οποία με τη σειρά της να μειωθεί σε 2,3-βουτανοδιόλη. (Bartowsky et al., 2002b; Costello, 2006).

Μία σημαντική αλλαγή κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση είναι η αύξηση της πτητικής οξύτητας. Αυτή η παραγωγή οφείλεται, τουλάχιστον εν’ μέρει, στην αποικοδόμηση του κιτρικού οξέος. Αν και ένα μόριο του κιτρικού οξέος παράγει δύο μόρια οξικού οξέος ($0,2\text{-}0,4\text{ g/L}$), αυτή η υποβάθμιση είναι πάντα περιορισμένη επειδή στα σταφύλια δεν περιέχεται μεγάλη ποσότητα αυτού του οξέος. Τα βακτήρια, επίσης, αυξάνουν τη πτητική οξύτητα μέσω της υποβάθμισης των πεντοζών. Στη πραγματικότητα αυτά τα σάκχαρα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθούν ως πηγή ενέργειας. Η υποβάθμιση του μηλικού οξέος δεν φαίνεται να επαρκεί για την εξασφάλιση των ενεργειακών αναγκών των κυττάρων. (Henick-Kling, 1992). Όλες οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η αύξηση της πτητικής οξύτητας πραγματοποιείται όταν το

μηλικό οξύ έχει εξ' ολοκλήρου εξαντληθεί. Επιπλέον, η αύξηση αυτή είναι ακόμα μεγαλύτερη όταν η μηλογαλακτική ζύμωση διευκολύνεται, όπως για παράδειγμα η χαμηλή οξύτητα γλεύκους. Γενικότερα, η πτητική οξύτητα αυξάνεται κατά τη προσβολή των συστατικών του οίνου, όπως τα σάκχαρα, η γλυκερίνη και το τρυγικό οξύ, από τα γαλακτικά βακτήρια και μπορεί να παρατηρηθεί ο παράλληλος σχηματισμός και άλλων οξέων της αλειφατικής σειράς όπως είναι το βουτυρικό και το μυρμηκικό οξύ. Το οξικό οξύ αποτελεί το 90-95% της συνολικής πτητικής οξύτητας. Η συσσώρευση του διακετυλίου και της ακετοΐνης εξαρτάται από το ποσοστό της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Δηλαδή, χαμηλότερα επίπεδα διακετυλίου και ακετοΐνης παράγονται από υψηλότερο ποσοστό μηλογαλακτικής ζύμωσης. Σε μελέτη βρέθηκε μειωμένη συγκέντρωση διακετυλίου μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση, αλλά αυξημένη συγκέντρωση 2,3-βουτανοδιόλη το οποίο οφείλεται στην ενζυματική μείωση του διακετυλίου. (Maicas et al., 1999). Αυτή η μετατροπή έχει άμεση επίδραση στο άρωμα του οίνου, εξαιτίας του γεγονότος ότι η ακετοΐνη και η 2,3-βουτανοδιόλη έχουν υψηλότερο κατώφλι αντίληψης, περίπου στα 150 mg /l (Francis & Newton, 2005) και 600 mg/l (Bartowsky & Henschke, 2004) αντίστοιχα, ενώ θεωρείται ότι συμβάλλουν στα βουτυρώδη αρώματα σε μικρότερο βαθμό. Η οργανοληπτική αντίληψη του διακετυλίου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η ποικιλία, το στυλ και η ηλικία του οίνου (Swiegers et al.; Costello, 2006), καθώς και τη παρουσία άλλων ενώσεων, όπως είναι το SO₂. Μία έρευνα των Nielsen και Richelieu το 1999, αναφέρθηκε στη σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων του διακετυλίου και του SO₂ στον οίνο κατά τη διάρκεια και μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Με την αρχική προσθήκη του SO₂ κατά την ολοκλήρωση, συνδέεται με το διακετύλιο, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση της ουσίας αυτής. Κατά την αποθήκευση του οίνου, η αντίδραση αυτή αντιστρέφεται με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του διακετυλίου.



Σχήμα 2.5 : Αποικοδόμηση πεντοζών από τα γαλακτικά βακτήρια (Πηγή: Università di Bologna Agricultural Microbiology 2004 / 2005)

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

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

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

Ανάλογα την επιλογή βακτηριακών στελεχών, βρέθηκαν αυξήσεις ή μειώσεις στη συγκέντρωση των εστέρων. (Maicas et al., 1999). Συγκεκριμένα ανέφεραν αύξηση του οξικού ισοαμυλικού, του καπροϊκού αιθυλίου και του οξικού 2-φαινυλ-αιθυλίου. Επίσης, οι Gambaro et al. το 2001 διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα των αιθυλικών και οξικών εστέρων μειώθηκαν κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, αλλά οι αλλαγές αυτές εξαρτώνται από την επιλογή των γαλακτικών βακτηρίων. Γενικότερα, ένα στέλεχος βακτηρίου που εμφανίζει δραστηριότητα στη παραγωγή εστέρων συμβάλλει στην

αύξηση του φρουτώδους αρώματος. Η μεγαλύτερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε από τα στελέχη των *Oenococcus oeni*, ενώ ακολουθούν τα στελέχη των *Lactobacillus* και των *Pediococcus*, αντίστοιχα. (Matthews et al., 2006).

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

Η κυστεΐνη και η μεθειονίνη μεταβολίζονται από βακτήρια που σχηματίζουν διαφορετικές θεικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένου του θειούχου υδρογόνου και της μεθανοθειόλης. Ο μεταβολισμός της μεθειονίνης οδήγησε στο σχηματισμό της μεθανοθειόλης, του διμέθυλο δισουλφίδιο, της 3-προπαν-1-όλη (γνωστής ως μεθειονόλη) και του 3-προπιονικού οξέος. Ο ακριβής μηχανισμός και τα βιοχημικά μονοπάτια δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Οι ενώσεις αυτές σχηματίζονται σε μεγαλύτερες ποσότητες από τον *Oenococcus oeni* παρά από το *Lactobacillus*. (Pripis-Nicolau et al., 2004).

Οι Vallet et al. το 2008, πρότειναν την πιθανή οδό για το σχηματισμό των ενώσεων αυτών με τη βοήθεια των *Oenococcus oeni*. Ο μεταβολισμός της μεθειονίνης οδήγησε στο σχηματισμό της μεθανοθειόλης, του διμέθυλο δισουλφίδιο, της 3-προπαν-1-όλη (γνωστής ως μεθειονόλη) και του 3-προπιονικού οξέος. Ο σχηματισμός των ενώσεων αυτών παίζουν σημαντικό ρόλο στη πολυπλοκότητα του αρώματος, λόγω της ισχυρής οσμής που εκλύουν, το οποίο βέβαια εξαρτάται από το κατώφλι αντίληψης. Αυξημένες συγκεντρώσεις από αυτές τις θειούχες ενώσεις μεταδίδουν αρνητικά

αποτελέσματα, ενώ συγκεντρώσεις κάτω ή κοντά στο κατώφλι αντίληψης, θα δώσουν πολυπλοκότητα στον οίνο.

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαινολικών ενώσεων και γαλακτικών βακτηρίων στους οίνους αναφέρονται στο μεταβολισμό των υδροξυκινναμωμικών οξέων (φερουλικό και κουμαρικό οξύ), από διαφορετικά είδη βακτηρίων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πτητικών φαινολών (4-ethylguaiacol και 4-αιθυλοφαινόλη) (Cavin et al 1993, Gury et al 2004). Αυτά τα παράγωγα μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στο άρωμα του οίνου εξαιτίας του χαρακτηριστικού αρώματός τους και του χαμηλού ορίου ανίχνευσης (Cavin et al. 1993). Στους οίνους, οι ποσότητες αυτών των ενώσεων είναι γενικά χαμηλές και, συνήθως, περιορίζονται από τις συγκεντρώσεις των προδρόμων τους. Σύμφωνα με τους Hernandez et al. (2006) φαίνεται ότι το τρανς καυταρικό και το τρανς κουταρικό οξέα είναι υποστρώματα των γαλακτικών βακτηρίων που μπορούν με τη δράση της κινναμούλο εστεράσης κατά την διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, να αυξήσουν τη συγκέντρωση των υδροξυκινναμωμικών οξέων. Μια πρόσθετη πηγή καφεϊκού και ρ-κουμαρικού οξέος μπορεί να προέλθει από την υδρόλυση των cinnamoyl-glucoside anthocyanins κινναμούλο-γλυκοσιδικών ανθοκυανών (Moreno-Arribas et al. 2008a), καθώς και από άλλα υδροξυκινναμωμικά παράγωγα με ενζυματική δραστηριότητα των γαλακτικών βακτηρίων. Εκτός των γαλακτικών βακτηρίων τα φαινολικά οξέα μπορούν επίσης να μεταβολιστούν από άλλους μικροοργανισμούς στον οίνο, κυρίως του γένους *Brettanomyces* / *Dekkera* (Chatonnet et al. 1995) για το σχηματισμό παραγώγων 4-βινύλ φαινόλης, το οποίο μπορεί να μειωθεί σε 4-αιθυλ φαινόλη. Έτσι, με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, τα γαλακτικά βακτήρια μπορεί να συμβάλουν στα επίπεδα βινυλοφαινόλης που βρέθηκαν σε οίνους.

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

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

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

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

2.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΜΓΖ

Στην οινοποίηση είναι ιδιαίτερα σημαντικός ο αποτελεσματικός έλεγχος της μηλογαλακτικής ζύμωσης για την αποφυγή βακτηριακών αλλοιώσεων. Για τον έλεγχο της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι απαραίτητη η μέτρηση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος. Η μηλογαλακτική ζύμωση συμβαίνει συνήθως μετά την αλκοολική ζύμωση του οίνου. Σε μερικές περιπτώσεις όμως μπορεί να αρχίσει πριν την αλκοολική ζύμωση με αποτέλεσμα να αυξηθεί ο χρόνος ζύμωσης. Η επικάλυψη των δύο ζυμώσεων μπορεί να σταματήσει την αλκοολική ζύμωση με αποτέλεσμα την κατανάλωση των σακχάρων από τα βακτήρια και την παραγωγή πτητικών παραπροϊόντων. Επίσης τα γαλακτικά βακτήρια κατά την φάση ανάπτυξης δεν μεταβολίζουν τα σάκχαρα αλλά μόνο το μηλικό οξύ. Με την κατανάλωση όλου του μηλικού στον οίνο αυξάνεται ο κίνδυνος σημαντικών μεταβολών, ειδικότερα σε οίνους που περιέχουν αζύμωτο σάκχαρο. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο έλεγχος της μηλογαλακτικής ζύμωσης και ειδικότερα του μηλικού οξέος και των πτητικών παραπροϊόντων. Στην πράξη κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, και αφού

έχει ολοκληρωθεί η αποικοδόμηση του μηλικού οξέος τα γαλακτικά βακτήρια περιορίζονται με την προσθήκη διοξειδίου του θείου (SO_2). Ωστόσο, η χρήση του ελέγχεται αυστηρά, αφού οι υψηλές δόσεις μπορεί να προκαλέσουν οργανοληπτικές αλλοιώσεις στο τελικό προϊόν (ανεπιθύμητα αρώματα θειούχων ενώσεων και μερκαπτανών) και λόγω των κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία από την κατανάλωση αυτής της ουσίας. Όσον αφορά τα προϊόντα με αντιμικροβιακή δράση συμπληρωματική προς SO_2 , πρόσφατα έχει περιγραφεί πως το διμεθυλοδικαρβονιδιο (DMDC) είναι σε θέση να αναστέλλει την ανάπτυξη ζυμομυκήτων και γαλακτικών βακτηρίων, επιτρέποντας τη μείωση της δόσης του SO_2 (Renouf et al. 2008). Οι άλλες εναλλακτικές λύσεις είναι η χρήση λυσοζύμης που είναι ιδιαίτερα σημαντική και ορισμένα αντιμικροβιακά πεπτίδια (Navarro et al 2000; Du Toit et al 2002). Δεδομένου ότι η λυσοζύμη μπορεί να προκαλέσει ανοσολογικές αντιδράσεις σε ορισμένα άτομα (Mine και Zhang 2002), η παρουσία της σε προϊόντα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του οίνου, μπορεί να προκαλέσει κάποια ανησυχία. Πρόσφατα, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις επιπτώσεις των φαινολικών ενώσεων για την ανάπτυξη και το μεταβολισμό των γαλακτικών βακτηρίων στον τομέα του οίνου, προκειμένου να διαπιστωθεί ο βαθμός στον οποίο οι ενώσεις αυτές συμμετέχουν στη μηλογαλακτική ζύμωση κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (Garcia-Ruiz et al. 2008a). Έχει προταθεί ότι φαινολικές ενώσεις μπορούν να συμπεριφέρονται ως ενεργοποιητές ή αναστολείς βακτηριακής ανάπτυξης ανάλογα με τη χημική τους δομή (υποκαταστάσεις στο φαινολικό δακτύλιο) και συγκέντρωση (Reguant et al. 2000). Πρόσφατα, η αξιολόγηση της διπλής αντιοξειδωτικής και αντιβακτηριδιακής δράσης των φαινολικών ενώσεων στα *Vitis Vinifera* L. επιβεβαίωσαν το δυναμικό αυτών των ενώσεων ως εναλλακτική λύση στα θειώδη στην οινοποίηση. (Garcia-Ruiz et al. 2008b).

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

- i. Χαμηλό pH ($\text{pH} < 3,2$)
- ii. Υψηλή συγκέντρωση αλκοόλης ($> 14\%$)
- iii. Χαμηλή θερμοκρασία

- iv. Περιεκτικότητα σε θειώδη ανυδρίτη > 50 ppm

Οι παρακάτω διεργασίες μπορούν να παρεμποδίσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση :

- i. Γρήγορη μετάγγιση του οίνου μετά την αλκοολική ζύμωση
- ii. Παστερίωση του οίνου
- iii. Αποστείρωση του οίνου με διήθηση

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

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο κεφάλαιο που ακολουθεί γίνεται αναλυτική περιγραφή όλων των μεθόδων και των αναλύσεων που έλαβαν χώρα κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της μεταπτυχιακής εργασίας. Πιο αναλυτικά γίνεται περιγραφή των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, κατά την μηλογαλακτική ζύμωση και τέλος τον οργανοληπτικό έλεγχο.

3.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε είχε ως στόχο την μελέτη της επίδρασης της μηλογαλακτικής ζύμωσης, με χρήση διαφορετικών στελεχών γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus Oeni*, σε ροζέ οίνο της ποικιλίας Μοσχοφίλερο. Η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογηθεί η χρησιμότητα της πραγματοποίησης μηλογαλακτικής ζύμωσης στους ροζέ οίνους της ποικιλίας Μοσχοφίλερο. Έτσι συγκρίνονται, ως προς τις χημικές και οργανοληπτικές παραμέτρους, οίνοι που εμβολιάστηκαν με επιλεγμένα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων, οίνοι που ολοκλήρωσαν την μηλογαλακτική ζύμωση αυθόρμητα με δείγματα χωρίς την πραγματοποίηση μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Η ποικιλία Μοσχοφίλερο είναι γνωστή για την παραγωγή φρέσκων και φρουτώδων οίνων, οι οποίοι είναι ευοξειδωτοι με ασταθές χρώμα, με αποτέλεσμα σε μικρό χρονικό διάστημα να παρουσιάζουν καστανές ανταύγειες γεγονός που προδίδει γήρανση του οίνου. Επίσης, λόγω της ευοξειδωτής φύσης τους, υπάρχει αλλαγή στον αρωματικό χαρακτήρα, με τη πάροδο του χρόνου. Η μελέτη περιέχει στοιχεία πρωτοτυπίας λόγω της χρησιμοποίησης γαλακτικών βακτηρίων για την πραγματοποίηση μηλογαλακτικής ζύμωσης σε ερυθρώπο οίνο μετά την αλκοολική ζύμωση με στόχο τη διαφοροποίηση, μιας και αυτή η πρακτική συνήθως δεν εφαρμόζεται έως τώρα.

