Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Τμήμα Φυτικής Παραγωγής
ΔΠΜΣ "Αμπελουργία-Οινολογία"

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη βελτίωσης ποιοτικών & οργανοληπτικών χαρακτηριστικών οίνου από σταφύλια της ποικιλίας Μοσχοφίλερο.

ΜΑΡΙΛΕΝΑ Θ. ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΥ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2017

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Τμήμα Φυτικής Παραγωγής
ΔΠΜΣ "Αμπελουργία-Οινολογία"

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη βελτίωσης ποιοτικών & οργανοληπτικών χαρακτηριστικών οίνου από σταφύλια της ποικιλίας Μοσχοφίλερο

ΜΑΡΙΛΕΝΑ Θ. ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΥ

Όνομα Επιβλέποντος: Κοτσερίδης Γ., Επίκουρος Καθηγητής Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Όνομα Α' μέλους Τριμελούς: Μπινιάρη Α., Επίκουρη Καθηγήτρια, Εργαστήριο Αμπελολογίας, Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Όνομα Β' μέλους Τριμελούς: Τσακαλίδου Ε., Καθηγήτρια Βιοχημείας Τροφίμων, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε μηλογαλακτική ζύμωση σε οίνους της ελληνικής ποικιλίας Μοσχοφίλερο, και η πρακτική αυτή προτάθηκε ως ένας εναλλακτικός τρόπος παραγωγής λευκού ξηρού οίνου από αυτή τη ποικιλία. Μελετήθηκε η επίδραση δύο διαφορετικών εμπορικών σκευασμάτων ζυμομυκήτων *Saccharomyces cerevisiae*, του VIVACE (Renaissance Yeast, Canada) και του UCLM S325 (Fermentis, France), και 3 διαφορετικών στελεχών γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus Oeni*, των Viniflora Oenos, Viniflora Cine και Viniflora CH16 (Chr. Hansen, Denmark), κατά την διεξαγωγή της αλκοολικής, καθώς και της μηλογαλακτικής ζύμωσης των οίνων. Αντικείμενο ήταν η μελέτη συγκεκριμένων συστατικών των 8 διαφορετικών οίνων, τα οποία έχουν έντονο τεχνολογικό ενδιαφέρον και επιδρούν στον ποιοτικό χαρακτήρα του οίνου.

Αρχικά, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης λαμβάνονταν σχεδόν καθημερινά μετρήσεις του ειδικού βάρους, ενώ κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης μετρούταν το μηλικό οξύ με ανακλασίμετρο RQflex. Στη συνέχεια, στα εμφιαλωμένα πλέον δείγματα, πραγματοποιήθηκαν οι κλασικές αναλύσεις του οίνου (οξύτητα, θειώδη, pH, ΔΦΟ, ανάγοντα σάκχαρα), μετρήθηκαν τα οργανικά οξέα (τρυγικό, μηλικό, κιτρικό, γαλακτικό, ηλεκτρικό και οξικό οξύ), προσδιορίστηκε το αρωματικό προφίλ μέσω GC-FID με SPME και ποσοτικοποιήθηκε το διακετύλιο μέσω GC-ECD. Τέλος, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος των παραγόμενων οίνων για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών τους και την μελέτη της αποδοχής του προϊόντος από τον καταναλωτή.

Αρχικά, οι δύο ζύμες δεν είχαν κάποια διαφορά στον ρυθμό καταβολισμού των σακχάρων. Φάνηκε ότι η ζύμη VIVACE, σύμφωνα και με τις προδιαγραφές της, μπορεί να μεταβολίσει μία μικρή ποσότητα του μηλικού οξέος. Ακόμη, η VIVACE παρήγαγε υψηλότερες στατιστικά συγκεντρώσεις σε εστέρες ανώτερων αλκοολών, σε σχέση με τη ζύμη UCLM S325. Στους εστέρες των λιπαρών οξέων και στις ανώτερες αλκοόλες, δεν παρουσίασαν κάποια διαφορά, σε αντίθεση με τα τερπένια, όπου το στέλεχος UCLM S325 παρήγαγε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ίσως λόγω της παράπλευρης δράσης της β-γλυκοσιδάσης, όπως αναφέρει και ο παρασκευαστής.

Η εφαρμογή της μηλογαλακτικής ζύμωσης κατά κύριο λόγο, επέφερε την ολοκληρωτική σχεδόν εξαφάνιση του μηλικού οξέος, το οποίο έφτασε έως τα 2.6 g/L στους οίνους μάρτυρες, μετατρέποντάς το σε γαλακτικό οξύ, το οποίο είναι πιο «μαλακό» στη γεύση. Συνεπώς, μειώθηκε η αρχική υψηλή οξύτητα των οίνων που υπερέβαινε τα 7 g/L σε τρυγικό οξύ, κατά έως και 1.7 μονάδες, και αυξήθηκε το pH έως και 0.12 μονάδες. Το βακτήριο Cine φάνηκε να καταναλώνει το περισσότερο μηλικό οξύ, αλλά ήταν αδύνατο να μεταβολίσει το κιτρικό οξύ. Έτσι, δεν παράγει τόσο οξικό οξύ όσο τα άλλα δύο βακτήρια, τα οποία αύξησαν τη συγκέντρωσή του έως και κατά 0.25 g/L.

Στα πτητικά συστατικά του αρώματος των οίνων που μελετήθηκαν δεν φάνηκαν σοβαρές μεταβολές μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Την σπουδαιότερη αλλαγή την επέφερε το γαλακτικό βακτήριο CH16 στον οίνο της ζύμης UCLM S325, αφού αύξησε πτητικά συστατικά όπως ο οξικός

εξυλεστέρας, ο οξικός ισοαμυλεστέρας, ο καπροϊκός αιθυλεστέρας και η ισοαμυλική αλκοόλη. Όσον αφορά το διακετύλιο, φάνηκε ότι το στέλεχος Oenos είναι ικανό να παράξει περισσότερο διακετύλιο σε σχέση με το CH16, ενώ το στέλεχος Cine δεν παράγει καθόλου, αφού δεν μπορεί να μεταβολίσει το κιτρικό οξύ.

Τέλος, ο οργανοληπτικός έλεγχος των 8 οίνων έδειξε ότι σε γενικές γραμμές η μηλογαλακτική ζύμωση αύξησε την ένταση του αρώματος, τον φρουτώδη χαρακτήρα, το άρωμα βουτύρου και την προτίμηση του οίνου από τους δοκιμαστές. Πιο αναλυτικά, φάνηκε το βακτήριο Oenos να αυξάνει την ένταση του αρώματος, καθώς και του βουτύρου, ενώ το βακτήριο CH16 αύξησε τον φρουτώδη χαρακτήρα και προτιμήθηκε σε σχέση με τα υπόλοιπα.

Λέξεις κλειδιά: Μοσχοφίλερο, λευκός οίνος, μηλογαλακτική ζύμωση, γαλακτικά βακτήρια, διακετύλιο, οργανοληπτικός έλεγχος

“Improvement of quality and sensory characteristics of Moschofilero wines”

ABSTRACT

In this thesis, malolactic fermentation was conducted in wines of the greek variety Moschofilero, and this method was proposed for the production of an alternative type of dry white wine of this variety. The effects of two different yeast strains *S. cerevisiae* (VIVACE (Renaissance Yeast, Canada) and UCLM S325 (Fermentis, France)), and three different lactic acid bacteria *O. oeni* (Viniflora Oenos, Viniflora Cine and Viniflora CH16 (Chr. Hansen, Denmark)), were examined during alcoholic and malolactic fermentation, respectively. The aim was to study specific components of these 8 final wines, that have a strong technological interest and they influence the quality of the wine.

At first, fermentation monitoring was performed almost every day, during alcoholic fermentation, while during malolactic fermentation, malic acid was measured with the RQflex reflectometer. Then, in the final bottled wines, the classic wine analyses (acidity, sulfite, pH, I_{280}, residual sugars) were performed, organic acids (tartaric, malic, citric, lactic, succinic and acetic acid) were measured, the aromatic profile was determined by GC -FID with SPME and diacetyl was measured by GC-ECD. Finally, the sensory analysis of the wines was carried out to determine their characteristics and to study the acceptability of the product by the consumers.

The two yeast strains had the same rate of sugar catabolism. The strain VIVACE, according to its specifications, metabolized a small amount of malic acid. In addition, VIVACE produced higher concentrations of esters of higher alcohols than UCLM S325. Esters of fatty acid and higher alcohols didn’t show any difference between the two strains, unlike terpenes, where the UCLM S325 strain produced them in higher concentrations, perhaps due to the side-effect of β-glucosidase, as reported by the manufacturer.

The application of malolactic fermentation resulted in almost complete disappearance of malic acid, which reached up to 2.6 g/L in control wines, turning it into lactic acid, which is a more "soft" acid in taste. Consequently, the original high acidity of wines, that exceeded 7 g/L of tartaric acid, decreased by up to 1.7 units, and the pH increased by 0.12 units. The strain of lactic acid bacteria Viniflora Cine consumed the most malic acid, but it was unable to metabolize citric acid. Thus, it doesn’t produce as much acetic acid as the two other bacteria, that increased its concentration by up to 0.25 g/L.

The volatile compounds of the wine aroma that were studied did not show any great changes after the completion of malolactic fermentation. The CH16 lactic acid bacteria caused the most significant change in the UCLM S325 yeast wine, since some volatile compounds of the control wine, such as hexyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate and isoamyl alcohol were increased. Also, it was observed that the Viniflora Oenos lactic acid bacteria were able to produce more diacetyl than CH16, whereas Cine does not produce at all, since it cannot metabolize citric acid.

Finally, the sensory analysis of the 8 wines, proved that, in general, the malolactic fermentation increased the intensity of the aroma, the fruity character, the butter aroma and the preference of the wine by the tasters. In more detail, Viniflora Oenos bacteria caused an increase in the intensity of the aroma, as well as the butter aroma, while the CH16 bacteria caused an increase in the fruity character and its wine was mostly preferred.

Key words: Moschofilero, white wine, malolactic fermentation, lactic acid bacteria, diacetyl, sensory analysis

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Εισαγωγή 11
1. Το σταφύλι 12
1.1. Χημική σύσταση του σταφυλιού 12
1.2. Στάδια ανάπτυξης του σταφυλιού 13
1.3. Σύσταση του γλεύκους 14
1.4. Μοσχοφίλερο 16
2. Ο οίνος 17
2.1. Αλκοολική ζύμωση 18
2.1.1. Κλασική λευκή οινοποίηση 19
2.1.2. Λευκή οινοποίηση με προζυμωτική κρυοεκχύλιση 21
2.2. Μηλογαλακτική ζύμωση 23
2.2.1. Βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη μηλογαλακτική ζυμωση 25
2.2.2. Η δράση των γαλακτικών βακτηρίων 26
2.3. Τα βασικά οργανικά οξέα του οίνου 34
2.4. Τα πτητικά συστατικά του αρώματος του οίνου 36
2.4.1. Από το σταφύλι 36
2.4.2. Από την αλκοολική ζύμωση 37
3. Οργανοληπτικός έλεγχος 38
4. Υλικά και μέθοδοι 41
4.1. Διαδικασίες μικροοινοποιήσεων και σχεδιασμός πειραμάτων 41
4.2. Εμπορικά σκευάσματα ζυμομυκήτων 42
4.3. Εμπορικά σκευάσματα γαλακτικών βακτηρίων 43
4.4. Αναλυτικές μέθοδοι 44
4.4.1. Βασικές αναλύσεις οίνου 44
4.4.2. Μέτρηση μηλικού οξέος με ανακλασίμετρο RQflex 44
4.4.3. Μέτρηση οξέων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) 44
4.4.4. Ποσοτικός προσδιορισμός αρωματικού δυναμικού με GC-FID 45
4.4.5. Ποσοτικός προσδιορισμός διακετυλίου με GC-ECD 46
4.5. Οργανοληπτικός έλεγχος 48
5. Αποτελέσματα - Συζήτηση 50
5.1. Πορεία ζύμωσης - Μηλικό οξύ των παραγόμενων οίνων 50

5.2. Βασικές αναλύσεις οίνου 51
5.3. Οργανικά οξέα μέσω HPLC 53
5.4. Αρωματικό προφίλ μέσω GC-FID 57
5.5. Διακετύλιο μέσω GC-ECD 65
5.6. Οργανοληπτικός έλεγχος 67
6. Συμπεράσματα 72
7. Βιβλιογραφία 74

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Μοσχοφίλερο 17
Εικόνα 2: Ασυνεχές πνευματικό πιεστήριο 19
Εικόνα 3: Δεξαμενές με μανδύα ψύξης για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας της αλκοολικής ζύμωσης 20
Εικόνα 4: Μεταβολισμός L-μηλικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης 27
Εικόνα 5: Μεταβολισμός σακχάρων από τα γαλακτικά βακτήρια O. oeni κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης 28
Εικόνα 6: Μεταβολισμός κιτρικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης 30
Εικόνα 7: Οργανοληπτικός έλεγχος: όραση, όσφρηση, γεύση 39
Εικόνα 8: Αντίδραση μεταξύ διακετυλίου και αντιδραστηρίου PFBOA 46
Εικόνα 9: Ατομικό πάνελ οργανοληπτικού ελέγχου των οίνων 48

ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του αέριου χρωματογράφου για τον προσδιορισμό του διακετυλίου 47
Διάγραμμα 2: Μεταβολή του ειδικού βάρους του γλεύκους κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης των 4 μικροοινοποιήσεων (VIV1, VIV2, UCLM1, UCLM2) 50
Διάγραμμα 3: Ογκομετρούμενη οξύτητα των 8 οίνων (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325), ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων) 52
Διάγραμμα 4: pH των 8 οίνων (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325), ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων) 53
Διάγραμμα 5: Συγκέντρωση οργανικών οξέων στους 4 οίνους της ζύμης VIVACE (τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325) για κάθε οξύ, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα μεταξύ των Διαγραμμάτων 5&6 υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων) 54
Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση οργανικών οξέων στους 4 οίνους της ζύμης UCLM S325 (τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE

και UCLM S325) για κάθε οξύ, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα μεταξύ των Διαγραμμάτων 5&6 υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων) 54

Διάγραμμα 7: Οι 3 εστέρες ανώτερων αλκοολών που ανιχνεύτηκαν στους 8 οίνους (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325) για κάθε εστέρα, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων για κάθε εστέρα) 58

Διάγραμμα 8: Οι 6 εστέρες λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν στους 4 οίνους της ζύμης VIVACE (τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση για κάθε εστέρα, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα στα Διαγράμματα 8 & 9 υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων (VIVs και UCLMs) για κάθε εστέρα) 60

Διάγραμμα 9: Οι 6 εστέρες λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν στους 4 οίνους της ζύμης UCLM S325 (τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση για κάθε εστέρα, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα στα Διαγράμματα 8 & 9 υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων (VIVs και UCLMs) για κάθε εστέρα) 60

Διάγραμμα 10: Οι 2 ανώτερες αλκοόλες που ανιχνεύτηκαν στους 8 οίνους (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325) για κάθε ανώτερη αλκοόλη, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων για κάθε εστέρα) 63

Διάγραμμα 11: Τα 2 τερπένια που ανιχνεύτηκαν στους 8 οίνους (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325) για κάθε ανώτερη αλκοόλη, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων για κάθε εστέρα) . 64

Διάγραμμα 12: Συγκέντρωση διακετυλίου που βρέθηκε στους 8 οίνους (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325), ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο οίνων (VIVACE και UCLM S325) του ιδίου γαλακτικού βακτηρίου) 65

Διάγραμμα 13: Τα αποτελέσματα των 3 τεστ Duo-Trio των οίνων της ζύμης VIVACE των οργανοληπτικών ελέγχων. Τα αποτελέσματα είναι ομαδοποιημένα στα 3 ζεύγη του κάθε τεστ για κάθε χαρακτηριστικό. Η μαύρη γραμμή υποδηλώνει το όριο πάνω από το οποίο υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων..... 67

Διάγραμμα 14: Τα αποτελέσματα του τεστ κατάταξης των οίνων της ζύμης VIVACE του 1ου οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μαύρες γραμμές υποδηλώνουν τα όρια εκτός των οποίων υπάρχει σημαντική διαφορά του δείγματος σε σχέση με τα υπόλοιπα. ... 68
Διάγραμμα 15: Τα αποτελέσματα του τεστ κατάταξης των οίνων της ζύμης VIVACE του 2ου οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μαύρες γραμμές υποδηλώνουν τα όρια εκτός των οποίων υπάρχει σημαντική διαφορά του δείγματος σε σχέση με τα υπόλοιπα. ... 69
Διάγραμμα 16: Τα αποτελέσματα των 3 τεστ Duo-Trio των οίνων της ζύμης UCLM S325 των οργανοληπτικών ελέγχων.. Τα αποτελέσματα είναι ομαδοποιημένα στα 3 ζεύγη του κάθε τεστ για κάθε χαρακτηριστικό. Η μαύρη γραμμή υποδηλώνει το όριο πάνω από το οποίο υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων..... 70
Διάγραμμα 17: Τα αποτελέσματα του τεστ κατάταξης των οίνων της ζύμης UCLM S325 του 1ου οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μαύρες γραμμές υποδηλώνουν τα όρια εκτός των οποίων υπάρχει σημαντική διαφορά του δείγματος σε σχέση με τα υπόλοιπα. ... 71
Διάγραμμα 18: Τα αποτελέσματα του τεστ κατάταξης των οίνων της ζύμης UCLM S325 του 2ου οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μαύρες γραμμές υποδηλώνουν τα όρια εκτός των οποίων υπάρχει σημαντική διαφορά του δείγματος σε σχέση με τα υπόλοιπα. ... 71

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χημική σύσταση των βοστρύχων 12
Πίνακας 2: Χημική σύσταση του φλοιού των ραγών 13
Πίνακας 3: Χημική σύσταση των γιγάρτων των ραγών 13
Πίνακας 4: Οι διαφορετικές μικροοινοποιήσεις, οι ζύμες και τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν..... 42
Πίνακας 5: Συγκέντρωση του μηλικού οξέος (μέσω ανακλασίμετρου) των 4 οίνων (VIV1, VIV2, UCLM1, UCLM2) 50
Πίνακας 6: Οι 13 ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ των 8 οίνων, και η χαρακτηριστική οσμή τους 57

Εισαγωγή

Το αμπέλι είναι, ίσως, από τα παλαιότερα φυτά που παρουσιάστηκαν στη γη και η χρησιμοποίηση των καρπών του, των σταφυλιών, για την παραγωγή οίνου χρονολογείται περίπου στο 3000 π.Χ.. Ο οίνος είναι το αποτέλεσμα της ζύμωσης του χυμού των σταφυλιών, του γλεύκους, από τους ζυμομύκητες, οι οποίοι κυρίως μετατρέπουν τα σάκχαρα του γλεύκους σε αιθανόλη. Η δημοτικότητα του συγκεκριμένου αλκοολούχου ποτού είναι υψηλή σχεδόν σε όλον τον κόσμο, και γι' αυτό η οινοβιομηχανία είναι ένας κλάδος που βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη. Η Ελλάδα, λόγω του κλίματός της και των διαφόρων γηγενών ποικιλιών που καλλιεργούνται σε διάφορα μέρη της, παράγει πολλούς οίνους ανώτερης ποιότητας. Εκτός της γνωστής ιδιότητας του οίνου που περνά από γενιά σε γενιά μέσω του ρητού «οίνος ευφραίνει καρδίαν ανθρώπου», η μέτρια κατανάλωσή του σε καθημερινή βάση έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να έχει θετικές επιπτώσεις στην υγεία.

Ο οίνος είναι ένα πολυσύνθετο μίγμα οργανικών και ανόργανων συστατικών. Ανάμεσα στις διάφορες ουσίες που περιέχονται ξεχωρίζουν τα οργανικά οξέα, που είναι υπεύθυνα για την όξινη γεύση των οίνων, τα σάκχαρα, χαρακτηριστικά των γλυκών και ημίγλυκων οίνων, οι φαινολικές ενώσεις, που επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, όπως είναι το χρώμα και η γεύση, ενώ λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, η κατανάλωση του οίνου σε μικρές ποσότητες συσχετίζεται με θετικές για την υγεία ιδιότητες και τα πτητικά συστατικά, που προσδίδουν το μοναδικό αρωματικό προφίλ του κάθε οίνου.

Η μετατροπή των σακχάρων του γλεύκους σε αιθανόλη γίνεται από τους ζυμομύκητες, κατά τη διάρκεια τη αλκοολικής ζύμωσης. Εκτός από την απαραίτητη αλκοολική ζύμωση, για την παραγωγή οίνων ποιότητας, κρίνεται όλο και συχνότερα αναγκαία η μηλογαλακτική ζύμωση. Η μηλογαλακτική ζύμωση στην ουσία είναι η βακτηριακή αποκαρβοξυλίωση του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Ως αποτέλεσμα είναι η μείωση της οξύτητας, και επομένως η μικρή αύξηση του pH, η μείωση της όξινης γεύσης, η τροποποίηση του αρώματος και η μικροβιακή σταθερότητα του οίνου. Τα γαλακτικά βακτήρια του είδους *Oenococcus oeni* είναι τα κύρια που διεξάγουν τη μηλογαλακτική ζύμωση σχεδόν σε όλους τους ερυθρούς οίνους, και με αυξανόμενο ρυθμό στους λευκούς και αφρώδεις. Οι αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που θα αποφέρει κάθε φορά η μηλογαλακτική ζύμωση, εξαρτώνται από το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που θα την διεξάγει, τον τύπο του οίνου και τον τρόπο οινοποίησής του, την γεύση και άρωμά του, καθώς και την παρουσία των πρόδρομων αρωματικών ενώσεων. Η μηλογαλακτική ζύμωση, γενικά, οδηγεί στην αύξηση του χαρακτηριστικού αρώματος του βουτύρου, το μειωμένο χορτώδη χαρακτήρα, τη βελτίωση του φρουτώδη χαρακτήρα και τη μακρότερη επίγευση του οίνου.

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε οίνους της ελληνικής ποικιλίας του Μοσχοφίλερου. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη ποικιλία αφού είναι μία από τις εκλεκτές ελληνικές ποικιλίες, που δίνει μονοποικιλιακούς οίνους

λευκούς και ερυθρωπούς με χαρακτηριστικό άρωμα. Τον καλύτερο χαρακτήρα στους οίνους της, τον δίνουν τα σταφύλια που έχουν καλλιεργηθεί στο οροπέδιο της Μαντινείας στην Αρκαδία στα 650 m, όπου παράγονται οι φρέσκοι με χαρακτηριστική οξύτητα οίνοι Π.Ο.Π. Μαντινείας. Λόγω του υψομέτρου και των θερμοκρασιών που επικρατούν, το μηλικό οξύ των παραγόμενων οίνων της Μαντινείας είναι υψηλότερο σε σχέση με άλλους οίνους που παράγονται σε χαμηλότερα υψόμετρα. Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι μία πρόταση για την παρασκευή πιο ώριμων οίνων από αυτή τη ποικιλία, που πιθανόν θα ωριμάζουν κάποιο διάστημα σε δρύινα βαρέλια. Συνεπώς, η συγκεκριμένη εργασία έχει ως στόχο να διερευνήσει την παρασκευή ενός άλλου τύπου οίνου Μοσχοφίλερου, καθώς και τις οργανοληπτικές και τεχνολογικές του ιδιότητες.

1. Το σταφύλι

Το σταφύλι αποτελείται από τους βόστρυχους και τις ράγες. Οι βόστρυχοι έχουν διπλό φυσιολογικό ρόλο. Μεταφέρονται με αυτούς οι θρεπτικές ουσίες στους καρπούς και κρατάνε τις ράγες. Οι ράγες αποτελούνται από το φλοιό, τη σάρκα και τα γίγαρτα. Το σταφύλι περιλαμβάνει 3-6.5% βοστρύχους και 93.5-97% ράγες. Οι ράγες αποτελούνται από 7-12% φλοιό, 83-87% σάρκα και 2-6% γίγαρτα. Ο φλοιός χαρακτηρίζει την οινική ποιότητα της ποικιλίας, λόγω των αρωματικών ουσιών και χρωστικών που έχει. Η ποιότητα, όμως, εξαρτάται από την ωρίμανση του σταφυλιού, την υγεία και το φορτίο του ανά πρέμνο (Σουφλερός 2000, Τσέτουρας 2008).

1.1. Χημική σύσταση του σταφυλιού

Η χημική σύσταση των βοστρύχων, των φλοιών και των γιγάρτων των ραγών παρουσιάζονται στους Πίνακες 1, 2 και 3:

Πίνακας 1: Χημική σύσταση των βοστρύχων

Νερό (ανάλογα με το βαθμό ωρίμανσης)	65-85%
Σάκχαρα	1%
Ταννίνες	2-4%
Αζωτούχες ουσίες	1-1.5%
Ανόργανες ουσίες	2-2.5%
Ρητίνες	1%
Διάφορα οργανικά οξέα	0.5-2%

Τα ανόργανα συστατικά του βοστρύχου αποτελούνται από άλατα φωσφορικά, ασβεστίου και καλίου.

Πίνακας 2: Χημική σύσταση του φλοιού των ραγών

Νερό	75-80%
Όξινα συστατικά	1-1.5%
Ανόργανες ουσίες	1.5-2%
Τανίνες	1-2%
Αζωτούχες ουσίες	1.5-2%
Διάφορες ουσίες	10-15%

Πίνακας 3: Χημική σύσταση των γιγάρτων των ραγών

Νερό	36-40%
Όξινα συστατικά	1%
Ανόργανες ουσίες	2-4%
Τανίνες	5-8%
Αζωτούχες ουσίες	5%
Διάφορες ουσίες	10-15%
Ελαιώδεις ουσίες	10-20%
Υδρογονάνθρακες	34-36%

Η σάρκα των ραγών είναι το κύριο συστατικό του γλεύκους. Ο χυμός των κυττάρων της είναι περίπου το 99.5% και οι κυτταρικές μεμβράνες το 0.5%. Η σάρκα συνήθως περιέχει 65-80% νερό και 17-25% ζυμώσιμα σάκχαρα. Περιέχει, επίσης, οργανικά οξέα, αζωτούχες ενώσεις, ανόργανα άλατα, πηκτινικές ουσίες, τανίνες και αρωματικές ουσίες, πολύ λιγότερες όμως από το φλοιό. Τα ζυμώσιμα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα προσδίδουν στον οίνο τη γευστική του ισορροπία (Σουφλερός 2000, Τσέτουρας 2008).

1.2. Στάδια ανάπτυξης του σταφυλιού

Μετά την καρπόδεση, κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, ολοκληρώνεται η κανονική ανάπτυξη του σταφυλιού. Σημαντικό ρόλο παίζουν η θερμοκρασία, οι βροχές, καθώς και η ισορροπημένη θρέψη. Σε όλο το διάστημα αυτής της περιόδου, οι ράγες είναι σκληρές και πράσινες, λόγω της άφθονης χλωροφύλλης που υπάρχει στους φλοιούς τους. Ο βόστρυχας παίρνει τις οριστικές του διαστάσεις.

Ο περκασμός (ή αλλιώς γυάλισμα) του σταφυλιού είναι το χαρακτηριστικό στάδιο της ανάπτυξής του. Τότε αρχίζει η βαθμιαία διάσπαση της χλωροφύλλης του φλοιού των ραγών και η προοδευτική εμφάνιση της χρώσης, που χαρακτηρίζει την κάθε ποικιλία. Στο στάδιο αυτό οι ράγες αυξάνονται μέχρι το διπλάσιο περίπου, αλλάζουν χρώμα και γίνονται μεταβολές στα σάκχαρα, τις

χρωστικές και σε άλλα χαρακτηριστικά που δίνουν τη γεύση, το άρωμα και τις ξεχωριστές ιδιότητες κάθε ποικιλίας. Οι ράγες γίνονται πιο μαλακές και ελαστικές και εμπλουτίζονται σε σάκχαρα. Η συσσώρευση των σακχάρων στη ράγα προκαλεί οσμωτική έλξη νερού, με αποτέλεσμα τη γρήγορη διόγκωση των ραγών και τη μείωση της οξύτητας. Η μείωση της οξύτητας οφείλεται στην αραίωση και την εξουδετέρωση που παθαίνουν τα οξέα της ράγας από το νερό και τα περιεχόμενα σε αυτό ανόργανα στοιχεία.

Το στάδιο της ωρίμανσης του σταφυλιού είναι το τέλος του ετήσιου κύκλου ζωής του αμπελιού. Η ωρίμανση αρχίζει αμέσως μετά το στάδιο του γυαλίσματος και διακρίνεται σε φυσιολογική και τεχνολογική ωρίμανση. Φυσιολογική ωρίμανση ονομάζεται η στιγμή κατά την οποία τα γίγαρτα είναι ικανά να βλαστήσουν και να δώσουν νέα φυτά, ενώ τεχνολογική είναι η στιγμή κατά την οποία η ποσότητα των σακχάρων στο χυμό έχει φτάσει ένα ικανοποιητικό επίπεδο, ενώ τα οξέα, τα αρωματικά και τα φαινολικά συστατικά βρίσκονται σε επιθυμητά επίπεδα. Η τεχνολογική ωρίμανση είναι αυτή που καθορίζει την έναρξη του τρύγου. Το στάδιο της ωρίμανσης περιλαμβάνει την αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων, τη μείωση της οξύτητας, την αύξηση του μεγέθους των ραγών και τον σχηματισμό των χρωστικών, των τανινών, καθώς και των αρωματικών ουσιών (Σουφλερός 2000, Τσέτουρας 2008).

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την ωρίμανση και την ποιότητα των σταφυλιών, που διακρίνονται σε σταθερούς και μεταβλητούς. Στους σταθερούς παράγοντες περιλαμβάνονται η ποικιλία της αμπέλου, το είδος του υποκείμενου (συνίσταται η χρήση υποκείμενου διαφορετικού από το υπέργειο φυτό για λόγους αυτοπροστασίας του φυτού), η ηλικία του φυτού, το κλίμα και το έδαφος της περιοχής που είναι φυτεμένα. Στους μεταβλητούς παράγοντες περιλαμβάνονται οι καιρικές συνθήκες, οι αποστάσεις φύτευσης, οι καλλιεργητικές τεχνικές και οι διάφορες ασθένειες που μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Σουφλερός 2000).

1.3. Σύσταση του γλεύκους

Το γλεύκος αποτελείται από 65-80% νερό και 17-25% σάκχαρα. Το υπόλοιπο 5-6% αποτελείται από διάφορες ουσίες υπό διάλυση, όπως οργανικά οξέα (τρυγικό, μηλικό, κιτρικό κ.α.), ανόργανα συστατικά (άλατα των ανόργανων οξέων με μέταλλα ασβεστίου, καλίου, μαγνησίου, μαγγανίου, σιδήρου, αργιλίου, νατρίου), αζωτούχες ενώσεις, πηκτινικές ουσίες, φαινολικά συστατικά (κυρίως τανίνες και χρωστικές ουσίες), αρωματικές ουσίες, διάφορα ένζυμα και, τέλος, βιταμίνες, οι οποίες παίζουν σπουδαίο ρόλο επειδή είναι πρόσθετοι παράγοντες ανάπτυξης των ζυμομυκήτων της αλκοολικής ζύμωσης.

