



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

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μηλογαλακτική ζύμωση σε ερυθρή ποικιλία Κοτσιφάλι

Στυλιανός Ε. Κλάδος

Επιβλέπων καθηγητής:
Γιώργος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2023**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μηλογαλακτική ζύμωση σε ερυθρή ποικιλία Κοτσιφάλι

“Malolactic fermentation on red variety Kotsifali”

Στυλιανός Ε. Κλάδος

Εξεταστική Επιτροπή

Κοτσερίδης Γεώργιος, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Καλλίθρακα Σταματίνα, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Γαρδέλη Χρυσανγή, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μηλογαλακτική ζύμωση σε ερυθρή ποικιλία Κοτσιφάλι

ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων Ι) Γαλακτοκομία ΙΙ) Οινολογία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Οινολογίας & Αλκοολούχων Ποτών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά τη διαδικασία παραγωγής οίνου, μία από τις παραμέτρους που μπορεί να επηρεάσει την οινοποιητική διαδικασία και το τελικό αποτέλεσμα είναι η μηλογαλακτική ζύμωση και το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που θα την ξεκινήσει και θα την ολοκληρώσει. Τα τελευταία χρόνια, στα πλαίσια της επίτευξης μιας πιο έντονης πολυπλοκότητας και μικροβιολογικής σταθερότητας του τελικού οίνου, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η απομόνωση και μελέτη νέων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων και των χαρακτηριστικών που αυτά μπορούν να προσδώσουν στον οίνο. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τέσσερα γαλακτικά βακτήρια, τρία *Oenococcus oeni* και ένα *Lactobacillus plantarum*, ενώ σε ένα δείγμα πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση αυθόρμητα, από τα γηγενή γαλακτικά βακτήρια. Τα στελέχη *Oenococcus oeni* εμβολιάστηκαν μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης ενώ το *Lactobacillus plantarum* πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα όπου προστέθηκε ικανή ποσότητα θειώδους ανυδρίτη για να αποτρέψει την διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Σκοπός της μελέτης ήταν να εντοπιστούν τυχόν διαφορές στους παραγόμενους οίνους της ερυθρής ποικιλίας Κοτσιφάλι.

Πραγματοποιήθηκαν έξι μικροοινοποιήσεις εις διπλούν για όλα τα δείγματα στις εγκαταστάσεις του Οινοποιείου Κλάδος στο Ρέθυμνο Κρήτης. Αποδόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στις κινητικές της μηλογαλακτικής ζύμωσης, στις βασικές αναλύσεις του οίνου (αλκοολικός τίτλος, ολική οξύτητα, pH, πτητική οξύτητα) και στις αναλύσεις χρώματος και φαινολικών συστατικών (ένταση, απόχρωση, Δείκτης Φαινολικών Ουσιών, τανίνες BSA, τανίνες MCP, ολικές ανθοκυάνες και ολικά φαινολικά με την μέθοδο Folin). Τέλος, διενεργήθηκε οργανοληπτική αξιολόγηση από το εκπαιδευμένο πάνελ του εργαστηρίου Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων και της οργανοληπτικής αξιολόγησης προέκυψε ότι τα διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων επηρέασαν την σύνθεση του παραγόμενου οίνου. Έτσι, γίνεται κατανοητό ότι τα γαλακτικά βακτήρια αποτελούν πλέον ένα ακόμα όπλο στα χέρια του οινολόγου για την παραγωγή πιο πολύπλοκων οίνων, μικροβιολογικά σταθερών και με μεγαλύτερες δυνατότητες παλαίωσης.

Επιστημονική περιοχή: Οινολογία

Λέξεις κλειδιά: Κοτσιφάλι, μηλογαλακτική ζύμωση, *Lactobacillus plantarum*, *Oenococcus oeni*, γαλακτικά βακτήρια, οργανοληπτικό προφίλ, αντίστροφη μηλογαλακτική ζύμωση

Malolactic fermentation on red variety Kotsifali

*MSc Current Food Technology. I) Dairy Science & Technology II) Oenology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Oenology & Alcoholic Drinks*

ABSTRACT

During the winemaking process, one of the parameters that can affect the vinification process and the final result is malolactic fermentation and the strain of lactic acid bacteria that initiates and completes it. In recent years, in pursuit of greater complexity and microbiological stability of the final wine, the isolation and study of new strains of lactic acid bacteria and the characteristics they can impart to the wine have been of particular interest. In this specific dissertation, four lactic acid bacteria strains were studied, three of *Oenococcus oeni* and one of *Lactobacillus plantarum*, while one sample underwent spontaneous malolactic fermentation by native lactic acid bacteria. *Oenococcus oeni* strains were inoculated after the end of alcoholic fermentation while *Lactobacillus plantarum* before the start of alcoholic fermentation. A sample was used as a control where a sufficient amount of sulfuric anhydride was added to prevent malolactic fermentation from taking place. The purpose of the study was to identify any differences in the produced wines from the red variety Kotsifali.

Six microvinifications were carried out for all samples at the facilities of Klados Winery in Rethymno, Crete. Special attention was given to the kinetics of malolactic fermentation, basic wine analyses (alcohol content, total acidity, pH, volatile acidity), color and phenolic compound analyses (intensity, hue, total phenolic content, BSA tannins, MCP tannins, total anthocyanins, and total phenolics using the Folin method). Finally, sensory evaluation was conducted by the trained panel of the Oenology Laboratory at the Agricultural University of Athens.

From the results of the analyses and sensory evaluation, it emerged that different strains of lactic acid bacteria significantly influenced the composition of the produced wine. Thus, it is understood that lactic acid bacteria are now another tool in the winemaker's hands for the production of more complex wines, microbiologically stable, and with greater aging potential.

Scientific area: Oenology

Keywords: Kotsifali, malolactic fermentation, *Lactobacillus plantarum*, *Oenococcus oeni*, lactic acid bacteria, organoleptic profile, reverse malolactic fermentation

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. ΟΙΝΙΚΗ ΠΑΡΑΔΟΣΗ ΤΗΣ ΚΡΗΤΗΣ	7
1.2. ΟΙΝΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ ΣΕ ΣΤΡΕΜΜΑΤΑ	9
1.3. ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ	10
1.4. ΕΡΥΘΡΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ	10
1.5. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΟΙΝΟΥ	13
1.5.1. ΑΙΘΥΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ.....	13
1.5.2. ΟΞΥΤΗΤΑ ΟΙΝΟΥ	14
1.4.3. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	16
1.6. ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ	20
1.6.1. ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	20
1.6.2. ΟΜΟΖΥΜΩΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΕΤΕΡΟΖΥΜΩΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ	21
1.6.3. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ.....	21
1.6.4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ	23
1.6.5. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ vs ΑΥΘΟΡΜΗΤΗ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ	24
1.6.6. ΣΤΑΔΙΟ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ	25
1.7. ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ.....	26
1.7.1. ΑΜΠΕΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	26
1.7.2. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ	27
1.8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	28
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
2.1.ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	29
2.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ – ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ	29
2.3. ΠΡΟΖΥΜΩΤΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ - ΡΥΘΜΙΣΕΙΣ	31
2.3.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΑΡΑΙΟΜΕΤΡΙΑ.....	31
2.3.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ.....	32
2.3.3. ΜΕΤΡΗΣΗ pH	32
2.4. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ	32

2.5. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΟΙΝΩΝ.....	34
2.5.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ.....	34
2.5.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΗΣ – ΕΝΕΡΓΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ	35
2.5.3. ΠΤΗΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ	35
2.5.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ	35
2.5.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	36
2.6. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	41
2.7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	41
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	43
3.1. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ.....	43
3.2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	45
3.2.1. ΟΛΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ	45
3.2.2. ΕΝΕΡΓΗ ΟΞΥΤΗΤΑ	46
3.2.3. ΑΙΘΥΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ.....	47
3.2.4. ΠΤΗΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ	47
3.3. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....	48
3.3.1. ΕΝΤΑΣΗ.....	48
3.3.2. ΑΠΟΧΡΩΣΗ	49
3.3.3. ΟΛΙΚΕΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΕΣ	49
3.3.4. ΔΕΙΚΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	50
3.3.5. ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ (ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN – CIOCALTEAU).....	51
3.3.6. ΤΑΝΙΝΕΣ BSA.....	51
3.3.7. ΤΑΝΙΝΕΣ MCP	52
3.4. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	53
3.5. ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (PCA).....	54
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	56
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59
5.1. ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59
5.2. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60
5.3. ΙΣΤΟΤΟΠΟΙ.....	60

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε αυτό το κεφάλαιο θα παρουσιαστούν ορισμένα στοιχεία για την ιστορική διαδρομή της καλλιέργειας της αμπέλου και της παραγωγής οίνου στην Κρήτη, βασικές πληροφορίες για την ερυθρή οινοποίηση, την μηλογαλακτική ζύμωση και τα προϊόντα τους καθώς επίσης και για την ερυθρή γηγενής ποικιλία “Κοτσιφάλι”.

1.1. ΟΙΝΙΚΗ ΠΑΡΑΔΟΣΗ ΤΗΣ ΚΡΗΤΗΣ

Η έναρξη της περιόδου εξημέρωσης της αμπέλου τοποθετείται στην νεολιθική εποχή μεταξύ 7000 – 6000 π.Χ. Η πρώτη οργανωμένη καλλιέργεια ποικιλιών αμπέλου και ταυτόχρονα η παραγωγή οίνου τοποθετούνται μεταξύ 6000 – 4500 π.Χ. στην περιοχή μεταξύ της Μαύρης Θάλασσας, της Κασπίας και της Μεσοποταμίας.

Ο κρητικός αμπελώνας, από τους παλαιότερους στον κόσμο και ο αρχαιότερος στην Ελλάδα, χαρακτηρίζεται από τον ποικιλιακό πλούτο και την μεγάλη έκτασή του. Ο Όμηρος είχε γράψει: Κρήτη... «*Η γη στη μέση της θάλασσας που έχει το χρώμα του κρασιού...*». Όμως, η ιστορία του κρασιού στην Κρήτη και οι δεσμοί του με το νησί έχουν τις ρίζες τους πολύ πιο παλιά, πριν ακόμη και από τα ομηρικά έπη (<https://www.winesofcrete.gr/crete/history/>).

Εδώ και περίπου έναν αιώνα οι ανασκαφές στην Κρήτη του διεθνούς φήμης αρχαιολόγου sir Arthur Evans έφεραν στο φως το θαύμα του Μινωικού Πολιτισμού, το παλάτι της Κνωσού. Στις πολύχρωμες τοιχογραφίες των μινωικών παλατιών απεικονίζεται μια ακμάζουσα οικονομία με γεωργικές, κτηνοτροφικές και εμπορικές δραστηριότητες. Μεταξύ των προϊόντων που καλλιεργούσαν με επιτυχία και εμπορεύονταν οι αρχαίοι Κρήτες ξεχωρίζουμε το λάδι, τα σιτηρά, αλλά και το κρασί.

Το αμπέλι καλλιεργείται συστηματικά στην Κρήτη εδώ και περίπου 4.000 χρόνια. Δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι το αρχαιότερο πατητήρι σταφυλιών, ηλικίας μεγαλύτερης των 3.500 ετών, έχει ανακαλυφθεί στην περιοχή του Βαθύπετρου. Επιπλέον, στο χωριό Μοναστηράκι, που βρίσκεται στον νομό Ρεθύμνης, έχουν βρεθεί γίγαρτα από την ποικιλία “Ακομινάτο” ηλικίας 3.500 ετών περίπου. Θα ήταν εξίσου σημαντικό να αναφέρουμε ότι σε κωνικό κύπελλο, που βρέθηκε στον Μινωικό οικισμό Αποδούλου, αναλύσεις έδειξαν ότι περιείχε κρασί αρωματισμένο με ρητίνη του δέντρου τερέβινθος (κοκκορεβυθιά ή τραμιθιά) συγγενικό του σκίνου και της φιστικιάς. Το αρχαιολογικό αυτό εύρημα (1900-1700 π.χ.) είναι το παλαιότερο που αποδεικνύει χρήση κρασιού με ρητίνη. Η ρετσίνα χρησίμευε ως υλικό μόνωσης του εσωτερικού των αποθηκευτικών πίθων και των αγγείων μεταφοράς αλλά και σαν μέσο συντήρησης, ώστε να αποτρέψει την μετατροπή του κρασιού σε ξύδι (<https://www.winesofcrete.gr/crete/history/>).