3.2 ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Η συλλογή των σταφυλιών έγινε στην περιοχή της Μηλίας του δήμου Τρίπολης στο νομό Αρκαδίας, η οποία συγκαταλέγεται στην αμπελουργική ζώνη Π.Ο.Π. της Μαντινείας. Ο αμπελώνας από τον οποίο προέρχονται τα σταφύλια τοποθετείται σε

υψόμετρο περίπου 680 μέτρων, έχει νοτιοανατολικό προσανατολισμό και κλίση εδάφους κάτω από 5%, είναι αρδευόμενος με μέση στρεμματική απόδοση 1.100 kg, ηλικίας 15 ετών. Το σύστημα μόρφωσης είναι γραμμικό αμφίπλευρο royat, το κλάδεμα καρποφορίας βραχύ με 2 οφθαλμούς ανά παραγωγική μονάδα, ενώ το υποκείμενο που χρησιμοποιείται είναι το 110 R.

Για την αλκοολική ζύμωση του οίνου ακολουθήθηκε πρωτόκολλο ροζέ οينوποίησης. Η συγκομιδή 65 κιλών σταφυλιών της ποικιλίας Μοσχοφίλερο, έγινε στις 25/10/2015, ενώ είχαν αποκτήσει 11,7^ο Baume ή αλλιώς 206 gr σακχάρων/ lt και εν συνεχεία μεταφέρθηκαν σε πλαστικά τελάρα στο εργαστήριο Οινολογίας του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, τον Οκτώβριο του 2015.

Για την ακρίβεια, τοποθετήθηκαν σε ψυκτικό θάλαμο στους 1 °C, με στόχο τη μείωση της θερμοκρασίας των σταφυλιών για την αποφυγή οξείδωσής τους. Ύστερα από 24 ώρες ακολούθησε η αποβοστρύχωση χειρωνακτικά και ο εκραγισμός με χειροκίνητο θλιπτήρα. Εν συνεχεία, ο σταφυλοχυμός μαζί με τα στέμφυλα μεταφέρθηκε σε μία μικρή δεξαμενή οينوποίησης inox με ελεγχόμενη ψύξη στους 10 °C ώστε να επιτύχουμε εκχύλιση ανθοκυανών για την παραγωγή χρώματος όπου αναδεδυόταν χειρωνακτικά. Κατά τον εκραγισμό και μετέπειτα στο σταφυλοπολτό πραγματοποιήθηκε θείωση με προσθήκη 3 g/hl sodium metabisulfite, καθώς επίσης και η προσθήκη ενζύμων απολάσπωσης 30 g/tn. Μετά την εκχύλιση πιέστηκε η σταφυλομάζα για την παραλαβή του γλεύκους το οποίο επανατοποθετήθηκε σε ψυκτικό θάλαμο για καλύτερη στατική απολάσπωση και αποφυγή έναρξης της αλκοολικής ζύμωσης λόγω μικρής ποσότητας θείωσης.

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

Μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης έγινε μετάγγιση του οίνου σε 8 δοχεία χωρητικότητας 5 λίτρων για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Ειδικότερα εμβολιάστηκαν τρία δοχεία με διαφορετικά στελέχη εμπορικών γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus Oeni* (Chr. Hansen, Denmark) με προσθήκη 20 g/hl και μια επανάληψη για το καθένα. Επιλέχθηκαν τα στελέχη Viniflora® CH16, Viniflora® Oenos και Viniflora® CiNe. Έγινε προσπάθεια σε ένα δοχείο για επίτευξη αυθόρμητης μηλογαλακτικής ζύμωσης με γηγενή γαλακτικά βακτήρια. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε για όλα τα δείγματα μετά από 20 ημέρες. Για τον έλεγχο της πορείας της μηλογαλακτικής ζύμωσης γινόταν καθημερινά προσδιορισμός με τη μέθοδο TLC (Thin Layer Chromatography). Παράλληλα ένα δοχείο των 5 λίτρων στο οποίο πραγματοποιήθηκε ισχυρή θείωση με προσθήκη 8 g/hl sodium metabisulfite για την ανακοπή αυθορμής μηλογαλακτικής ζύμωσης ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για τις αναλύσεις και την οργανοληπτική δοκιμή.

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

Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων και η περιγραφή της συνθήκης.

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

Πίνακας 3.1 : Η ονομασία των δειγμάτων και η περιγραφή της συνθήκης

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

- i. Βασικές αναλύσεις οίνων :
 - ✓ pH
 - ✓ ολική οξύτητα
 - ✓ ελεύθερος και ολικός SO₂
 - ✓ πτητική οξύτητα
 - ✓ ανάγοντα σάκχαρα
 - ✓ ένταση – απόχρωση
- ii. Προσδιορισμός φαινολικών ουσιών
- iii. Ποσοτικός προσδιορισμός αρωματικού δυναμικού με χρήση GC-FID/ SPME
- iv. Ακριβής ανάλυση για έλεγχο της ποσότητας των οξέων με χρήση HPLC
- v. Οργανοληπτικός έλεγχος του τελικού προϊόντος

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

3.3 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΟΙΝΟΥ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

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 :

- i. Μέτρηση της ογκομετρούμενης οξύτητας
- ii. Μέτρηση της ενεργούς οξύτητας
- iii. Μέτρηση της πτητικής οξύτητας
- iv. Μέτρηση αλκοολικού βαθμού
- v. Μέτρηση αναγόντων σακχάρων
- vi. Προσδιορισμός χρωματικών χαρακτηριστικών (ένταση, απόχρωση)

3.3.2 ΔΕΙΚΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (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 σιφόνιο 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). Μετρίεται 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

3.3.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ (TLC) ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΗΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Μία ταχεία μέθοδος προσδιορισμού (κυρίως ποιοτικού) ύπαρξης ή όχι μηλικού οξέος στον οίνο είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη προκειμένου να διαπιστωθεί εάν έγινε ή όχι μηλογαλακτική ζύμωση, αφού χρησιμοποιείται κατά τη διάρκειά της και εμφανίζει το τρυγικό, το μηλικό, το γαλακτικό και το ηλεκτρικό οξύ.

Χρησιμοποιούνται :

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

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

3.3.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΕ GC-FID

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

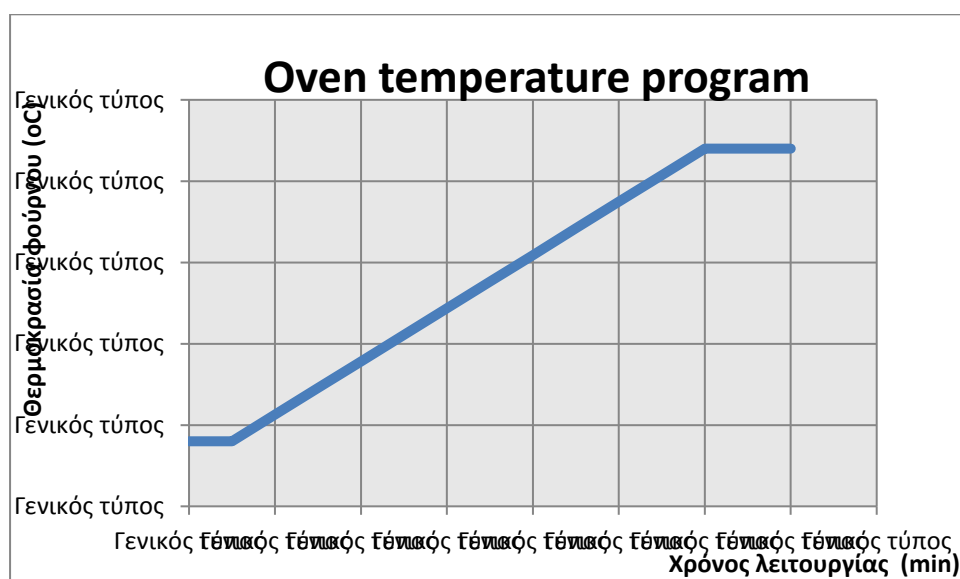
Αρχικά, γίνεται ταυτοποίηση, βάση των προτύπων των αρωματικών ενώσεων, αφού γνωρίζουμε τον χρόνο που εμφανίζεται η κορυφή κάθε αρωματικής ουσίας. Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα των υπό μελέτη ουσιών και αναλύονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες με το άγνωστο δείγμα. Επιπλέον, κατασκευάζεται η πρότυπη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

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

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

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

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



Γράφημα 3.1 : Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα

3.3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC)

Η οργανολογία της Υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης είναι η εξής:

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

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

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

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- i. 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 .
- ii. Παραλαβή του αναλυόμενου δείγματος μέσω σύριγγας χωρητικότητας 50 μL , γεμίζοντας την μέχρι τέλους με σκοπό την παντελή αποφυγή φυσαλίδων.
- iii. Εισχώρηση του δείγματος μέσα από την ειδική εσοχή με ένεση και αφού το μηχανήμα κρατούσε συγκεκριμένη ποσότητα για τα τελικά αποτελέσματα (20 μL) η υπόλοιπη ποσότητα απορρίπτονταν (INJECT).
- iv. Ακολουθεί η ενεργοποίηση των καναλιών ώστε να τρέξει το δείγμα και να φανερωθούν οι αντίστοιχες κορυφές.
- v. Μετά από διάστημα 30 λεπτών λαμβάνεται το χρωματογράφημα.

Καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής πορείας η ροή και η πίεση ήταν ρυθμισμένες 0.6mL/min και 38kg/cm² αντίστοιχα. Η θερμοκρασία ήταν προγραμματισμένη στους 50 °C όπου και παρέμενε σταθερή μέσω φούρνου. Η ίδια

διαδικασία για κάθε δείγμα εφαρμόστηκε 2 φορές με σκοπό την καλύτερη επαναληψιμότητα

3.4 ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 3 στελέχη εμπορικών γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus Oeni* και ειδικότερα τα Viniflora® Cine, Viniflora® Oenos και Viniflora® CH16. Τα παραπάνω στελέχη, σύμφωνα με την εταιρία παραγωγής τους, δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα σε συγκεκριμένες συνθήκες στον οίνο.

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

Το Viniflora® Oenos είναι το πρώτο γαλακτικό βακτήριο *Oenococcus Oeni* που εμφανίστηκε για άμεσο εμβολιασμό στον οίνο. Η ιδέα ήταν να κάνει μία εύκολη, και ασφαλή μηλογαλακτική ζύμωση για μεγάλο εύρος κρασιών. Γενικότερα θα δώσει μία σταθερή και αποτελεσματική μηλογαλακτική ζύμωση στα περισσότερα κρασιά. Για αυτό το λόγο είναι πολύ συχνή η εφαρμογή του. Με το Oenos έχουμε μία μεσαία παραγωγή διακετυλίου. Χρησιμοποιείται για ποικιλίες κυρίως κόκκινες, όπως είναι τα Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot, Malbec, Pinot Noir, Gamay, Nebbiolo, Carignan και Tempranillo. Επίσης όπως στο προηγούμενο γαλακτικό βακτήριο, ο εμβολιασμός του μπορεί να γίνει πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την αλκοολική ζύμωση. Η θερμοκρασία που συνιστάται είναι περίπου 17 – 25 °C, το pH μεγαλύτερο από 3,3, το ολικό SO₂ πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης να είναι μικρότερο από 40 ppm

για λευκούς και 70 ppm για κόκκινους οίνους και ο μέγιστος αλκοολικός τίτλος να μη ξεπερνάει το 14 % vol.

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

3.5 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

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

i. Η εξέταση της αξιολόγησης των αρωμάτων

- ✓ εσπεριδοειδή
- ✓ βανίλια

✓ τριαντάφυλλο

✓ βούτυρο

ii. Η οξύτητα

iii. Η ισορροπία

iv. Το σώμα

Για την διενέργεια του οργανοληπτικού ελέγχου πραγματοποιήθηκε εκπαίδευση 14 δοκιμαστών σε 4 συνεδρίες. Οι δοκιμαστές εκπαιδεύτηκαν με εξάσκηση και επανάληψη πάνω στους άξονες του ενδιαφέροντός μας. Στη συνέχεια παρατίθενται οι ασκήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση των δοκιμαστών.

1^η άσκηση: Βασικές γεύσεις σε νερό

1Α : 2,0 g / lt αλάτι σε νερό

1Β : 20,0 g / lt ζάχαρη σε νερό

1Γ : 15,0 mg / lt θειική κινίνη

1Δ : 2,5 g / lt τρυγικό οξύ

2^η Άσκηση: Βασικές γεύσεις σε λευκό κρασί

2Α : Μάρτυρας

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

2Γ : Μάρτυρας + 15,0 g / lt ζάχαρη

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

3^η Άσκηση : Οξύτητα σε λευκό κρασί

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

3Β : Μάρτυρας

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

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

4^η Άσκηση: Ζάχαρη σε λευκό κρασί

4Α : Μάρτυρας + 8,0 g / lt ζάχαρη

4Β : Μάρτυρας

4Γ : Μάρτυρας + 15,0 g / lt ζάχαρη

4Δ : Μάρτυρας + 25,0 g / lt ζάχαρη

5^η Άσκηση: Ισορροπία οξύτητας / σακχάρων σε λευκό κρασί

5Α : Μάρτυρας

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

5Γ : Μάρτυρας + 7,5 g / lt ζάχαρη

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

6^η Άσκηση: Εξέταση σώματος σε λευκό κρασί

6Α : Μάρτυρας

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

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

7^η Άσκηση: Αναγνώριση αρωμάτων

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

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

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

Ροδάκινο : 12 ml χυμό ροδάκινο σε 300 ml οίνου

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

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

Μετά την εκπαίδευση ακολούθησε ο οργανοληπτικός έλεγχος των 5 δειγμάτων. Σε κάθε δοκιμαστή δόθηκε ένα φύλλο με τα χαρακτηριστικά του οίνου (άρωμα, οξύτητα, ισορροπία, σώμα) και τη κλίμακα με βάση την οποία θα γινόταν η βαθμολόγηση. Οι δοκιμαστές χρησιμοποίησαν μία κλίμακα με συνεχόμενες γραμμές από 0 – 10 για να βαθμολογήσουν την ένταση του κάθε χαρακτηριστικού. Οι συνεχόμενες γραμμές έχουν μήκος 15 εκατοστά και στην αρχή και στο τέλος υπάρχουν τα δύο άκρα της έντασης του χαρακτηριστικού που μετριέται. Ο δοκιμαστής βάζει ένα σημάδι, ενώ ο αναλυτής το μετατρέπει σε νούμερο. Αυτή η κλίμακα δίνει τη δυνατότητα να μετρηθούν οι μικρές διαφορές, εάν υπάρχουν, μεταξύ των δειγμάτων. Βεβαίως είναι πιο δύσκολη στη χρήση, για αυτό απαιτείται η επανάληψη, για ακριβέστερα συμπεράσματα. Ο οργανοληπτικός έλεγχος έγινε εις τριπλούν κάτω υπό τις ίδιες συνθήκες, με τους ίδιους δοκιμαστές, με διαφορετική τριπήφια κωδικοποίηση των δειγμάτων. (Καλλίθρακα, 2014).