Τα κύρια σάκχαρα του γλεύκους είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, των οποίων η αναλογία είναι ίση με 0.95 κατά την ωρίμανση. Η περιεκτικότητα των σακχάρων στο γλεύκος είναι αντιστρόφως ανάλογη με την περιεκτικότητα σε οξέα. Το αυξημένο ποσοστό των οξέων στο κρασί δίνει ευχάριστη γεύση, συντελεί στη διατήρησή του και αποτρέπει τα διάφορα θολώματα. Τα

κύρια οργανικά οξέα που περιέχονται στο γλεύκος είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό με προέλευση το σταφύλι, το ηλεκτρικό και το γαλακτικό που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και το πτητικό οξικό οξύ. Από τα παραπάνω οξέα το μηλικό, το τρυγικό, το κιτρικό και το γαλακτικό οξύ, τα οποία περιέχουν στο μόριό τους ομάδες υδροξυλίων, έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν το σίδηρο, με αποτέλεσμα να αποφεύγονται τα θολώματα σιδήρου (Σουφλερός 2000, Τσέτουρας 2008).

Τα ανόργανα συστατικά σχηματίζονται στους βλαστούς του φυτού και μετακινούνται στη συνέχεια στα σταφύλια, απ' όπου τελικά περνούν στο γλεύκος. Οι ανόργανες ουσίες διακρίνονται σε ανιόντα και κατιόντα. Τα κυριότερα ανιόντα που περιέχονται στο γλεύκος είναι ανιόντα Cl^- με ανώτερο επιτρεπτό όριο στο κρασί 0.5 g/L NaCl, ανιόντα SO_4^{--} σε περιεκτικότητα 0.1-0.4 g/L K_2SO_4, η οποία αυξάνεται με την προσθήκη θειώδη ανυδρίτη και ανιόντα PO_4^{--}. Τα φωσφορικά οξέα συμμετέχουν στους ενδιάμεσους μεταβολισμούς και στις κυριότερες χημικές μεταβολές του οίνου. Η σπουδαιότητα που παρουσιάζει ο φώσφορος οδηγεί μερικές φορές στην προσθήκη φωσφορικού αμμωνίου στο γλεύκος για την διευκόλυνση της αλκοολικής ζύμωσης. Η προσθήκη, όμως, αυτή μπορεί να προκαλέσει το «λευκό θόλωμα» στους λευκούς οίνους, αφού το φωσφορικό ιόν, κυρίως παρουσία αέρα, μπορεί να σχηματίσει με τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{+++}) ένα αδιάλυτο ίζημα. Επομένως, εάν υπάρχει περίσσεια σιδήρου προστίθεται θειικό αμμώνιο και όχι φωσφορικό.

Τα κατιόντα που περνούν στο γλεύκος και στον οίνο είναι κατιόντα K^+ με περιεκτικότητα 0.1-0.8 g/L και παρουσιάζουν ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον υπό τη μορφή του όξινου τρυγικού καλίου, κατιόντα Na^+ σε περιεκτικότητα 20-200 mg/L, η οποία αυξάνονται με την προσθήκη θειώδη ανυδρίτη ή μπεντονίτη κακής ποιότητας, κατιόντα Ca^{++} σε περιεκτικότητα 80-100 mg/L και Mg^{++} σε περιεκτικότητα 80-120 mg/L. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κατιόντα Fe^{++}/Fe^{+++} και Cu^+/Cu^{++} λόγω του ότι παρουσιάζουν θολώματα στον οίνο αν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ο σίδηρος έχει περιεκτικότητα στο γλεύκος 2-5 mg/L, αλλά φτάνει στον οίνο μέχρι 40-50 mg/L. Η αναλογία δισθενή και τρισθενή σιδήρου μεταβάλλεται ανάλογα με το δυναμικό οξειδοαναγωγής του οίνου. Ο αερισμός μετατρέπει το δισθενή σε τρισθενή, μορφή η οποία δίνει αδιάλυτες ενώσεις με τις χρωστικές του οίνου και το φωσφορικό οξύ (σιδηρικό θόλωμα σε περιεκτικότητα Fe^{+++} > 12 mg/L). Το γλεύκος είναι πλούσιο σε χαλκό λόγω των διαφόρων ψεκασμών του αμπελιού. Αυξάνεται κατά την οινοποίηση, όπως και ο σίδηρος, λόγω της επαφής του γλεύκους με σωληνώσεις και κρουνούς, και φτάνει τελικά σε περιεκτικότητα 0.1-5 mg/L. Σε αναγωγικό περιβάλλον (έλλειψη αέρα) επικρατεί ο μονοσθενής χαλκός, ο οποίος σχηματίζει ενώσεις με το θειικό οξύ και προκαλεί θολώματα, όταν η συγκέντρωσή του είναι μεγαλύτερη από 0.5 mg/L (Σουφλερός 2000).

Τα ένζυμα που έχουν βρεθεί στο γλεύκος είναι οξειδωτικά, πηκτινολυτικά, πρωτεολυτικά κ.α. Αυτά είναι κυρίως οι καταλάσες, οι οξειδάσες, οι ιμβερτάσες, οι πρωτεάσες, οι πηκτινάσες, οι εστεράσες, οι τανάσες κ.α. Τα περισσότερα βρίσκονται στον φλοιό των ραγών. Ορισμένα ένζυμα είναι ανεπιθύμητα (οξειδωτικά), ενώ άλλα βοηθούν στην εκχύλιση, στην ομαλή ζύμωση, στη διαύγαση ή στο σχηματισμό εστέρων που είναι υπεύθυνοι για το άρωμα των οίνων. Η ιμβερτάση, που υδρολύει την σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, βρίσκεται σε αφθονία στις ράγες του

σταφυλιού, απ' όπου περνάει στο γλεύκος. Η ποσότητα του ενζύμου αυτού γίνεται ακόμη μεγαλύτερη κατά την αλκοολική ζύμωση ή προς το τέλος αυτής, γιατί παράγεται και από τις ζύμες. Με το πέρασμα του χρόνου, η δραστηριότητά της μειώνεται προοδευτικά, αλλά μερικές φορές εξακολουθεί να διατηρείται ακόμη και στους παλαιούς οίνους (Σουφλερός 2000).

Οι οξειδάσες (υπεροξειδάσες και πολυφαινυλοξειδάσες), επίσης, προέρχονται από το σταφύλι και εντοπίζονται κυρίως στο φλοιό των ραγών. Τα οξειδωτικά ένζυμα που εμπλέκονται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών είναι οι πολυφαινυλοξειδάσες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία χαλκού. Τα ώριμα και υγιή σταφύλια περιέχουν την τυροσινάση (*ορθο*-διφαινολοξειδάση). Εκτός από την τυροσινάση, στην κατηγορία των πολυφαινολοξειδασών ανήκει και η λακκάση (*παρα*-διφαινολοξειδάση) που βρίσκεται σε σταφύλια προσβεβλημένα από τον *Botrytis cinerea*. Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για το καφέτισμα των γλευκών και των λευκών οίνων, για το κεραμιδί χρώμα που αποκτούν οι νέοι ερυθροί οίνοι, για το οξειδωτικό θόλωμα των οίνων κ.α. Οι οξειδάσες αυξάνουν σημαντικά την ταχύτητα κατανάλωσης του οξυγόνου από τα γλεύκη και στο στάδιο αυτό η χημική οξείδωση είναι ουσιαστικά αμελητέα (Συμεού 2010).

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούνται κυρίως από τις ανθοκυάνες, οι οποίες δίνουν το χαρακτηριστικό έντονο χρώμα στους ερυθρούς οίνους, τις κατεχίνες, οι οποίες μαζί με τα πολυμερή τους, προκυανιδίνες και τανίνες, ευθύνονται για τη στυφή γεύση των ερυθρών οίνων, τις φλαβονόλες, οι οποίες αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές των λευκών και ερυθρών ποικιλιών σταφυλιού και, τέλος, τα φαινολικά οξέα.

1.4. Μοσχοφίλερο

Το Μοσχοφίλερο είναι μία πολυδύναμη ποικιλία της Πελοποννήσου. Το Μοσχοφίλερο και το Μαυροφίλερο αποτελούν μία και την αυτή ποικιλία και είναι η μοναδική που διαθέτει το μοσχάτο χαρακτήρα. Με την ποικιλία αυτή είναι στενά συγγενείς οι παραλλαγές Ασπροφίλερο και Ξανθοφίλερο, που υστερούν όμως σε αρωματικό δυναμικό και πιθανόν προήλθαν από την αρχική ποικιλία μέσω του φαινομένου της μετάλλαξης.

Η ευγενής ερυθρωπή και αρωματική ποικιλία Μοσχοφίλερο, καλλιεργείται στην καρδιά της Πελοποννήσου, την Αρκαδία, όπου καταλαμβάνει έκταση περίπου 7.000 στρεμμάτων σε υψόμετρο 650 m. Εκεί, στο οροπέδιο της Τρίπολης που περιβάλλεται από τα βουνά Μαίναλο (1981 μέτρα, δυτικά), Ολίγυρτος (1935 μέτρα, βόρεια), Αρτεμίσιο (1772 μέτρα, βορειοανατολικά), Κτενιάς (1599 μέτρα, ανατολικά) και Πάρνωνας (1936 μέτρα, ανατολικά - νοτιοανατολικά), παράγεται ο λευκός ξηρός οίνος Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης «Μαντινεία». Ο οίνος αυτός χαρακτηρίζεται για τη φρεσκάδα του, το ελαφρύ άρωμά του και είναι ισορροπημένος, αποτελώντας ταυτόχρονα έναν εξαιρετικό οίνο βάσης για την παρασκευή αφρώδους οίνου.

Εικόνα 1: Μοσχοφίλερο

Η ζώνη των οίνων Π.Ο.Π. Μαντινείας είναι από τις ψυχρότερες στην Ελλάδα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αργή ωρίμανση των σταφυλιών και τον όψιμο τρυγητό. Το έδαφος είναι σχετικά φτωχό και καλά στραγγιζόμενο. Όσον αφορά το κλίμα, χαρακτηρίζεται από πολλές βροχές και χιόνια το χειμώνα, συχνές καταιγίδες, μέχρι και παγετούς την άνοιξη, καθώς και βροχές το καλοκαίρι με θερμοκρασίες χαμηλές, σε σχέση με την υπόλοιπη ηπειρωτική χώρα. Γι' αυτό η ωρίμανση των σταφυλιών παρατηρείται το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Σεπτέμβρη, έως και τις πρώτες ημέρες του Οκτώβρη.

Συνήθως το γλεύκος του Μοσχοφίλερου περιέχει σάκχαρα από 210 – 220 g/ L, οξύτητα 5.4 – 6.8 g/Lσε τρυγικό οξύ και pH 3.3 – 3.5. Εκτός από τους λευκούς ξηρούς οίνους, παράγονται εξαιρετικοί ροζέ ξηροί οίνοι με ελαφρύ άρωμα μοσχάτου, Τέλος, υπάρχει η δυνατότητα παρασκευής αφρωδών οίνων εξαιρετικής ποιότητας.

Η υψηλή περιεκτικότητα σε οξέα (κυρίως το χαμηλό pH) και τ' άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κάνουν τον οίνο της ποικιλίας αυτής να μοιάζει με τους λευκούς ξηρούς οίνους της Αλσατίας (Γαλλία) και της Γερμανίας, που προέρχονται από την ποικιλία Riesling. Για την παραγωγή αυτών των οίνων, η στρεμματική απόδοση των αμπελώνων δεν πρέπει να ξεπερνά τα 900 kg σταφυλιών, η δε περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα να μην είναι κατώτερη από 188 g/L (Σουφλερός 2000, Τσέτουρας 2008, Σταυρακάκης 2010).

2. Ο οίνος

Οίνος είναι το ποτό, το οποίο προέρχεται από τη μερική ή ολική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών. Η Ευρωπαϊκή ένωση δίνει τον ορισμό: «οίνος καλείται το προϊόν που παράγεται

αποκλειστικά με αλκοολική ζύμωση, ολική ή μερική, νωπών σταφυλιών, σπασμένων ή όχι, ή γλεύκους σταφυλιών». Ορίζεται, δηλαδή, από το νόμο ότι το σταφύλι είναι η πρώτη ύλη της οινοβιομηχανίας (Τσέτουρας 2008).

2.1. Αλκοολική ζύμωση

Αλκοολική ζύμωση είναι το βιοχημικό φαινόμενο, κατά το οποίο τα σάκχαρα μετατρέπονται από τα ένζυμα των ζυμών σε αιθανόλη και παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και θερμότητα (περίπου 24 kcal/mole γλυκόζης). Η μετατροπή αυτή παρατηρείται στους σακχαρούχους χυμούς των καρπών, περιλαμβάνει περίπου 30 ξεχωριστές αντιδράσεις και συνοψίζεται στην εξίσωση του Gay-Lussac:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$$

Σχηματίζονται και διάφορα άλλα παραπροϊόντα, αλλά σε πολύ μικρές ποσότητες, όπως γλυκερίνη, οξέα, ανώτερες αλκοόλες, αλδεΰδες, εστέρες κ.α.

Κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται μεγάλες ποσότητες διοξειδίου του άνθρακα, το οποίο αυξάνει τον όγκο του γλεύκους κατά 20%.. Ένα μέρος διαλύεται στο γλεύκος, ενώ το μεγαλύτερο αποβάλλεται στο περιβάλλον. Η διαλυτότητά του στους ερυθρούς οίνους είναι 0.1-0.5 g/L και στους λευκούς 0.5-1 g/L. Παρατηρείται, ακόμη, αύξηση της θερμοκρασίας και μείωση του ειδικού βάρους. Έτσι, πρέπει να ελέγχεται η πυκνότητα του γλεύκους για την παρακολούθηση της αλκοολικής ζύμωσης, και η θερμοκρασία, αφού οι πιο κατάλληλες θερμοκρασίες για τη λευκή οινοποίηση είναι 16-20 °C και για την ερυθρή 25-30 °C.

Στην αρχή η ζύμωση είναι ζωηρή, και καθώς συνεχίζεται αυξάνεται ο αλκοολικός βαθμός και η ζύμωση μετριάζεται. Όταν ο αλκοολικός τίτλος φτάσει στο 11-12% v/v η ζύμωση γίνεται βραδεία, επειδή περιορίζεται η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των ζυμομυκήτων.

Οι ικανότητες των διαφόρων ειδών την ζύμης, ως προς την ταχύτητα και την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης, την αντοχή στα ποσοστά της παραγόμενης αιθανόλης, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων κ.α., έχουν αυξήσει το ενδιαφέρον των οινοποιών προς την ελεγχόμενη αλκοολική ζύμωση με επιλεγμένα είδη ζυμών. Συνήθως, ο εμβολιασμός του γλεύκους γίνεται με τους ζυμομύκητες *Saccharomyces cerevisiae* οι οποίοι έχουν μεγάλα ποσοστά βιωσιμότητας (Τσέτουρας 2008).

2.1.1. Κλασική λευκή οινοποίηση

Οι λευκοί οίνοι, κατά γενικό κανόνα, παράγονται με τη ζύμωση του γλεύκους που προκύπτει από λευκά σταφύλια και η οποία συμβαίνει αποκλειστικά στο χυμό, χωρίς την παρουσία των στερεών συστατικών του σταφυλιού. Υπάρχουν, βέβαια, περιπτώσεις που οι λευκοί οίνοι παράγονται από ερυθρά σταφύλια και περιπτώσεις όπου η ζύμωση μπορεί να γίνει παρουσία στεμφύλων λευκών ποικιλιών (Σουφλερός 2000).

Αρχικά γίνεται ο σωστός προσδιορισμός του τρύγου, όταν η περιεκτικότητα σε σάκχαρα και η ολική οξύτητα είναι στα επιθυμητά επίπεδα. Όταν η ολική οξύτητα βρίσκεται στα 6.5-7.5 g/L σε τρυγικό οξύ, η ζύμωση ευνοείται, καθώς ένα μεγάλος αριθμός παθογόνων και διαφόρων μικροοργανισμών που προκαλούν ασθένειες στους οίνους δεν δρα σε αυτή την οξύτητα. Σημαντική παράμετρος για την έναρξη του τρύγου είναι, επίσης, η τιμή της ενεργής οξύτητας (pH). Στα γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια επιθυμητής ωριμότητας, το pH κυμαίνεται μεταξύ 3.2 - 3.5. Στις τιμές αυτές είναι δύσκολο να δράσουν βακτήρια ή άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Οι διαφορές στις τιμές του pH παίζουν ρόλο στη γευστική ισορροπία των οίνων και στην ποιότητά τους. Δύο οίνοι με την ίδια ολική οξύτητα μπορεί να έχουν διαφορετικό pH.

Στη λευκή οινοποίηση συνήθως δεν αποχωρίζονται οι ράγες από τους βόστρυχους. Το κρασί από τα λευκά σταφύλια χωρίς απορραγισμό δεν παρουσιάζει θόλωμα. Το γλεύκος που προέρχεται από λευκά σταφύλια περιέχει δέκα φορές λιγότερες τανίνες από το γλεύκος των ερυθρών σταφυλιών. Οι τανίνες που περιέχονται στους βοστρύχους σε ποσοστά 2.5-3.5% έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σε πολλά οινοποιεία, όμως, συνηθίζεται να γίνεται αποβοστρύχωση και στη λευκή και στην ερυθρή οινοποίηση (Τσέτουρας 2008).

Τα σταφύλια, είτε μετά την αποβοστρύχωσή τους, όπου διαχωρίζονται οι ράγες από τους βοστρύχους, είτε κατευθείαν, εισέρχονται στο πιεστήριο. Το γλεύκος που παραλαμβάνεται χωρίς πίεση, αποτελεί τον πρόρωγο, από το οποίο παρασκευάζονται οι οίνοι ποιότητας. Είναι το 50-60% του συνολικού γλεύκους. Βρίσκεται ακριβώς κάτω από το φλοιό, στη χυμώδη ζώνη της σάρκας. Τα στέμφυλα περιέχουν επί πλέον ποσότητα γλεύκους, το οποίο λαμβάνεται με συμπίεση στα ασυνεχή πνευματικά πιεστήρια (Εικόνα 2). Τα ασυνεχή πιεστήρια θεωρούνται τα καλύτερα, επειδή η τροφοδότηση δεν είναι συνεχής, η συμπίεση γίνεται σε χαμηλές πιέσεις και σε χρονικά διαστήματα που καθορίζονται ανάλογα με την ποικιλία και την ωριμότητα των σταφυλιών. Από τις πρώτες πιέσεις, λαμβάνεται το γλεύκος που βρίσκεται στη μεσαία ζώνη της σάρκας. Περιέχει περισσότερα σάκχαρα και οξέα σε σχέση με τον πρόρωγο και λιγότερους

Εικόνα 2: Ασυνεχές πνευματικό πιεστήριο

ευγενείς οργανοληπτικούς χαρακτήρες. Η παραλαβή του γίνεται με μικρές πιέσεις. Με κατάλληλη επεξεργασία δίνει αξιόλογο οίνο. Από τις δεύτερες πιέσεις, λαμβάνεται το γλεύκος από τη κεντρική ζώνη της σάρκας, που περιέχει λιγότερα σάκχαρα, τα περισσότερα οξέα, έχει τραχύτητα και λίγους ευγενείς οργανοληπτικούς χαρακτήρες. Από το γλεύκος αυτό παρασκευάζονται οίνοι κοινής κατανάλωσης. Από τις τελευταίες πιέσεις, λαμβάνεται γλεύκος κατώτερης ποιότητας που δεν χρησιμοποιείται για την παραγωγή οίνων.

Τα μέρη του γλεύκους που παραλήφθησαν με τις διαδοχικές πιέσεις διαχωρίζονται σε διαφορετικές δεξαμενές (Εικόνα 3), και προστίθεται θειώδης ανυδρίτης που είναι απαραίτητος για την αναστολή της δράσης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, αλλά και για την προστασία από οξειδώσεις, αφού η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, που προστατεύουν το γλεύκος από τα οξειδωτικά φαινόμενα, είναι πολύ μικρή. Οι δόσεις κυμαίνονται από 5 έως 20 g/hL, με τις μεγαλύτερες να προστίθενται στα γλεύκη των σταφυλιών που έχουν προσβληθεί από διάφορες ασθένειες και σε περιπτώσεις που η ζύμωση γίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες. Η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη διευκολύνει και την απολάσπωση που ακολουθεί μετά από 12 μέχρι 24 ώρες, αφού καθυστερεί την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης.

Η απολάσπωση κρίνεται απαραίτητη στη λευκή οινοποίηση για την ποιοτική βελτίωση των οίνων. Η «λάσπη» αποτελείται από διάφορα κομματάκια των στερεών συστατικών του σταφυλιού, από χώματα, σκόνες, σάπιες ράγες που έχουν προσβληθεί από βοτρύτη, από πηκτινικές, πρωτεϊνικές και βλεννώδεις ουσίες που καταβυθίζονται μαζί με τα άλατα και τις τανίνες. Η απολάσπωση έχει μεγάλη επιτυχία όταν το γλεύκος εκτεθεί σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 10 °C. Σε αυτές τις θερμοκρασίες η αλκοολική ζύμωση αργεί να ξεκινήσει και το γλεύκος έχει το χρόνο να ηρεμήσει και να καταβυθιστεί η οινολάσπη στον πυθμένα. Η απολάσπωση μπορεί να γίνει είτε με στατική απολάσπωση είτε με φυγοκέντρηση είτε με επίπλευση.

Εικόνα 3: Δεξαμενές με μανδύα ψύξης για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας της αλκοολικής ζύμωσης

Κατά την στατική απολάσπωση γίνεται μετάγγιση του υπερκείμενου καθαρού γλεύκους. Έχει το μειονέκτημα ότι χάνεται ποσότητα από το γλεύκος αλλά δεν απομακρύνονται οι ζύμες, και έτσι η αλκοολική ζύμωση αργότερα εξελίσσεται ικανοποιητικά. Η χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων ευνοεί την στατική απολάσπωση, απομακρύνοντας τις πηκτινικές ουσίες που ενεργούν ως προστατευτικά κολλοειδή και εμποδίζουν την καταβύθιση των στερεών συστατικών. Ο όγκος της λάσπης αποτελεί το 5-10% του γλεύκους ή και περισσότερο. Η απολάσπωση με φυγοκέντρηση

γίνεται με φυγόκεντρους αμέσως μετά την εξαγωγή του γλεύκους ή την παραλαβή του μετά από μερική απολάσπωση με τη στατική μέθοδο. Είναι γρήγορη μέθοδος, αλλά απαιτεί ακριβό εξοπλισμό. Δίνει καλά αποτελέσματα, αλλά δεν λαμβάνεται τόσο διαυγές γλεύκος, όπως από μία επιτυχημένη στατική απολάσπωση. Έχει το μειονέκτημα ότι αφαιρεί τις ζύμες. Κατά την απολάσπωση με επίπλευση διοχετεύεται αέριο άζωτο μέσα στη δεξαμενή με το γλεύκος, και δημιουργούνται σύνολα «σωματιδίων-αερίου», που ανέρχονται στην επιφάνεια. Έτσι, η λάσπη απομακρύνεται από το πάνω μέρος της δεξαμενής και όχι από τον πυθμένα. Έχει το πλεονέκτημα της προστασίας του γλεύκους από την οξείδωση, λόγω του αδρανούς αερίου.

Μετά την απολάσπωση ακολουθεί ο εμβολιασμός με καθαρή ζύμη 10 έως 20 g/hL. Οι κατάλληλες θερμοκρασίες ζύμωσης για την λευκή οινοποίηση είναι μεταξύ 16 και 20 °C. Δεν πρέπει η ζύμωση να πραγματοποιείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες γιατί χάνονται τα φυσικά αρώματα του γλεύκους, τα οποία είναι πτητικά και ο οίνος γίνεται ουδέτερο χωρίς άρωμα. Η αργή αλκοολική ζύμωση δίνει πιο αρωματικούς οίνους.

Μετά την αποζύμωση όλων των σακχάρων προσδιορίζεται η λήξη της αλκοολικής ζύμωσης με τη μέτρηση του ειδικού βάρους, με κατάλληλα διαβαθμισμένα αραιόμετρα. Η λήξη της αλκοολικής ζύμωσης επιβεβαιώνεται με την μέτρηση των αναγόντων σακχάρων, των σακχάρων δηλαδή που δεν ζυμώνονται, τα οποία έχουν περιεκτικότητα μικρότερη των 2 g/L στους λευκούς οίνους.

Στη συνέχεια, γίνεται μετάγγιση του οίνου και προστίθεται θειώδης ανυδρίτης 8-10 g/hL με σκοπό να επιτευχθεί ελεύθερο θειώδες 30-40 mg/L. Με τη γρήγορη απομάκρυνση της οινολάσπης μετά την αλκοολική ζύμωση, αποφεύγεται η δημιουργία οσμών υδρόθειου. Ακολουθεί το απογέμισμα των δεξαμενών για την προστασία του οίνου από το οξυγόνο του αέρα. Ύστερα από 15-20 ημέρες γίνεται μία δεύτερη μετάγγιση και διορθώνεται η ποσότητα του θειώδη ανυδρίτη. Ακολουθεί η διαύγαση, η σταθεροποίηση, η ήπια χρήση του δρύινου βαρελιού για την ωρίμανση, και η εμφιάλωση (Σουφλερός 2000, Τσέτουρας 2008).

2.1.2. Λευκή οινοποίηση με προζυμωτική κρυοεκχύλιση

Στην τεχνική της προζυμωτικής κρυοεκχύλισης γίνεται εκχύλιση των υδατοδιαλυτών συστατικών του φλοιού των σταφυλιών, πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Τα συστατικά αυτά περνούν στο γλεύκος, το οποίο στη συνέχεια ζυμώνεται. Τα στέμφυλα έρχονται σε επαφή με το γλεύκος και αυτό εμπλουτίζεται με συστατικά που βελτιώνουν το άρωμα, τη γεύση και το σώμα του οίνου. Πάνω από 30 χρόνια διεξάγονται έρευνες πάνω στην προζυμωτική κρυοεκχύλιση για την βελτίωση της ποιότητας των λευκών οίνων. Έχει γίνει μία αναπόσπαστη διεργασία στις λευκές οινοποιήσεις στα περισσότερα οινοποιεία (Hernanz et al. 2007). Η προζυμωτική εκχύλιση εφαρμόζεται σε σταφύλια που προέρχονται από εκλεκτές λευκές ποικιλίες, ώριμα και απόλυτα υγιή, χωρίς παρασιτικές προσβολές. Τα σταφύλια πρέπει να έχουν ωριμάσει κατάλληλα γιατί οι

φλοιοί των μη σωστά ωριμασμένων σταφυλιών προσδίδουν στον οίνο ένα χορτώδη χαρακτήρα, λόγω του μεγάλου ποσού C-6 συστατικών που περιέχουν (Gómez-Míguez et al. 2007). Σημαντική είναι, επίσης, η επίδραση στο αποτέλεσμα της εκχύλισης και δύο εξωτερικών παραγόντων, της διάρκειας και της θερμοκρασίας της προζυμωτικής κρυοεκχύλισης. Για την επιτυχία της, το οινοποιείο πρέπει να διαθέτει ειδικά κατασκευασμένα πνευματικά πιεστήρια κλειστού τύπου ή κατάλληλες μεταλλικές δεξαμενές. Επίσης, οι σωληνώσεις μεταφοράς του σταφυλοπολτού πρέπει να βρίσκονται σε περιβάλλον αδρανούς αερίου, κατά προτίμηση διοξειδίου του άνθρακα (Σουφλερός 2000).

Τα σταφύλια υπόκεινται σε αποβοστρύχωση και ελαφρό σπάσιμο των ραγών, χωρίς πίεση. Ο σταφυλοπολτός μεταφέρεται στο χώρο εκχύλισης και προστίθεται θειώδης ανυδρίτης 5-10 g/hL. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης η θερμοκρασία του σταφυλοπολτού πρέπει να είναι χαμηλή, ώστε να επιβραδυνθεί η έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Ο χρόνος παραμονής του γλεύκους ποικίλει και φτάνει μέχρι και τις 24 ώρες, ανάλογα με την ποικιλία, την ωριμότητα και την υγιεινή κατάσταση των σταφυλιών. Καλή υγιεινή κατάσταση και καλή ωριμότητα επιτρέπουν μεγαλύτερη διάρκεια εκχύλισης. Για το διαχωρισμό του γλεύκους από τα στέμφυλα, ο οποίος γίνεται με το λιγότερο δυνατό αερισμό, τα στέμφυλα μεταφέρονται στο πιεστήριο. Ο πρόρρωγος που αποτελεί το 70% και η πρώτη πίεση συγκεντρώνονται μαζί. Ακολουθεί η στατική απολάσπωση του γλεύκους και συνεχίζονται οι διαδικασίες της κλασικής λευκής οινοποίησης. Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, ακολουθεί η διατήρησή του με τις υπόλοιπες οινολάσπες για χρονικό διάστημα περίπου δύο μηνών. Η διαδικασία συνεχίζεται με τη διαύγαση του οίνου προσθέτοντας μπεντονίτη, τη σταθεροποίηση με ψύξη και την εμφιάλωση (Σουφλερός 2000, Τσέτουρας 2008).

Το γλεύκος και ο οίνος που προκύπτουν από την προζυμωτική εκχύλιση, σε σχέση με αυτά από την κλασική λευκή οινοποίηση, έχουν αρκετές διαφορές. Η ολική οξύτητα του γλεύκους της προζυμωτικής εκχύλισης είναι μικρότερη και το pH μεγαλύτερο. Επίσης, αυξάνεται η συγκέντρωση του καλίου, ιδιαίτερα στις ποικιλίες με χαμηλή οξύτητα (Darias-Martín et al. 2000).Υπάρχει αύξηση των αζωτούχων ενώσεων (αμινοξέα, πρωτεΐνες) και των ουδέτερων πολυσακχαριτών (Gómez-Míguez et al. 2007, Σουφλερός 2000).

Το χρώμα του γλεύκους που προκύπτει μετά από προζυμωτική εκχύλιση είναι στενά συνδεδεμένο με τις συνθήκες πραγματοποίησης της εκχύλισης. Γενικά, παρατηρείται μία αύξηση στην παράμετρο L* (φωτεινότητα) και στην απόχρωση (hue), γεγονός που σημαίνει ότι το γλεύκος είναι πιο ανοιχτό σε χρώμα και λιγότερο καφέ. Επιπλέον, οι τιμές της παραμέτρου a* μειώνονται, το οποίο σημαίνει ότι το γλεύκος χάνει το καφέ του χρώμα. Αυτή η απώλεια του καφέ χρώματος που παρατηρείται στα γλεύκη μετά την προζυμωτική εκχύλιση, μπορεί να οφείλεται στην καθίζηση, λόγω πολυμερισμού, των χρωστικών ουσιών που είναι υπεύθυνες για το χρώμα αυτό. Αντίθετα, για μεγάλης διάρκειας εκχύλιση (πάνω από 12 ώρες) και χαμηλές θερμοκρασίες (έως 10 °C) έχει παρατηρηθεί ότι το καφέτισμα και η ένταση του χρώματος αυξάνονται, αν και το χρώμα του οίνου παραμένει στα αποδεκτά όρια για τους λευκούς οίνους (Gómez-Míguez et al. 2007).