Από τον Όμηρο γνωρίζουμε πως τα κρητικά κρασιά ήταν ξακουστά σε όλο τον τότε γνωστό κόσμο. Πέρα από το ηλικίας 3.500 ετών πατητήρι, εντυπωσιακοί αμφορείς, τεράστιοι υπόγειοι χώροι αποθήκευσης, σχετικές απεικονίσεις σε όλα τα μινωικά ανάκτορα, αλλά και αναρίθμητες καταχωρίσεις για μεγάλες ποσότητες κρασιού στα μινωικά αρχεία σηματοδοτούν όχι μόνο τον κεντρικό ρόλο που έπαιζε το κρασί στη ζωή του νησιού, αλλά και το υψηλό επίπεδο γνώσης των Μινωιτών για αυτό. Επίσης, δεδομένου ότι οι Μινωίτες πρωταγωνιστούσαν και στο θαλάσσιο εμπόριο μεταφέρουν το κρητικό κρασί και στην αυλή του Αιγύπτιου Φαραώ. Τέλος, δεν είναι

τυχαίο το γεγονός ότι στον «Κώδικα της Γόρτυνας», το αρχαιότερο νομικό κείμενο στην Ευρώπη, βλέπουμε πρώτη φορά κανόνες για την καλλιέργεια της αμπέλου.



Εικόνα 1. Μικρός πίθος από την Κνωσό el.wikipedia.org/wiki/Μινωικός_πολιτισμός/Aardewerk_Knossos

Διανύοντας τους αιώνες η Κρήτη γίνεται πλέον επαρχία της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας. Τότε, η Κρητική οινοπαραγωγή γνωρίζει τρομακτική εντατικοποίηση. Αυτό οφείλεται στο ότι η κατανάλωση κρασιού στην Ρώμη ήταν τεράστια αλλά και στην δυσκολία των Ιταλών αμπελουργών να ανταποκριθούν σε αυτή την μεγάλη ζήτηση. Οι πεδιάδες και οι λόφοι της Κρήτης μετατρέπονται σταδιακά σε τεράστιους αμπελώνες, ενώ οι Κρήτες οινοποιοί βελτιώνουν όλο και περισσότερο τις μεθόδους οινοποίησης και παράγουν άριστα γλυκά κρασιά, τα οποία, μέσω της Ρώμης, κατακτούν όλο τον τότε γνωστό κόσμο. Πολλοί Έλληνες και Λατίνοι συγγραφείς της εποχής εκθειάζουν τον κρητικό οίνο, ο οποίος θεωρείται πως διαθέτει και φαρμακευτικές ιδιότητες. Οι πολυάριθμοι κρητικοί αμφορείς που έχουν βρεθεί είναι αδιαμφισβήτητοι μάρτυρες αυτής της αρχαίας εμπορικής επιτυχίας. Ένας μάλιστα από αυτούς, που ανακαλύφθηκε στην Πομπηία, γράφει ακόμη στο στόμιό του, στα Λατινικά, «CRET EXC», που, σύμφωνα με τους ειδικούς, σημαίνει «Εξαιρετικός Κρητικός Οίνος»(<https://www.winesofcrete.gr/crete/history/>).

Στην συνέχεια και μετά από τα βυζαντινά χρόνια η Κρήτη εμπλέκεται σε μια σειρά από πολέμους που δεν ευνοούν την αμπελοκαλλιέργεια και την οινοπαραγωγή, έως ότου το 1204 κατακτάται από τους Βενετούς, ξακουστοί τότε για τις εμπορικές τους δυνατότητες. Η κρητική οινοποιία και οι εξαγωγές ανθούν υπό την κυριαρχία των Βενετών. Ο Φλωρεντίνος καλόγερος και γεωγράφος Cristoforo Buondelmonti αναφέρει ότι το 1415 εξάγονται περισσότερα από 20.000 βαρέλια οίνου εξαιρετικής ποιότητας κάθε χρόνο. Ο Pietro Casola, τον Ιούλιο του έτους 1494 φθάνει στον Χάνδακα και περιγράφει αφθονία εξαιρετικών οίνων Μαλβαζία και Μοσχάτο σε όλο το νησί και ειδικά στο Ρέθυμνο. Έναν αιώνα αργότερα οι εξαγωγές φθάνουν τα 60.000 βαρέλια. Το 1590 ο Γερμανός Sommer αναφέρει ότι το κρασί Λιάτικο είναι το ακριβότερο, αγοράζεται 36 χρυσές κορώνες το βαρέλι, το καλύτερο Μοσχάτο είναι το ρεθυμιώτικο-22 κορώνες το βαρέλι, και ο καλύτερος Μαλβαζίας οίνος παράγεται στην περιοχή του Χάνδακα-18 κορώνες το βαρέλι(https://www.rethemnosnews.gr/apopseis/661343_oinos-kritikos-odoiporiko-kriti-romi-konstantinoypoli-benetia).

Όμως, το 1669 η Κρήτη κατακτάται από τους Οθωμανούς. Για τους επόμενους δύο αιώνες η εικόνα της παραγωγής κρασιού στην Κρήτη δεν είναι ξεκάθαρη, όμως η απαγόρευση της κατανάλωσης αλκοόλ από το Ισλάμ δεν μπορεί παρά να είχε αρνητικές συνέπειες. Ως επακόλουθο έρχεται η μείωση της παραγωγής καθώς επίσης παρατηρείται και μια φθίνουσα πορεία στις σχέσεις με τα εμπορικά δίκτυα με τις αγορές της Δύσης.

Η Κρήτη απελευθερώνεται από τον Οθωμανικό ζυγό τον 19^ο αιώνα και η νέα διοίκηση του νησιού προωθεί με όλες τις δυνάμεις της την αναδιοργάνωση και τον εκσυγχρονισμό της αγροτικής παραγωγής. Έτσι, ξεκινά και η αναγέννηση της οινοπαραγωγής. Το 1913 η Κρήτη προσαρτάται στο ελληνικό κράτος. Όμως η παραγμένη ιστορία της Ελλάδας τις επόμενες δεκαετίες, με τους αλληπάλληλους πολέμους, δεν ευνοεί τις εξαγωγές, γεγονός που επηρεάζει ιδιαίτερα το κρασί. Παρά τις δύσκολες συνθήκες όμως, η κρητική οινοποιητική παράδοση επιβιώνει στα δύσκολα αυτά χρόνια μέσα από τη βασική της μονάδα, την οικογένεια.

(<https://www.winesofcrete.gr/crete/history/>).

Φτάνοντας στο σήμερα, στο νησί της Κρήτης υπάρχουν περισσότερα από 80 οινοποιεία εκ των οποίων τα 36 αποτελούν μέλη του δικτύου οινοποιών Κρήτης. Οι 11 γηγενείς ποικιλίες (7 λευκές και 4 ερυθρές) και οι περισσότερες από 20 ακόμα εντελώς ανεξερεύνητες δίνουν ένα εχέγγυο για την μοναδικότητα αυτού του τόπου. Η πείρα αιώνων σε συνδυασμό με τις σύγχρονες οινοποιητικές μονάδες, την υψηλή τεχνογνωσία των νέων αμπελουργών και οινοποιών, τις εξαγωγές στις σημαντικότερες οινικές αγορές του κόσμου και τις πολυάριθμες διακρίσεις σε σημαντικούς οινικούς διαγωνισμούς αποδεικνύουν ότι ο κρητικός οίνος αρχίζει να παίρνει την θέση που δικαιωματικά του ανήκει στον παγκόσμιο οινικό χάρτη.

1.2. ΟΙΝΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ ΣΕ ΣΤΡΕΜΜΑΤΑ

Στον πίνακα 1 φαίνεται η αμπελοκαλλιέργεια στην Κρήτη του σήμερα (Σταυρακάκης, 2018).

Πίνακας 1. ΚΥΡΙΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΟΙΝΟΠΟΙΙΑΣ ΤΟΥ ΚΡΗΤΙΚΟΥ ΑΜΠΕΛΩΝΑ & ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑΣ (ΕΚΤΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΤΡ (ΠΗΓΗ ΥΠΑΑΤ 2015)

	Ν. ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ	Ν. ΛΑΣΙΘΙΟΥ	Ν. ΡΕΘΥΜΝΗΣ	Ν. ΧΑΝΙΩΝ	ΣΥΝΟΛΟ
ΛΙΑΤΙΚΟ	4850	8450	12140	1280	26720
ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	12300	1070	140	150	13660
ΒΗΛΑΝΑ	5070	820	60	40	5990
ΜΑΝΔΗΛΑΡΙΑ	2600	120	30	20	2770
ΘΡΑΨΑΘΗΡΙ	560	440	10	10	1020
ΒΙΔΙΑΝΟ	520	10	420	30	980
SYRAH	1560	200	30	160	1950
CABERNET SAUVIGNON	510	90	70	190	860
GRENACHE	400	30	20	320	770
CHARDONNAY	310	100	10	10	430
MERLOT	240	30	20	40	330
SAUVIGNONBLANC	260				260
ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ	134580	4770	8600	270	148220

Μεγάλη επιρροή στην έκταση, την δομή, την διάρθρωση και την ποικιλιακή σύνθεση του κρητικού αμπελώνα διαδραμάτισε τόσο η ποικιλία Σουλτανίνα όσο και η φυλλοξήρα. Η μεν Σουλτανίνα άλλαξε τον ποικιλιακό χάρτη της Κρήτης μέσα σε λίγα χρόνια, ενώ η φυλλοξήρα, που εμφανίστηκε το 1978 στην Μεσσαρά, συνέβαλε στη μείωση των καλλιεργούμενων εκτάσεων (μαζί με την πολιτική των εκριζώσεων) αλλά και στην ποικιλιακή «αναδιάρθρωση» των αμπελώνων του νησιού. Έτσι, παρατηρήθηκε μια αύξηση στις νέες φυτεύσεις των ποικιλιών Κοτσιφάλι, Θραψαθήρι, Βιδιανό, Μοσχάτο Σπίνας και μια αισθητή μείωση των ποικιλιών Λιάτικο, Σουλτανίνα και Ραζακί. Η ποικιλιακή σύνθεση επηρεάστηκε και από την εισαγωγή ξένων (κυρίως γαλλικών) ποικιλιών οινοποιίας.

1.3. ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η λέξη “οινοποίηση” θα μπορούσε να μεταφραστεί ως το σύνολο των διαδικασιών που ξεκινούν από την συλλογή των σταφυλιών μέχρι την στιγμή που τελειώνει η μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη και έχουμε ουσιαστικά τον οίνο.

Οι κύριες μορφές οινοποίησης είναι οι ακόλουθες:

- Ερυθρή οινοποίηση
- Λευκή οινοποίηση
- Ερυθρωπή (ροζέ) οινοποίηση
- Οινοποιήσεις ειδικών τύπων π.χ. γλυκοί οίνοι, αρωματισμένοι οίνοι, αφρώδης οίνοι(Σουφλερός, 2000)

Παρακάτω, λόγω του αντικειμένου, θα δοθεί έμφαση στην ερυθρή οινοποίηση.

1.4. ΕΡΥΘΡΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Ο τρύγος των ερυθρών σταφυλιών πραγματοποιείται αφού επιτευχθεί ο συνδυασμός της ωρίμανσης των σακχάρων, των αρωμάτων και των φαινολών. Κατά την διάρκεια της συγκομιδής μια πρώτη διαλογή των υγιών τσαμπιών γίνεται στο αμπέλι. Στην συνέχεια τα σταφύλια μεταφέρονται στο οινοποιείο όσον το δυνατόν πιο γρήγορα από την στιγμή της απομάκρυνσής τους από το φυτό και σε όσον το δυνατόν χαμηλότερη θερμοκρασία. Στην συνέχεια τοποθετούνται στην τράπεζα διαλογής, όπου εκεί γίνεται μια δεύτερη και αυστηρότερη διαλογή, και καταλήγουν σε, μηχανικό πλέον, εκραγιστήρα – σπαστήρα. Εκεί, θα απομακρυνθούν οι βόστρυχοι και θα γίνει μια όσον τον δυνατόν πιο απαλή έκθλιψη των ραγών τόσο για την εξαγωγή του χυμού όσο και για να αποφευχθεί το μάσημα των φλοιών και το σπάσιμο των γιγάρτων. Η απορράγιση είναι μια σημαντική διαδικασία διότι παρατηρείται:

- μια σημαντική μείωση του χώρου που καταλαμβάνει η σταφυλομάζα (οι βόστρυχοι αντιπροσωπεύουν το 15-30% του όγκου της)
- γευστική βελτίωση των οίνων με την μείωση της στυφής γεύσης
- αύξηση αλκοολικού τίτλου δεδομένου ότι οι βόστρυχοι απορροφούν αλκοόλη και αποδίδουν νερό
- καλύτερη ένταση χρώματος για τους ερυθρούς οίνους μιας και οι βόστρυχοι δεσμεύουν τις ανθοκυάνες
- δυσκολία στην ομαλή εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης αφού περιέχουν άζωτο
- μείωση της απόδοσης σε γλεύκος

- μεγαλύτερη ευκολία στην οξείδωση τόσο λόγω της απομάκρυνσης φαινολικών ουσιών όσο και του έντονου αερισμού
- μικρή μείωση της οξύτητας (Σουφλερός, 2000)

Η έκθλιψη μπορεί να προκαλέσει:

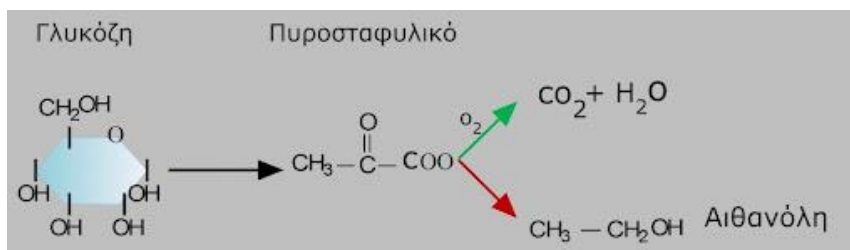
- αύξηση της επιφάνειας επαφής υγρού και στερεών με αποτέλεσμα να ξεκινά η εκχύλιση πιο γρήγορα
- καλύτερη κατανομή του θειώδη ανυδρίτη
- απελευθέρωση του χυμού
- πλήρη κατανάλωση των σακχάρων
- οικονομία χώρου και ευκολία μεταφοράς με αντλίες
- αύξηση οινολάσπης
- ευαισθησία στην οξείδωση
- γρήγορη εξέλιξη αλκοολικής ζύμωσης και άνοδος της θερμοκρασίας
- καταστροφή των χρωστικών στα προσβεβλημένα από σήψη σταφύλια
- αύξηση των γιγάρτων στο γλεύκος και μεγαλύτερο κίνδυνο για να κατακερματιστούν (Σουφλερός, 2000)

Στην συνέχεια το γλεύκος μεταφέρεται σε δεξαμενές μαζί με τους φλοιούς και τα γίγαρτα, πράγμα που αποτελεί και την σημαντική διαφορά με την λευκή οينوποίηση. Αφού με την μεταφορά έχει γίνει και η ομογενοποίηση της σταφυλομάζας, ακολουθούν οι αναλύσεις γλεύκους και αναλόγως οι κατάλληλες διορθώσεις. Οι κύριες αναλύσεις αφορούν την μέτρηση των σακχάρων, της οξύτητας, του pH και το αφομοιώσιμο άζωτο. Η συνήθης πρακτική, λόγω του ξηροθερμικού κλίματος της Ελλάδας, αφορά αύξηση της οξύτητας, που γίνεται με τρυγικό οξύ, και διορθώσεις του αφομοιώσιμου αζώτου, σημαντικό συστατικό για την θρέψη των ζυμών.

Επιπλέον, κατά την μεταφορά της σταφυλομάζας στην δεξαμενή ζύμωσης γίνεται και η προσθήκη του θειώδη ανυδρίτη (Τσακίρης, 1998). Ο θειώδης ανυδρίτης χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο ιδιοτήτων, πολύ διαφορετικών μεταξύ τους, οι οποίες τον καθιστούν σχεδόν απαραίτητο στις επεξεργασίες και στην μεταφορά του οίνου. Έτσι:

- έχει αντιοξειδωτική δράση για δεσμεύει το οξυγόνο
- επιδρά στις οξειδάσες, ένζυμα που δρουν σαν καταλύτες στις οξειδώσεις των συστατικών του οίνου
- παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.
- πραγματοποιεί επιλογή στις διάφορες ζύμες
- διευκολύνει την εκχύλιση χρωστικών και άλλων φαινολικών
- αυξάνει την οξύτητα
- διευκολύνει στην διαύγαση
- δεσμεύει την ακεταλδεΐδη (Σουφλερός, 2000)

Στην συνέχεια αρχίζει η αλκοολική ζύμωση, δηλαδή η μετατροπή της γλυκόζης και της φρουκτόζης σε αιθανόλη και CO₂, μέσω της γλυκόλυσης.

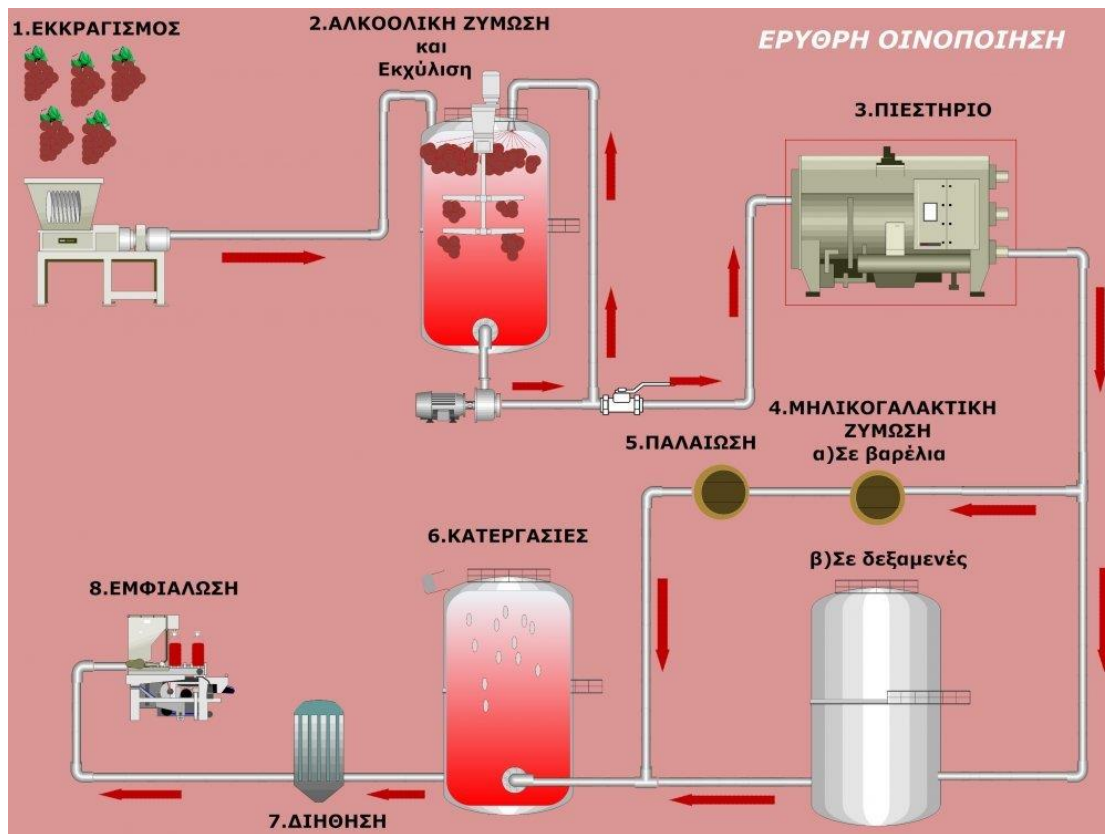


Εικόνα 2. Αλκοολική ζύμωση (infowine.gr)

Λόγω της παραγωγής CO_2 κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης στην επιφάνεια του γλεύκους δημιουργείται το “καπέλο” που αποτελείται από όλα τα στερεά συστατικά του σταφυλοπολτού. Η θερμοκρασία είναι ένας βασικός παράγοντας κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Στα ερυθρά γλεύκη η θερμοκρασία είναι υψηλότερη από την λευκή οινοποίηση και κυμαίνεται μεταξύ 20°C και 28°C . Η θερμοκρασία επηρεάζει την εξέλιξη της ζύμωσης, είναι υψηλότερη μέσα στο καπέλο και επηρεάζει αισθητά την εκχύλιση (αύξηση της θερμοκρασίας σημαίνει και πιο έντονη εκχύλιση).

Η εκχύλιση που πραγματοποιείται από την συμπαραμονή των φλοιών και των γιγάρτων με το γλεύκος κατά την διάρκεια της ερυθρής οινοποίησης είναι η κύρια διαφορά με την λευκή οινοποίηση και έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στον τελικό παραγόμενο οίνο. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας μεταφέρονται από τον φλοιό και τα γίγαρτα στο γλεύκος οι φαινολικές ουσίες. Οι κυριότερες είναι οι ανθοκυάνες και οι τανίνες. Οι ανθοκυάνες δίνουν το χρώμα στον οίνο και παρουσιάζουν ένα μέγιστο την 5^η με 6^η ημέρα εκχύλισης. Στην συνέχεια ελαττώνονται γιατί απορροφούνται από την βιομάζα και τα στέμφυλα αλλά και γιατί καταστρέφονται στο αναγωγικό περιβάλλον της ζύμωσης. Οι τανίνες είναι υπεύθυνες για την στυφή γεύση στον οίνο και για την ισχυρή αντιοξειδωτική τους προστασία. Βρίσκονται τόσο στον φλοιό όσο και στα γίγαρτα και η περιεκτικότητά τους αυξάνεται όσο παραμένουν σε επαφή τα στέμφυλα με το γλεύκος. Επίσης, η αλκοόλη είναι ένα συστατικό που με την αύξησή της παρατηρείται και μια αύξηση στην εκχύλιση. Η διαδικασία της εκχύλισης επηρεάζεται επίσης και από άλλους παράγοντες όπως είναι ο θειώδης ανυδρίτης, ο βαθμός ωριμότητας της πρώτης ύλης, οι ζύμες, τα ένζυμα, η αναλογία γλεύκους - στεμφύλων, ο χρόνος συμπαραμονής, ο αριθμός διαβροχών κτλ. Οι κυριότεροι τρόποι διαβροχής είναι η εμβάπτιση, η παλίρροια και το delestage. Η μεγιστοποίηση την εκχύλισης των φαινολικών και η καλύτερη ομογενοποίηση της σταφυλομάζας είναι οι λόγοι που πραγματοποιούνται οι διαβροχές. Ο αριθμός τους εξαρτάται από το επιθυμητό αποτέλεσμα (Τσακίρης, 1998), (Σουφλερός, 2000).