Εικόνα 3.1 : Θέση οργανοληπτικού ελέγχου. (Πηγή: Προσωπικό αρχείο.)

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

3.5.1 ΤΡΟΠΟΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ

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

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

Και σε μία δεύτερη φάση της οσφρητικής εκτίμησης, να γίνεται και ανάδευση του κρασιού με περιστροφικές κινήσεις, μία διαδικασία μέσω της οποίας επιτρέπει τη



Εικόνα 3.2 : Δείγματα οργανοληπτικού ελέγχου

μεγέθυνση της επιφάνειας εξάτμισης και συνεπώς τη μεγαλύτερη απελευθέρωση αρώματος. (OIV 2009).

Ακολουθεί εισαγωγή μικρής ποσότητας δείγματος, 6 έως 10 ml, στο στόμα. Το κρασί “μετακινείται” στο στόμα για να καλυφθούν όλες οι επιφάνειες στο στόμα, όπως η γλώσσα, τα μάγουλα και ο ουρανίσκος. Οι διάφορες διαταραχές της γεύσης (γλυκιά, ξινή, γλυκιά) οι οποίες γίνονται αντιληπτές, σχετίζονται με τη διάρκεια του χρόνου αλλά και το πώς αλλάζουν στην αντίληψη και την ένταση.

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

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

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

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



Διάγραμμα 4.1 : Γραφική απεικόνιση Αλκοολικής ζύμωσης

Μετά την έκθλιψη, την εκχύλιση και την πίεση του σταφυλοπολτού έγινε ο εμβολιασμός με ζύμες *Saccharomyces cerevisiae* 20 g/ hl (UCLM S325, Fermentis, France) καθώς επίσης και θρεπτικά για τους ζυμομύκητες 20 g/ hl (bioferm 1, Fermentis, France). Κατά την αλκοολική ζύμωση, η μέση θερμοκρασία ήταν 20 °C.

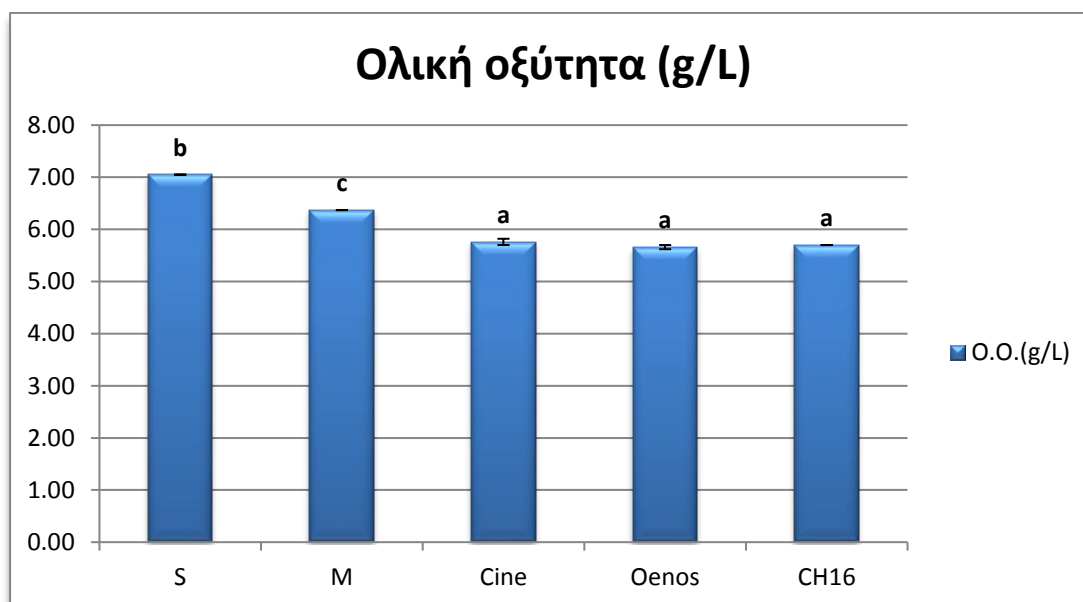
4.2 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΟΙΝΟΥ

Κατά την πραγματοποίηση της ερευνητικής εργασίας έλαβαν χώρα όλες οι βασικές οινολογικές αναλύσεις. Τα αποτελέσματα συλλέχθηκαν μετά τη περαίωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζονται η ολική οξύτητα, η ενεργός οξύτητα (pH), η πτητική οξύτητα, ο αλκοολικός βαθμός και τα ανάγοντα σάκχαρα (Διάγραμμα 4.1).

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ					
ΔΕΙΓΜΑ	Ολική οξύτητα (g/L)	Ενεργός οξύτητα (ph)	Πτητική οξύτητα(g/L)	Ανάγοντα σάκχαρα(g/L)	Αλκοολικός τίτλος(% vol)
S	7.05	3.4	0.297	1,116	12,3
M	6.37	3.44	0.421		
Cine	5.75	3.5	0.345		
Oenos	5.66	3.52	0.426		
CH16	5.7	3.53	0.385		

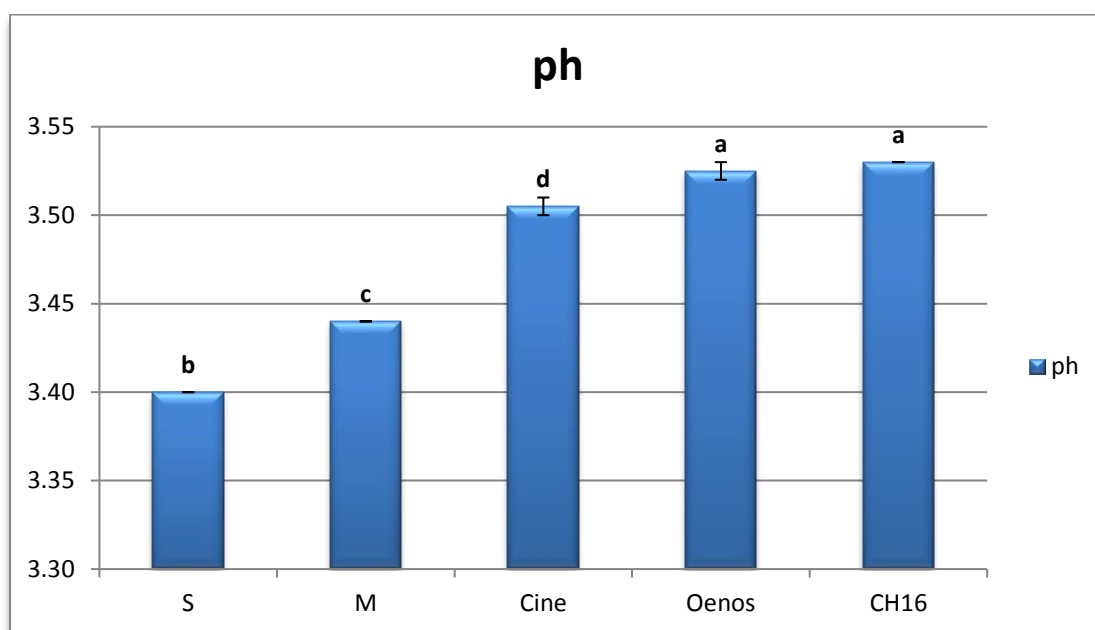
Πίνακας 4.1 : Πίνακας Βασικών Αναλύσεων του Μοσχοφίλερου

Η ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4.2, δείχνει μεγαλύτερη στο δείγμα S που έχει αποτραπεί η μηλογαλακτική ζύμωση. Αυτό είναι φυσιολογικό, καθώς κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση το L-μηλικό οξύ μετατρέπεται σε L-γαλακτικό οξύ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αισθητή μείωση της ολικής οξύτητας. (Davis et al., 1985; Lonvaud-Funel, 1999). Δηλαδή, 1 g/ l μηλικού οξέος έχει την ικανότητα να μετατρέπεται σε 0,67 g/ l γαλακτικού οξέος. Με αυτή τη διαδικασία, ο οίνος αποκτά μικρότερη ογκομετρούμενη οξύτητα συνολικά. Οι τιμές των δειγμάτων κυμαίνονται από 5,66 έως 7,05 g/ l τρυγικού οξέος. Τα δείγματα Cine, Oenos και CH16 δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, κάτι που δεν ισχύει με τα άλλα 2 δείγματα, ενώ χαμηλότερη τιμή εμφανίζει το δείγμα Oenos.



Διάγραμμα 4.2 : Ολική οξύτητα μετά τη Μηλογαλακτική ζύμωση εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ (g / l)
(οι τιμές με διαφορετικά a, b, c είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Στο διάγραμμα 4.3 παρουσιάζεται το pH – ενεργός οξύτητα των δειγμάτων, μετρημένο στους 20 °C. Όπως γίνεται αντιληπτό, εξίσου το pH των οίνων που ολοκλήρωσαν τη μηλογαλακτική ζύμωση είναι αυξημένο σε σχέση πρωτίστως με το δείγμα S και μετέπειτα το δείγμα M με την αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση. Η ανώτερη τιμή είναι 3,53 στα δείγματα Oenos και CH16, ενώ η χαμηλότερη 3,40 στο δείγμα S. Στις μετρήσεις των δειγμάτων φαίνεται ότι δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους τα δείγματα Oenos και CH16, ενώ διαφέρουν ελάχιστα με το δείγμα Cine και ακόμα περισσότερο με τα δείγματα S και M.

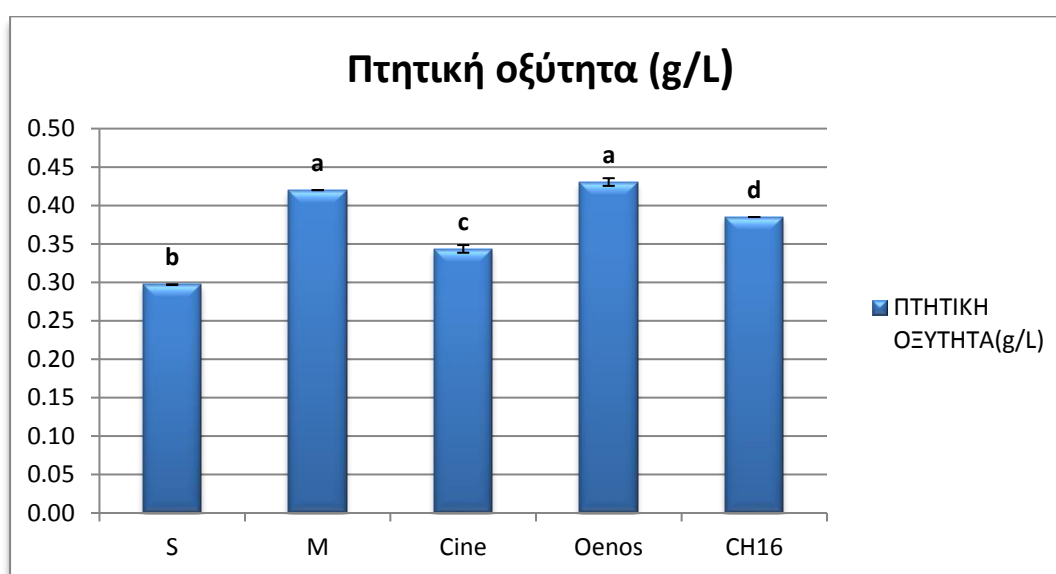


Διάγραμμα 4.3 : Η ενεργός οξύτητα μετά τη Μηλογαλακτική ζύμωση (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

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

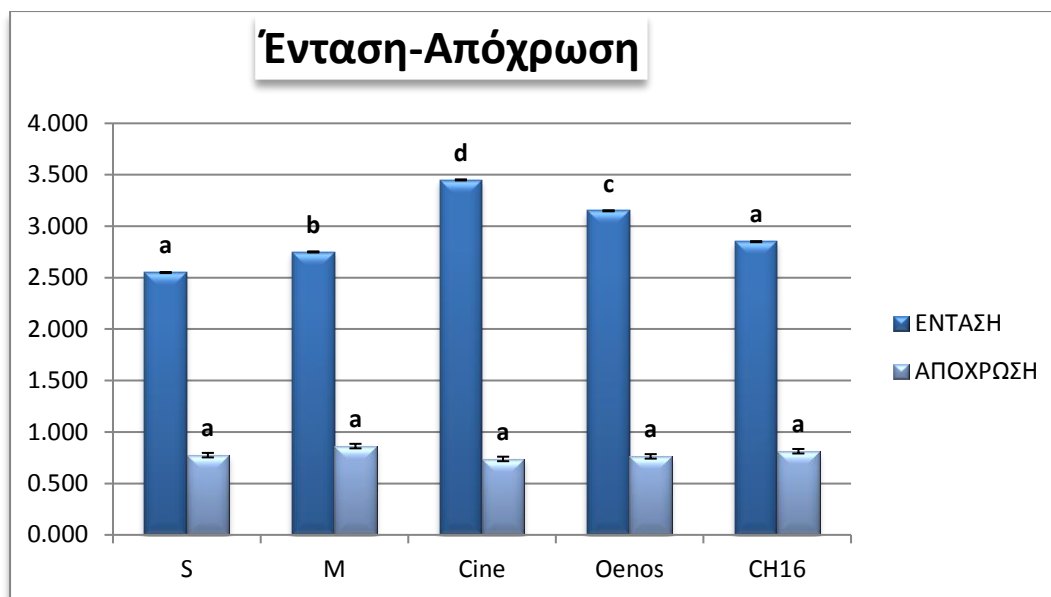
κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση ως αναπόφευκτο αποτέλεσμα του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος από τα μηλογαλακτικά βακτήρια.

Όπως παρατηρείται, στο διάγραμμα 4.4, γενικά σε όλα τα δείγματα παρατηρείται πολύ χαμηλή πτητική οξύτητα. Το δείγμα S έχει τη χαμηλότερη πτητική οξύτητα και ισούται με 0,297 g/l οξικού οξέος, καθώς έχει αποτραπεί η μηλογαλακτική ζύμωση, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα υπάρχει μία μικρή αύξηση από 0,08 έως 0,15 g/l οξικού οξέος. Η αύξηση της πτητικής οξύτητας στα δείγματα αυτό είναι φυσιολογική, αφού τα γαλακτικά βακτήρια συμβάλλουν σε αυτή. Παρ' όλα αυτά, η χαμηλή πτητική οξύτητα, σε όλα τα δείγματα, συμβάλλει στην πολυπλοκότητα του αρώματος.