Επίσης, παρατηρείται αύξηση και στην συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων του γλεύκους (Hernanz et al. 2007, Gómez-Míguez et al. 2007). Σημαντική αύξηση παρουσιάζουν κυρίως το καφεϊκό οξύ, αλλά και η κατεχίνη, το *π*-υδροξυβενζοϊκό οξύ, κάποιες υποκατεστημένες μορφές της κερκετίνης, το καφταρικό, το *π*-κουταρικό και το γαλλικό οξύ. Το φερουλικό οξύ έχει χαμηλή διάχυση στο γλεύκος. Το καφεϊκό οξύ θεωρείται ότι είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, το οποίο έχει ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου (Makris et al. 2003). Η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή είναι 7 φορές υψηλότερη στο γλεύκος με προζυμωτική εκχύλιση μεγάλης διάρκειας και χαμηλής θερμοκρασίας, σε σχέση με το γλεύκος χωρίς εκχύλιση. Η σημαντική αυτή διαφορά οφείλεται στο ότι αυτά τα συστατικά βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς των σταφυλιών, και επομένως η εκχύλισή τους είναι εύκολη. Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί ότι το φαινολικό φορτίο του τελικού οίνου μειώνεται κατά τη διάρκεια της μετέπειτα οινοποίησης. Η μείωση αυτή είναι εμφανής στους οίνους μεγάλης διάρκειας εκχύλισης (πάνω από 12 ώρες) και παρατηρείται κυρίως στις φλαβονοειδής φαινόλες. Το ποσοστό της μείωσης αυτής μπορεί να φτάσει το 26% (Gómez-Míguez et al. 2007). Σε άλλη έρευνα που διεξήχθη, αποδείχτηκε ότι η προζυμωτική εκχύλιση σε λευκές ποικιλίες σταφυλιών της Ισπανίας, αποδίδει το υψηλότερο ποσό φαινολικών σε 6 ώρες εκχύλισης στους 10 °C, και μάλιστα το ποσό των φλαβονοειδών του οίνου με αυτή τη προζυμωτική εκχύλιση ήταν 2.6 φορές μεγαλύτερο από αυτό του οίνου που οινοποιήθηκε με τη κλασική μέθοδο (Hernanz et al. 2007).

Η επαφή των φλοιών με το γλεύκος ευνοεί την εκχύλιση πρόδρομων αρωμάτων, που μετατρέπονται σε άρωμα κατά την αλκοολική ζύμωση και διατηρούντα στον οίνο (Selli et al. 2006). Η εκχύλιση των αρωματικών ενώσεων είναι βραδύτερη από εκείνη ορισμένων άλλων συστατικών των φλοιών (κάλιο, φαινολικές ενώσεις), γεγονός που εξηγεί ότι οι πιο μακροχρόνιες εκχυλίσεις δίνουν καλύτερα αποτελέσματα. Ο οίνος που έχει παρασκευασθεί με προζυμωτική εκχύλιση είναι πιο «μεστός» και δίνει δομή πιο πλούσια, σε σχέση με αυτούς που προκύπτουν από την κλασική λευκή οινοποίηση. Τέλος, ευνοείται αισθητά η μηλογαλακτική ζύμωση. Συμπερασματικά, η διατήρηση του οίνου αυτού σε φιάλες είναι συγκριτικά καλύτερη, διότι σημειώνεται βελτίωση της ποιότητας (Σουφλερός 2000).

2.2. Μηλογαλακτική ζύμωση

Μηλογαλακτική ζύμωση είναι η μετατροπή του L-μηλικού οξέος ($C_4H_6O_5$) σε L-γαλακτικό οξύ ($C_3H_6O_3$), από τα γαλακτικά βακτήρια, με σύγχρονη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (αποκαρβοξυλίωση). Συγκεκριμένα, 1g μηλικού οξέος θα δώσει 0.67 g γαλακτικού οξέος και 0.33 g CO_2. Τα γαλακτικά βακτήρια από το σταφύλι περνούν στο γλεύκος, όπου με την παραγωγή της αλκοόλης, ο πληθυσμός τους μειώνεται και επιζούν μόνο τα πιο ανθεκτικά, τα οποία προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, και εφόσον οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, πραγματοποιούν τη μηλογαλακτική ζύμωση.

Από τεχνολογικής πλευράς, η μηλογαλακτική ζύμωση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ολικής οξύτητας (κατά 2-4 g/L εκφρασμένα ως τρυγικό οξύ), την συνεπαγόμενη αύξηση του pH (κατά 0.1-0.2), και τη μικροβιακή σταθερότητα των οίνων, αφού εξαλείφει το μηλικό οξύ, το οποίο θα μπορούσε να είναι ένα πιθανό υπόστρωμα άνθρακα για τους μικροοργανισμούς. Έτσι, εξαφανίζεται το πιο «σκληρό» στη γεύση μηλικό οξύ και παράγεται το πιο «μαλακό» γαλακτικό. Επιπλέον, μέσω αυτής παράγονται αρωματικές ενώσεις από σάκχαρα, τα οποία επιδρούν στο οργανοληπτικό προφίλ των οίνων. Οι αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που θα αποφέρει κάθε φορά η μηλογαλακτική ζύμωση, εξαρτώνται από το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που θα την διεξάγει, τον τύπο του οίνου και τον τρόπο οινοποίησής του, την γεύση και το άρωμά του, καθώς και την παρουσία των πρόδρομων αρωματικών ενώσεων. Η μηλογαλακτική ζύμωση, γενικά, οδηγεί στην αύξηση του χαρακτηριστικού αρώματος του βουτύρου, το μειωμένο χορτώδη χαρακτήρα, τη βελτίωση του φρουτώδη χαρακτήρα και τη μακρότερη επίγευση του οίνου.

Η μηλογαλακτική ζύμωση, ως συνήθως, είναι επιθυμητή στις ψυχρότερες αμπελουργικές περιοχές, όπου τα σταφύλια έχουν υψηλή συγκέντρωση μηλικού οξέος, στους οίνους που παλαιώνουν σε βαρέλια, σε αυτούς που απαιτούν μεγάλης διάρκειας ωρίμανση σε φιάλες (π.χ. Σαμπάνια), ή σε οίνους που απαιτείται ένα συγκεκριμένο οργανοληπτικό προφίλ (π.χ Chardonnay, λευκοί οίνοι Βουργουνδίας και ερυθροί Μπορντώ). Στους λευκούς και ροζέ οίνους άμεσης κατανάλωσης, δεν είναι επιθυμητή, καθώς το μηλικό οξύ που περιέχουν (1-2.5 g/L) διατηρεί τη φρουτώδη γεύση και τη φρεσκάδα του νέου κρασιού.

Μόνο τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων των γενών *Lactobacillus, Leuconostoc, Oenococcus* και *Pediococcus* είναι ανθεκτικά στα χαμηλά pH του οίνου, τις υψηλές συγκεντρώσεις θειώδη ανυδρίτη (50 ppm) και της αιθανόλης. Τα *Pediococcus damnosus, Leuconostoc mesenteroides* και *Oenococcus oeni* επικρατούν κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Παρ' όλα αυτά, προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, η αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση διεξάγεται κυρίως από τα *O. oeni*, που ήταν γνωστά στο παρελθόν ως *Leuconostoc oenos*. Μη ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση, ειδικά σε οίνους με υψηλά pH στις θερμότερες αμπελουργικές περιοχές, όπου η συγκέντρωση του μηλικού οξέος είναι χαμηλή, μπορεί να επιφέρει την αλλοίωσή τους. Μπορεί να προκαλέσει μείωση του χρώματος των ερυθρών οίνων έως και 30%, και παραγωγή βιογενών αμινών.

Ο εμβολιασμός με καθαρές καλλιέργειες μειώνει τον κίνδυνο της αλλοίωσης του οίνου από άλλα γαλακτικά βακτήρια ή και βακτηριοφάγους, διασφαλίζοντας έτσι μία γρήγορη έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, τον καλύτερο έλεγχο του ρυθμού της και της παραγωγής των αρωματικών ενώσεων, καθώς επίσης, μειώνει το κίνδυνο της παραγωγής βιογενών αμινών, που μπορούν να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία. Έχουν αναπτυχθεί πολλά σκευάσματα γαλακτικών βακτηρίων, που κυκλοφορούν στο εμπόριο είτε λυοφιλιωμένα είτε κατεψυγμένα.

Το μηλικό οξύ σε χαμηλά pH μεταβολίζεται με υψηλό ρυθμό, ενώ ο μεταβολισμός των υπολειπόμενων σακχάρων προχωρά πολύ αργά. Η αναμενόμενη αύξηση του pH κατά την μηλογαλακτική ζύμωση, μειώνει την αποικοδόμηση του μηλικού οξέος ενώ αυξάνει την αποικοδόμηση των υδατανθράκων. Μετά την εξαφάνιση του μηλικού οξέος, τα γαλακτικά βακτήρια προσβάλουν το κιτρικό οξύ και σχηματίζουν οξικό οξύ, με αποτέλεσμα την μικρή αύξηση της πτητικής οξύτητας. Μόλις τελειώσει η μηλογαλακτική ζύμωση πρέπει αμέσως να προστεθεί στον οίνο θειώδης ανυδρίτης για την αναστολή της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων, γιατί είναι δυνατόν να προσβάλουν τα υπόλοιπα σάκχαρα (αραβινόζη, ξυλόζη), που δεν ζυμώνονται, τη γλυκερίνη, το τρυγικό και το κιτρικό οξύ και να δημιουργηθούν ασθένειες στον οίνο. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί ο παράλληλος σχηματισμός και άλλων οξέων της αλειφατικής σειράς, όπως είναι το βουτυρικό και το μυρμηκικό οξύ (Bartowsky & Borneman 2011, Bauer & Dicks 2004) .

2.2.1. Βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη μηλογαλακτική ζύμωση

Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης και τη φάση προσαρμογής των γαλακτικών βακτηρίων, και κατ' επέκταση το μέγιστο πληθυσμό των βακτηρίων. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των στελεχών του *O. oeni* είναι περίπου 20 με 25 °C. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των βακτηρίων εξαρτάται από την περιεκτικότητα των οίνων σε αιθανόλη. Από 0-4% (v/v) η βέλτιστη ανάπτυξή τους πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 30 °C, ενώ από 10-14% η κατάλληλη θερμοκρασία είναι 18-25 °C.

Αιθανόλη

Η αιθανόλη επηρεάζει την ανάπτυξη και την μεταβολική ικανότητα των γαλακτικών βακτηρίων. Υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης μειώνουν την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων, ενώ η ανθεκτικότητά τους στην αιθανόλη μειώνεται σε αυξημένες θερμοκρασίες. Ενώ οι αλκοολοπεριεκτικότητες των οίνων (8-12% vol.) δεν παρεμποδίζουν την μηλογαλακτική ζύμωση, ο ρυθμός ανάπτυξης των *O. oeni* μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης, με τα περισσότερα στελέχη να αντέχουν έως τα 14% (v/v). Η ανάπτυξη παρεμποδίζεται ολοκληρωτικά στους οίνους με 10-14% vol. σε θερμοκρασίες άνω των 25 °C. Η βέλτιστη ανάπτυξη (σύντομη φάση προσαρμογής, γρήγορος ρυθμός ανάπτυξης και υψηλή απόδοση κυττάρων) σε τέτοιες συγκεντρώσεις αιθανόλης σημειώνεται στους 18 έως 20 °C. Ακόμη, η ανθεκτικότητα στην αιθανόλη εξαρτάται από το pH του οίνου και το διαθέσιμο άζωτο. Στελέχη των *Lactobacillus* και *Pediococcus* είναι γενικά πιο ανθεκτικά από του *O. oeni*.

pH

Το pH του οίνου παίζει σπουδαίο ρόλο στην επιβίωση και στην ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων, καθώς και στον ρυθμό που αυτά αναπτύσσονται. Όσον αφορά την έναρξη και την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, οίνοι με pH άνω του 3.3 δεν παρουσιάζουν ως συνήθως προβλήματα, ενώ σε χαμηλότερα pH μπορεί να εμφανισθούν. Συνήθως, σε pH μικρότερο του 3.5 επικρατούν στελέχη *O. oeni,* ενώ σε υψηλότερα στελέχη των γενών των *Lactobacillus και Pediococcus*. Όταν το pH του οίνου είναι μικρότερο από 3.5 έχει αποδειχτεί ότι το *O. Oeni* είναι λιγότερο πιθανό να παράξει δυσάρεστες οσμές από ότι αυτόχθονα βακτηριακά στελέχη. Υπερβολικές ποσότητες οξικού οξέος, δυσάρεστες οσμές, ακόμα και βιογενείς αμίνες εμφανίζονται συνήθως όταν αναπτύσσονται τα αυτόχθονα γένη *Pediococcus* και *Lactobacillus* και διεξάγουν τη μηλογαλακτική ζύμωση σε pH μεγαλύτερο από 3.5. Παρόλο που η αποικοδόμηση των σακχάρων και η ανάπτυξη του *O. oeni* παρεμποδίζονται σε χαμηλά pH, η μέγιστη ικανότητα του στη μηλογαλακτική ζύμωση παρατηρείται σε pH 3.5 έως 4.0.

Θειώδης ανυδρίτης

Η θείωση του γλεύκους στην αρχή της οινοποίησης με 50 έως 100 mg/L SO_2 γίνεται με στόχο την παρεμπόδιση της δράσης των γηγενών ζυμών των γενών *Kloeckera* και *Henseniaspora* και των οξικών βακτηρίων. Στο χαμηλό pH των οίνων ο SO_2 επικρατεί στην ελεύθερη μορφή του, κυρίως ως HSO_3^{-1} και λιγότερο ως μοριακός SO_2 και SO_3^{-2}. Ο μοριακός SO_2 είναι η μόνη μορφή που μπορεί να διαπεράσει τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών και των βακτηρίων, να αντιδράσει με τις πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και τους συμπαράγοντες (cofactors) των κυττάρων, και επομένως να επηρεάσει την ανάπτυξή τους. Τα στελέχη του *O. oeni* έχουν ανθεκτικότητα στον θειώδη ανυδρίτη έως και 30 mg/L (Bauer & Dicks 2004).

2.2.2. Η δράση των γαλακτικών βακτηρίων

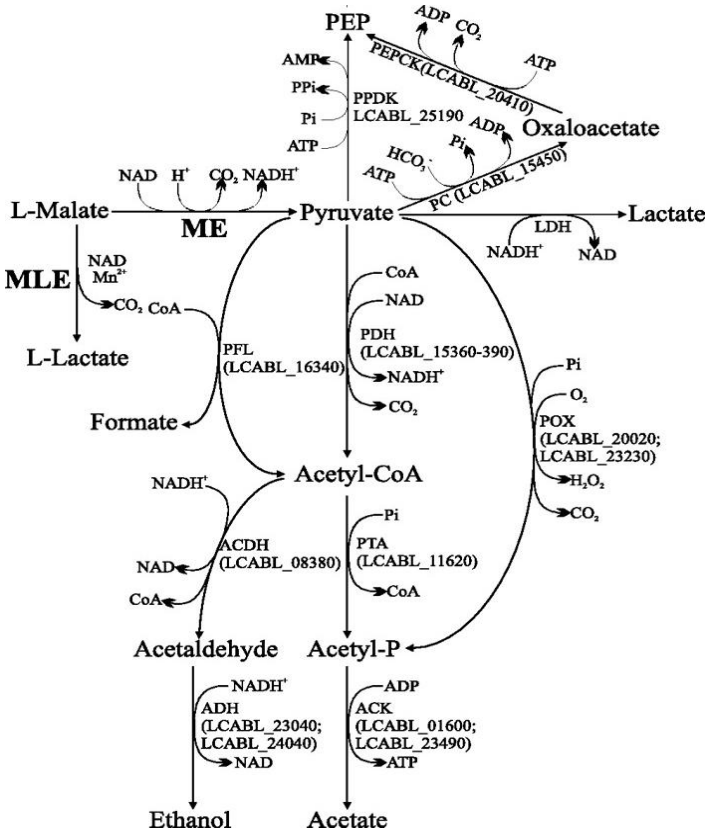
Τα κύρια υποστρώματα για τα γαλακτικά βακτήρια είναι τα οργανικά οξέα, τα σάκχαρα, οι πολυσακχαρίτες και τα αμινοξέα του οίνου. Επίσης, μπορούν να μεταβολίσουν πιο σύνθετα συστατικά, όπως οι φαινολικές και οι αρωματικές ενώσεις που βρίσκονται σε μικρότερη ποσότητα. Διαθέτουν διάφορα ένζυμα, όπως γλυκοσιδάσες, εστεράσες και πρωτεάσες, που βοηθούν στην παραγωγή πτητικών συστατικών πάνω από το κατώφλι αντίληψής τους. Αλλοιωγόνα βακτήρια μπορούν να παράξουν ακρολεΐνη, υψηλά επίπεδα οξικού οξέος βιογενείς αμίνες και ενώσεις με δυσάρεστες οσμές, όπως του γερανίου (Bartowsky & Borneman 2011).

Οι Krienger et al. (2000) έχουν προτείνει 3 στάδια για τον μεταβολισμό του *O. oeni* κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Κατά το πρώτο στάδιο, τα κύτταρα αναπτύσσονται καθώς καταβολίζουν τα σάκχαρα, παράγοντας γαλακτικό και λίγο οξικό οξύ. Σε αυτό το στάδιο δεν καταβολίζονται καθόλου μηλικό και κιτρικό οξύ. Κατά το δεύτερο στάδιο, ο καταβολισμός των σακχάρων

διακόπτεται και ξεκινά ο καταβολισμός του μηλικού οξέος, παράγοντας γαλακτικό οξύ. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο, καταβολίζεται το κιτρικό οξύ, παράγοντας οξικό οξύ.

Μεταβολισμός L-μηλικού οξέος

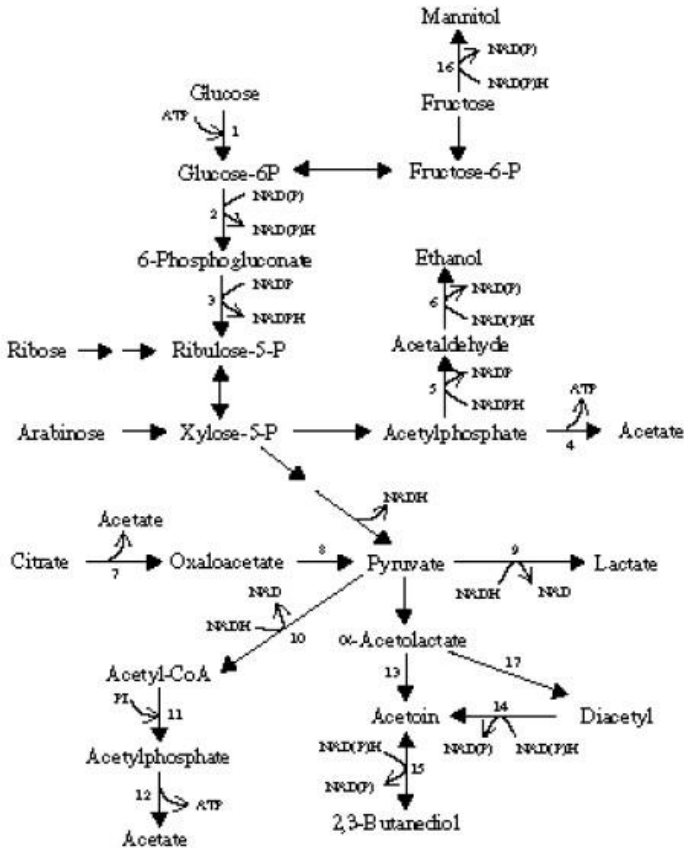
Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος έχουν τρεις πιθανές ενζυμικές οδούς για την μετατροπή του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό οξύ (Εικόνα 4). Μπορούν να μεταβολίσουν το μηλικό οξύ με την απευθείας αποκαρβοξυλίωσή του σε γαλακτικό οξύ μέσω του μηλογαλακτικού ενζύμου (MLE), χωρίς την απελευθέρωση ενδιαμέσων. Επίσης, μπορούν να μετατρέψουν το μηλικό οξύ σε πυροσταφυλικό μέσω του μηλικού ενζύμου (ME), και στη συνέχεια να το ανάξουν σε γαλακτικό οξύ μέσω της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος. Τέλος, μπορούν να ανάξουν το μηλικό οξύ σε οξαλοοξικό οξύ μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος, να το αποκαρβοξυλίωσουν σε πυροσταφυλικό οξύ και στη συνέχεια να το ανάξουν σε γαλακτικό οξύ μέσω της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος (Bauer & Dicks 2004).



Εικόνα 4: Μεταβολισμός L-μηλικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης

Μεταβολισμός σακχάρων

Τα κύρια υπολειμματικά σάκχαρα μετά την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, που μπορεί να έχουν συγκεντρώσεις από 10 g/L έως και λιγότερο από 0.5 g/L, ανάλογα με το είδος του οίνου. Η φρουκτόζη βρίσκεται πάντα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από την γλυκόζη. Αν και το *O. oeni* προτιμά τη γλυκόζη, η φρουκτόζη εμφανίζει μεγαλύτερες αποδόσεις κατά τον μεταβολισμό της και υψηλότερο ποσό βιομάζας. Η φρουκτόζη μπορεί να μεταβολιστεί μέσω της ετεροζυμωτικής οδού, καθώς επίσης μπορεί και να μετατραπεί σε μαννιτόλη μέσω της αφυδρογονάσης της μαννιτόλης. Οι δύο αυτές εξόζες, γλυκόζη και φρουκτόζη, μπορούν να μετατραπούν σε L- και D-γαλακτικό οξύ ή και τα δύο μαζί ανάλογα με το είδος του γαλακτικού βακτηρίου που διεξάγει τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ωστόσο, η ποσότητα του γαλακτικού οξέος που σχηματίζεται από τα σάκχαρα είναι αμελητέα σε σχέση με αυτή που προέρχεται από το μηλικό οξύ. Η αποικοδόμηση των υπολοίπων σακχάρων του οίνου, των πεντοζών ριβόζη και αραβινόζη, που μπορεί να φτάσουν έως και 1.3 g/L, εξαρτάται από την ικανότητα του κάθε στελέχους του *O. oeni*,και μπορεί να αυξήσει την πτητική οξύτητα (Εικόνα 5) (Bauer & Dicks 2004).



Εικόνα 5: Μεταβολισμός σακχάρων από τα γαλακτικά βακτήρια O. oeni κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης

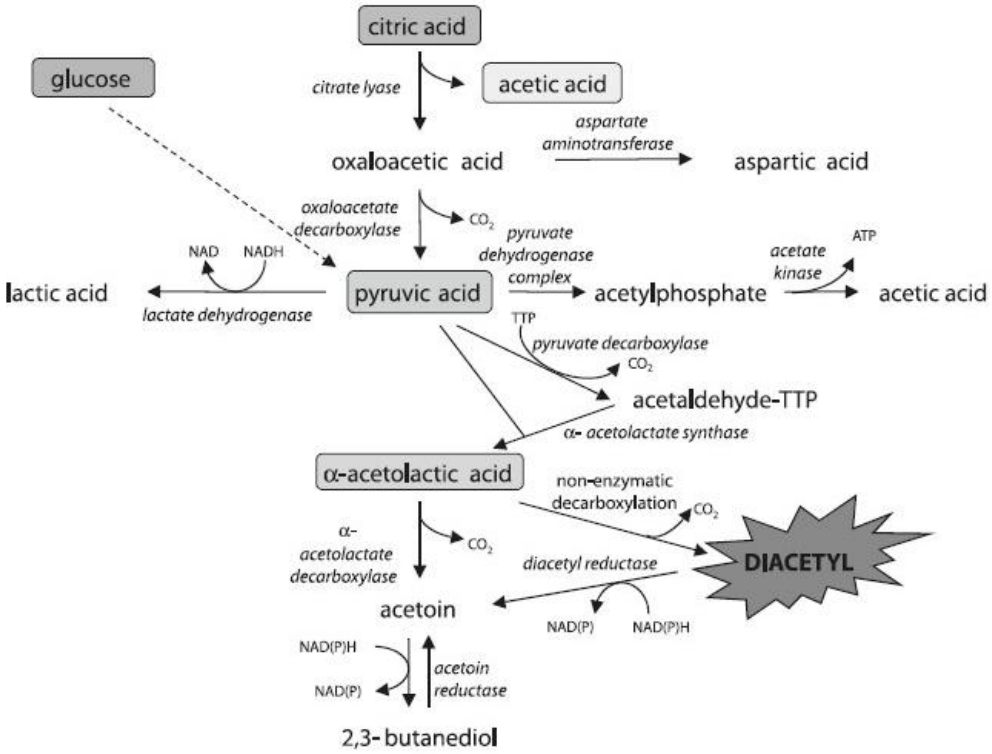
Μεταβολισμός και παραγωγή L-γαλακτικού οξέος

Το L-γαλακτικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί μόνο αερόβια από τα γαλακτικά βακτήρια, και καταλήγει στην αλλοίωση του οίνου. Υψηλές συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος στον οίνο μπορούν να περιορίσουν το ποσό της ενέργειας από την μηλογαλακτική ζύμωση, αφού μειώνει την εξαγωγή του γαλακτικού οξέος από το κύτταρο των γαλακτικών βακτηρίων (Bauer & Dicks 2004).

Μεταβολισμός κιτρικού οξέος και παραγωγή διακετυλίου

Το κιτρικό οξύ είναι ένα σημαντικό συστατικό των οίνων και η συγκέντρωσή του κυμαίνεται από 0.1 έως 0.7 g/L. Κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης ο *O. oeni* καταβολίζει το κιτρικό οξύ (Εικόνα 6) και τα εναπομείναντα σάκχαρα μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Από τον καταβολισμό του κιτρικού οξέος παράγονται αρωματικά και γευστικά συστατικά, όπως το διακετύλιο και η ακετοΐνη.

Η παραγωγή διακετυλίου και ακετοΐνης από τα στελέχη *O. oeni* ενισχύεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις κιτρικού οξέος. Σε μέτρια συγκέντρωση, δηλαδή έως 4 mg /L, το δευτερογενές προϊόν διακετύλιο 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). Συγκεκριμένα, συμβάλει στην πολυπλοκότητα του οίνου για τους λευκούς στα 2-3 mg/L και για τους ερυθρούς περίπου στα 5 mg/L. Μπορεί να βρεθεί και σε συγκεντρώσεις της τάξης των 10 mg/L σε μερικού οίνους (Ribéreau-Gayon et al. 2006a). Όταν βρίσκεται στον οίνο σε συγκεντρώσεις άνω του κατωφλιού αντίληψης, το οποίο ποικίλει από 0.2 mg/L στα Chardonnay έως 2.8 mg/L στα Cabernet Sauvignon (Martineau et al. 1995a), δίνει αρώματα βουτύρου. Το κατώφλι αντίληψης του διακετυλίου στους οίνους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η ποικιλία, το στυλ, η ηλικία του οίνου, καθώς και η παρουσία άλλων ενώσεων, όπως είναι το SO_2. Η μόνη πηγή του διακετυλίου στον οίνο, είναι μία ασταθής ένωση, το α-οξικογαλακτικό οξύ. Σε υψηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής και υψηλές συγκεντρώσεις O_2, σε χαμηλό pH, το οξικογαλακτικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται αυθόρμητα σε διακετύλιο, ενώ σε χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής και χαμηλές συγκεντρώσεις O_2, μετατρέπεται, είτε χημικά είτε από το ένζυμο της αποκαρβοξυλάσης του οξικογαλακτικού οξέος, σε ακετοΐνη.



Εικόνα 6: Μεταβολισμός κιτρικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης

Οι ζύμες παράγουν και αυτές διακετύλιο κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά λόγω των αναγωγικών συνθηκών που επικρατούν στο τέλος της, το περισσότερο διακετύλιο μεταβολίζεται περαιτέρω σε ακετοΐνη και 2,3-βουτανεδιόλη. Η αναγωγή αυτή του διακετυλίου είναι υπέρ των ζυμών, καθώς τα προϊόντα της αναγωγής (ακετοΐνη και 2,3-βουτανεδιόλη) είναι λιγότερο τοξικά από το διακετύλιο, και επίσης, μέσω αυτής, αυξάνονται τα επίπεδα των συνενζύμων NAD και NADP. Το διακετύλιο είναι ένα ασταθές τελικό προϊόν, και όπως και οι υπόλοιπες καρβονυλικές ενώσεις, όπως η ακεταλδεΰδη, ανάγονται περαιτέρω στην αντίστοιχη αλκοόλη (2,3-βουτανεδιόλη) (Bartowsky & Henschke 2004).

Κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, η αποικοδόμηση του κιτρικού οξέος καθυστερεί σε σχέση με την αποικοδόμηση του μηλικού οξέος. Αυτό ίσως οφείλεται στην παρεμποδιστική δράση που ασκεί το μηλικό οξύ στην σύνθεση της περμεάσης του κιτρικού οξέος, που μεταφέρει το κιτρικό οξύ μέσα στο κύτταρο. Όταν ο οίνος εμβολιάζεται με υψηλό πληθυσμό βακτηρίων (10^8 cfu/mL), η κυτταρική ανάπτυξη καταστέλλεται, και το μηλικό και το κιτρικό οξύ καταβολίζονται αμέσως. Όταν ο οίνος εμβολιάζεται με μικρότερο πληθυσμό η αποικοδόμηση του κιτρικού οξέος καθυστερεί σε σχέση με αυτή του μηλικού. Επομένως, σε εμβολιασμούς με χαμηλούς πληθυσμούς, η μέγιστη συγκέντρωση του διακετυλίου συμπίπτει με την εξαφάνιση του L-μηλικού οξέος.

Τα βακτήρια *O. oeni* και οι ζύμες συχνά αποικοδομούν το διακετύλιο σε ακετοΐνη και 2,3-βουτανεδιόλη, τα οποία σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν επηρεάζουν το άρωμα του οίνου. Έτσι, αν

τα αρώματα του βουτύρου υπερισχύουν στον οίνο μετά την αποικοδόμηση του μηλικού οξέος, τότε προτείνεται η καθυστέρηση της προσθήκης θειώδη ανυδρίτη, έως ότου το διακετύλιο να μειωθεί στα επιθυμητά επίπεδα. Ο θειώδης ανυδρίτης ενώνεται με το διακετύλιο και μειώνει τα άρωμα βουτύρου στον οίνο. Όμως κατά την αποθήκευση του οίνου, καθώς ο θειώδης ανυδρίτης μειώνεται, η συγκέντρωση του διακετυλίου θα αυξηθεί πάλι. Οι ποσότητες του διακετυλίου και της ακετοΐνης που παράγονται κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, εξαρτώνται από τη ποσότητα του παραγόμενου πυροσταφυλικού οξέος, το δυναμικό οξειδοαναγωγής και τη μεταβολική ικανότητα των βακτηρίων. Κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού των σακχάρων, το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται σε γαλακτικό οξύ για να διατηρηθεί η ισορροπία του δυναμικού οξειδοαναγωγής του βακτηρίου. Όταν, επιπλέον, το πυροσταφυλικό παράγεται ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος , ενώ δεν υπάρχουν πλέον σάκχαρα, κατευθύνεται στη παραγωγή ακετοΐνης και 2,3-βουτανεδιόλης (Bauer & Dicks 2004).

Συνοπτικά, η ποσότητα του διακετυλίου που θα παραχθεί εξαρτάται από το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που θα την διεξάγει, από τον τύπο του οίνου (στους ερυθρούς παράγεται περισσότερο διακετύλιο σε σχέση με τους λευκούς), από το πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων (εμβολιασμοί χαμηλού πληθυσμού (10^4 cfu/mL) παράγουν περισσότερο διακετύλιο σε σχέση με υψηλότερους (10^6 cfu/mL)), από την παραμονή του οίνου με τις οινολάσπες (μειώνει τη ποσότητα του διακετυλίου), από τον αερισμό του οίνου κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης (αυξάνει την ποσότητα του παραγόμενου διακετυλίου), από την προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (δεσμεύει το διακετύλιο και, επομένως, χάνεται το άρωμά του, ενώ παράλληλα αδρανοποιεί τις ζύμες και τα βακτήρια σταθεροποιώντας το διακετύλιο, αφού δεν μπορούν να το ανάξουν περαιτέρω σε ακετοΐνη και 2,3-βουτανεδιόλη), από τη συγκέντρωση του κιτρικού οξέος (αυξημένη συγκέντρωση συνεπάγεται υψηλότερη παραγωγή διακετυλίου, καθώς και οξικού οξέος), από τη θερμοκρασία που διεξάγεται η μηλογαλακτική ζύμωση (π.χ. στους 18 παράγεται περισσότερο διακετύλιο σε σχέση με τους 25°C), από το pH του οίνου (περισσότερο διακετύλιο σε χαμηλότερα pH), από το δυναμικό οξειδοαναγωγής του οίνου (υψηλότερο δυναμικό, περισσότερο διακετύλιο) και από την συγκέντρωση των υπολειπόμενων σακχάρων (όσο περισσότερα, τόσο λιγότερο διακετύλιο) (Bartowsky & Henschke 2004, Martineau et al. 1995b).

