



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
I) ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ II) ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών γαλακτικών βακτηρίων  
κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση σε ερυθρό οίνο της ποικιλίας Αγιωργίτικο

**Γεωργία Ελισσάβετ Α. Ζάββου**

Επιβλέπων καθηγητής:

Κοτσερίδης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οινολογίας

**ΑΘΗΝΑ  
2022**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών γαλακτικών βακτηρίων κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση σε ερυθρό οίνο της ποικιλίας Αγιωργίτικο

Study of the effect of different strains of lactic bacteria during malolactic fermentation in red wine of Agiorgitiko variety

**Γεωργία Ελισσάβη Α. Ζάββου**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κοτσερίδης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής ΓΠΑ

## **Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών γαλακτικών βακτηρίων κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση σε ερυθρό οίνο της ποικιλίας Αγιωργίτικο**

*ΠΜΣ Τεχνολογία Οίνου & Αποσταγμάτων  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Οινολογίας & Αλκοολούχων Ποτών*

### **Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η**

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή αποσκοπεί στην διερεύνηση της επίδρασης της μηλογαλακτικής ζύμωσης με χρήση διαφορετικών γαλακτικών βακτηρίων σε ερυθρό οίνο, ποικιλίας Αγιωργίτικο. Η πρώτη ύλη προήλθε από την Π.Ο.Π. αμπελουργική περιοχή της Νεμέας. Η μελέτη της επίδρασης σχετίζεται με τα διαφορετικά στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, η μηλογαλακτική ζύμωση έλαβε χώρα: πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης με χρήση γαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus plantarum*, μετά την αλκοολική ζύμωση με χρήση γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus oeni*, ή μετά την αλκοολική ζύμωση με γηγενή γαλακτικά βακτήρια-αυθόρμητα. Επίσης συμπεριλήφθηκε στα προς μελέτη δείγματα οίνος στον οποίο αποτράπηκε η διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης με θείωση.

Σκοπός, λοιπόν, της συγκεκριμένης διατριβής αποτελεί η παρακολούθηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης με τη χρήση διαφορετικών στελεχών γαλακτικών βακτηρίων και ο εντοπισμός και η αποτύπωση των διαφορών στους παραχθέντες οίνους. Η παρακολούθηση της ζύμωσης έγινε καθημερινά με μέτρηση των οργανικών οξέων, των χρωματικών και των φαινολικών συστατικών των οίνων ενώ οι οίνοι εξετάστηκαν τόσο ως προς τη χημική τους σύσταση ως προς τα φαινολικά συστατικά όσο και ως προς το οργανοληπτικό τους προφίλ.

Οι παράμετροι στις οποίες δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή αφορούσαν αναλύσεις φαινολικών συστατικών. Επίσης διενεργήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος από εκπαιδευμένο πάνελ δοκιμαστών με εφαρμογή της περιγραφικής ανάλυσης και αξιολόγηση των οίνων ως προς τα αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά τα οποία συνδέονται άμεσα με τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων.

Από την συγκεκριμένη μελέτη αποδείχτηκε ότι η χρήση επιλεγμένων γαλακτικών βακτηρίων, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη σύσταση των παραγόμενων οίνων, τους βελτιώνει και τους προφυλάσσει από τυχόν αλλοιώσεις. Οργανοληπτικά, εμπλουτίζει το αρωματικό προφίλ και αναδεικνύει τα φρουτώδη αρώματα, τυπικά της ποικιλίας. Επίσης στον οίνο που η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε πριν την αλκοολική ζύμωση, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη επίδραση στα αρωματικά χαρακτηριστικά, ενεργώντας θετικά, ενώ στα δείγματα που η μηλογαλακτική πραγματοποιήθηκε μετά την αλκοολική ζύμωση, παρατηρήθηκε θετική επίδραση στα χρωματικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Επομένως, άμεσα μπορεί η επιλογή των γαλακτικών βακτηρίων να συνδυαστεί με τον τρόπο παλαίωσης ή όχι του παραγόμενου οίνου.

**Επιστημονική περιοχή:** Οινολογία

**Λέξεις κλειδιά:** Αγιωργίτικο, μηλογαλακτική ζύμωση, γαλακτικά βακτήρια, φαινολικά συστατικά, οργανοληπτικό προφίλ HPLC.

## **Study of the effect of different strains of lactic bacteria during malolactic fermentation in red wine of Agiorgitiko variety**

*MSc Wine & Spirits Technology  
Department of Food Science & Human Nutrition  
Laboratory of Oenology & Alcoholic Drinks*

### **ABSTRACT**

The current end of study project aims to investigate the effect of malolactic fermentation using different lactic bacteria on red wine of Agiorgitiko variety. The grapes came from the area of Nemea. The study examines the effect of the different strains of lactic bacteria used. Specifically, malolactic fermentation took place: before the beginning of alcoholic fermentation using lactic bacteria of *Lactobacillus plantarum*, after alcoholic fermentation using lactic bacteria of *Oenococcus oeni*, or after alcoholic fermentation using indigenous lactic bacteria. A sample in which malolactic fermentation was prevented by sulphation was also used as a control.

The aim of this study is therefore to monitor malolactic fermentation using different strains of lactic bacteria and to identify and document the differences in the wines produced. Fermentation was monitored daily by measuring the organic acids, the phenolic components of the wine and the samples were examined both in terms of their chemical composition in terms of phenolic components and their organoleptic profile.

The parameters to which particular attention was paid concerned analyses of the phenolic components. An organoleptic test was also carried out by a trained panel of tasters using descriptive analysis to ensure the correct evaluation and comparison of the wines produced in terms of the qualitative characteristics (taste, aroma) of each wine, which are directly linked to the results of the chemical analyses.

This study has shown that the use of selected lactic bacteria has a major impact on the wines produced, improving and protecting them from deterioration. Organoleptically, it enriches the aromatic profile and brings out the fruity aromas typical of the variety. Also, in the wine where malolactic fermentation took place before alcoholic fermentation, a greater effect on the aromatic characteristics was observed, with a positive effect, while in the samples where malolactic fermentation took place after alcoholic fermentation, a positive effect on the colour characteristics of the wines produced was observed. Therefore, directly the choice of lactic bacteria can be linked to the way of ageing or not of the wine produced.

**Scientific area:** Oenology

**Key words:** Agiorgitiko, malolactic fermentation, lactic acid bacteria, phenolic compounds, anthocyanins, sensory analysis, HPLC.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οινολογίας του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Οινολογία-Αμπελουργία»

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Κοτσερίδη Γεώργιο που με δέχθηκε στην ομάδα του και στο εργαστήριο του και υπό την επίβλεψη του μπόρεσα να πραγματοποιήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία. Εκτός από τις γνώσεις που μου μετέδωσε, μου κέντρισε το ενδιαφέρον με τις ιδέες του και τη συνεχή του προσπάθεια για εξέλιξη. Τον ευχαριστώ επίσης για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την ενθάρρυνση του και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Σταματίνα Καλλίθρακα και τον Καθηγητή Χημείας κ. Ταραντίλη Πέτρο, οι οποίοι μου μετέδωσαν πολύτιμες γνώσεις κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, καθώς και για την αφιέρωση του πολύτιμου χρόνου τους στην αξιολόγηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κυρία Νίκη Προξενιά, μέλος της Ε.ΔΙ.Π. για την αμέριστη βοήθεια της και το συνεχές της ενδιαφέρον. Η ανταπόκριση της σε κάθε δυσκολία, οι συμβουλές της, οι παροτρύνσεις καθώς και η ευχάριστη διάθεση της, με βοήθησαν να εκτελέσω τα πειράματα μου χωρίς δυσκολία και αναπάντεχα προβλήματα. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω και την υπόλοιπη ομάδα του εργαστηρίου, η οποία με υποδέχθηκε στο εργαστήριο αλλά και ανταποκρίνονταν σε κάθε μου πρόβλημα και δυσκολία κατά την περαίωση της εργασίας μου.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Ανδρέα και Κωνσταντίνα, οι οποίοι είναι δίπλα μου σε κάθε επιλογή μου, με στηρίζουν και με εμπιστεύονται. Ιδιαίτερα, βέβαια, ευχαριστώ την αδερφή μου, Χαρά για όλη την υπομονή που μου δείχνει, για τις στοχευμένες τι συμβουλές και για την δύναμη της.

## Πίνακας περιεχομένων

<b>1.Εισαγωγή</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1Η περιοχή της Νεμέας</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Αγιωργίτικο</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3 Η σύσταση του γλεύκους</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. Τα σάκχαρα.....	10
1.3.2. Τα οργανικά οξέα .....	11
1.3.3. Το άζωτο και τα αμινοξέα.....	12
1.3.4. Τα φαινολικά συστατικά.....	12
1.3.5. Οι αρωματικές ενώσεις.....	15
<b>1.4 Ερυθρή οινοποίηση</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5 Αλκοολική ζύμωση</b> .....	<b>17</b>
<b>1.6 Μηλογαλακτική Ζύμωση</b> .....	<b>19</b>
1.6.1. Εισαγωγή .....	19
1.6.2Τα γαλακτικά βακτήρια στον οίνο .....	23
1.6.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μηλογαλακτική ζύμωση .....	24
1.6.4Η συνεισφορά της μηλογαλακτικής ζύμωσης.....	28
1.6.5 Ανεπιθύμητες μεταβολές της μηλογαλακτικής ζύμωσης.....	32
<b>2.Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1 Οινοποίηση και πειραματική πορεία</b> .....	<b>34</b>
VINIFLORA® NOVA™ .....	35
VINIFLORA® CH11.....	35
VINIFLORA® CH16.....	35
VINIFLORA® CINE™ .....	35
<b>2.2 Τα γαλακτικά βακτήρια</b> .....	<b>36</b>
<b>2.3 Οι αναλύσεις των παραθθέντων οίνων</b> .....	<b>37</b>
<b>2.4 Βασικές αναλύσεις οίνων</b> .....	<b>37</b>
2.4.1 Προσδιορισμός αλκοολικού βαθμού.....	37
2.4.2 Προσδιορισμός ολικής οξύτητας.....	37
2.4.3 Προσδιορισμός ενεργούς οξύτητας .....	37
2.4.4 Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας.....	38
<b>2.5Χρωματικά χαρακτηριστικά</b> .....	<b>38</b>
2.5.1Ένταση και απόχρωση .....	38
2.5.2Δείκτης Φαινολικών Ουσιών .....	38
2.5.3Ολικά Φαινολικά (Μέθοδος Folin-Ciocalteu).....	39
2.5.4Ολικές ανθοκυάνες .....	39

2.5.5 Προσδιορισμός ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	40
2.5.6 Προσδιορισμός ταννινών με τη μέθοδο : Δέσμευση από πρωτεΐνες-BSA	40
2.5.7 Προσδιορισμός ταννινών με προσθήκη μεθυλ-κυτταρίνης (MCP)	41
2.6 Οργανοληπτικός έλεγχος	42
3. Αποτελέσματα	43
3.1 Η κινητική πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης	43
3.1.1 Κινητική πορεία των οξέων κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση	43
3.1.2 Πορεία εξέλιξης pH κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση	45
3.1.3 Πορεία εξέλιξης χρωματικών χαρακτηριστικών κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση.	46
3.2 Βασικές αναλύσεις οίνων	49
3.2.1 Αλκοολικός τίτλος	49
3.2.2 Πτητική οξύτητα	49
3.2.3 Ενεργός οξύτητα / pH	50
3.2.4 Ολική οξύτητα	51
3.3 Χρωματικά χαρακτηριστικά	52
3.3.1 Ένταση / Απόχρωση	52
3.3.2 Δείκτης φαινολικών ουσιών (Δ.Φ.Ο.)	53
3.3.3 Ολικές ανθοκυάνες	54
3.3.4 Folin Ciocalteau	55
3.3.5 Προσδιορισμός ταννινών	56
3.3.6 Ανθοκυάνες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	57
3.4 Οργανοληπτικός έλεγχος	59
4. Συζήτηση - Συμπεράσματα	61
5. Βιβλιογραφία	65

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Η περιοχή της Νεμέας

Η Νεμέα αποτελεί μια ορεινή περιοχή του νομού Κορινθίας, περιτριγυρισμένη από κοιλάδες που σχηματίστηκαν από ποταμούς όπως ο Ασωπός και ο Ξεριάς. Η περιοχή περιλαμβάνει 429.506 στρέμματα, εκ των οποίων τα 25.000 είναι φυτεμένα με την ποικιλία Αγιωργίτικο. Μάλιστα ο οίνος ΠΟΠ Νεμέα, το οποίο καθορίστηκε από το Βασιλικό διάταγμα, αριθμού 539/4-8-1971 (ΦΕΚ 159/Α/14/8/1971) είναι ο μόνος ελληνικός οίνος ΠΟΠ του οποίου η ζώνη εκτείνεται σε δύο περιφερειακές ενότητες της χώρας και αναγνώριζε σαν ονομασία προέλευσης «Νεμέα» δύο τύπους ερυθρών οίνων: ξηρό και γλυκό ποικιλίας Αγιωργίτικο. Το κατά πολύ μεγαλύτερο τμήμα της στο νότιο κεντρικό τμήμα της περιφερειακής ενότητας Κορινθίας, κυρίως στην περιοχή Νεμέας (Νεμέα, Αηδόνια, Αρχαίες Κλεωνές, Γαλατάς, Δάφνη, Καστράκι, Λεόντιο, Πετρί) ενώ μικρότερες εκτάσεις υπάρχουν στις περιοχές Σικυωνών (Μποζικά, Τιτάι) και στις περιοχές Στυμφαλίας (Ασπρόκαμπος, Κεφαλάρι, Ψάρι). Η έκταση της στην περιφερειακή ενότητα Αργολίδας είναι μικρή και εντοπίζεται στο βορειοδυτικό τμήμα της, στις περιοχές Κουτσοποδίου (Μαλανδρένι) και Λυρκείας (Γυμνό). Το υψόμετρο της ζώνης ξεκινάει από τα 90 μέτρα ενώ αγγίζει ακόμα και τα 1000 μέτρα περίπου, με κατά τόπου διαφοροποιήσεις εδαφών και κλιματικών συνθηκών. Για το λόγο αυτό έχει γίνει διαχωρισμός σε τρεις υποζώνες λόγω των διαφορετικών χρόνων συγκομιδής, έντασης χρώματος και οξύτητα το οποίο έμμεσα σχετίζεται με την παραγωγή διαφορετικών τύπων οίνων (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., 1997). Η πρώτη υποζώνη, η πεδινή, εκτείνεται σε υψόμετρο 200-320 μέτρα, η δεύτερη, ημιορεινή, με αμπελοτόπια σε πλαγιές στα 320-550 μέτρα, ενώ η τελευταία, η ορεινή, στα 550-850 μέτρα και περιλαμβάνει αμπελώνες όψιμης ωριμανσης.





Εικόνα 3: Η ζώνη της Νεμέας. Πηγή: (www.google.gr)

Το κλίμα της Νεμέας χαρακτηρίζεται μεσογειακό, ήπιο, με ενδιάμεσες βροχοπτώσεις που κατανέμονται από τον Οκτώβριο μέχρι και τον Απρίλιο. Οι χειμώνες είναι αρκετά κρύοι και υγροί, ενώ τα καλοκαίρια είναι ξηρά και ζεστά. Στην περίοδο της ωρίμανσης, από τον Αύγουστο μέχρι και τον Σεπτέμβριο, οι ζεστές ημέρες και οι δροσερές νύχτες συνεργούν στην παραγωγή πολύ καλής πρώτης ύλης. Τη συγκεκριμένη περίοδο δεν σημειώνονται σημαντικές βροχοπτώσεις στην περιοχή. Η μέση θερμοκρασία κυμαίνεται από 16-18 βαθμούς Κελσίου ενώ ο ετήσιος μέσος όρος βροχόπτωσης είναι 700-800 χιλιοστά, εκ των οποίων ποσοστό μικρότερο του 20% να είναι διαθέσιμο κατά τη διάρκεια του κύκλου ανάπτυξης των πρέμων (Koundouras et al.,2006).

Όσον αφορά τα εδάφη των αμπελώνων είναι μέσης περιεκτικότητας σε οργανική ουσία, με μέτριο αλκαλικό pH και με σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε ανθρακικό ασβέστιο. Το έδαφος περιέχει άργιλο, πηλό, πέτρα, χαλίκι και άμμο. Η συγκεκριμένη σύνθεση συγκρατεί όλη την απαραίτητη υγρασία η οποία αποδεσμεύεται σταδιακά κατά τους ξηρούς θερινούς μήνες, χωρίς παράλληλα να παρεμποδίζεται η επαρκής στράγγιση και ανάπτυξη του ριζικού συστήματος (Koundouras, 2002).



Εικόνα 4: Οι αμπελώνες της Νεμέας. Πηγή : (<https://winesofgreece.org/>).

## 1.2 Αγιωργίτικο

Το αγιωργίτικο αποτελεί ποικιλία ερυθρή ποικιλία αμπέλου, ευρέως γνωστή ως μια από τις σημαντικότερες ερυθρές ποικιλίες της Ελλάδας. Είναι μια γηγενής ερυθρή ποικιλία του γένους *Vitis Vinifera L.*, η οποία καλλιεργείται κυρίως στην περιοχή της Νεμέας του Νομού Κορινθίας καλύπτοντας μάλιστα το 80% των αμπελώνων της περιοχής. Η ζώνη της Νεμέας, που αρχίζει από υψόμετρο 250 m και φτάνει μέχρι και τα 800 m είναι η μεγαλύτερη και πιο δυναμική της Πελοποννήσου, δεδομένου ότι εκτός από την πόλη της Νεμέας περιλαμβάνει ακόμα 16 χωριά που εκτείνονται γύρω από αυτή. Σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία, η καλλιέργεια της ποικιλίας συνίσταται στα αμπελουργικά διαμερίσματα της Πελοποννήσου (με το συνώνυμο μαύρο Νεμέας μόνο για την οριοθετημένη ζώνη της παραγωγής οίνου ΠΟΠ «Νεμέας», Στερεάς Ελλάδας και επιτρέπεται σε αυτό της Μακεδονίας.

Όσον αφορά τα αμπελογραφικά του χαρακτηριστικά, το Αγιωργίτικο έχει κορυφή νεαρού βλαστού ανοιχτή έως μέση, βαμβακώδης, λευκοπράσινη με ερυθρή παρυφή. Το φύλλο της είναι ανεπτυγμένο μεσαίου μεγέθους, με μισχικό κόλπο V ή U κλειστό με επικαλυπτόμενα χείλη. Τα άνθη της είναι μορφολογικά και φυσιολογικά ερμαφρόδιτα. Η σταφυλή είναι μετρίου έως μεγάλου μεγέθους, πυκνή, με το μίσχο της να είναι μέσου μήκους, σχεδόν πράσινος έως σχεδόν ξυλοποιημένος μέχρι τον κόμπο. Η ράγα είναι μέσου μεγέθους έως μικρή, σφαιρική κυανομελανή, με παχύ φλοιό ενώ η σάρκα της είναι μαλακή και χυμώδης.

Πρόκειται για μια ποικιλία όψιμη. Ο τρύγος του πραγματοποιείται από τα μέσα μέχρι το τέλος του Σεπτεμβρίου. Το φυτό ευδοκίμει σε περιοχές με χαμηλά ποσοστά υγρασίας και εδάφη στραγγιζόμενα, διαφόρων ειδών μεταξύ των οποίων τα αργιλώδη, τα αργιλοπηλώδη και τα σχιστολιθικά. Βέβαια, για την παραγωγή ποιοτικής πρώτης ύλης προτιμώνται οι ξηροθερμικές συνθήκες. Πρόκειται για μια ποικιλία παραγωγική, κάθε καρποφόρος βλαστός φέρει 2-4 σταφύλια και τα πρέμνα της χαρακτηρίζονται από μέση ζωνρότητα. Έρευνες έδειξαν ότι η συγκεκριμένη ποικιλία παρουσιάζει μεγάλο δυναμισμό παραγωγής, με την έννοια ότι είναι δυνατή η

αύξηση αποδόσεων ανά πρέμνο και στρέμμα χωρίς να υποβαθμίζεται η ποιότητα των παραγόμενων οίνων (ΕΘ.Ι.Α.ΓΕ., 1997, Koundouras & Van Leeuwen, 2002). Συνήθως εφαρμόζεται διαμόρφωση με σχήμα Royat και ιδιαίτερα το διπλό με μεταβλητό ύψος από την επιφάνεια του εδάφους ανάλογα με το υψόμετρο στο οποίο καλλιεργείται. Συνδυάζεται πολύ καλά με τα υποκείμενα 110R και 41B καθώς και 140Ru. Σχετικά με την ευαισθησία της συγκεκριμένης ποικιλίας, θεωρείται μέτρια έως υψηλή και προσβάλλεται κυρίως από τον περονόσπορο, το ωίδιο και τον βοτρυτή (Σταυρακάκης, 2010).

Το γλεύκος της ποικιλίας χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (200-240g/ L), χαμηλή οξύτητα (4,4-4,6 g τρυγικού οξέος / L ) και pH 3,4-3,8. Πρόκειται για μια ποικιλία πλούσια σε ανθοκυάνες και συγκεκριμένα περιέχει περίπου 600mg ανθοκυανών ανά κιλό ραγών ενώ περιλαμβάνεται στις τέσσερις πιο πλούσιες σε ανθοκυάνες καλλιεργούμενες γηγενείς ποικιλίες μαζί με το Βερτζαμί, τη Μανδηλαρία και τη Μαυροδάφνη (Χαρβαλιά και Μπενά Τζούρου, 1982). Ωστόσο η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών επηρεάζεται έντονα από τον κλώνο, την καλλιεργητική τεχνική και τις εδαφοτοποκληματικές συνθήκες (Koundouras S. et al., 2006). Οι οίνοι που παράγονται από τη ποικιλία Αγιωργίτικο διακρίνονται από το πλούσιο, βαθύ χρώμα (Koundouras S., et al, 2006), χαμηλή στυπτικότητα (Koussisi E., Paterso A., Piggot, J., 2003, Kallithraka S., et al., 2011) και έχουν ικανότητα παλαίωσης. Επίσης το Αγιωργίτικο διακρίνεται για τις μαλακές ταννίνες, την ισορροπημένη οξύτητα και έντονα αρώματα κόκκινων φρούτων (βατόμουρα, κεράσια), καθώς και στην συμβολή της παλαίωσης η οποία προσδίδει πολυπλοκότητα τόσο στο άρωμα όσο και στο σώμα (Σταυρακάκης, 2010).



Εικόνες 1, 2: Σταφύλι από ποικιλία Αγιωργίτικο. Πηγή: (<https://winesofgreece.org/>)

### 1.3 Η σύσταση του γλεύκους

Το σταφύλι που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του οίνου ύστερα από ζύμωση του χυμού αυτού, είναι καρπός της αμπέλου του γένους *Vitis Vinifera*, εμβολιασμένη σε κάποιο υποκείμενο. Οι ράγες του σταφυλιού είναι πλούσιες σε χημικές ενώσεις οι οποίες είναι απαραίτητες για να ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση αλλά και για να διαμορφωθεί το τελικό προϊόν. Τα κύρια συστατικά των ραγών είναι αναλύονται παρακάτω.

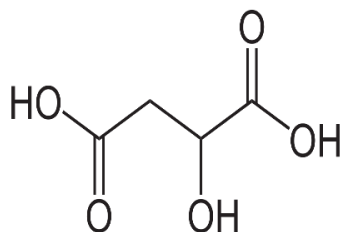
#### 1.3.1. Τα σάκχαρα

Τα σάκχαρα τα οποία φτάνουν σε συγκέντρωση 200 έως 300gr/lit στο τελικό στάδιο ωρίμανσης τους. Τα σάκχαρα με τη σειρά τους ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες, τους μονοσακχαρίτες, τους πολυσακχαρίτες και του ετεροπολυσακχαρίτες. Οι μονοσακχαρίτες βρίσκονται κυρίως με τη μορφή γλυκόζης (~100 g/lit), φρουκτόζης (~100 g/lit) και σε μικρότερα ποσοστά (0,5g/lit): αραβινόζη, ξυλόζη και γαλακτόζη. Τα τρία τελευταία δεν είναι ζυμώσιμα από τις ζύμες αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν

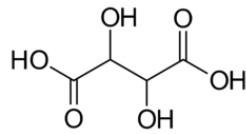
ως θρεπτικά υποστρώματα για τα γαλακτικά βακτήρια (Navarre και Langlade, 2010, Ribéreau-Gayon et al., 2012a). Μάλιστα ο λόγος γλυκόζη προς φρουκτόζη χρησιμοποιείται ως δείκτης ωριμότητας, όπου η τιμή 1,5 φανερώνει πλήρη ωριμότητα, ενώ μικρότερες τιμές του 1 φανερώνουν τη δράση της επιμεράσης η οποία αυξάνει τη φρουκτόζη (Ribereau-Gayon et al., 2006). Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή μονοσακχαριτών (π.χ. το άμυλο ή η κυτταρίνη). Επίσης η σακχαρόζη είναι ένας έμμεσα ζυμώσιμος δισακχαρίτης, η οποία όταν υδρολυθεί δίνει ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο φρουκτόζης. Υπάρχει σε συγκέντρωση 1,5 g/l. (Navarre and Langlade, 2010- Ribéreau-Gayon et al., 2012a). Οι ετεροπολυσακχαρίτες είναι πολυσακχαρίτες συνδεδεμένοι με μακρομόρια, όπως φαινολικές ενώσεις ή πρόδρομα αρωματικά συστατικά. Καθ' όλη τη διάρκεια της οινοποίησης, ιδίως κατά τη ζύμωση, παρατηρείται χημική ή ενζυμική υδρόλυση αυτών των συστατικών τα οποία έχουν άμεση οργανοληπτική επίδραση στον οίνο ακόμα και σε και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (της τάξης των μικρογραμμάρια ανά λίτρο ή ppb). (Navarre and Langlade, 2010; Ribéreau- Gayon et al., 2012a).

### 1.3.2. Τα οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα είναι τα δεύτερα σε συγκέντρωση συστατικά των σταφυλιών μετά τα σάκχαρα. Σε αυτά περιλαμβάνεται το τρυγικό οξύ (7,5-15g/l), το μηλικό οξύ (1-7 g/l) και το κιτρικό οξύ (0,5-2g/l) (Lasik, 2013). Το τρυγικό οξύ παράγεται μόνο στο αμπέλι. Το μηλικό οξύ υπάρχει στη πλειονότητα των φρούτων και αποτελεί φορέα ενέργειας. Όσον αφορά το σταφύλι, η συγκέντρωση του εξαρτάται από κλιματικούς παράγοντες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση στα σταφύλια που βρίσκονται σε βόρειες περιοχές. Τόσο το τρυγικό όσο και το μηλικό συντίθενται στα φύλλα της αμπέλου και στο χυμό του σταφυλιού και συνιστούν το 90% των οξέων του σταφυλιού. Το τρυγικό οξύ παραμένει σταθερό κατά την ωρίμανση, ενώ μπορεί να μειωθεί λόγω αύξησης του όγκου της ράγας ή λόγω φυσικοχημικών μετατροπών. Αντίθετα το μηλικό οξύ μειώνεται από τον περκασμό έως την ωρίμανση της ράγας καθώς καταναλώνεται ως μορφή ενέργειας κατά την αναπνοή παράγοντας δευτερογενείς μεταβολίτες. Επίσης σε περιπτώσεις που η πρώτη ύλη έχει προσβληθεί από τον *Botrytis cinerea* συναντάται σε μικρές συγκεντρώσεις το γλυκονικό οξύ. Τέλος συναντάται και το ασκορβικό οξύ το οποίο έχει αντιοξειδωτική δράση και στο γλεύκος συναντάται σε συγκέντρωση 50-100g/l.



Εικόνα 5: Οξέα του οίνου: Μηλικό οξύ. Πηγή: (<https://en.wikipedia.org/>).



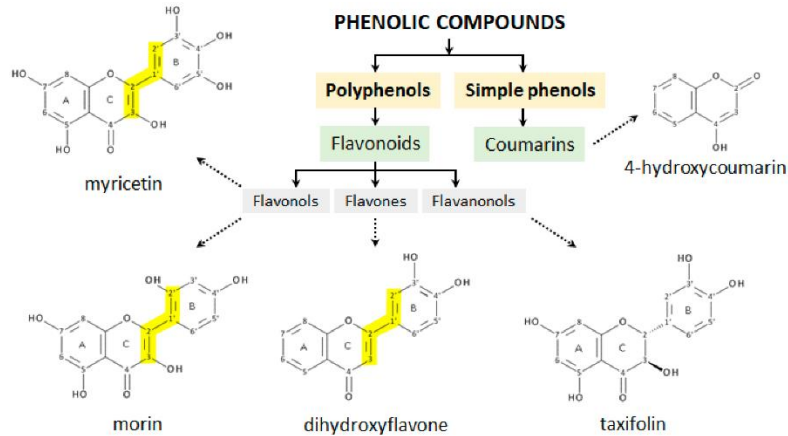
Εικόνα 6: Οξέα του οίνου: Τρυγικό οξύ. Πηγή : (<https://en.wikipedia.org/>).

### 1.3.3. Το άζωτο και τα αμινοξέα

Το άζωτο και τα αμινοξέα που συναντώνται στο γλεύκος αποτελούν βασικό ρόλο για τον μεταβολισμό καθώς και τον πολλαπλασιασμό των ζυμών καθώς επηρεάζουν άμεσα την κινητική της ζύμωσης (Garde-Cerdan et al., 2014). Το άζωτο συναντάται σε διάφορες μορφές είτε ανόργανες είτε οργανικές όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμίνες, νουκλεοτίδια, βιταμίνες και ανόργανα άλατα (Burin et al., 2016). Τα αμινοξέα αποτελούν καθοριστικό παράγοντα για την τελική ποιότητα του οίνου καθώς το συνδέονται άμεσα με το ποικιλιακό άρωμα των οίνων μέσω των πρόδρομων αρωματικών ενώσεων (Hernandez – Orte et al., 2009) και κατά την αλκοολική ζύμωση παίζουν ενεργό ρόλο στην παραγωγή αρωματικών ενώσεων (λιπαρά οξέα, εστέρες, ανώτερες αλκοόλες) μέσω των αμινοξέων (Styger et al., 2011). Μάλιστα είναι γενικά αποδεκτό ότι ο τύπος και η συγκέντρωση των αμινοξέων εξαρτάται από την ποικιλία του οίνου, τις κλιματικές συνθήκες καθώς και την καλλιεργητικές τεχνικές.