Διάγραμμα 4.4 : Η πτητική οξύτητα μετά τη Μηλογαλακτική ζύμωση (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Στο διάγραμμα 4.5 παρουσιάζεται η ένταση και η απόχρωση των δειγμάτων με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου. Ένταση χρώματος είναι το άθροισμα απορροφήσεων στα 420nm, 520nm και 620nm. Απόχρωση του οίνου είναι ο λόγος της απορρόφησης στα 420nm προς την απορρόφηση στα 520nm. Οι μετρήσεις αυτές επιτρέπουν την παρακολούθηση των μεταβολών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης και των διάφορων οινολογικών πρακτικών. Την μεγαλύτερη ένταση παρουσιάζει το δείγμα Cine. Ως προς την απόχρωση δεν φαίνεται να υπάρχουν αξιόλογες διαφορές.

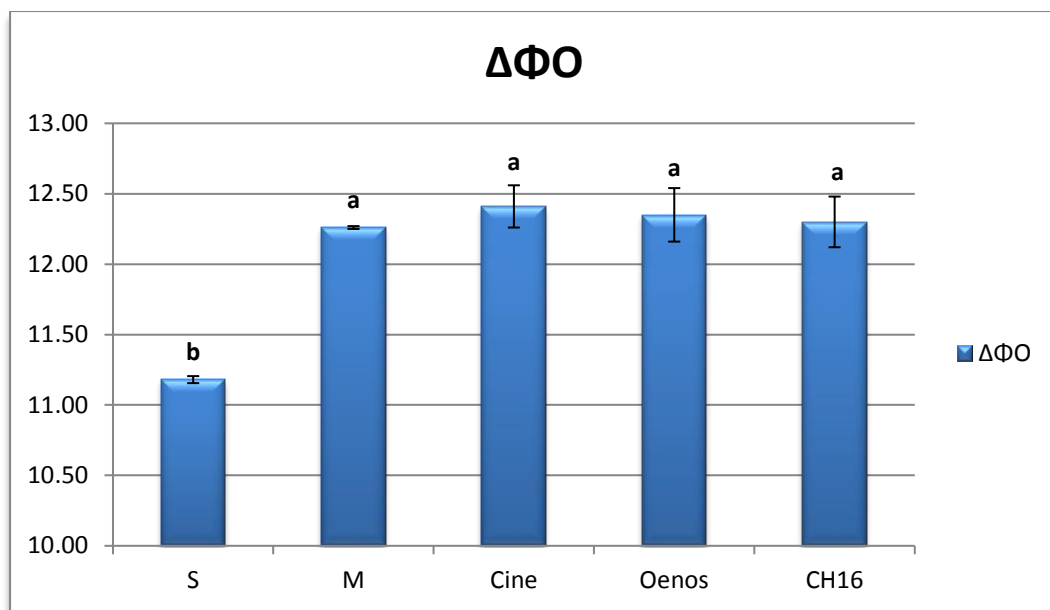


Διάγραμμα 4.5. : Η ένταση και απόχρωση των οίνων (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Σύμφωνα με το διάγραμμα 4.1, παρατηρείται ότι ο αλκοολικός βαθμός, όπου οι μονάδες μέτρησης της αλκοόλης στους οίνους είναι % vol που υποδηλώνει τα ml άνυδρης καθαρής αλκοόλης που περιέχονται σε 100 ml οίνου (vol/vol), υπολογίστηκε στα 12.3 % vol. Τέλος, τα ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκαν στα 1,116 g/l, το οποίο δηλώνει πως επρόκειτο για ξηρό οίνο, καθώς δεν ξεπέρασε τα 2 g/l ανάγοντα σάκχαρα.

4.3 ΔΕΙΚΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

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 το σύνολο των φαινολικών συστατικών του οίνου και όχι το χρώμα του. Οι περιεκτικότητες των οίνων σε φαινολικές ουσίες παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα.



Διάγραμμα 4.6 : ΔΦΟ τελικών οίνων(τιμές με διαφορετικά γράμματα a,b ... είναι σημαντικά διαφορετικές ,Tuckey's HSD test, $p < 0.05$)

Παρατηρείται ότι όσον αφορά τις φαινολικές ουσίες υπάρχουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι τιμή του δείκτη για το δείγμα χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση είναι μικρότερη απ' ότι στα δείγματα που πραγματοποιήθηκε μηλογαλακτική ζύμωση. Οι διαφορά αυτή οφείλεται πιθανόν σε συσσωματώσεις και πολυμερισμούς που έγιναν κατά την διάρκεια της ΜΓΖ.

4.4 ΑΡΩΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΜΕΣΩ GC-FID

Η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να μεταβάλλει στο αρωματικό προφίλ του οίνου, όσον αφορά τους εστέρες. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι κατά την ενζυματική δραστηριότητα των γαλακτικών βακτηρίων θα μπορούσε, είτε να συντεθούν, είτε να υδρολυθούν εστέρες, ανάλογα βέβαια το βακτηριακό στέλεχος που θα χρησιμοποιηθεί, την ποικιλία και τις συνθήκες οινοποίησης (Pozo-Bayón et al., 2005). Η αναλυτική μέθοδος μέσω GC-FID εφαρμόστηκε στα 5 δείγματα για να καθοριστεί το αρωματικό τους προφίλ, μετά τη περαίωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν. Αναγνωρίστηκαν 10 πτητικές ενώσεις οι οποίες παρουσιάζονται αναλυτικά στο πίνακα 4.2. που ακολουθεί. Ανιχνεύθηκαν 6 αιθυλικοί εστέρες ευθείας και διακλαδωμένης αλυσού, 1 οξικός εστέρας, 2 ανώτερες αλκοόλες και 1 τερπενόλη.

Ομάδα Αρωματικών Ουσιών	Αρωματικές Ενώσεις	Άρωμα
Αιθυλικοί εστέρες	Ethyl butyrate	αγγούρι, ανανάς, γρέϊπφρουτ
	Ethyl caproate	αγγούρι, ανανάς, γρέϊπφρουτ
	Ethyl isobutyrate	ώριμο φρούτο, γλυκό, καουτσούκ
	Ethyl-2-methyl butyrate	γλυκό πράσινο μήλο
	Ethyl laurate	φύλλο
	Ethyl decanoate	σταφύλι
Οξικοί εστέρες	Isoamyl acetate	μπανάνα,αχλάδι
Ανώτερες αλκοόλες	Isoamyl alcohol	μπανάνα
	Phenethyl alcohol	τριαντάφυλλο
Τερπενόλες	Linalool	λεβάντα,κίτρο

Πίνακας 4.2 : Ομάδες αρωματικών ενώσεων

Παρατηρώντας το διάγραμμα 4.7 που παρουσιάζονται 6 αιθυλικοί εστέρες και ένας οξικός εστέρας που εντοπίστηκαν. Όσον αφορά τους αιθυλικούς εστέρες, ο ethyl laurate βρέθηκε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα σε σχέση με τους υπόλοιπους εστέρες, σε συγκεντρώσεις από 0,37 έως 0,45 mg/l, ενώ ο ethyl decanoate είναι αυτός με τη μικρότερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα, της τάξεως από 0,011 έως 0,035 mg/l.

Ο ethyl butyrate διαφέρει στατιστικά σημαντικά μόνο στο δείγμα S, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα δεν διαφέρουν. Το δείγμα S παρουσίασε τη μεγαλύτερη ποσότητα, συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Σε όλα τα άλλα, η διαφορά είναι μικρή μεταξύ τους. Το ethyl butyrate είναι μία πτητική ένωση που παραπέμπει σε αρώματα φρέσκων φρούτων τα οποία κυριαρχούν σε οίνους χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση. Φαίνεται ότι στα υπόλοιπα δείγματα που πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση ο συγκεκριμένος εστέρας μειώθηκε σημαντικά.

Σημαντικότερη είναι η μείωση για τον ethyl caproate, το δείγμα S παρατηρείται ότι διαφέρει στατιστικά σημαντικά και είναι σχεδόν διπλάσιο ως προς τις συγκεντρώσεις του, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Δηλαδή, στα

υπόλοιπα δείγματα που πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση ο συγκεκριμένος εστέρας μειώθηκε σημαντικά. Οπότε, όσον αφορά τα φρουτώδη αρώματα όπως γκρέιπφρουτ και ανανά, αναμένεται να είναι λίγο πιο έντονα στο δείγμα S.

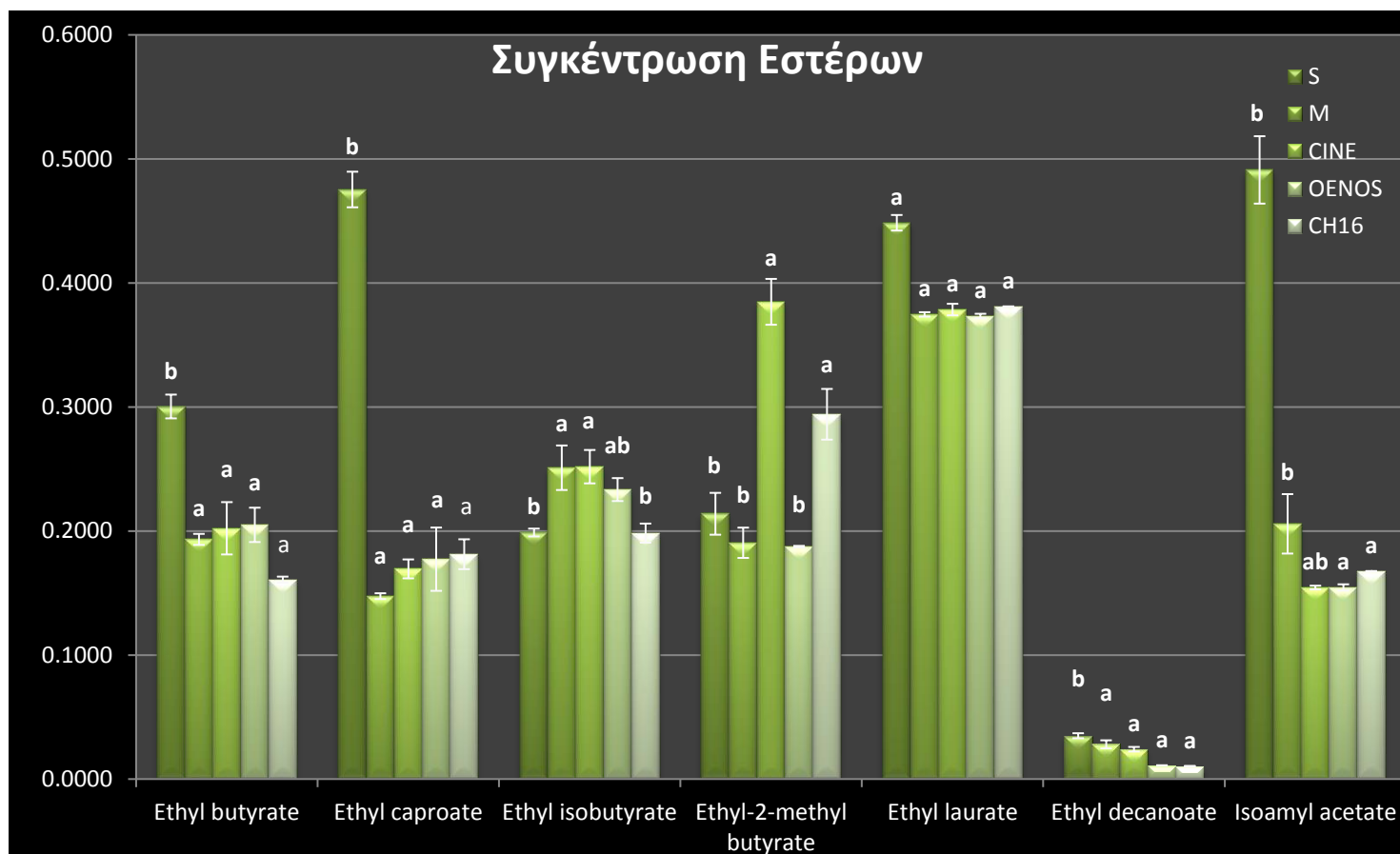
Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις του ethyl isobutyrate, διαπιστώνεται ότι το δείγμα που εμβολιάστηκε με το εμπορικό παρασκεύασμα Cine παρουσίασε μαζί με την αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση τις υψηλότερες συγκεντρώσεις και ακολουθεί το δείγμα Cine, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Σε αυτή τη περίπτωση το δείγμα S φαίνεται να διαθέτει τις μικρότερες συγκεντρώσεις ως προς τον ethyl isobutyrate, κάτι που αναμενόταν διότι ο συγκεκριμένος εστέρας παραπέμπει σε αρώματα της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

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

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

Το ethyl decanoate, το οποίο βρέθηκε σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τους υπόλοιπους αιθυλικούς εστέρες, παρουσιάζει μεγαλύτερη ποσότητα στο δείγμα S, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα μειώνεται δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ του S και του M, μικρότερη είναι η διαφορά με το στέλεχος Cine και μεγαλύτερη με τα Oenos και CH16 σύμφωνα με το ποσοτικό προσδιορισμό των αιθυλικών εστέρων μέσω της GC-FID.

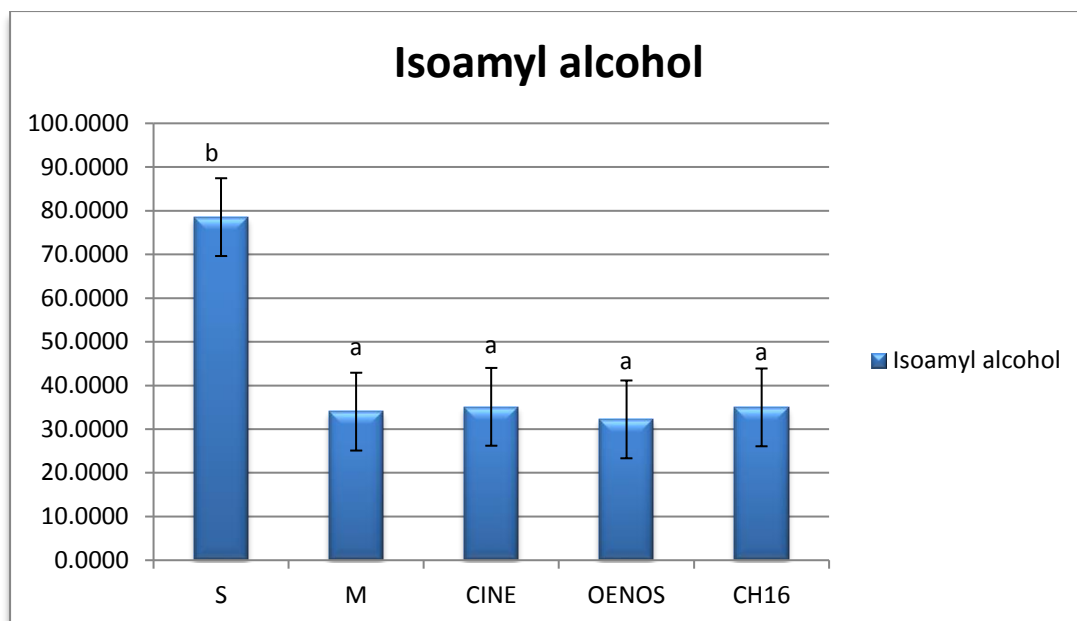
Οι συγκεντρώσεις του οξικού εστέρα isoamyl acetate, δεν παρουσιάζουν καμία σημαντική στατιστική διαφορά στα δείγματα που πραγματοποιήθηκε μηλογαλακτική ζύμωση, διαφέρουν όμως σημαντικά με τη συγκέντρωση του δείγματος αυτό δείχνει ότι η μηλογαλακτική ζύμωση μετάβαλλε σημαντικά τη συγκέντρωσή του.