Ο διαχωρισμός του οίνου/γλεύκους από τα στέμφυλα μπορεί να γίνει σε 3 διαφορετικές φάσεις. Η πρώτη φάση είναι πριν το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, η δεύτερη στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης και η τρίτη κάποιες μέρες μετά το τέλος της. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το προϊόν που επιθυμεί να παραχθεί ο οινοποιός. Οι εργαστηριακές αναλύσεις σε συνδυασμό με τον τακτικό οργανοληπτικό έλεγχο θα υποδείξουν την κατάλληλη στιγμή διαχωρισμού. Η ενέργεια αυτή περιλαμβάνει δύο φάσεις. Η πρώτη φάση αφορά τον οίνο εκροής, δηλαδή τον οίνο που θα απομακρυνθεί από την δεξαμενή ζύμωσης με ελεύθερη ροή και θα μεταφερθεί σε άλλη δεξαμενή για τις επόμενες διαδικασίες. Η δεύτερη φάση είναι ο οίνος πίεσης και αφορά τον διαχωρισμό του γλεύκους από τα στέμφυλα με πίεση. Πρόκειται για κατώτερο ποιοτικά οίνο γιατί συνήθως έχει υψηλότερη πτητική οξύτητα, περισσότερα ανάγοντα σάκχαρα, μικρότερο αλκοολικό τίτλο, μεγαλύτερο pH και περισσότερες τανίνες, κυρίως από τα γίγαρτα (Τσακίρης, 1998).



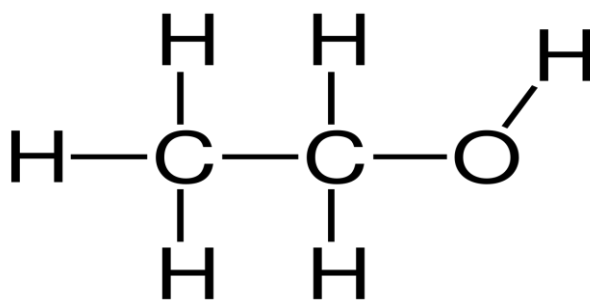
Εικόνα 3. Διαδικασία ερυθρής οινοποίησης (infowine.gr)

1.5. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΟΙΝΟΥ

Ο οίνος σύμφωνα με την οινική νομοθεσία είναι το ποτό που προέρχεται αποκλειστικά από την ολική ή μερική ζύμωση νωπών σταφυλιών ή γλεύκους που προέρχεται από νωπά σταφύλια. Από φυσικοχημική άποψη, ο οίνος αποτελείται από δύο κύρια συστατικά, το νερό και την αιθανόλη. Πρόκειται, δηλαδή, για ένα υδροαλκοολικό διάλυμα οργανικών οξέων, ένα μέρος των οποίων βρίσκεται σε μορφή αλάτων. Επίσης, θα ήταν σημαντικό να αναφερθεί ότι με την επινόηση της χρωματογραφίας, της φασματοφωτομετρίας, της ενζυμολογίας κτλ. μια σταγόνα οίνου είναι αρκετή για τον προσδιορισμό οξέων, αλκοολών, εστέρων, αμινοξέων, σακχάρων καθώς και άλλων ουσιών σημαντικών για την καλύτερη κατανόηση των οίνων (Jackson, 2008, Σουφλερός, 2000).

1.5.1. ΑΙΘΥΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ

Η αιθυλική αλκοόλη είναι το κύριο προϊόν του μεταβολισμού της γλυκόζης και της φρουκτόζης από τις ζύμες. Αποτελείται από 2 άτομα άνθρακα και έχει σημείο βρασμού 78,4°C. Αντιπροσωπεύει, μετά το νερό, το μεγαλύτερο μέρος του όγκου του οίνου και συνήθως κυμαίνεται από 10% έως 16% του όγκου του. Η % κατ'όγκο περιεκτικότητα των οίνων σε αλκοόλη αποτελεί τον αλκοολικό τίτλο, ο οποίος ασκεί σημαντική επίδραση στην ποιότητα, στην συντήρηση και στην εμπορική αξία του οίνου.



Εικόνα 4. Αιθυλική αλκοόλη (<https://el.wikipedia.org/wiki>)

Η αιθανόλη αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά του οίνου που προσδίδουν μια αίσθηση γλυκύτητας στον οίνο, συμβάλλοντας έτσι στην παραγωγή πιο πλούσιων γευστικά οίνων με καλύτερη ισορροπία. Επίσης, βοηθάει στην εξαγωγή συστατικών του σταφυλιού και έχει σημαντικό ρόλο στην διαλυτοποίηση αρωματικών, χρωστικών και άλλων ουσιών. Τέλος, έχει και αντισηπτικό χαρακτήρα αναστέλλοντας την δράση επιβλαβών μικροοργανισμών (Σουφλερός, 2000).

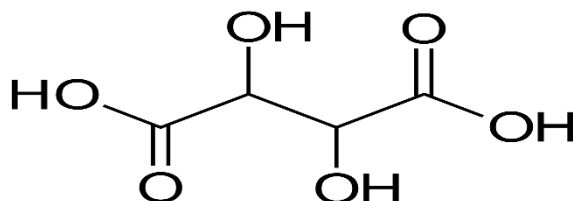
1.5.2. ΟΞΥΤΗΤΑ ΟΙΝΟΥ

Το γλεύκος και ο οίνος περιέχουν ανόργανα και οργανικά οξέα καθώς επίσης και βάσεις οι οποίες εξουδετερώνουν το σύνολο των ανόργανων οξέων, ως πιο ισχυρά, και μέρος των οργανικών. Έτσι, τα οργανικά οξέα είναι υπεύθυνα τόσο για την ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα του γλεύκους και του οίνου όσο και για το pH ή ενεργή οξύτητα. Η ολική οξύτητα είναι το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων των οξέων είτε βρίσκονται σε διάσταση είτε όχι, ενώ το pH είναι το σύνολο των καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση.

Τα οργανικά οξέα είναι υπεύθυνα για την όξινη γεύση των οίνων, για την προστασία αυτών από μικροβιολογικές ή χημικές προσβολές και για την διατήρηση του χρώματος. Κάποια από αυτά βρίσκονται στο σταφύλι ενώ κάποια άλλα δημιουργούνται κατά την διάρκεια των ζυμώσεων του γλεύκους και του οίνου, επιθυμητών ή μη. Σε πολλές περιπτώσεις, διάφοροι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα οξέα ως υποστρώματα κατά την διάρκεια του μεταβολισμού τους, πράγμα που οδηγεί σε αλλοιώσεις ή, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, σε αύξηση της πολυπλοκότητας των οίνων (Σουφλερός, 2000).

Τα κυριότερα οξέα του γλεύκους και του οίνου είναι:

1.5.2.1. ΤΡΥΓΙΚΟ ΟΞΥ

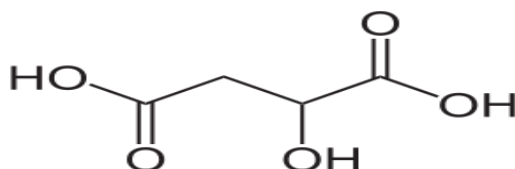


Εικόνα 5. Τρυγικό οξύ (<https://el.wikipedia.org/wiki>)

Το οξύ αυτό θεωρείται ως το κατ' εξοχήν οξύ του σταφυλιού και των προϊόντων του γιατί είναι πολύ λίγο διαδεδομένο στην φύση. Στον οίνο συναντάται σαν D-τρυγικό οξύ. Είναι το ισχυρότερο οξύ του σταφυλιού, του γλεύκους και του οίνου και άρα επηρεάζει και την ενεργό οξύτητα. Επίσης, είναι από

τα πιο ανθεκτικά στις βακτηριακές προσβολές. Η περιεκτικότητά του στο πράσινο σταφύλι είναι περίπου στα 15g/l ενώ στο ώριμο σταφύλι στα 7,5g/l. Κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, εξαιτίας της αύξησης της αιθανόλης και της ταυτόχρονης μείωσης της διαλυτότητας και καθίζησης του όξινου τρυγικού καλίου, η περιεκτικότητά του κυμαίνεται από τα 2,5 έως 4g/l. Τέλος, στον οίνο επιταχύνεται η καθίζηση των τρυγικών αλάτων λόγω του ψύχους του χειμώνα με αποτέλεσμα, το τρυγικό οξύ στους οίνους, να μην ξεπερνάει τα 2,5g/l (Σουφλερός, 2000).

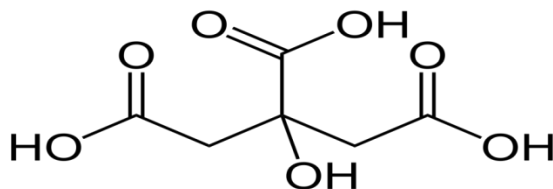
1.5.2.2. ΜΗΛΙΚΟ ΟΞΥ



Εικόνα 6. Μηλικό οξύ(<https://el.wikipedia.org/wiki/>)

Το μηλικό οξύ είναι πολύ διαδεδομένο στην φύση και απαντάται με το L(-) ισομερές του. Στα πράσινα σταφύλια η περιεκτικότητά του κυμαίνεται από 15 έως 25g/l, ενώ στα ώριμα μειώνεται από τα 2 έως τα 4g/l. Γενικά πρόκειται για ένα ασταθές οξύ που προσβάλλεται τόσο από ζύμες, κάνοντας την μηλο-αλκοολική ζύμωση, όσο και από τα βακτήρια, πραγματοποιώντας την μηλο-γαλακτική ζύμωση. Επιπλέον, οι καιρικές συνθήκες επηρεάζουν την ύπαρξη του συγκεκριμένου οξέος στο σταφύλι. Σε ζεστές περιοχές και σε θερμές χρονιές η περιεκτικότητά του στο σταφύλι μειώνεται αισθητά (Σουφλερός, 2000).

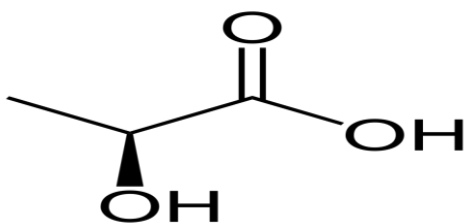
1.5.2.3. ΚΙΤΡΙΚΟ ΟΞΥ



Εικόνα 7.Κιτρικό οξύ(<https://el.wikipedia.org/wiki/>)

Πρόκειται για το χαρακτηριστικό οξύ των εσπεριδοειδών. Στο σταφύλι βρίσκεται σε μικρές ποσότητες, 0,5g/l. Το μοναδικό οξύ που μπορεί να προστεθεί στους οίνους για την αύξηση της οξύτητας. Επίσης δημιουργεί διαλυτά σύμπλοκα με τον τρισθενή Fe προστατεύοντας έτσι τον οίνο από θολώματα. (Σουφλερός, 2000)

1.5.2.4. ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ



Εικόνα 8.Γαλακτικό οξύ(<https://el.wikipedia.org/wiki/>)

Ενώ τα προηγούμενα οξέα περιέχονται στο σταφύλι, το γαλακτικό οξύ απαντά μόνο στους οίνους. Πρόκειται για το περισσότερο χημικώς και βιολογικώς σταθερό οργανικό οξύ. Το D(-) γαλακτικό οξύ παράγεται κυρίως από τις ζύμες κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ το L(+) κατά την διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. (Σουφλερός, 2000)

1.5.2.5. ΠΤΗΤΙΚΑ ΟΞΕΑ

Τα κύρια πτητικά οργανικά οξέα των οίνων είναι το οξικό οξύ, που αποτελεί και το 95% αυτών, το μυρμηκικό, προπιονικό, ισοβουτυρικό και το βουτυρικό. Στο οξικό οξύ οφείλεται η χαρακτηριστική οσμή ξυδιού που μπορεί να αποκτήσει κάποιος προσβεβλημένος οίνος.