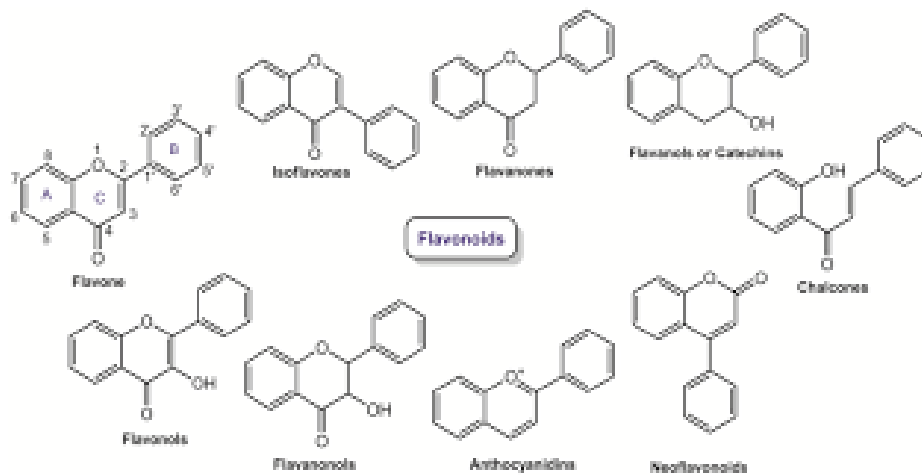
### 1.3.4. Τα φαινολικά συστατικά

Τα φαινολικά συστατικά, ιδίως στους ερυθρούς οίνους, αποτελούν κυρίαρχα συστατικά επηρεάζοντας τους χρωματικούς δείκτες αλλά και προσφέροντας αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, αποτελούν βασικό αντικείμενο μελέτης καθώς επιδρούν άμεσα στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός οίνου μέσω της στυπτικότητας και της πικρής γεύσης (Robichaud and Noble , 1990), αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες και συμπλοκοποιούνται (Ricardo da Silva et al., 1991) αλλά και αποτελούν δείκτη παλαίωσης των οίνων (Haslam 1980). Δομικά όλες οι φαινολικές ενώσεις αποτελούνται από έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με κάποιο υδροξυλιωμένο παράγωγο. Διακρίνονται από τον αριθμό και την αλληλουχία των αρωματικών δακτυλίων αλλά και τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλικών ομάδων (Ribereau -Gayon P., et al., 2006). Τα φαινολικά συστατικά που συναντάμε στους οίνους διακρίνονται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες, τις φλαβονοειδείς και μη φλαβονοειδείς φαινόλες με σημαντικότερες τις πρώτες.



Εικόνα 7: Τα φαινολικά συστατικά του οίνου. Πηγή : (<https://en.wikipedia.org/>)

Οι φλαβονοειδείς ενώσεις αποτελούνται από δύο δακτύλιους ενωμένους με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο με ένα μόριο οξυγόνου (Ribereau-Gayon P., et al., 2006). Η διαφορά μεταξύ των διάφορων φλαβονοειδών έγκειται στην υποκατάσταση του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου καθώς και στον διαφορετικό βαθμό οξείδωσης αυτού. Παραδείγματα των φλαβονοειδών ενώσεων αποτελούν οι φλαβόνες, οι φλαβανόνες, οι φλαβονόλες, οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες (Cataldo et al., 2019). Οι ανθοκυάνες είναι υπεύθυνες για το κόκκινο χρώμα των οίνων και δεν έχουν οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς των ραγών και σε λίγες ποικιλίες στο χυμό της ράγας. Αποτελούνται από δυο βενζοϊκούς δακτυλίους που συνδέονται με ένα δακτύλιο πυριλίου. Οι γνωστότερες ανθοκυάνες είναι η δελφινιδίνη, η κυανιδίνη, η πετουινιδίνη, η μαλβιδίνη, και η παιονιδίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ανθοκυάνες αποχρωματίζονται ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, και πιο συγκεκριμένα ανάλογα με το pH και την ύπαρξη ή όχι οξυγόνου, παρατηρείται μεταβολή από άχρωμη σε έγχρωμη μορφή λόγω σταθεροποίησης (Castaneda – Ovando., et al., 2009). Οι φλαβονόλες εντοπίζονται στο φλοιό των ραγών και έχουν κίτρινο χρώμα. Η συγκέντρωσή τους διαφοροποιείται ανάλογα την ποικιλία (Κουράκου-Δραγώνα Σ., 1998), και έχει αποδειχτεί ότι συμβάλλουν στην σταθεροποίηση του χρώματος (Mc Donald, et al., 1998). Οι ταννίνες είναι πολυμερισμένες χρωστικές οι οποίες αποτελούνται από μονάδες φλαβαν-3-ολης ((+)-κατεχίνη, (-)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, (-)-επιγαλλοκατεχίνη και το γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης. Απαντούν στα στερεά μέρη της σταφυλής όπως τα γίγαρτα, οι βόστρυχοι και η σάρκα και σε αυτές οφείλεται η αίσθηση της στυπτικότητας. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις υδρολυόμενες (γαλλικές και ελλαγικές) και στις συμπυκνωμένες (Garcia -Estevez I., et al., 2017). Χαρακτηριστικά των ταννινών είναι ότι ενώνονται με πρωτείνες σχηματίζοντας αδιάλυτες ενώσεις, οι οποίες καθιζάνουν και σε αυτές οφείλεται η στυπτικότητα των οίνων (Ribereau-Gayon, et al., 2006) αλλά και κατέχουν αντιοξειδωτική δράση κατά την παλαίωση των οίνων.

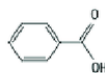


Εικόνα 8: Τα φαινολικά συστατικά του οίνου, τα φλαβονοειδή. Πηγή : (<https://en.wikipedia.org/>)

Στα μη φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά περιλαμβάνονται κυρίως τα στυλβένια, τα βενζοϊκά οξέα και τα κινναμωμικά οξέα. Συναντώνται κυρίως στο σταφύλια αλλά όχι αποκλειστικά καθώς εντοπίζονται και στο ξύλο δρυός κατά την παλαίωση των οίνων. Έχει αποδειχτεί ότι οι ερυθροί οίνοι περιέχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των φαινολικών αυτών ομάδων, της τάξης των 60-566 mg/L (Cataldo L., et al., 2019) σε σχέση με τους λευκούς οίνους. Αν και είναι άχρωμα, είναι γνωστό ότι σταθεροποιούν και ενισχύουν το χρώμα των οίνων μέσω ενδομοριακών και διαμοριακών αντιδράσεων. Επίσης είναι γνωστό ότι πολλά από τα φαινολικά οξέα συμβάλλουν στο άρωμα των οίνων (π.χ. η γουαϊακόλη, η βανιλίνη, η ευγενόλη) και μερικά από αυτά, όπως η ρεσβερατρόλη παίζουν σημαντικό ρόλο σε βιολογικές αντιδράσεις ως αποκρίσεις σε επιθέσεις βακτηριδίων και μυκήτων. Μάλιστα για τη ρεσβερατρόλη έχουν δημοσιευτεί διάφορες μελέτες για την διατήρηση της ανθρώπινης υγείας και για την καταπολέμηση ανθρώπινων ασθενειών (Barbalo S.M., et al., 2019).

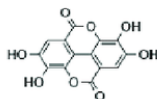


Non-flavonoids  
Phenolic acids

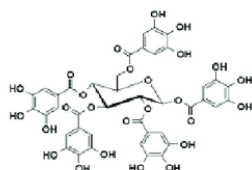


Hydroxybenzoic acids

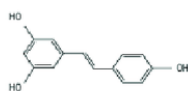
Biphenols



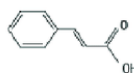
Ellagic acid



Hydrolysable tannins (galotannins)

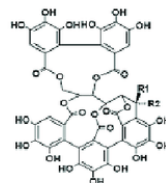


Stilbenes (resveratrol)

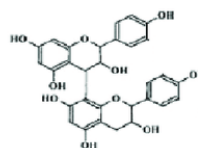


Hydroxycinnamic acids

Tannins

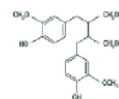


Hydrolysable tannins (ellagitannins)



Condensed tannins (proanthocyanidins, e.g. procyanidin dimer)

Other non-flavonoid polyphenols

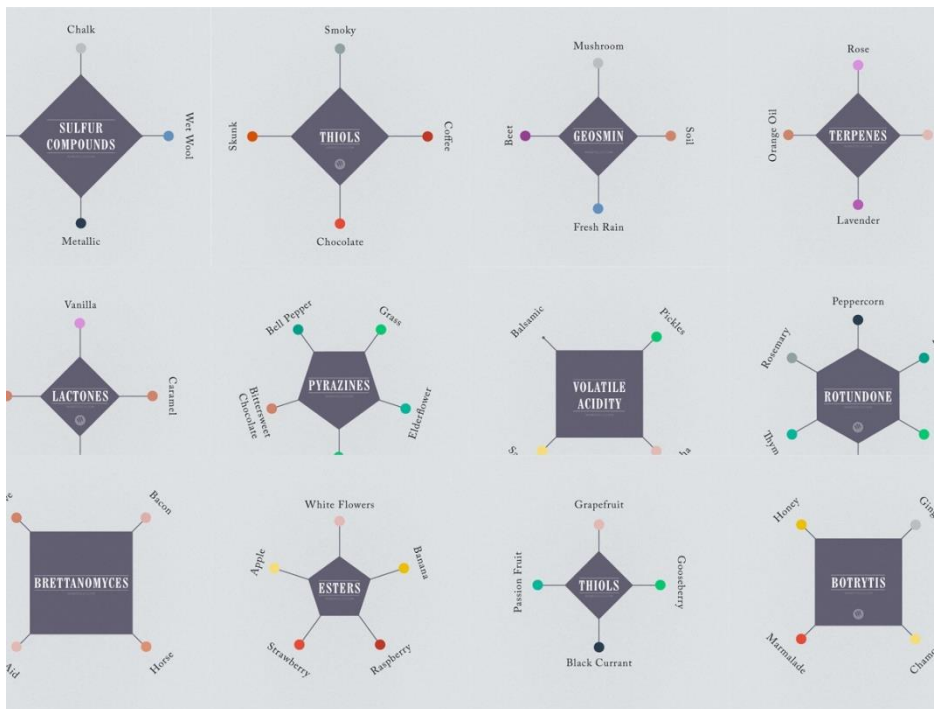


Lignans (secoisolariclitresinol)

Εικόνα 9: Δομή μη-φλαβονοειδών φαινολικών συστατικών. Πηγή : <https://www.researchgate.net/> .

### 1.3.5. Οι αρωματικές ενώσεις

Στο σταφύλι, επίσης, συναντώνται οι πτητικές ενώσεις οι οποίες διαμορφώνουν το ποικιλιακό άρωμα και είναι χαρακτηριστικές για κάθε ποικιλία. Οι κύριες ενώσεις που προέρχονται από την πρώτη ύλη και συνιστούν το πρωτογενές άρωμα είναι τα τερπένια (άρωμα εξωτικών φρούτων, τριαντάφυλλου) οι τερπενόλες (άρωμα λουλουδιών), οι πυραζίνες (οσμές λαχανικών) και οι θειόλες (άρωμα φρούτων του πάθους) (Ebeler and Thorngate 2009; Gongalez-Barreiro et al., 2013).



Εικόνα 10: Πτητικές ενώσεις οίνου. Πηγή : (<https://winefolly.com>)

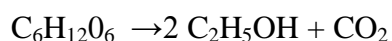
## 1.4 Ερυθρή οينوποίηση

Η οينوποίηση είναι μια σύνθετη σειρά διαδικασιών για την μετατροπή των σταφυλιών σε κρασί μέσω της χρήσης ζυμομυκήτων και γαλακτικών βακτηρίων. Μάλιστα σύμφωνα με τον νομικό ορισμό του οίνου στην Ευρώπη « Οίνος είναι το προϊόν που λαμβάνεται αποκλειστικά από την ολική ή μερική ζύμωση νωπών σταφυλιών , θρυμματισμένων ή μη ή γλεύκους σταφυλιών.». Οι ζυμομυκήτες και τα γαλακτικά βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την ολοκλήρωση της οينوποιητικής διαδικασίας υπάρχουν φυσικά στα συστατικά των σταφυλιών, στις δεξαμενές, στα βαρέλια, σε όλο τον εξοπλισμό του οινοποιείου ακόμα και στον αέρα του οινοποιείου (Renouf et al., 2005). Ορισμένα βήματα είναι απαραίτητα αλλά αφήνονται στη διακριτική ευχέρεια του οινοποιού ανάλογα με το οσφρητικό και γευστικό προφίλ που επιδιώκεται στον τελικό οίνο. Τα πρωτόκολλα οينوποίησης ποικίλλουν ανάλογα με τις περιοχές και το επιθυμητό προϊόν του εκάστοτε παραγωγού Ribéreau-Gayon et al. (1998). Ωστόσο η ερυθρή οينوποίηση περιλαμβάνει ορισμένα στάδια βασικά τα οποία δεν παραλείπονται και προσαρμόζονται ανάλογα με το επιθυμητό προϊόν και τις επιλογές του οινολόγου. Αρχικά παραλαμβάνεται η πρώτη ύλη, όταν τα σταφύλια βρίσκονται στο βέλτιστο στάδιο ωρίμανσης και υγείας και οδηγούνται στο εκραγιστήριο για την απομάκρυνση των βοστρύχων. Είναι προαιρετικό αλλά συχνό όταν η εκχύλιση διαρκεί πολύ, καθώς με αυτόν τον τρόπο περιορίζονται βοτανικές γεύσεις που προσδίδουν στυπτικότητα στο κρασί. Στην συνέχεια γίνεται η έκθλιψη των ραγών στο θλιπτήριο με σκοπό την απελευθέρωση του χυμού (με ρύθμιση κατάλληλης ταχύτητας ώστε να αποφευχθεί το σπάσιμο των γιγάρτων (πικρή γεύση). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας η πρώτη ύλη ομογενοποιείται και αερίζεται.

Ακολουθεί η μεταφορά της σταφυλομάζας σε ανοξειδωτες δεξαμενές προκειμένου να ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται και εκχύλιση. Στο στάδιο αυτό έχουμε και παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την άνοδο των στερεών μερών( στέμφυλα, γίγαρτα) στη κορυφή της δεξαμενής σχηματίζοντας το «καπέλο». Προκειμένου να εκχυλιστούν οι ανθοκύανες και οι ταννίνες και να ληφθεί το επιθυμητό χρώμα, γεύση και υφή είναι απαραίτητο το σπάσιμο του καπέλου με ανακύκλωση, δηλαδή με άνοδο του χυμού από τον πυθμένα στην κορυφή με βοήθεια αντλίας. Η εκχύλιση μπορεί να διαρκέσει από ελάχιστες ημέρες έως και αρκετές εβδομάδες. Μόλις ο παραγόμενος οίνος έχει αποκτήσει το κατάλληλο χρώμα και γεύση απομακρύνεται από τους φλοιούς και τα γίγαρτα σε άλλη δεξαμενή προκειμένου να ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση και τα στέμφυλα μεταφέρονται στο πιεστήριο για την εξαγωγή του οίνου πίεσης ο οποίος μεταφέρεται σε άλλη δεξαμενή. Στη δεξαμενή που θα μεταφερθεί, ολοκληρώνεται η αλκοολική ζύμωση και πραγματοποιείται η μηλογαλακτική ζύμωση από γαλακτικά βακτήρια. Στο τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης, ο οίνος μεταγγίζεται και διαχωρίζεται από τις οινολάσπες (υπολείμματα, στερεά σωματίδια, απενεργοποιημένες ζύμες και βακτήρια). Με αυτόν τον τρόπο ο διαυγής οίνος αερίζεται . Τέλος, ο οινολόγος αποφασίζει τη διαδικασία που θα ακολουθήσει ,είτε με παλαίωση του οίνου σε βαρέλια δρυός είτε με εμφιάλωση του νεαρού οίνου.

## 1.5 Αλκοολική ζύμωση

Ο Luis Pasteur ήταν αυτός που απέδειξε ότι η αλκοολική ζύμωση είναι αποτέλεσμα της αναερόβιας μεταβολικής δραστηριότητας των ζυμών το 1864. Η αλκοολική ζύμωση βασίζεται στην μετατροπή των σακχάρων από τα ένζυμα των ζυμών σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα και θερμότητα (24kcal/mole γλυκόζης). Το είδος ζύμης που είναι κυρίως υπεύθυνο για την αλκοολική ζύμωση είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος εμφανίζεται κυρίως στο γλεύκος (Mortimer and Polsinelli, 1999), αλλά πολλά άλλα είδη είναι επίσης ενεργά, τουλάχιστον στις αρχές της αλκοολικής ζύμωσης. Συγκεκριμένα , με το σπάσιμο των σταφυλιών , στο γλεύκος υπάρχει πληθώρα ζυμών που βρίσκονται είτε στο φλοιό είτε στη σάρκα των σταφυλιών. Αυτά τα στελέχη μπορούν να ξεκινήσουν την αλκοολική ζύμωση μετατρέποντας τα σάκχαρα σε αιθανόλη. Καθώς η αλκοολική ζύμωση προχωράει , ο πληθυσμός αυτών των ζυμών μειώνεται λόγω των συνθηκών και επικρατεί ο *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet & Heard , 1993) Αυτό συμβαίνει για παράδειγμα με τον *Torulasporea delbruckii* ο οποίος συμμετέχει σε αυτή τη ζύμωση, με ενδιαφέροντα αποτελέσματα, έτσι ώστε να λειτουργεί ως συμπλήρωμα του *S. cerevisiae* (Renault et al., 2009). Η μετατροπή αυτή περιλαμβάνει 30 ξεχωριστές αντιδράσεις που συνοψίζεται στην εξίσωση του Gay -Lussac :



Άλλα παραπροϊόντα που σχηματίζονται κατά την αλκοολική ζύμωση, αλλά σε μικρή ποσότητα είναι η γλυκερόλη, οξέα, ανώτερες αλκοόλες, αλδεΐδες, αστέρες κ.α..

Πρόκειται για μια διεργασία η οποία περιλαμβάνει πλήθος βιοχημικών, χημικών και φυσικοχημικών μεταβολικών οδών, όπως ο κύκλος του κιτρικού οξέος που πραγματοποιούνται. Επίσης σε αυτή διεργασία τεράστιο ρόλο παίζει η θερμοκρασία, η ταχύτητα με την οποία πραγματοποιείται καθώς και η ποσότητα του οξυγόνου στην αρχή της ζύμωσης που θα επιτρέψει τον πολλαπλασιασμό των ζυμών.

Στην ερυθρή οινοποίηση, οι βέλτιστες συνθήκες είναι οι εξής: έως 25 °C η θερμοκρασία ζύμωσης ενώ η διάρκεια να μην ξεπερνά τις 2 εβδομάδες. Έχει αποδειχτεί ότι οι υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να ευνοούν την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων ενισχύοντας το χρώμα, ωστόσο μειώνεται ο φρουτώδης χαρακτήρας του αρώματος (Sacchi et al., 2005)

Η αλκοολική ζύμωση περιγράφεται από την πραγματοποίηση δύο αντιδράσεων. Αρχικά γίνεται η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού, το οποίο έχει σχηματιστεί από τη γλυκόλυση, σε ακεταλδεΐδη και στη συνέχεια ανάγεται σε αιθανόλη από το NADH μέσω της αλκοολικής αφυδρογονάσης (Neuberg, 1946). Μάλιστα η μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό πραγματοποιείται εξ'ολοκλήρου στο εσωτερικό των κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae*.

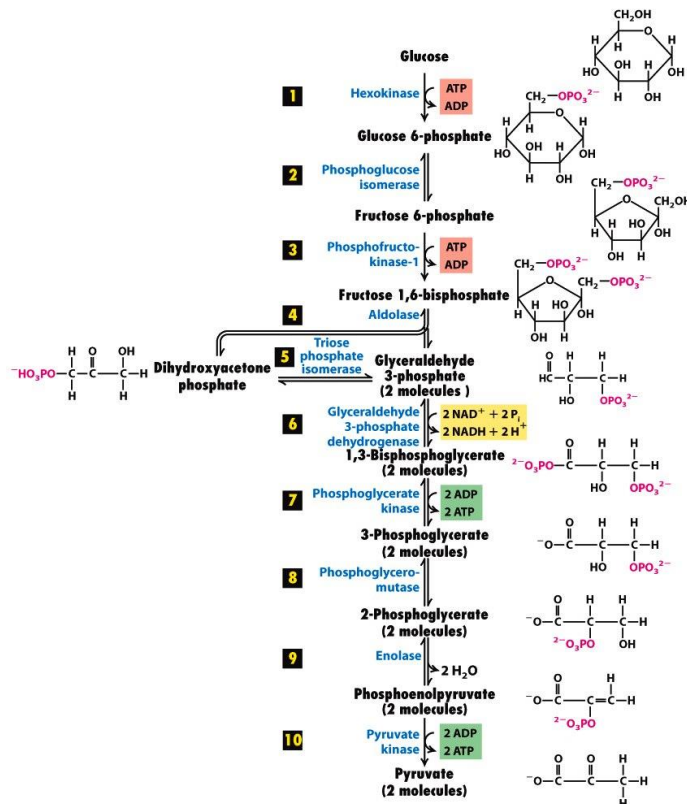
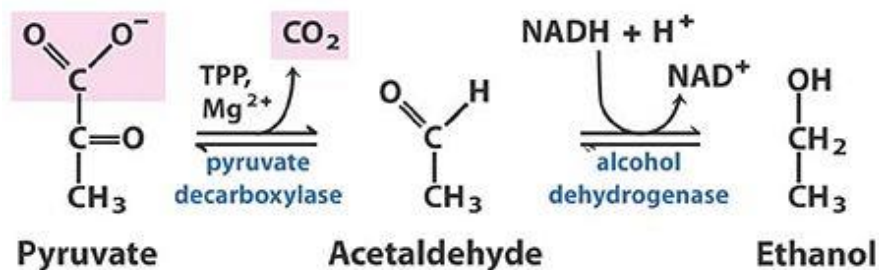


Figure 12-3  
Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

Εικόνα 12: Το πρώτο στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης, η γλυκόλυση. Μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό. Πηγή: Webnode.



Εικόνα 12: Το δεύτερο στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης. Μετατροπή του πυροσταφυλικού σε αιθανόλη. Πηγή: Protopedia.

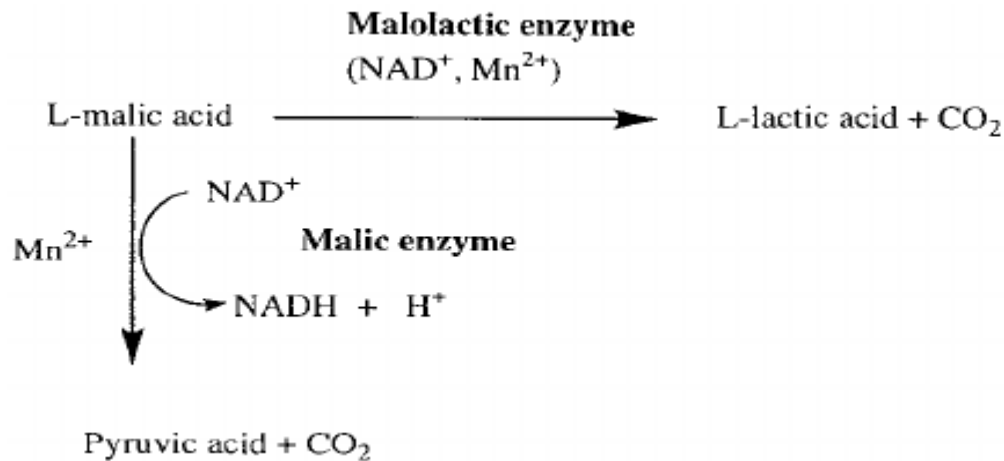
## 1.6 Μηλογαλακτική Ζύμωση

### 1.6.1. Εισαγωγή

Η μηλογαλακτική ζύμωση άρχισε να μελετάται από την επιστημονική κοινότητα τη δεκαετία του 1920, παρά τις μικροβιολογικές παρατηρήσεις του Luis Pasteur το 1857. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Kunkee το 1967, οι πρώτοι που παρατήρησαν τη μηλογαλακτική ζύμωση ήταν οι Berthelot και Fleurieu το 1864, οι οποίοι όρισαν τη μηλογαλακτική ζύμωση ως μια δεύτερη ζύμωση μέσω της οποίας μειώνεται η οξύτητα του οίνου. Το 1900 ο Koch απομόνωσε γαλακτικά βακτήρια προκειμένου να πραγματοποιήσουν ζύμωση, το 1901 ο Moslinger περιέγραψε τη μηλογαλακτική ζύμωση ως μια διαδικασία μετατροπής του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα ενώ το 1943 ο Guess ανέφερε ότι στον οίνο υπάρχουν γηγενή βακτήρια τα οποία καταναλώνουν μηλικό οξύ.

Γενικά, η μηλογαλακτική ζύμωση είναι γνωστή ως μια δεύτερη ζύμωση η οποία πραγματοποιείται μετά την αλκοολική ζύμωση ή και ταυτόχρονα. Τα τελευταία χρόνια μάλιστα, σε ορισμένα είδη κρασιού προτιμάται να γίνεται πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης προκειμένου να μην καταναλωθεί ποσότητα μηλικού οξέος κατά την αλκοολική ζύμωση αλλά και για να επιταχυνθεί η ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης δεδομένου ότι δεν υπάρχουν παρεμποδιστικοί παράγοντες (αλκοόλη,  $\text{SO}_2$ ) (Kunkee, 1991, Abrahamse et al., 2011).

Πρόκειται για μια ενζυμική μετατροπή κατά την οποία το L-μηλικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται προς παραγωγή L-γαλακτικού οξέος και διοξειδίου του άνθρακα παρουσία  $\text{NAD}^+$  και ιόντων  $\text{Mn}^{2+}$  ως συμπαραγόντες για την αποφυγή ανεπιθύμητων ενδιάμεσων προϊόντων (Naouri et al., 1990).



Εικόνα 13: Αναπαράσταση της μετατροπής του L-μηλικού σε L-γαλακτικό κατά την μηλογαλακτική ζύμωση. Πηγή: (<https://www.researchgate.net>) .

Αυτή η μετατροπή μπορεί να πραγματοποιηθεί αυθόρμητα από τα ενδογενή γαλακτικά βακτήρια που βρίσκονται στο γλεύκος, είτε από στελέχη γαλακτικών βακτηρίων που υπάρχουν στο εμπόριο. Το στέλεχος *Oenococcus Oeni* είναι το κύριο είδος γαλακτικού βακτηρίου για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης καθώς μπορεί να αντέξει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του παραγόμενου οίνου (Bartowsky, 2005). Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα στελέχη των γενών *Lactobacillus* και *Pediococcus* μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για αυτή τη βιομετατροπή. Συγκεκριμένα το στέλεχος *Lactobacillus Plantarum* έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να ολοκληρώσει τη διαδικασία της μηλογαλακτικής ζύμωσης σύμφωνα με τους επιστήμονες (du Toit et al., 2011 ; Berbegal et al., 2016) και για αυτό το λόγο έχουν παραχθεί εμπορικά στελέχη του συγκεκριμένου στελεχούς.

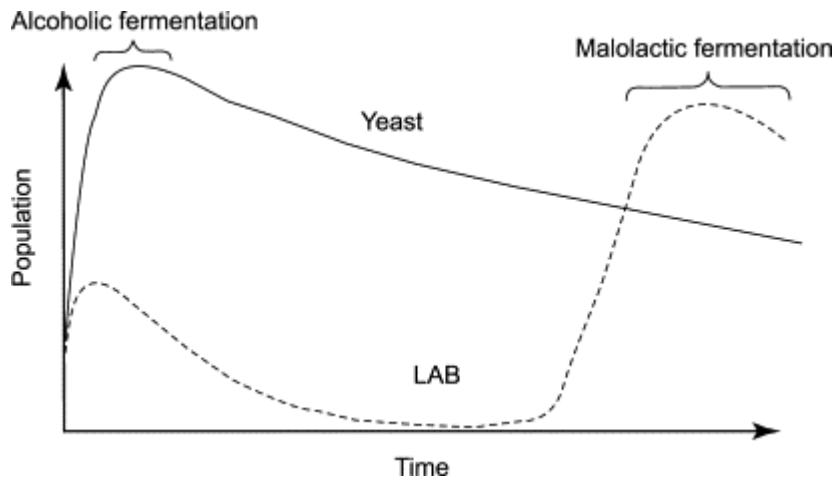
Όσον αφορά το είδος των οίνων στα οποία συνίσταται να γίνει η μηλογαλακτική ζύμωση είναι οι ερυθροί οίνου για την ωρίμανση τους καθώς και σε ορισμένες λευκές ποικιλίες όπως το Chardonnay και το Riesling αλλά και σε ορισμένους αφρώδεις οίνους. Οι βασικοί λόγοι για τους οποίους είναι επιθυμητή η μηλογαλακτική ζύμωση είναι ότι συμβάλλει στην ωριμότητα των ερυθρών οίνων, καθώς το κάνει πιο μαλακό μειώνοντας την οξύτητα που προσδίδει επιθετική γεύση, δρα ευεργετικά στους λευκούς οίνους με υψηλή οξύτητα, προσδίδει μικροβιακή σταθερότητα και ενισχύει το άρωμα και την πολυπλοκότητα των οίνων. Επίσης εκτός από τις κύριες οργανοληπτικές επιδράσεις αυτή η δευτερεύουσα ζύμωση τροποποιεί το άρωμα των οίνων καθώς παράγεται διακετύλιο (2,3-βουτανεδιόνη) προσφέροντας στο κρασί νότες βουτύρου. Πολλές αντιδράσεις έχουν σημειωθεί ότι λαμβάνουν χώρα κατά την διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης οι οποίες τείνουν να ενισχύουν το άρωμα και την ποιότητα του οίνου συμπεριλαμβανομένου της δράσης της εστεράσης, τον μεταβολισμό της μεθειονίνης καθώς και την δράση διάφορων γλυκασιδάσεων (Moreno-Arribas and Polo, 2005 ; Munoz et al., 2011).