Μεταβολισμός άλλων οργανικών οξέων

Το L-μηλικό και το τρυγικό οξύ (2-10 g/L) είναι τα κυρίαρχα οργανικά οξέα των οίνων. Σε αντίθεση με το μηλικό, το τρυγικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί μόνο αερόβια από τα γαλακτικά βακτήρια, που σημαίνει ότι ο οίνος θα πρέπει να εκτεθεί στον αέρα. Το ηλεκτρικό οξύ (0.2-2 g/L), που παράγεται από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, δεν μεταβολίζεται από τα γαλακτικά βακτήρια, ενώ το οξικό οξύ (0.05-0.2 g/L στους ξηρούς οίνους) παράγεται από την αποικοδόμηση των σακχάρων και του κιτρικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια. Μικρές ποσότητες γλυκονικού οξέος (0.05-1.1 g/L) και πυροσταφυλικού (0.03-0.3 g/L) που υπάρχουν στους οίνους, μπορούν να μεταβολιστούν από τα γαλακτικά βακτήρια προς σχηματισμό γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος και CO_2.

Άλλα οξέα, όπως το φουμαρικό και το σορβικό, βρίσκονται στους οίνους σε σημαντικές ποσότητες μόνο αν προστεθούν μετά την αλκοολική ζύμωση για να αποτρέψουν την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Το φουμαρικό οξύ έχει αντιβακτηριδιακή δράση σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0.4 και 1.5 g/L ανάλογα με το pH. Βέβαια, τα βακτήρια μπορεί να αναιρέσουν την παρεμπόδιση αυτή, μετατρέποντας το φουμαρικό σε μηλικό, μέσω μια αντίδρασης καταλυόμενης από τη φουμαράση. Το σορβικό δρα κατά των βακτηρίων σε συγκεντρώσεις από 150 έως 250 mg/L. Τα *O. oeni* μπορούν να μεταβολίσουν το σορβικό οξύ και να παράξουν ενώσεις με δυσάρεστο άρωμα γερανίου (Bauer & Dicks 2004).

Μεταβολισμός φαινολικών συστατικών

Κάποια φαινολικά συστατικά μπορεί να εμπλακούν στην απελευθέρωση ζυμώσιμων σακχάρων, ή ακόμα μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με το οξυγόνο, μπορούν να μειώσουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του οίνου. Σε υψηλές συγκεντρώσεις τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, κυρίως το p-κουμαρικό και το φερουλικό, δρουν παρεμποδιστικά προς τη δράση των αλλοιωγόνων γαλακτικών βακτηρίων και του *O. oeni*. Κάποια γαλακτικά βακτήρια των *Lactobacillus* spp., σε αντίθεση με τα *O. oeni,* μπορούν να μεταβολίσουν τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, μετατρέποντάς τα σε αιθυλ-φαινόλες και αναιρώντας την παρεμποδιστική τους δράση. Το γαλλικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί από τα *O. oeni* και να προάγει την ανάπτυξή τους και τη δράση τους κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Δύο άλλα φαινολικά οξέα, το προτοκατεχικό και το βανιλικό οξύ, δεν έχουν σημαντική επίδραση στη μηλογαλακτική ζύμωση και δρουν ελάχιστα παρεμποδιστικά. Οι ανθοκυάνες μεταβολίζονται από τα *O. oeni*, χρησιμοποιώντας την ομάδα της γλυκόζης τους ως πηγή ενέργειας. Τέλος, τα φλαβονοειδή κατεχίνη και κερκετίνη προάγουν και αυτά τη μηλογαλακτική ζύμωση (Bauer & Dicks 2004).

Αλλαγές των πτητικών συστατικών που καθορίζουν το άρωμα

Ο οίνος είναι ένα πολυσύνθετο μίγμα συστατικών, τα οποία επηρεάζουν την εμφάνιση, το άρωμα και τη γεύση του. Τα συστατικά αυτά που προέρχονται από το σταφύλι δίνουν τη βασική δομή του οίνου, αλλά τον χαρακτήρα του τον δομούν οι πτητικοί μεταβολίτες που προέρχονται από τον μεταβολισμό των ζυμών και των βακτηρίων. Τα γαλακτικά βακτήρια *O.oeni* έχουν πολλές και διαφορετικές μεταβολικές οδούς και ένζυμα που μπορούν να παράξουν δευτερεύουσες πτητικές ενώσεις σε συγκεντρώσεις πάνω από το κατώφλι αντίληψής τους στους οίνους. Τέτοιες ενώσεις είναι οι αιθυλεστέρες και οι οξικοί εστέρες, οι ανώτερες αλκοόλες, τα καρβονύλια, τα πτητικά λιπαρά οξέα και οι θειούχες ενώσεις. Η συγκέντρωση των επιμέρους παραπάνω ενώσεων που θα παραχθούν κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, εξαρτάται από το στέλεχος που θα την διεξάγει. Για παράδειγμα, κάποια στελέχη του *O. oeni* παράγουν ουδέτερα αρώματα, ενώ άλλα ενισχύουν τον φρουτώδη χαρακτήρα ή τα αρώματα βουτύρου. Γενικά, στη μηλογαλακτική ζύμωση παρατηρείται αύξηση των συγκεντρώσεων των εστέρων (Bartowsky & Borneman 2011, Maicas et al. 1999, Delaquis et al. 2000). Υπάρχουν βέβαια έρευνες που υποστηρίζουν και το αντίθετο (Gambaro et al. 2001, Du Plessis et al. 2002). Οι Maicas et al. (1999) υποστήριξαν ότι η

αύξηση ή η μείωση στη συγκέντρωση των διάφορων εστέρων μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση, εξαρτάται από το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που διεξάγει τη ζύμωση. Αυτό φαίνεται και στην έρευνα των Ugliano & Moio (2005), όπου οι εστέρες των λιπαρών οξέων σε ερυθρό οίνο αυξήθηκαν περισσότερο σε σχέση με τους εστέρες των ανώτερων αλκοολών, μετά την μηλογαλακτική ζύμωση. Σχετικά πρόσφατη έρευνα των Knoll et al. (2011) έδειξε την αύξηση των ολικών εστέρων, σε διαφορετικά pH και συγκεντρώσεις αιθανόλης, σε δύο λευκές ποικιλίες (Riesling και Chardonnay), έως και κατά 4 φορές.

Οι πρόδρομες αρωματικές ενώσεις των οίνων είναι συχνά υπό τη μορφή γλυκοσιδίων και μπορούν να απελευθερωθούν ενζυμικά από τις γλυκοσιδάσες των μικροοργανισμών. Τα *O.oeni* έχουν διάφορες γλυκοσιδάσες που μπορούν να απελευθερώσουν πολλές πτητικές ενώσεις, όπως τα μονοτερπένια, τα νορισοπρενοειδή και τις αλειφατικές ενώσεις, που προσδίδουν αρώματα φρούτων και λουλουδιών (Bartowsky & Borneman 2011).

Επιπλέον, μερικά γαλακτικά βακτήρια μπορούν να μεταβολίσουν την μεθειονίνη προς πτητικές θειούχες ενώσεις κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση των οίνων. Οι ενώσεις αυτές συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα του αρώματος όταν βρίσκονται σε συγκεντρώσεις κοντά στο κατώφλι αντίληψης, ενώ αυξημένες συγκεντρώσεις δίνουν δυσάρεστα αποτελέσματα (Landaud et al. 2008).

Παρεμπόδιση της μηλογαλακτικής ζύμωσης

Διάφοροι τρόποι έχουν προταθεί για την παρεμπόδιση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, μερικοί όμως από αυτούς με μεγάλη επιτυχία. Όπως προαναφέρθηκε, το φουμαρικό οξύ δρα παρεμποδιστικά, αλλά μπορεί να μεταβολιστεί από τις ζύμες τα γαλακτικά βακτήρια. Το δικαρβονικό διμεθύλιο (DMDC) είναι θανατηφόρο ενάντια στις ζύμες και τα βακτήρια, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποστείρωση του οίνου. Το DMDC υδρολύεται σε CO_2 και στην τοξική μεθανόλη. Οι περισσότεροι οινοποιοί χρησιμοποιούν SO_2 για τη παρεμπόδιση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, που όμως επιδρά στον οργανοληπτικό χαρακτήρα των οίνων.

Ενάντια στη φιλοσοφία των χημικών συντηρητικών, έχουν μελετηθεί φυσικά αντιμικροβιακά συστατικά από φυτά (π.χ. φαινολικά), ζώα (π.χ. ένζυμα, όπως η λυσοζύμη) και μικροοργανισμούς (π.χ. βακτηριοσίνες, όπως η πεδιοσίνη PD-1 και η νισίνη). Η λυσοζύμη είναι βακτηριολυτική ενάντια στα περισσότερα θετικά κατά gram βακτήρια, δεν έχει επίδραση στις ζύμες, μπορεί να δράσει στο pH του οίνου και δεν επηρεάζεται από την αιθανόλη (Bauer & Dicks 2004).

2.3. Τα βασικά οργανικά οξέα του οίνου

Τα βασικά οργανικά οξέα των σταφυλιών είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό, ενώ από τη δράση των ζυμών κατά την αλκοολική ζύμωση και τη δράση των βακτηρίων του γλεύκους ή του οίνου παράγονται το ηλεκτρικό, το γαλακτικό και το οξικό οξύ. Τα οξέα αυτά προσφέρουν την όξινη γεύση του οίνου και επιδρούν στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Το οξέα προσφέρουν φρεσκάδα στους οίνους, ακόμη και ξινή γεύση, αν αυτά βρίσκονται σε πολύ υψηλή συγκέντρωση. Το τρυγικό και το μηλικό είναι «σκληρά» οξέα, ενώ το κιτρικό δίνει μία πιο «φρέσκια» γεύση. Το γαλακτικό έχει μία ελαφρά όξινη γεύση, κάπως στιφή και ξινή. Το οξικό είναι το οξύ του ξιδιού και έχει την χαρακτηριστική του γεύση, ενώ το ηλεκτρικό έχει μία έντονη γεύση, πικρή και αλμυρή μαζί, και είναι το οξύ με την περισσότερη γεύση (Peynaud & Blouin 1996, Ribéreau-Gayon et al. 2006b)

Τρυγικό οξύ

Το φυσικό τρυγικό οξύ του οίνου είναι το D-τρυγικό. Το οξύ αυτό θεωρείται το οξύ του σταφυλιού, καθώς, εκτός από το σταφύλι, είναι πολύ λίγο διαδεδομένο στη φύση. Είναι το πιο ισχυρό από τα οξέα του οίνου, γεγονός που επηρεάζει ουσιαστικά την ενεργό οξύτητα (pH), και το πιο ανθεκτικό στις βακτηριακές προσβολές. Αυτός είναι ο λόγος που προστίθεται στον οίνο για την αύξηση της οξύτητάς του, αν είναι απαραίτητη. Συμβαίνει, όμως, μερικές φορές το τρυγικό οξύ να προσβάλλεται από ορισμένα γαλακτικά βακτήρια, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή του να πέφτει στο μηδέν και να αυξάνεται η πτητική οξύτητα. Πρόκειται για την ασθένεια εκτροπίαση ή εκτροπή.

Η περιεκτικότητά του στο ώριμο σταφύλι είναι 7.5 g/L περίπου, ενώ κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, η παραγωγή αλκοόλης μειώνει τη διαλυτότητα του όξινου τρυγικού καλίου, με αποτέλεσμα την καθίζησή του και τη μείωση της οξύτητας στα 2.5-4 g/L τρυγικού οξέος. Ανάλογη πτώση των τρυγικών αλάτων (όξινο τρυγικό κάλιο και ουδέτερο τρυγικό ασβέστιο) γίνεται και με την επίδραση του ψύχους του χειμώνα, και τελικά η ποσότητα του τρυγικού οξέος σταθεροποιείται στον οίνο στα 1.5-4.5 g/L.

Η ξινή του γεύση θεωρείται η πιο τυπική, με την έννοια ότι είναι μία καθαρά ξινή γεύση, απαλλαγμένη από κάθε άλλου είδους γεύση ή οσμή και συγχρόνως στη σκληρότερη μορφή της που ακριβώς οφείλεται στο ότι δεν συμπεριέχει άλλες γεύσεις που θα μαλάκωναν την σκληρότητα του ξινού (Jackson 2008, Ribéreau-Gayon et al. 2006b, Σουφλερός 2000, Τσακίρης 2014) .

Μηλικό οξύ

Το μηλικό οξύ, αντίθετα προς το τρυγικό, είναι πολύ διαδεδομένο στο φυτικό βασίλειο και συναντάται στα φύλλα και στους καρπούς των φυτών. Το φυσικό μηλικό οξύ του οίνου είναι το L-μηλικό. Στα ώριμα σταφύλια η περιεκτικότητά του κυμαίνεται από 2 έως 4 g/L, και

μεταβάλλεται πάρα πολύ ανάλογα με την ποικιλία και τις καιρικές συνθήκες. Είναι πιο ευπαθές από το τρυγικό και προσβάλλεται από τους μικροοργανισμούς (ζύμες και βακτήρια). Κατά τη αλκοολική ζύμωση, όταν αυτή διεξάγεται από τις συνηθισμένες ζύμες, η μεταβολή της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος είναι σχεδόν μηδενική. Υπάρχουν, όμως, μερικές ζύμες, όπως ο *Schizosaccharomyces pombe,* που μετατρέπουν έως και το 1/3 του μηλικού οξέος σε αλκοόλη (μηλοαλκοολική ζύμωση), ταυτόχρονα με τη ζύμωση του σακχάρου. Επίσης, ορισμένα γαλακτικά βακτήρια μετατρέπουν το μηλικό οξύ σε γαλακτικό (μηλογαλακτική ζύμωση).

Βρίσκεται σε πολλά άλλα φρούτα και ως κυρίως συστατικό του μήλου. Πέρα από την καθαρά ξινή γεύση του, που είναι πιο ισχυρή από τα άλλα οξέα του οίνου, εμφανίζει μία πρόσθετη αρωματικότητα που, σε συνδυασμό με τη γεύση, του δίνουν την αίσθηση της ανωριμότητας, του άγουρου, ή ακόμα και χορτώδεις οσμές. Επίσης, προσδίδει μία στυφή αίσθηση στον οίνο.

Κιτρικό οξύ

Το κιτρικό οξύ είναι το χαρακτηριστικό οξύ του λεμονιού και των εσπεριδοειδών. Στο σταφύλι βρίσκεται σε μικρές ποσότητες που δεν ξεπερνούν τα 0.5 g/L. Δεν παράγεται (ή παράγεται σε ίχνη) κατά την αλκοολική ζύμωση. Το κιτρικό οξύ προστατεύει από τα σιδηρικά θολώματα των οίνων, και ενδείκνυται η προσθήκη του για την αύξηση της οξύτητας πριν την εμφιάλωση.

Η ξινή γεύση του κιτρικού οξέος του σταφυλιού, συμβαδίζει με μία αίσθηση φρεσκάδας που τη μεταφέρει στον οίνο. Σε αυτό το οξύ σε συνδυασμό με το άρωμά του, οφείλει την ευχάριστη οξύτητά του το λεμόνι.

Ηλεκτρικό οξύ

Το ηλεκτρικό οξύ παράγεται ως δευτερεύον προϊόν, μέσω του μεταβολισμού των λιπιδίων και του κύκλου του Krebs, μαζί με το φουμαρικό οξύ, κατά την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων. Η συγκέντρωσή του στους οίνους ανέρχεται στα 0.5-1.5 g/L. Είναι πολύ ανθεκτικό στις βακτηριακές προσβολές υπό αναερόβιες συνθήκες και σταθερό στους οίνους

Το ηλεκτρικό οξύ έχει γεύση συγχρόνως ξινή, αλμυρή και πικρή αυξάνοντας την πολυπλοκότητα του οίνου. Λόγω της πικρής και αλμυρής του γεύσης δεν προτιμάται η προσθήκη του στους οίνους για την αύξηση της οξύτητας.

Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ είναι και αυτό ένα από τα οργανικά οξέα που απαντά μόνο στους οίνους και όχι στα γλεύκη, και με τα δύο του ισομερή D(-) και L(+). Έχει τριπλή προέλευση: α) από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση παράγεται κυρίως το D(-) σε ποσότητες 0.1-0.4 g/L, ενώ το L(+) σε ίχνη, β) από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση παράγεται μόνο το L(+) γαλακτικό οξύ έως και 3 g/L, γ) από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη προσβολή των

σακχάρων (εξοζών), της γλυκερίνης και του τρυγικού οξέος, και ανάλογα με το βαθμό της προσβολής η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος μπορεί να φτάσει τα 10 g/L.

Οξικό οξύ

Το οξικό οξύ αποτελεί το 90-95% της πτητικής οξύτητας. Βρίσκεται σε ίχνη και στο γλεύκος, αλλά παράγεται σε μεγάλες ποσότητες μόνο από βακτηριακές προσβολές των οίνων. Παράγεται ως παραπροϊόν μέσω του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, αλλά μπορεί επίσης να σχηματισθεί κατά τη χημική υδρόλυση των ημικυτταρινών κατά την ωρίμανση του οίνου σε δρύινα βαρέλια. Το οξικό οξύ αρχίζει να παράγεται στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, περνά από ένα μέγιστο που συμπίπτει με την κατανάλωσης της μισής σχεδόν ποσότητας των σακχάρων και στη συνέχεια ελαττώνεται, μετατρεπόμενο σε άλλα δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης

Η συγκέντρωσή του αποτελεί κριτήριο για την υγιεινή κατάσταση των οίνων, και πέρα από μία ορισμένη ποσότητα υποβαθμίζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αυτών, δίνοντας μία δυσάρεστη οσμή και γεύση ξιδιού. Σε φυσιολογικές όμως συγκεντρώσεις (0.3 g/L) προσφέρει πολυπλοκότητα στον οίνο. Μέχρι 1 g/L δεν γίνεται απευθείας αντιληπτό ως οξικό οξύ, παρά μόνο χάρη στη σκληράδα και στη δριμύτητα που δίνει στον οίνο. Σε περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 1 g/L γίνεται πια αντιληπτό με το χαρακτηριστικό του άρωμα ξιδιού, ενώ αυξάνει το κάψιμο που προκαλεί στο βάθος του στόματος, μεταξύ απόληξης της γλώσσας και φάρυγγα, στο σημείο που αρχίζει η κατάποση (Ribéreau-Gayon et al. 2006b, Σουφλερός 2000, Τσακίρης 2014).

2.4. Τα πτητικά συστατικά του αρώματος του οίνου

Τα πτητικά συστατικά του αρώματος του οίνου μπορούν να προέρχονται είτε από το σταφύλι (πρωτογενές άρωμα), είτε να δημιουργηθούν κατά την αλκοολική ζύμωση (δευτερογενές άρωμα).

2.4.1. Από το σταφύλι

Τα πτητικά συστατικά που προέρχονται από το σταφύλι ανήκουν σε διάφορες τάξεις χημικών ενώσεων, με σημαντικότερα τα τερπένια (χαρακτηριστικά των μοσχάτων ποικιλιών), τις πυραζίνες (οσμή πράσινης πιπεριάς), τις φαινολικές ενώσεις (άρωμα καπνού, ξύλου ή δέρματος), αλλά και αλκοόλες, όπως η μεθανόλη και η εξανόλη (οσμή χόρτου).

Έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 70 ενώσεις τερπενίων, κυρίως μονοτερπένια (ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα), που μπορεί να είναι υδρογονάνθρακες, αλδεΰδες, αλκοόλες ή ακόμη και εστέρες, αλλά και κάποια σεσκιτερπένια (ενώσεις με 15 άτομα άνθρακα). Γενικά πρόκειται για ενώσεις με έντονο και ευχάριστο χαρακτήρα αρώματος, που έχουν σημαντική οργανοληπτική επίδραση. Σε αυτές αποδίδεται το άρωμα των λουλουδιών. Στις μοσχάτες ποικιλίες συνιστούν τα σημαντικότερα αρωματικά συστατικά, από αυτά που καθορίζουν το άρωμά τους. Εντοπίζονται στην ράγα, κυρίως στον φλοιό, ενώ αυξάνονται κατά την ωρίμανση, για να μειωθούν κατά την υπερωρίμανση.

Πολλές πρόδρομες αρωματικές ενώσεις βρίσκονται υπό την μορφή γλυκοζιτών στο γλεύκος, αλλά μπορούν να απελευθερωθούν, δίνοντας αρωματικές ενώσεις. Έτσι βρίσκονται και διάφορες τερπενικές ενώσεις. Για την απελευθέρωση του πτητικού μορίου θεωρείται αναγκαία η χρήση ενζύμων (β-γλυκοσιδάση) κατά την οινοποίηση. Οι βασικές τερπενικές ενώσεις των αρωματικών ποικιλιών είναι η α-τερπινεόλη, η λιναλοόλη, η γερανιολη, η νερόλη, η σιτρονελόλη, το λιμονένιο, και τα τέσσερα οξείδια (A,B,C,D) της λιναλοόλης, με την σιτρονελόλη και την λιναλοόλη να είναι από τις πιο αρωματικές ενώσεις. Η συνολική συγκέντρωσή τους στον οίνο φτάνει τα 1-3 mg/L. Ένα μέρος τους χάνεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ κατά την παλαίωση οξειδώνονται σε ενώσεις λιγότερο αρωματικές (Σουφλερός 2000, Τσακίρης 2014, Ribéreau-Gayon et al. 2006b, Jackson 2002).

2.4.2. Από την αλκοολική ζύμωση

Τα πτητικά συστατικά που δημιουργούνται κατά την ζύμωση μπορούν να προσφέρουν στην πολυπλοκότητα του αρώματος του οίνου, να υπερκαλύψουν το ποικιλιακό άρωμα ή ακόμη και να του προσδώσουν ελαττωματικές οσμές. Κυρίως σχηματίζονται ανώτερες αλκοόλες και εστέρες που προσδίδουν φρουτώδη χαρακτήρα και αρώματα λουλουδιών, πτητικά οξέα (αρώματα τυριού, φυτικές οσμές), θειούχες ενώσεις (οσμή κλουβιού αυγού) και πτητικές φαινόλες (άρωμα γαρίφαλο) (Τσακίρης 2014).

Ανώτερες αλκοόλες

Οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται από τα σάκχαρα κατά την αλκοολική ζύμωση, τα οποία στην συνέχεια αποκαρβοξυλιώνονται και ανάγονται προς αλκοόλες. Σχηματίζονται επίσης από αμινοξέα , μετά από απαμίνωση και αποκαρβοξυλίωση. Στον οίνο βρίσκονται η προπανόλη-1, η προπανόλη-2, η βουτανόλη-1, η βουτανόλη-2 και η ισοβουτανόλη, που έχουν οσμή παρόμοια με αυτή της αιθανόλης. Η 2-μέθυλο-1-βουτανόλη υπάρχει σε συγκεντρώσεις 15-150 mg/L και η 3-μέθυλο-1-βουτανόλη (ισοαμυλική αλκοόλη) σε συγκεντρώσεις από 30-500 mg/L. Και οι δύο αυτές αλκοόλες έχουν χαρακτηριστική, αρκετά δριμεία οσμή, και ονομάζονται αμυλικές αλκοόλες. Στους οίνους βρίσκονται, επίσης, η εξανόλη, η επτανόλη, η οκτανόλη και η δεκανόλη. Η φαίνυλο-2-αιθανόλη έχει άρωμα τριαντάφυλλου και συγκεντρώσεις 10-80 mg/L. Η τυροσόλη έχει άρωμα μελιού. Η 2,3-βουτανοδιόλη σχηματίζεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ως δευτερεύον προϊόν, όπως και η ακετοΐνη. Η γλυκερόλη βρίσκεται σε συγκεντρώσεις 5-20 g/L και σχηματίζεται κυρίως στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης (Τσακίρης 2014).

Γενικά, παράγοντες που αυξάνουν τον ρυθμό ζύμωσης, όπως οξυγόνωση του γλεύκους, υψηλές θερμοκρασίες και παρουσία στερεών σωματιδίων, αυξάνουν και τον σχηματισμό ανώτερων αλκοολών. Ο σχηματισμός τους εξαρτάται από τις συνθήκες τις ζύμωσης και, κυρίως, από το στέλεχος της ζύμης που διεξάγει την αλκοολική ζύμωση (Ribéreau-Gayon et al. 2006b).

Εστέρες

Οι εστέρες δημιουργούνται είτε με ενζυμική εστεροποιήση, κατά την αλκοολική ζύμωση, είτε με χημική εστεροποίηση, κατά την παλαίωση του οίνου. Πολλοί λίγοι εστέρες υπάρχουν στα σταφύλια. Παρέχουν ευχάριστο φρουτώδη χαράχτηκα στους οίνους, εκτός από τον οξικό αιθυλεστέρα που σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει οσμή διαλύτη.

Μία ομάδα αποτελούν οι εστέρες των λιπαρών οξέων με αιθανόλη που παράγονται από τις ζύμες υπό αναερόβιες συνθήκες. Τέτοιοι είναι, ο προπανοϊκός αιθυλεστέρας και ο βουτανοϊκός αιθυλεστέρας. Ο εξανοϊκός (καπροϊκός), οκτανοϊκός (καπριλικός), ο δεκανοϊκός και ο δωδεκανοϊκός (λαυρικός) αιθυλεστέρας προσδίδουν φρουτώδη αρώματα στους οίνους, ακόμη και μελιού ή κεριού. Γενικά, η συγκέντρωση των εστέρων αυξάνεται κατά την παλαίωση του οίνου, σε αντίθεση με την συγκέντρωση των εστέρων των λιπαρών οξέων που υδρολύονται. Καθώς το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας αυξάνεται, τα αρώματα των εστέρων από φρουτώδη μετατρέπονται σε αρώματα σαπουνώδη, και τέλος σε λιπαρά (εστέρες με 16 και 18 άτομα άνθρακα). Η παρουσία εστέρων όπως ο οξικός εξυλεστέρας, και ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας αναφέρονται ως δείκτες για την ποιότητα των ερυθρών οίνων.

Μια άλλη ομάδα αποτελούν οι εστέρες των ανώτερων αλκοολών με το οξικό οξύ, όπως ο οξικός ισοαμυλεστέρας, που έχει χαρακτηριστικό άρωμα μπανάνας, και βρίσκεται σε συγκεντρώσεις 0.2-6 mg/L. Επίσης, υπάρχουν στον οίνο ο οξικός εξυλεστέρας, ο οξικός επτυλεστέρας, ο οξικός οκτυλεστέρας και ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας, που μπορούν να έχουν αρώματα φρούτων και μήλου. Ο σχηματισμός τους ενισχύεται στους αργούς ρυθμούς ζύμωσης και την απουσία στερεών αιωρημάτων κατά την αλκοολική ζύμωση, ενώ παρεμποδίζεται στην παρουσία οξυγόνου, πολύ χαμηλών θερμοκρασιών και αυστηρά απολασπωμένων γλευκών. Η παραμονή του οίνου με τις οινολάσπες ευνοεί την αύξηση της περιεκτικότητας σε εστέρες αλλά και σε ανώτερες αλκοόλες (Σουφλερός 2000, Τσακίρης 2014, Ribéreau-Gayon et al. 2006b, Jackson 2002).

3. Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οργανοληπτικός έλεγχος ή αλλιώς γευσιγνωσία αποκαλύπτει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών των οίνων, κάτι που δεν μπορεί να κάνει ακόμη η ενόργανη ανάλυση. Κατά τη διάρκειά του, ο χαρακτήρας του οίνου έρχεται σε επαφή με τις αισθήσεις του δοκιμαστή (όραση, όσφρηση, γεύση). Οι παράγοντες που διαμορφώνουν τον χαρακτήρα ενός οίνου ποικίλλουν και μπορεί να συμπεριλαμβάνουν τις ποικιλίες των σταφυλιών, το κλίμα της περιοχής, το χρόνο του τρύγου, τη τεχνική της οινοποίησης, τον τρόπο συντήρησής του κ.α..

Όραση

Η όραση πληροφορεί για το χρώμα (ένταση και απόχρωση), τη διαύγεια, την αδράνεια, τη ρευστότητα και την έκλυση διοξειδίου του άνθρακα. Είναι η πρώτη εκτίμηση, κατά την γευσιγνωσία, η οποία επιδρά στα επόμενα στάδια. Για παράδειγμα, η ένταση του χρώματος ενός ερυθρού οίνου μας επιτρέπει να προδικάσουμε το σώμα και τον όγκο του, η απόχρωσή του την ηλικία του, και σε ένα λευκό οίνο την κατάσταση της οξείδωσής τους.

Όσφρηση

Η όσφρηση εξυπηρετείται από μία ζώνη περιορισμένης επιφάνειας, που βρίσκεται στο πάνω μέρος της ρινικής κοιλότητας και αποτελεί το κέντρο της όσφρησης. Μια ουσία για να έχει οσμή πρέπει να είναι πτητική και να βρίσκεται σε συγκέντρωση ανώτερη του κατωφλιού αντίληψης. Ο δοκιμαστής μυρίζει τον οίνο πριν καν τον γευτεί, και γι' αυτό, χρησιμοποιεί την απευθείας γραμμή όσφρησης που συνδέει το εξωτερικό περιβάλλον με το κέντρο της όσφρησης μέσω της μύτης (ρινική όσφρηση). Η ανακίνηση του οίνου μέσα στο ποτήρι της δοκιμασίας βοηθά στην αύξηση της έντασης αλλά και στην απελευθέρωση νέων αρωμάτων. Επίσης, ο οίνος απελευθερώνει αρώματα κατά την γευστική δοκιμή του, μέσω της έμμεσης γραμμής όσφρησης (άρωμα του στόματος).

Εικόνα 7: Οργανοληπτικός έλεγχος: όραση, όσφρηση, γεύση

Γεύση

Με τον όρο γεύση εννοείται η αίσθηση του στόματος που αναφέρεται στις 4 στοιχειώδεις γεύσεις: γλυκιά, αλμυρή, ξινή και πικρή. Το υπόλοιπο της στοματικής αίσθησης είναι κυρίως η αίσθηση της αφής, που μας δίνει πληροφορίες για το ιξώδες, τη λιπαρότητα, τον όγκο και τη θερμοκρασία, και η αίσθηση της στυφάδας. Επίσης, γίνεται αντιληπτό το «κάψιμο» της αιθανόλης, το οποίο οφείλεται στην ικανότητα της αιθανόλης να απορροφά το νερό των κυττάρων. Η αίσθηση της γεύσης επιτελείται με τη βοήθεια των θηλών (καλύκων) που βρίσκονται στην επιφάνεια της γλώσσας. Κάθε θηλή της γλώσσας περιέχει γευστικά κύτταρα. Το κεντρικό τμήμα της γλώσσας έχει μικρή πυκνότητα θηλών και άρα δεν έχει ιδιαίτερη ευαισθησία στις γεύσεις. Το μπροστινό μέρος της γλώσσας είναι πιο ευαίσθητο στη γλυκιά γεύση, τα πλάγια στην αλμυρή και ξινή και το πίσω μέρος της στην πικρή γεύση. Το πικρό γίνεται περισσότερο αντιληπτό αφού εξέλθει ο οίνος από το στόμα του δοκιμαστή. Η ξινή γεύση γίνεται αντιληπτή και στο εσωτερικό από τα μάγουλα.