Διάγραμμα 4.7 : Συγκέντρωση εστέρων (mg /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

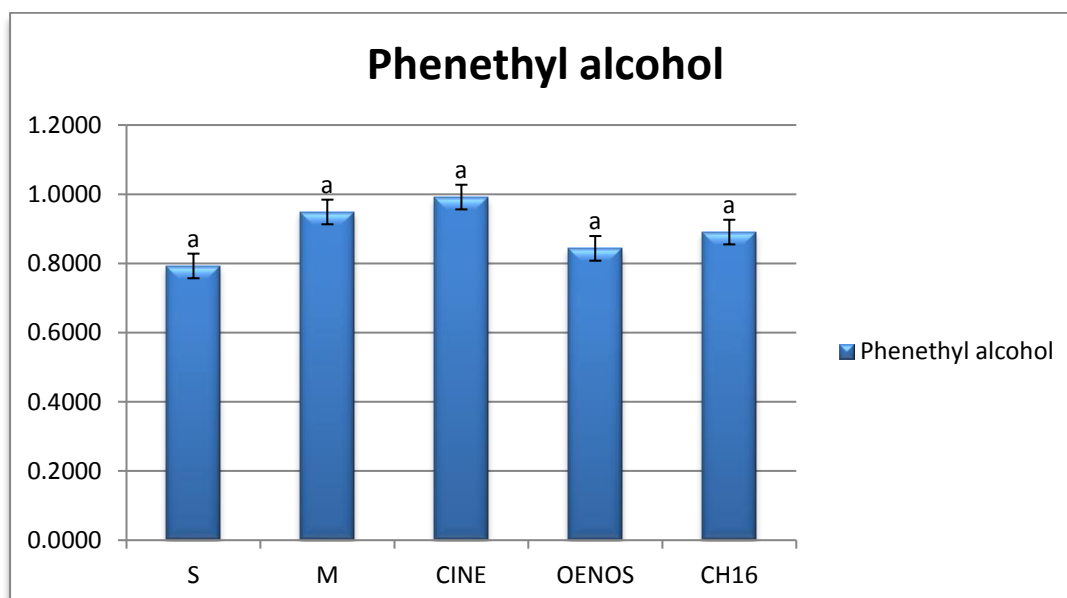
Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών παίζει σημαντικό ρόλο στο αρωματικό προφίλ των οίνων. Για να προσδώσει φρουτώδη χαρακτήρα, πρέπει η ποσότητά τους να μην ξεπερνάει τα 300 mg /l. Επίσης, πολλά αποτελέσματα μελετών, είτε δείχνουν μικρή ασήμαντη αύξηση, είτε καμία αλλαγή, είτε ότι επηρεάζεται από την επιλογή βακτηριακών στελεχών, είτε ότι δεν υπάρχει καμία μεταβολή σε οίνους με υψηλή περιεκτικότητα αλκοόλης, εξαιρουμένου των σημαντικών αυξήσεων στις συγκεντρώσεις των isoamyl alcohol, isobutanol και 2-phenylethanol. Άρα, γενικότερα τα συμπεράσματα είναι συγκεχυμένα (de Revel et al., 1999; Jeromel et al., 2008).

Στο διάγραμμα 4.8 παρουσιάζεται η συγκέντρωση του isoamyl alcohol. Σε όλα τα δείγματα παρατηρείται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης σε σύγκριση με το δείγμα S που αποτράπηκε η μηλογαλακτική ζύμωση. Τα υπόλοιπα δείγματα δε παρουσιάζουν στατιστική διαφορά μεταξύ τους.



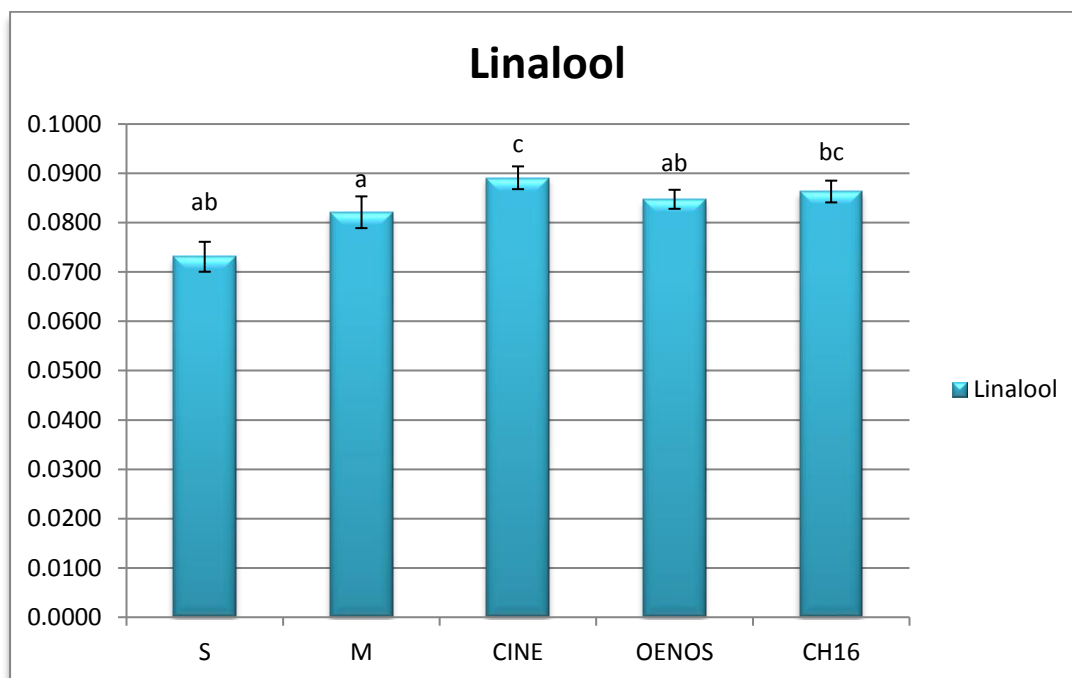
Διάγραμμα 4.8 : Η συγκέντρωση της isoamyl alcohol (mg /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Για την περίπτωση της phenethyl alcohol, στο διάγραμμα 4.9, δεν παρατηρείτε αξιόλογη μεταβολή στη συγκέντρωσή της στα δείγματα με μηλογαλακτική ζύμωση. Μόνο μια μικρή αύξηση στο δείγμα Cine. Γενικότερα, η συγκέντρωση της phenethyl alcohol δεν φαίνεται να μειώνεται στα δείγματα που σημαίνει ότι ο οίνος διατηρεί το ποικιλιακό άρωμα του τριαντάφυλλου.



Διάγραμμα 4.9 : Η συγκέντρωση της phenethyl alcohol (mg /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Όσον αφορά την τερπενόλη linalool στο διάγραμμα 4.10, και σε αυτή τη περίπτωση, έχουμε μία μικρή αύξηση στο δείγμα Cine που δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το δείγμα CH16. Επίσης, το δείγμα CH16 δεν έχει στατιστική διαφορά με τα δείγματα Oenos και S.



Διάγραμμα 4.10 : Η συγκέντρωση της linalool (mg /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

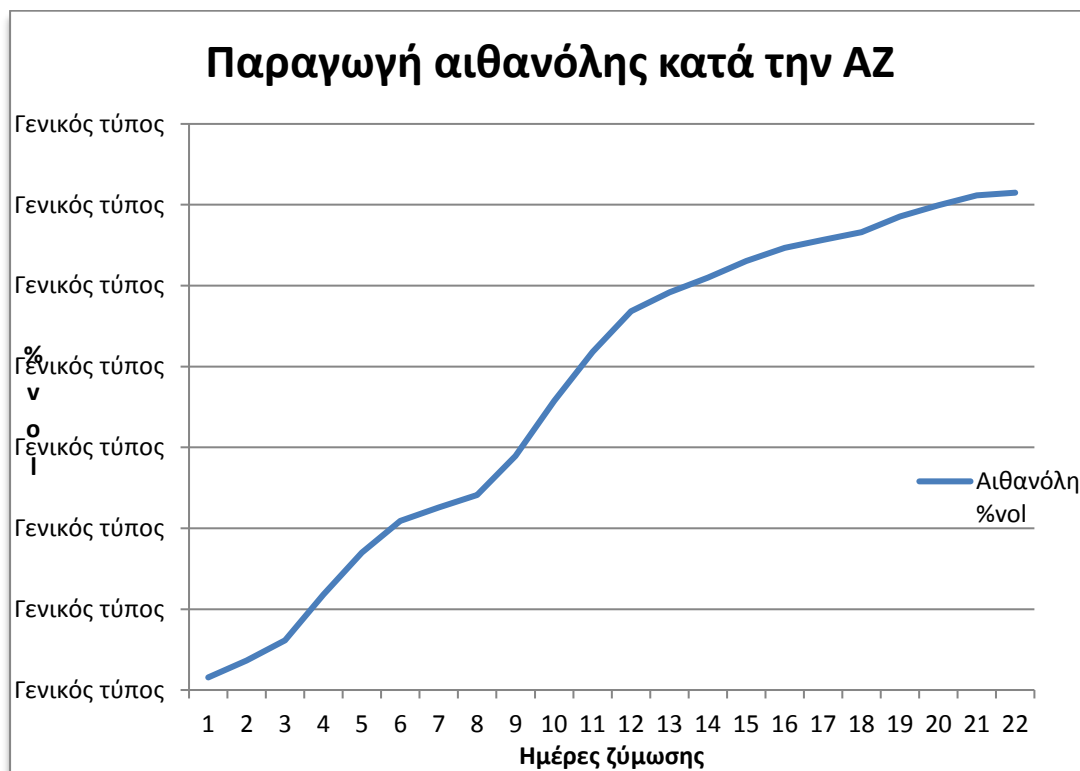
Τα αποτελέσματά αυτά μπορούν να στηριχθούν και σε παλαιότερες μελέτες που έχουν ολοκληρωθεί. Δηλαδή τα γαλακτικά βακτήρια, κυρίως τα *Oenococcus oeni*, έχουν την ικανότητα να διασπούν τον γλυκοζιτικό δεσμό, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των πτητικών ενώσεων και άρα την ενδυνάμωση του αρώματος. (Grimaldi et al., 2000; Boido et al., 2002; Liu, 2002; Barbagallo et al., 2004; D'Incecco et al., 2004; Matthews et al., 2004) και επίσης, οι Gambaro et al. το 2001 διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα των αιθυλικών και οξικών εστέρων μειώθηκαν κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, αλλά οι αλλαγές αυτές εξαρτώνται από την επιλογή των γαλακτικών βακτηρίων

4.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΚΟΟΛΩΝ ΚΑΙ ΟΞΕΩΝ ΜΕΣΩ HPLC

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού αλκοολών και οξέων:

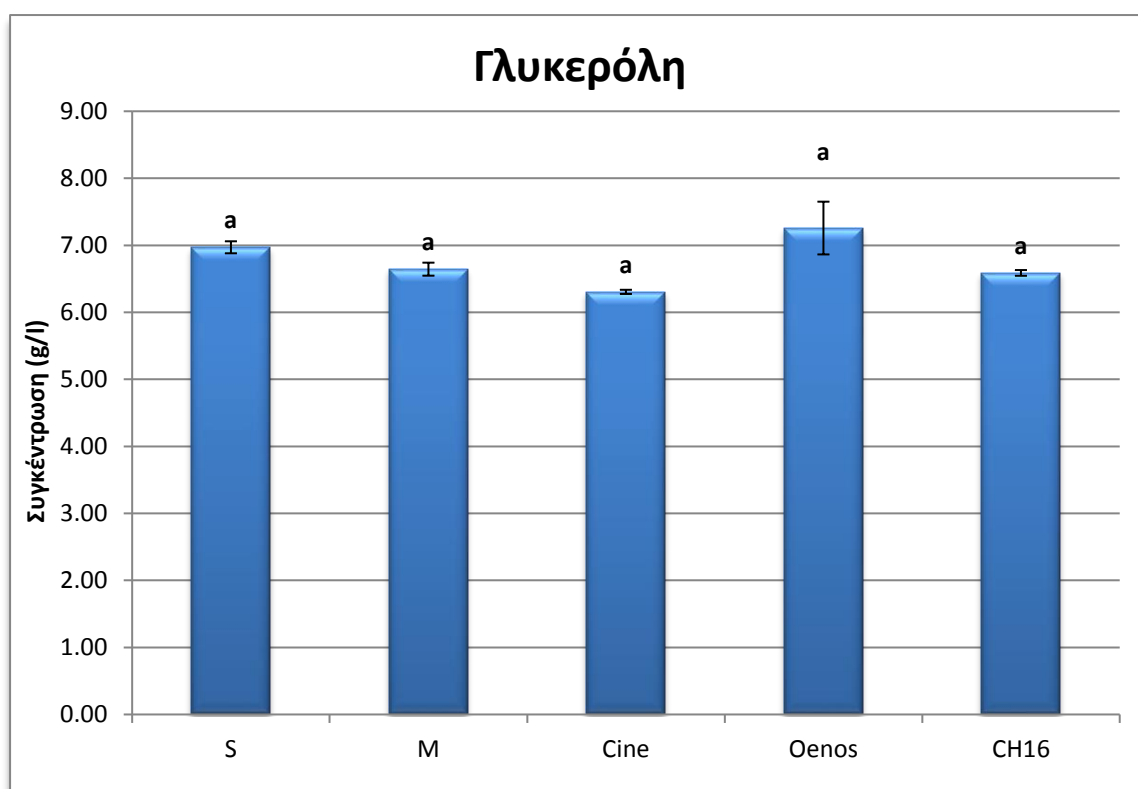
- ✓ Αλκοόλες : i) Αιθανόλη, ii) Γλυκερόλη
- ✓ Οξέα : i) Μηλικό οξύ, ii) Γαλακτικό οξύ, iii) Κιτρικό οξύ

Στο διάγραμμα 4.11 καταγράφεται η πορεία της αιθανόλης κατά την αλκοολική ζύμωση. Όπως προαναφέρθηκε, η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε μετά από 22 μέρες. Η παραγόμενη αιθυλική αλκοόλη υπολογίστηκε στα 12.3% Vol. Μέχρι την 14 ημέρα ζύμωσης, η συγκέντρωσή της αυξάνεται σταδιακά. Την 13 ημέρα και μετά, η αποζύμωση ολοκληρώνεται με πιο αργό ρυθμό, λόγω της παραγόμενης αλκοόλης που δυσκολεύει την επιβίωση των ζυμομυκήτων, καθώς και την συνεχή μείωση θρεπτικών συστατικών (αμμωνιακά, θειαμίνη) που χρησιμοποιούνται κατά τη θρέψη των ζυμομυκήτων.



Διάγραμμα 4.11 : Η πορεία της αιθανόλης κατά την αλκοολική ζύμωση του οίνου.