Για την μετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό τα γαλακτικά βακτήρια διαθέτουν τρεις πιθανές ενζυματικές οδούς. Η πρώτη, όπως αναφέρθηκε πριν, είναι η

άμεση μετατροπή του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό μέσω της μηλικής αποκαρβοξυλάσης, επίσης γνωστή ως μηλογαλακτικό ένζυμο. Η αντίδραση αυτή απαιτεί το  $\text{NAD}^+$  και το  $\text{Mn}^{2+}$  ως συμπαραγόντες προκειμένου να μην υπάρχουν ενδιάμεσα παραπροϊόντα. Ο ρυθμός της αποκαρβοξυλίωσης του μηλικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια σχετίζεται με τη δραστηριότητα του βακτηριακού κυττάρου (Bartowsky, 2005). Το δεύτερο μονοπάτι χρησιμοποιεί το μηλικό ένζυμο για την μετατροπή του L-μηλικού οξέος σε πυροσταφυλικό το οποίο στη συνέχεια ανάγεται από την αφυδρογονάση του L-γαλακτικού σε γαλακτικό οξύ. Η τρίτη πιθανή ενζυμική οδός είναι η αναγωγή του μηλικού οξέος από τη μηλική αφυδρογονάση σε οξαλοξικό, ακολουθούμενη από αποκαρβοξυλίωση σε πυρουβικό και αναγωγή σε γαλακτικό οξύ (Lonvaud-Funel, 1999).

Γενικά, η μηλογαλακτική ζύμωση συνίσταται να γίνεται σε δροσερές αμπελουργικές περιοχές στις οποίες οι τιμές του μηλικού οξέος παρουσιάζονται υψηλές. Συγκεκριμένα, οι τιμές του μηλικού οξέος κυμαίνονται από 15-25g/L στα πράσινα σταφύλια, ενώ σε ώριμα, διογκωμένα σταφύλια η τιμή του είναι 1-4g/L. Αυτό εξηγείται καθώς το μηλικό οξύ μειώνεται σε υψηλές θερμοκρασίες λόγω καύσης (Handbook of enology volume 1, 2006). Επίσης το μηλικό οξύ μειώνεται καθώς είναι ευπαθές σε σχέση με το τρυγικό που παραμένει σταθερό καθώς προσβάλλεται από μικροοργανισμούς, ζύμες και βακτήρια. Σε πολλές περιπτώσεις η μηλογαλακτική ζύμωση θεωρείται και αλλοίωση καθώς προσδίδει ανεπιθύμητες οργανοληπτικές αλλαγές, μειώνει το χρώμα των οίνων κατά 30% (Van Vuuren -Dicks, 1993) αλλά είναι και υπεύθυνη για την παραγωγή βιογενών αμινών (Lonvaud - Funel & Joyeux, 1994).

Όπως αναφέρθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση διεξάγεται από τα γαλακτικά βακτήρια και διακρίνονται δύο περιπτώσεις. Η μια αφορά την αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση μέσω των αυτόχθονων ειδών βακτηρίων που βρίσκονται στο φλοιό των σταφυλιών ή στο περιβάλλοντα χώρο (δεξαμενές, βαρέλια, λάστιχα) ενώ η άλλη σχετίζεται με τον εμβολιασμό εμπορικών σκευασμάτων των γαλακτικών βακτηρίων. Σε κανονικές συνθήκες, μόλις ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση υπάρχει μια στατική φάση (10-15 ημέρες) κατά την οποία τα γαλακτικά βακτήρια δεν αυξάνονται σε πληθυσμό, καθώς υπάρχουν οι ζύμες και άλλοι παράγοντες που τα εμποδίζουν. Μόλις αυτή η φάση ολοκληρωθεί, τα βακτήρια αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται φτάνοντας περίπου τα  $10^6$  CFU/mL και ξεκινούν τη μηλογαλακτική ζύμωση.



Εικόνα 13: Αναπαράσταση της εξέλιξης του βακτηριακού πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων κατά την οινοποίηση. Πηγή: (<https://www.sciencedirect.com>).

Σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητο να ελεγχθούν οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η μηλογαλακτική ζύμωση καθώς υπάρχουν πολλοί φυσικοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολισμό των βακτηρίων, όπως η αιθανόλη, το pH, η θερμοκρασία καθώς και διοξείδιο του θείου. (Bettering et al., 2015). Σε βιομηχανικό επίπεδο, προτιμάται η χρήση εμπορικών σκευασμάτων γαλακτικών βακτηρίων, κυρίως του *Oenococcus oeni* και το *Lactobacillus plantarum* καθώς αντέχουν τις σκληρές συνθήκες του παραγόμενου οίνου, δεν παράγουν βιογενείς αμίνες και συμβάλλουν θετικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου (G-Alegria et al., 2004). Στη περίπτωση που η μηλογαλακτική ζύμωση αργεί ή δε ολοκληρώνεται, υπάρχει ο κίνδυνος αλλοιώσεων με αντίκτυπο στην ποιότητα του κρασιού αλλά και στην οικονομική κατάσταση του οίνου. Απαραίτητη θεωρείται η παρουσία υδρογονανθράκων, αμινοξέων, βιταμινών, πεπτιδίων, λιπαρών οξέων, αλάτων και νουκλεϊκών οξέων (Hebert et al., 2004). Ωστόσο τα παραπάνω θρεπτικά καταναλώνονται από τις ζύμες στο στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης και μόνο ένα μικρό ποσοστό μπορεί να επιστραφεί από τη λύση των κυττάρων των ζυμών το οποίο βέβαια δεν είναι επαρκές. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητο να υπάρχουν τα κατάλληλα θρεπτικά για να μπορέσουν να καταναλωθούν από τα γαλακτικά βακτήρια και να ολοκληρώσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση. Τα απαραίτητα θρεπτικά ή οι ενεργοποιητές της μηλογαλακτικής ζύμωσης σχηματίζονται κυρίως από απενεργοποιημένες ζύμες ή αλλιώς χρησιμοποιείται η καζεΐνη και η κυτταρίνη τα οποία περιέχουν αμινοξέα και βιταμίνες. Με αυτόν τον τρόπο ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων πολλαπλασιάζεται και ταυτόχρονα απορροφούνται ουσίες όπως σουλφίδια και μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα που δρουν κατασταλτικά κατά την μηλογαλακτική ζύμωση.

Στην περίπτωση που η επιλογή του οινολόγου είναι η αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση, το οποίο συνεπάγεται ελλειμματική θείωση απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή καθώς αυξάνεται ο κίνδυνος αλλοίωσης από ζύμες ή βακτήρια. Παράδειγμα αποτελεί η αύξηση της πτητικής οξύτητας μέσω αποικοδόμησης των σακχάρων ή η παραγωγή βινύλ και αιθύλ πτητικών ενώσεων που αποτελούν ελαττώματα. Προκειμένου, λοιπόν, να αποφευχθεί η μόλυνση από αλλοιογόνα βακτήρια έχουν εφαρμοστεί ορισμένες μέθοδοι, όπως για παράδειγμα η χρήση θερμότητας για αποστείρωση.



Άλλες χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την επαρκή θείωση η οποία προσδίδει αντιβακτηριακή δράση καθώς και η προσθήκη λυσοζύμης που αναστέλλει τελείως τη δράση των γαλακτικών βακτηρίων. Άλλοι αναστολείς των γαλακτικών βακτηρίων αποτελούν η λυσίνη και το φουμαρικό οξύ. Σε κάθε περίπτωση, η υψηλή αντοχή των γαλακτικών βακτηρίων θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη, ειδικά όταν το pH του οίνου είναι υψηλό (Handbook of enology, Volume 1, 2006).

## 1.6.2 Τα γαλακτικά βακτήρια στον οίνο

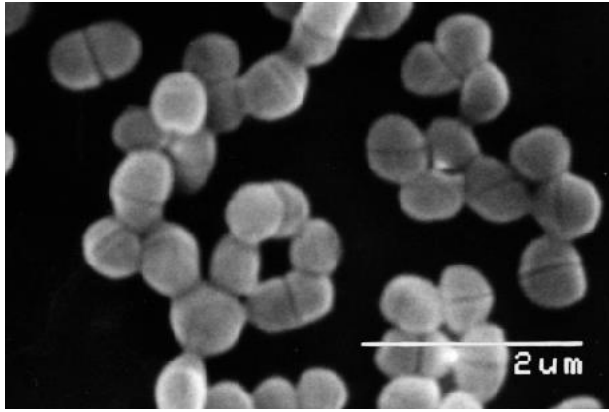
Τα γαλακτικά βακτήρια εμφανίζονται ως κοκκοειδή επιμήκη ή ραβδοειδή. Είναι Gram θετικά, μη σπορογόνα και λειτουργούν σε αναερόβιες συνθήκες. Μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση την παραγωγή γαλακτικού οξέος χρησιμοποιώντας ως μεταβολίτη τη γλυκόζη (Dicks and Endo, 2009). Μπορούν να διακριθούν σε δύο ομάδες με βάση τη μεταβολική οδό που θα επιλέξουν για την αποικοδόμηση της γλυκόζης: ομοζυμωτικά έχοντας ως κύριο προϊόν το γαλακτικό οξύ και ετεροζυμωτικά παράγοντας γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και διοξειδίο του άνθρακα.

Η εξέλιξη των γαλακτικών βακτηρίων από τον αμπελώνα έως το τέλος της οινοποίησης έχουν καταγραφεί και παρουσιάζουν σημαντική μεταβλητότητα ανάλογα την περιοχή, τη ποικιλία καθώς και τον τρόπο οινοποίησης. Εμφανίζονται κυρίως στις επιφάνειες των φύλλων και στη σάρκα των σταφυλιών χωρίς όμως να ξεπερνούν τα  $10^3$  CFU/g (Lafon-Lafourcade et al., 1983). Το μέγεθος του πληθυσμού εξαρτάται κυρίως από την ωριμότητα αλλά και την κατάσταση υγιεινής των σταφυλιών (Wibowo et al., 1985, Jackson, 2008).

Υπάρχουν διάφορα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων με κυριότερα των *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* αλλά και ο *Oenococcus oeni* τα οποία είναι υπεύθυνα για τις αλλαγές στον οίνο κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση (Wibowo et al., 1985). Ο *Oenococcus oeni* έχει προσαρμοστεί καλύτερα στο περιβάλλον του οίνου και πολλά εμπορικά σκευάσματα περιέχουν το συγκεκριμένο στέλεχος για την διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Wibowo et al., 1985-Davis et al., 1988-Drici -Cachon et al., 1996 -Lonvaud-Funel, 1999). Τα βασικότερα χαρακτηριστικά των κύριων γαλακτικών βακτηρίων που βρίσκονται στον οίνο αναφέρονται παρακάτω:

### ***Oenococcus oeni*:**

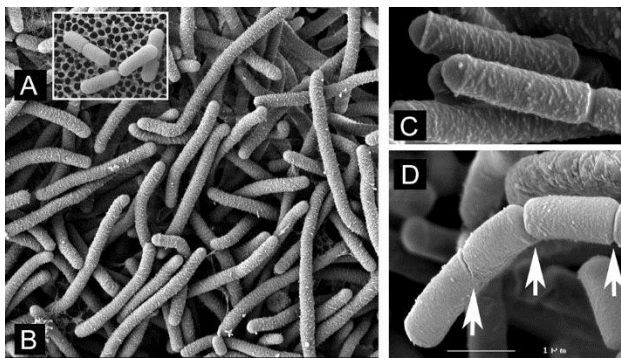
Το συγκεκριμένο γαλακτικό βακτήριο είναι από τα πιο βασικά που υπάρχουν στον οίνο, είναι ασπορογενές και τα κύτταρα του είναι ελλειμοειδή ή σφαιρικά, κανονισμένα σε ζεύγη ή σε μικρού μήκους αλυσίδες. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του είναι μεταξύ 20° C και 30°C και σε pH 4,8-5,5. Ο πληθυσμός του μπορεί να αυξηθεί κατά την αλκοολική ζύμωση και να υπερिσχύσει έναντι των άλλων γαλακτικών βακτηρίων. Για αυτό το λόγο αλλά και χάρη στην επίδραση του στα αρωματικά χαρακτηριστικά, προτιμάται και κυρίως σε ερυθρούς οίνους παλαιώσης αλλά και σε αφρώδεις οίνους. (Henick-Kling et al., 1993; Lafon-Lafourcade et al., 1983b).



Εικόνα 14: Κύτταρα του γαλακτικού βακτηρίου *Oenococcus oeni*. Πηγή : (<https://www.sciencedirect.com>).

### **Lactobacillus plantarum:**

Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ετεροζυμωτικό, με σχήμα επίμηκες ή ροβδόμορφο. Υπάρχουν πολλά στελέχη του συγκεκριμένου στον σταφύλι, είτε στη σάρκα είτε στον φλοιό. Ευθύνεται για την παραγωγή πολλών αρωματικών ενώσεων διαμορφώνοντας το αρωματικό προφίλ του οίνου, καθώς περιέχει πληθώρα ενζύμων που ενεργοποιούν γονίδια υπεύθυνα για την παραγωγή αρωματικών ενώσεων. Έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να αντέξει σε υψηλό pH, η αλκοολοανθεκτικότητα του φτάνει έως τους 14% vol. ενώ παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με τον *Oenococcus oeni* όσον αφορά το SO<sub>2</sub> (Lerm et al., 2011 ; du Toit et al., 2011 ; Spano et al., 2002).



Εικόνα 14: Κύτταρα του γαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus plantarum*. Πηγή: (<https://asm.org/>).

### **1.6.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μηλογαλακτική ζύμωση**

Είναι γενικά αποδεκτό ότι υπάρχει πληθώρα παραγόντων που επηρεάζει η δράση των γαλακτικών βακτηρίων, συνεπώς και την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αυτοί οι παράγοντες μπορεί να σχετίζονται άμεσα με τον πολλαπλασιασμό των γαλακτικών βακτηρίων ή έμμεσα με τις μεταβολικές ιδιότητες αυτών. Οι κύριοι

παράγοντες αποτελούν το pH, η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε αιθανόλη, το SO<sub>2</sub> καθώς και κάποια προϊόντα από τον μεταβολισμό των ζυμών. Το 1991 ο Kunkee ανέφερε ότι οι τέσσερις περιμέτροι που επηρεάζουν το βαθμό πολλαπλασιασμού των γαλακτικών βακτηρίων καθώς και την εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι το pH, η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε αιθανόλη, το SO<sub>2</sub>. Ωστόσο το 2003 οι Gockowiak & Henschke υποστήριξαν ότι η ζωτικότητα των γαλακτικών βακτηρίων επηρεάζεται περισσότερο από το περιβάλλον του οίνου σε μεγαλύτερο βαθμό από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω, ενώ όσον αφορά τους παραπάνω παράγοντες αναφέρθηκαν στην συνεργιστική τους δράση και όχι μεμονωμένα. Πιο συγκεκριμένα, σχετικά με το περιβάλλον του οίνου κάποιοι από τους παράγοντες που έχουν μελετηθεί είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηρίων και ζυμών, τα προϊόντα των ζυμών όπως η αιθανόλη και μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα, η παρουσία φαινολικών ενώσεων, η προσθήκη λυσοζύμης καθώς και οι οινοποιητικές τεχνικές. Πιο αναλυτικά:

- i. **Η αιθανόλη :** Η αλκοόλη αποτελεί το κύριο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και δρα κατασταλτικά για τα γαλακτικά βακτήρια, τα οποία παρουσία αλκοόλης δεν μπορούν να επιβιώσουν και να ολοκληρώσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση. Έχει αποδειχτεί ότι η δράση της είναι συνεργιστική με τη θερμοκρασία· ακόμα και αν υπάρχουν οι βέλτιστες θερμοκρασίες εμβολιασμού των γαλακτικών βακτηρίων, σε υψηλή αλκοόλη αυτά δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν, ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες τα γαλακτικά βακτήρια δεν επιβιώνουν (Henick-Kling 1993; Bauer & Dicks, 2004). Σε θερμοκρασία άνω των 25°C και σε αλκοόλ 10- 14% vol., τα γαλακτικά βακτήρια θανατώνονται ενώ αντίθετα σε θερμοκρασία 18-20°C μπορούν να ανταπεξέλθουν τις συνθήκες αλκοόλ (Henick-Kling 1993). Έχει αποδειχτεί ότι ο *O. oeni* και ο *L. plantarum* μπορούν να αντέξουν μάλιστα σε συνθήκες αλκοόλ 13% vol., ενώ η δράση τους καταστέλλεται όταν το αλκοόλ ξεπεράσει τους 14% vol. σύμφωνα με τους G-Alegria et al., 2004. Επίσης έρευνες έχουν δείξει ότι ο βαθμός με τον οποίο επηρεάζονται τα βακτήρια από το αλκοόλ εξαρτάται από τη μορφολογία των βακτηρίων (οι βάκιλοι είναι πιο ανθεκτική στην αλκοόλη σε σχέση με τους κόκκους) καθώς και τις συνθήκες ενεργοποίησης πριν τον εμβολιασμό τους στο μέσο πολλαπλασιασμού (Britz & Tracy, 1990). Τέλος, οι Chu-Ky et al., το 2005 εξέτασαν την επίδραση του pH, του κρύου και της αιθανόλης συνδυαστικά. Παρατήρησαν ότι οι κυτταρικές μεμβράνες του *O. oeni* σε κρασί με περιεκτικότητα σε αλκοόλ 10-14 % vol. ρευστοποιούνται και κατά συνέχεια δεν κάμπτονται και μειώνεται η βιωσιμότητά τους ενώ σε συνδυασμό με pH 3,5, τα κύτταρα θανατώνονται.
- ii. **Το SO<sub>2</sub> :** Είναι γενικά αποδεχτό ότι η προσθήκηθειώδους είναι απαραίτητη κατά την οινοποίηση δεδομένου ότι αποτελεί αντιμικροβιακό και κατασταλτικό παράγοντα έναντι μικροοργανισμών και βακτηρίων που θα εμποδίσουν την αλκοολική ζύμωση (Fleet & Heard, 1993 ). Το SO<sub>2</sub> βρίσκεται σε τρεις μορφές στον οίνο ανάλογα με το περιβάλλον, δηλαδή ανάλογα με το pH. Το μοριακό SO<sub>2</sub> θεωρείται η πιο ισχυρή μορφή τουθειώδους για τα γαλακτικά βακτήρια, κυρίως σε χαμηλό pH, το οποίο μπορεί να διασχίσει τις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων και να αντιδράσει με διάφορα συστατικά όπως οι πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων (Carrete et al., 2002 ; Bauer & Dicks, 2004). Επίσης έχει αποδειχτεί ότι τα

γαλακτικά βακτήρια διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά την αντοχή τους στο SO<sub>2</sub>, ο *O. oeni* είναι λιγότερο ανθεκτικός συγκριτικά με τον *Pediococcus* (Davis et al., 1985; Larsen et al., 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι το θειώδες παράγεται επίσης από τις ζύμες και αυτό εξαρτάται από το μέσο στο οποίο προστίθενται αλλά και από το στέλεχος της ζύμης που επιλέγεται (Romano & Suzzi, 1993). Οι περισσότερες ζύμες παράγουν λιγότερο από 30mg/l, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις κάποιες παράγουν έως και 100mg/l. Βέβαια η σωστή θείωση είναι απαραίτητη καθώς επιτρέπει μια ολοκληρωμένη αλκοολική ζύμωση, αποφεύγοντας την αλλοίωση της ποιότητας χωρίς να ελλοχεύει η διακοπή ή η καθυστέρηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Η προσθήκη του θειώδους θα πρέπει να γίνει με προσοχή και ο εκάστοτε οινολόγος να λάβει υπόψη και την παραγωγή του θειώδους από τις ζύμες. Σε περιπτώσεις μάλιστα που η μηλογαλακτική ζύμωση είναι απαραίτητη, τότε θα πρέπει να επιλεγθεί κάποιο στέλεχος ζυμομύκητα που να μην παράγει καθόλου θειώδες, ενώ αν η προσθήκη αυτού είναι απαραίτητη, να προστεθεί κατά το σπάσιμο των σταφυλιών μια μικρή ποσότητα. Αν απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα θειώδους (>30mg/L), πχ σε περιπτώσεις που δεν είναι υγιής η πρώτη ύλη, τότε ο εμβολιασμός των γαλακτικών βακτηρίων και συνεπώς η μηλογαλακτική ζύμωση θα λάβουν χώρα μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης (Henick-Kling & Park, 1994). Τέλος έχει προταθεί η χρήση της λυσοζύμης ώστε να συμπληρώνει την επίδραση του διοξειδίου του θείου ως αντιμικροβιακός παράγοντας.

- iii. **Το pH :** Το pH παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο για την εξέλιξη και ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Οίνοι με pH από 3,3 και άνω τείνουν να είναι λιγότερο προβληματικοί όσον αφορά την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των γαλακτικών βακτηρίων, σε σύγκριση με χαμηλότερα pH. Επίσης η εξάρτηση του pH και της εξέλιξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης σχετίζεται και με το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που θα επιλεγθεί · σε pH <3,5 προτιμάται ο *O. oeni* ενώ σε υψηλότερα pH ο *Lactobacillus* και ο *Pediococcus* έχουν καλύτερα αποτελέσματα. Ωστόσο σε pH<3,2 που εμφανίζονται σε ψυχρότερες περιοχές παρατηρούνται προβλήματα ακόμα και με τον *O. oeni*. Εκτός από την ανάπτυξη των βακτηρίων, ο μεταβολισμός διαφόρων συστατικών όπως τα σάκχαρα επηρεάζεται επίσης από τις τιμές του pH. Για αυτό το λόγο υπάρχουν δυο οριακές τιμές, η μια αναφέρεται στο μεταβολισμό των σακχάρων και η άλλη στον μεταβολισμό του μηλικού οξέος. Όσο μεγαλώνει η διαφορά αυτών των δύο τιμών pH, τόσο ευκολότερη γίνεται η προσαρμογή των γαλακτικών βακτηρίων στο μέσο για την διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Οι βέλτιστες τιμές pH για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων είναι μεταξύ 4,2 και 4,5. Η τιμές pH και η ταχύτητα εξέλιξης της μηλογαλακτικής είναι ανάλογες. Επίσης σε υπέρωριμα σταφύλια, με χαμηλή οξύτητα ο χρόνος εξέλιξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι σύντομος, όμως ο κίνδυνος βακτηριακής προσβολής είναι υψηλός. Σε περιπτώσεις που το pH είναι πολύ χαμηλό, συνίσταται η προσθήκη CaCO<sub>3</sub> για διόρθωση του pH χωρίς να επηρεαστεί η τιμή του τρυγικού οξέος.
- iv. **Η θερμοκρασία:** Η θερμοκρασία έχει τεράστια επίδραση στον πολλαπλασιασμό των γαλακτικών βακτηρίων και επηρεάζει τόσο την έναρξη όσο και την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Σχετίζεται κυρίως με την κινητική της ζύμωσης καθώς επηρεάζει το ρυθμό πολλαπλασιασμού, το χρόνο που θα

διαρκέσει η φάση ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων αλλά τον τελικό πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων που θα σχηματιστεί. (Henick-Kling, 1993; Bauer & Dicks, 2004). Για την ομαλή εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, η ενδεικνυόμενη θερμοκρασία είναι 18-25°C. Η χαμηλή θερμοκρασία κάνει η μηλογαλακτική ζύμωση πιο αργή, αλλά περιορίζει τον κίνδυνο βακτηριακής αλλοίωσης, όπως η αύξηση της πτητικής οξύτητας.

- v. **Ο ανταγωνισμός μεταξύ ζυμών και βακτηρίων :** Η επιλογή των ζυμών και των γαλακτικών βακτηρίων παίζει τεράστιο ρόλο στην ομαλή εξέλιξη των ζυμώσεων και στα αποτελέσματα που θα έχει στο τελικό αποτέλεσμα. Διάφορες είναι οι θεωρίες σχετικά με τον τρόπο ανταγωνισμού μεταξύ ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων. Σε μια έρευνα που διεξήχθη το 2008 από τους Nehme et al., βρέθηκε ότι ο ανταγωνισμός σχετίζεται με τα στελέχη που επιλέγονται κάθε φορά και αυτό έχει άμεσο αντίκτυπο στο πολλαπλασιασμό των βακτηρίων και όχι τόσο στην δραστηριότητα αυτών. Αντίθετα, οι Amink & Henick-Kling το 2005 ανέφεραν ότι ο ανταγωνισμός σχετίζεται με την κάθε ποικιλία ξεχωριστά και όχι με την επιλογή των ζυμών και βακτηρίων. Επιπλέον, ιδιαίτερης σημασίας αποτελούν τα θρεπτικά που καταναλώνονται τόσο από τις ζύμες όσο και από τα γαλακτικά βακτήρια. Στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης η δράση των γαλακτικών βακτηρίων καταστέλλεται καθώς όλοι οι διαθέσιμοι μεταβολίτες καταναλώνονται από τις ζύμες. Σε αυτούς τους μεταβολίτες συμπεριλαμβάνονται οι στερόλες, τα αμινοξέα και οι βιταμίνες (Larsen et al., 2003). Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, όλα τα θρεπτικά συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται από τις ζύμες και η αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων καθυστερεί έως ότου γίνει η αυτόλυση των ζυμών και συνεπώς η απελευθέρωση θρεπτικών στοιχείων τα οποία είναι απαραίτητα για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων (Alexandre et al., 2004). Κατά την αυτόλυση των ζυμών απελευθερώνονται στο μέσο ιδιαίτερης σημασίας ουσίες όπως αμινοξέα, βιταμίνες, γλουκάνια και μαννοπρωτεΐνες. (Alexandre et al., 2004. Μάλιστα οι μαννοπρωτεΐνες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς προωθούν την αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων και απορροφούν μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα, αποτοξινώνοντας το μέσο.
- vi. **Το N<sub>2</sub>:** Το N<sub>2</sub> είναι απαραίτητο θρεπτικό στοιχείο καθώς μέσω αυτού συντίθενται τα αμινοξέα τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Θεωρείται ότι οι κόκκοι έχουν μεγαλύτερες ανάγκες σε αμινοξέα σε σχέση με τους βακίλους.
- vii. **Τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας:** Παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση και αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την επιβίωση των γαλακτικών βακτηρίων. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται: το εξανοϊκό, το οκτανοϊκό, το δεκανοϊκό και το δωδεκανοϊκό οξύ (Lonvaud – Funel et al., 1998). Επηρεάζουν τον μεταβολισμό του μηλικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την επιβράδυνση της εξέλιξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης.
- viii. **Τα φαινολικά συστατικά:** Ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρούν τα γαλακτικά βακτήρια με τα φαινολικά συστατικά του οίνου, εξαρτάται από το είδος του γαλακτικού βακτηρίου που έχει επιλεγεί αλλά και από την ποσότητα των φαινολικών συστατικών που περιέχονται στο μέσο (Stead, 1993; Reguant et al., 2000 ; Garcia -Ruiz et al., 2008). Δεν είναι ξεκάθαρο αν τα φαινολικά οξέα διευκολύνουν ή αναστέλλουν τη δράση των γαλακτικών βακτηρίων καθώς έχουν

παρατηρηθεί διάφορα αποτελέσματα που έχουν πραγματοποιηθεί. Οι ελεύθερες ανθοκυάνες αλλά και το γαλλικό οξύ έχει αποδειχτεί ότι κινητοποιούν τη δράση των γαλακτικών βακτηρίων και να καταλύουν τη κατανάλωση του μηλικού οξέος. Επίσης τα φαινολικά συστατικά επηρεάζουν τον οργανοληπτικό χαρακτήρα καθώς κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, τα γαλακτικά βακτήρια μεταβολίζουν τα υδροξυκινναμωμικά οξέα παράγοντας πτητικές φαινόλες, που αποτελούν ελάττωμα για έναν οίνο.

- ix. **Το οξυγόνο:** Τα γαλακτικά βακτήρια είναι αναερόβιοι ή μικροαερόφιλοι οργανισμοί και αυτό εξαρτάται από την ομάδα ή το είδος του βακτηρίου στο οποίο ανήκουν. Η οξυγόνωση του οίνου μπορεί να είναι επωφελής μόνο στην έναρξη της μηλογαλακτικής και όχι σε μεγάλο βαθμό καθώς υπάρχει ο κίνδυνος της διακόπησης της.
- x. **Η διάρκεια παραμονής του οίνου με τα στέμφυλα:** Πρώιμος αποχωρισμός του οίνου από τα στέμφυλα οδηγεί σε απομάκρυνση μεγάλου ποσοστού γαλακτικών βακτηρίων που υπάρχουν σε αυτόν. Ως αποτέλεσμα, η μηλογαλακτική ζύμωση είτε διακόπτεται είτε καθυστερείται.