Αλληλεπίδραση γεύσεων

Οι διάφορες γεύσεις του οίνου αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους. Η γλυκιά γεύση μεταβάλλει ελάχιστα τη ξινή γεύση, ενώ αντίθετα η ξινή γεύση ελαττώνει έντονα τη γλυκιά. Η αιθανόλη ελαττώνει τη ξινή γεύση. Επιπλέον, γίνεται αισθητή και μία αίσθηση σκληράδας που οφείλεται στο ότι η ξινή γεύση αυξάνει την αίσθηση του καψίματος που προκαλεί η αιθανόλη. Η γλυκιά γεύση εξουδετερώνει την πικρή, χωρίς όμως να καταφέρνει να την σκεπάσει τελείως. Η αιθανόλη σκεπάζει τη στυφή γεύση των τανινών, ελαττώνει την πικρή και αυξάνει τη γλυκιά. Η ξινή γεύση αυξάνει την πικρή, καθώς και η πικρή γεύση αυξάνει τη ξινή (Τσακίρης 2014).

Τρόπος δοκιμής

Τα ποτήρια της γευσιγνωσίας πρέπει να είναι μεταξύ τους πανομοιότυπα, καθαρά και σε σχήμα τουλίπας. Πρέπει να γεμίζονται με την ίδια ποσότητα οίνου (περίπου μεταξύ του 1/4 και του 1/3 του ποτηριού). Στο πρώτο στάδιο ελέγχεται η εμφάνισή του. Το κάθε ποτήρι φέρεται σε γωνία 30° έως 45° και παρατηρείται πάνω σε ένα φωτεινό, λευκό φόντο. Έτσι παρατηρούνται και καταγράφονται η διαύγεια, η ένταση και η απόχρωσης, καθώς και το ιξώδες του οίνου.

Στο δεύτερο στάδιο ακολουθεί η οσφρητική εξέταση του οίνου. Πριν γίνει η ανάδευση του οίνου μέσα στο ποτήρι, ο εξεταστής καταγράφει τα αρώματα που ανιχνεύει. Στη συνέχεια, αναδεύει τον οίνο περιστροφικά, βοηθώντας τον να απελευθερώσει τα αρώματά του, μυρίζει και καταγράφει την ένταση και τα αρώματα που βρίσκει.

Στο τρίτο στάδιο εξετάζεται η αίσθηση του οίνου στο στόμα, το άρωμα και η επίγευση. Ο δοκιμαστής εισάγει μικρή ποσότητα οίνου, 6 έως 10 mL, στο στόμα και την κρατάει για 15 με 30 δευτερόλεπτα. Ο οίνος κινείται μέσα στο στόμα για να καλυφθούν όλες οι επιφάνειες, όπως η γλώσσα, τα μάγουλα και ο ουρανίσκος. Ο δοκιμαστή πρέπει να σημειώνει για τις διάφορες γεύσεις (γλυκιά, ξινή, πικρή) που τις αντιλαμβάνεται, πότε τις ανίχνευσε για πρώτη φορά, πόση ώρα διαρκούν και πως αλλάζει η αίσθηση και η ένταση σε συνάρτηση με το χρόνο. Επίσης, ελέγχει την αφή του οίνου, δηλαδή τη στυπτικότητα, το σώμα, τη θερμοκρασία και το κάψιμο. Στη συνέχεια, ο δοκιμαστής εισάγει αέρα στο στόμα του, που θα τον βοηθήσει να καταλάβει τα αρώματα του οίνου στο στόμα και την έντασή τους. Έπειτα, ο οίνος αποβάλλεται από τη στοματική κοιλότητα και ελέγχονται οι οσφρητικές και οι γευστικές αισθήσεις που παραμένουν στο στόμα, ο χαρακτήρας και η διάρκειά τους (Jackson 2002).

4. Υλικά και μέθοδοι

4.1. Διαδικασίες μικροοινοποιήσεων και σχεδιασμός πειραμάτων

Για τη διεξαγωγή των πειραματικών μικροοινοποιήσεων, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Οινολογίας (τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών), ελήφθησαν περίπου 80 kg νωπά σταφύλια της ποικιλίας Μοσχοφίλερο, τα οποία προήλθαν από την περιοχή της Μαντινείας (Γκορτσούλι Μαντινείας, Αρκαδία). Αφού τα σταφύλια ψύχθηκαν στους 5 °C, η διαδικασία ξεκίνησε με την εισαγωγή των σταφυλιών στον σπαστήρα για την έκθλιψη των ραγών τους και συνέχισε με τη χειρωνακτική αποβοστρύχωσή τους. Ο σταφυλοπολτός που προέκυψε μεταφέρθηκε σε ψυχόμενη δεξαμενή, όπου πραγματοποιήθηκε προζυμωτική κρυοεκχύλιση περίπου 15 ωρών σε χαμηλή θερμοκρασία. Στη δεξαμενή αυτή προστέθηκαν ένζυμα εκχύλισης Safizym Color plus (4 g/hL), ενώ δεν πραγματοποιήθηκε προσθήκη θειώδους ανυδρίτη. Έπειτα, ο σταφυλοπολτός πιέστηκε σε υδροπρέσσα και παρελήφθησαν περίπου 60 L γλεύκους. Το γλεύκος μεταφέρθηκε στη δεξαμενή καθίζησης, με σταδιακή προσθήκη ενζύμων απολάσπωσης Safizym Clean (3 g/hL), και μετά από 6 περίπου ώρες διαχωρίστηκαν 48 L υπερκείμενου καθαρού γλεύκους .

Το γλεύκος αυτό, σύμφωνα με τις αρχικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, είχε ογκομετρούμενη οξύτητα ίση με 7.3 g/L (εκφρασμένη ως τρυγικό οξύ), pH 3.3 και περιεκτικότητα σακχάρων 18.6 °Brix. Στη συνέχεια, το γλεύκος χωρίστηκε σε 4 δοχεία (12 L το καθένα), και πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με εμπορικές ζύμες (30 g/hL). Τα δύο πρώτα εμβολιάστηκαν με τη ζύμη VIVACE (Renaissance Yeast, Canada), και τα άλλα δύο με τη UCLM S325 (Fermentis, France). Η αλκοολική ζύμωση ήταν ελεγχόμενη στους 20 °C. Την επόμενη μέρα (ημέρα 1^{η}) προστέθηκαν στα δοχεία γλουταθειόνη Springarom (20 g/hL) και οργανικό άζωτο Springferm (30 g/hL). Τη 2^{η} ημέρα προστέθηκε ανόργανο άζωτο DAP (30 g/hL). Την 7^{η} πραγματοποιήθηκε προσθήκη φυτοπρωτεϊνών Pro Natur (Dolmar, Spain) (φυτοπρωτεΐνες) (50 g/hL). Την 9^{η} ημέρα η αλκοολική ζύμωση έφτασε στο τέλος της και, αφού μετρήθηκε το μηλικό οξύ των 4 οίνων με ανακλασίμετρο RQflex (Merck, Germany) έγινε η προσθήκη των γαλακτικών βακτηρίων ώστε να πραγματοποιηθεί η μηλογαλακτική ζύμωση. Η κάθε επιμέρους μικροοινοποίηση (VIV1, VIV2, UCLM1, UCLM2) χωρίστηκε σε 4 ίσα μέρη και έγινε προσθήκη 3 διαφορετικών στελεχών εμπορικών γαλακτικών βακτηρίων, ενώ κρατήθηκαν και δείγματα χωρίς προσθήκη (μάρτυρες). Τα εμπορικά σκευάσματα που προστέθηκαν ήταν τα Viniflora Oenos (3 g/hL), Viniflora Cine (3 g/hL) και Viniflora CH16 (3 g/hL) (Chr. Hansen, Denmark). Κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης η συγκέντρωση του μηλικού οξέος ελεγχόταν με ανακλασίμετρο RQflex, ενώ την 14^{η} ημέρα προσδιορίστηκε το τέλος των 12 αυτών μηλογαλακτικών ζυμώσεων, αφού η συγκέντρωση του μηλικού οξέος πήρε μηδενική τιμή.

Οι 4 οίνοι μάρτυρες (VIV1s, VIV2s, UCLM1s, UCLM2s) που δεν πραγματοποίησαν μηλογαλακτική ζύμωση, φιλτραρίστηκαν και εμφιαλώθηκαν μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης με προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (8 g/hL potassium metabisulfite). Οι 12 οίνοι με

μηλογαλακτική ζύμωση (VIV1oen, VIV1cine, VIV1CH16, VIV2oen, VIV2cine, VIV2CH16, UCLM1oen, UCLM1cine, UCLM1CH16, UCLM2oen, UCLM2cine, UCLM2CH16) φιλτραρίστηκαν και εμφιαλώθηκαν μετά το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης με προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (8 g/hL potassium metabisulfite). Στον Πίνακα 4 φαίνονται συγκεντρωμένες οι επιμέρους οινοποιήσεις.

Πίνακας 4: Οι διαφορετικές μικροοινοποιήσεις, οι ζύμες και τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν

Συντομογραφία μικροοινοποίησης	**Ζύμη**	**Γαλακτικό Βακτήριο**
VIV1s VIV2s	VIVACE	-
VIV1oen VIV2oen		Oenos
VIV1cine VIV2cine		Cine
VIV1ch16 VIV2ch16		CH16
UCLM1s UCLM2s	UCLM S325	-
UCLM1oen UCLM2oen		Oenos
UCLM1cine UCLM2cine		Cine
UCLM1ch16 UCLM2ch16		CH16

4.2. Εμπορικά σκευάσματα ζυμομυκήτων

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά στελέχη ζυμομυκήτων η VIVACE (Renaissance Yeast, Canada) και η UCLM S325 (Fermentis, France).

Το σκεύασμα VIVACE είναι ένα στέλεχος της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae bayanus* με υψηλή ανθεκτικότητα στην αλκοόλη, έως και στα 16% vol. Προτείνεται για λευκούς και λευκούς αφρώδεις οίνους. Διαθέτει εξαιρετική ικανότητα ζύμωσης από τους 13 έως τους 30 °C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάμεσα στους 15-18 °C. Έχει πολύ χαμηλή παραγωγή SO_2 και μηδενική παραγωγή υδρόθειου. Μπορεί να καταναλώσει το 30% του μηλικού οξέος του γλεύκους και να παράξει έως και 9.5 g/L γλυκερόλη, γεγονός που την καθιστά μία καλή επιλογή για τους φρέσκους φρουτώδεις λευκούς οίνους των ψυχρότερων αμπελουργικών περιοχών. Παρέχει μέτριο σώμα, ισορροπημένη επίγευση εσπεριδοειδών και αρώματα κόκκινου μήλου, αχλαδιού, εσπεριδοειδών και μελιού (*www.renaissanceyeast.com*).

Το σκεύασμα UCLM S325 είναι ένα στέλεχος της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* με ανθεκτικότητα στην αλκοόλη, έως και 13% vol. Προτείνεται για λευκούς και ροζέ οίνους. Διαθέτει εξαιρετική ικανότητα ζύμωσης σε απολασπωμένα γλεύκη από τους 12 έως τους 35 °C. Έχει πολύ χαμηλή παραγωγή SO_2, πτητικής οξύτητας και ακεταλδεΰδης (λιγότερο από 24 mg/L) και μηδενική παραγωγή υδρόθειου. Μπορεί να παράξει έως και 10 g/L γλυκερόλη, ενώ η συμπληρωματική δράση της β-γλυκοσιδάσης αυξάνει το αρωματικό δυναμικό των ποικιλιών που διαθέτουν τερπένια, όπως το Μοσχοφίλερο (*www.fermentis.com*).

4.3. Εμπορικά σκευάσματα γαλακτικών βακτηρίων

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά στελέχη εμπορικών γαλακτικών βακτηρίων Oenococcus Oeni, τα Viniflora Oenos, Viniflora Cine και Viniflora CH16 (Chr. Hansen, Denmark).

Το Viniflora Oenos είναι το πρώτο σκεύασμα που ανέπτυξε η εταιρία για την απευθείας προσθήκη του στον οίνο, χωρίς να απαιτείται ενυδάτωση ή ενεργοποίηση. Παρέχει μία γρήγορη και ασφαλή μηλογαλακτική ζύμωση στους οίνους, με μέτρια παραγωγή διακετυλίου, χαμηλή πτητική οξύτητα και μηδενική παραγωγή βιογενών αμινών. Ο εμβολιασμός με αυτό το βακτήριο μπορεί να γίνει πριν, κατά τη διάρκεια ή και μετά την αλκοολική ζύμωση. Η θερμοκρασία που συνιστάται είναι μεταξύ 17 και 25 °C σε pH μεγαλύτερο από 3.3. Έχει ανθεκτικότητα στον θειώδη ανυδρίτη, που προστίθεται πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, έως 40 ppm ολικού SO_2 για λευκούς και έως 70 ppm για ερυθρούς οίνους, και στην παραγόμενη αιθανόλη έως και 14 % vol.

Το Viniflora Cine έχει τα παραπάνω χαρακτηριστικά του Viniflora Oenos, προσφέροντας και αυτό μία γρήγορη και ασφαλή μηλογαλακτική ζύμωση. Η διαφορά τους είναι ότι το Cine δεν αποικοδομεί το κιτρικό οξύ σε οξικό οξύ, διακετύλιο και 2,3-βουτανεδιόλη. Χρησιμοποιείται κυρίως για λευκούς και ροζέ φρουτώδεις οίνους, διατηρεί το αρωματικό τους προφίλ, δεν εμφανίζει αρώματα βουτύρου και δίνει σώμα και δομή. Η θερμοκρασία που συνιστάται είναι μεταξύ 17 και 25 °C σε pH μεγαλύτερο από 3.2. Έχει ανθεκτικότητα στον θειώδη ανυδρίτη, που προστίθεται πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, έως 30 ppm ολικού SO_2 και στην παραγόμενη αιθανόλη έως και 14 % vol.

Το Viniflora CH16 υπερέχει των δύο άλλων γαλακτικών βακτηρίων για την υψηλή αντοχή του στην παραγόμενη αιθανόλη έως και 16% vol. Παράγει και αυτό μέτρια ποσότητα διακετυλίου. Λειτουργεί αποτελεσματικά με μία μεγάλη ποικιλία στελεχών ζυμομυκήτων Saccharomyces cerevisiae κατά τον συνεμβολιασμό. Η θερμοκρασία που συνιστάται είναι μεταξύ 17 και 25 °C σε pH μεγαλύτερο από 3.4. Έχει ανθεκτικότητα στον θειώδη ανυδρίτη, που προστίθεται πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, έως 40 ppm ολικού SO_2 και στην παραγόμενη αιθανόλη έως και 16 % vol. (*www.chr-hansen.com).*

4.4. Αναλυτικές μέθοδοι

Στην παρούσα εργασία διεξήχθησαν οι βασικές αναλύσεις του οίνου και μετρήθηκαν το μηλικό οξύ, τα οργανικά οξέα, τα αρωματικά συστατικά και το διακετύλιο, όπως θα περιγραφούν παρακάτω. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ο οργανοληπτικός έλεγχος των παραγόμενων οίνων. Όλα τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά μέσω του προγράμματος STATISTICA v.8, με one-way ANOVA και δοκιμή Tuckey HSD.

4.4.1. Βασικές αναλύσεις οίνου

Οι βασικές αναλύσεις του οίνου που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις επίσημες ευρωπαϊκές μεθόδους (OIV 2012) ήταν :

- Μέτρηση της ογκομετρούμενης οξύτητας
- Μέτρηση της ενεργούς οξύτητας (pH)
- Μέτρηση ελεύθερου και ολικού θειώδους ανυδρίτη
- Μέτρηση Δείκτη Φαινολικών Ουσιών
- Μέτρηση Αναγόντων Σακχάρων

4.4.2. Μέτρηση μηλικού οξέος με ανακλασίμετρο RQflex

Το ανακλασίμετρο που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του μηλικού οξέος ήταν το RQflex (Merck, Darmstadt, Germany). Αρχικά, βαθμονομήθηκε με την ταινία-barcode που περιείχε η συσκευασία του, και στη συνέχεια αφού βυθίζονταν τα strips μέσα στον οίνο για μερικά δευτερόλεπτα, εισέρχονταν στην ειδική υποδοχή της συσκευής, ώστε να εμφανισθεί στην οθόνη η συγκέντρωση του μηλικού οξέος. Το βιολογικά αποικοδομούμενο strip πολυεστέρα που περιείχε ελάχιστες ποσότητες σε αντιδραστήρια πάνω στις χάρτινες ζώνες, δεν απαιτούσε καμία ειδική διαχείριση (*www.enochimiki.gr*).

4.4.3. Μέτρηση οξέων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)

Οι μετρήσεις των βασικών οργανικών οξέων των οίνων (κιτρικό, τρυγικό, μηλικό, γαλακτικό, ηλεκτρικό και οξικό οξύ) πραγματοποιήθηκαν στον αναλυτή Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης 2695 Separations Module (Waters, U.S.A.) με χρωματογραφική στήλη Rezex™

ROA-Organic Acid H+ (8%), LC Column 300 x 7.8 mm, Ea (Phenomenex, U.S.A.), σε σύνδεση με συστοιχία φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD). Οι κορυφές των οξέων εμφανίζονταν στα 210 nm, ενώ ο διαλύτης ήταν H_2SO_4 10mM με ροή 0.5 mL/min (σταθερή) και ο όγκος της κάθε ένεσης ίσος με 20 μL. Η θερμοκρασία του φούρνου διατηρούταν σταθερή στους 40 °C, για 30 min που διαρκούσε η κάθε ανάλυση. Ο κάθε οίνος προς ανάλυση φιλτραριζόταν με φίλτρο μεμβράνης PVDF 0.2 μm, και η κάθε ανάλυση διεξαγόταν εις διπλούν από τον αυτόματο δειγματολήπτη.

4.4.4. Ποσοτικός προσδιορισμός αρωματικού δυναμικού με GC-FID

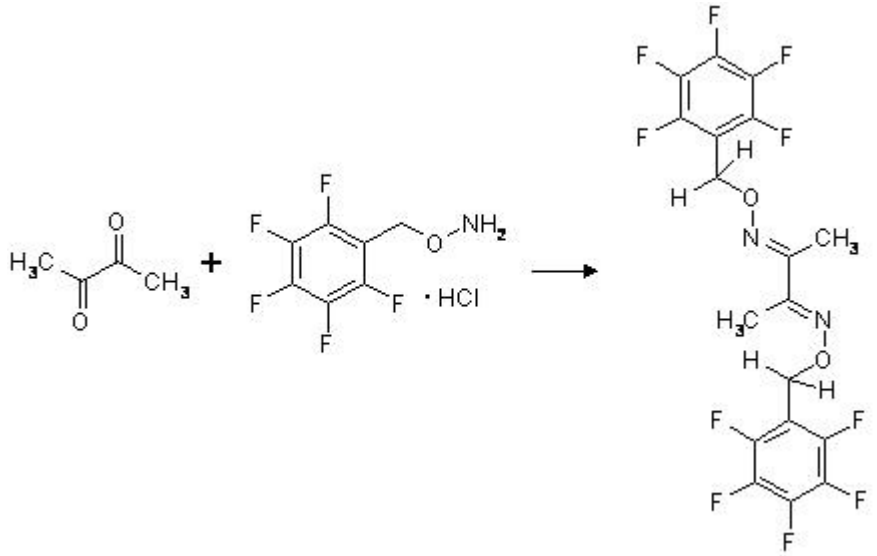
Για να προσδιορισθούν και να ποσοτικοποιηθούν οι βασικές πτητικές ενώσεις του αρώματος των παραγόμενων οίνων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SPME (Solid Phase Micro Extraction). Οι μετρήσεις έγιναν σε GC-FID (Hewlett Packard series II 5890), με φέρον αέριο το Ήλιον (He). Η στήλη ήταν η DB-WAX (30m I.D., 0.32mm, 0.25μm) (Agilent J&W, Agilent Technologies)

Για την προετοιμασία του δείγματος σε γυάλινο vial SPME των 20 mL (με βιδωτό πώμα με διάφραγμα septum) φέρονταν 7 mL οίνου, 3 mL απιονισμένο νερό, 10 μL 3-οκτανόλη (εσωτερικό πρότυπο IS) και 3 g χλωριούχου νατρίου (NaCl). Το vial τοποθετούταν σε μαγνητικό αναδευτήρα στα 400 rpm, για 10 min σε υδατόλουτρο στους 35 °C. Μετά το πέρας των 10 min, εισερχόταν η ίνα τριστρωματικής σύνθεσης στο vial και απελευθερωνόταν ώστε να γίνει η προσρόφηση των πτητικών ενώσεων για 30 min. Τέλος, η ίνα μεταφερόταν στην υποδοχή έγχυσης, όπου παρέμενε για 10 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν από την ίνα οι αρωματικές ενώσεις. Κάθε δείγμα οίνου μετρούταν δύο φορές στον αέριο χρωματογράφο.

Το θερμοστατικό πρόγραμμα του φούρνου, με σταθερή θερμοκρασία εισόδου και ανιχνευτή στους 220 °C και 250 °C αντίστοιχα, είχε αρχική θερμοκρασία 40 °C σταθερή για τα πρώτα 5 min και στη συνέχεια με βήμα 3 °C/min έφτανε τους 220 °C, όπου και παρέμενε για 5 min. Το πρόγραμμα αυτό είχε διάρκεια 70 min.

4.4.5. Ποσοτικός προσδιορισμός διακετυλίου με GC-ECD

Ο προσδιορισμός του διακετυλίου έγινε σε αέριο χρωματογράφο GC-17A (Shimadzu, Japan) με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων ECD-17A (Shimadzu, Japan) και στήλη πολική DB-WAX 30m 0.25mm 0.25μm (Agilent J&W, California), σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους De Revel & Bertrand (1993). Για την προετοιμασία του δείγματος, σε ένα vial των 4 mL προστίθενταν 100 μL οίνου, 200 μL εσωτερικού προτύπου IS (25 mg/L mesityl oxide σε αιθανόλη), 50μL υδατικού διαλύματος PFBOA 5g/L (O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamine hydrochloride) και συμπληρωνόταν ο όγκος με απιονισμένο νερό έως τα 2 mL. Το δείγμα αφηνόταν σε ηρεμία για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, και στη συνέχεια γινόταν διπλή εκχύλιση με 1 mL διαλύτη κάθε φορά (αιθυλεθαίρας : εξάνιο, 1:1 (v/v)). Λαμβανόταν η άνω φάση (οργανική) με πιπέτα και προστιθόταν σε αυτή άνυδρο άλας Na_2SO_4 για την απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας. Τέλος, το δείγμα φιλτραριζόταν με φίλτρο σύριγγας 0.20 μm, και αποθηκευόταν στην κατάψυξη έως την ανάλυσή του. Για κάθε οίνο έγινε η παρασκευή διπλού δείγματος προς ανάλυση, και σε κάθε δείγμα διπλή ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο. Στην Εικόνα 7 φαίνεται η αντίδραση μεταξύ του διακετυλίου και του αντιδραστηρίου PFBOA.

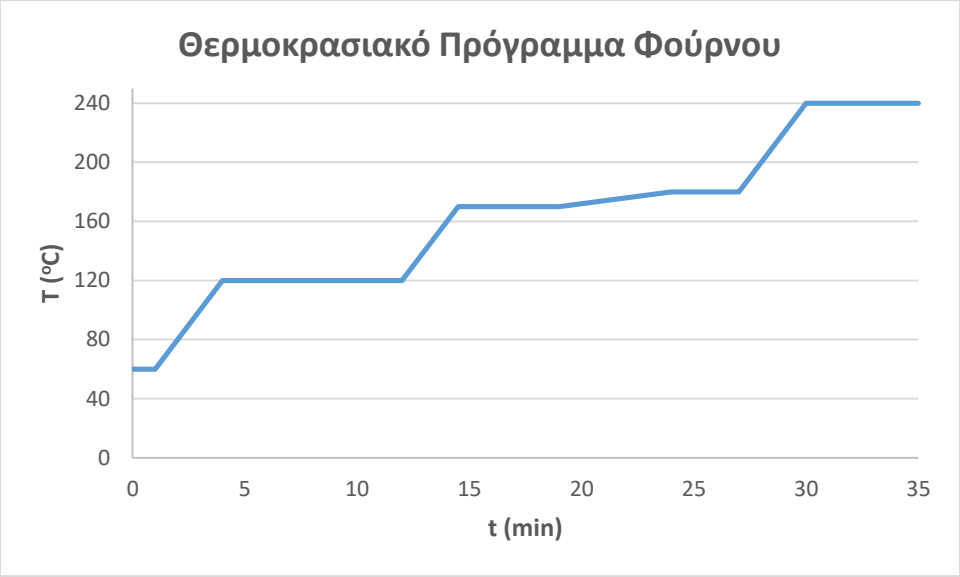


<u>Εικόνα 8</u>: Αντίδραση μεταξύ διακετυλίου και αντιδραστηρίου PFBOA

Σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση παράγονται 3 διυποκατεστημένα παράγωγα που ανιχνεύονται από τον ECD ((Z,Z), (E,E) και (Z,E)+(E,Z)), καθώς και δύο μονουπακατεστημένα παράγωγα, όπως περιγράφεται και από τους Flamini et al. (2005) . Οι χρόνοι έκλουσής τους για το συγκεκριμένο πρόγραμμα του φούρνου ήταν 21.34, 23.38, 25.97 και 10.95, 12.03 min αντίστοιχα. Μεγαλύτερη κορυφή παρουσίαζε πάντα το μονοΰποκατεστημένο παράγωγο στα 10.95 min, αλλά κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων λήφθηκαν υπόψη και οι 5 κορυφές. Η αντίδραση του εσωτερικού προτύπου με το PFBOA δίνει και αυτή δύο παράγωγα σε χρόνους 9.90

και 10.53 min, αλλά κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων λήφθηκε υπόψη μόνο η δεύτερη κορυφή, καθώς η πρώτη ανιχνευόταν πάντοτε σε ίχνη.

Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν σταθερή στους 220 °C, και του ανιχνευτή στους 250 °C. Ο όγκος της ένεσης ήταν 1 μL (splitless), ενώ το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου (Διάγραμμα 1) διαρκούσε 35 min, ώστε να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός στον συντομότερο χρόνο. Φέρον αέριο ήταν το ήλιο (600 kPa), velocity 29 cm/sec, column flow 1.2 mL/min, total flow 25 mL/min. Για την χάραξη της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις διακετυλίου (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 mg/L) σε model wine, και προέκυψε η εξίσωση y=2.914x+0.3119 με R^2=0.999.



<u>Διάγραμμα 1</u>: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του αέριου χρωματογράφου για τον προσδιορισμό του διακετυλίου

4.5. Οργανοληπτικός έλεγχος

Η οργανοληπτικός έλεγχος των 8 τελικών οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση, έλαβε χώρα στον ειδικά διαμορφωμένο χώρο του Εργαστηρίου Οινολογίας του Τμήματος Ε.Τ.Δ.Α του Γ.Π.Α. (Εικόνα 9). Σκοπός ήταν η σύγκριση των 3 γαλακτικών βακτηρίων (Oenos, Cine και CH16) μεταξύ τους, καθώς και η επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης στους οίνους μάρτυρες. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν 6 τεστ Duo-Trio, και 2 τεστ κατάταξης, όπως ακριβώς φαίνονται στον Πίνακα 5.

Εικόνα 9: Ατομικό πάνελ οργανοληπτικού ελέγχου των οίνων

Πίνακας 5: Τα τεστ που διεξήχθησαν για τη σύγκριση των οίνων

Τεστ	Οίνοι προς σύγκριση
Duo-Trio 1	VIVoen-VIVch16
Duo-Trio 2	VIVcine-VIVoen
Duo-Trio 3	VIVch16-VIVcine
Duo-Trio 4	UCLMoen-UCLMch16
Duo-Trio 5	UCLMcine-UCLMoen
Duo-Trio 6	UCLMch16-UCLMcine
Κατάταξη 1	VIVs-VIVoen-VIVcine-VIVch16
Κατάταξη 2	UCLMs-UCLMoen-UCLMcine-UCLMch16

Οι οίνοι συγκρίθηκαν ως προς το άρωμά τους στα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Ένταση αρώματος
- Φρουτώδης χαρακτήρας
- Άρωμα βουτύρου
- Προτίμηση

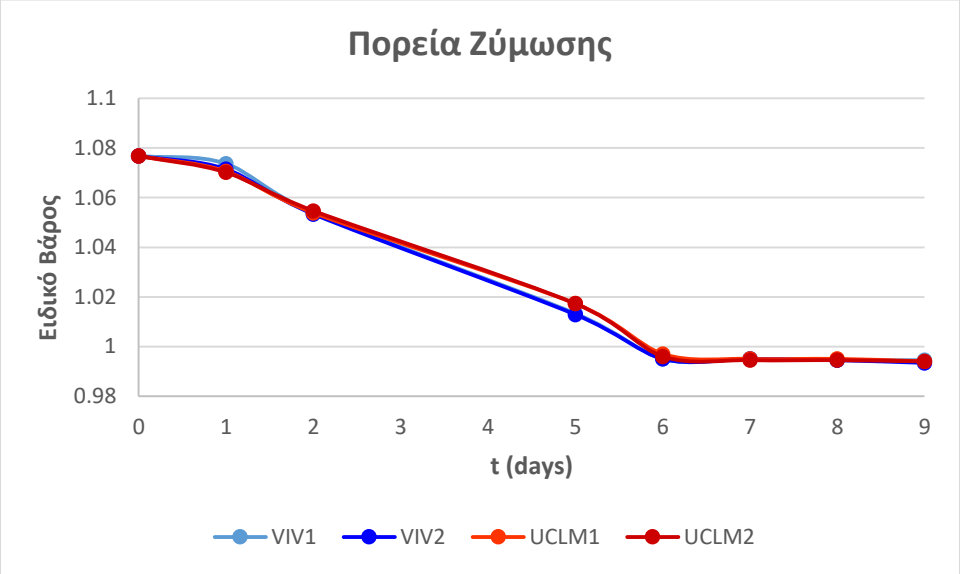
Στα τεστ Duo-Trio, οι δοκιμαστές είχαν έναν οίνο αναφοράς (R) και δύο δείγματα. Καλούνταν να βρουν πιο είναι το ίδιο δείγμα με τον οίνο αναφοράς (R), και στη συνέχεια να συγκρίνουν τα δύο δείγματα ως προς τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Στα τεστ κατάταξης, οι δοκιμαστές είχαν 4 δείγματα και καλούνταν να τα κατατάξουν αριθμητικά με αύξουσα σειρά από το 1 έως το 4 , ως προς το κάθε χαρακτηριστικό.

Ο οργανοληπτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με γυάλινα ποτήρια γευσιγνωσίας οίνου ISO σε σχήμα τουλίπας, που γεμίζονταν με 30 mL το καθένα, και έφεραν καπάκι για την μείωση της απώλειας αρωμάτων. Διεξήχθη από ομάδα μη εκπαιδευμένων ατόμων, αλλά σχετικών με το αντικείμενο, με μία επανάληψη εντός μίας εβδομάδας. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων έγινε με τυχαίους, μη επαναλαμβανόμενους, τριψήφιους κωδικούς. Ο χώρος του οργανοληπτικού ελέγχου είχε 4 πάνελ, ανά δύο ίδια. Στα πάνελ 1 & 3 ήταν τοποθετημένα τα ποτήρια των 3 τεστ Duo-Trio (1,2,3) και του ενός κατάταξης (1) για τη ζύμη VIVACE, ενώ στα πάνελ 2 & 4 ήταν τοποθετημένα τα ποτήρια των 3 τεστ Duo-Trio (4,5,6) και του ενός κατάταξης (2) για τη ζύμη UCLM S325.

5. Αποτελέσματα - Συζήτηση

5.1. Πορεία ζύμωσης - Μηλικό οξύ των παραγόμενων οίνων

Για την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους γινόταν σχεδόν καθημερινά μέτρηση του ειδικού του βάρους στους 20 °C. Στο Διάγραμμα 2, παρουσιάζεται η εξέλιξη του ειδικού βάρους του γλεύκους σε συνάρτηση με το χρόνο.