Η προέλευση αυτών των οξέων είναι:

- Από την αλκοολική ζύμωση
- Από την μηλογαλακτική ζύμωση και την προσβολή από τα γαλακτικά βακτήρια του κίτριου οξέος και των σακχάρων
- Από την χημική οξείδωση της αλκοόλης προς οξικό οξύ παρουσία αέρος
- Από την ενζυμική οξείδωση της αλκοόλης προς οξικό οξύ από τα αερόβια οξικά βακτήρια.
- Προσβολή ορισμένων συστατικών του οίνου (ζάχαρα, γλυκερίνη, τρυγικό οξύ) από τα αναερόβια γαλακτικά βακτήρια (Σουφλερός, 2000)

1.4.3. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Φαινολικές ονομάζονται οι ενώσεις που περιέχουν στο μόριό τους την χαρακτηριστική ομάδα φαινόλης, δηλαδή έναν εξαμελή δακτύλιο με "C" και ένα -OH. Οι πολυφαινόλες, με την σειρά τους, έχουν πιο πολλά από ένα -OH ή παραπάνω φαινολικούς δακτυλίους. Όλα τα φαινολικά είναι ακόρεστες κυκλικές δομές και έχουν 1 ως 3 υδροξυλομάδες στη βάση του δακτυλίου. Οι υδροξυλομάδες βοηθούν στην εγκατάσταση άλλων μορίων, κυρίως σακχάρων και οργανικών οξέων. Πρόκειται για σημαντικές ενώσεις γιατί:

- Συμμετέχουν στον καθορισμό της γεύσης του οίνου
- Καθορίζουν την ένταση, το χρώμα και την σταθερότητά του
- Προσφέρουν αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική προστασία
- Παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην παλαίωση των οίνων
- Συμμετέχουν στην οξείδωση των λευκών οίνων
- Οι υδροξυλικές ομάδες στα μόρια των πολυφαινολών μπορούν να δεχτούν ένα ηλεκτρόνιο και να σχηματίσουν σταθερές ρίζες, σταματώντας με αυτόν τον τρόπο τις αντιδράσεις οξείδωσης στα κύτταρα (Σουφλερός, 2000)

Οι συγκεκριμένες ενώσεις χωρίζονται σε 2 οικογένειες:

- Τις μη φλαβονοειδή φαινόλες
- Τις φλαβονοειδή φαινόλες που έχουν 2 βενζολικούς δακτυλίους ενωμένους με ένα ετεροκυκλικό δακτύλιο πυρυλίου

1.5.3.1. ΜΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες απαρτίζονται από μονομοριακά φαινολικά παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος αλλά και από τα στιλβένια.

Τα βενζοϊκά οξέα δεν βρίσκονται ελεύθερα στο σταφύλι. Φαίνεται, μεταξύ άλλων, να σχηματίζουν ενώσεις και με τις ανθοκυάνες αλλά και να συμμετέχουν και στην δομή των τανινών (γαλλικό οξύ). Σε ελεύθερη μορφή βρίσκονται κατά την παλαίωση των οίνων, οπότε και παρατηρείται και αύξηση της περιεκτικότητάς τους. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν εφτά οξέα με το σημαντικότερο να είναι το γαλλικό οξύ.

Τα κινναμωμικά οξέα δεν περιέχονται ελεύθερα στα σταφύλια και στους οίνους αλλά ενώνονται με τις ανθοκυάνες και το τρυγικό οξύ δημιουργώντας τους τρυγικούς εστέρες. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οξέα, όπως το καφεϊκό, το φερουλικό και το p-κουμαρικό. Δεδομένου ότι περιέχονται και στην σάρκα της ράγας, είναι τα κύρια φαινολικά συστατικά που υπάρχουν και στους λευκούς οίνους. Τα φαινολικά, και ειδικά αυτά που έχουν δύο –OH σε θέση –ορθο, όπως το καφεϊκό, οξειδώνονται εύκολα και μετατρέπονται σε κινόνες. Οι κινόνες έχουν φαιά απόχρωση και παίζουν κάποιο ρόλο στην οξειδωτική μετατροπή του χρώματος των λευκών γλευκών και οίνων σε φαιό.

Τα στιλβένια βρίσκονται στους φλοιούς, στα γίγαρτα και στα φύλλα. Από αυτήν την κατηγορία έχει μελετηθεί περισσότερο η trans-ρεσβερατρόλη καθώς πιστεύεται ότι είναι η κύρια ουσία που ασκεί ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου.

Τέλος, στις μη φλαβονοειδείς φαινόλες ανήκουν και οι τανίνες που περιέχονται στο ξύλο του βαρελιού και περνάνε στους οίνους που έχουν ωριμάσει σε αυτά. Είναι πολυμερή με κεντρικό μόριο ένα σάκχαρο, κυρίως γλυκόζη. Αν εκεί έχει εστεροποιηθεί το γαλλικό οξύ έχουμε τις γαλλοτανίνες, ενώ αν έχει εστεροποιηθεί ελλαγικό έχουμε τις ελλαγικές τανίνες. Πρόκειται για υδρολυόμενες τανίνες οπότε στον οίνο κάποια στιγμή ελευθερώνουν γαλλικό και ελλαγικό οξύ. (Ribereau-Gayon, 2006)

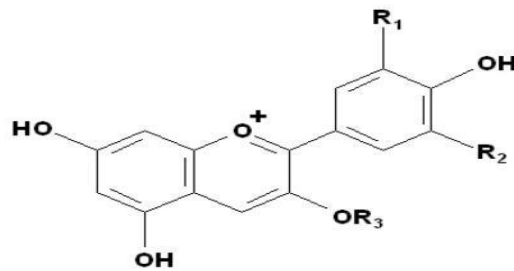
1.5.3.2. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι συγκεκριμένες ενώσεις αποτελούνται από 3 συνεχόμενους δακτυλίους, “A-C-B”. Ο “A” και ο “B” αποτελούνται μόνο από άνθρακα, ενώ ο “C” είναι ετεροκυκλικός. Αποτελείται από άνθρακα και από άλλα άτομα όπως “O”. Οι σημαντικότερες ενώσεις από αυτήν την κατηγορία είναι:

- Οι ανθοκυάνες
- Οι φλαβανόλες

ΑΝΘΟΚΥΑΝΕΣ

Οι ανθοκυάνες είναι οι ερυθρές χρωστικές του σταφυλιού που βρίσκονται κυρίως στον φλοιό των ραγών και δεν περιέχονται καθόλου στις λευκές ποικιλίες. Η συγκεκριμένη ένωση περιέχει έναν οξυγονούχο ετερόκυκλο σε μορφή θετικού ιόντος, που επιτρέπει τον σχηματισμό αλάτων με ανιόντα. Η απορρόφησή του είναι στα 520nm και έχει χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα. Ανάλογα με την μορφή του πλάγιου δακτυλίου “B” διακρίνονται και οι διάφορες ανθοκυανιδίνες. Αυτές είναι η πελαργονιδίνη (δεν περιέχεται στα σταφύλια), η κυανιδίνη, η παιονιδίνη, η δελφινιδίνη, η πετουινιδίνη, η μαλβιδίνη. Η τελευταία είναι και η σημαντικότερη από άποψη ποσότητας χρωστικής των ερυθρών σταφυλιών. Στην φύση οι ανθοκυανιδίνες είναι πάντα ενωμένες με σάκχαρα. Δηλαδή ισχύει ότι «ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΔΙΝΕΣ + ΣΑΚΧΑΡΑ = ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΕΣ» (Σουφλερός, 2000). Στα σταφύλια βρίσκονται ενωμένες με την γλυκόζη. Η ένωση με τα σάκχαρα αυξάνει την διαλυτότητα της ανθοκυανίνης.



ΟΝΟΜΑΤΑ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ	R ₁	R ₂	R ₃
Pelargonidin	H	H	H
Cyanidin	OH	H	H
Delphinidin	OH	OH	H
Peonidin	OCH ₃	H	H
Petunidin	OCH ₃	OH	H
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	H
Pelargonidin-3-O-glucoside	H	H	Glu
Cyanidin-3-O-glucoside	OH	H	Glu
Delphinidin-3-O-glucoside	OH	OH	Glu
Peonidin-3-O-glucoside	OCH ₃	H	Glu
Petunidin-3-O-glucoside	OCH ₃	OH	Glu
Malvidin-3-O-glucoside	OCH ₃	OCH ₃	Glu

Εικόνα 9. Δομές των μονομερών ανθοκυανινών που υπάρχουν φυσιολογικά στους οίνους.

Η γλυκόζη προσκολλάται στη θέση 3 του μορίου της ανθοκυανιδίνης και έτσι δημιουργείται ο μονο-γλυκοζίτης 3. Η ύπαρξη ενός μόνο μορίου γλυκόζης είναι χαρακτηριστικό των ποικιλιών του *Vitisvinifera*. Υπάρχει και η περίπτωση η γλυκόζη να βρίσκεται τόσο στην θέση 3 όσο και στην θέση 5 του μορίου και να σχηματίζεται ένας ο δι-γλυκοζίτης-3,5. Αυτό είναι χαρακτηριστικό για τις ποικιλίες που δεν προέρχονται από την ευρωπαϊκή άμπελο αλλά από διάφορα υβρίδια (Ribereau – Gayon, 1959). Τέλος, οι ανθοκυανίνες μπορούν να ενωθούν και με τα κινναμωμικά οξέα στην θέση –OH της γλυκόζης και να δώσουν τις ακυλιωμένες ανθοκυανίνες, οι οποίες και δημιουργούν πιο σταθερό χρώμα σε σχέση με τις ελεύθερες ανθοκυανίνες.

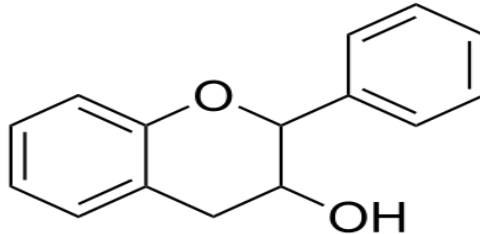
Ορισμένες ιδιότητες των ανθοκυανών είναι οι παρακάτω:

- Όσο πιο όξινο είναι το περιβάλλον που βρίσκονται τόσο πιο έντονο είναι και το κόκκινο χρώμα που έχουν. Όσο αυξάνεται το pH, το χρώμα τους πάει σε άχρωμη μορφή και στην συνέχεια σε κυανή
- Ο θειώδης ανυδρίτης αποχρωματίζει τις ανθοκυανίνες. Η αντίδραση αυτή είναι αμφίδρομη και έτσι με την ελάττωση του θειώδους επανέρχεται το χρώμα
- Οι ανθοκυανίνες αποχρωματίζονται με αναγωγή

ΦΛΑΒΑΝΟΛΕΣ

Στις φλαβανόλες ανήκουν τα μονομερή κατεχίνη και επικατεχίνη. Αυτά τα μονομερή μπορούν να πολυμεριστούν και να δώσουν τις τανίνες. Οι τανίνες χωρίζονται σε υδρολυόμενες, οι οποίες υπάρχουν στο ξύλο του βαρελιού, και στις συμπυκνωμένες, οι οποίες βρίσκονται στα σταφύλια (Ribereau–Gayon, 2006). Συγκεκριμένα, οι συμπυκνωμένες τανίνες είναι στα γίγαρτα, στους βόστρυχες, στον φλοιό και στην σάρκα του σταφυλιού. Διαφορετική ονομασία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τις συμπυκνωμένες τανίνες είναι «προανθοκυανιδίνες». Χρησιμοποιείται αυτή η λέξη γιατί όταν βρεθούν σε όξινο περιβάλλον σπάει ο δεσμός των πολυμερών και μετατρέπονται σε ανθοκυανίνες. Η χημική δομή των προανθοκυανιδινών διαχωρίζεται βάση των παρακάτω:

- Υδροξυλίωση του “B” δακτυλίου και έτσι παρατηρείται ο διαχωρισμός σε προκυανιδίνη και προδελφινιδίνη
- Στερεοχημεία στον άνθρακα “2”, που αφορά την ένωση του “C” και του “B” δακτυλίου, και στον “3”, που αφορά την θέση του –OH.
- Εστεροποίηση με γαλλικό οξύ στην θέση 3
- Το μήκος της αλυσίδας, δηλαδή τον βαθμό πολυμερισμού
- Την θέση του δεσμού του άνθρακα



Εικόνα 10. Χημική δομή φλαβανόλης(<https://el.wikipedia.org/wiki>)

Παρόλο που οι τανίνες περιέχονται σε πολλά μέρη του σταφυλιού και σε σημαντική αναλογία, μόνο ένα μικρό μέρος θα περάσει στο γλεύκος και μετά στον οίνο. Στην περίπτωση που οι βόστρυχοι δεν χρησιμοποιηθούν κατά την οινοποίηση μόνο ένα μικρό ποσοστό των τανινών από τα γιγάρτα και από τον φλοιό θα εκχυλιστούν στον οίνο. Όμως, οι τανίνες από αυτά τα 2 μέρη του σταφυλιού έχουν σημαντικές διαφορές, όπως:

- Οι τανίνες των φλοιών έχουν μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού σε σχέση με αυτές των γιγάρτων
- Και οι δύο τανίνες προέρχονται από τα μονομερή της κατεχίνης και της επικατεχίνης. Όμως, οι τανίνες των φλοιών περιέχουν και μονομερή της επιγαλλοκατεχίνης (προδελφινιδίνη), ενώ οι τανίνες των γιγάρτων περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό από γαλλικούς εστέρες της επικατεχίνης.

Οι βασικές ιδιότητες των τανινών είναι:

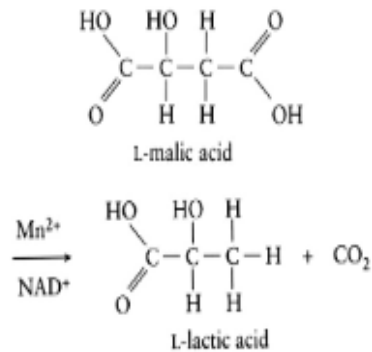
- Καθιζάνουν τις πρωτεΐνες του σάλιου. Έτσι, δημιουργείται το αίσθημα του στυφού και του πικρού
- Παίρνουν μέρος στην διαύγαση (κολλάρισμα) των οίνων, όπου χρησιμοποιούνται διάφορες πρωτεϊνούχες κόλλες
- Παρεμποδίζουν την δράση των ενζύμων αφού συνδέονται με το πρωτεϊνικό τους μέρος και είναι ισχυρά αντιοξειδωτικές ουσίες (Σουφλερός, 2000)



Εικόνα 11. Προέλευση ταννινών οίνου.

1.6. ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι η αποκαρβοξυλίωση του μηλικού οξέος που περιέχει δύο καρβοξύλια σε γαλακτικό οξύ που έχει ένα καρβοξύλιο με την δράση των γαλακτικών βακτηρίων. Επιπλέον παρατηρείται η παραγωγή ATP. Η γενική αντίδραση αυτής της μετατροπής φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:



Εικόνα 12. ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ (JACKSON, 2019)

1.6.1. ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

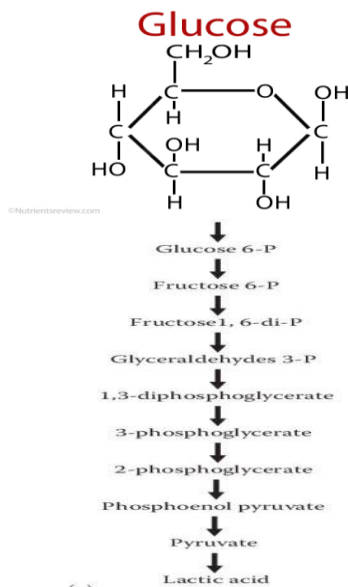
Τα γαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην υποομάδα των προκαρυωτικών πρωτίστων και είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί. Τα βακτήρια που βρίσκονται στον οίνο είναι θετικά κατά Gram, ακίνητα, μη σπορογενή και πολλαπλασιάζονται με κυτταροδιαίρεση. Βρίσκονται στα σταφύλια, στα γλεύκη και στους οίνους, είναι λιγότερο οξεόφιλα από τις ζύμες, με βέλτιστο pH ανάπτυξης το 4,5 και άνω, υψηλές ανάγκες σε θρεπτικά σε σχέση με τα οξικά βακτήρια και πιο πολύπλοκα μεταβολικά μονοπάτια σε σχέση με τις ζύμες. Αν τα παρατηρήσουμε στο μικροσκόπιο θα δούμε ότι διακρίνονται σε κόκκους και σε βάκιλους. Οι κόκκοι έχουν σχήμα σφαιρικό και οι βάκιλοι ραβδόμορφο. Τα σπουδαιότερα γένη που βρίσκονται στους οίνους είναι τα *Oenococcus*, *Pediococcus* και *Lactobacillus* (Σουφλερός, 2000).

Η ταξινόμησή τους μπορεί να είναι φυλογενετική, μοριακή, με την οποία ανιχνεύονται ομοιότητες και διαφορές του γονιδιώματος του βακτηρίου, αλλά και φαινοτυπική που αναφέρεται στους μορφολογικούς, φυσιολογικούς, βιοχημικούς και ανοσολογικούς χαρακτήρες και στην σύνθεση συγκεκριμένων κυτταρικών συστατικών. Η μορφολογική ταξινόμηση οφείλεται στην ευκολία που επιδεικνύουν τα γαλακτικά βακτήρια να αλλάζουν την μορφολογία τους σε πιο πολύπλοκα σχήματα για να προσαρμοστούν σε πιο δύσκολες συνθήκες. Η βιοχημική ταξινόμηση αφορά τους μεταβολίτες και τι ζυμώνουν τα βακτήρια. Η ανοσολογική ταξινόμηση γίνεται με τις πρωτεΐνες που έχουν στην εξωτερική μεμβράνη χωρίς όμως να φτάνει σε επίπεδο είδους ή στελέχους. Τέλος, η φυσιολογική ταξινόμηση γίνεται με την ικανότητα ανάπτυξης σε διαφορετικά μέσα ανάπτυξης, που όμως δεν υπάρχει υψηλή διάκριση (Ribereau-Gayon, 2006).

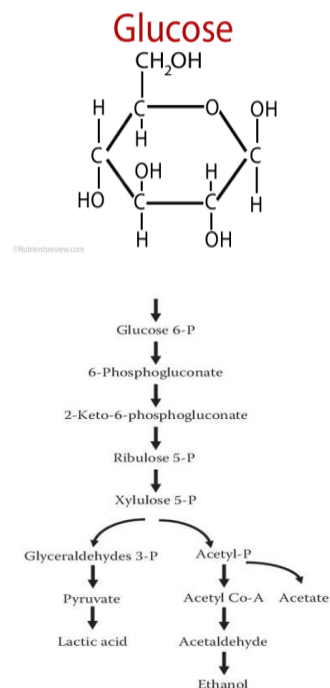
1.6.2. ΟΜΟΖΥΜΩΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΕΤΕΡΟΖΥΜΩΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ

Ένας βασικό κριτήριο για την ταξινόμηση των βακτηρίων είναι ο συγκεκριμένος χαρακτήρας και τα προϊόντα που παράγονται από την ζύμωση των εξοζών. Έτσι, διακρίνουμε τα ομοζυμωτικά και τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια. Αρχικά θα ήταν σωστό να αναφερθεί ότι τα γαλακτικά βακτήρια στον οίνο πρέπει να μεταβολίζουν το μηλικό οξύ και όχι τα σάκχαρα. Αυτό βέβαια δεν είναι δυνατόν. Για αυτό τα διακρίνουμε στις παρακάτω κατηγορίες (Ribereau-Gayon, 2006).

- Τα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια μεταβολίζουν μέσω της οδού της γλυκόλυσης τις εξόζες και δίνουν γαλακτικό οξύ. Σπάνια υπάρχουν στους οίνους και δεν ζυμώνουν τις πεντόζες.
- Τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια ζυμώνουν τις εξόζες και τις πεντόζες χρησιμοποιώντας την οδό των φωσφορικών πεντοζών, μιας και δεν περιέχουν το ένζυμο της γλυκόλυσης, και παράγουν γαλακτικό οξύ, αιθυλική αλκοόλη, οξικό οξύ και CO₂. Πρόκειται για τα κύρια γαλακτικά βακτήρια του οίνου.



Εικόνα 13. Γλυκόλυση ομοζυμωτικών βακτηρίων



Εικόνα 14. Γλυκόλυση ετεροζυμωτικών βακτηρίων

- Τέλος, μια τρίτη κατηγορία είναι τα προαιρετικά ετεροζυμωτικά. Αυτά ακολουθούν και τα δύο μονοπάτια, δηλαδή τόσο τον μεταβολισμό της γλυκόζης μέσω της γλυκόλυσης και παράγουν γαλακτικό οξύ, όσο και μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών για την παραγωγή γαλακτικού οξέος, αιθανόλης, οξικού οξέος και CO₂.

1.6.3. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Η μηλογαλακτική ζύμωση θεωρήθηκε για πολλά χρόνια ως μία μη επιθυμητή διαδικασία και πάντα γινόταν προσπάθεια για την αποφυγή της έναρξής της. Όμως, τις τελευταίες δεκαετίες αποδείχτηκε ότι κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις το συγκεκριμένο φαινόμενο είναι απαραίτητο και μάλιστα συνεισφέρει στην σταθερότητα και στην πολυπλοκότητα του οίνου. Δεν είναι τυχαίο ότι σπουδαίοι Γάλλοι οινολόγοι, ερευνητές και συγγραφείς έχουν πει για την μηλογαλακτική ζύμωση ότι

“είναι απόλυτα ανακριβές, να θεωρούμε ότι ένας οίνος υψηλής ποιότητας είναι αποτέλεσμα μιας καθαρής αλκοολικής ζύμωσης. Δεν είναι καθόλου υπερβολή, να πούμε ότι δεν θα υπήρχαν υψηλής ποιότητας οίνοι, ακόμη και στο Bordeaux, χωρίς την μηλογαλακτική ζύμωση. Όλοι οι “μεγάλοι” οίνοι δεν περιέχουν καθόλου ή περιέχουν πολύ λίγο μηλικό οξύ, ενώ αντίθετα είναι πλούσιοι σε γαλακτικό οξύ”(Ribereau-Gayon, 2006).