#### 1.6.4 Η συνεισφορά της μηλογαλακτικής ζύμωσης

Ο μεταβολισμός των γαλακτικών βακτηρίων τα οποία είναι υπεύθυνα για την διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης έχει μελετηθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια καθώς έχει επιφέρει τεράστιες αλλαγές τόσο στο οργανοληπτικό χαρακτήρα των οίνων όσο στη μικροβιολογική του σταθερότητα. Ορισμένες από τις αλλαγές που επιφέρει είναι οι εξής:

- i. **Μείωση της ολικής οξύτητας:** Η συγκεκριμένα μεταβολή αποτελεί τη σπουδαιότερη, ιδιαίτερα στους ερυθρούς οίνους, μειώνει την επιθετικότητα και προσδίδει απαλότητα. Η μείωση αυτή εξαρτάται κυρίως από το αρχικό pH του οίνου αλλά και την αρχική ποσότητα του μηλικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα η μείωση της οξύτητας οφείλεται στην αποικοδόμηση του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό οξύ όπου θεωρητικά από 1gr L-μηλικού οξέος παράγεται 0,67 gr L-γαλακτικό οξύ και 0,37gr CO<sub>2</sub>, χωρίς να επηρεάζεται το τρυγικό οξύ που είναι πιο σταθερό. Οπότε σε περίπτωση που η οξύτητα είναι υψηλή λόγω του τρυγικού οξέος, δεν παρατηρείται ιδιαίτερη αλλαγή στην οξύτητα με το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Σε γενικές γραμμές η μείωση της οξύτητας κυμαίνεται μεταξύ 0,1-0,3 gr/L τρυγικού οξέος, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν σημειωθεί αυξημένες μειώσεις της τάξης των 8,6gr/L. Η συγκεκριμένη αλλαγή είναι περισσότερο επιθυμητή σε βόρειες και ψυχρές περιοχές όπου οι οίνοι παρουσιάζουν αυξημένη οξύτητα.
- ii. **Μικροβιακή σταθερότητα του οίνου:** Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να πραγματοποιηθεί η μηλογαλακτική ζύμωση πριν την εμφιάλωση του οίνου, καθώς υπάρχει ο κίνδυνος να πραγματοποιηθεί η ζύμωση μέσα στο μπουκάλι και να εμφανιστεί ίζημα ή να θολώσει ο οίνος. Επίσης είναι πιθανό οι θρεπτικές ουσίες που δεν έχουν καταναλωθεί από τα γαλακτικά βακτήρια να αποτελέσουν υποστρώματα για αλλοιογόνα βακτήρια που θα υποβαθμίσουν ή θα αλλοιώσουν εξ'ολοκλήρου τον οίνο. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η κοινή αυτή πεποίθηση έχει αλλάξει και

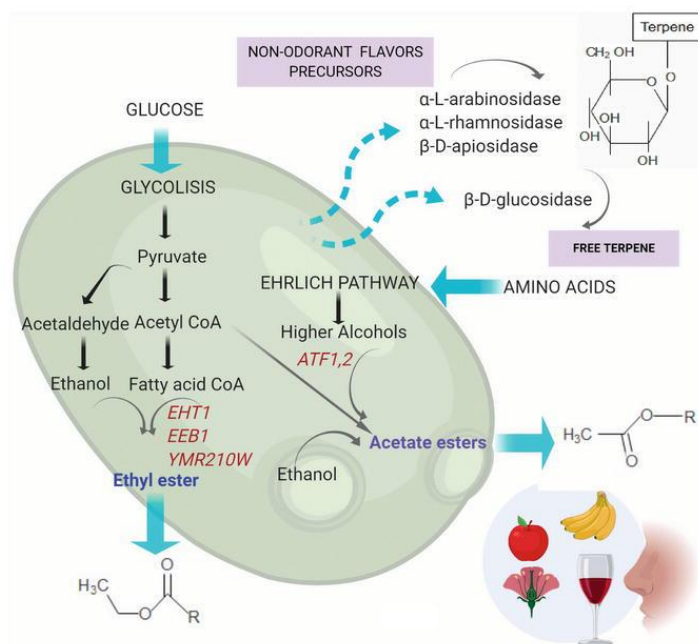
θεωρείται ότι η μηλογαλακτική ζύμωση σε κάποιες περιπτώσεις μειώνει τη μικροβιακή σταθερότητα. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η αύξηση του pH, μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη βακτηρίων αλλοίωσης του γαλακτικού οξέος, ειδικά όταν το pH κυμαίνεται μεταξύ 3,5 και 4.

**iii. Μεταβολές στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου:** Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η μηλογαλακτική ζύμωση έχει το δυναμικό να αλλάξει το αρωματικό προφίλ των οίνων από την μετατροπή ή την παραγωγή πτητικών αρωματικών ενώσεων. Ο Bartowsky & Henschke το 1995 ανέφεραν ότι τα γαλακτικά βακτήρια είναι ικανά να αλλάξουν το αρωματικό προφίλ, παράγοντας πτητικές ενώσεις από τον μεταβολισμό συστατικών του σταφυλιού (σάκχαρα και αμινοξέα), τροποποιώντας τους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τις ζύμες ή απορροφώντας εντός των κυττάρων τους και μετοβολίζοντας συστατικά της γεύσης. Ο τρόπος με τον οποίο η μηλογαλακτική ζύμωση επηρεάζει το αρωματικό προφίλ εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, με έναν από τους σημαντικότερους το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που θα χρησιμοποιηθεί, η ποικιλία αλλά και οι οινοποιητικές τεχνικές (Bartowsky et al., 2002b). Εξίσου σημαντικό παράγοντα αποτελεί ο ανταγωνισμός μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων – ζυμών, ο χρόνος εμβολιασμού των γαλακτικών βακτηρίων αλλά και το αν η μηλογαλακτική ζύμωση διεξήχθη σε δεξαμενή ή βαρέλι. Τα κύρια αρώματα που παράγονται από την μηλογαλακτική ζύμωση σχετίζονται με καρβονυλικές ενώσεις, εστέρες, πτητικές φαινόλες, πτητικά λιπαρά οξέα, θειούχες και αζωτούχες ενώσεις. Συγκεκριμένα:

- 1. Καρβονυλικές ενώσεις:** Το διακετύλιο (2,3-βουτανεδιόλη) είναι η κύρια ένωση που παράγεται κατά την μηλογαλακτική ζύμωση και προσδίδει αρώματα βουτύρου, καραμέλας και καβουρδισμένων ξηρών καρπών αλλά δίνει και ένα χαρακτήρα ζύμης στους αφρώδεις οίνους (Bartowsky, 2002). Αποτελεί ένα ενδιάμεσο προϊόν από το μεταβολισμό του κιτρικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια. Το κιτρικό οξύ είναι ένα οξύ που υπάρχει είτε στο σταφύλι είτε στο γλεύκος σε πολύ μικρή συγκέντρωση (0,1-1g/L). Μετατρέπεται από την κιτρική λυάση και την αποκαρβοξυλάση του οξαλοξικού σε πυροσταφυλικό, το οποίο ανάγεται σε γαλακτικό οξύ παρουσία NADH. Ωστόσο το πυροσταφυλικό οξύ κάποιες φορές μετατρέπεται αποκαρβοξυλιώνεται και μετατρέπεται σε ακετοίνη και 2,3-βουτανεδιόλη. Η αποικοδόμηση του κιτρικού οξέος από τα γαλακτικά οξέα προκαλεί μικρή αύξηση της πτητικής οξύτητας, χωρίς όμως αυτό να επηρεάζει αρνητικά το τελικό αποτέλεσμα. Το διακετύλιο σε μέτρια συγκέντρωση (1-4mg/L), συμβάλλει στην αρωματική πολυπλοκότητα που είναι επιθυμητή στους ερυθρούς οίνους, αλλά σε συγκεντρώσεις πάνω από 4 mg/L κυριαρχεί το χαρακτηριστικό άρωμα του βουτύρου το οποίο δεν είναι επιθυμητό. Επίσης η αντίληψη του αρώματος του διακετυλίου διαφέρει ανάλογα το πρωτόκολλο οινοποίησης, το στυλ, το χρόνο παλαίωσης του οίνου (Swiegers et al., 2005; Costello, 2006) καθώς και την ικανότητα του να αντιδρά με άλλες ενώσεις όπως το SO<sub>2</sub> (Martineau et al., 1995, Bartowsky et al., 2002a ; Bartowsky & Henschke, 2004 ; Swiegers et al., 2005). Έχει αποδειχτεί συγκεκριμένα γαλακτικά βακτήρια παράγουν σε μεγαλύτερες ποσότητες διακετυλίου, σε συνδυασμό με την κατάλληλη θερμοκρασία, την περιεκτικότητα σε SO<sub>2</sub> και οινολάσπες. Σε χαμηλό pH, το SO<sub>2</sub> βρίσκεται στην πιο δραστική του μορφή (αντιμικροβιακή), και επομένως η δράση των γαλακτικών βακτηρίων καταστέλλεται

και η παραγωγή διακετυλίου παραμένει σταθερή. Αντίθετα με οξυγόνωση του μέσου, ενισχύεται το οξειδωτικό περιβάλλον και διευκολύνεται η παραγωγή διακετυλίου από τις πρόδρομες ενώσεις του.

- 2. Εστέρες:** Η πλειοψηφία των εστέρων παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες κατά την αλκοολική ζύμωση αλλά παρουσία της εστεράσης των γαλακτικών βακτηρίων το αρωματικό προφίλ των οίνων τροποποιείται (Matthews et al., 2004). Υπάρχουν δύο κύριες ομάδες εστέρες που παράγονται κατά την διαδικασία της ζύμωσης και διακρίνονται στους οξικούς εστέρες και στους αιθυλικούς εστέρες των λιπαρών οξέων. Οι αιθυλικοί εστέρες των λιπαρών οξέων παράγονται από την ενζυμική εστεροποίηση των λιπαρών οξέων ενώ οι οξικοί εστέρες από την συμπύκνωση των ανώτερων αλκοολών με το ακέτυλο-CoA (Matthews et al., 2004 ; Ugliano & Henschke, 2008). Είναι γενικά αποδεκτό ότι κατά την μηλογαλακτική ζύμωση παράγονται σε μεγαλύτερο ποσοστό αιθυλικών εστέρων, συμπεριλαμβανομένου του γαλακτικού αιθυλεστέρα, του οξικού αιθυλεστέρα, εξανοϊκού αιθυλεστέρα και του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα. Ειδικά ο αιθυλικός εστέρας είναι ιδιαίτερα ωφέλιμο στο άρωμα του οίνου χάρη στον φρουτώδη, κρεμώδη και βουτυρώδη χαρακτήρα που προσδίδει. Σύμφωνα με έρευνες από τους Maicas et al. το 1999 αποδείχτηκε ότι η αύξηση ή η μείωση των εστέρων σχετίζεται από το είδος του γαλακτικού βακτηρίου που θα επιλεγεί. Βέβαια κατά την μηλογαλακτική ζύμωση σχηματίζονται περισσότερο εστέρες με αριθμό ατόμων άνθρακα C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> των αιθυλεστέρων των λιπαρών οξέων καθώς και ο 3- οξικός μεθυλοβουτυλεστέρας. Ωστόσο η παραγωγή των οξικών αιθυλεστέρων των λιπαρών οξέων είναι μεγαλύτερη από αυτή των οξικών εστέρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι βακτηριακά στελέχη που περιέχουν τη δράση εστεράσης έχουν εκτεταμένη παραγωγή εστέρων χάρη στην υδρόλυση των εστέρων, εμπλουτίζοντας τον φρουτώδη χαρακτήρα του οίνου. Μάλιστα ο *O. oeni* σημείωσε αυξημένη δραστηριότητα εστεράσης, ακολουθούμενο από τον *L. plantarum* και τελευταίο ο *Pediococcus*.

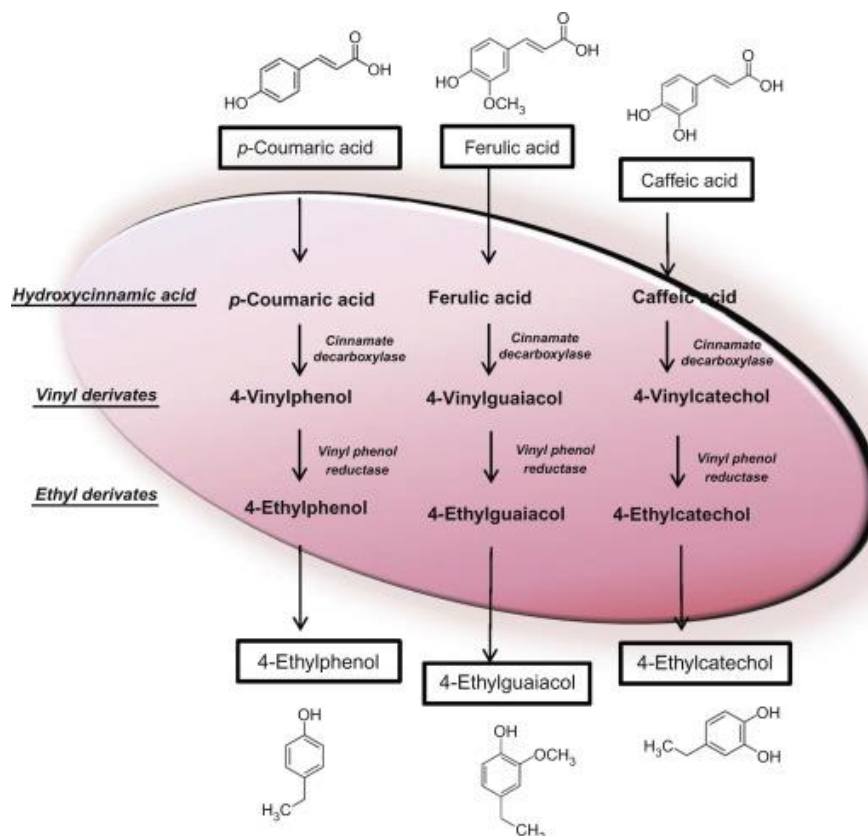


Εικόνα 16: Παραγωγή εστέρων κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Πηγή: (<https://www.intechopen.com/>).



- 3. Γλυκοσίδια:** Πολλά αρωματικά συστατικά βρίσκονται στην πρώτη ύλη, οι γνωστές πρόδρομες αρωματικές ενώσεις, ενωμένα με γλυκοζιτικούς δεσμούς με κάποιο σάκχαρο, με αποτέλεσμα να μην είναι αντιληπτές και να μην μπορούν να συμβάλλουν στο άρωμα των οίνων. Αυτές αποτελούνται από τα μονοτερπένια, τα C16-νορισοπρενοειδή, τα παράγωγα του βενζολίου και διάφορες αλειφατικές ενώσεις (Sefton et al., 1993). Τα γαλακτικά βακτήρια και κυρίως ο *O. oeni* έχει την ιδιότητα να σπάει αυτόν τον γλυκοζιτικό δεσμό με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται οι πτητικές αυτές ενώσεις και να ενισχύεται το άρωμα του οίνου (Grimaldi e al.,2000; Boido et al., 2002; Liu 2002; Barbagallo e al., 2004; D'Incecco et al., 2004; Matthews et al., 2004). Ο βαθμός με τον οποίο πραγματοποιείται η υδρόλυση των πρόδρομων αρωματικών ενώσεων εξαρτάται από το βακτηριακό στέλεχος, το pH, τη θερμοκρασία, τα σάκχαρα και την αιθανόλη.
- 4. Πτητικές θειούχες ενώσεις:** Η παραγωγή των συγκεκριμένων ενώσεων δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί εκτενώς. Ωστόσο, διάφορες θειικές ενώσεις παράγονται από τον μεταβολισμό της κυστεινης και της μεθειονίνης από τα γαλακτικά βακτήρια. Ορισμένες από τις ενώσεις που σχηματίστηκαν κατά τον μεταβολισμό αυτών ήταν η μεθανοθειόλη, το διμέθυλο δισουλφίδιο, η 3-προπαν-1-όλη και το 3-προπιονικό οξύ. Αν και αυτές οι ενώσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις συνεισφέρουν στην αρωματική πολυπλοκότητα των οίνων, σε μεγάλες συγκεντρώσεις αποτελούν ελάττωμα.
- 5. Πτητικές φαινόλες:** Ο οίνος περιέχει διάφορα φαινολικά συστατικά, των οποίων τα οξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την παραγωγή πτητικών φαινολικών ενώσεων που συνεισφέρουν στο άρωμα. Συγκεκριμένα τα υδροξυκινναμωμικά οξέα (το φερούλικό και το κουμαρικό) μεταφέρονται στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων, μετατρέπονται σε βινύλ-φαινόλες και στη συνέχεια οξειδώνονται ενζυμικά σε αιθύλ-φαινόλες (Cavin et al 1993 , Swiegers et al., 2005). Αυτά τα παράγωγα έχουν σημαντική επίδραση στο άρωμα του οίνου εξαιτίας του χαρακτηριστικού τους αρώματος και του χαμηλού ορίου αντίχενυσης τους. Η συγκέντρωσή τους είναι πολύ χαμηλή και εξαρτάται από την συγκέντρωση των πρόδρομων ενώσεων τους. Οι βινύλ-φαινόλες προσδίδουν αρώματα φαρμακείου (Ribereau -Gayon et al.,2002) ενώ οι αιθύλ-φαινόλες ζωικά αρώματα όπως άλογο και στάβλο (Lonvaud – Funel, 1999). Τα παραπάνω αρώματα είναι επίσης ενδεικτικά όταν ο οίνος έχει προσβληθεί από *Brettanomyces* (Chatonnet et al., 1992), το οποίο βέβαια δεν ισχύει απόλυτα σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις. Ειδικά όταν η μηλογαλακτική ζύμωση γίνεται αυθόρμητα αυτά τα αρώματα είναι πιο έντονα.
- 6. Ανώτερες αλκοόλες:** Οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται από την αποκαρβοξυλίωση και αναγωγή των α-κετο-οξέων τα οποία είναι ενδιάμεσα προϊόντα κατά την βιοσύνθεση των αμινοξέων. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (<300mg/L) συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα και στο φρουτώδη χαρακτήρα, ενώ σε υψηλές (>400mg/L) αποτελούν ελάττωμα (Swiegers et al.,2005). Δεν είναι ακριβές αν η μηλογαλακτική ζύμωση σχετίζεται με την παραγωγή των ανώτερων αλκοολών καθώς υπάρχουν και οι δύο απόψεις. Ωστόσο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα διαφορετικά γαλακτικά βακτήρια, τα υποστρώματα που

βρίσκουν στο μέσο, η ποικιλία, και οι οινοποιητικές τεχνικές συνδέονται άμεσα με την ένταση διαμορφώνουν επιδρούν στον αρωματικό χαρακτήρα κάθε οίνου.

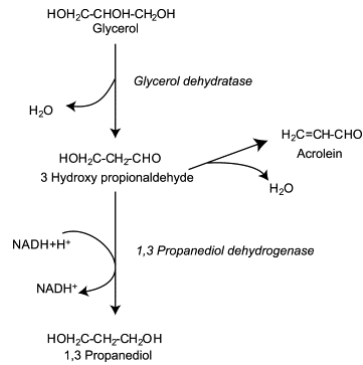


Εικόνα 17: Παραγωγή φαινολικών πτητικών συστατικών από γαλακτικά βακτήρια κατά την μηλογαλακτική ζύμωση. Πηγή : ( <https://www.sciencedirect.com/> ).

## 1.6.5 Ανεπιθύμητες μεταβολές της μηλογαλακτικής ζύμωσης

Τα γαλακτικά βακτήρια τα οποία είναι υπεύθυνα για την περαίωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι πιθανό σε ορισμένες περιπτώσεις αποικοδομήσουν συστατικά του οίνου και να προκαλέσουν ανεπιθύμητες μεταβολές στο τελικό προϊόν. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν:

- 1. Αύξηση της πτητικής οξύτητας:** Τα γαλακτικά βακτήρια μπορεί να μεταβολίσουν αζύμωτα σάκχαρα από την αλκοολική ζύμωση και να προκαλέσουν μεγάλη αύξηση της πτητικής οξύτητας. Επίσης ο μεταβολισμός του κιτρικού οξέος μπορεί επίσης να αυξήσει την πτητική οξύτητα καθώς παράγεται οξικό οξύ. Το οξικό οξύ είναι πολύ χαρακτηριστικό, δίνει αρώματα ξιδιού (Francis & Newton, 2005) σε συγκεντρώσεις >0,7g/L ενώ σε συγκεντρώσεις 0,2-0,6 g/L μπορεί να συνεισφέρει στην αρωματική πολυπλοκότητα.
- 2. Παραγωγή ακρολείνης :** Παράγεται από την αποικοδόμηση της γλυκερόλης που παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση από τα γαλακτικά βακτήρια δίνοντας πικρή γεύση στον οίνο (Handbook of Oenology Vol. 1, 2006).



Εικόνα 17: Παραγωγή ακρολείνης από την αποικοδόμηση της γλυκερόλης κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Πηγή: ( <https://www.sciencedirect.com/> ).

3. **Παραγωγή βιογενών αμινών :** Οι κύριες βιογενείς αμίνες που παρατηρούνται στο κρασί είναι η πουτρεσκίνη, η τυραμίνη, υσταμίνη και η καδαβερίνη (Ten Brink et al.,1999; Lonvaud-Funel, 2001). Σχηματίζονται από συγκεκριμένα γαλακτικά βακτήρια μέσω αποκαρβοξυλίωσης συγκεκριμένων αμινοξέων (Ten Brink et al.,1990; Lonvaud-Funel, 2001). Προκαλούν προβλήματα υγείας όπως πονοκεφάλους, υπέρταση, καρδιακά προβλήματα και σε σπάνιες περιπτώσεις αναφυλακτικό σοκ (Shalaby, 1996). Έχει αποδειχτεί ότι η μηλογαλακτική ζύμωση σχετίζεται άμεσα με την παραγωγή βιογενών αμινών, και ειδικότερα τα γένη *Pediococcus* και *Lactobacillus* (Moreno – Arribas & Polo, 2008). Σύμφωνα με τους επιστήμονες, ο *O. oeni* είναι υπεύθυνος για την παραγωγή της υσταμίνης ενώ ο *Lactobacillus* για την παραγωγή τυραμίνης. Ορισμένοι παράμετροι που παίζουν ρόλο στην παραγωγή των βιογενών αμινών είναι το υψηλό pH (Wibowo et al., 1985; Lonvaud-Funel & Joyeux, 1999), χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ και χαμηλό  $\text{SO}_2$ .

## 2.Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Οινοποίηση και πειραματική πορεία

Η συλλογή των σταφυλιών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διατριβής πραγματοποιήθηκε στη περιοχή της Αρχαίας Νεμέας , η οποία υπάγεται στη ζώνη της Νεμέας.

Η κατάσταση υγιεινής των σταφυλών κρίθηκε πολύ καλή δεδομένης της φαινολογικής και τεχνολογικής ωρίμανσης. Η συγκομιδή των σταφυλιών έγινε στις 21/10/2021 , όταν τα σταφύλια είχαν αποκτήσει τιμή άνω των 12,5° Baume και pH=3,58. Με τη συλλογή της απαιτούμενης ποσότητας σταφυλών από των αμπελώνα, έγινε η παραλαβή των σταφυλιών στο χώρο οινοποίησης και πραγματοποιήθηκε χειρωνακτική αποβοστρύχωση και εκραγισμός. Ο σταφυλοπολτός μαζί με τα στέμφυλα στη συνέχεια μοιράστηκαν ισόποσα (40 κιλά) σε 5 ανοξείδωτους περιέκτες χωρητικότητάς 60lt και στη συνέχεια έγινε προσθήκη ενζύμων εκχύλισης (Rohavin Color) σε συγκέντρωση 4g/hl σε όλους τους περιέκτες.

Στη συνέχεια έγινε διαχωρισμός των περιεκτών ανάλογα με το γαλακτικό βακτήριο που θα εξεταζόταν σε κάθε δείγμα. Χρησιμοποιήθηκαν 2 δοχεία στα οποία ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε την ίδια μέρα της συγκομιδής με γαλακτικά βακτήρια του γένους *Lactobacillus plantarum*, VINIFLORA® NOVA™ της εταιρείας Chr Hansen για την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης , πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Μετά την πάροδο τεσσάρων ωρών πραγματοποιήθηκε αζωτούχος θρέψη με ανόργανο και οργανικό άζωτο σε αναλογία 1:1, συγκεκριμένα Spring Ferm Xtreme και σε συγκέντρωση 15g/hl και ίδια συγκέντρωση DAP. Καθ' όλη τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης πραγματοποιούνταν σπάσιμο του καπέλου 3 φορές της μέρα και καθημερινός έλεγχος της πορείας της ζύμωσης με μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας (°Brix) και θερμοκρασίας. Μετά από 48 ώρες της μηλογαλακτικής ζύμωσης έγινε εμβολιασμός με *Saccharomyces cerevisiae*, ζύμη BRAVO από RENAISSANCE YEAST σε συγκέντρωση 25g/hl καθώς και προσθήκη οργανικού αζώτου σε συγκέντρωση 30 g/hl. Με το πέρας ης αλκοολικής ζύμωσης, έγινε διαχωρισμός των στέμφυλων από τον εν δυνάμει οίνο και μετάγγιση σε πλαστικά δοχεία των 10lt. Ύστερα από μικρό χρονικό διάστημα διαπιστώθηκε και η ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης μέσω ενζυμικής ανάλυσης στον ενζυμικό αναλυτή Biosystem για τον εντοπισμό απουσίας μηλικού οξέος. Τέλος πραγματοποιήθηκε απολάσπωση, θείωση με sodium metabisulfite σε συγκέντρωση 10 g/lt και ερμητικό κλείσιμο για αποφυγή της ύπαρξης οξυγόνου. Τα δοχεία παρέμειναν σε ψυκτικό θάλαμο για επίτευξη φυσικής διάλυγας μέχρι την εμφιάλωσή τους.

Σχετικά με τους άλλους 3 περιέκτες έγινε αρχικά εμβολιασμός με ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* σε συγκέντρωση BRAVO από RENAISSANCE YEAST σε συγκέντρωση 25g/hl. Συγκεκριμένα για τον εμβολιασμό, η ζύμη διασπάρθηκε σε δεκαπλάσια ποσότητα γλεύκους και αφέθηκε σε ηρεμία για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια, ακολούθησε ήπια ανάδευση και προσθήκη του εμβολίου στους

ανοξειδωτους περιέκτες. Μετά την πάροδο τεσσάρων ωρών, πραγματοποιήθηκε αζωτούχος θρέψη καθώς και προσθήκη οργανικού αζώτου (Viniliquid) σε συγκέντρωση 30 g/ hl Κατά το 1/3 της αλκοολικής ζύμωσης ,πραγματοποιήθηκε δεύτερη προσθήκη θρέψης αζώτου αυτή τη φορά οργανικού και ανόργανου αζώτου σε αναλογία 1:1 και σε συγκέντρωση 30g/hl. Καθ' όλη τη διάρκεια της αλκοολική ζύμωση γινόταν σπάσιμο του καπέλου τρεις φορές την ημέρα, με ταυτόχρονη ανάδευση για την χορήγηση επαρκούς οξυγόνου. Μάλιστα γίνονταν καθημερινά μετρήσεις Baume, θερμοκρασίας και pH για συνεχή παρακολούθηση της πορείας της αλκοολικής ζύμωσης. Μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, έγινε διαχωρισμό των στέμφυλων και μετάγγιση του οίνου σε 6 δοχεία χωρητικότητας 10 lt για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά στελέχη του γαλακτικού βακτηρίου *Oenococcus oeni*. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά στελέχη της εταιρείας Chr Hansen (VINIFLORA® CH11, VINIFLORA® CH16, VINIFLORA® CINE™). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 2 ακόμα περιέκτες για την πραγματοποίηση αυθόρμητης μηλογαλακτικής ζύμωσης από γηγενή γαλακτικά βακτήρια καθώς και ένας ακόμα περιέκτης στον οποίο έγινε θείωση με sodium metabisulfite σε συγκέντρωση 10g/hl, για την διακοπή της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Με την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής, το οποίο διαπιστώθηκε ενζυμικά στον ενζυμικό αναλυτή (malic acid <0,1 g/lt), έγινε τελική απολάσπωση και μετάγγιση σε 2 περιέκτες για το κάθε στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου *Oenococcus oeni*, θείωση με sodium metabisulfite σε συγκέντρωση 10g/hl και ερμητικό κλείσιμο για την αποφυγή ύπαρξης οξυγόνου. Τα δοχεία μεταφέρθηκαν σε ψυκτικό θάλαμο για την πραγματοποίηση φυσικής διάλυγας μέχρι την εμφιάλωση τους.

Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων ανάλογα με τις συνθήκες οινοποίησης τους.

<b>Κωδικος Δείγματος</b>	<b>Γαλακτικά βακτήρια</b>
<b>TH</b>	Μόνο Αλκοολική ζύμωση
<b>SP</b>	Γηγενή γαλακτικά βακτήρια
<b>N</b>	VINIFLORA® NOVA™
<b>CH11</b>	VINIFLORA® CH11
<b>CH16</b>	VINIFLORA® CH16
<b>CINE</b>	VINIFLORA® CINE™

## 2.2 Τα γαλακτικά βακτήρια

Στη συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά εμπορικά στελέχη του γένους *Oenococcus oeni* από την εταιρεία Chr Hansen με διαφορετικά χαρακτηριστικά το καθένα.