Διάγραμμα 2: Μεταβολή του ειδικού βάρους του γλεύκους κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης των 4 μικροοινοποιήσεων (VIV1, VIV2, UCLM1, UCLM2)

Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε την 9η ημέρα, καθώς και στις 4 μικροοινοποιήσεις μετρήθηκαν τα ανάγοντα σάκχαρα και βρέθηκαν < 2 g/L. Επίσης, τα δύο διαφορετικά εμπορικά σκευάσματα ζυμομυκήτων δεν παρουσίασαν κάποια διαφορά στο ρυθμό αποικοδόμησης των σακχάρων του γλεύκους. Η συγκέντρωση του μηλικού οξέος των οίνων στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, όπως μετρήθηκε με το ανακλασίμετρο RQflex, φαίνεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Συγκέντρωση του μηλικού οξέος (μέσω ανακλασίμετρου) των 4 οίνων (VIV1, VIV2, UCLM1, UCLM2)

Οίνος	Μηλικό οξύ (g/L)
VIV1	2.5
VIV2	2.5
UCLM1	2.9
UCLM2	2.7

Το μηλικό οξύ των οίνων της ζύμης VIVACE (VIV1 και VIV2) μετρήθηκε ίσο με 2.5 g/L, ενώ της ζύμης UCLM S325 (UCLM1 και UCLM2) ίσο περίπου με 2.8 g/L. Η διαφορά αυτή οφείλεται, σύμφωνα με τις προδιαγραφές των δύο εμπορικών ζυμών, στην ικανότητα της ζύμης VIVACE να καταναλώνει κάποια ποσότητα του μηλικού οξέος (*www.renaissanceyeast.com*).

5.2. Βασικές αναλύσεις οίνου

Ελεύθερο και ολικό θειώδες

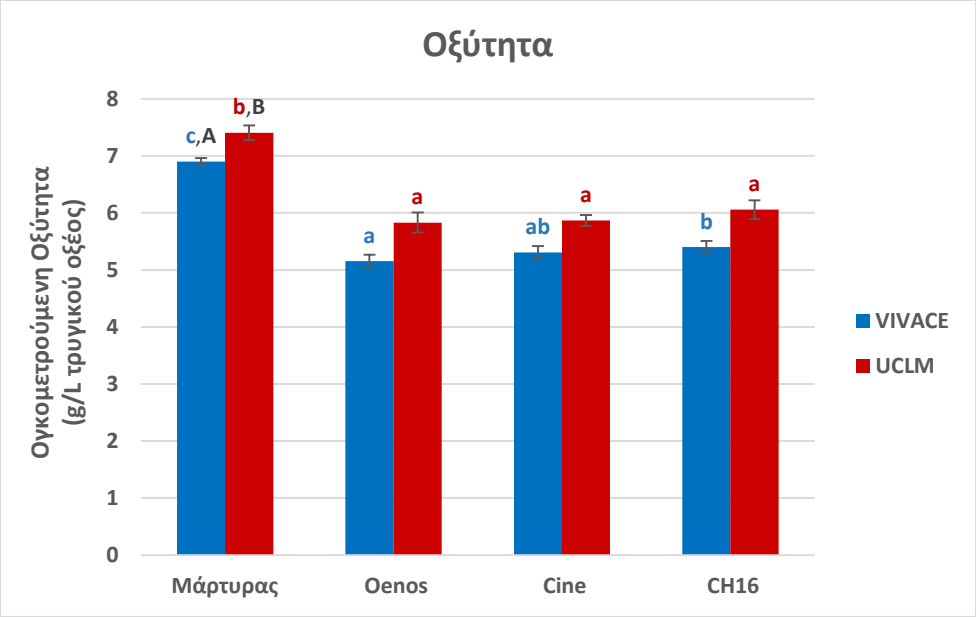
Το ολικό θειώδες του μάρτυρα VIVs μετρήθηκε ίσο με 48.5 ± 2.8 mg/L, ενώ των τριών οίνων με μηλογαλακτική ζύμωση VIVoen, VIVcine, VIVch16 δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, και είχε χαμηλότερη τιμή από του μάρτυρα ίση με 29.7 ± 4.7 mg/L. Το ολικό θειώδες του μάρτυρα UCLMs μετρήθηκε ίσο με 28.1 ± 3.0 mg/L, ενώ των τριών οίνων με μηλογαλακτική ζύμωση UCLMoen, UCLMcine, UCLMch16, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, και είχε χαμηλότερη τιμή από του μάρτυρα ίση με 20.2 ± 4.7 mg/L. Το ελεύθερο θειώδες όλων των οίνων δεν παρουσίασε στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων και βρέθηκε ίσο με 8.1 ± 1.7 mg/L, γεγονός το οποίο αποδεικνύει ότι οι οίνοι δεν ήταν προστατευμένοι από οξειδώσεις και από μικροβιακές προσβολές κατά την αποθήκευσή τους.

Δείκτης Φαινολικών Ουσιών

Ο δείκτης των φαινολικών ουσιών δεν επηρεάστηκε από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Έτσι, οι οίνοι που ζυμώθηκαν από την εμπορική ζύμη VIVACE παρουσίασαν ΔΦΟ 7.2 ± 0.1, ενώ αυτοί με την UCLM S325 παρουσίασαν στατιστικά χαμηλότερη τιμή ίση με 6.4 ± 0.1.

Οξύτητα

Η ογκομετρούμενη οξύτητα των 8 οίνων, εκφρασμένη σε g/L τρυγικού οξέος, φαίνεται στο Διάγραμμα 3.

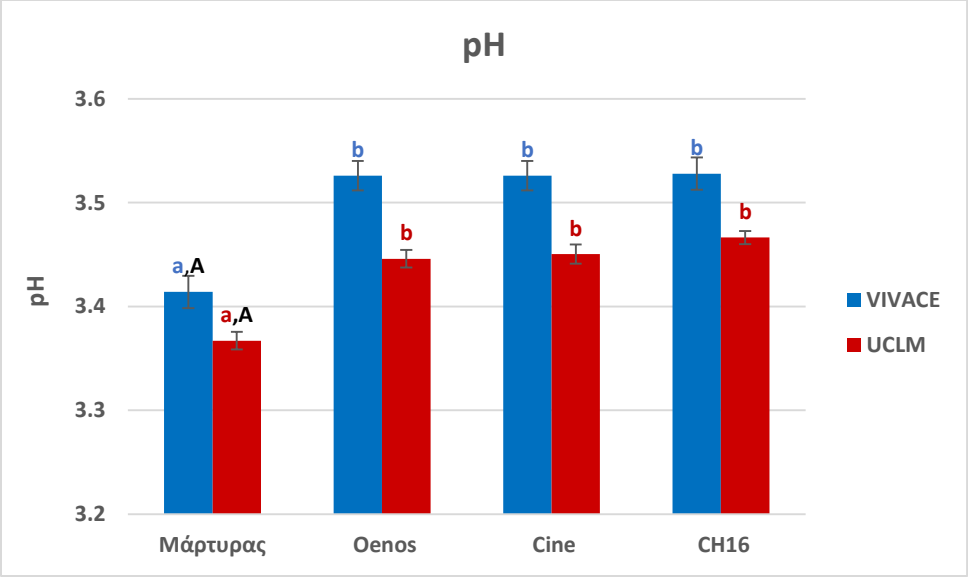


<u>Διάγραμμα 3</u>: Ογκομετρούμενη οξύτητα των 8 οίνων (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325), ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων)

Ο οίνος μάρτυρας της ζύμης VIVACE παρουσίασε ολική οξύτητα 6.9 ± 0.1 g/L, ενώ ο οίνος μάρτυρας της ζύμης UCLM S325 7.4 ± 0.1. Η μικρή αυτή διαφορά, αν και στατιστικά σημαντική μεταξύ των δύο δειγμάτων, μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα της ζύμης VIVACE να καταναλώνει έως και το 30% του μηλικού οξέος, όπως αναφέρει ο παρασκευαστής της. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι όντως η μηλογαλακτική ζύμωση επίδρασε στην οξύτητα των οίνων. Για τη ζύμη VIVACE η οξύτητα μειώθηκε από 1.5 έως 1.7 g/L και για τη UCLM S325 από 1.4 έως 1.6 g/L.

<u>pH</u>

Στο Διάγραμμα 4 εμφανίζονται τα pH των 8 οίνων. Ο οίνος μάρτυρας της ζύμης VIVACE παρουσίασε pH 3.41 ± 0.02 g/L, ενώ ο οίνος μάρτυρας της ζύμης UCLM S325 3.37 ± 0.01. Αν και δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά αυτή, είναι αναμενόμενη, καθώς η ζύμη VIVACE που παρουσίασε χαμηλότερη ολική οξύτητα από την UCLM S325, παρουσιάζει τώρα λίγο υψηλότερο pH.

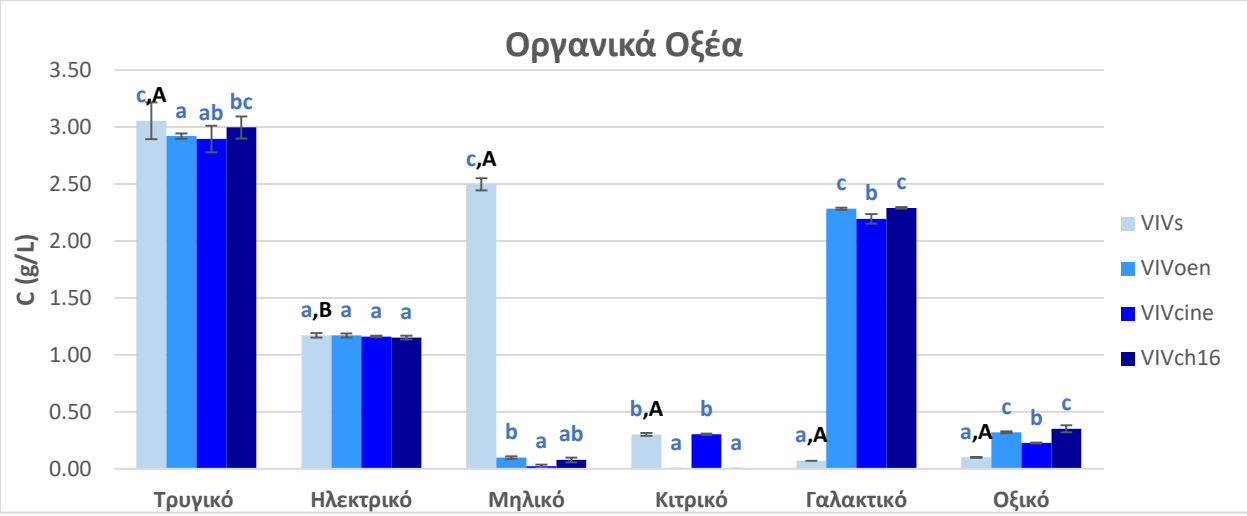


<u>Διάγραμμα 4</u>: pH των 8 οίνων (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325), ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων)

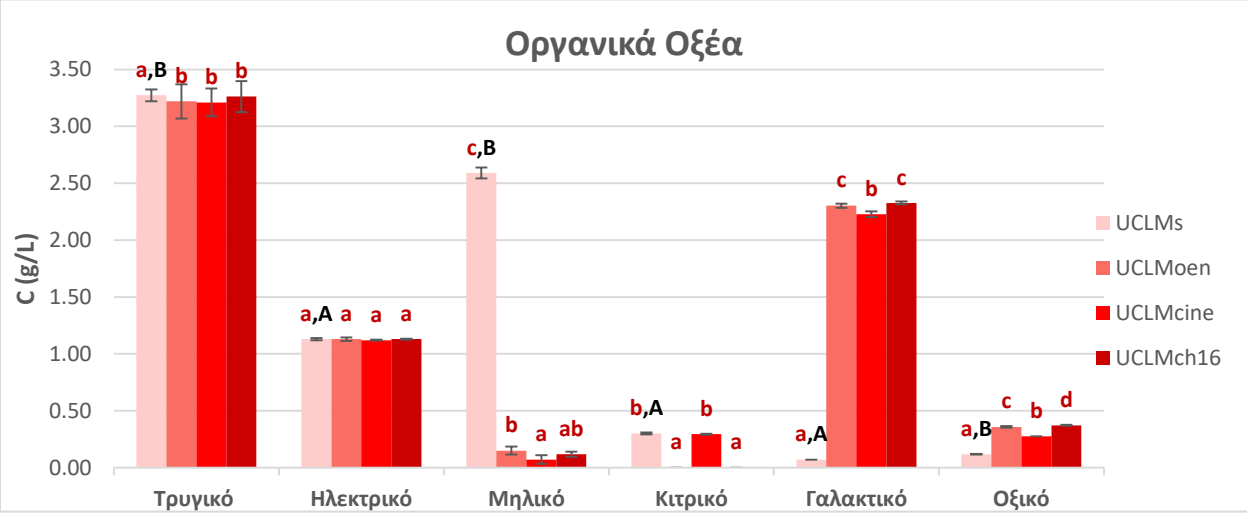
Τα γαλακτικά βακτήρια αναμενόμενα επέφεραν αύξηση του pH, για τη ζύμη VIVACE ίση με 0.12 μονάδες και για τη UCLM S325 0.09. Η επίδραση των 3 διαφορετικών γαλακτικών βακτηρίων στο pH του οίνου, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των βακτηρίων, σε καμία από τις δύο ζύμες.

5.3. Οργανικά οξέα μέσω HPLC

Στα δύο επόμενα Διαγράμματα που ακολουθούν 5 & 6 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των διαφόρων οργανικών οξέων (τρυγικό, ηλεκτρικό, μηλικό, κιτρικό, γαλακτικό, οξικό) των οίνων.



<u>Διάγραμμα 5</u>: Συγκέντρωση οργανικών οξέων στους 4 οίνους της ζύμης VIVACE (τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325) για κάθε οξύ, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα μεταξύ των Διαγραμμάτων 5&6 υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων)



<u>Διάγραμμα 6</u>: Συγκέντρωση οργανικών οξέων στους 4 οίνους της ζύμης UCLM S325 (τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325) για κάθε οξύ, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα μεταξύ των Διαγραμμάτων 5&6 υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων)

Το τρυγικό οξύ των οίνων με τη ζύμη VIVACE κυμάνθηκε από 2.90 - 3.05 g/L, ενώ αυτών με UCLM S325 από 3.21 - 3.27 g/L. Οι μικρές αυτές, αλλά στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας ζύμης, αλλά και μεταξύ των δύο μαρτύρων, ίσως οφείλεται στο διαφορετικό pH των οίνων, το οποίο επηρεάζει την καθίζηση των τρυγικών αλάτων κατά την αποθήκευσή τους (Zoecklein et al. 1995).

Το ηλεκτρικό οξύ των οίνων με τη ζύμη VIVACE κυμάνθηκε από 1.15 - 1.17 g/L, ενώ αυτών με UCLM S325 από 1.12-1.13 g/L, χωρίς όμως να παρουσιαστεί κάποια σημαντική μεταβολή μετά την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, καθώς τα γαλακτικά βακτήρια δεν μπορούν να μεταβολίσουν το ηλεκτρικό οξύ (Bauer & Dicks 2004). Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία, ο μάρτυρας της ζύμης VIVACE εμφάνισε υψηλότερη συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος ίσης με 1.17 g/L, σε σχέση με τον μάρτυρα της ζύμης UCLM S325 που είχε 1.13 g/L.

Το μηλικό οξύ του οίνου μάρτυρα VIVs μετρήθηκε ίσο με 2.50 ± 0.05 g/L, ενώ του UCLMs 2.59 ± 0.05 g/L. Η στατιστικά αυτή σημαντική διαφορά οφείλεται, σύμφωνα με τις προδιαγραφές των δύο εμπορικών ζυμών, στην ικανότητα της ζύμης VIVACE να καταναλώνει κάποια ποσότητα του μηλικού οξέος (*www.renaissanceyeast.com*). Στη συνέχεια, μετά την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, όπως ήταν αναμενόμενο, το μηλικό οξύ σχεδόν μηδενίστηκε (Bartowsky & Borneman 2011, Bauer & Dicks 2004). Συγκεκριμένα, οι οίνοι που εμβολιάστηκαν με το σκεύασμα γαλακτικών βακτηρίων Oenos είχαν μηλικό οξύ 0.10 ± 0.01 g/L και 0.15 ± 0.04 g/L για τις ζύμες VIVACE και UCLM αντίστοιχα. Οι οίνοι με Cine 0.02 ± 0.01 g/L και 0.07 ± 0.04 g/L, και οι οίνοι με CH16 0.08 ± 0.02 g/L και 0.12 ± 0.02 g/L, αντίστοιχα. Σύμφωνα με την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τα γαλακτικά βακτήρια Oenos και Cine παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην αποικοδόμηση του μηλικού οξέος, με το βακτήριο Cine να καταναλώνει περισσότερο μηλικό οξύ από το Oenos και στους δύο οίνους (VIVACE και UCLM S325).

Το κιτρικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί από τα γαλακτικά βακτήρια (Bartowsky & Borneman 2011, Bauer & Dicks 2004). Έτσι, ενώ οι οίνοι μάρτυρες των δύο ζυμών περιείχαν ίσες ποσότητες κιτρικού οξέος 0.30 ± 0.01 g/L, οι οίνοι που υπέστησαν μηλογαλακτική ζύμωση με τα γαλακτικά βακτήρια Oenos και CH16 δεν περιείχαν καθόλου κιτρικό οξύ, σε αντίθεση με τους οίνους του Cine, το οποίο δεν μπορεί να μεταβολίσει το κιτρικό οξύ (*www.chr-hansen.com*).

Το γαλακτικό οξύ βρέθηκε μόνο σε ίχνη στους οίνους μάρτυρες (<0.05 g/L), ενώ στους οίνους με μηλογαλακτική ζύμωση εμφανίστηκε σε σημαντικές συγκεντρώσεις. Το γαλακτικό οξύ προκύπτει από την αποκαρβοξυλίωση του μηλικού οξέος κατά τη δράση των γαλακτικών βακτηρίων της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Bartowsky & Borneman 2011, Bauer & Dicks 2004). Συγκεκριμένα, οι οίνοι της ζύμης VIVACE που είχαν διεξάγει μηλογαλακτική ζύμωση, είχαν γαλακτικό οξύ ίσο με 2.28 ± 0.1 g/L και 2.29 ± 0.1 g/L, για τα γαλακτικά βακτήριά Oenos και CH16. Οι δύο αυτοί οίνοι παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος σε σχέση με τον οίνο με το Cine, που είχε γαλακτικό οξύ ίσο 2.19 ± 0.4 g/L. Παρόμοια, ήταν και η συμπεριφορά των οίνων με τη ζύμη UCLM S325, μόνο που οι συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος των οίνων που είχαν κάνει μηλογαλακτική ζύμωση ήταν περίπου κατά 0.4 g/L υψηλότερες, λόγω της αυξημένης συγκριτικά συγκέντρωσης του μηλικού οξέος στον οίνο της ζύμης UCLM S325. Επιπλέον, η σημαντική στατιστικά διαφορά στην παραγωγή γαλακτικού οξέος μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων Oenos και CH16 με τα Cine, ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι γαλακτικό οξύ μπορεί να παραχθεί και μέσω της αποικοδόμησης

του κιτρικού οξέος, και από τη στιγμή που τα Cine δεν μεταβολίζουν το κιτρικό οξύ, είναι λογικό να παράγουν λιγότερο γαλακτικό οξύ, ακόμα και αν είναι αυτά που αφήνουν το λιγότερο μηλικό οξύ στον οίνο, όπως ήδη αναφέρθηκε.

Το οξικό οξύ παράγεται σε μικρές ποσότητες κατά την αλκοολική ζύμωση, αλλά αυξάνεται αν διεξαχθεί μηλογαλακτική ζύμωση (Ribéreau-Gayon et al. 2006b). Έτσι, οι οίνοι μάρτυρες VIVs και UCLMs περιείχαν 0.10 και 0.12 g/L οξικού οξέος αντίστοιχα, ενώ η μηλογαλακτική ζύμωση με τα στελέχη Oenos και CH16 αύξησε τη συγκέντρωσή του κατά 0.22 - 0.25 g/L. Στο στέλεχος Cine παρατηρήθηκε χαμηλότερη αύξηση, της τάξης του 0.12 - 0.16, που είναι στατιστικά σημαντική από αυτή των δύο άλλων στελεχών, και οφείλεται στο γεγονός ότι το Cine δεν μπορεί να καταβολίσει το κιτρικό οξύ.

5.4. Αρωματικό προφίλ μέσω GC-FID

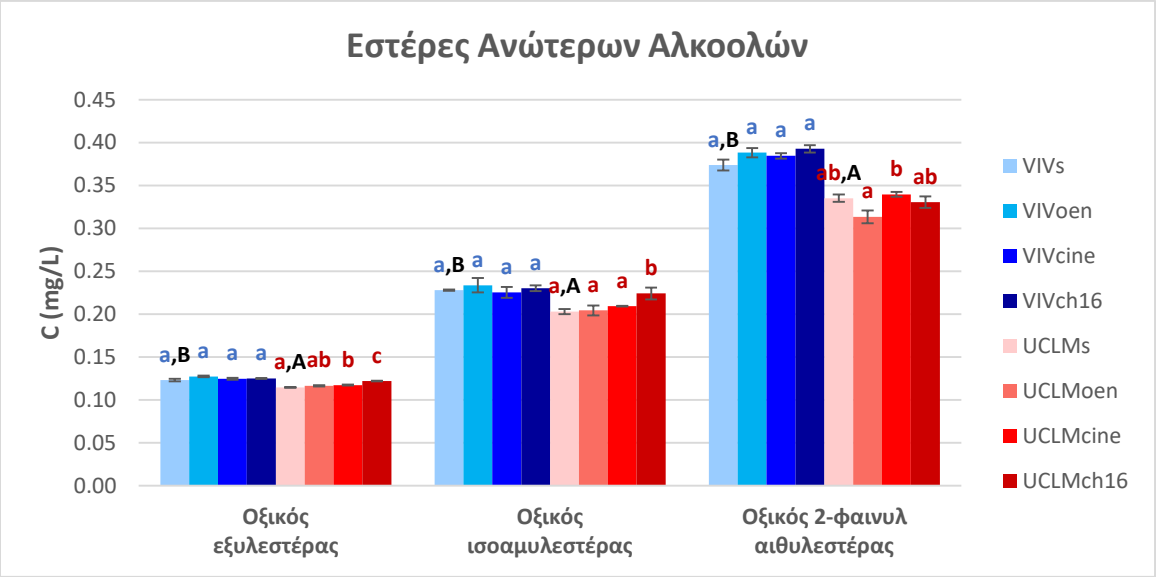
Μέσω του αέριου χρωματογράφου ανιχνεύθηκαν 13 ενώσεις που συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ των 8 οίνων. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν 3 εστέρες ανώτερων αλκοολών, 6 εστέρες λιπαρών οξέων, 2 ανώτερες αλκοόλες και 2 τερπένια (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Οι 13 ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ των 8 οίνων, και η χαρακτηριστική οσμή τους

Εστέρες Ανώτερων Αλκοολών		
Hexyl acetate	οξικός εξυλεστέρας	φρουτώδες, μήλο (Rojas et al. 2001)
Isoamyl acetate	οξικός ισοαμυλεστέρας	μπανάνα (Sánchez-Palomo et al.2015)
2-phenyl ethylacetate	οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας	λουλούδια (Sánchez-Palomo et al. 2015)
Εστέρες λιπαρών οξέων		
Ethyl decanoate	δεκανοϊκός αιθυλεστέρας	γλυκό, φρουτώδες (Sánchez-Palomo et al. 2015)
Ethyl caproate (Ethyl hexanoate)	καπροϊκός αιθυλεστέρας	φρουτώδες, πράσινο μήλο (Sánchez-Palomo et al. 2015)
Ethyl caprylate (Ethyl octanoate)	καπρυλικός αιθυλεστέρας	γλυκό, φρουτώδες (Sánchez-Palomo et al. 2015)
Ethyl isobutyrate	ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας	γλυκό, φρουτώδες, άρωμα κίτρου (Burdock 2010)
Ethyl laurate (Ethyl dodecanoate)	λαυρικός αιθυλεστέρας	λουλούδια, φρουτώδες, κρεμώδες (Burdock 2010)
Ethyl 2-methyl-butyrate	2-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστερας	φρουτώδες, μήλο (Bauer et al. 1997)
Ανώτερες αλκοόλες		
Isoamyl alcohol (3-methyl-1-butanol)	ισοαμυλική αλκοόλη	αρώματα καμένου, αλκοόλ (Sánchez-Palomo et al. 2015)
Phenethyl alcohol (2-phenylethanol)	φαινυλ-2-αιθανόλη	λουλούδια, τριαντάφυλλο, γιασεμί (Sánchez-Palomo et al. 2015)
Τερπένια		
Citronellol	κιτρονελόλη	λουλούδια, άρωμα κίτρου ((Rogercon & Symington 2013)
Linalool	λιναλοόλη	λουλούδια, τριαντάφυλλο, λεμόνι (Rogercon & Symington 2013)

Εστέρες Ανώτερων Αλκοολών

Μία ομάδα εστέρων που δημιουργούνται με ενζυμική εστεροποιήση κατά την αλκοολική ζύμωση είναι οι εστέρες των ανώτερων αλκοολών με το οξικό οξύ, όπως ο οξικός ισοαμυλεστέρας, που έχει χαρακτηριστικό άρωμα μπανάνας, ο οξικός εξυλεστέρας και ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας, που μπορούν να έχουν αρώματα φρούτων και μήλου (Ribéreau-Gayon et al. 2006b, Jackson 2002). Στο Διάγραμμα 7 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των 3 αυτών εστέρων που βρέθηκαν στους 8 οίνους.



Διάγραμμα 7: Οι 3 εστέρες ανώτερων αλκοολών που ανιχνεύτηκαν στους 8 οίνους (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325) για κάθε εστέρα, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων για κάθε εστέρα)

Ο οξικός εξυλεστέρας είχε συγκέντρωση 0.12 - 0.13 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, χωρίς να επηρεαστεί από τη μηλογαλακτική ζύμωση, όπως επίσης αναφέρουν οι Ugliano & Moio (2005), καθώς και οι Pozo-Bayon et al. (2005) στις έρευνές τους σε ερυθρό οίνο. Ο μάρτυρας VIVs εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, καθώς ο τελευταίος είχε χαμηλότερη συγκέντρωση οξικού εξυλεστέρα ίση με 0.11 mg/L. Στη ζύμη UCLM φάνηκε ότι η μηλογαλακτική ζύμωση αύξησε ελάχιστα τη συγκέντρωση του οξικού εξυλεστέρα με το βακτήριο CH16 να παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση των 0.12 mg/L. Έρευνα των Knoll et al. (2011) σε λευκούς οίνους Riesling και Chardonnay, για τις πλησιέστερες τιμές pH και αιθανόλης με τους οίνους της παρούσας εργασίας, έδειξε ότι η συγκέντρωση του οξικού εξυλεστέρα μειώθηκε μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση.

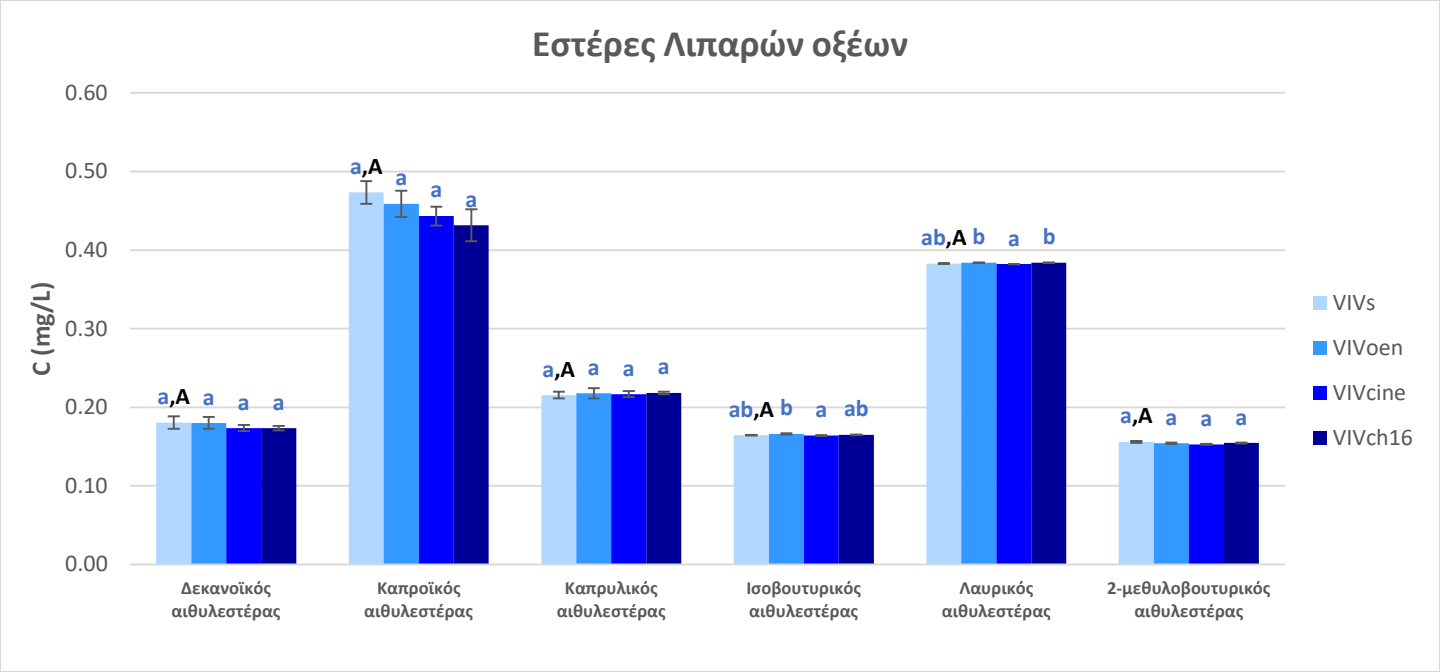
Ο οξικός ισοαμυλεστέρας είχε συγκέντρωση 0.23 mg/L και για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, χωρίς να επηρεαστεί από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ο μάρτυρας VIVs εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, καθώς ο τελευταίος είχε χαμηλότερη συγκέντρωση οξικού ισοαμυλεστέρα ίση με 0.20 mg/L. Στους 4 οίνους της ζύμης UCLM η

συγκέντρωση κυμάνθηκε από 0.20 έως 0.22 mg/L, χωρίς όμως και πάλι να παρατηρηθούν σημαντικές στατιστικά διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Έρευνα των Knoll et al. (2011) σε λευκούς οίνους Riesling και Chardonnay, για τις πλησιέστερες τιμές pH και αιθανόλης με τους οίνους της παρούσας εργασίας, έδειξε ότι η συγκέντρωση του οξικού ισοαμυλεστέρα μειώθηκε στο Riesling και αυξήθηκε στο Chardonnay μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Έρευνα των Dourtoglou et al. (2014) σε 11 οίνους από Μοσχοφίλερο του εμπορίου έδειξε ότι η συγκέντρωση του οξικού ισοαμυλεστέρα κυμάνθηκε από 0.10 - 0.57 mg/100 g οίνου, η οποία είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή που βρέθηκε στους οίνους της παρούσας διπλωματικής.