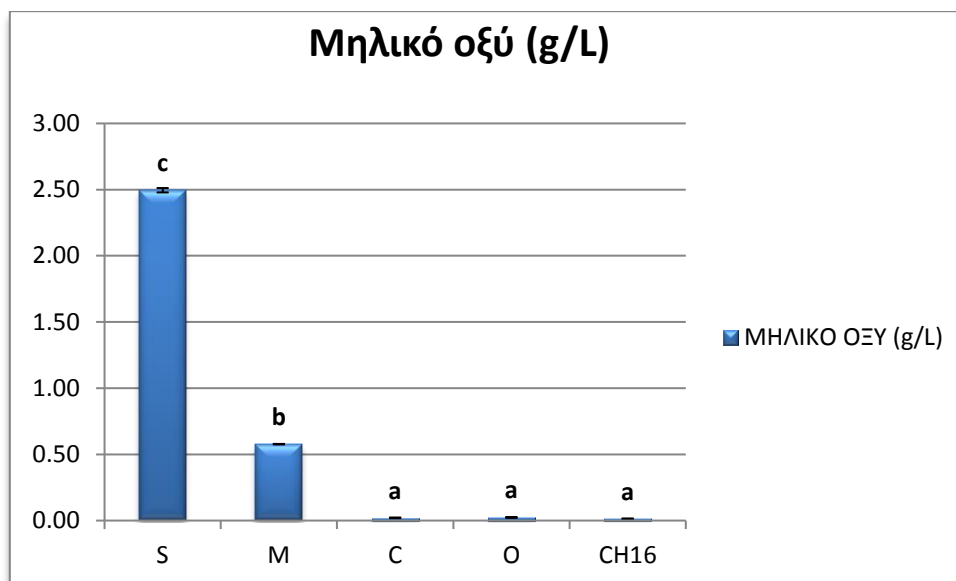
Η γλυκερόλη είναι η τρίτη κατά σειρά ουσία σε ποσότητα στον οίνο, παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4.12. Όπως παρατηρείται, το δείγμα με τη μεγαλύτερη ποσότητα σε γλυκερόλη εμφανίζεται το δείγμα Oenos, ποσότητα ίση με 7,25 g/l, αλλά χωρίς να διαφέρει στατιστικά σημαντικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζουν περίπου την ίδια ποσότητα γλυκερόλης, αφού δεν έχει μεταβληθεί ιδιαίτερα μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Συνεπώς η μηλογαλακτική ζύμωση δεν έχει επηρεάσει την ουσία αυτή.



Διάγραμμα 4.12 : Η συγκέντρωση της γλυκερόλης (g/l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

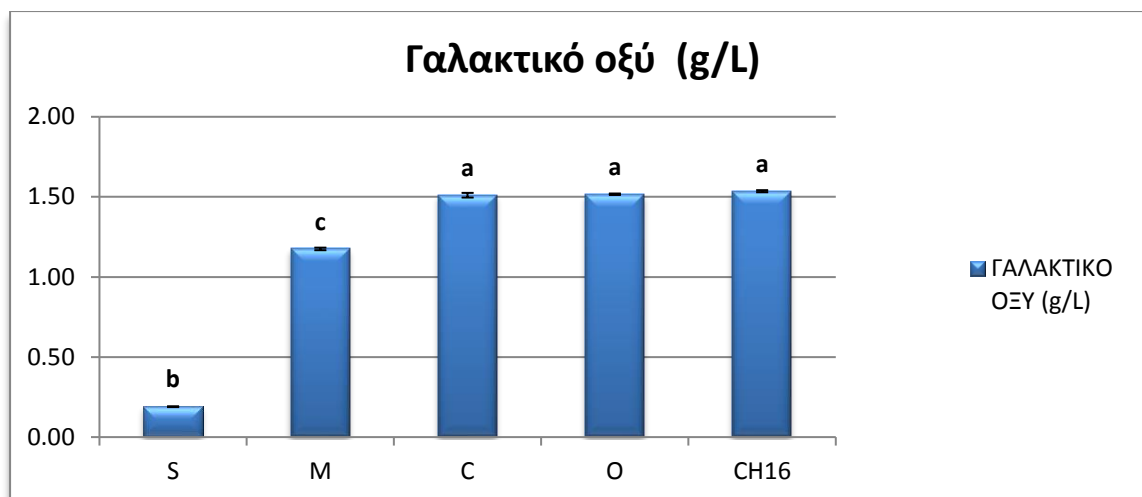
Η τελική συγκέντρωση του μηλικού οξέος στους τελικούς οίνους παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4.13. Στα δείγματα που έχουν ολοκληρώσει τη μηλογαλακτική ζύμωση η ποσότητα του μηλικού οξέος είναι σχεδόν μηδενική. Στο δείγμα M, στο οποίο πραγματοποιήθηκε με γηγενή γαλακτικά βακτήρια δεν μεταβολίστηκε όλη η ποσότητα του μηλικού οξέος. Στον οίνο παρέμεινε 0,38 g/l μηλικό οξύ. Τέλος, το δείγμα S όπως είναι λογικό το μηλικό οξύ παρέμεινε στην αρχική του ποσότητα, ίση

με 2,49 g/l. Τα δείγματα Cine, Oenos και CH16 δεν έχουν στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ τους και έχουν καταναλώσει όλη την ποσότητα του μηλικού οξέος.



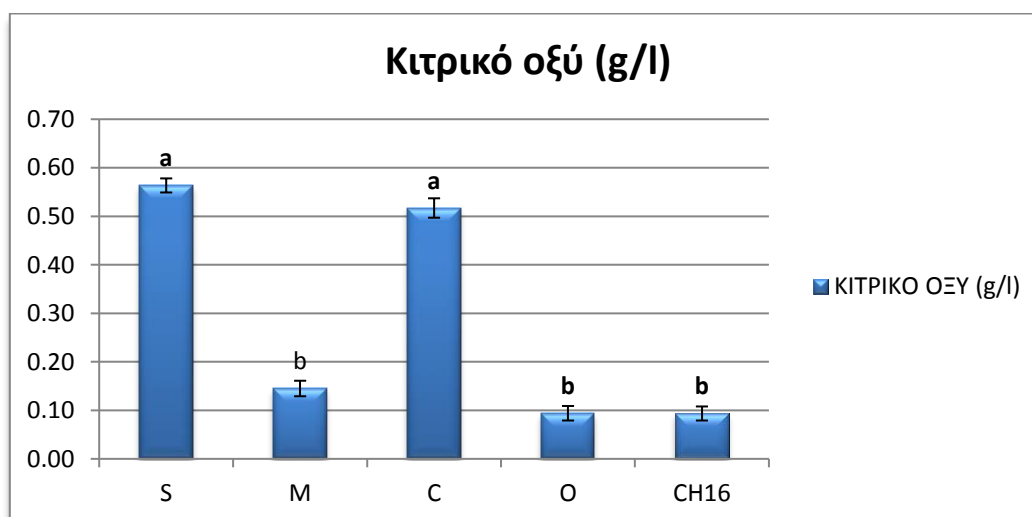
Διάγραμμα 4.13 : Η συγκέντρωση του μηλικού οξέος (g /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Στο διάγραμμα 4.14 εμφανίζονται οι συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος σε όλα τα δείγματα. Όπως είναι φυσιολογικό οι μεγαλύτερες ποσότητες εμφανίζονται στα δείγματα που έχει ολοκληρωθεί η μηλογαλακτική ζύμωση, Cine, Oenos και CH16, τα οποία δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Οι ποσότητές τους καταγράφηκαν σε 1.51, 1.52 και 1.54 g/l αντίστοιχα. Επιπλέον η μικρότερη συγκέντρωση εμφανίστηκε στο δείγμα S, για την ακρίβεια 0.19 g/l, ενώ στο δείγμα M η ποσότητά του ισούται με 1.18 g/l. Αυτό μας δείχνει τη δυσκολία ολοκλήρωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης από τα γηγενή γαλακτικά βακτήρια που βρέθηκαν στο μοσχοφίλερο.



Διάγραμμα 4.14 : Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (g /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Τέλος, από το διάγραμμα 4.15 συμπεραίνετε ότι το δείγμα S και το δείγμα Cine παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κιτρικού οξέος, ενώ επίσης υπάρχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές με τα υπόλοιπα δείγματα. Για το δείγμα Cine, αυτό εξηγείται αφού αυτό το γαλακτικό βακτήριο δεν έχει την ικανότητα να αποικοδομήσει το κιτρικό οξύ και να μεταβολιστεί κυρίως σε διακετύλιο, καθώς και να αυξήσει τη πτητική οξύτητα με παραγωγή οξικού οξέος. Στο δείγμα S είναι φυσιολογικό να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αφού δεν πραγματοποιείται η δεύτερη ζύμωση.

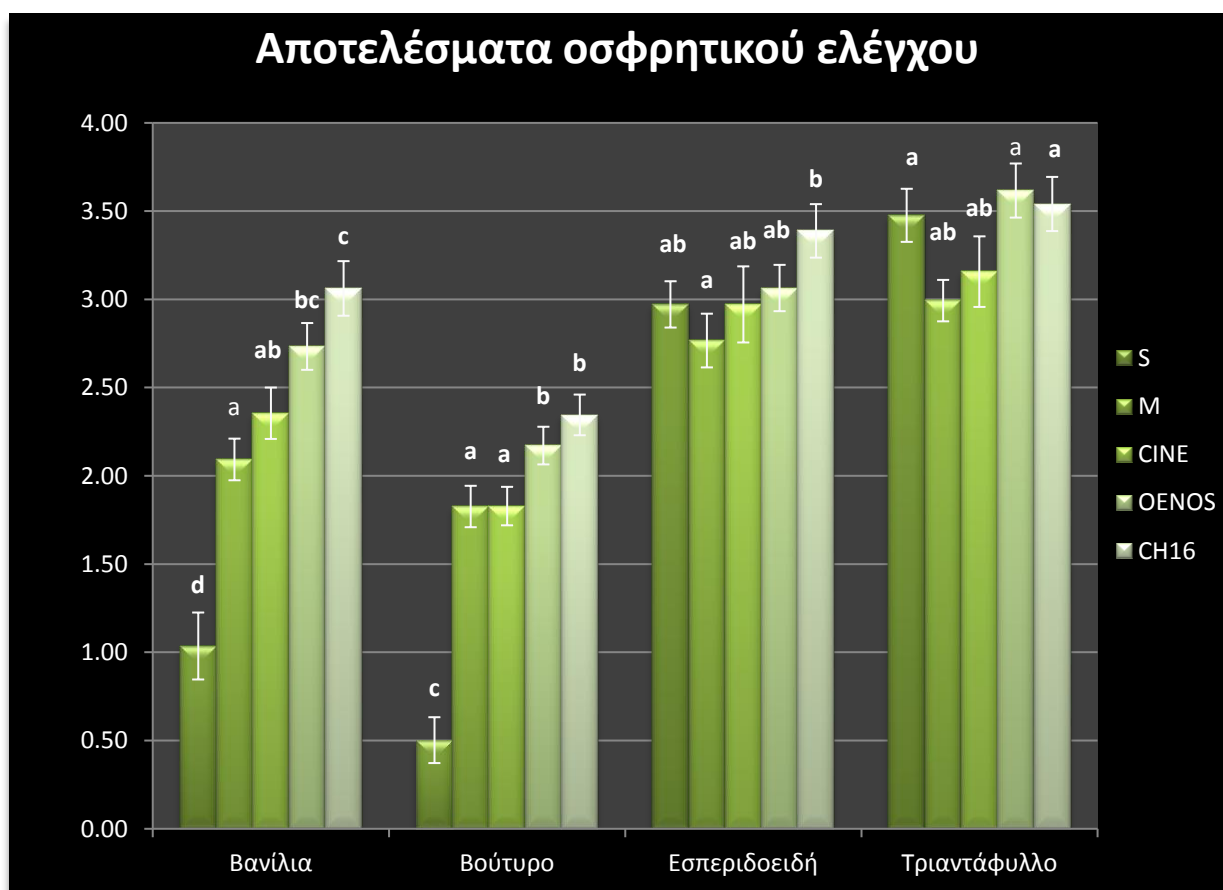


Διάγραμμα 4.15 : Η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος (g /l) ανά δείγμα (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

4.6 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Με τον οργανοληπτικό έλεγχο εξετάστηκαν τέσσερα βασικά αρώματα, δύο χαρακτηριστικά της μηλογαλακτικής ζύμωσης (βανίλια, βούτυρο) και δύο χαρακτηριστικά της ποικιλίας (εσπεριδοειδή και τριαντάφυλλο). Επίσης εξετάστηκαν η οξύτητα, η ισορροπία και το σώμα των οίνων. Στη συνέχεια παρατίθενται όλα τα διαγράμματα που απεικονίζουν τα χαρακτηριστικά αυτά.

Αρχικά στο διάγραμμα 4.16 παρουσιάζονται συνολικά όλα τα αρώματα που εξετάστηκαν στα δείγματα. Έγινε ομαδοποίηση σε ένα πίνακα ώστε να μπορούν να εξαχθούν πιο εύκολα συμπεράσματα.



Διάγραμμα 4.16 : Αποτελέσματα οσφρητικού ελέγχου των δειγμάτων (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Για το άρωμα βανίλια, τη μεγαλύτερη βαθμολογία συγκεντρώνει το δείγμα CH16, το οποίο, βέβαια, δε διαφέρει στατιστικά με το δείγμα Oenos. Τη χαμηλότερη βαθμολογία συγκέντρωσε το δείγμα S το οποίο έχει στατιστικά σημαντικές διαφορές

από τα υπόλοιπα, όπως είναι φυσιολογικό, αφού έχει αποτραπεί η μηλογαλακτική ζύμωση και το άρωμα βανίλιας είναι χαρακτηριστικό άρωμα της ζύμωσης αυτής.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το άρωμα του βουτύρου φαίνεται ότι το CH16 έχει τη μεγαλύτερη βαθμολογία, ενώ ακολουθεί το δείγμα Oenos χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές. Όπως και στη προηγούμενη περίπτωση το δείγμα S έχει τη μικρότερη βαθμολογία και διαφέρει στατιστικά από τα υπόλοιπα διότι έχουμε απουσία μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Όσον αφορά το άρωμα των εσπεριδοειδών, τη μεγαλύτερη βαθμολογία συγκεντρώνει το δείγμα CH16, το οποίο βέβαια δε διαφέρει στατιστικά με όλα τα υπόλοιπα δείγματα εκτός του δείγματος M το οποίο έχει και τη μικρότερη βαθμολογία.