1. VINIFLORA<sup>®</sup> CINE<sup>™</sup>: Συνίσταται για διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης χωρίς την παραγωγή διακετυλίου καθώς δεν έχει τα ένζυμα που μεταβολίζουν το κιτρικό οξύ και έχουν ως προϊόν το διακετύλιο, δηλαδή αρωμάτων βουτύρου. Χρησιμοποιείται για οίνους λευκούς, ροζέ και κόκκινα άμεσης κατανάλωσης. Οι καλύτερες συνθήκες εμβολιασμού είναι σε θερμοκρασία 17-25°C, pH > 3,2, μέγιστη αλκοολική περιεκτικότητα 14% vol. , ενώ το ολικό SO<sub>2</sub> < 30ppm πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Προσδίδει στους οίνους αρώματα με έμφαση στον φρουτώδη χαρακτήρα, ισορροπία αλλά και πολυπλοκότητα. Όσον αφορά τον χρόνο εμβολιασμού, δεν υπάρχει κάποια ακριβή πληροφορία για το πότε πρέπει να γίνει.
2. VINIFLORA<sup>®</sup> CH16: Συνίσταται για οίνους που παράγονται σε θερμές περιοχές όπου η περιεκτικότητα αλκοόλ μπορεί να φτάσει μεταξύ 14-16 % vol.. Έχει μικρό χρόνο περαίωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης αλλά η παραγωγή διακετυλίου είναι μικρή. Επίσης χρησιμοποιείται για οίνους παλαίωσης των ποικιλιών Cabernet Sauvignon, Merlot, Corvina, Nebiolo, Nero d'Avola, Tempranillo, Syrah, Grenache, Malbec. Σχετικά με τις συνθήκες εμβολιασμού, η θερμοκρασία εμβολιασμού να είναι μεταξύ 17-25°C, pH>3,4 ενώ το ολικό SO<sub>2</sub> να μην ξεπερνά τα 70ppm. Όσον αφορά τον χρόνο εμβολιασμού, δεν υπάρχει κάποια ακριβή πληροφορία για το πότε πρέπει να γίνει.
3. VINIFLORA<sup>®</sup> CH11: Συνίσταται για οίνους που παράγονται σε θερμές περιοχές ή για οινοποιήσεις που γίνονται σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε μικρά pH αλλά κυρίως για λευκά κρασιά. Ωστόσο, το συγκεκριμένο στέλεχος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλες περιπτώσεις, επιταχύνοντας το χρόνο διεξαγωγής της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Παράγει διακετύλιο σε μικρές ποσότητες, ενισχύει την κομψότητα των λευκών οίνων και διατηρεί τη φρεσκάδα. Σχετικά με τις συνθήκες εμβολιασμού, η θερμοκρασία εμβολιασμού να είναι μεταξύ 14-25°C, pH>3 , περιεκτικότητα σε αλκοόλ να μην ξεπερνά τους 15% vol. ενώ το ολικό SO<sub>2</sub> να μην ξεπερνά τα 35ppm. Όσον αφορά τον χρόνο εμβολιασμού, δεν υπάρχει κάποια ακριβή πληροφορία για το πότε πρέπει να γίνει.
4. VINIFLORA<sup>®</sup> NOVA<sup>™</sup> : Το συγκεκριμένο βακτήριο χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Συγκεκριμένα γίνεται αρχικά ο εμβολιασμός του βακτηρίου και μετά από 24-48 ώρες γίνεται και ο εμβολιασμός με τον *Saccharomyces cerevisiae* για την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Ιδανικά συνίσταται να προστίθεται σε περιπτώσεις που το μηλικό οξύ είναι χαμηλό και δεν ελλοχεύει ο κίνδυνος έναρξης αυθόρμητης μηλογαλακτικής ζύμωσης και αύξησης της πτητικής οξύτητας. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι σχηματίζει ακεταλδεΐδη, ακετοίνη, 2,3-μέθυλο-1-βουτανόλη και ισοβουτανόλη. Επίσης είναι υπεύθυνο για μικρή αύξηση του pH, καθώς και για την παραγωγή ευρείας πτητικών ενώσεων που παραπέμπουν σε αρώματα κερασιού, μούρου, κόκκινων φρούτων κ.α. Κατά την

προσθήκη του συγκεκριμένου είναι απαραίτητη η ελλιπής θείωση (<10ppm.), με θερμοκρασία εμβολιασμού 18-24° C και pH > 3,2.

## **2.3 Οι αναλύσεις των παραχθέντων οίνων**

Στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής καθώς και στο τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης, πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω αναλύσεις:

- i. Βασικές αναλύσεις οίνου βασισμένες σε επίσημες μεθόδους του OIV :
  - ✓ Προσδιορισμός αλκοολικού βαθμού
  - ✓ Προσδιορισμός ενεργούς οξύτητας
  - ✓ Προσδιορισμός ογκομετρούμενης -ολικής οξύτητας
  - ✓ Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας
  - ✓ Προσδιορισμός χρωματικών χαρακτηριστικών (ένταση -απόχρωση)
  - ✓ Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων
  - ✓ Προσδιορισμός ελεύθερου και ολικού θειώδους
- ii. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών
- iii. Προσδιορισμός ανθοκυανών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)
- iv. Οργανοληπτικός έλεγχος

## **2.4 Βασικές αναλύσεις οίνων**

### **2.4.1 Προσδιορισμός αλκοολικού βαθμού**

Ο προσδιορισμός του αλκοολικού τίτλου με της μέθοδο της απόσταξης μεθ' υδρατμών. Συγκεκριμένα, έγινε απόσταξη της αλκοόλης και στη συνέχεια στο απόσταγμα μετρήθηκε η αλκοόλη με αραιόμετρο Gay-Lussac. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε επί τις εκατό αιθανόλη κατά όγκο. (OIV-MA-AS311-01A).

### **2.4.2 Προσδιορισμός ολικής οξύτητας**

Η ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα των οίνων βασίζεται στην εξουδετέρωση των όξινων ομάδων του δείγματος με πρότυπο διάλυμα αλκαλέως (0,1N NaOH) παρουσία δείκτη βρωμοθυμόλης. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο (OIV-MA-AS313-01).

### **2.4.3 Προσδιορισμός ενεργούς οξύτητας**

Ο προσδιορισμός της ενεργούς οξύτητας πραγματοποιείται με πεχάμετρο ψηφιακό. (HANNA HI 112).

#### **2.4.4 Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας**

Ο προσδιορισμός της πτητικής οξύτητας γίνεται με τιτλοδότηση των πτητικών οξέων της σειράς του οξικού οξέος που διαχωρίζονται από τον οίνο μέσω απόσταξης με υδρατμούς και ανακαθαρισμό των ατμών. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε γραμμάρια οξικού οξέος ανά λίτρο. (OIV-MA-AS313-02).

### **2.5 Χρωματικά χαρακτηριστικά**

#### **2.5.1 Ένταση και απόχρωση**

Το χρώμα των ερυθρών οίνων οφείλεται στις ανθοκυάνες και στα παράγωγα αυτών, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας του οίνου και αποδίδεται φωτομετρικά χάρη στην εκλεκτική απορρόφηση αυτών των ενώσεων σε τρία μήκη κύματος του ορατού φάσματος. Συγκεκριμένα, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου λαμβάνουμε μετρήσεις σε απορροφήσεις που γίνονται στα 420, 520 και 620 nm. Η ένταση ορίζεται ως το άθροισμα των τιμών των τριών απορροφήσεων που λαμβάνουμε στα τρία παραπάνω μήκη κύματος και παίρνει τιμές από 0,3-1,8 ανάλογα με την ποικιλία που εξετάζουμε. Η απόχρωση ορίζεται από το πηλίκο της τιμής που λαμβάνουμε στα 420nm προς τη τιμή που λαμβάνουμε στα 520 nm, παίρνει τιμές από 0,5-0,7 για νεαρούς οίνους και φτάνει ως 1,2-1,3 σε παλαιωμένους οίνους, οπότε γίνεται αντιληπτό ότι εξαρτάται άμεσα από την ηλικία του οίνου.

Όσον αφορά τα μήκη κύματος, στα 520 nm έχουμε τη μέγιστη απορρόφηση, χαρακτηριστικό του κόκκινου χρώματος και οφείλεται στις ελεύθερες ανθοκυάνες, με τη μορφή κατιόντος φλαβυλίου. Με το πέρασμα του χρόνου, μειώνεται σταδιακά η τιμή που λαμβάνουμε στα 520nm και αυξάνεται η τιμή που λαμβάνουμε στα 420nm, χαρακτηριστική του κίτρινου χρώματος. Η τιμή στα 620nm, χαρακτηριστική του κυανού χρώματος, λαμβάνεται για καλύτερη αξιολόγηση του χρώματος των ερυθρών οίνων, κυρίως των νεαρών και οφείλεται στις ανθοκυάνες που βρίσκονται σε μορφή άνυδρης βάσης (Ribereau-Gayon, 1970).

#### **2.5.2 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών**

Ο προσδιορισμός του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (Δ.Φ.Ο.) βασίζεται στην απορρόφηση του βενζοϊκού δακτυλίου των φαινολικών ουσιών στο υπεριώδες και συγκεκριμένα στα 280nm. Η απορρόφηση αυτή αντιστοιχεί στην συγκέντρωση των φλαβονοειδών φαινολών όπως οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες, των μη φλαβονοειδών όπως τα φαινολικά οξέα και κάποιων μη φαινολικών ουσιών. Παράλληλα δεν περιλαμβάνει ενώσεις όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ως μικρό σφάλμα καθώς οι συγκεκριμένες ενώσεις βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση στα σταφύλια και στους οίνους αντίστοιχα. Οι τιμές που λαμβάνονται κυμαίνονται μεταξύ 6 και 120. Η μέθοδος για το Δ.Φ.Ο. είναι γρήγορη και εύκολη και τα αποτελέσματα που δίνει είναι επαναλήψιμα. Οι μετρήσεις λαμβάνονται από φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού, ρυθμισμένο για μέτρηση απορρόφησης στα



280nm. Οι ερυθροί οίνοι αραιώνονται 100 φορές με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια λαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησης τους στα 280nm. Τέλος, για την έκφραση του αποτελέσματος, η μετρούμενη τιμή πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή αραιώσης, ο οποίος στην συγκεκριμένη μέθοδο είναι 100.

### 2.5.3 Ολικά Φαινολικά (Μέθοδος Folin-Ciocalteu)

Πρόκειται για μια πιστοποιημένη από τον OIV (OIV-MA-AS2-10) φωτομετρική μέθοδο, η οποία βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στον οίνο από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο είναι ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδενικά ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) και φωσφοβολφραμικά ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) ετεροπολυμερή οξέα. Μετά την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων του οίνου, τα ίδια ανάγονται σε μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου ( $W_8O_{23}$ ) και του μολυβδενίου ( $Mo_8O_{23}$ ). Η μέγιστη απορρόφηση λαμβάνεται στα 765nm και είναι ανάλογη των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στο δείγμα. Συγκεκριμένα, σε ογκομετρική φιάλη των 100mL προστίθενται 100μL οίνου, 0,5mL διαλύματος Folin και 1,5mL  $Na_2CO_3$  20%, για ρύθμιση της αλκαλικότητας και συμπληρώνεται ο όγκος με απιονισμένο νερό. Για την παρασκευή του τυφλού δείγματος που χρησιμοποιείται για μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιούνται τα ίδια αντιδραστήρια με τη διαφορά ότι αντί για οίνο χρησιμοποιούμε απιονισμένο νερό. Μετά από κάθε προσθήκη γίνεται ανάδευση με vortex. Ακολουθεί αναμονή 30min σε θερμοκρασία δωματίου, για την ανάπτυξη του χρωμοφόρου. Κατόπιν μετρείται η απορρόφηση στα 765nm. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος σε mg /L, όπως προκύπτουν μετά την κατασκευή καμπύλης αναφοράς με γνωστές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος και ακολουθώντας την ίδια μέθοδο.

### 2.5.4 Ολικές ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες απαντώνται στο κρασί σε τρεις μορφές: τις ελεύθερες (Al) και τις πολυμερισμένες με ταννίνες (Ac), κάποιες από τις οποίες αποχρωματίζονται με την παρουσία θειώδη ανυδρίτη  $SO_2$  (TA) ενώ οι υπόλοιπες δεν επηρεάζονται (TAT). Επομένως το άθροισμα των παραπάνω αντιπροσωπεύει τις ολικές ανθοκυάνες σε ένα δείγμα. Μέσω της μεθόδου γίνεται εκτίμηση της ποσότητας τους μέσω μιας χημικής μεθόδου για τον προσδιορισμό των Al και TA. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στη διαφοροποίηση του χρώματος αυτών ανάλογα με το pH και το  $SO_2$  (Ribereau-Gayon and Stonestreet, 1965). Σχετικά με το πειραματικό μέρος, σε μικρή φιάλη ογκομετρική τοποθετούνται 1mL οίνου, 1 mL αλκοολικού διαλύματος HCl 1% και 20 mL υδατικού διαλύματος HCl 2% . Στη συνέχεια σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρονται 5mL στο καθένα από το παραπάνω διάλυμα. Στο πρώτο προστίθενται 2 mL απιονισμένο νερό και στο δεύτερο προστίθενται 2 mL διαλύματος  $NaHSO_3$  15%. Αφήνονται σε ηρεμία για 20min και μετά παίρνουμε την απορρόφηση των διαλυμάτων στα 520nm. Ως μάρτυρας, για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιούμε απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών (Al) δίνεται

από τη σχέση εκφράζεται σε mg/L και προκύπτει από την αφαίρεση των δύο απορροφήσεων ( $OD_{H_2O} - OD_{NAHSO_3}$ ) και των πολλαπλασιασμό της τιμής με το 875.

### 2.5.5 Προσδιορισμός ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Στη συγκεκριμένη διατριβή για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης όλων των επιμέρους ανθοκυανών χρησιμοποιήθηκε μέθοδος άμεσης έγχυσης σε υγρό χρωματογράφο. Συγκεκριμένα, ο εξοπλισμός αποτελούνταν από μια συσκευή Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης HP 1050 με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων Jasco MD-910, στήλη Restek Pinnacle II C18 (250, 4.0mm, 5μm). Τα δείγματα των οίνων υποβλήθηκαν σε φιλτράρισμα με φίλτρο σύριγγας πορώτητας 0,2μ πριν από τη χρωματογραφία και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια-vials.

Στον παρακάτω πίνακα περιγράφεται η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών.

<b>Μέθοδος</b>	Προσδιορισμός ανθοκυανών
Στήλη	Restek Pinnacle II C18, 250*4.0mm*5μm.
Ρυθμός ροής διαλυτών	1 ml/min
Ανιχνευτής	Diode array (DAD; Jasco MD-910)
Μήκος κύματος ανίχνευσης	520nm
Όγκος έγχυσης	10μL
Διαλύτες	Διαλύτης A: 10% φορμικό οξύ σε νερό καθαρότητας HPLC Διαλύτης B: MeOH καθαρότητας HPLC
Πρόγραμμα HPLC	Χρόνος σε min 0 22 30 35
	% διαλύτη A 95 50 5 95
	% διαλύτη A 5 50 95 5
Έκφραση αποτελεσμάτων	Ισοδύναμα Mln σε mg/L

### 2.5.6 Προσδιορισμός ταννινών με τη μέθοδο: Δέσμευση από πρωτεΐνες-BSA

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για τη μέτρηση ταννινών δείγματος οίνου ή ράγας. Δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά από τους Hagerman & Butler το 1978, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Adams & Harbertson (1999) για αναλύσεις οίνου και στην συνέχεια τροποποιήθηκε από τον Harbertson et al. το 2003. Η αρχή μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με άλλα μόρια όπως η αλβουμίνη (BSA), μια πρωτεΐνη που προέρχεται από ορό βοοειδών, και τη καθίζηση των αδιάλυτων συμπλόκων, τανίνης-πρωτεΐνης, που δημιουργούνται. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο διάλυμα, γίνεται επαναδιαλυτοποίηση σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ταννινών μετά από αντίδραση με χλωριούχο σίδηρο, ο οποίος αντιδρά με μόρια πολυφαινολών και σχηματίζει σύμπλοκα της μορφής  $Fe-(OR)_6$ . Στη συνέχεια γίνεται φωτομετρική μέτρηση στα

510m και δίνεται η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των ιονισμένων φαινολικών μορίων (OR) τα οποία σε αλκαλικό διάλυμα έχουν ιώδες χρώμα. Η συγκέντρωση των ταννινών στα σύμπλοκα τανίνης πρωτεΐνης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα. Μάλιστα, είναι απαραίτητο το πρωτεϊνικό διάλυμα να περιέχει διπλάσια ποσότητα αλβουμίνης σε σχέση με τη συγκέντρωση των ταννινών, ενώ η περίσσεια πρωτεΐνης δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα. Θεωρείται ότι το αλκαλικό περιβάλλον συνεισφέρει στην σταθερότητα του συμπλόκου τανίνης-πρωτεΐνης και επομένως βελτιώνει και το περιεχόμενο της μετρούμενης τανίνης (Harbertson et al., 2015). Επίσης η σύνδεση των προανθοκυανιδινών με τις πρωτεΐνες εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος των μορίων καθώς και τον αριθμό και τη θέση του υδροξυλίου. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για την μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών, μεγάλων μορίων, διαφορετικού μεγέθους της τάξης των τριμερών έως οκταμερών μορίων, ενώ δε μπορεί να εντοπίσει μονομερή και διμερή. (Harbertson et al., 2014). Επομένως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χημικό προσδιορισμό της στυπτικότητας. (Paissoni M.A. et al. , 2018). Τέλος, έχει αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα ανάλυσης BSA μπορεί να ποικίλουν με βάση διάφορες μεταβλητές όπως η ομογενοποίηση του δείγματος τανίνης-πρωτεΐνης και ο χρόνος συμπαραμονής τανίνης-πρωτεΐνης BSA (Ropiak et al., 2017).

### **2.5.7 Προσδιορισμός ταννινών με προσθήκη μεθυλ-κυτταρίνης (MCP)**

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό ταννινών με προσθήκη MCP δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά το 2006 από τους Sarneckis et al.. Πρόκειται για μια γρήγορη, σχετικά απλή αλλά και αξιόπιστη φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του συνόλου ταννινών σε ένα δείγμα οίνου. Στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις ταννινών-πολυμερών το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων και εν τέλει την καθίζηση αυτών. Στη συγκεκριμένη μέθοδο ως πολυμερές χρησιμοποιείται η μεθυλ-κυτταρίνη, ενώ κατά τη διαδικασία μέτρησης με το φασματοφωτόμετρο ρυθμισμένο στα 280nm, λαμβάνονται μετρήσεις απορρόφησης πριν και μετά την προσθήκη αυτού του πολυμερούς για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων. Σύμφωνα με τους ερευνητές , (Sernakis et al. 2006) η μέθοδος αυτή είναι επιλεκτική για τις συμπυκνωμένες ταννίνες και δεν υπάρχει ο κίνδυνος να συμπεριληφθούν στη μέτρηση φαινολικά όπως ανθοκυάνες και μονομερή κατεχίνης που απορροφούνται στο ίδιο μήκος κύματος καθώς επίσης και η μεθυλ-κυτταρίνη (AWRI, 2009).

Όλη η μέθοδος πραγματοποιείται σε erpedorf των 2mL και για όλα τα δείγματα ετοιμάζονται δύο erpedorf. Πιο αναλυτικά, το ένα αποτελεί τον μάρτυρα, το erpedorf του οποίου περιέχει 50μL οίνου, 400μL κορεσμένου θεικού αμμωνίου και 1550μL απιονισμένο νερό ενώ το erpedorf του δείγματος περιέχει 50μL οίνου 600μL μεθυλ-κυτταρίνης (ακολουθεί ήπια ανάδευση και παραμονή σε ηρεμία για 2-3 min και στην συνέχεια προστίθενται τα υπόλοιπα αντιδραστήρια), 400μL κορεσμένου θεικού αμμωνίου και 950μL απιονισμένο νερό. Αφού παρασκευασθούν παραμένουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10min και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 5min στις 10000rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται στη κυψελίδα χαλαζία και μετριέται η απορρόφηση στα 280nm. Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Επομένως η τιμή της απορρόφησης του μάρτυρα ( $A_{280-b1}$ )

φανερώνει την ποσότητα των φαινολικών ουσιών που υπάρχουν στο δείγμα, ενώ η τιμή της απορρόφησης του δείγματος ( $A_{280-s}$ ) φανερώνει την ποσότητα των φαινολικών που παραμένουν εν διαλύσει στο δείγμα ακόμα και μετά την προσθήκη του πολυμερούς. Η διαφορά των δύο απορροφήσεων υποδεικνύει την απορρόφηση που οφείλεται στις ταννίνες. Ύστερα από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση των ταννινών σε ισοδύναμα κατεχίνης, στο διάλυμα μέτρησης, σε mg/L κατεχίνης  $C_{ds}$ . Για να βρεθεί η τελική συγκέντρωση ταννινών πολλαπλασιάζουμε την τιμή  $C_{ds}$  επί 40 καθώς και με το συντελεστή αραίωσης (αν έχει πραγματοποιηθεί αραίωση στο δείγμα).

## 2.6 Οργανοληπτικός έλεγχος

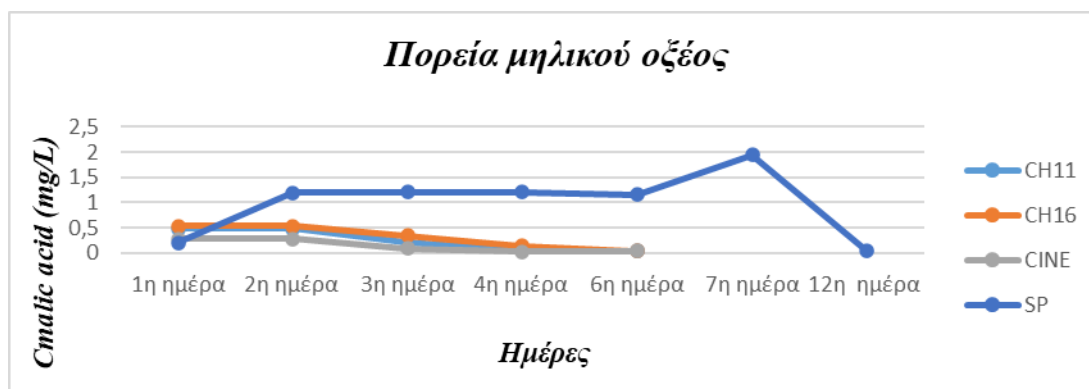
Ένας εξίσου σημαντικός έλεγχος που διεξήχθη στα δείγματα του ερυθρού οίνου από την ποικιλία Αγιωργίτικο, ήταν ο οργανοληπτικός ο οποίος πραγματοποιήθηκε με τη περιγραφική μέθοδο. Συγκεκριμένα, η περιγραφική ανάλυση αποτελεί το πρωταρχικό εργαλείο για την ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών για τα τρόφιμα από εκπαιδευμένο προσωπικό και διάφορες είναι οι μέθοδοι που έχουν υλοποιηθεί. Κατά την εφαρμογή της στην αξιολόγηση του οίνου υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί που σχετίζονται με την απόδοση της έντασης των αρωμάτων σύμφωνα με τον Lawlees (Lawlees, 1999). Επίσης δεδομένου ότι ο οίνος αποτελεί ένα διάλυμα με περίπλοκο αρωματικό προφίλ, είναι δύσκολο να αποτυπωθεί και να διακριθεί απόλυτα κάποιο αρωματικό χαρακτηριστικό (Laing, 1991; Laing & Glemares, 1992). Ο οργανοληπτικός έλεγχος στη συγκεκριμένη διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών από εκπαιδευμένο πάνελ δοκιμαστών, σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο. Σκοπός του οργανοληπτικού ελέγχου ήταν η αξιολόγηση των οίνων αλλά και η διερεύνηση των διαφορών τους, δεδομένου ότι η μηλογαλακτική ζύμωση είχε πραγματοποιηθεί από διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων. Τα δείγματα αναλύθηκαν ως προς τα χρωματικά χαρακτηριστικά (ένταση, απόχρωση), τα αρωματικά χαρακτηριστικά και την ένταση αυτών, την οξύτητα, τη στυπτικότητα, την πικράδα, αλλά και την συνολική εκτίμηση. Όσον αφορά τα αρωματικά χαρακτηριστικά, επιλέχθηκαν οι περιγραφικοί όροι: κεράσι, βανίλια, φράουλα, μούρα, μανιτάρι (γήινο), δαμάσκηνο καθώς και τα μπαχαρικά. Δημιουργήθηκαν 7 πρότυπα διαλύματα για τους παραπάνω περιγραφικούς όρους και δόθηκαν στο κάθε δοκιμαστή πριν τον οργανοληπτικό έλεγχο ώστε να γίνει επαναληπτική εκπαίδευση των δοκιμαστών. Στο πάνελ συμμετείχαν 10 εκπαιδευμένοι δοκιμαστές, οι οποίοι αφού μύρισαν τα πρότυπα διαλύματα προχώρησαν στη διαδικασία της περιγραφικής αξιολόγησης. Ο οργανοληπτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με 30ml δείγματος σε γυάλινα ποτήρια γευσιγνωσίας οίνου ISO σε σχήμα τουλίπας και καλύφθηκαν με τρυβλίο προκειμένου να αποφευχθεί η απώλεια αρωμάτων. Στην συνέχεια μεταφέρθηκαν στον ειδικά διαμορφωμένο χώρο γευσιγνωσίας, ο οποίος παρείχε τον κατάλληλο φωτισμό και εξαερισμό. Τα δείγματα είχαν κωδικοποιηθεί με τυχαίους τριψήφιους και αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά με δύο επαναλήψεις με χρήση κλίμακας από το ένα έως το 5 για κάθε περιγραφικό όρο που εξεταζόταν. Στο τέλος συλλέχθηκαν τα αποτελέσματα με τη χρήση Compusense Cloud, Academic Consortium και πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση.

### 3. Αποτελέσματα

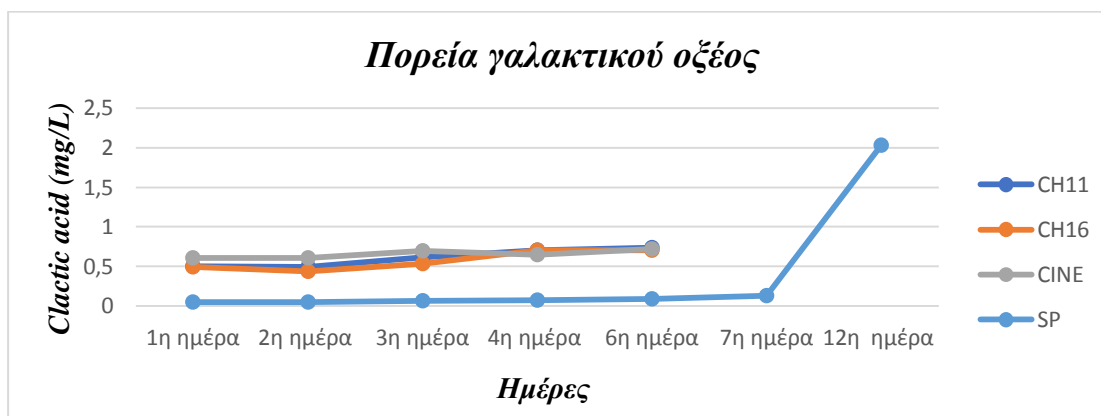
#### 3.1 Η κινητική πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης

##### 3.1.1. Κινητική πορεία των οξέων κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση

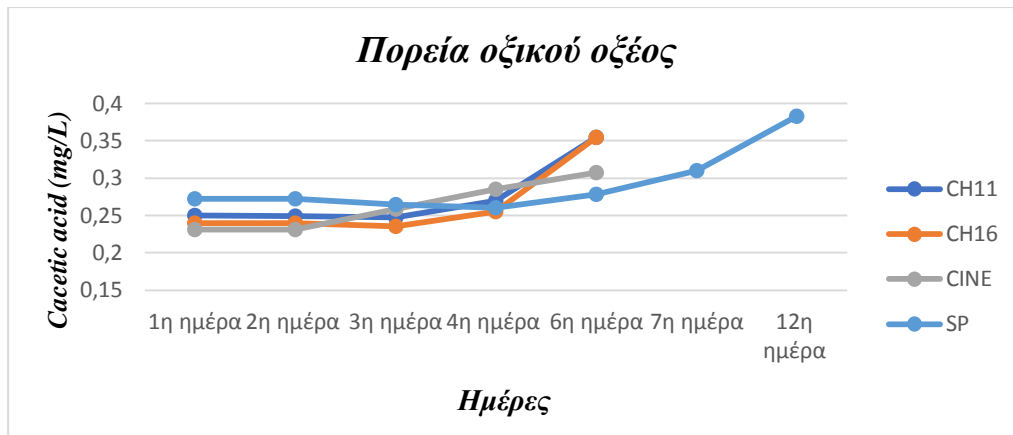
Η κινητική της μηλογαλακτικής ζύμωσης μελετήθηκε μέσω της μέτρησης του μηλικού και του γαλακτικού οξέος. Οι μετρήσεις των οξέων γίνονται μετά από ενζυμική αντίδραση και φασματοσκοπική μέτρηση στα 340nm (OIV-MA-AS313-11; OIV-MA-AS313-07) με χρήση ενζυμικού αναλυτή Y15 (BioSystems). Οι μετρήσεις γίνονταν καθημερινά για το κάθε δείγμα ξεχωριστά έως ότου η τιμή του μηλικού οξέος να είναι < 0,1 g/L. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν και μετρήσεις του οξικού οξέος.