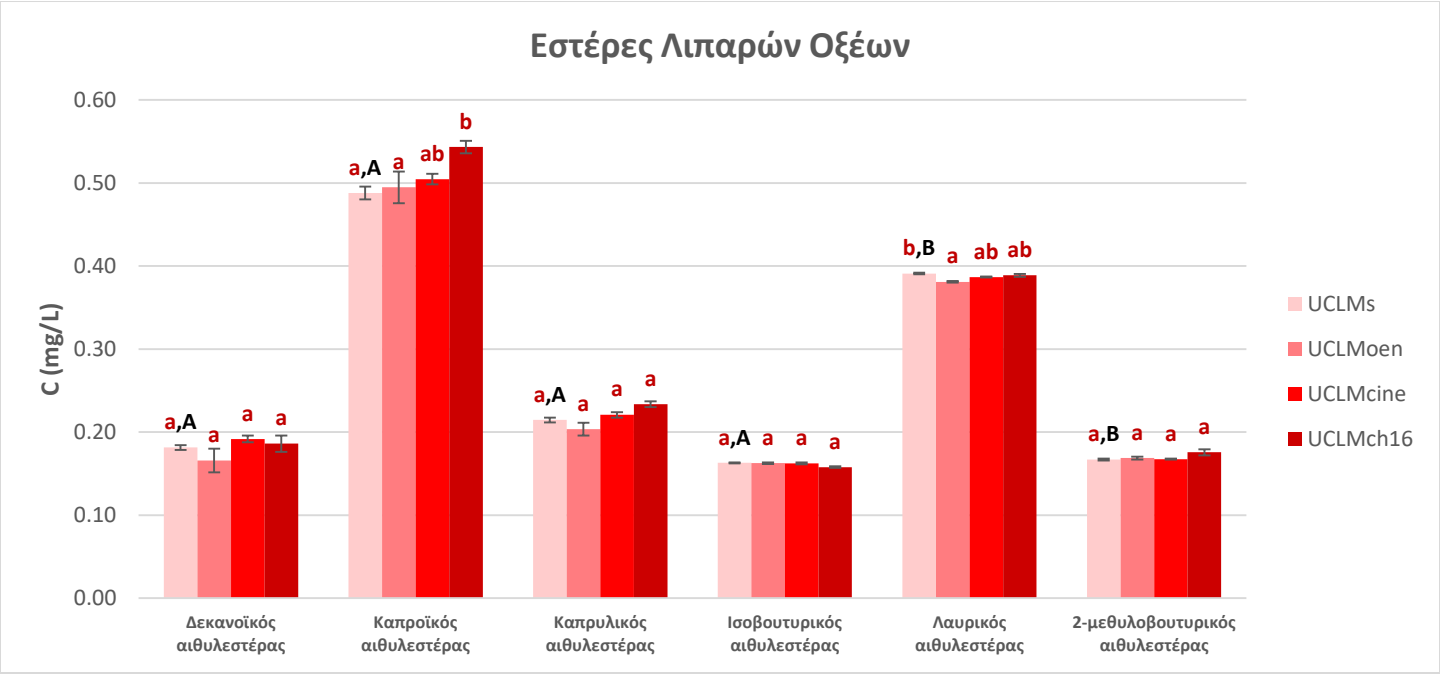
Ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας είχε συγκέντρωση 0.37 - 0.39 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, και όπως φάνηκε ύστερα από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν επηρεάστηκε από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ο μάρτυρας VIVs εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, καθώς ο τελευταίος είχε χαμηλότερη συγκέντρωση οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα ίση με 0.34 mg/L. Στους 4 οίνους της ζύμης UCLM η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 0.31 έως 0.34 mg/L, χωρίς να υπάρχει κάποια ουσιαστική αλλαγή μετά την μηλογαλακτική ζύμωση. Με αυτό συμφωνούν και οι έρευνες των Ugliano & Moio (2005), καθώς και των Pozo-Bayon et al. (2005) σε ερυθρούς οίνους. Έρευνα των Knoll et al. (2011) σε λευκούς οίνους Riesling και Chardonnay, για τις πλησιέστερες τιμές pH και αιθανόλης με τους οίνους της παρούσας εργασίας, έδειξε ότι η συγκέντρωση του οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα αυξήθηξε στο Riesling και μειώθηκε στο Chardonnay μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Έρευνα των Dourtoglou et al. (2014) σε 11 οίνους από Μοσχοφίλερο του εμπορίου έδειξε ότι η συγκέντρωση του οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα κυμάνθηκε από 0.09 - 0.31 mg/100 g οίνου, η οποία είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή που βρέθηκε στους οίνους της παρούσας διπλωματικής.

Εστέρες Λιπαρών Οξέων

Μία ομάδα αποτελούν οι εστέρες των λιπαρών οξέων με αιθανόλη που παράγονται από τις ζύμες υπό αναερόβιες συνθήκες. Τέτοιοι είναι, ο δεκανοϊκός, ο καπροϊκός, ο καπρυλικός, ο ισοβουτυρικός, ο λαυρικός και ο 2-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας. Οι εστέρες αυτοί προσδίδουν φρουτώδη αρώματα στους οίνους, ακόμη και γλυκά αρώματα μελιού ή κεριού (Ribéreau-Gayon et al. 2006b, Jackson 2002). Στο Διάγραμμα 8 και 9 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των 6 αυτών εστέρων που βρέθηκαν στους 4 οίνους της ζύμης VIVACE και στους 4 οίνους της ζύμης UCLM S325, αντίστοιχα.



<u>Διάγραμμα 8</u>: Οι 6 εστέρες λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν στους 4 οίνους της ζύμης VIVACE (τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση για κάθε εστέρα, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα στα Διαγράμματα 8 & 9 υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων (VIVs και UCLMs) για κάθε εστέρα)



<u>Διάγραμμα 9:</u> Οι 6 εστέρες λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν στους 4 οίνους της ζύμης UCLM S325 (τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση για κάθε εστέρα, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα στα Διαγράμματα 8 & 9 υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων (VIVs και UCLMs) για κάθε εστέρα)

Ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας είχε συγκέντρωση 0.17 - 0.18 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, χωρίς να επηρεαστεί η συγκέντρωσή του από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ο μάρτυρας VIVs δεν εμφάνισε διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, καθώς και οι δύο είχαν συγκέντρωση ίση με 0.18 mg/L. Στους 4 οίνους της ζύμης UCLM η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 0.17 έως 0.19 mg/L, χωρίς να υπάρχει κάποια αλλαγή μετά την μηλογαλακτική ζύμωση. Βέβαια, έρευνα των Ugliano & Moio (2005) σε ερυθρό οίνο έδειξε ότι η συγκέντρωση του δεκανοϊκού αιθυλεστέρα αυξάνεται με την μηλογαλακτική ζύμωση, ενώ η έρευνα των Pozo-Bayon et al. (2005) έδειξε το αντίθετο. Έρευνα των Knoll et al. (2011) σε λευκούς οίνους Riesling και Chardonnay, για τις πλησιέστερες τιμές pH και αιθανόλης με τους οίνους της παρούσας εργασίας, έδειξε ότι η συγκέντρωση του δεκανοϊκού αιθυλεστέρα μειώθηκε στο Riesling και αυξήθηκε στο Chardonnay μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση.

Ο καπροϊκός αιθυλεστέρας είχε συγκέντρωση 0.43- 0.47 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, και όπως φάνηκε ύστερα από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν επηρεάστηκε από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Pozo-Bayon et al. (2005). Ο μάρτυρας VIVs δεν εμφάνισε σημαντική στατιστικά διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, που η συγκέντρωσή του ανήλθε στα 0.49 ± 0.02 mg/L. Στους οίνους της ζύμης UCLM που διεξήγαγαν μηλογαλακτική ζύμωση η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 0.49 έως 0.54 mg/L, με το γαλακτικό βακτήριο CH16 να αυξάνει σημαντικά την συγκέντρωση του καπροϊκού αιθυλεστέρα στον οίνο. Τέτοια αύξηση παρατηρείται και στην έρευνα των Ugliano & Moio (2005) σε ερυθρό οίνο. Έρευνα των Knoll et al. (2011) σε λευκούς οίνους Riesling και Chardonnay, για τις πλησιέστερες τιμές pH και αιθανόλης με τους οίνους της παρούσας εργασίας, έδειξε ότι η συγκέντρωση του καπροϊκού αιθυλεστέρα μειώθηκε και στους δύο οίνους μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση.

Ο καπρυλικός αιθυλεστέρας είχε συγκέντρωση 0.22 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, χωρίς να επηρεαστεί η συγκέντρωσή του από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ο μάρτυρας VIVs δεν εμφάνισε διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, που είχε συγκέντρωση ίση με 0.21 mg/L. Στους 4 οίνους της ζύμης UCLM η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 0.20 έως 0.23 mg/L, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μετά την μηλογαλακτική ζύμωση. Την ίδια συμπεριφορά έδειξε και η έρευνα των Pozo-Bayon et al. (2005) σε ερυθρό οίνο, σε αντίθεση με αυτή των Ugliano & Moio (2005) σε ερυθρό οίνο, που έδειξε ότι η συγκέντρωση του καπρυλικού αιθυλεστέρα αυξάνεται με την μηλογαλακτική ζύμωση.. Έρευνα των Knoll et al. (2011) σε λευκούς οίνους Riesling και Chardonnay, για τις πλησιέστερες τιμές pH και αιθανόλης με τους οίνους της παρούσας εργασίας, έδειξε ότι η συγκέντρωση του καπρυλικού αιθυλεστέρα δεν επηρεάστηκε από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Έρευνα των Dourtoglou et al. (2014) σε 11 οίνους από Μοσχοφίλερο του εμπορίου έδειξε ότι η συγκέντρωση του καπρυλικού αιθυλεστέρα κυμάνθηκε από 0.14 - 0.77 mg/100 g οίνου, η οποία είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή που βρέθηκε στους οίνους της παρούσας διπλωματικής

Ο ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας είχε συγκέντρωση 0.16-0.17 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, χωρίς να επηρεαστεί ουσιαστικά η συγκέντρωσή του από τη μηλογαλακτική

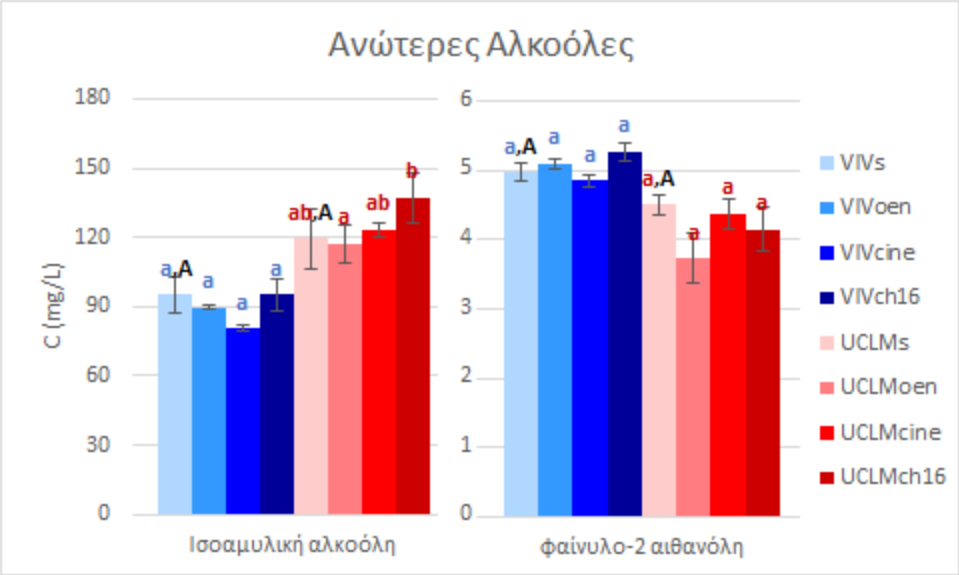
ζύμωση. Ο μάρτυρας VIVs δεν εμφάνισε διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, που είχε συγκέντρωση ίση με 0.16 mg/L. Στους 4 οίνους της ζύμης UCLM η συγκέντρωση βρέθηκε 0.16 mg/L, χωρίς να μεταβάλλεται μετά την μηλογαλακτική ζύμωση. Έρευνα των Knoll et al. (2011) σε λευκούς οίνους Riesling και Chardonnay, για τις πλησιέστερες τιμές pH και αιθανόλης με τους οίνους της παρούσας εργασίας, έδειξε ότι η συγκέντρωση του ισοβουτυρικού αιθυλεστέρα μειώθηκε στο Riesling και δεν μεταβλήθηκε στο Chardonnay μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση.

Ο λαυρικός αιθυλεστέρας είχε συγκέντρωση 0.38 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, χωρίς να επηρεαστεί ουσιαστικά η συγκέντρωσή του από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ο μάρτυρας VIVs εμφάνισε διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, του οποίου η συγκέντρωση ήταν υψηλότερη ίση με 0.39 mg/L. Από τα 3 γαλακτικά βακτήρια, μόνο το Oenos είχε σημαντική στατιστικά επίδραση στη συγκέντρωση του λαυρικού αιθυλεστέρα, και μάλιστα επέφερε μείωση στα 0.38 mg/L.

Ο 2-μεθυλοβουτυρικός αιθυλεστέρας είχε συγκέντρωση 0.15-0.16 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, χωρίς να επηρεαστεί η συγκέντρωσή του από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ο μάρτυρας VIVs εμφάνισε διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, που είχε υψηλότερη συγκέντρωση ίση με 0.17 mg/L. Στους 4 οίνους της ζύμης UCLM η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 0.17 έως 0.18 mg/L, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μετά την μηλογαλακτική ζύμωση. Έρευνα των Knoll et al. (2011) σε λευκούς οίνους Riesling και Chardonnay, για τις πλησιέστερες τιμές pH και αιθανόλης με τους οίνους της παρούσας εργασίας, έδειξε ότι η συγκέντρωση του 2-μεθυλοβουτυρικού αιθυλεστέρα μειώθηκε στο Riesling και αυξήθηκε στο Chardonnay, μόνο από το ένα βακτήριο, μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση.

Ανώτερες Αλκοόλες

Οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται από τα σάκχαρα κατά την αλκοολική ζύμωση, τα οποία στην συνέχεια αποκαρβοξυλιώνονται και ανάγονται προς αλκοόλες. Σχηματίζονται επίσης από αμινοξέα , μετά από απαμίνωση και αποκαρβοξυλίωση. Στους οίνους της παρούσας εργασίας ανιχνεύθηκαν η ισοαμυλική αλκοόλη, που βρίσκεται στους οίνους σε συγκεντρώσεις από 30-500 mg/L και έχει δριμεία οσμή, και η φαινυλ-2-αιθανόλη που έχει άρωμα τριαντάφυλλου και συγκεντρώσεις 10-80 mg/L (Τσακίρης 2014). Οι συγκεντρώσεις των δύο αυτών ανώτερων αλκοολών στους 8 οίνους φαίνονται στο Διάγραμμα 10.



<u>Διάγραμμα 10:</u> Οι 2 ανώτερες αλκοόλες που ανιχνεύτηκαν στους 8 οίνους (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325) για κάθε ανώτερη αλκοόλη, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων για κάθε εστέρα)

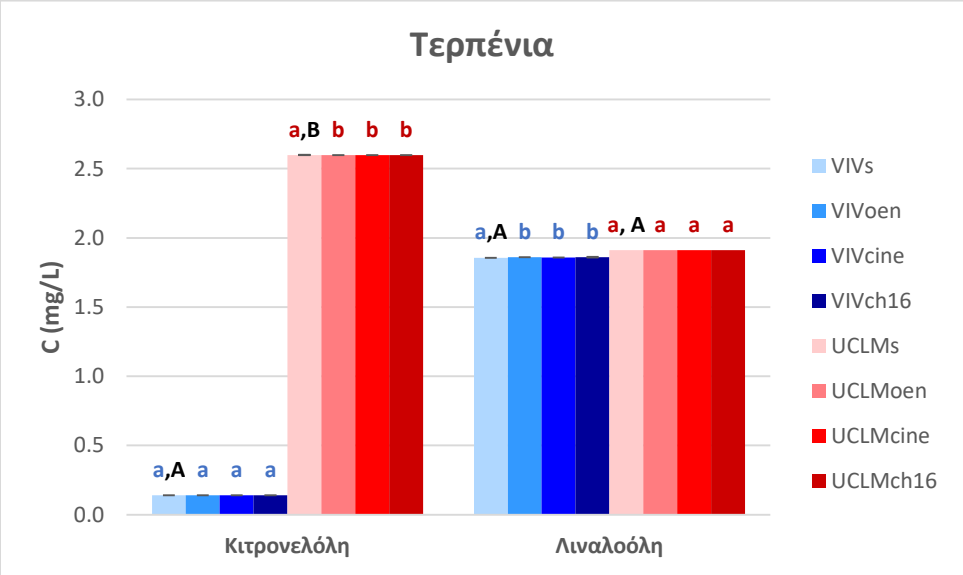
Η ισοαμυλική αλκοόλη είχε συγκέντρωση 80-90 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, χωρίς όμως να επηρεαστεί σημαντικά η συγκέντρωσή της από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ο μάρτυρας VIVs δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, που είχε συγκέντρωση ίση με 119 mg/L. Στους 4 οίνους της ζύμης UCLM η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 117-137 mg/L, χωρίς όμως να υπάρχει κάποια ουσιαστική διαφορά μετά την μηλογαλακτική ζύμωση. Το γεγονός αυτό, ότι δηλαδή η μηλογαλακτική ζύμωση δεν επηρεάζει την ισοαμυλική αλκοόλη έδειξε και η έρευνα των Pozo-Bayon et al. (2005) σε ερυθρό οίνο, καθώς και αυτή των Ugliano & Moio (2005) σε ερυθρό οίνο για την πλειοψηφία των γαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν. Έρευνα των Knoll et al. (2011) σε λευκούς οίνους Riesling και Chardonnay, για τις πλησιέστερες τιμές pH και αιθανόλης με τους οίνους της παρούσας εργασίας, έδειξε ότι η συγκέντρωση της ισοαμυλικής αλκοόλης αυξήθηκε μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Έρευνα των Dourtoglou et al. (2014) σε 11 οίνους από Μοσχοφίλερο του εμπορίου έδειξε ότι η συγκέντρωση της ισοαμυλικής αλκοόλης κυμάνθηκε από 4.5 - 14 mg/100 g οίνου, η οποία είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτή που βρέθηκε στους οίνους της παρούσας εργασίας.

Η φαινυλ-2-αιθανόλη είχε συγκέντρωση 4.9-5.3 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, χωρίς όμως να επηρεαστεί σημαντικά η συγκέντρωσή του από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ο μάρτυρας VIVs δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, που είχε συγκέντρωση ίση με 4.5 mg/L. Στους 4 οίνους της ζύμης UCLM η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 4.2-4.4 mg/L, χωρίς όμως να υπάρχει κάποια στατιστική διαφορά μετά την μηλογαλακτική ζύμωση. Το γεγονός αυτό, ότι δηλαδή η μηλογαλακτική ζύμωση δεν επηρεάζει την φαινυλ-2-αιθανόλη έδειξε έρχεται σε αντίθεση με τις έρευνες των Pozo-Bayon et al. (2005) και των Ugliano

& Moio (2005) σε ερυθρό οίνο, όπου η φαινυλ-2-αιθανόλη αυξήθηκε με τη μηλογαλακτική ζύμωση. Έρευνα των Knoll et al. (2011) σε λευκούς οίνους Riesling και Chardonnay, για τις πλησιέστερες τιμές pH και αιθανόλης με τους οίνους της παρούσας εργασίας, έδειξε ότι η συγκέντρωση της φαινυλ-2-αιθανόλης αυξήθηκε στο Riesling και μειώθηκε στο Chardonnay μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Έρευνα των Dourtoglou et al. (2014) σε 11 οίνους από Μοσχοφίλερο του εμπορίου έδειξε ότι η συγκέντρωση της φαινυλ-2-αιθανόλης κυμάνθηκε από 1.6 - 4.3 mg/100 g οίνου, η οποία είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή που βρέθηκε στους οίνους της παρούσας εργασίας.

Τερπένια

Τα αρωματικά συστατικά που προέρχονται από το σταφύλι ανήκουν σε διάφορες τάξεις χημικών ενώσεων, με σημαντικότερα τα τερπένια (χαρακτηριστικά των μοσχάτων ποικιλιών). Πολλές πρόδρομες αρωματικές ενώσεις βρίσκονται υπό την μορφή γλυκοσιδίων στο γλεύκος, αλλά μπορούν να απελευθερωθούν, δίνοντας αρωματικές ενώσεις. Έτσι βρίσκονται και διάφορες τερπενικές ενώσεις. Για την απελευθέρωση του πτητικού μορίου θεωρείται αναγκαία η χρήση ενζύμων (β-γλυκοζιδάση) κατά την οινοποίηση (Τσακίρης 2014, Ribéreau-Gayon et al. 2006b). Οι τερπενικές ενώσεις που βρέθηκαν στους οίνους της παρούσας εργασίας ήταν η κιτρονελόλη και η λιναλοόλη, και η συγκέντρωσή τους φαίνεται στο Διάγραμμα 11.



Διάγραμμα 11: Τα 2 τερπένια που ανιχνεύτηκαν στους 8 οίνους (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325) για κάθε ανώτερη αλκοόλη, ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο μαρτύρων για κάθε εστέρα)

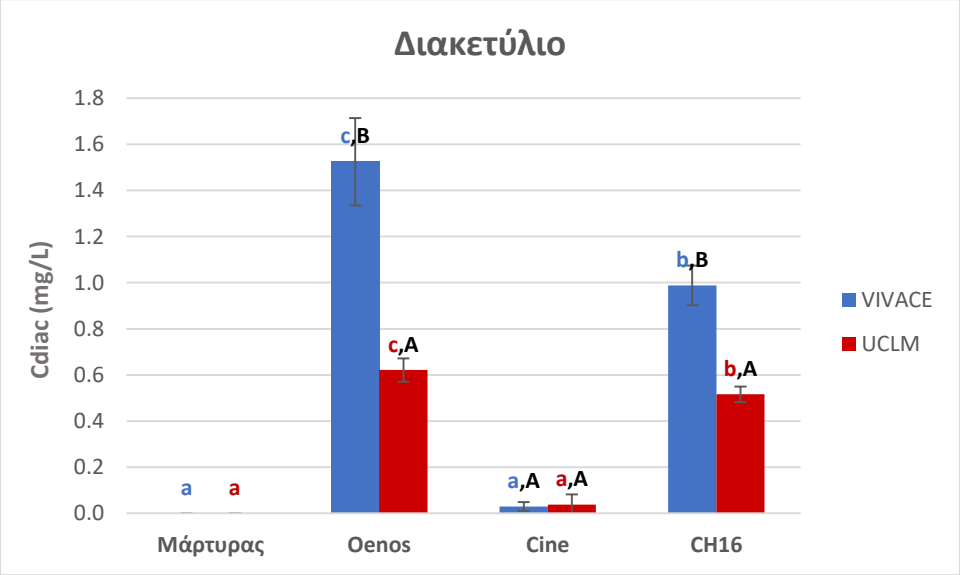
Η κιτρονελόλη είχε συγκέντρωση 0.14 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, χωρίς να επηρεαστεί η συγκέντρωσή της από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ο μάρτυρας VIVs εμφάνισε σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα UCLMs, που είχε αρκετά υψηλότερη συγκέντρωση ίση με 2.60 mg/L. Η διαφορά αυτή ίσως οφείλεται στη συμπληρωματική δράση της β-γλυκοζιδάσης που έχει η ζύμη UCLM S325, και αυξάνει το αρωματικό δυναμικό των ποικιλιών που διαθέτουν

τερπένια, όπως το μοσχοφίλερο (*www.fermentis.com*). Στους 4 οίνους της ζύμης UCLM η συγκέντρωση ανήλθε στα 2.60 mg/L, χωρίς να υπάρχει κάποια διαφορά μετά την μηλογαλακτική ζύμωση. Έρευνα των Metafa & Economou (2013) σε 2 οίνους από Μοσχοφίλερο του εμπορίου έδειξε ότι η συγκέντρωση της ελεύθερης κιτρονελόλης ανήλθε περίπου στα 36 mg/L, η οποία είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή που βρέθηκε στους οίνους της παρούσας εργασίας.

Η λιναλοόλη είχε συγκέντρωση περίπου 1.86 mg/L για τους 4 οίνους της ζύμης VIVACE, και παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της συγκέντρωσή της από τη μηλογαλακτική ζύμωση. Στους οίνους της ζύμης UCLM S325 η λιναλοόλη ανήλθε στα 1.91 mg/L, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Έρευνα των Metafa & Economou (2013) σε 2 οίνους από Μοσχοφίλερο του εμπορίου έδειξε ότι η συγκέντρωση της ελεύθερης λιναλοόλης ανήλθε περίπου στα 36-43 mg/L, η οποία είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή που βρέθηκε στους οίνους της παρούσας εργασίας.

5.5. Διακετύλιο μέσω GC-ECD

Το διακετύλιο παράγεται από τον μεταβολισμό του κιτρικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, και είναι υπεύθυνο για το άρωμα βουτύρου / καραμέλας βουτύρου που μπορεί να ανιχνευθεί στους οίνους (Bartowsky & Borneman 2011, Bauer & Dicks 2004). Στο Διάγραμμα 12 απεικονίζεται η συγκέντρωση του διακετυλίου στους 8 οίνους της παρούσας εργασίας.



Διάγραμμα 12: Συγκέντρωση διακετυλίου που βρέθηκε στους 8 οίνους (τα διαφορετικά πεζά γράμματα ιδίου χρώματος υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των οίνων με ή χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση της ίδιας ζύμης (VIVACE και UCLM S325), ενώ τα διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο οίνων (VIVACE και UCLM S325) του ιδίου γαλακτικού βακτηρίου)

Αν και οι ζύμες έχουν τη δυνατότητα να παράξουν και αυτές διακετύλιο κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, λόγω των αναγωγικών συνθηκών που επικρατούν στο τέλος της, το περισσότερο από αυτό το διακετύλιο μεταβολίζεται περαιτέρω σε ακετοΐνη και 2,3-βουτανεδιόλη (Bartowsky & Henschke 2004). Έτσι, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 12, στους δύο μάρτυρες VIV και UCLM δεν ανιχνεύθηκε διακετύλιο.

Για τους οίνους της ζύμης VIVACE που έκαναν μηλογαλακτική ζύμωση, οι οίνοι με τα γαλακτικά βακτήρια Oenos και CH16 είχαν διακετύλιο 1.52 ± 0.19 και 0.99 ± 0.09 mg/L, αντίστοιχα. Ο οίνος με το βακτήριο Cine παρουσίασε μόνο ίχνη διακετυλίου (<0.05 mg/L), αφού το συγκεκριμένο στέλεχος δεν μπορεί να μεταβολίσει το κιτρικό οξύ, και κατ' επέκταση να παράξει διακετύλιο (*www.chr-hansen.com*). Η ελάχιστη ποσότητα αυτή του διακετυλίου ίσως οφείλεται στην παράλληλη δράση των ιθαγενών γαλακτικών βακτηρίων. Για τους οίνους της ζύμης UCLM S325 που έκαναν μηλογαλακτική ζύμωση, οι οίνοι με τα γαλακτικά βακτήρια Oenos και CH16 είχαν διακετύλιο 0.62 ± 0.05 και 0.52 ± 0.03 mg/L, αντίστοιχα. Ο οίνος με το βακτήριο Cine παρουσίασε και πάλι ίχνη διακετυλίου (<0.05 mg/L).

Όπως φαίνεται μετά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων ανά ζύμη, το στέλεχος Oenos είναι ικανό να παράξει υψηλότερη ποσότητα διακετυλίου σε σχέση με το CH16, ενώ και τα δύο διαφέρουν σημαντικά από τις μηδενικές συγκεντρώσεις του μάρτυρα και του Cine (Διάγραμμα 12). Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι η ποσότητα του διακετυλίου που θα παραχθεί εξαρτάται από το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που θα την διεξάγει (Bartowsky & Henschke 2004, Martineau et al. 1995b). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι οι οίνοι της ζύμης VIVACE που έκαναν μηλογαλακτική ζύμωση με τα βακτήρια Oenos και CH16, είχαν περισσότερο διακετύλιο σε σχέση με τους αντίστοιχους οίνους της ζύμης UCLM S325, γεγονός που επιβεβαιώθηκε μετά από τη στατιστική επεξεργασία ανά βακτήριο (Διάγραμμα 12, κεφαλαία γράμματα). Η παραγωγή του διακετυλίου εξαρτάται, επίσης, από την συγκέντρωση των υπολειπόμενων σακχάρων του οίνου, και συγκεκριμένα, όσο υψηλότερη η συγκέντρωση αναγόντων σακχάρων, τόσο χαμηλότερη παραγωγή διακετυλίου (Bartowsky & Henschke 2004, Martineau et al. 1995b). Έτσι, μετά από τη μέτρηση των αναγόντων σακχάρων των δύο μαρτύρων, βρέθηκε ότι ο μάρτυρας της ζύμης VIVACE είχε 0.816 g/L και της UCLM S325 0.996 g/L. Επομένως, ίσως αυτή η διαφορά στη συγκέντρωση του διακετυλίου ανάμεσα στους οίνους με μηλογαλακτική ζύμωση των δύο ζυμών, να οφείλεται εν μέρη στη διαφορετική συγκέντρωση αναγόντων σακχάρων των δύο οίνων.

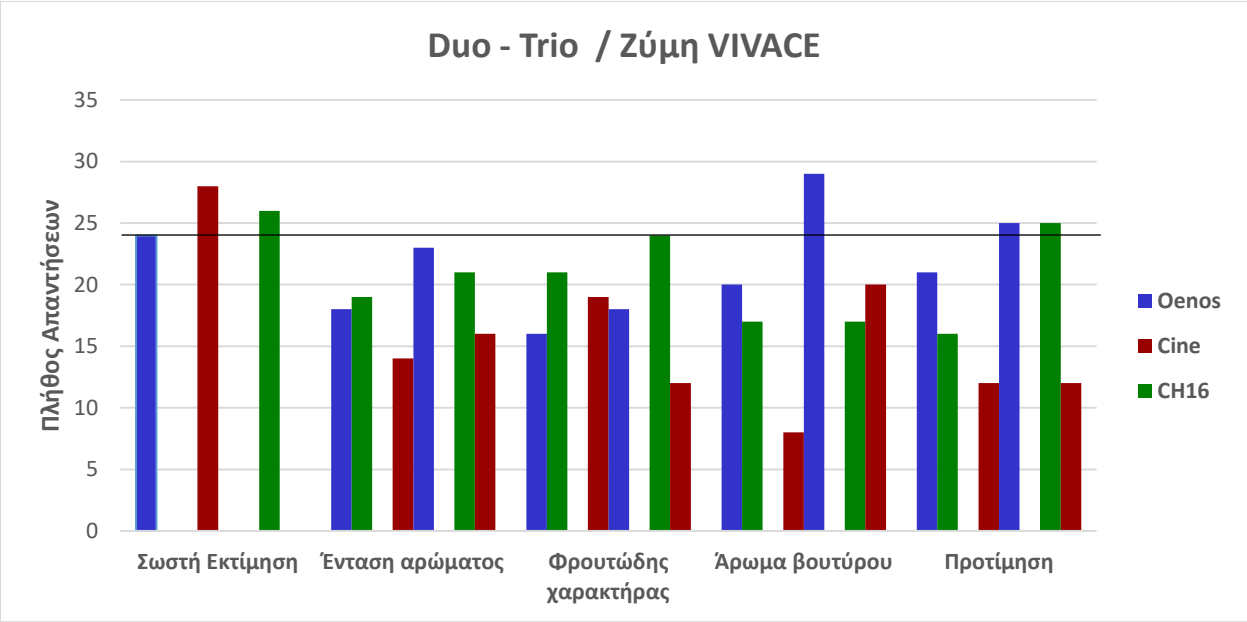
Συνολικά, στους οίνους του Μοσχοφίλερου με μηλογαλακτική ζύμωση, από τα βακτήρια Oenos και CH16, η συγκέντρωση του διακετυλίου κυμάνθηκε από 0.5 έως 1.5 mg/L. Έρευνες των Bartowsky et al. (1997, 2002a, 2002b) σε λευκούς οίνους της Αυστραλίας έδειξαν ότι το περιεχόμενό τους σε διακετύλιο ήταν μεταξύ 0.3 και 0.7 mg/L. Οι Martineau et al. (1995b) αναλύοντας 41 εμπορικούς οίνους Chardonnay, βρήκαν ότι κυμαινόταν από 0.0005 έως 1.7 mg/L. Σε προηγούμενες έρευνες σε λευκά κρασιά των Dittrich & Kernel (1964) και των Fornachon & Lloyd (1965), η συγκέντρωσή του βρέθηκε 0.2 - 0.6 mg/L, και 0.1 - 2.3 mg/L, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η συγκέντρωση του διακετυλίου στους οίνους της παρούσας εργασίας κυμάνθηκε στα φυσιολογικά πλαίσια ενός λευκού ξηρού οίνου.