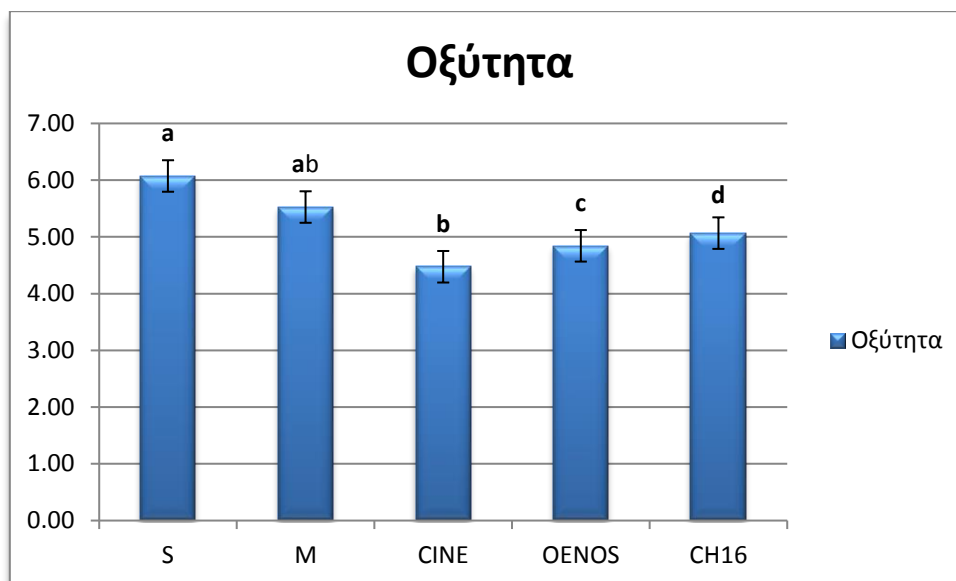
Για το άρωμα του τριαντάφυλλου, η υψηλότερη βαθμολογία εντοπίστηκε στα δείγματα Oenos, S και CH16 το οποία δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Υπάρχουν όμως στατιστικές διαφορές με τη βαθμολογία των δειγμάτων M και Cine.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στα δύο τελευταία αρώματα, δηλαδή τα εσπεριδοειδή και τα πυρηνόκαρπα που χαρακτηρίζουν τη ποικιλία Μοσχοφίλερο, συγκέντρωσαν αρκετά υψηλή βαθμολογία για το δείγμα S, σε σύγκριση με τα δύο πρώτα αρώματα, που είναι χαρακτηριστικά για τη μηλογαλακτική ζύμωση.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται ξεχωριστά τα αποτελέσματα της γευστικής δοκιμής των δειγμάτων ώστε να λάβουμε συμπεράσματα για την οξύτητα, την ισορροπία και το σώμα των οίνων.

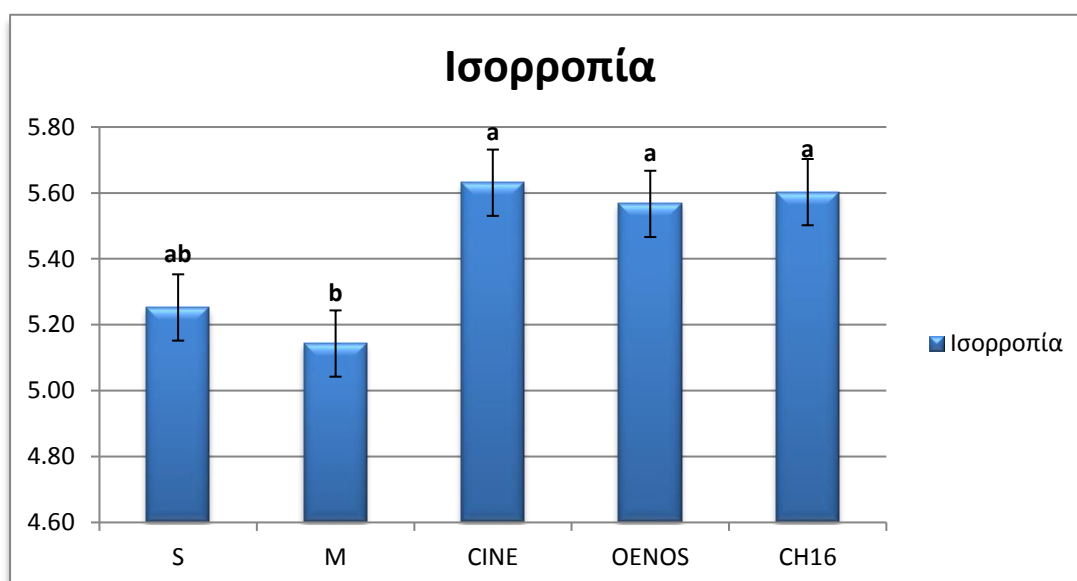
Στο διάγραμμα 4.17 παρουσιάζεται η βαθμολογία της οξύτητας των πέντε δειγμάτων. Παρατηρείται ότι την υψηλότερη βαθμολογία απέσπασε το δείγμα S, ενώ είναι σημαντική η στατιστική διαφορά με τα υπόλοιπα. Αυτό είναι λογικό καθώς με τη μηλογαλακτική ζύμωση, το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό με αποτέλεσμα να 'μαλακώνει' ο οίνος και να μειώνεται η οξύτητά του. Το δείγμα M έχει παρουσιάζεται να έχει μικρότερη οξύτητα από το μάρτυρα αλλά μεγαλύτερη από τα άλλα δείγματα. Το δείγμα Cine παρουσιάζει τη μικρότερη οξύτητα, το οποίο διαφέρει στατιστικά με τα δείγματα Oenos και CH16. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα

αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων συμπίπτουν με αυτά του πάνελ των γευσιγνωστών.



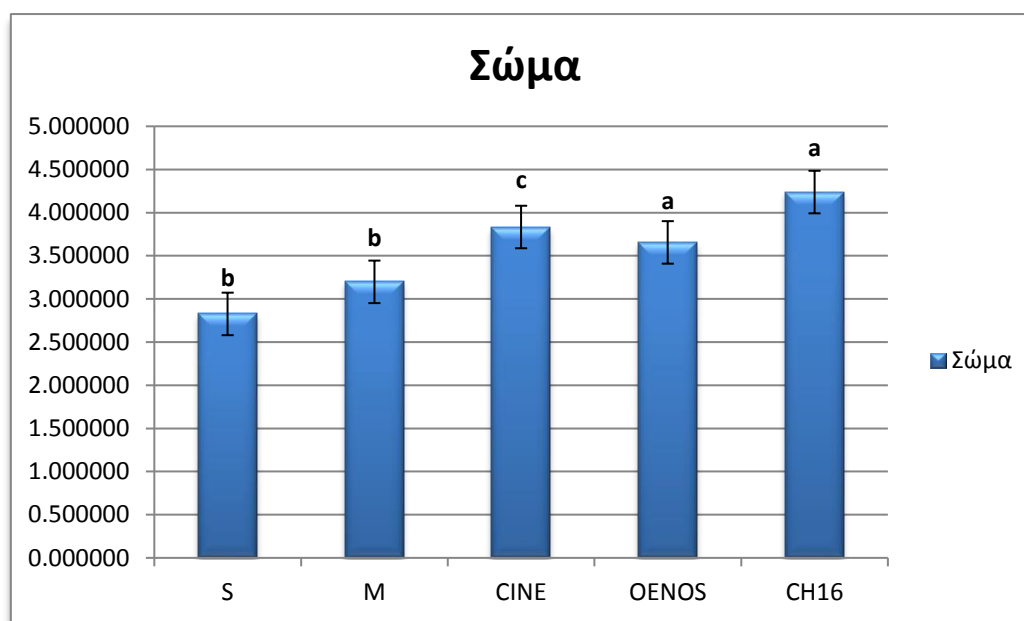
Διάγραμμα 4.17 : Η βαθμολογία της οξύτητας ανά δείγμα επέμβασης (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Στο διάγραμμα 4.18 παρουσιάζεται η βαθμολογία της ισορροπίας των δειγμάτων. Οι δοκιμαστές αξιολόγησαν τα δείγματα Cine και CH16, ως τα καλύτερα όσον αφορά την ισορροπία, τα οποία δε διαφέρουν στατιστικά. Το δείγμα Cine έχει μικρότερη βαθμολογία και τέλος ακολουθούν τα M και S με ακόμα μικρότερη βαθμολογία και τα οποία διαφέρουν στατιστικά με τα υπόλοιπα δείγματα.



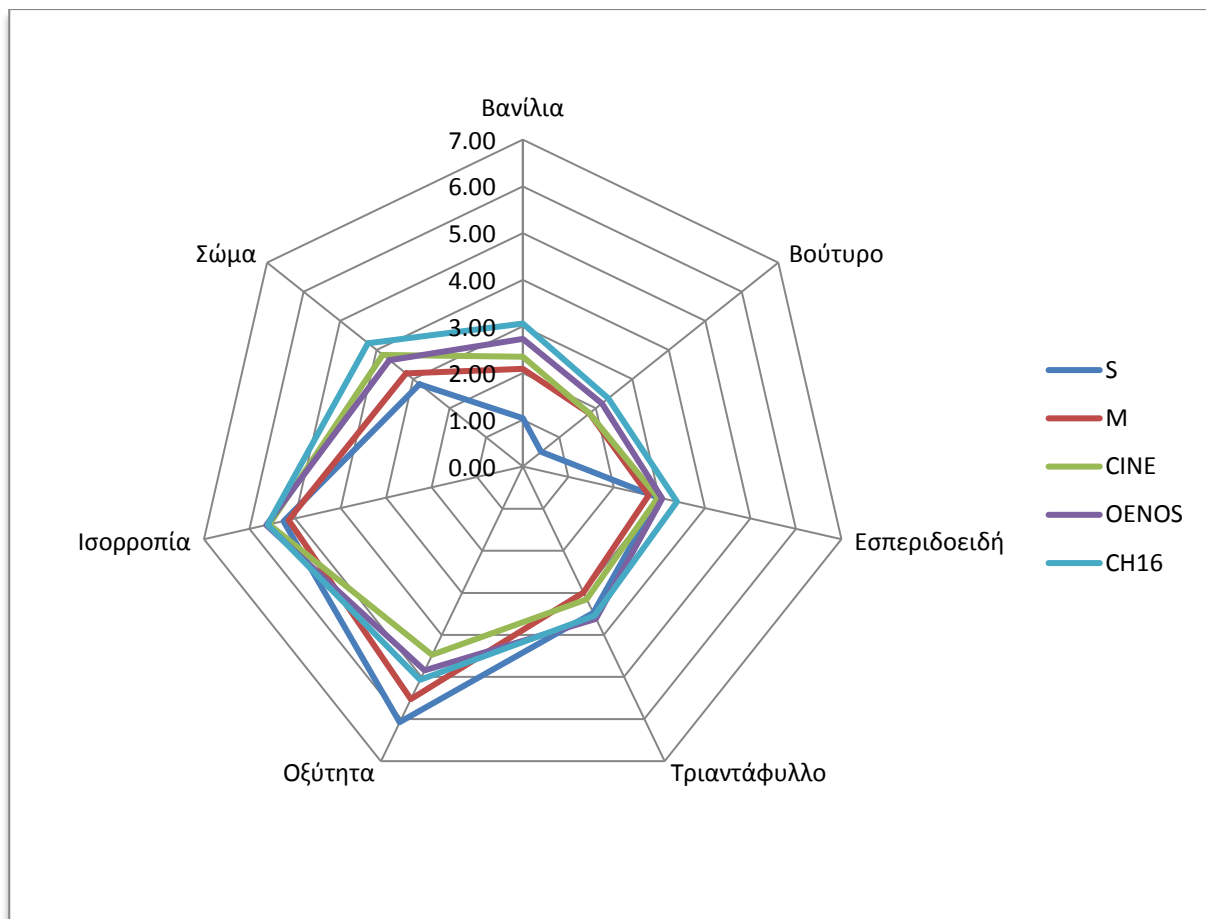
Διάγραμμα 4.18 : Η βαθμολογία της οξύτητας ανά δείγμα επέμβασης (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Η ομάδα των δοκιμαστών αξιολόγησε με τη μεγαλύτερη βαθμολογία ως προς το σώμα, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4.19, το δείγμα CH16 που ξεχωρίζει στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Ακολουθούν τα δείγματα Cine και Oenos που δεν έχουν στατιστικά διαφορές, ενώ καταλήγοντας το δείγμα M και S παρουσιάζουν τη μικρότερη βαθμολογία και αυτά μεταξύ τους δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.



Διάγραμμα 4.19 : Η βαθμολογία του σώματος ανά δείγμα επέμβασης (οι τιμές με διαφορετικά a, b, c, d είναι σημαντικά διαφορετικές, Tukey's HSD test, $p > 0,05$)

Συνοψίζοντας, για καλύτερη κατανόηση των συνολικών αποτελεσμάτων του οργανοληπτικού ελέγχου παρουσιάζεται το παρακάτω γράφημα 4.5.5. Σύμφωνα με αυτό, οι οίνοι παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους σχεδόν σε όλες τις κατηγορίες, ιδιαίτερα στο άρωμα βουτύρου, στην ισορροπία και την οξύτητα. Ο οίνος S παρουσιάζει τη μεγαλύτερη οξύτητα, αφού οι υπόλοιποι οίνοι έχουν μικρή απόκλιση μεταξύ τους. Πιο ισορροπημένοι αξιολογήθηκαν οι οίνοι Oenos και CH16, ενώ ακολουθεί ο οίνος Cine. Ως προς το σώμα ξεχωρίζει ο οίνος Oenos, ενώ ακολουθούν οι δύο οίνοι που έχουν υποστεί μη λογαλακτική ζύμωση. Τέλος, πιο αρωματικός οίνος συνολικά, δηλαδή τα αρώματα εσπεριδοειδή, πυρηνόκαρπα και βουτύρου, παρουσιάζεται ο οίνος CH16 σε σύγκριση με τους υπόλοιπους παραχθέντες οίνους.



Γράφημα 4.20 : Παρουσίαση οργανοληπτικών αποτελεσμάτων του οίνου

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό να μελετήσει την επίδραση, της μηλογαλακτικής ζύμωσης στα χημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε οίνο που προέρχεται από την ποικιλία Μοσχοφίλερο. Η μελέτη περιέχει στοιχεία πρωτοτυπίας λόγω της φύσης της ποικιλίας μιάς και δεν συνηθίζεται μετά την αλκοολική ζύμωση η χρησιμοποίηση γαλακτικών βακτηρίων για πραγματοποίηση μηλογαλακτική ζύμωσης. Ειδικότερα, εφαρμόστηκαν **α)** τρία (3) διαφορετικά στελέχη του *Oenococcus Oeni* με τις εμπορικές ονομασίες **i) Viniflora® Cine, ii) Viniflora® Oenos και iii) Viniflora® CH16** για την περαίωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης αμέσως μετά την αλκοολική ζύμωση στις ελάχιστες προτεινόμενες ποσότητες και υπό τις συνθήκες που προτείνει ο προμηθευτής, **β)** αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση από γηγενή γαλακτικά βακτήρια, και **γ)** χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση, σαν μάρτυρας.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος αναλύθηκαν πέντε δείγματα μαζί με την επανάληψή τους. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρατηρήθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

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. Όσον αφορά την **ενεργό οξύτητα** και την **ολική οξύτητα** παρατηρούνται διάφορες μεταξύ των δειγμάτων των τελικών οίνων. Ειδικότερα, η ολική οξύτητα, στους οίνους που υπέστησαν μηλογαλακτική ζύμωση, μειώθηκε περίπου κατά 1,5 g/l σε σύγκριση με τον οίνο που αποτράπηκε. Στην αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση δεν ολοκληρώθηκε ο μεταβολισμός του μηλικού οξέος λόγω του χαμηλού pH, με αποτέλεσμα να υπάρχει μικρότερη μείωση της οξύτητας κατά 0,7 g/l. Επίσης οι τιμές **pH** των οίνων με προσθήκη γαλακτικών βακτηρίων Cine, Oenos και CH16 αυξήθηκαν σε 3.50, 3.52 και 3.53 αντίστοιχα, ενώ η τελική τιμή pH του οίνου S είναι χαμηλότερη σε 3.40. Τα αποτελέσματα αυτά προκύπτουν, όπως έχει αναφερθεί πιο πάνω, επειδή 1 g μηλικού οξέος όταν μεταβολίζεται αντιστοιχεί σε 0,67 g γαλακτικού οξέος. Όσον αφορά την **απόχρωση** των τελικών οίνων δεν παρατηρείται καμία στατιστική διαφορά μεταξύ των τελικών οίνων, όμως φαίνεται να υπάρχουν διαφορές στην **ένταση** του χρώματος. Η τιμή του **ΔΦΟ** για το δείγμα χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση είναι μικρότερη απ' ότι στα δείγματα που πραγματοποιήθηκε μηλογαλακτική ζύμωση. Η διαφορά αυτή οφείλεται πιθανόν σε συσσωματώσεις και

πολυμερισμούς που έγιναν κατά την διάρκεια της ΜΓΖ. Τέλος η **πητική οξύτητα** παρατηρήθηκε ότι στα δείγματα Oenos και CH16, αυξήθηκε κατά 0,129 και 0,048 g/l. Σημειώνεται ότι η αύξηση αυτή είναι πολύ μικρή και φυσικά στα επιτρεπτά όρια από τη νομοθεσία του οίνου. Επίσης, στον οίνο Cine η αύξηση είναι ακόμα μικρότερη, αφού σύμφωνα με τον προμηθευτή, το συγκεκριμένο στέλεχος δεν έχει την ικανότητα να μεταβολίσει το κιτρικό οξύ (όπως αποδείχτηκε και από τα αποτελέσματά μας) και να παραχθεί είτε διακετύλιο, είτε να ακολουθήσει το άλλο μεταβολικό μονοπάτι, δηλαδή να αυξήσει τη συγκέντρωση του οξικού οξέος.