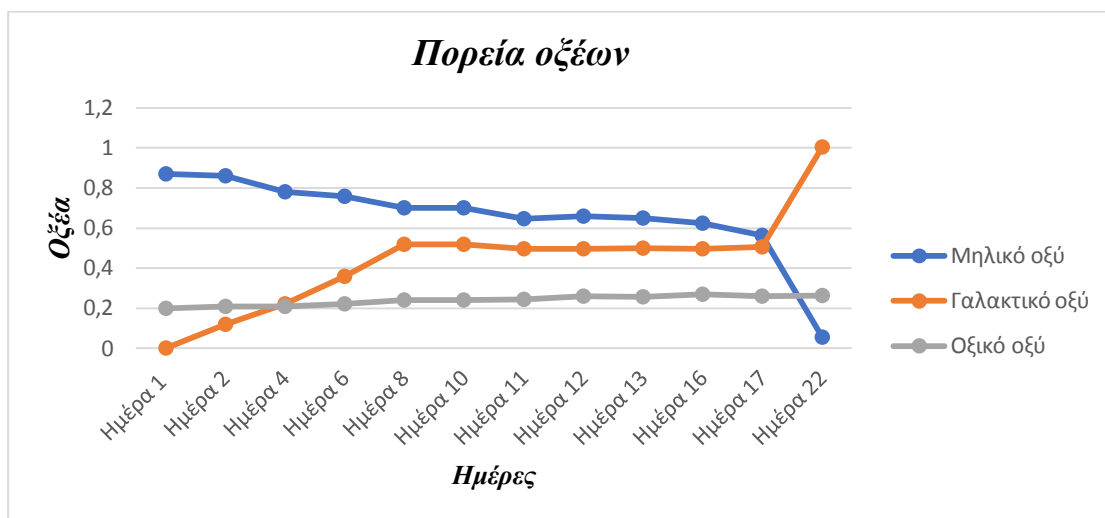
Διάγραμμα 1: Πορεία μείωσης του μηλικού οξέος κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης για τα δείγματα CH11 , CH16 , CINE, SP.



Διάγραμμα 2: Πορεία αύξησης του γαλακτικού οξέος κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης για τα δείγματα CH11, CH16, CINE, SP.



Διάγραμμα 3: Πορεία αύξησης του οξικού οξέος κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης για τα δείγματα CH11, CH16, CINE, SP.

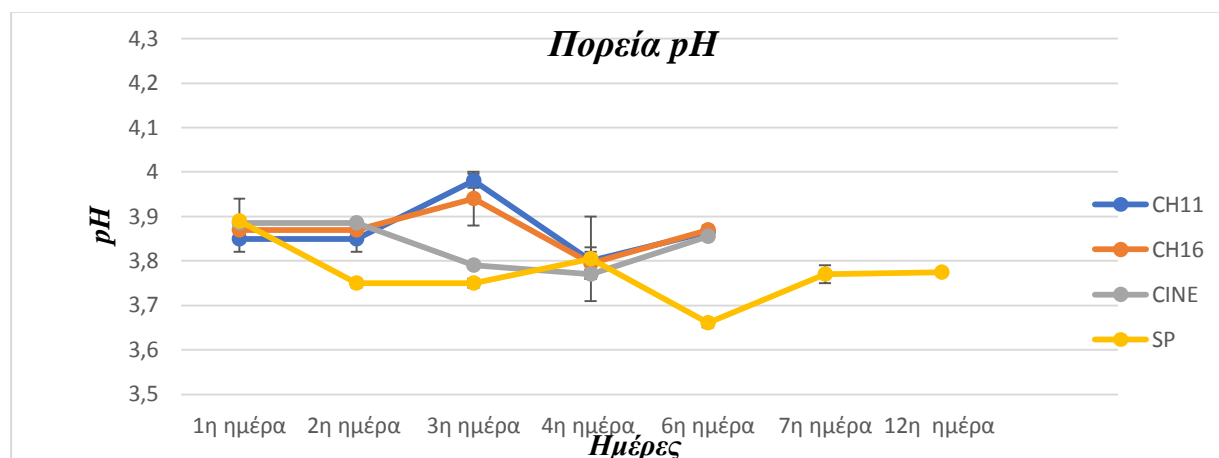


Διάγραμμα 4: Πορεία οξέων κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης για το δείγμα NOVA.

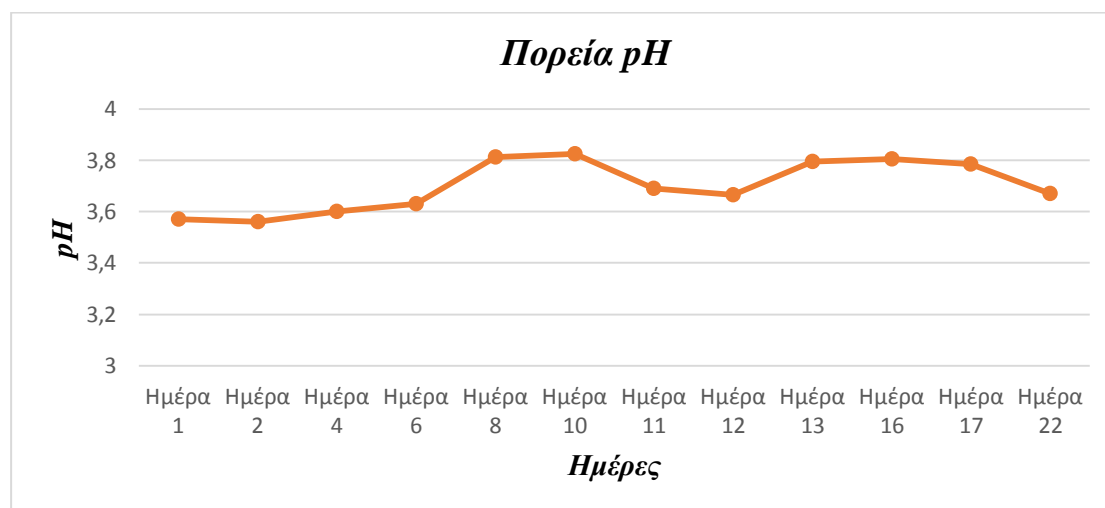
Στα παραπάνω γραφήματα (1, 2, 3, 4) παρουσιάζεται η πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης μέσω των μετρήσεως του μηλικού και του γαλακτικού οξέος. Παρατηρούμε ότι η μηλογαλακτική ζύμωση δεν διήρκησε για όλα τα δείγματα το ίδιο χρονικό διάστημα. Ενώ όλα τα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με γαλακτικά βακτήρια του γένους *Oenococcus oeni* (CH11, CH16, CINE), ολοκλήρωσαν τη μηλογαλακτική ζύμωση την έκτη μέρα μετά τον εμβολιασμό με τα γαλακτικά βακτήρια, το δείγμα που είχε εμβολιαστεί με γαλακτικό βακτήριο του γένους *Lactobacillus plantarum* (NOVA) ολοκλήρωσε τη μηλογαλακτική ζύμωση μετά από 22 μέρες ενώ το δείγμα στο οποίο η μηλογαλακτική ζύμωση έγινε αυθόρμητα (SP) η μηλογαλακτική ζύμωση διήρκησε δώδεκα μέρες. Μάλιστα, όπως παρατηρούμε μετά την έβδομη μέρα για το δείγμα SP και μετά από την δέκατη έβδομη μέρα για το δείγμα NOVA υπάρχει μια απότομη αύξηση του γαλακτικού οξέος και αντίστοιχα απότομη μείωση του μηλικού οξέος και συνεπώς σε επιτάχυνση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Όσον αφορά τα υπόλοιπα δείγματα, CH11, CH16, CINE παρατηρούμε ομαλή εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Όσον αφορά το οξικό οξύ παρατηρούμε μια ελάχιστη αύξηση τόσο για τα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με *Oenococcus oeni* τόσο για το

δείγμα που είχε εμβολιαστεί με *Lactobacillus plantarum*. Κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση μια αύξηση της τάξεως 0,1-0,2 g/L οξικού οξέος μπορεί να συμβάλλει στη πολυπλοκότητα του οίνου (Bartowsky & Henshke, 1995). Μάλιστα θεωρείται αναπόφευκτη ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια.

### 3.1.2 Πορεία εξέλιξης pH κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση



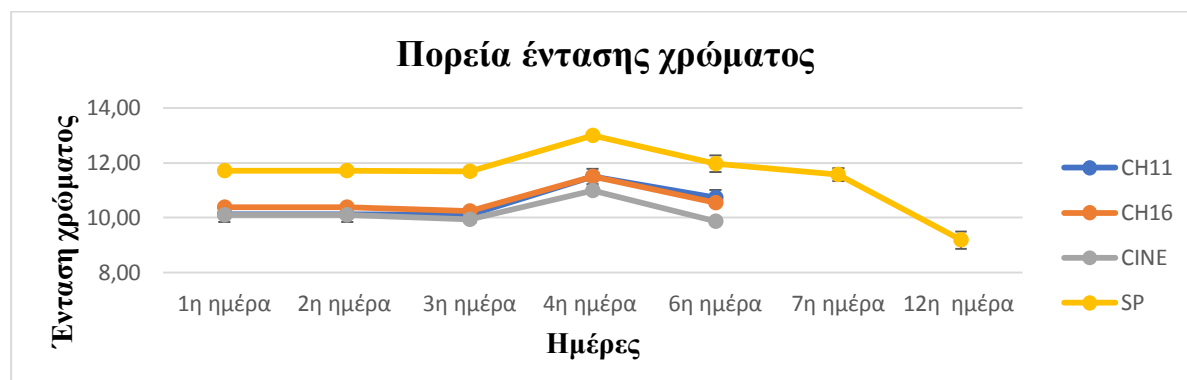
**Διάγραμμα 5:** Πορεία εξέλιξης pH κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης για τα δείγματα CH11, CH16, CINE, SP.



**Διάγραμμα 6:** Πορεία εξέλιξης pH κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης για το δείγμα NOVA.

Στα παραπάνω διαγράμματα (4, 5) παρουσιάζεται η εξέλιξη του pH κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα 5, σε όλα τα δείγματα παρατηρείται μια μικρή πτώση του pH και κυρίως για το δείγμα SP στο οποίο η μηλογαλακτική δείγματα, το οποίο βέβαια δεν είναι συνυφασμένο με τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ωστόσο στο δείγμα NOVA παρατηρείται μια μικρή αύξηση του pH, το οποίο είναι λογικό κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση.

### 3.1.3 Πορεία εξέλιξης χρωματικών χαρακτηριστικών κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση.



(A)

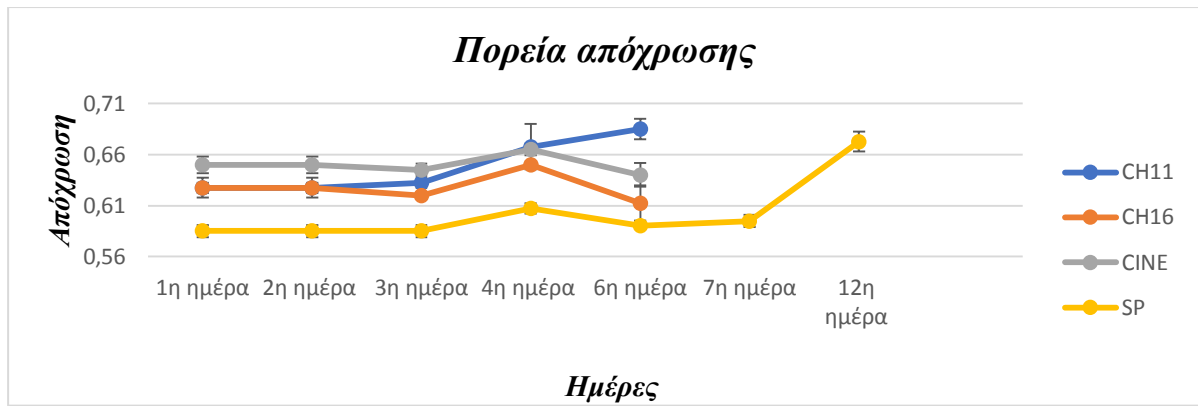


(B)

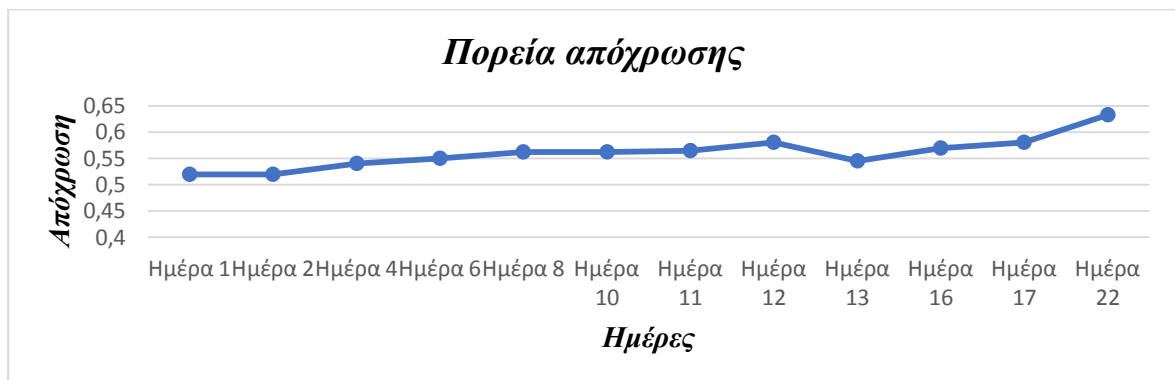
Διάγραμμα 7: Πορεία εξέλιξης έντασης κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης (A) για τα δείγματα CH11, CH16, CINE, SP. (B) για το δείγμα NOVA.

Στα παραπάνω διαγράμματα 7A, 7B παρουσιάζεται η πορεία της έντασης του χρώματος στην διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αρχικά, όσον αφορά το διάγραμμα 7A, παρατηρούμε ότι για τα δείγματα CH16, και CH11 παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της έντασης, για το δείγμα CINE δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή ενώ για το δείγμα SP παρατηρούμε μια σημαντική πτώση της έντασης. Αντίθετα, για το δείγμα NOVA, όπως φαίνεται από το διάγραμμα 7B παρατηρείται αύξηση της έντασης μέχρι το τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Οι διαφορετικές πορείες της έντασης κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, οφείλονται στα διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν. Σύμφωνα με μελέτες, η επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης στα φαινολικά συστατικά του οίνου σχετίζεται άμεσα με το μεταβολισμό του κάθε στελέχους γαλακτικού βακτηρίου (Hernandez et al., 2006). Όλα τα δείγματα εκτός του δείγματος SP, στο τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης είχαν ένταση 10 μονάδες, το οποίο αποτελεί το κατώτερο όριο σύμφωνα με το οποίο ένας οίνος θεωρείται κατάλληλος για παλαίωση (Καλλίθρακα, 2015).





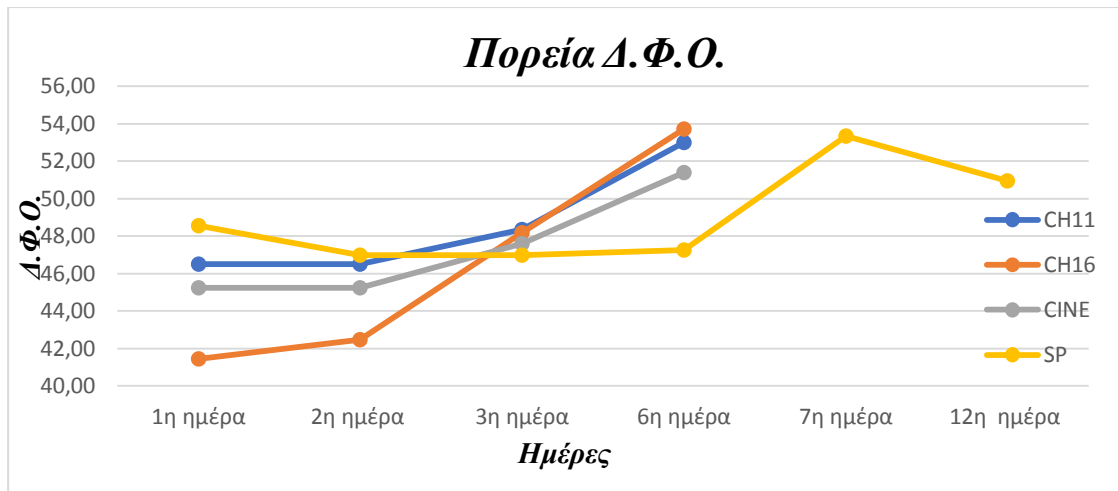
(A)



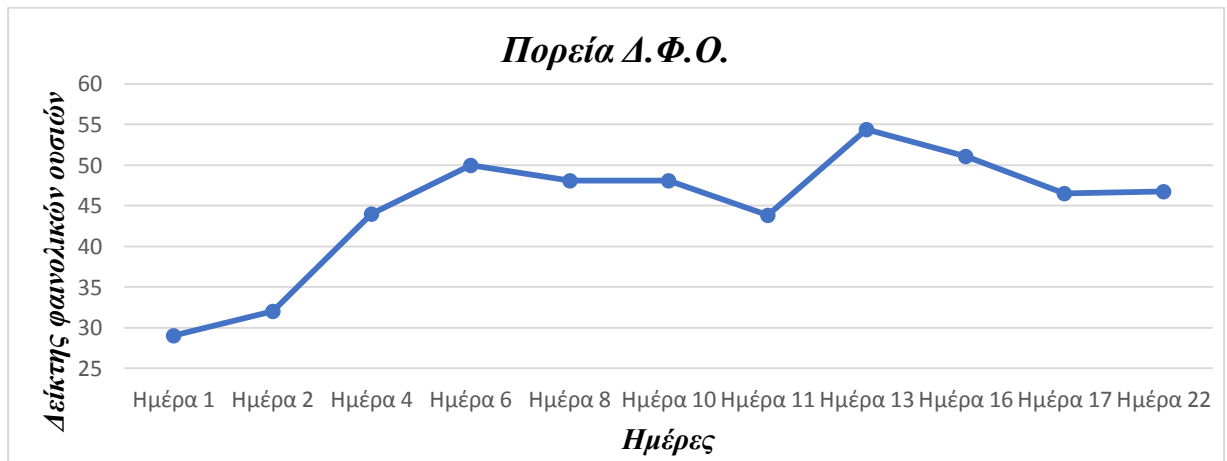
(B)

Διάγραμμα 8: Πορεία εξέλιξης απόχρωσης κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης (A) για τα δείγματα CH11, CH16, CINE, SP. (B) για το δείγμα NOVA.

Στα παραπάνω διαγράμματα 8A, 8B παρουσιάζεται η εξέλιξη της απόχρωσης κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Για τα δείγματα CH11, SP καθώς και για το δείγμα NOVA παρατηρείται αύξηση της τιμής της απόχρωσης. Αντίθετα, τα δείγματα CH16 και CINE παρουσίασαν μικρή μείωση της τιμής της απόχρωσης. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι τιμές της απόχρωσης αποδεικνύουν την χημική ηλικία των οίνων. Στα παραπάνω διαγράμματα οι τιμές της απόχρωσης των δειγμάτων κυμαίνονται μεταξύ 0,52 έως 0,65 το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό για φρέσκους, ερυθρούς οίνους των οποίων τα όρια βρίσκονται μεταξύ 0,5-0,7 (Ribéreau – Gayon P., et al. 2006).



(A)



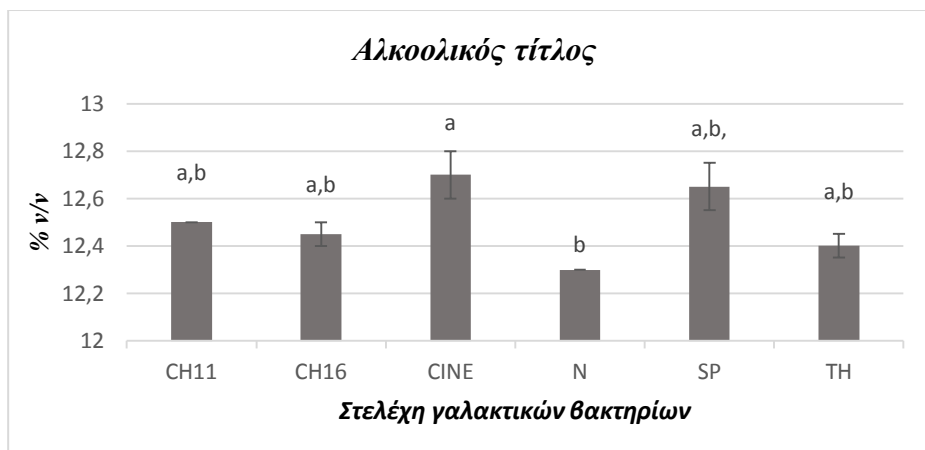
(B)

Διάγραμμα 9: Πορεία εξέλιξης Δ.Φ.Ο. κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης (A) για τα δείγματα CH11, CH16, CINE, SP. (B) για το δείγμα NOVA.

Στα παραπάνω διαγράμματα 9A, 9B παρατηρείται αυξητική πορεία της τιμής του Δ.Φ.Ο. κατά την εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης για όλα τα δείγματα.

## 3.2 Βασικές αναλύσεις οίνων

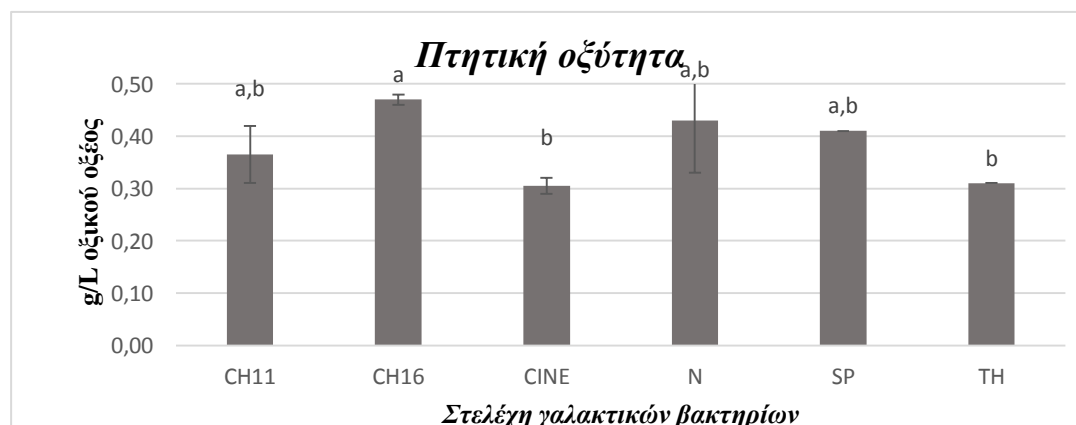
### 3.2.1 Αλκοολικός τίτλος



Διάγραμμα 10: Αλκοολικός τίτλος των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test ,  $p < 0,05$ ).

Ο αλκοολικός τίτλος μεταξύ των δειγμάτων δεν φαίνεται να παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων. Υψηλότερη τιμή αλκοολικού τίτλου εμφάνισε ο οίνος CH11 ακολουθούμενος από τον CH16 και τον CINE. Την χαμηλότερη τιμή αλκοολικού τίτλου εμφάνισε ο TH, δηλαδή ο μάρτυρας, χωρίς όμως να παρουσιάζει μεγάλη στατιστική διαφορά.

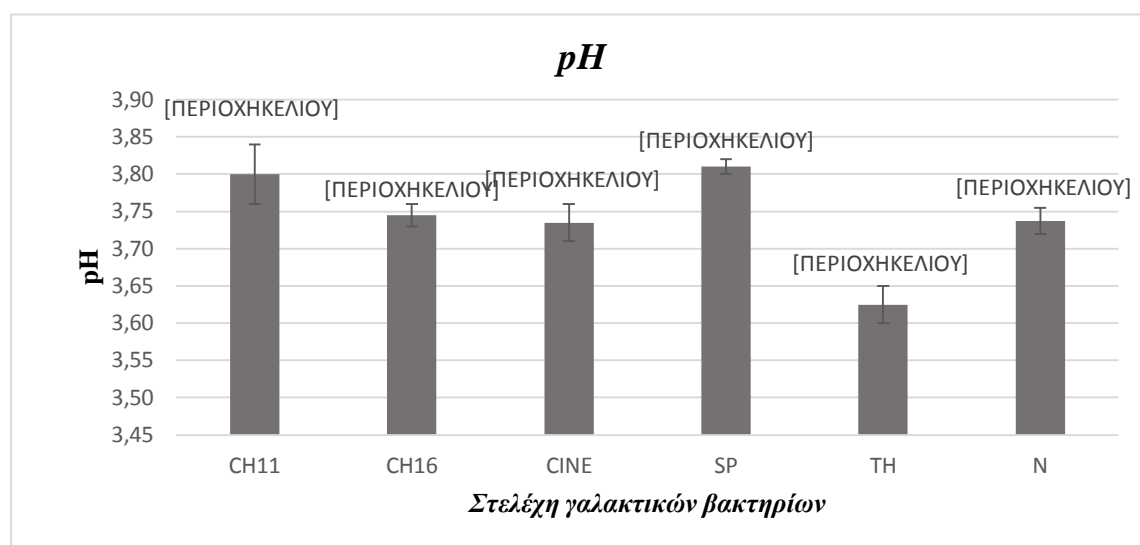
### 3.2.2 Πτητική οξύτητα



Διάγραμμα 11: Πτητικές οξύτητες των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test ,  $p < 0,05$ ).

Παρατηρούμε ότι υπάρχουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Μεγαλύτερη τιμή πτητική οξύτητας παρουσιάζει το δείγμα CH16, ενώ μικρότερη τιμή τα δείγματα CINE και TH. Πρέπει να σημειωθεί ότι η τόσο η αλκοολική όσο και η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκαν χωρίς την προσθήκη θειώδους ανυδρίτη. Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων είναι απόλυτα φυσιολογικές καθώς κάθε γαλακτικό οξύ έχει διαφορετικά επίπεδα παραγωγής οξικού οξέος. Σε όλες τις περιπτώσεις όλες οι τιμές είναι εντός ορίων της νομοθεσίας.

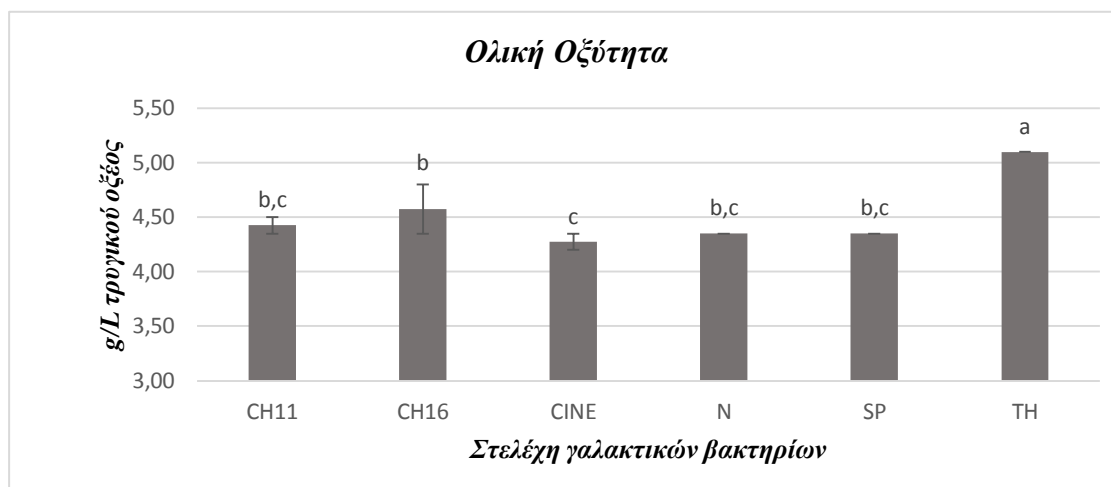
### 3.2.3 Ενεργός οξύτητα / pH



Διάγραμμα 12: Ενεργός οξύτητα των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test,  $p < 0,05$ ).

Η ενεργός οξύτητα αναφέρεται κυρίως στην περιεκτικότητα του τρυγικού οξέος στον οίνο. Σχετίζεται άμεσα με το χρώμα και σε χαμηλές τιμές προσδίδει ζωηρότητα. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα τα δείγματα που έχουν πραγματοποιήσει μηλογαλακτική ζύμωση έχουν υψηλότερη τιμή pH, το οποίο είναι φυσιολογικό καθώς κατά την μηλογαλακτική ζύμωση η ολική οξύτητα μειώνεται και το pH αυξάνεται. Υψηλότερες τιμές pH παρουσιάζουν τα δείγματα CH11 και SP ενώ χαμηλότερη τιμή παρουσιάζει το δείγμα TH, δηλαδή ο μάρτυρας. Από τις μετρήσεις φαίνεται ότι μεταξύ στατιστικά δεν διαφέρουν τα δείγματα CH11, CH16, NOVA, διαφέρουν ελάχιστα με τα δείγματα CINE και SP και ακόμα περισσότερο με το δείγμα TH. Σε γενικές γραμμές οι τιμές του pH είναι φυσιολογικές δεδομένου ότι το Αγιωργίτικο είναι μια ποικιλία με μέτριες έως υψηλές τιμές ενεργούς οξύτητας.

### 3.2.4 Ολική οξύτητα

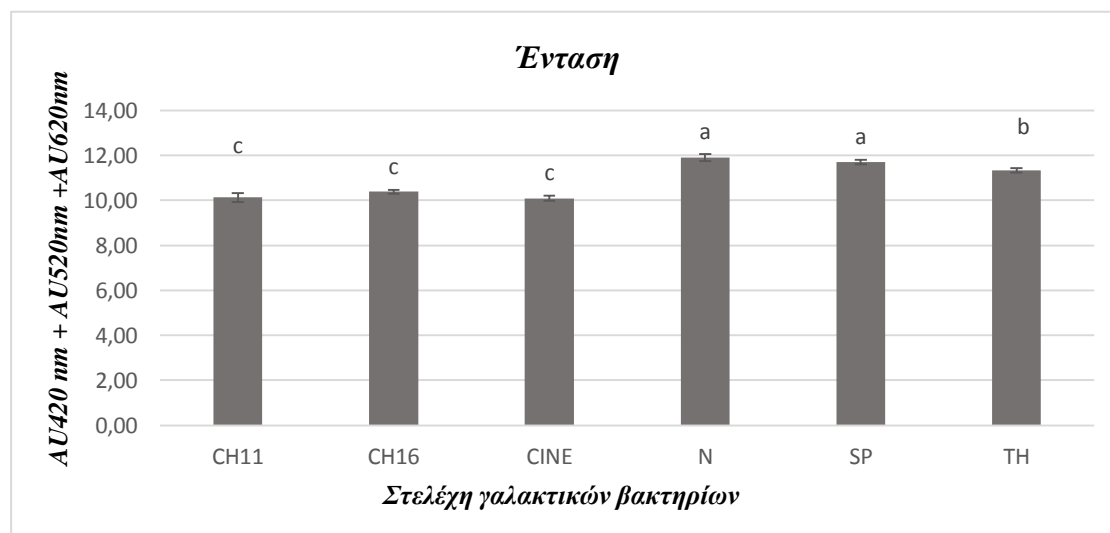


Διάγραμμα 13: Ολική οξύτητα των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test ,  $p < 0,05$ ).