5.6. Οργανοληπτικός έλεγχος

Στον 1ο οργανοληπτικό έλεγχο έλαβαν μέρος 17 δοκιμαστές, ενώ στον 2ο 20. Για τα τεστ Duo-Trio, αφού τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου επεξεργάσθηκαν, ελέγχθηκε η σημαντική διαφορά των δύο δειγμάτων σύμφωνα με τους πίνακες των Roessler et al. (1956), για πιθανότητα σωστών απαντήσεων από τύχη Ho=1/2, και επίπεδο σημαντικότητας p=0.05. Έτσι για τις απαντήσεις των 17 δοκιμαστών, θα έπρεπε να είναι ίδιες τουλάχιστον οι 13, για να έχουν τα δύο δείγματα στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, ενώ για τους 20 δοκιμαστές θα έπρεπε τουλάχιστον οι 15 να είναι ίδιες. Για τα τεστ κατάταξης, ο έλεγχος της σημαντικής διαφοράς μεταξύ των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τους πίνακες των Kramer et al. (1963) για επίπεδο σημαντικότητας p=0.05. Έτσι, στον 1ο οργανοληπτικό που συμμετείχαν 17 δοκιμαστές, θα έπρεπε κάποιο δείγμα να είχε συγκεντρώσει συνολική βαθμολογία είτε μικρότερη του 32, είτε μεγαλύτερη του 53 για να έχει σημαντική στατιστικά διαφορά από τα υπόλοιπα. Στον 2ο οργανοληπτικό που συμμετείχαν 20 δοκιμαστές, θα έπρεπε κάποιο δείγμα να είχε συγκεντρώσει συνολική βαθμολογία είτε μικρότερη του 39, είτε μεγαλύτερη του 61 για να έχει σημαντική στατιστικά διαφορά από τα υπόλοιπα. Στα παρακάτω Διαγράμματα 13 - 20, φαίνονται τα αποτελέσματα των δύο οργανοληπτικών ελέγχων.

Οίνοι ζύμης VIVACE

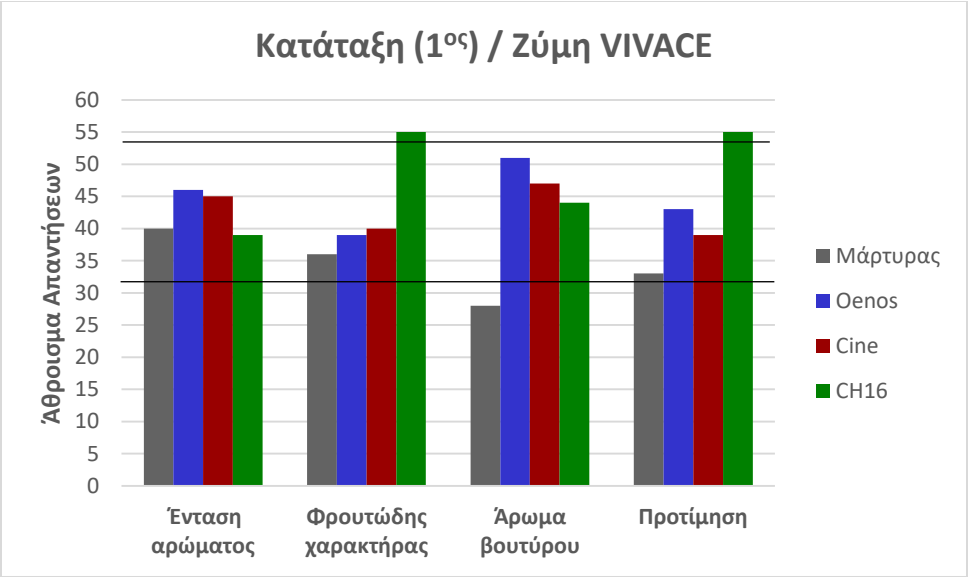
Στο Διάγραμμα 13 φαίνονται τα αποτελέσματα των τεστ Duo-Trio των οίνων της ζύμης VIVACE, των οργανοληπτικών ελέγχων.



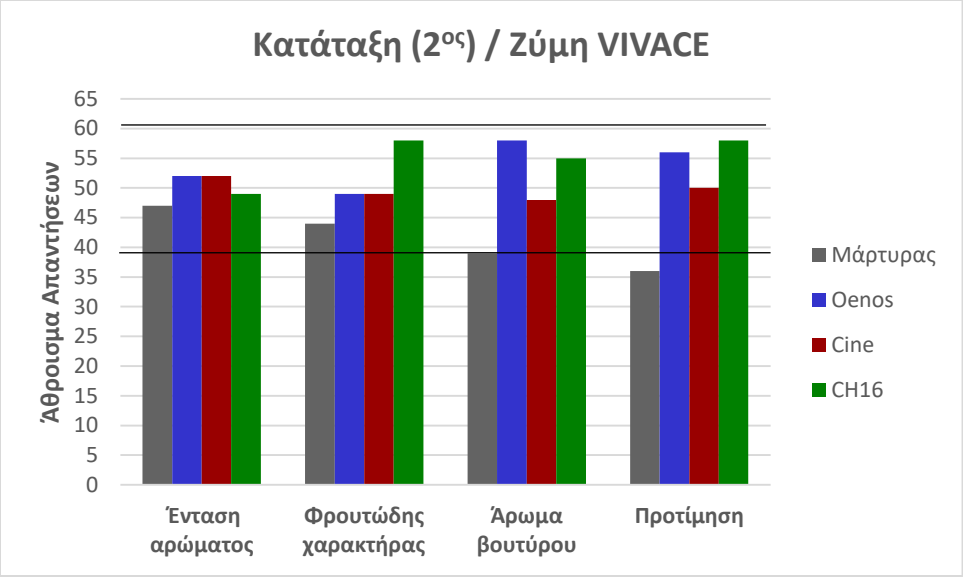
Διάγραμμα 13: Τα αποτελέσματα των 3 τεστ Duo-Trio των οίνων της ζύμης VIVACE των οργανοληπτικών ελέγχων. Τα αποτελέσματα είναι ομαδοποιημένα στα 3 ζεύγη του κάθε τεστ για κάθε χαρακτηριστικό. Η μαύρη γραμμή υποδηλώνει το όριο πάνω από το οποίο υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων.

Σύμφωνα με το παραπάνω διαγράμμα, οι δοκιμαστές βρήκαν σημαντικά στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Όσον αφορά την ικανότητά τους να βρουν το ίδιο δείγμα με τον οίνο αναφοράς R, και στα 3 τεστ υπήρξε επιτυχία, γεγονός που υποδηλώνει ότι όντως τα δείγματα του κάθε ζεύγους διέφεραν μεταξύ τους. Όσον αφορά την ένταση του αρώματος δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, ενώ στο φρουτώδη χαρακτήρα ξεχώρισε ο οίνος του βακτηρίου CH16 σε σχέση με το Cine. Στο άρωμα βουτύρου το γαλακτικό βακτήριο Oenos φαίνεται να έχει στατιστικά εντονότερο άρωμα βουτύρου από το Cine. Η προτίμηση των δοκιμαστών ήταν σημαντική, υπέρ των βακτηρίων Oenos και CH16 έναντι του Cine, γεγονός που δείχνει μία χαμηλότερη προτίμηση στον οίνο που είχε διεξάγει μηλογαλακτική ζύμωση με το βακτήριο Cine.

Στα Διαγράμματα 14 & 15 φαίνονται τα αποτελέσματα του τεστ κατάταξης των οίνων της ζύμης VIVACE, για τον 1ο και τον 2ο οργανοληπτικό έλεγχο, αντίστοιχα.



<u>Διάγραμμα 14:</u> Τα αποτελέσματα του τεστ κατάταξης των οίνων της ζύμης VIVACE του 1ου οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μαύρες γραμμές υποδηλώνουν τα όρια εκτός των οποίων υπάρχει σημαντική διαφορά του δείγματος σε σχέση με τα υπόλοιπα.

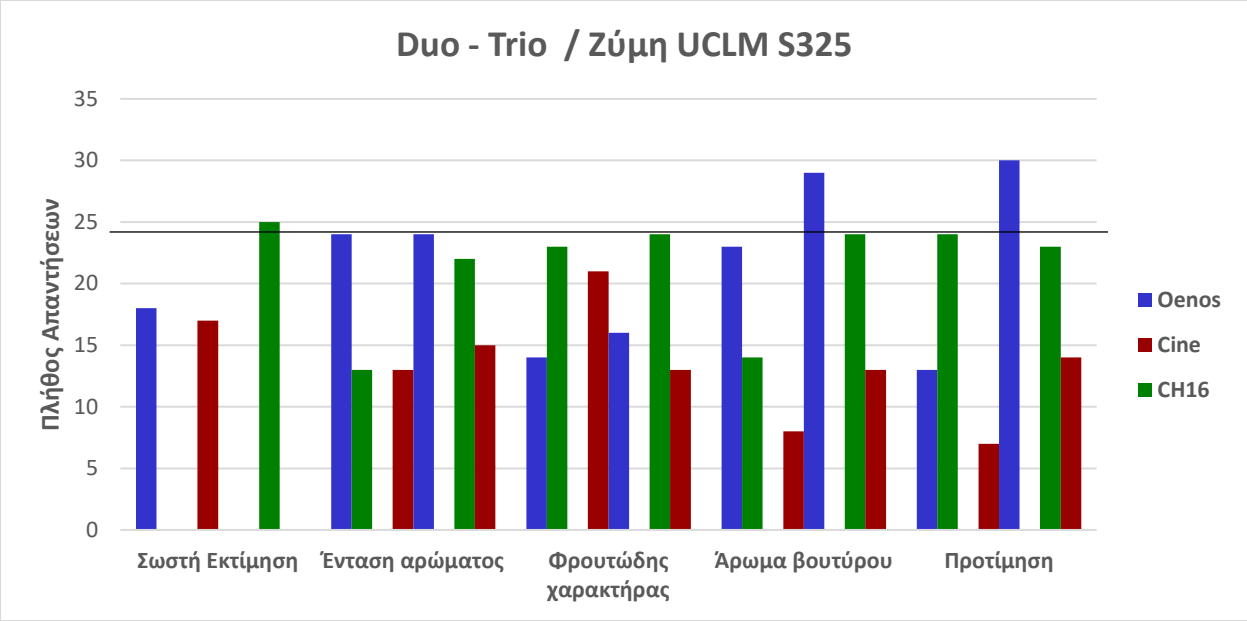


<u>Διάγραμμα 15:</u> Τα αποτελέσματα του τεστ κατάταξης των οίνων της ζύμης VIVACE του 2ου οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μαύρες γραμμές υποδηλώνουν τα όρια εκτός των οποίων υπάρχει σημαντική διαφορά του δείγματος σε σχέση με τα υπόλοιπα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι υπήρχαν κάποιες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Στην ένταση του αρώματος, δεν φάνηκε να ξεχωρίζει κάποιος οίνος και, επομένως, η μηλογαλακτική ζύμωση δεν είχε κάποια σημαντική επίδραση. Όσον αφορά τον φρουτώδη χαρακτήρα, ξεχώρισε το βακτήριο CH16 και στους δύο οργανοληπτικούς ελέγχους, αλλά μόνο στον πρώτο είχε στατιστικά εντονότερο φρουτώδη χαρακτήρα. Όσον αφορά το άρωμα βουτύρου, ο μάρτυρας πήρε και στους δύο οργανοληπτικούς τη χαμηλότερη βαθμολογία, υποδεικνύοντας έτσι τη στατιστικά σημαντική διαφορά του από τα υπόλοιπα δείγματα. Επίσης, στην ένταση του αρώματος βουτύρου φαίνεται να παίρνει την πρώτη θέση ο οίνος με μηλογαλακτική ζύμωση από το βακτήριο Oenos, χωρίς όμως να έχει σημαντική διαφορά από τους άλλους δύο οίνους. Τέλος, στην προτίμηση κάποιου από τους 4 οίνους, φαίνεται να μην προτιμάται ο οίνος χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση και να υπάρχει μία προτίμηση στον οίνο με μηλογαλακτική ζύμωση από το βακτήριο CH16, που όμως είναι στατιστικά σημαντικές μόνο στον έναν από τους δύο οργανοληπτικούς ελέγχους.

<u>Οίνοι ζύμης UCLM S325</u>

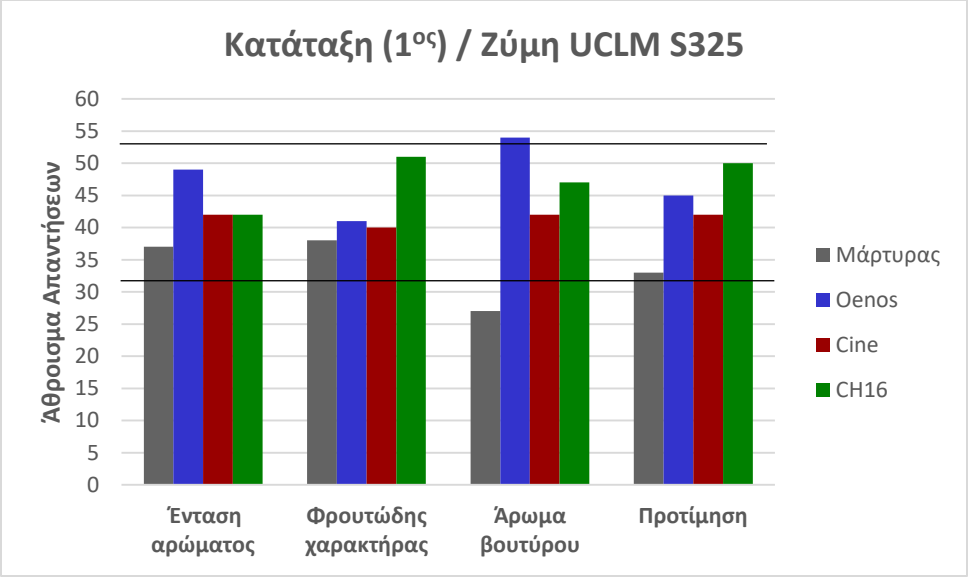
Στο Διάγραμμα 16 φαίνονται τα αποτελέσματα των τεστ Duo-Trio των οίνων της ζύμης UCLM, των οργανοληπτικών ελέγχων.



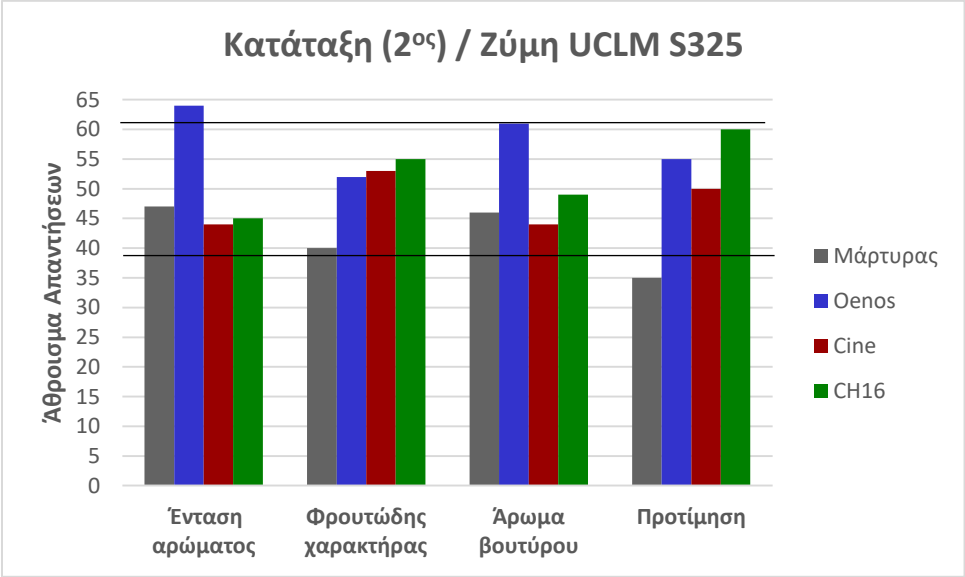
<u>Διάγραμμα 16:</u> Τα αποτελέσματα των 3 τεστ Duo-Trio των οίνων της ζύμης UCLM S325 των οργανοληπτικών ελέγχων.. Τα αποτελέσματα είναι ομαδοποιημένα στα 3 ζεύγη του κάθε τεστ για κάθε χαρακτηριστικό. Η μαύρη γραμμή υποδηλώνει το όριο πάνω από το οποίο υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, οι δοκιμαστές βρήκαν πολλές σημαντικά στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Όσον αφορά την ικανότητά τους να βρουν το ίδιο δείγμα με τον οίνο αναφοράς R, βρήκαν σημαντική διαφορά μόνο μεταξύ των δειγμάτων CH16 και Cine. Ένταση αρώματος φάνηκε να έχει την υψηλότερη ο οίνος που είχε κάνει μηλογαλακτική ζύμωση με το βακτήριο Oenos, και μάλιστα ξεχώρισε σημαντικά και από τα άλλα δύο βακτήρια. Στον φρουτώδη χαρακτήρα το βακτήριο CH16 φάνηκε να υπερέχει σημαντικά έναντι του βακτηρίου Cine. Όσον αφορά το άρωμα βουτύρου, το βακτήριο Cine είχε λιγότερο από τα άλλα δύο στελέχη, και μάλιστα αυτή η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική. Ανάμεσα στους οίνους του βακτηρίου Oenos και CH16, οι δοκιμαστές προτίμησαν τον οίνο του CH16, ενώ ανάμεσα στα Cine και Oenos, οι δοκιμαστές προτίμησαν εμφανώς το Oenos.

Στα Διαγράμματα 17 & 18 φαίνονται τα αποτελέσματα του τεστ κατάταξης των οίνων της ζύμης UCLM S325, για τον 1^{ο} και τον 2^{ο} οργανοληπτικό έλεγχο, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 17: Τα αποτελέσματα του τεστ κατάταξης των οίνων της ζύμης UCLM S325 του 1ου οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μαύρες γραμμές υποδηλώνουν τα όρια εκτός των οποίων υπάρχει σημαντική διαφορά του δείγματος σε σχέση με τα υπόλοιπα.



Διάγραμμα 18: Τα αποτελέσματα του τεστ κατάταξης των οίνων της ζύμης UCLM S325 του 2ου οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μαύρες γραμμές υποδηλώνουν τα όρια εκτός των οποίων υπάρχει σημαντική διαφορά του δείγματος σε σχέση με τα υπόλοιπα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι υπήρχαν κάποιες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Στην ένταση του αρώματος, φάνηκε να ξεχωρίζει το γαλακτικό βακτήριο Oenos, αλλά μόνο στον δεύτερο οργανοληπτικό έλεγχο είχε στατιστικά εντονότερο άρωμα, από τους

υπόλοιπους οίνους. Όσον αφορά τον φρουτώδη χαρακτήρα, δε ξεχώρισε κάποιος οίνος, αν και φάνηκε να προηγείται το βακτήριο CH16. Όσον αφορά το άρωμα βουτύρου, ο μάρτυρας πήρε και στους δύο οργανοληπτικούς τη χαμηλότερη βαθμολογία, ενώ ο οίνος του βακτηρίου Oenos συγκέντρωσε την υψηλότερη, ξεχωρίζοντας στατιστικά από τους υπόλοιπους οίνους και στους δύο ελέγχους. Τέλος, στην προτίμηση κάποιου από τους 4 οίνους, φαίνεται να μην προτιμάται ο οίνος χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση και να υπάρχει μία προτίμηση στον οίνο με μηλογαλακτική ζύμωση από το βακτήριο CH16, που όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.

6. Συμπεράσματα

Οι οίνοι από την ποικιλία Μοσχοφίλερο, όταν αυτή καλλιεργείται στο οροπέδιο της Μαντινείας στην Αρκαδία, είναι ως συνήθως οίνοι υψηλής οξύτητας και μέτριου αλκοολικού βαθμού, μέτριου σώματος, με χαρακτηριστικό άρωμα και σχετικά καλή επίγευση. Η παρούσα εργασία είχε ως αντικείμενο τη μελέτη της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε οίνους Μοσχοφίλερου, ως έναν τρόπο για τη βελτίωση κάποιων χαρακτηριστικών είτε τεχνολογικού είτε οργανοληπτικού ενδιαφέροντος. Για το λόγο αυτό, μετά την παραγωγή δύο διαφορετικών οίνων Μοσχοφίλερου από τους ζυμομύκητες του είδους *S. cerevisiae,* VIVACE (Renaissance Yeast, Canada) και UCLM S325 (Fermentis, France), ακολούθησε ο εμβολιασμός με τα γαλακτικά βακτήρια του είδους *O. Oeni,* των Viniflora Oenos, Viniflora Cine και Viniflora CH16 (Chr. Hansen, Denmark).

Οι δύο ζύμες παρουσίασαν διαφορά στην ολική οξύτητα, καθώς το στέλεχος VIVACE είναι ικανό να μεταβολίσει έως και το 30% του μηλικού οξέος, και κατ΄ επέκταση στο pH των οίνων. Ακόμη, διαφοροποιήθηκαν μερικώς στα πτητικά συστατικά που συνεισφέρουν στο άρωμα των οίνων, με τη ζύμη VIVACE να υπερέχει στις συγκεντρώσεις των εστέρων των ανώτερων αλκοολών, και τη ζύμη UCLM S325 στα τερπένια.

Η εφαρμογή της μηλογαλακτικής ζύμωσης μέσω των τριών γαλακτικών βακτηρίων επέφερε σημαντικές αλλαγές στον οίνο. Μεταβολίστηκε το μηλικό οξύ, του οποίου η συγκέντρωση ήταν υψηλή στους οίνους μάρτυρες, και φάνηκε ότι το βακτήριο Cine καταναλώνει το περισσότερο μηλικό οξύ, αλλά αδυνατεί να μεταβολίσει το κιτρικό οξύ. Έτσι, δεν παράγει τόσο οξικό οξύ όσο τα άλλα δύο βακτήρια, τα οποία αύξησαν τη συγκέντρωσή του. Στα πτητικά συστατικά του αρώματος των οίνων που μελετήθηκαν δεν φάνηκαν σοβαρές μεταβολές μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Την σπουδαιότερη αλλαγή την επέφερε το γαλακτικό βακτήριο CH16 στον οίνο της ζύμης UCLM S 325. Όσον αφορά το διακετύλιο, φάνηκε ότι το στέλεχος Oenos είναι ικανό να παράξει περισσότερο διακετύλιο σε σχέση με το CH16, ενώ το στέλεχος Cine δεν παράγει καθόλου, αφού δεν μπορεί να μεταβολίσει το κιτρικό οξύ.

Τέλος, ο οργανοληπτικός έλεγχος των 8 οίνων έδειξε ότι σε γενικές γραμμές η μηλογαλακτική ζύμωση αύξησε την ένταση του αρώματος, τον φρουτώδη χαρακτήρα, το άρωμα βουτύρου και την προτίμηση του οίνου από τους δοκιμαστές. Πιο αναλυτικά, φάνηκε το βακτήριο

Oenos να αυξάνει την ένταση του αρώματος, καθώς και του βουτύρου, ενώ το βακτήριο CH16 αύξησε τον φρουτώδη χαρακτήρα και προτιμήθηκε σε σχέση με τα υπόλοιπα.

Συμπερασματικά, όντως η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να προταθεί ως ένας εναλλακτικός τρόπος παραγωγής λευκών ξηρών οίνων από την ποικιλία Μοσχοφίλερο, αφού όμως επιλεχθεί το σωστό στέλεχος γαλακτικού βακτηρίου με την κατάλληλη ζύμη. Η εφαρμογή της μηλογαλακτικής ζύμωσης έχει τεχνολογικό ενδιαφέρον, καθώς μειώνει τον κίνδυνο μικροβιακών αλλοιώσεων, αλλά και ποιοτικό, καθώς αυξάνει την αποδοχή του προϊόντος από τους καταναλωτές. Ίσως κρίνεται αναγκαία σε οίνους με τόσο υψηλή συγκέντρωση μηλικού οξέος, γιατί εκτός από όλα αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι ένας πιο φυσικός τρόπος μείωσης της οξύτητας. Σε τέτοιους οίνους που είναι απαραίτητη η μείωση της όξινης γεύσης, η μείωση του μηλικού οξέος για την επιθυμητή οξύτητα του τελικού οίνου, ίσως προτιμάται από την αντίστοιχη μείωση του τρυγικού οξέος, καθώς στην περίπτωση του μηλικού είναι μικρότερη η αύξηση του pH, που βοηθά στην καλύτερη συντήρηση του οίνου κατά τη παλαίωσή του.

7. Βιβλιογραφία

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

Σουφλερός, Ε. (2000). *Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τομός Ι.* Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.

Σουφλερός, Ε. (2000). *Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τομός ΙΙ.* Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.

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

Συμεού, Ε. (2010). Διδακτορική Διατριβή: *Μελέτη των φαινολικών συστατικών σταφυλιών και οίνου, Χίου και Νεμέας και της επίδρασης των ενζύμων και άλλων παραμέτρων σε αυτά,* Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Τσακίρης Α. (2014). *Οινολογία, από το σταφύλι στο κρασί, 4η Έκδοση.* Αθήνα: Εκδόσεις Ψύχαλου.

Τσέτουρας, Π. (2008). *Οινοτεχνία, Η Επιστήμη του κρασιού στην πράξη, ISO 22000*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.

Bartowsky E.J., Burvill T.B., Henschke P.A. (1997). Diacetyl in wine: role of malolactic bacteria and citrate. *Aust. Grapegrow. Winemak.* 402a, 130–135.

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

Bartowsky E.J., Francis I.L., Bellon J.R., Henschke P.A., (2002b). Is buttery aroma perception in wines predictable from diacetyl concentration? *Aust. J. Grape Wine Res*. 8, 180–185.

Bartowsky E.J. & Henschke P.A. (2004). The ‘buttery’ attribute of wine - diacetyl - desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 235–252.

Bartowsky E. J. & Borneman A. R. (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl. Microbial Biotechnol*, 92, 441-447.

Bauer K., Garbe D., Surburg H. (1997). *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH.

Bauer R. & Dicks L.M.T. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 25, No. 2, 74-88

Burdock G. A., (2010). *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, Sixth Edition*. U.S.A: CRC Press.

Darias-Martín, J., Rodríguez, O., Díaz, E., & Lamuela-Raventós, R. M. (2000). Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chemistry*, 71, 483–487.

Delaquis P., Cliff M., King M., Girard B., Hall J. & Reynolds A. J. (2000). Effect of two commercial malolactic cultures on the chemical and sensory properties of Chancellor wines vinified with different yeast and fermentation temperatures. *Am. J. Enol. Vitic*. 2000, 51, 42-48.

Dittrich, H. H. & Kerner E. (1964). Diacetyl als weinfehler ursache und beseitigung des "milchsauretones". *Wein Wess*. 19, 528-535

Dourtoglou V., Antonopoulos A., Dourtoglou T., & Lalas S. (2014). Discrimination of varietal wines according to their volatiles. *Food Chemistry*, 159, 181–7.

Du Plessis H. W., Steger C. L. C., du Toit M. & Lambrechts M. G. (2002). The occurrence of malolactic fermentation in brandy base wine and its influence on brandy quality. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 1005-1013.

Fornachon, J. C. M., and Lloyd B., (1965). Bacterial production of diacetyl and acetoin in wine. *J. Sci. Food Agric*. 16, 710-716

Hernanz, D., Recamales, A. F., Gonzalez-Miret, M. L., Gómez-Míguez, M. J., Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2007). Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale. *Journal of Food Engineering*, 80, 327-335.

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

Gómez-Míguez, J., Gonzalez-Miret, L., Hernanz, D., Fernandez, A. , Vicario, I. & Heredia, F. J. (2007). Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*, 78, 238-245

International Organization of Vine and wine, (2012), *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*, Vol 2, OIV, Paris

Jackson R. S., (2002). *Wine tasting: a professional handbook*. U.K.: Elsevier Academic Press.

Jackson, R. S. (2008). *Wine science: principles and applications* (pp. 270-331). San Diego: Academic Press.

Krieger, S.A., Lempere, E., Ernst, M., 2000. Management of malolactic fermentation with regard to flavour modification. Session 3B, Flavour modification in the winery: microbiological. *Proceedings of 5th International Symposium on Cool Climate Viticulture and Oenology*. 16 – 20 January, 2000, Melbourne, Australia, 1 – 4.

Knoll C., Fritsch F., Schnell S., Grossmann M., Rauhut D. & du Toit M. (2011) Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *Food Science and Technology*, 44, 2077-2086.

Kramer A., Modery M., Twigg B., Coole F., & Cooler, J. (1963). Numbers of tasters required to determine consumer preferences for fruit drinks. *Food Technology*, 17(3), 322.

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, 491-496.

Makris, D. P., Psarra, E., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2003). The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Research International*, 36, 805–814.

Martineau, B., Acree, T.E., Henick-Kling, T., 1995a. Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Res. Int*. 28, 139– 143.

Martineau, B., Henick-Kling, T., Acree, T., 1995b. Reassessment of the influence of malolactic fermentation on the concentration of diacetyl in wines. *Am. J. Enol. Vitic*. 46, 385– 388.

Metafa M. & Economou A. (2013) Comparison of solid-phase extraction sorbents for the fractionation and determination of important free and glycosidically-bound varietal aroma compounds in wines by gas chromatography-mass spectrometry. *Cent. Eur. J. Chem.* 11:228–247

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

Peynaud E. & Blouin J. (1996). *The Taste of Wine: The Art Science of Wine Appreciation.* WFest Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd.

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8729–8735.

De Revel G. & Bertrand A. (1993). A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal. *J Sci Food Agric*, 61, 267-272.

Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006a). *Handbook of Enology. The microbiology of wine and vinifications (Vol. 1)* (pp. 115-182). WFest Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd.

Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006b). *Handbook of Enology. The chemistry of wine stabilization and treatments (Vol. 2)* (pp. 141-204). West Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd.

Roessler E. B., Baker G. A., & Amerine, M. A. (1956). One-tailed and two-tailed tests in organoleptic comparisons. *Journal of Food Science*, *21*(1), 117-121.

Rogerson F. & Symington C. (2013). Enzyme-catalyzed modulation of the typicity of touriga nacional aroma and flavor. *in: Understanding varietal aromas during alcoholic and malolactic fermentations*. 23-37. Lalemand. Lisbon, Portugal.

Rojas V., Gil J.V., Pinaga F. & Manzanares P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. of Food Microbiology*, 70, 283-289.

Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T., Erten, H., Lepoutre, J.-P. & Gunata, Z. (2006). Effect of skin contact on the free and bound aroma compounds of the white wine of Vitis vinifera L. cv Narince. *Food Control*, 17, 75-82.

Sánchez-Palomo E., Garcia-Carpintero G. E. & Vinas G. M. A. (2015). Aroma fingerprint characterization of La Mancha red wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*,Vol. 36, 117-125.

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10134–10139.