Οι συνέπειες, λοιπόν, που θα επιφέρει η συγκεκριμένη ζύμωση στον παραγόμενο οίνο είναι οι ακόλουθες:

- **Μείωση της οξύτητας.** Έχει παρατηρηθεί μια μείωση της τιτλοδοτούμενης οξύτητας από 0,5 έως 1g/λεκφρασμένη σε τρυγικό οξύ και συγχρόνως μια αύξηση του pH από 0,1 έως 0,3. Αυτό συμβαίνει γιατί από 1g/l μηλικού οξέος που έχει 2 καρβοξύλια παράγονται 0,67g/γαλακτικού οξέος που έχει 1 καρβοξύλιο. Επιπλέον, παρατηρείται και μια μικρή έκλυση CO₂ (Σουφλερός, 2000).
- **Βακτηριακή σταθερότητα.** Με την μηλογαλακτική ζύμωση καταναλώνονται τροφές που θα μπορούσαν να είναι διαθέσιμες για άλλους μικροοργανισμούς. Επίσης, παράγονται τοξίνες που θα μπορούσαν να είναι διαθέσιμες για άλλα βακτήρια
- **Αλλαγές στο άρωμα.** Αρχικά παρατηρείται αύξηση του οξικού οξέος που συνεπάγεται και αύξηση στην πτητική οξύτητα εξαιτίας του μεταβολισμού των σακχάρων και του κιτρικού οξέος. Ο μεταβολισμός του κιτρικού οξέος έχει σαν αποτέλεσμα τόσο την παραγωγή οξικού και γαλακτικού οξέος όσο και την παραγωγή διακετυλίου αλλά και ακετοΐνης. Το διακετύλιο είναι μια ουσία η οποία σε συγκεντρώσεις από 1 έως 4mg/l προσδίδει στους οίνους ένα άρωμα βουτύρου τονίζοντας την πολυπλοκότητα και τον πλούτο του οίνου. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις το συγκεκριμένο άρωμα γίνεται μη επιθυμητό (Ribereau-Gayon, 2006). Όμως, η συγκεκριμένη ένωση δεν είναι σταθερή και μπορεί να αναχθεί σε λιγότερο πτητικές ενώσεις, να δεσμευτεί από το θειώδες αλλά και να αντιδράσει με το αμινοξύ κυστεΐνη και να παράξει θειαζόλη, μια ουσία που θυμίζει κάστανο (Marchand *et al.*, 2000).

198

N. Olguin *et al.* / Food Microbiology 26 (2009) 197–203

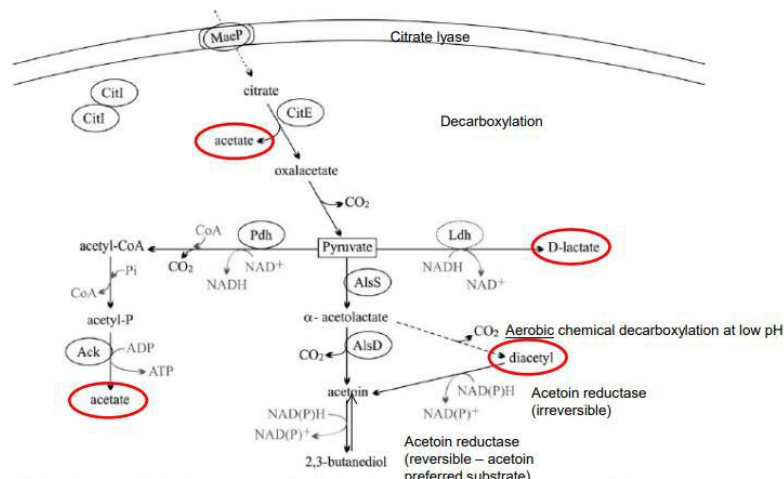


Fig. 1. Main pathways for citrate/pyruvate metabolism by *O. oeni*. Genes analyzed in this study: *citI* – transcriptional activator; *maeP* – putative citrate permease; *citE* – citrate lyase; *pdh* – pyruvate dehydrogenase; *ackA* – acetate kinase; *ldh* – lactate dehydrogenase; *alsS* – α -acetolactate synthase; *alsD* – α -acetolactate decarboxylase. Dashed arrow toward diacetyl denotes a nonenzymatic reaction.

Εικόνα 15. Κύρια μονοπάτια μεταβολισμού κιτρικού/πυρρουθικού οξέος από το βακτήριο *O. Oeni*.

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων περιέχουν το ένζυμο β-γλυκοσιδάση, το οποίο και διασπά τους δεσμούς μεταξύ των σακχάρων και των τερπενίων ελευθερώνοντάς τα στον οίνο και αυξάνοντας έτσι την αρωματική του ένταση. Το συγκεκριμένο ένζυμο το χρησιμοποιούν τα βακτήρια για να υδρολύσουν γλυκοσιλωμένα παράγωγα και να βρουν έτσι πηγές άνθρακα (σάκχαρα) απαραίτητες για την προσαρμογή του βακτηρίου στον οίνο (Bartowsky&Borneman, 2011).

- *Αλλαγές στο χρώμα.* Με την μείωση της οξύτητας (και αύξηση του pH) λόγω του συγκεκριμένου φαινομένου παρατηρείται και μια μείωση της έντασης του χρώματος του οίνου. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι ορισμένα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων φέρουν ένζυμα β-γλυκοσιδάσης, τα οποία τα χρησιμοποιούν για την υδρόλυση των γλυκοσιλωμένων παραγώγων. Οι ανθοκυάνες είναι ενωμένες με σάκχαρα και η απελευθέρωσή τους έχει σαν αποτέλεσμα να χαθούν και να έχουμε μείωση της έντασης (Paramithiotis, 2022). Τέλος, κατά την διάρκεια της συγκεκριμένης ζύμωσης παράγεται και ακεταλδεΐδη, η οποία λειτουργεί σαν γέφυρα ένωσης ανθοκυανών και τανινών και κατ' επέκταση της σταθεροποίησης του χρώματος.
- *Αλλαγές στην γεύση.* Με την μείωση της οξύτητας οι οίνοι γίνονται πιο απαλοί και περισσότερο λιπαροί. Η ταυτόχρονη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από κάποια στελέχη αυξάνουν τον όγκο των παραγόμενων οίνων (Δημοπούλου, 2016).

1.6.4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Σε γενικές γραμμές τα γαλακτικά βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα από τους ζυμομύκητες. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την έναρξη και την εξέλιξη του φαινομένου είναι (Ribereau-Gayon, 2006):

- *Θερμοκρασία.* Η ιδανική θερμοκρασία για την έναρξη και την ομαλή εξέλιξη της ζύμωσης είναι από 18 °C έως 22 °C. Υψηλότερες θερμοκρασίες επιταχύνουν την διαδικασία.
- *SO₂.* Έχει ανασταλτική δράση. Μόνο ο μοριακός θειώδης ανυδρίτης μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο. Ένα κομμάτι του θα μεταβολιστεί αλλά το υπόλοιπο γίνεται τοξικό, διασπώντας την θειαμίνη, έχοντας μεταλλαξιογόνο δράση και απενεργοποιώντας τα ένζυμα. Τα περισσότερα στελέχη έχουν μια αντοχή έως τα 10mg/l ελεύθερο θειώδες και 50mg/l ολικό.
- *Αιθανόλη.* Η υψηλή συγκέντρωση επιβραδύνει την μηλογαλακτική ζύμωση γιατί επηρεάζει την βιωσιμότητα των γαλακτικών βακτηρίων και άρα το ποια θα είναι παρόντα.
- *Θρεπτικά.* Τα γαλακτικά βακτήρια έχουν μεγάλες ανάγκες σε θρεπτικά, κυρίως σε ανόργανα συστατικά και σε βιταμίνες και όχι τόσο σε σάκχαρα. Οι διάφορες οινοποιητικές τεχνικές μπορεί να ευνοήσουν την αύξηση των θρεπτικών στον οίνο. Η παραμονή του οίνου στις λεπτές οινολάσπες δίνουν περισσότερα θρεπτικά λόγω της αυτόλυσης των ζυμών. Επίσης, λιγότερη διαύγαση και περισσότερη επαφή με τα στέμφυλα αυξάνει την επάρκεια σε θρεπτικά συστατικά.
- *Επίδραση ζυμών.* Η επιλογή της ζύμης για την αλκοολική ζύμωση μπορεί να διευκολύνει τα γαλακτικά βακτήρια στην έναρξη και στην ομαλή ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Μια αυτολυτική ζύμη θα γεμίσει το μέσο με τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τα γαλακτικά βακτήρια. Επίσης, μια ζύμη που μειώνει το μηλικό οξύ κατά την διάρκεια της

αλκοολικής ζύμωσης, μειώνει και την οξύτητα πράγμα που ευνοεί και την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Όμως, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι ορισμένες ζύμες μπορούν να παράγουν λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας που είναι τοξικά για τα βακτήρια.

- *pH*. Το χαμηλό pH μπορεί να προκαλέσει απώλεια δραστηριότητας των σχετικά ευαίσθητων σε οξέα γλυκολυτικών ενζύμων, τα οποία επηρεάζουν σοβαρά την ικανότητα παραγωγής ATP, και δομική βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη και σε μακρομόρια όπως DNA και πρωτεΐνες.
- *Βακτηριοφάγοι*. Πρόκειται για ιούς που ενσωματώνονται στο DNA του βακτηρίου. Εκεί μπορεί να ενεργοποιηθούν και να προκαλέσουν την λύση του κυττάρου. Τα βακτήρια που μεταφέρουν τον ιό ονομάζονται λυσογόνα.
- *Υπερβολική οξυγόνωση του οίνου*

1.6.5. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ vs ΑΥΘΟΡΜΗΤΗ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Το σημαντικότερο γαλακτικό βακτήριο που συμμετέχει στην μηλογαλακτική ζύμωση είναι ο *Oenococcus oeni*. Αυτό συμβαίνει γιατί αρκετά στελέχη από το συγκεκριμένο βακτήριο έχουν αυξημένη αντοχή στην αιθανόλη, στον θειώδη ανυδρίτη, σε χαμηλότερο pH, σε έλλειψη θρεπτικών, προκαλούν λιγότερες αλλοιώσεις και αλλάζουν μορφολογικά δημιουργώντας αλυσίδες για να προσαρμοστούν σε δύσκολες συνθήκες. Άλλα γένη γαλακτικών βακτηρίων που μπορούν να πάρουν μέρος στο συγκεκριμένο φαινόμενο είναι τα *Lactobacillus* και *Pediococcus*. Τα συγκεκριμένα γένη δρουν σε υψηλότερο pH από το *Oenococcus* και συνήθως προκαλούν αλλοιώσεις.

Κατ' αντιστοιχία με την αλκοολική ζύμωση, και στην μηλογαλακτική ζύμωση υπάρχει η δυνατότητα της έναρξης της ζύμωσης με εναρκτήρια καλλιέργεια συγκεκριμένου στελέχους γαλακτικού βακτηρίου (εμβολιασμός) ή να γίνει αυθόρμητα. Στην περίπτωση του εμβολιασμού γίνεται απευθείας προσθήκη μιας υψηλής συγκέντρωσης γαλακτικών βακτηρίων οπότε υπάρχει καλύτερος έλεγχος της έναρξης και της πορείας της μηλογαλακτικής ζύμωσης δεδομένου ότι τα χαρακτηριστικά του στελέχους που έχει επιλεγεί είναι γνωστά. Επίσης, μπορεί να είναι γνωστή η δυνατότητα παραγωγής διακετυλίου με στόχο το καλύτερο αρωματικό αποτέλεσμα. Τέλος, υπάρχει και μικρότερη παραγωγή των βιογενών αμινών. Οι βιογενείς αμίνες προέρχονται από την αποκαρβοξυλίωση κάποιων αμινοξέων, με την βοήθεια ενζύμων που περιέχουν τα γαλακτικά βακτήρια, παράγοντας ισταμίνη, πουτρεσκίνη, καδαβερίνη, ουσίες που προκαλούν αλλεργίες. Παράγονται από τα βακτήρια μιας και είναι μηχανισμός ρύθμισης του pH στο εσωτερικό του κυττάρου και παραγωγής ATP. Στα εμπορικά στελέχη το συγκεκριμένο ένζυμο δεν υπάρχει οπότε και αποφεύγεται η παραγωγή αυτών των ενώσεων. Στα αρνητικά για τον εμβολιασμό θα μπορούσε να αναφερθεί το κόστος και η προετοιμασία της προκαλλιέργειας (πόδι) κάποιων στελεχών των γαλακτικών βακτηρίων.