Με τον όρο ολική οξύτητα εννοούμε το σύνολο των οξέων που υπάρχουν στον οίνο. Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα την μεγαλύτερη τιμή ολικής οξύτητας κατέχει το δείγμα TH, δηλαδή ο μάρτυρας στον οποίο δεν πραγματοποιήθηκε μηλογαλακτική ζύμωση. Μάλιστα, η συγκεκριμένη τιμή ακολουθεί και την τιμή του pH, η οποία ήταν η μικρότερη όπως έδειξε το διάγραμμα 5. Η ολική οξύτητα βρίσκεται σε επιθυμητές τιμές, χωρίς μεγάλες στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, εκτός βέβαια από το δείγμα TH.

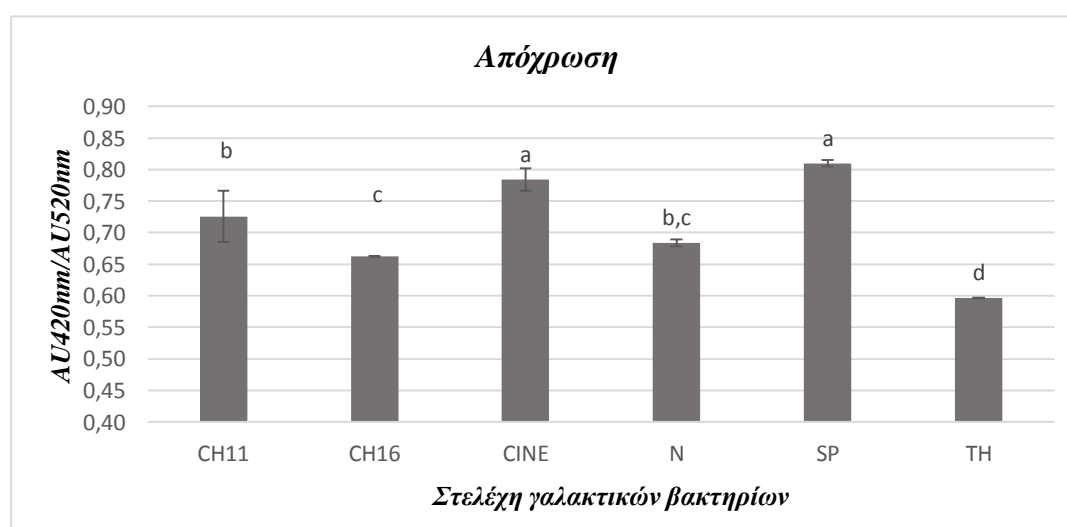
### 3.3 Χρωματικά χαρακτηριστικά

#### 3.3.1 Ένταση / Απόχρωση



Διάγραμμα 14: Ένταση χρώματος των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test ,  $p < 0,05$ ).

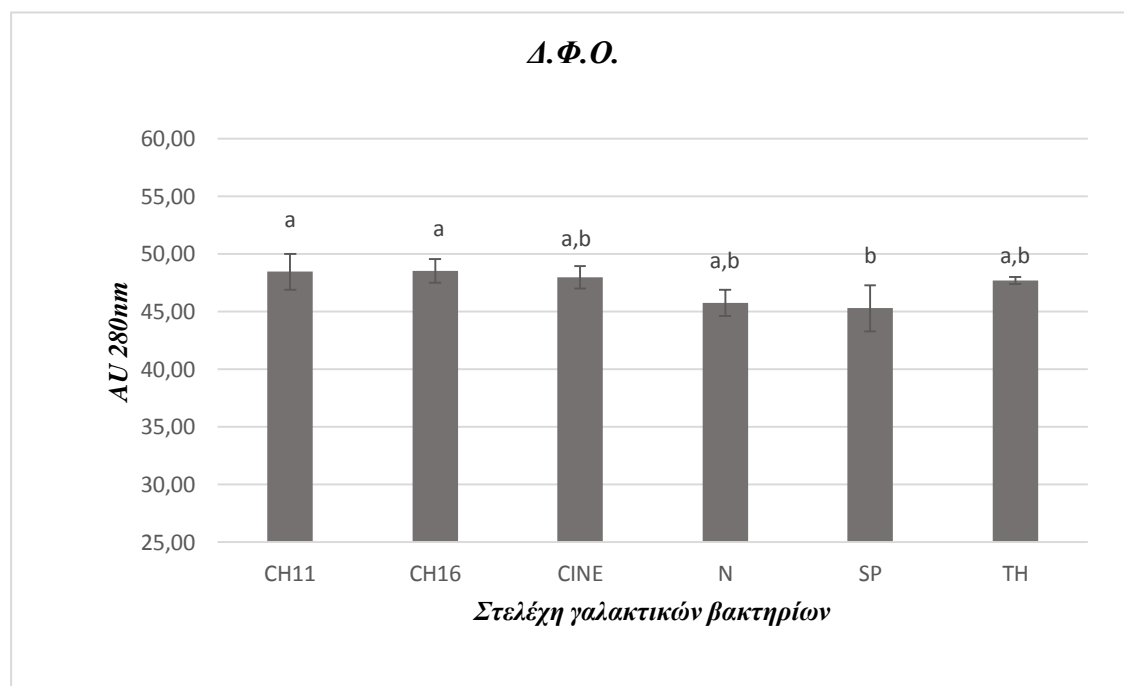
Η ένταση του χρώματος κυμαίνεται μεταξύ 10-12. Υψηλότερη τιμή παρουσιάζει το δείγμα NOVA, ακολουθεί το δείγμα SP στο οποίο η μηλογαλακτική ζύμωση έγινε αυθόρμητα μαζί με το δείγμα TH ενώ μικρότερες τιμές παρουσιάζουν τα δείγματα CH11, CH16, CINE. Μικρή στατιστική διαφορά φαίνεται να έχουν τα δείγματα N, SP με το δείγμα SP και μεγαλύτερη με τα CH11, CH16 και CINE. Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές της έντασης φαίνεται να είναι υψηλές , το οποίο θεωρείται αρκετά καλό για οίνους που πρόκειται να παλαιωθούν.



Διάγραμμα 15: Απόχρωση χρώματος των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test ,  $p < 0,05$ ).

Η απόχρωση των δειγμάτων κυμαίνεται μεταξύ 0,60 και 0,81 , οι οποίες θεωρούνται υψηλές τιμές για φρέσκους οίνους. Υψηλότερη τιμή κατέχει το δείγμα SP μαζί σχετικά με το CINE ενώ μικρότερη τιμή παρουσιάζει το δείγμα TH, το οποίο φαίνεται να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά με τα άλλα δείγματα.

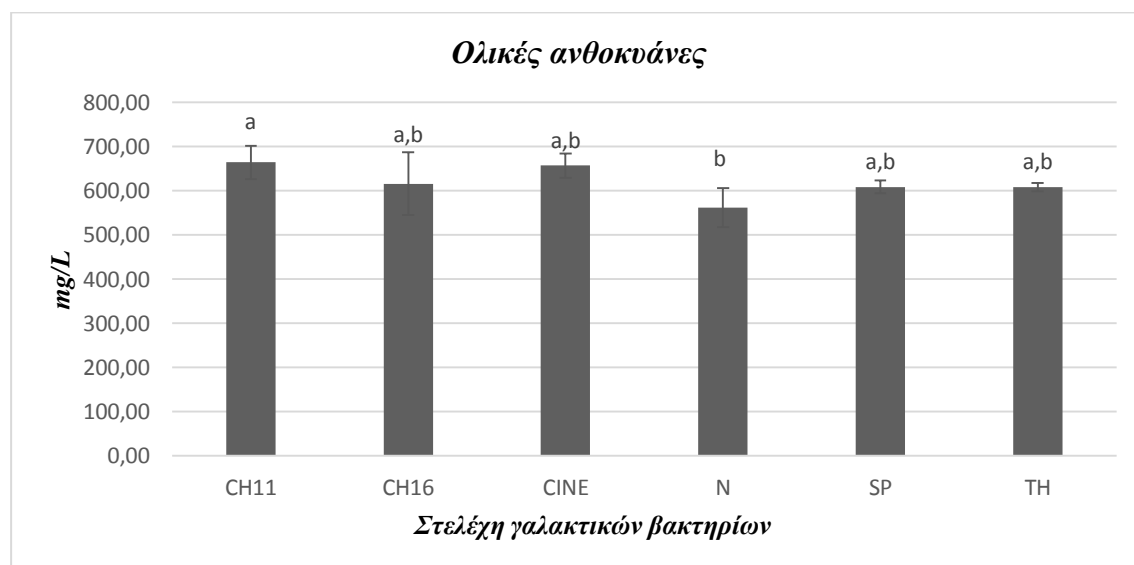
### 3.3.2 Δείκτης φαινολικών ουσιών (Δ.Φ.Ο.)



Διάγραμμα 16: Δείκτης φαινολικών ουσιών των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test ,  $p < 0,05$ ).

Ο δείκτης φαινολικών ουσιών αποτελεί μια εύκολη και γρήγορη μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται πρακτικά για να δείξει πόσο έντονο είναι το χρώμα σε έναν οίνο. Μεγαλύτερες τιμές παρουσιάζουν τα δείγματα CH11 και CH16 ενώ τη χαμηλότερη τιμή το δείγμα SP. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές δεν φαίνεται να υπάρχουν μεταξύ των δειγμάτων.

### 3.3.3 Ολικές ανθοκυάνες

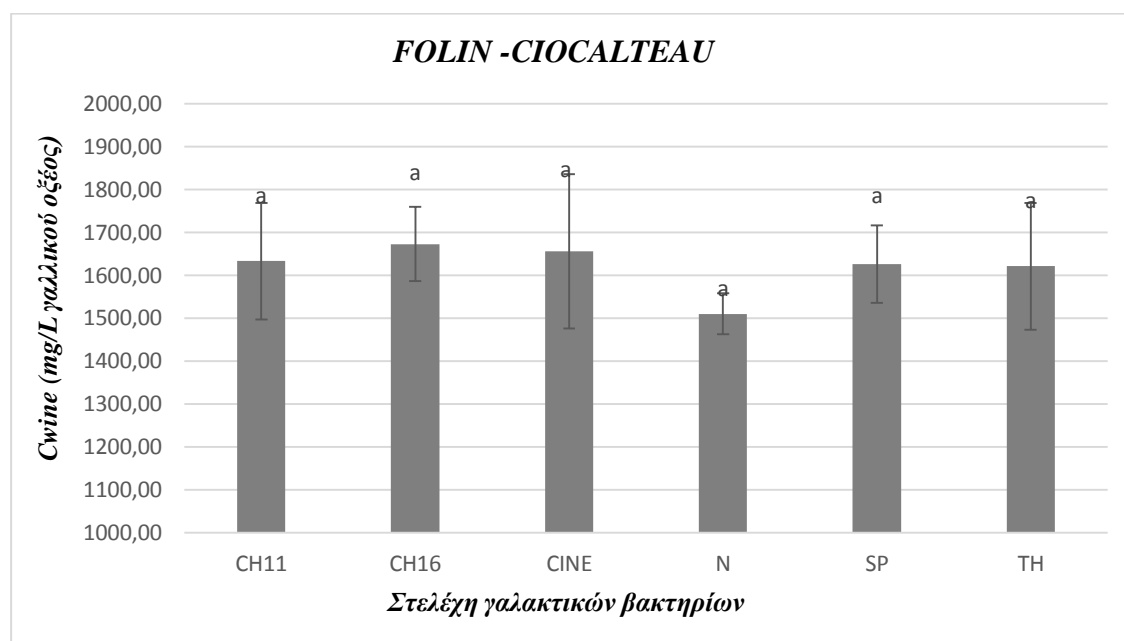


Διάγραμμα 17: Ολικές ανθοκυάνες των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test ,  $p < 0,05$ ).

Παρατηρούμε αρχικά ότι δεν υπάρχουν μεγάλες διαφοροποιήσεις στις τιμές σε όλα τα δείγματα. Βέβαια την μεγαλύτερη τιμή στην συγκέντρωση ανθοκυανών την έχει το δείγμα CH11 ενώ τη μικρότερη συγκέντρωση την έχει το δείγμα NOVA. Η τιμή αυτή για το δείγμα CH11 έρχεται σε συμφωνία με τις υπόλοιπες μετρήσεις που αφορούν τα φαινολικά συστατικά, όπως για παράδειγμα στην ένταση που έχει εξίσου υψηλή τιμή. Ωστόσο αυτό δεν φαίνεται να ισχύει και για το δείγμα NOVA. Επίσης μεταξύ των δειγμάτων CH16, CINE, SP και TH δεν υπάρχουν στατιστικές διαφορές, υπάρχουν για τα δείγματα CH11 και NOVA.



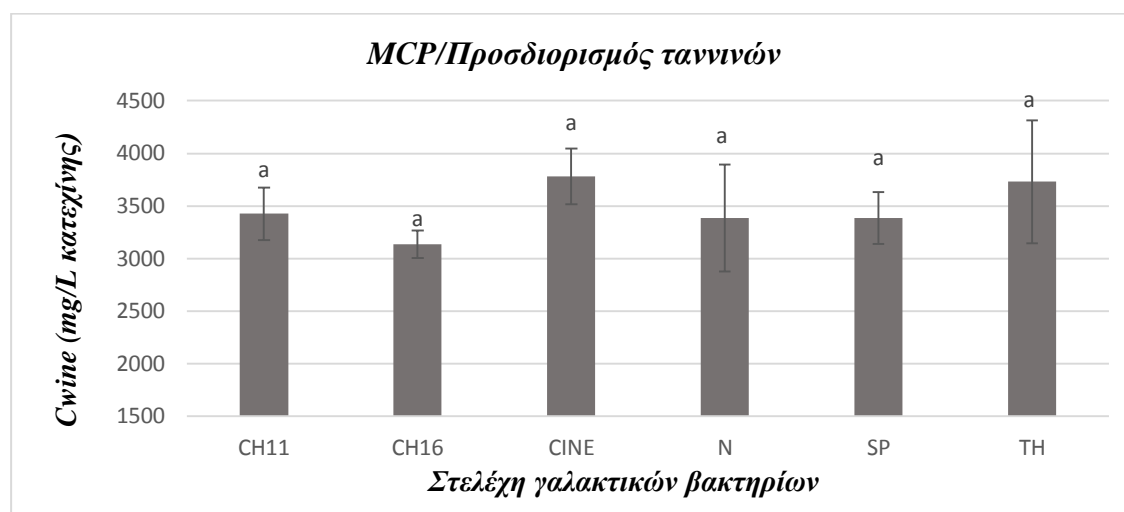
### 3.3.4 Folin Ciocalteau



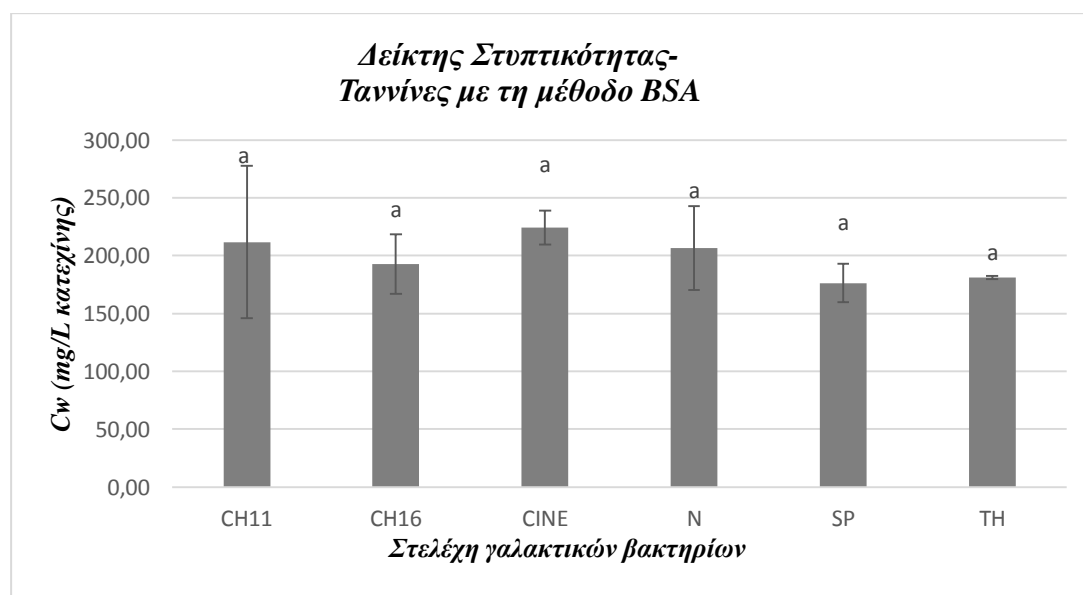
Διάγραμμα 18: Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin-Ciocalteu) των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test,  $p < 0,05$ ).

Η έκφραση των αποτελεσμάτων σε mg γαλλικού οξέος ανά λίτρο οίνου έγινε με βάση την εξίσωση  $y = 0,0011 + 0,0742 (R^2 = 0,9961)$  της πρότυπης ευθείας που παρασκευάστηκε βάση γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος. Την υψηλότερη τιμή ολικών φαινολικών την έχει το δείγμα CH16, όπως και κατά την μέτρηση του Δ.Φ.Ο. Αντίθετα τη χαμηλότερη τιμή παρουσιάζει το δείγμα N. Ωστόσο τα δείγματα δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Στη συγκεκριμένη μέθοδο σε αντίθεση με τη μέτρηση Δ.Φ.Ο. μετρούνται οι χαλκόνες και τα υδροξυκινναμωμικά οξέα και για αυτό το λόγο υπάρχουν διαφορές στις μετρήσεις.

### 3.3.5 Προσδιορισμός ταννινών



Διάγραμμα 19: Προσδιορισμός ταννινών με τη μέθοδο MCP των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test,  $p < 0,05$ ).

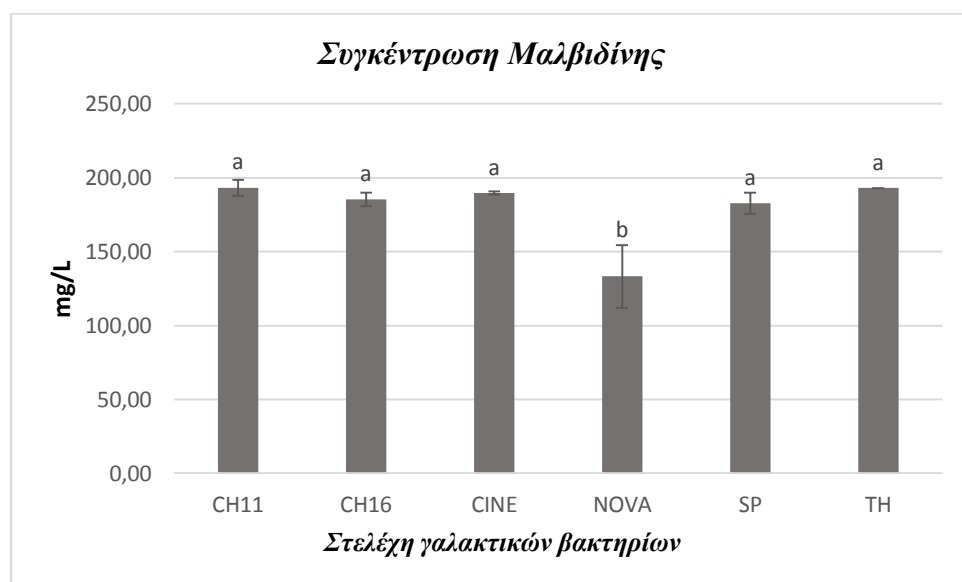


Διάγραμμα 20: Προσδιορισμός ταννινών και δείκτη στυπτικότητας με τη μέθοδο BSA των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test,  $p < 0,05$ ).

Για την έκφραση των αποτελεσμάτων της μεθόδου MCP σε mg κατεχίνης ανά λίτρο οίνου χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση  $y = 0,011x + 0,0115$  ( $R^2 = 0,9998$ ), ενώ για τη μέθοδο BSA χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση  $y = 0,0052 + 0,016$  ( $R^2 = 0,9992$ ). Παρατηρούμε ότι τόσο τα αποτελέσματα της μεθόδου MCP όσο και τα αποτελέσματα της μεθόδου BSA δεν παρουσιάζουν μεγάλες στατιστικές σημαντικές διαφορές.

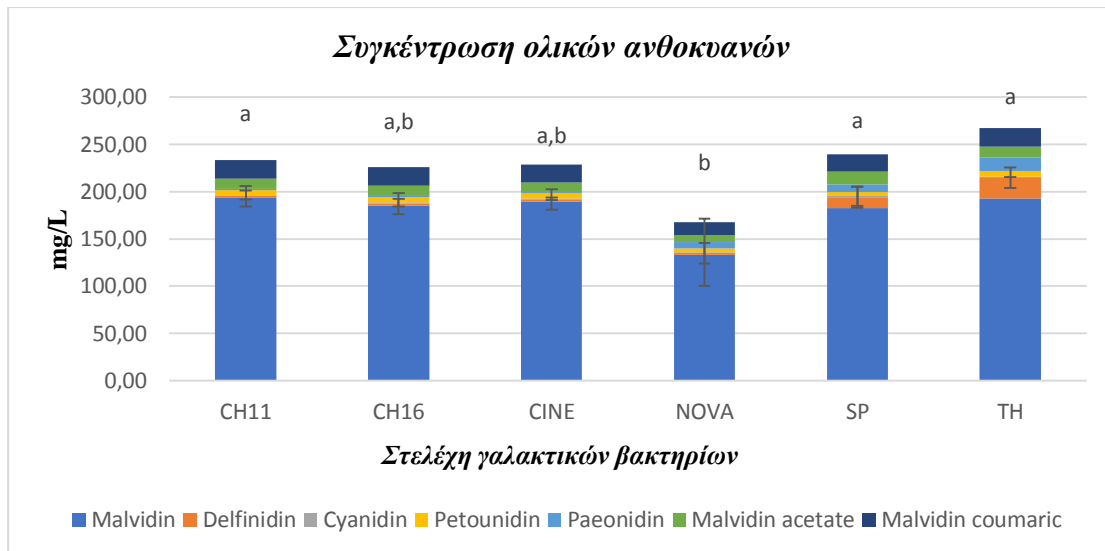
Επίσης, από το διάγραμμα της MCP παρατηρούμε ότι τις μεγαλύτερες τιμές παρουσιάζουν τα δείγματα TH και κατά συνέχεια το CINE ενώ από το γράφημα της BSA παρατηρούμε ότι ενώ διατηρεί την αυξημένη του τιμή το δείγμα CINE, το δείγμα TH παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή μεταξύ των δειγμάτων. Όσο για τις μικρότερες τιμές παρατηρούμε ότι κατά την μέθοδο της MCP την μικρότερη τιμή κατέχουν τα δείγματα CH11 και CH16 τα οποία αντίθετα κατέχουν υψηλές σχετικά τιμές κατά την μέτρηση του δείκτη στυπτικότητας με τη μέθοδο BSA. Αναμένεται λοιπόν ότι το δείγμα SP, δηλαδή το δείγμα στο οποίο η μηλογαλακτική ζύμωση έχει πραγματοποιηθεί αυθόρμητα, να έχει μικρότερη αίσθηση στυφάδας και να είναι πιο μαλακό. Οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι η αλβουμίνη που χρησιμοποιείται κατά τη μέθοδο BSA καταβυθίζει κυρίως προκυανιδίνες με βαθμό πολυμερισμού μεταξύ 4 και 8.

### 3.3.6 Ανθοκυάνες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)



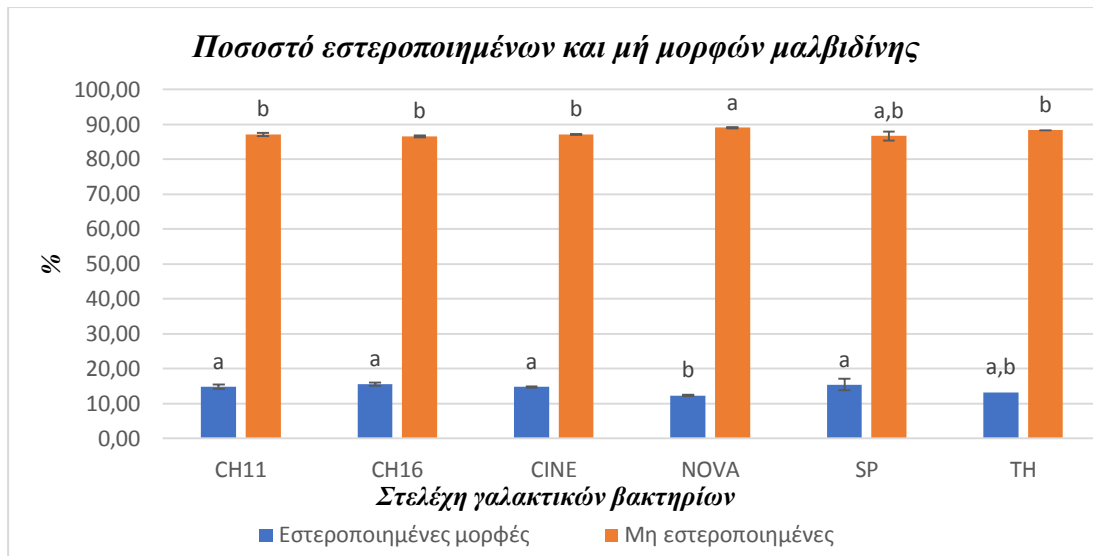
Διάγραμμα 21: Συγκέντρωση μαλβιδίνης των παραχθέντων οίνων σε mg/L. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test,  $p < 0,05$ ).

Στο διάγραμμα 14 παρουσιάζεται η συγκέντρωση της μαλβιδίνης, της κυρίαρχης ανθοκυάνης μεταξύ των δειγμάτων σε mg/L όπως προέκυψε από την ανάλυση με HPLC. Όπως είναι φανερό όλα τα δείγματα εμφανίζουν υψηλές συγκεντρώσεις και χωρίς μεγάλες διαφορές, εκτός από το δείγμα NOVA που φέρει και στατιστικές διαφορές από τα άλλα δείγματα. Υψηλότερη συγκέντρωση, με πολύ μικρή διαφορά, έχει το δείγμα CH11.



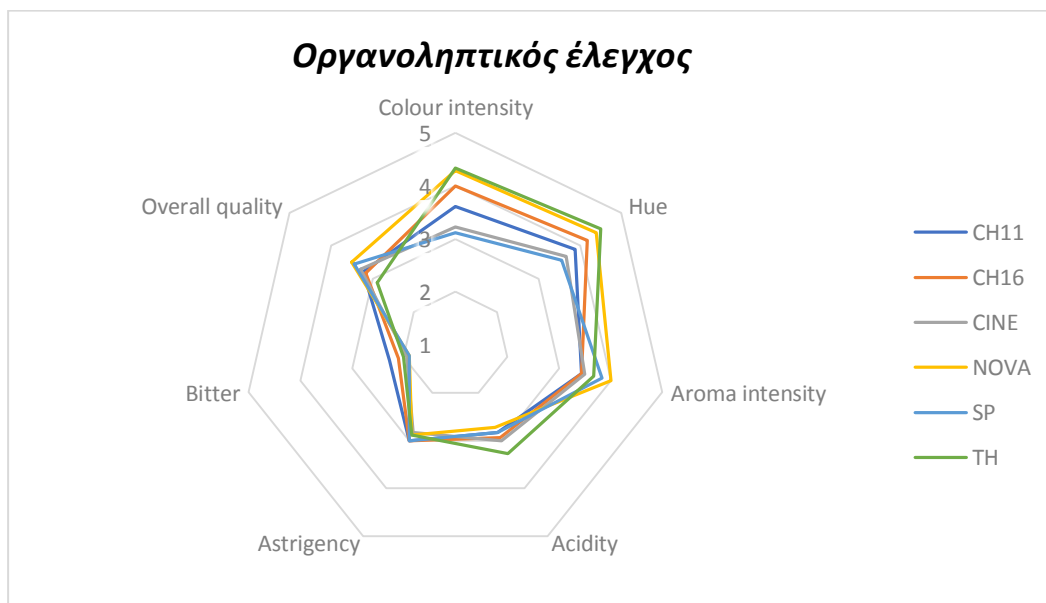
**Διάγραμμα 22:** Συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών των παραχθέντων οίνων σε mg μαλβιδίνης ανά L. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test ,  $p < 0,05$ ).

Στο διάγραμμα 15 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανών σε mg μαλβιδίνης ανά λίτρο οίνου. Αρχικά όπως είναι φανερό το δείγμα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι το TH, δηλαδή το δείγμα στο οποίο δεν είχε πραγματοποιηθεί η αλκοολική ζύμωση και στη συνέχεια ακολουθούν τα δείγματα CH11 και SP. Τα τρία αυτά δείγματα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Την μικρότερη συγκέντρωση φέρει το δείγμα NOVA ως ακολουθία του προηγούμενου διαγράμματος (Διάγραμμα 14). Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι η μαλβιδίνη είναι η ανθοκυάνη που ξεχωρίζει ,με ποσοστό επί του συνόλου των ανθοκυανών 80,46% ακολουθούν οι εστεροποιημένες μορφές της με ποσοστά 4,78% (malvidin acetate) και 7,93% (malvidin coumarate) και σε πολύ μικρή συγκέντρωση εμφανίζονται η δελφινιδίνη με 2,18%, η πετουινιδίνη με 2,20% και η παιονιδίνη με 2%. Επίσης η ελάχιστη συγκέντρωση της κυανιδίνης (0,45% επί του συνόλου) έρχεται να επιβεβαιώσει παλαιότερες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί για το Αγιωργίτικο, με βάση τις οποίες η συγκεκριμένη ανθοκυάνη δεν εντοπίζεται.