Συνεχίζοντας και μελετώντας **το αρωματικό προφίλ** κάθε επέμβασης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι συγκεντρώσεις των αρωματικών ουσιών που προέκυψαν μετά το ποσοτικό προσδιορισμό με τη χρήση GC-FID είναι η γενικότερη αύξηση της συγκέντρωσης στις περισσότερες πτητικές ενώσεις, στο δείγμα Cine και μετέπειτα στο δείγμα CH16, σε σύγκριση με το μάρτυρα S. Πιο συγκεκριμένα για το δείγμα Cine παρατηρήθηκε αύξηση των αιθυλικών εστέρων ethyl isobutyrate και του ethyl-2-methyl butyrate, κάτι που αναμενόταν διότι ο συγκεκριμένος εστέρας παραπέμπει σε αρώματα της μηλογαλακτικής ζύμωσης, και της τερπενόλης linalool. Το δείγμα CH16 ακολουθεί με ελάχιστα μικρότερη συγκέντρωση σε αυτές τις ενώσεις. Από την άλλη, στο δείγμα Oenos δεν σημειώθηκε σχεδόν καμία σοβαρή διαφοροποίηση σε σύγκριση με το δείγμα S, με εξαίρεση το ethyl isobutyrate. Και στον οίνο M, που πραγματοποιήθηκε αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση, δεν σημειώθηκε κάποια σοβαρή αλλαγή στο αρωματικό δυναμικό του. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι δεν ολοκληρώθηκε η αποικοδόμηση του μηλικού οξέος. Τέλος, όσον αφορά το οίνο μάρτυρα S οι αρωματικές ουσίες που η συγκέντρωσή τους είχε στατιστικά σημαντικές διαφορές είναι στον ethyl caproate, της isoamyl alcohol και της isoamyl alcohol οι συγκεκριμένες είναι πτητικές ενώσεις που παραπέμπουν σε αρώματα φρέσκων φρούτων τα οποία κυριαρχούν σε οίνους χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση αυτό δείχνει ότι η μηλογαλακτική ζύμωση μετάβαλλε σημαντικά τη συγκέντρωσή τους.

Όπως αναφέρθηκε, ο ethyl laurate, ο οποίος επίσης ευθύνεται για τα αρώματα φρούτων και λουλουδιών, βρέθηκε με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε όλους τους υπό εξέταση οίνους. Το δείγμα με τη μεγαλύτερη ποσότητα, που όμως δεν

παρουσιάζει σημαντική στατιστική διαφορά, είναι το S. Τα υπόλοιπα δείγματα δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

Το ethyl decanoate, το οποίο βρέθηκε σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τους υπόλοιπους αιθυλικούς εστέρες, παρουσιάζει μεγαλύτερη ποσότητα στο δείγμα S, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα μειώνεται δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ του S και του M, μικρότερη είναι η διαφορά με το στέλεχος Cine και μεγαλύτερη με τα Oenopos και CH16 σύμφωνα με το ποσοτικό προσδιορισμό των αιθυλικών εστέρων μέσω της GC-FID.

Μετά την μελέτη των αποτελεσμάτων, συμπεραίνεται ότι η ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση με τα γαλακτικά βακτήρια Cine συνέβαλε στον εμπλουτισμό του αρωματικού δυναμικού των οίνων της ποικιλίας Moschofilero.

Στους οίνους που εμβολιάστηκαν με γαλακτικά βακτήρια, παρατηρήθηκε η μηδενική σχεδόν συγκέντρωση μηλικού οξέος, που σημαίνει ότι ολοκληρώθηκε επιτυχώς η μηλογαλακτική ζύμωση. Στον οίνο M δεν ολοκληρώθηκε η ζύμωση αυτή με τη συγκέντρωση του μηλικού να αγγίζει τα 0,38 g/l μηλικό οξύ. Ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα είχαμε στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος. Και σε αυτή τη περίπτωση, όπως είναι λογικό είχαμε αύξηση της συγκέντρωσης στους οίνους που περατώθηκε η ζύμωση αυτή. Το κιτρικό οξύ υπέστη σοβαρή μείωση στους οίνους Oenopos και CH16, ενώ στον Cine **η μείωσή του είναι ελάχιστη**. Και αυτό το συμπέρασμα είναι λογικό, καθώς ο προμηθευτής του σκευάσματος Cine αναφέρει ότι δεν παράγεται καθόλου διακετύλιο το οποίο προέρχεται από το μεταβολικό μονοπάτι του κιτρικού οξέος.

Βάση του **οργανοληπτικού ελέγχου**, αυτό που γίνεται εύκολα αντιληπτό είναι ότι με τη μηλογαλακτική ζύμωση στο moschofilero βελτιώνονται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Πιο συγκεκριμένα, ο εμβολιασμός με γαλακτικά βακτήρια CH16 ήταν αυτός που συγκέντρωσε τις υψηλότερες βαθμολογίες στις περισσότερες από τις οργανοληπτικές κατηγορίες που εξετάστηκαν από το συγκεκριμένο εκπαιδευμένο πάνελ, ενώ ακολουθούν με πολύ μικρή διαφορά το Oenopos και το Cine.

Για τα αρώματα βουτύρου και βανίλιας υψηλότερη βαθμολογία δόθηκε στα δείγματα CH16 και Oenopos, καθώς τα συγκεκριμένα αρώματα είναι αποτελέσματα κυρίως της μηλογαλακτικής ζύμωσης, χαρακτηριστικά αρώματα του παραγόμενου διακετυλίου.

Επίσης, πιο αρεστό στο πάνελ, ως προς τα εσπεριδοειδή το τριαντάφυλλο και το σώμα του, είναι ο οίνος CH16. Τέλος, το δείγμα Cine συγκέντρωσε τη μεγαλύτερη βαθμολογία ως προς την ισορροπία.

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

- ✓ Η ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση συνίσταται και για ερυθρωπούς οίνους καθώς δημιουργεί οίνους με ποιοτικότερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τόσο αρωματικά όσο και γευστικά
- ✓ Η μηλογαλακτική ζύμωση, οδηγεί στην αύξηση του χαρακτηριστικού αρώματος του βουτύρου, στο μειωμένο χορτώδη χαρακτήρα, στη βελτιστοποίηση του φρουτώδη χαρακτήρα και στη βελτιωμένη αίσθηση και καλύτερη επίγευση του στόματος και καλύτερο σώμα.
- ✓ Το γαλακτικό βακτήριο Cine είναι ιδανικό 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.
- ✓ Το Μοσχοφίλερο είναι μια ποικιλία που μπορεί να δεχθεί μηλογαλακτική ζύμωση με σκοπό την διαφοροποίηση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

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

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

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

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

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

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

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agricultural Microbiology, Università di Bologna (2004/2005)

Alice Betteridge, Paul Grbin, and Vladimir Jiranek., Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *The University of Adelaide, Cellpress* p. 547-554.

Barbagallo, R.N., Spagna, G., Palmeri, R. & Torriani, S., (2004). Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme Microb. Tech.* 34, 292-296.

Bartowsky, E.J. & Henschke, P.A., (1995). Malolactic fermentation and wine flavour. *Aust. Grapegrow. Winemak.* 378, 83-94.

Bartowsky, E.J., Costello, P. & Henschke, P.A., (2002b). Management of malolactic fermentation - wine flavour manipulation. *Aust. N.Z. Grapegrow. Winemak.* 461, 7-8 and 10-12.

Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., (2004). The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 235–252.

Bauer R. and Dicks L.M.T., (2004). Control of Malolactic Fermentation in Wine, A Review, *South African Journal for Enology and Viticulture*.

BEELMAN R.B. and J.F. GALLANER. (1970). The effect of grape skin treatments on induced malo-lactic fermentation in Ohio wines. *American Journal of Enology and Viticulture.* 21:193-200.

Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Carrau, F. & Dellacassa, E., (2002). Effect of β -glucosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2344- 2349.

Carboxylic acids in wine, Chem News, October, 2006, No 341, pg 12

Cofran, L. and J. Mayer (1970). The effect of fumaric acid on malo-lactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 21:189-92.

De Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A. & Bertrand, A., (1999). Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4003-4008.

Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. & Fleet, G.M., (1985). Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 290-301.

D'Incecco, N., Bartowsky, E., Kassara, S., Lante, A., Spettoli, P. & Henschke, P., (2004). Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiol.* 21, 257-265.

Ebeler, S.E., (2001). Analytical chemistry: unlocking the secrets of wine flavour. *Food Rev. Int.* 17, 45-64.

Etiévant, P., (1991). Wine. In: Maarse, H. (ed). *Volatile compounds in food and beverages*. Marcel Dekker, New York, pp 483-546.

- Francis, I.L. & Newton, J.L., (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 114-126.
- Gámbaro, A., Boido, E., Zlotejablko, A., Medina, K., Lloret, A., Dellacassa, E. & Carrau, F., (2001). Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7, 27-32.
- Glorie, Y. (1984). *La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interpretation.* Partie I. Connaiss. Vigne Vin, 18, 195-217.
- Grimaldi, A., McLean, H. & Jiranek, V., (2000). Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 362-369.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E. & Jiranek, V., (2005a). Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1061-1069.
- Henick-Kling T. (1992). In *Wine Microbiology and Biotechnology* (ed. G.H. Fleet). Hartwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Herjavec, S., Tupajić, P. & Majdak, A., (2001). Influence of malolactic fermentation on the quality of Riesling wine. *Agric. Conspec. Sci.* 66, 59-64.
- Hoefnagel et al. (2002), Metabolic Control Analysis
- Jeromel, A., Herjavec, S., Orlić, S., Redzepovic, S. & Wondra, M., (2008). Changes in volatile composition of Kraljevina wines by controlled malolactic fermentation. *J. Cent. Eur. Agric.* 9, 363-372.
- Kunkee, R.E. (1967) *Malo-lactic fermentation*. Adv. Appl. Microbiol. 9:235-79.
- Kunkee, R.E. (1974) *Malo-lactic fermentation and winemaking in Chemistry of winemaking*. A.D. Webb (Ed.). Adv. Chem. Ser. 137, pp 151-70. American Chemical Society, Washington, DC
- Lafon-Lafourcade, S. and E. Peynaud, (1974). *Sur l'action antibacterienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée*. Connaiss. Vigne Vin 8:187-203.

- Lambrechts, M.G. & Pretorius, I.S., (2000). Yeast and its importance to wine aroma - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97-129.
- Landaud, S., Helinck, S. & Bonnarme, P., (2008). Formation of volatile sulphur compounds and metabolism of methionine and other sulphur compounds in fermented food. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1191-1205.
- Lloret, A., Boido, E., Lorenzo, D., Medina, K., Carrau, F. & Dellacassa, E., (2002). Aroma variation in Tannat wines: Effect of malolactic fermentation on ethyl lactate level and its enantiomeric distribution. *Ital. J. Food. Sci.* 14, 175-180.
- Lonvaud-Funel, A. & Joyeux, A., (1994). Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 401-407.
- Lonvaud-Funel, A., (1999). *Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine*. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 317-331.
- Lonvaud-Funel, A., (2001). *Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria*. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 9-13.
- Maicas, S., Gil, J-V., Pardo, I. & Ferrer, S., (1999). *Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria*. *Food Res. Int.* 32, 491.
- Malolactic Fermentation: *The ABC's of MLF*, 2010
- Matthews, A.H., Grbin, P.R. & Jiranek, V., (2006). A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 235-244.
- Nelson, L., 2008. The production of volatile phenols by wine microorganisms. Thesis, Stellenbosch University, Private Bag X1, 7602 Matieland (Stellenbosch), South Africa.
- Nielsen, J.C., Prahl, C. & Lonvaud-Funel, A., (1996). Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 42-48.

- Nielsen, J.C. & Richelieu, M., (1999). Control of flavour development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 740-745.
- Peinado, R.A., Moreno, J., Bueno, J.E., Moreno, J.A. & Mauricio, J.C., (2004). *Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration*. *Food Chem.* 84, 589-590.
- Peynaud E., (1981), *Connaissance et Travail du Vin*. Dunod, Paris.
- Popescu I., Gheorghita M., (2007). The malolactic fermentation conduction on red wines, using starter cultures of malolactic bacteria. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, Volume XIII, No.1* 183-190
- Pozo-Bayón, M.A., Alegría, E.G., Polo, M.C., Tenorio, C., Martín-Álvarez, P.J., Calvo de la Banda, M.T., Ruiz-Larrea, F. & Moreno-Arribas, M.V., (2005). Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8729-8735.
- Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Bertrand, A. & Lonvaud-Funel, A., (2004). Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1176-1184.
- Ribereau P.-Gayon, Dubourdieu D., Doneche B. and Lonvaud A., (2006), *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition.*, John Wiley & Sons Ltd, Bordeaux, France.
- Ronald S.J., (2002), *Wine Tasting: A Professional Handbook*. Elsevier Academic Press
- Sefton, M.A., Francis, I.L. & Williams, P.J., (1993). The volatile composition of Chardonnay juices: a study by flavor precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 359-370.
- Spano, G., Rinaldi, A., Ugliano, L., Moio, L., Beneduce, L. & Massa, S., (2005). A β -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses. *J. Appl. Microbiol.* 98, 855-861.

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

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

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

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

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

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

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

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

<https://www.google.com/earth/>

<http://www.lallemandwine.com>

<http://www.newwinesofgreece.com>

<http://www.oiv.int>

<http://www.wikipedia.org>