**Διάγραμμα 23:** Ποσοστό εστεροποιημένων και μη μορφών μαλβιδίνης των παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test ,  $p < 0,05$ ).

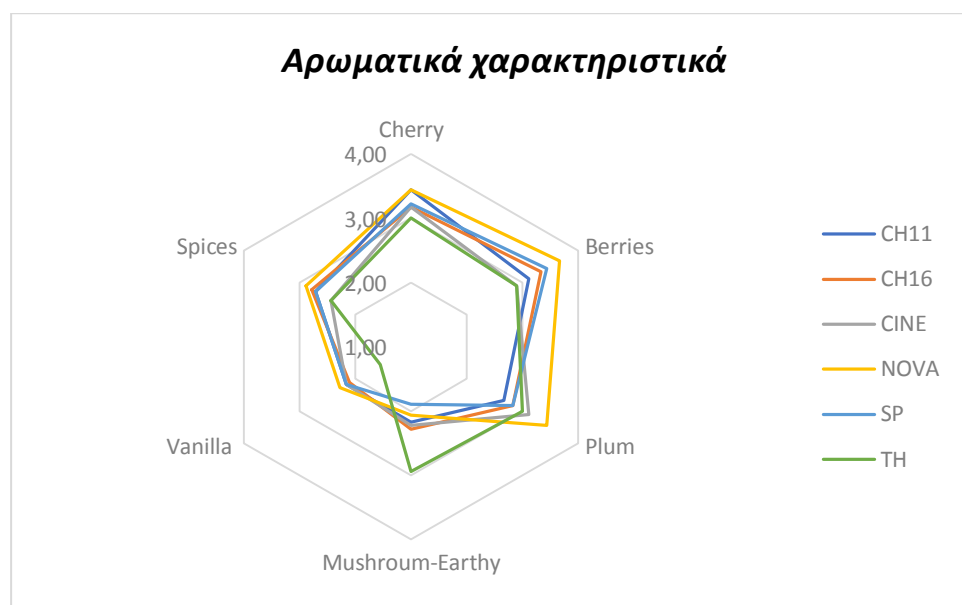
### 3.4 Οργανοληπτικός έλεγχος



**Διάγραμμα 25:** Οργανοληπτικός έλεγχος (Α): Ένταση χρώματος, ένταση αρώματος, απόχρωση, οξύτητα, στυφάδα, πικράδα, συνολική εικόνα). Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test ,  $p < 0,05$ ).

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου που πραγματοποιήθηκε από εκπαιδευμένο πάνελ δοκιμαστών. Όπως είναι φανερό από το αραχνοδιάγραμμα τα δείγματα παρουσιάζουν εμφανείς διαφορές όσον αφορά την ένταση του χρώματος και την απόχρωση, με το δείγμα TH και NOVA να

παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες τιμές. Βέβαια το δείγμα TH παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές και στην οξύτητα καθώς και στην στυφάδα, το οποίο είναι λογικό καθώς είναι το δείγμα στο οποίο η μηλογαλακτική ζύμωση διακόπηκε, οπότε η οξύτητα δεν μειώθηκε. Όσον αφορά την ένταση του αρώματος το δείγμα NOVA φαίνεται να παρουσιάζει την μεγαλύτερη τιμή ενώ το δείγμα CH16 τη μικρότερη. Όλα τα δείγματα φαίνεται να παρουσιάζουν μικρές τιμές όσον αφορά την πικράδα. Σχετικά με την συνολική εκτίμηση, το δείγμα NOVA φαίνεται να υπερέχει έναντι των άλλων.



Διάγραμμα 26: Οργανοληπτικός έλεγχος (B): Αρωματικό προφίλ (Κεράσι, μούρα, δαμάσκηνο, μανιτάρι-γήινο, βανίλια, μπαχαρικά). Οι μπάρες δείχνουν τη  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα μεταξύ των δειγμάτων αντιστοιχούν σε στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Tukey's test,  $p < 0,05$ ).

Στο παραπάνω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι τα δείγματα διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά τα αρώματα των μούρων, του δαμάσκηνο καθώς και του μανιταριού/γήινο. Βέβαια το δείγμα NOVA φαίνεται να παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές στα αρωματικά χαρακτηριστικά συνολικά, με εντονότερα τα αρώματα του δαμάσκηνο, των μούρων και των μπαχαρικών. Αντίθετα τα δείγματα SP και TH φαίνεται να είναι τα πιο αδύνατα αρωματικά δείγματα. Μάλιστα το δείγμα TH φέρει ελάχιστα το άρωμα της βανίλιας, ενώ κατέχει την υψηλότερη τιμή όσον αφορά το άρωμα του μανιταριού/γήινο.

## 4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της μηλογαλακτικής ζύμωσης στα χημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε οίνο της ποικιλίας Αγιωργίτικο. Για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης έγινε χρήση διαφορετικών γαλακτικών βακτηρίων και επίσης δοκιμάστηκε η τεχνική του εμβολιασμού γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Ειδικότερα, επιλέχθηκαν 3 διαφορετικά στελέχη *Oenococcus oeni* από την εταιρία Chr-Hansen με τις εμπορικές ονομασίες 1. Viniflora® Cine 2. Viniflora® CH16 3. Viniflora® CH11 για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης μετά την αλκοολική ζύμωση, ενώ για την διενέργεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης πριν την αλκοολική ζύμωση χρησιμοποιήθηκε γαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus plantarum*, με την εμπορική ονομασία Viniflora® Nova. Επίσης σε ένα επιπλέον δείγμα η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε αυθόρμητα από γηγενή γαλακτικά βακτήρια, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο αποτράπηκε η μηλογαλακτική ζύμωση μέσω θείωσης. Όσον αφορά τις ποσότητες, χρησιμοποιήθηκε τριπλή δόση από τη συνιστάμενη και οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος βασίστηκαν σε αυτές που πρότεινε ο προμηθευτής.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος έγινε παρακολούθηση της πορείας της μηλογαλακτικής ζύμωσης και στο τέλος της πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις των έξι δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα) μαζί με την επανάληψη αυτών. Συμπερασματικά, βάσει χημικών αναλύσεων και οργανοληπτικού ελέγχου προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

Αρχικά, η αλκοολική ζύμωση σε όλα τα δείγματα διήρκησε το ίδιο χρονικό διάστημα, το οποίο μάλιστα ήταν σύντομο (6 ημέρες). Να σημειωθεί ότι κανένα δείγμα δεν παρουσίαζε πρόβλημα διακοπής της αλκοολικής ζύμωσης και ο ρυθμός μείωσης της σακχαροπεριεκτικότητας ήταν σταθερός. Όσον αφορά τη μηλογαλακτική ζύμωση, τα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με γαλακτικά βακτήρια *Oenococcus oeni* δεν παρουσίασαν κάποια ανωμαλία και η μηλογαλακτική ζύμωση ολοκληρώθηκε σύντομα. Ωστόσο τόσο το δείγμα Nova (γαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus plantarum*, πριν την αλκοολική ζύμωση) όσο και το δείγμα SP στα οποία η μηλογαλακτική ζύμωση έγινε αυθόρμητα, καθυστέρησαν στην ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Η διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης και η περαίωση της σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα των γαλακτικών βακτηρίων να αντέξουν σε συνθήκες αλκοόλ μεγαλύτερο του 10% vol. ή σε pH μεγαλύτερο του 3,5 (Wibowo et al., 1985). Δεδομένου, λοιπόν, ότι τα στελέχη του *Lactobacillus Plantarum* είναι ευαίσθητα παρουσία αλκοόλ, έχει προταθεί η προσθήκη αυτού πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. (Prah et al., 1989).

Με την ολοκλήρωση των βασικών αναλύσεων, προκύπτει ότι τα δείγματα δεν παρουσίασαν μεγάλες διαφοροποιήσεις. Αρχικά, το αλκοόλ δεν παρουσίασε μεγάλες αλλαγές, όλα τα δείγματα κυμαίνονταν μεταξύ 12,5% vol. και 12,6% vol. εκτός από το δείγμα CH11 το οποίο είχε αλκοόλ 12,7% vol.. Όσον αφορά την ενεργό οξύτητα και την ολική οξύτητα παρατηρήθηκαν ορισμένες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων των τελικών οίνων. Πιο συγκεκριμένα, η ολική οξύτητα στο δείγμα που δεν είχε

πραγματοποιηθεί η μηλογαλακτική ζύμωση, το TH, ήταν υψηλότερη σε σχέση με τα άλλα δείγματα με μια διαφορά περίπου 1,20g/L, το οποίο είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι δεν υπήρχε η δράση των γαλακτικών βακτηρίων για την κατανάλωση οξέων. Αντίστροφα, το pH σε όλα τα δείγματα, εκτός από το δείγμα που δεν πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση, αυξήθηκε μετά την αλκοολική ζύμωση, το οποίο είναι λογικό καθώς η ολική τους οξύτητα είχε μειωθεί σε σχέση με τον μάρτυρα. Συγκεκριμένα οι τιμές της ενεργούς οξύτητας κυμαίνονταν μεταξύ 3,6 έως 3,8, το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό για την ποικιλία σύμφωνα με μελέτες που έγιναν από τις Χαρβαλιά Α. και Μπενά-Τζούρου Ε., το 1981. Επίσης μικρές αυξήσεις παρατηρήθηκαν και στην πτητική οξύτητα σε σχέση με τον μάρτυρα, φαινόμενο το οποίο είναι πιο διακριτό για τα δείγματα CH16, NOVA και SP. Παρ' όλα αυτά όλες οι τιμές βρίσκονται εντός ορίων με βάση η νομοθεσία του οίνου. Ειδικά το δείγμα CINE που έχει ίδια τιμή πτητικής οξύτητας με το μάρτυρα, TH, είναι απόλυτα δικαιολογημένο καθώς το συγκεκριμένο γαλακτικό βακτήριο, βάσει προμηθευτή, δεν μεταβολίζει το κιτρικό οξύ και να παράξει διακετύλιο ή να παράξει οξικό οξύ.

Στις αναλύσεις που σχετίζονταν με χρωματικά και φαινορικά χαρακτηριστικά των οίνων παρουσιάστηκαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα και μπορούμε να διακρίνουμε διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Αρχικά, αν και η ένταση όλων των δειγμάτων εμφάνισε παρόμοια αποτελέσματα, με τα δείγματα N, SP και TH να ξεχωρίζουν με μικρές διαφορές, δεν μπορούμε να πούμε ότι αυτό ισχύει για τις μετρήσεις της απόχρωσης καθώς μεταξύ των δειγμάτων υπάρχουν στατιστικές διαφορές, ο μάρτυρας παρουσιάζει μικρή τιμή σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα και το δείγμα SP τη μεγαλύτερη τιμή. Κατά ανάλυση του Δ.Φ.Ο., δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, οι τιμές ήταν παρόμοιες για όλα τα δείγματα, με μια μικρή διαφορά στο δείγμα NOVA το οποίο είχε την μικρότερη τιμή. Σχετικά με τις ολικές ανθοκυάνες, αν και δεν υπήρχαν στατιστικές διαφορές, είναι φανερό ότι το δείγμα NOVA υστερεί, το οποίο εξακριβώθηκε από την ανάλυση υγρής χρωματογραφίας HPLC καθώς και από την ανάλυση Folin-Ciocalteu κατά την οποία μετρούνται τα ολικά φαινορικά. Το δείγμα NOVA, στο οποίο η έναρξη την μηλογαλακτικής ζύμωσης προηγήθηκε της αλκοολικής εμφανίζει μειωμένα φαινορικά συστατικά, το οποίο σχετίζεται άμεσα με τον μεταβολισμό των γαλακτικών βακτηρίων και τον ανταγωνισμό τους με τα φαινορικά συστατικά (Hernandez et al., 2006). Τα δείγματα που είχαν τις μεγαλύτερες τιμές σε όλες τις αναλύσεις σχετικές με τα χρωματικά χαρακτηριστικά ήταν αυτά που είχαν εμβολιαστεί με γαλακτικό βακτήριο *Oenococcus oeni* στα οποία η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε μετά την αλκοολική ζύμωση.

Στη συνέχεια, από τα αποτελέσματα της μέτρησης ταννινών με τη μέθοδο MCP, παρατηρούμε αρχικά ότι το δείγμα του μάρτυρα κατέχει την υψηλότερη τιμή ακολουθούμενο από το δείγμα CINE. Επίσης τα δείγματα CH11 και CH16 έχουν τις χαμηλότερες τιμές ενώ τα δείγματα NOVA και SP έχουν την ίδια τιμή χωρίς στατιστικές διαφορές μεταξύ του. Επιπλέον σχετικά με τις ταννίνες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BSA, η οποία αποτελεί δείκτη στυπτικότητας. Όπως και στη μέθοδο MCP έτσι και σε αυτή την περίπτωση το δείγμα CINE έχει την υψηλότερη τιμή επομένως θα έχει υψηλή αίσθηση στυφάδας, ενώ το δείγμα TH σε αντίθεση με την προηγούμενη μέθοδο, έχει την μικρότερη τιμή. Τα υπόλοιπα δείγματα έχουν



ενδιάμεσες τιμές και δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους αριθμητικά και στατιστικά. Πιθανώς, οι διαφορές των δειγμάτων στις μετρήσεις τανινών και ανθοκυανών οφείλεται σε συσσωματώσεις που έγιναν κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Μετά το πέρας των χημικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος από εκπαιδευμένο πάνελ δοκιμαστών προκειμένου να συνδυαστούν τα αποτελέσματα των αναλύσεων με τα γευστικά και οπτικά χαρακτηριστικά και να διεξαχθούν ολοκληρωμένα συμπεράσματα. Όσον αφορά τα φαινολικά χαρακτηριστικά, ξεχώρισαν τα δείγματα NOVA και TH, έπειτα τα δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με το γαλακτικό βακτήριο *Oenococcus oeni* και τέλος το δείγμα SP. Ωστόσο τα παραπάνω δεν είναι απόλυτα συμβατά με τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν καθώς το δείγμα NOVA φάνηκε να υστερεί στο δείκτη φαινολικών ουσιών. Όσον αφορά τα αρωματικά χαρακτηριστικά το δείγμα NOVA ξεχώρισε ως το πιο πλούσιο αρωματικά, χωρίς όμως να διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από τα υπόλοιπα δείγματα. Από το δεύτερο αραχνοδιάγραμμα που σχετίζεται με τα αρώματα των οίνων το NOVA υπερτερεί στα αρώματα μούρων, δαμάσκηνου, κερασιού και μπαχαρικών. Συνεπώς τα αρώματα κόκκινων φρούτων φαίνεται να είναι τυπικά της ποικιλίας Αγιωργίτικο, το οποίο έχει αποδειχθεί και από προηγούμενες μελέτες (Κουνδουράς Σ., et al., 2006). Βέβαια όλα τα δείγματα έλαβαν παρόμοιες αξιολογήσεις σχετικά με τα αρωματικά χαρακτηριστικά στα οποία εξετάστηκαν, εκτός από το δείγμα TH που φαίνεται να ξεχώρισε αρκετά στο άρωμα του μανιταριού / γήινου. Σε μικρότερη αναλογία φαίνεται να ανιχνεύεται το άρωμα της βανίλιας και των μπαχαρικών. Σχετικά με την πικράδα και τη στυφάδα, κανένα από τα δείγματα δεν έλαβε μεγάλες τιμές και όλα κυμαίνονταν στα ίδια νούμερα καθώς επίσης και στην οξύτητα εκτός από το δείγμα TH το οποίο διαφοροποιήθηκε, το οποίο είναι λογικό καθώς είναι ο μάρτυρας και δεν είχε πραγματοποιηθεί μηλογαλακτική ζύμωση. Σύμφωνα με τους δοκιμαστές, το δείγμα που προτιμήθηκε ήταν το δείγμα NOVA ενώ αυτό που υστερούσε ήταν το δείγμα TH.

Συμπερασματικά, από την παρούσα διπλωματική εργασία μπορούν να διεξαχθούν τα παρακάτω:

- Η ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση ενδείκνυται για φρέσκους, ερυθρούς οίνους καθώς βελτιώνει τόσο τα χημικά χαρακτηριστικά όσο και τα οργανοληπτικά.
- Όπως διαπιστώθηκε από τον οργανοληπτικό έλεγχο τα δείγματα που πραγματοποίησαν μηλογαλακτική ζύμωση, ανέδειξαν και εμπλούτισαν τον φρουτώδη αρωματικό χαρακτήρα των οίνων, δίνοντας έμφαση στα αρώματα κερασιού, μούρων και δαμάσκηνου τα οποία αποτελούν τυπικά αρώματα της συγκεκριμένης ποικιλίας.
- Το δείγμα NOVA, στο οποίο η μηλογαλακτική ζύμωση έγινε πριν την αλκοολική ζύμωση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή φρέσκων οίνων καθώς πέρα από τον πλούσιο αρωματικό χαρακτήρα, έχουν χαμηλή αίσθηση στυφάδας και πικράδας.
- Επίσης όσον αφορά το γαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus plantarum*, NOVA, μειώνει τον κίνδυνο αύξησης πτητικής οξύτητας στα πρώτα στάδια της

αλκοολικής ζύμωσης και μπορεί να στηρίζει και την προσθήκη μικρότερης ποσότητας θειώδους ανυδρίτη (Britt Karlsson, 2004)

- Τα γαλακτικά βακτήρια CH16, CH11 και CINE θα ήταν ιδανικά για οίνους προς παλαίωση καθώς οι αναλύσεις φαινολικών ουσιών και ανθοκυανών φάνηκαν ιδανικές για τη τεχνική παλαίωσης.
- Η ποικιλία Αγιωργίτικο απέδειξε ότι επιδέχεται μηλογαλακτική ζύμωση για παραγωγή οίνων ποιότητας, με πλούσιο αρωματικό και φαινολικό χαρακτήρα, σχηματίζοντας το ‘μπουκέτο’ προς ανάδειξη της.

## 5. Βιβλιογραφία

- Arnink, K. & Henick-Kling, T., 2005. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains on successful malolactic conversion in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 228-237.
- Barbagallo, R.N., Spagna, G., Palmeri, R. & Torriani, S., 2004. Assessment of  $\beta$ -glycosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme Microb. Tech.* 34, 292-296.
- Barbegal, C., Pena, N., Russo, P., Griego, F., Pardo I., Ferrer S., et al., 2016. Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from grape must fermentation. *Food Microbiol.* 57, 187-194.
- Bartowsky, E.J. & Henschke, P.A. (1995). Malolactic fermentation and wine flavor. *Aust. Grapegrow. Winemak.* 378, 83-94.
- Bartowsky, E.J., Castello, P. & Henschke, P.A., (2002b). Management of malolactic fermentation – wine flavor manipulation.
- 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, 74-88
- Betteridge, A., Grbin, P., Jiranek, V., 2015. Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends Biotechnol.* 33, 545-553.
- Britt Karlsson, 2004. Fermentation in reverse order. *BKWineMagazine*.
- Boido, E., Loret, A., Medina, K., Carrau, F., Dellacasa, E., 2002. Effect of 3-glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food. Chem.* 50, 2344-2349.
- Britz, T.J. & Tracey, R.P., 1990. The combination effect of pH, SO<sub>2</sub>, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 23-31.
- Carreté, R., Vidal, M.T. & Bordons, A., 2002. Inhibitory effect of sulphur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 155-159.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N. & Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165-178.
- Chu-Ky, S., Tourdot-Marechal, R., Marechal, P.-A. & Guzzo, J., 2005. Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochim. et Biophys. Acta* 1717, 118-124.
- Davis, C. R., Wibowo, D. J., Lee, T. H., & Fleet, G. H. (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wine at different pH. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Fleet, G.H., Lee, T.H., 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 137-142.
- D’Incecco, N., Bartowsky, E., Kassara, S., Lante, A., Spettoli, P. & Henschke, P., 2004. Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiol.* 21, 257-265.

- Dicks L.M.T., Endo, A., 2009. Taxonomic status of lactic acid bacteria in wine and key characteristics to different species. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 30, 72-90.
- du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E., Kriegel-Weber, S., 2011. Lactobacillus: the next generation of malolactic fermentation starter cultures- an interview. *Food Bioprocess Technol* 4, 876-906.
- Ebeler, S.E., and J.H. Thorngate, 2009. Wine chemistry and flavor: Looking into the crystal glass, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8098-8108.
- Ebeler, S.E., (2001). Analytical chemistry: unlocking the secrets of wine flavour. *Food Rev. In.* 17, 45-64.
- Kunkee, R.E. (1967) Malolactic fermentation. *Adv. Appi. Microbiol.* 9:235-79.
- Kunkee, R.E. (1974) Malolactic fermentation and winemaking in *Chemistry of winemaking*. A.D. Webb (Ed) *Adv. Chem. Ser* 137, pp, 151-170. American Chemical Society, Washington, DC.
- Fleet, G.H. & Heard, G.M., 1993. Yeast growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (ed.). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. pp. 27-54.
- Francis, I.L., Newton, J.L. 2005. Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape wine Res.* 11, 114-126.
- G-Alegria, E., Lopez, I., Saenz, J., Fernadez, E., Zarazaga, M., et al., 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilization and stress environment conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 53-61.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A.J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P.J. & Moreno-Arribas, M.V., 2008. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control* 19, 835-841.
- Gockowiak H. & Henschke P.A., 2003. Interaction of pH, ethanol concentration and wine matrix on induction of malolactic fermentation with commercial 'direct inoculation' starter cultures. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9, 200-209.
- Gonzalez-Nevesa G., Barreiroa L., Gila G., Francoc., J Ferrerd M., Moutounete M., Charbonneau A., (2004). Anthocyanin composition of Tannat grapes from the south region of Uruguay, *Analytica Chimica Acta*, 513, 197-200.
- Grimaldi, A., Mclean, H., Jiranek, V., 2000. Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 362.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E. and Jiranek, V. (2005). A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*.
- Hebert, E.M., Raya, R.R., Savoy De Giori, G., 2004. Evaluation of minimal nutritional requirements of lactic acid bacteria used in functional foods. In Walker, J.M., Spencer, J.F.T., Ragout De Spencer, A.L. (Eds), *Environmental Microbiology: Methods and protocols*. Humana press, Totowa, NJ. Henick-Kling, T. & Park, Y.H., 1994. Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO<sub>2</sub> and timing of inoculation. *Am. J. Enol. Vitic.* 45,464-469.
- Henick- Kling, T. 1993. Malolactic fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Switzerland.

- Henick- Kling, T., Acree, T., Gavitt, B., Krieger, S.A., Laurent, M.H. 1993. Sensory aspects of malolactic fermentation. In: Stockley, C.S., Johnston, R.S., Leske, P.A., Lee, T.H. (Eds.), Proceedings of the Eighth Australian Wine Industry Technical Conference. Winetitles, Adelaide, Australia.
- Hernandez – Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., Ferreira, V., 2009. Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic bacteria. *Food Res. Int.* 42, 773-781.
- Koundouras S., Marinos V., Gkoulioti A., Kotseridis Y. and Van Leeuwen C. (2006): Influence of Vineyard location and Vine Water Status on Fruit Maturation of not Irrigated Cv Agiorgitiko (*Vitis Vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006.
- Koundouras S., Van Leeuwen C., (2002): Environmental effects on wine grape Cv Agiorgitiko (*Vitis Vinifera* L.) grow in the Nemea region (Greece). 1. Vinewater status and physiological parameters.
- Koussisi E., Pateros A. and Piggot J., (2003): Sensory flavor discrimination of Greek dry red wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Kunkee, R.E. (1967) Malolactic fermentation.
- Lafon -Lafourcade, S., Lanvaud-Funel, A., Carre, E., 1983b. Lactic acid bacteria of wines: stimulation of growth and malolactic fermentation. *Antoine Van Leeuwenhoek* 49, 349-352.
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antoine Van Leeuwenhoek* 76, 317-331.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., Desens, C., 1988. Inhibition of malolactic fermentation of wine by products of yeast metabolism. *J. Sci. Food Agric.* 44, 183-191.
- Lanvaud-Funel, A., (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine Matthews, A.H., Girbin, P.R. & Jiranek, V., (2006). A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interests to oenology.
- Larsen, J.T., Nielsen, J.-C., Kramp, B., Richelieu, M., Bjerring, P., Riisager, N.A. & Edwards, C.G., 2003. Impact of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 246-251.
- Laing, D.G. (1991). Characteristics of the human sense of smell when processing odor mixtures. In D. G. Laing R. D. Doty, W. Breipohl (Eds). *The human sense is smell*.
- Laing D. G., & Glemarec A. (1992). Selective attention and the perceptual attention of odor mixtures, *Physiology and Behavior*, 52 (6), 1047-1053.
- Lerm, E., Engelbrecht, L., Du Toit, M., 2010. Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 31, 186-212.
- Lerm, E., Engelbrecht, L., Du Toit, M., 2011. Selection and characterization of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starters cultures, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 32, 280-295.
- Lawless, H.T. Descriptive analysis of complex odors: Reality, model or illusion? *Food Qual. Prefer.* (1999)
- Liu, S.Q., 2002. Malolactic fermentation in wine. Beyond deacidification. *J. Appl. Microbiol.* 92, 589-601.

- Martineau, B., Henick- Kling, T., Acree, T., 1995. Reassessment of the influence of malolactic fermentation on the concentration of diacetyl in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46,385.
- Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P., Jiranek, V., 2004. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 5715-5731.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. 2005. Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends *Crit Rev. Food Sci Nutr.* 45, 265-286.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2008). *Wine Chemistry and Biochemistry*, New York: Springer.
- Naouri, P., Chaugnaud, P., Arnaud, A., Galzy, P., 1990. Purification and properties of a malolactic enzyme from *Leuconostoc Oenos* ATCC 23278. *J Basic Microbiol.* 30, 577-585.
- Nehme, N., Mathieu, F. & Taillandier, P., 2008. Quantitative study of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 685-693.
- Nehme, N., Mathieu, F. & Taillandier, P., 2010. Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and partial characterization of a yeast-derived inhibitory peptidic fraction. *Food Microbiol.* 27, 150-157.
- OIV-MA-AS2-10, Folin-Ciocalteu Index
- OIV-MA-AS312-01A, Alcoholic strength by volume (Resolution Oeno 566/2016)
- OIV-MA-AS313-01, Total acidity (Oeno 551/2015)
- OIV-MA-AS313-02, Volatile acidity (A 11, revised by 377/2009)
- OIV-MA-AS313-11
- 7 OIV-MA-AS313-07
- Paissoni M.A., Waffo-Teguo P., Ma1 W., Rolle L., Teissedre P.L., 2018. Chemical and sensorial investigation of in-mouth sensory properties of grape anthocyanins, *Scientific Reports*, [www. Nature.com/srep](http://www.Nature.com/srep).
- Ribereau- Gayon, P., Glories Y., Maujen, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology 1 & 2*. West Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Rogerson F. & Symington C. 2013. Enzyme catalyzed modulation of the typicality of touriga national aroma and flavour, In.: *Understanding varietal aromas during alcoholic and malolactic fermentation* 23-37. Lalemand. Lisbon, Portugal.
- Sarneckis C.J., Damberg R.J., Jones P., Mercurio M. Hherderich M.J., Smith P.A., 2006. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol,12, 39-49.
- Sanchez-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.
- Sefton, M.A., Francis, I.L. & Williams, P.J., 1993. The volatile composition of Chardonnay juices: a study by flavor precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 359-370.
- Spano, G., Beneduce, L., Tarantino, D., Zapparoli, G., Massa, S., 2002. Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR. *Lett Appl. Microbiol.* 35, 370-374.

- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. & Pretorius, I.S., (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M., Huis in 't Veld, J.H., 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in food. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 73-84.
- Ugliano, M. & Henschke, P.A., (2008). Yeast and wine flavour. In: Moreno-Arribas, M.V. and Polo, C. (eds). *Wine chemistry and biochemistry*. Springer, New York. Pp. 328-348.
- Van Leeuwen C., Frianti P., Chone X., Tregoat O., Koundouras S. & Dubourdieu D., (2004): Influence of climate, soil and cultivar on terroir. *Am J. Enol. Vitic.* 12:88-98)
- Van Vuuren, H.J. & Dicks, L.M.T., (1993). *Leuconostoc Oeni*: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 99-112.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H. & Lee, T.H., 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 301-313.
- Κοτσερίδης Γ., Καλλίθρακα Σ., Προξενιά Ν. (2012). Εργαστηριακές ασκήσεις. Οινολογία Ι & ΙΙ. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Αθήνα.
- Κουνδουράς Σ., (2019) Σημειώσεις Αμπελουργίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Αθήνα.
- Κουράκου – Δραγώνα, Σ. (1988). Θέματα Οινολογίας. Αθήνα.: Τροχαλία.
- Σταυρακάκης Μ., (2010) Αμπελογραφία.
- Ταραντίλης Π., (2019), Σημειώσεις Χημείας Οίνου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Αθήνα.
- Χαρβαλιά Α. και Μπενά-Τζούρου Ε., (1982). Τα φαινολικά συστατικά και το χρώμα των ελληνικών οίνων, *Ελληνικά Οινολογικά χρονικά*, 2, 1-77, Ινστιτούτο Οίνου, Αθήνα.

### **Ηλεκτρονικές Πηγές:**

<https://nemeawineland.com/>

<https://www.oiv.int/>

<https://www.chr-hansen.com/en/>

<https://winesofgreece.org/>

<https://www.lallemandwine.com/>

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