Μια αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση θα έχει σαν αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έναρξής της με αποτέλεσμα ο οίνος να παραμένει απροστάτευτος για περισσότερο καιρό, δεδομένης και της ευαισθησίας των γαλακτικών βακτηρίων στην χρήση του θειώδους, και να διευκολύνεται η προσβολή από αλλοιογόνους μικροοργανισμούς (*Brettanomyces*). Επιπλέον, δεν είναι γνωστή η έναρξη αλλά και η λήξη της διαδικασίας της ζύμωσης. Το ρίσκο για κάποιο μη επιθυμητό γαλακτικό βακτήριο, ειδικά σε λίγο μεγαλύτερα pH, είναι δεδομένο με παρούσα την πιθανότητα για την παραγωγή οξικού οξέος, ανεπιθύμητων οσμών και μεγάλων ποσοτήτων διακετυλίου (Zeeman et al., 1982; Bartowsky

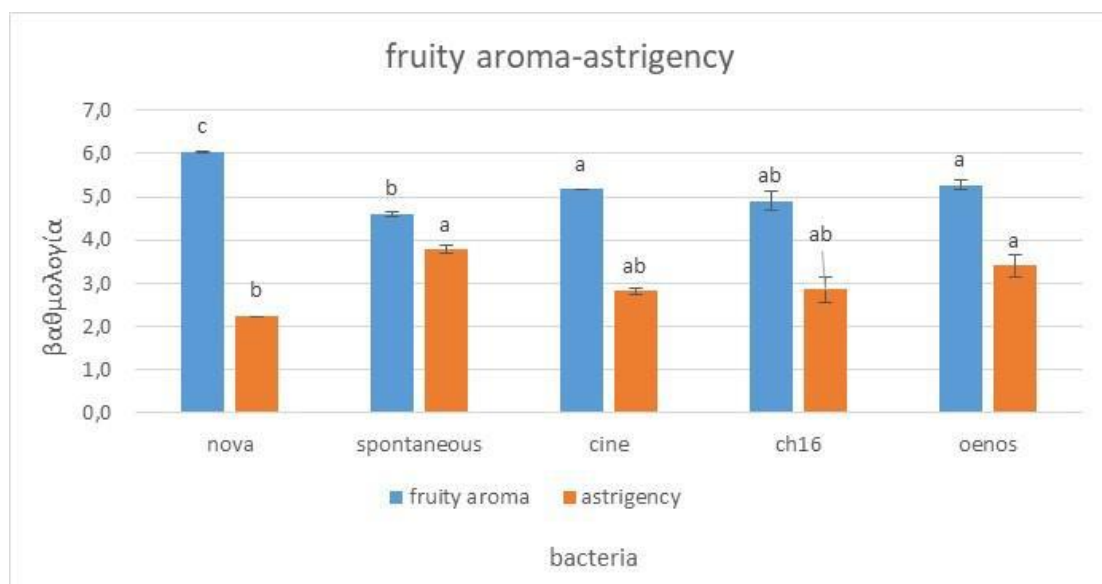
and Henschke, 1995). Τέλος, υπάρχει μεγαλύτερο ρίσκο για την παραγωγή βιογενών αμινών (Fugelsang, 2007).

Στα θετικά της αυθόρμητης ζύμωσης είναι η ανάγκη προσαρμογής των γαλακτικών βακτηρίων στον οίνο υδρολύοντας γλυκοσιλιωμένα παράγωγα με την χρήση ενζύμων β-γλυκοσιδάσης με αποτέλεσμα πιο φρουτώδεις οίνους.

1.6.6. ΣΤΑΔΙΟ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο *Oenococcus oeni* είναι το πιο συνηθισμένο γαλακτικό βακτήριο που χρησιμοποιείται στους οίνους. Λαμβάνοντας υπόψη ότι πρόκειται για ένα ετεροζυμωτικό βακτήριο, η προσθήκη του μπορεί να γίνει είτε στην έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, μια με δύο μέρες μετά την προσθήκη των ζυμών, είτε αμέσως μετά την αλκοολική ζύμωση. Στην πρώτη περίπτωση υπάρχει μια πιο γρήγορη προσαρμογή των γαλακτικών βακτηρίων στους οίνους, δεδομένης της έλλειψης αιθανόλης και της περίσσειας θρεπτικών συστατικών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μια πιο γρήγορη ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης και άρα πιο γρήγορη θείωση και προφύλαξη του οίνου. Το σημαντικό πρόβλημα στην συγκεκριμένη περίπτωση θα ήταν μια διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης, και ειδικά σε υψηλότερα pH, που θα ευνοούσε την παραγωγή οξικού οξέος και D-γαλακτικού οξέος από τον μεταβολισμό των σακχάρων (Fugelsang, 2007).

Στην περίπτωση του εμβολιασμού αμέσως μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης το ρίσκο παραγωγής οξικού οξέος είναι μικρότερο και υπάρχει καλύτερος έλεγχος της μηλογαλακτικής ζύμωσης, αλλά από την άλλη πλευρά η υψηλή συγκέντρωση της αιθανόλης και η έλλειψη θρεπτικών συστατικών μπορεί να οδηγήσει σε επιβράδυνση της διαδικασίας (Fugelsang, 2007).



Εικόνα 16. Επίδραση του στελέχους στο οργανοληπτικό προφίλ ερυθρών οίνων (φρουτώδες άρωμα, στυπτικότητα) (http://dspace.aua.gr/xmlui/bitstream/handle/10329/6543/Papandreou_S.pdf?sequence=3)

Τα τελευταία χρόνια όμως υπάρχει η δυνατότητα να πραγματοποιηθεί η μηλογαλακτική ζύμωση και πριν της έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Είναι μια καινοτομία που επιτυγχάνεται με τα γαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus plantarum*. Πρόκειται για ομοζυμωτικά βακτήρια, πράγμα που σημαίνει ότι δεν παράγουν οξικό οξύ από τον μεταβολισμό των σακχάρων. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι το pH να είναι πάνω από 3,5. Έτσι, ο οίνος μπορεί αμέσως μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης να είναι

έτοιμος για την θείωση και την προστασία από ενδεχόμενη μικροβιακή προσβολή έχοντας πραγματοποιήσει ήδη την μηλογαλακτική ζύμωση. Τέλος, έρευνες έχουν δείξει ότι με αυτόν τον τρόπο ο τελικός οίνος έχει βελτιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, είναι πολύ περισσότερο φρουτώδης (Lucio, 2017).

1.7. ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ

Η ερυθρή ποικιλία “Κοτσιφάλι” κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο στην αμπελοκαλλιέργεια και στην οινοπαραγωγή στην Κρήτη. Η φύτευσή της ενισχύθηκε σημαντικά αμέσως μετά την αναμπέλωση που πραγματοποιήθηκε στο νησί εξαιτίας της φυλλοξήρας.

Καλλιεργείται κυρίως στην κεντρική Κρήτη, κατά πάσα πιθανότητα από τον 13^ο αιώνα, συμμετείχε στην παραγωγή του Μαλβάζιου οίνου και η πρώτη γραπτή αναφορά της ποικιλίας ανήκει στον Τζουάνε Παπαδόπουλο στο Occio, όπου έχει καταγράψει τις αναμνήσεις από την πατρίδα του: «Έβγαζαν ιδίως ένα μαύρο κρασί σαν μελάνι, εύγευστο, όχι γλυκό, που το έπινες σαν γάλα, από ένα είδος σταφυλιού με μεγάλες ρόγες που λεγόταν κοτσυφάλι». Το Κοτσιφάλι είναι σήμερα η κύρια ποικιλία της Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης Αρχάνες, στη ζώνη Χάνδακας – Candia (Έκθεση σχετικά με τις Π.Ο.Π. Χάνδακας – Candia & Malvasia Χάνδακας – Candia, Σταυρούλα Κουράκου).

Ως Kotsifali και Kotsiphali αναφέρεται από τους Viala και Vermorel (1909), ενώ αμπελογραφικά έχει περιγραφεί από τον Κριμπά (1943). Παίρνει το όνομά του από το χρώμα του φλοιού των ραγών ορισμένων βιότυπων, που θυμίζει το κοτσύφι (Turdusmerula). Η καλλιέργεια της συγκεκριμένης ποικιλίας συνίσταται για το αμπελουργικό διαμέρισμα της Κρήτης και επιτρέπεται στο αμπελουργικό διαμέρισμα των Κυκλάδων και στην Ικαρία.

Στην δυτική Κρήτη καλλιεργείται η ποικιλία με το όνομα Κανισκαδιανό, που είναι ταυτόσημη (κλώνος) με την ποικιλία Κοτσιφάλι. Το όνομα «Κανισκαδιανό» προέρχεται από την λέξη «κανίσκι», υποκοριστικό της αρχαίας ελληνικής λέξης «κάνεον» (αβαθές καλάθι). Αποτελεί έθιμο στην Κρήτη, που διατηρείται ακόμα και σήμερα, η προσφορά τροφίμων μέσα στα κανίσκια – αβαθή καλάθια - στα νιόπαντρα ζευγάρια. Ανάμεσα στα τρόφιμα τοποθετούν και σταφύλια από Κοτσιφάλι, τα οποία είναι κατάλληλα και για νωπή κατανάλωση (Κρητική Αμπελογραφία, 2018).

1.7.1. ΑΜΠΕΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η κορυφή νεαρής βλάστησης είναι ανοιχτή και λευκοπράσινη, ενώ τα νεαρά φύλλα είναι ωχροπράσινα με ερυθροχαλκόχρους μεσονεύριες περιοχές, έντονα βαθύκολπα και με νευρώσεις κιτρινοπράσινες. Το ανεπτυγμένο φύλλο είναι μέτριο έως μεγάλο, κυκλικό έως πενταγωνικό, συμμετρικό, κυρίως πεντάκολπο. Οι ανώτεροι κόλποι είναι μεγάλου βάθους σχήματος U, ενώ οι κατώτεροι κόλποι είναι μετρίου βάθους σχήματος U. Οι νευρώσεις είναι πράσινες με ερυθρωπή βάση, ενώ το έλασμα μετρίως παχύ, βαθυπράσινο με την περιφέρεια στραμμένη προς τα πάνω. Τέλος, ο μίσχος είναι πράσινος με ερυθρές ραβδώσεις, βραχύς έως μέτριος, λείος και κατά τόπους αραχνοϋφής.

Οι έλικες είναι διαλείπουσες, δισχιδείς, πρασινέρυθρες, μικρές έως μέτριες, λεπτές, λείες και κατά τόπους αραχνοϋφείς. Η σταφυλή είναι μέτρια, κωνική, πυκνή με ισομεγέθεις ράγες. Ποδίσκος παχύς, βραχύς, πράσινος, δυσχερούς αποκοπής. Ράγα μικρή έως μέτρια, σχεδόν ελλειψοειδής. Φλοιός μετρίου πάχους, ερυθρομέλανος, με άφθονη ανθηρότητα. Σάρκα μαλακή, άχρωμη, γλυκιά, ελαφρώς

υπόξινη, εύγεστη, χυμώδης. Τέλος, τα γίγαρτα είναι από 1 έως 3, συνήθως 2 σε κάθε ράγα, μέτρια και απιοειδή (Αμπελογραφία, 2010).

1.7.2. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Πρόκειται για μια ποικιλία ζωηρή, παραγωγική, μεσοόψιμης εποχής εκβλάστησης των λανθανόντων οφθαλμών, μεσοπρώιμης ωρίμανσης των σταφυλιών. Ο καρποφόρος βλαστός φέρει δύο, σπανιότερα τρεις, σταφυλές από τον 3^ο έως τον 5^ο κόμβο, Ο τυφλός και οι ταχυφυείς οφθαλμοί είναι γόνιμοι. Τα πρέμνα συνήθως μορφώνονται είτε σε χαμηλά κύπελλα με 5 έως 7 βραχίονες και βραχύ κλάδεμα καρποφορίας, είτε σε αμφίπλευρα γραμμικά με βραχύ κλάδεμα καρποφορίας. Προτιμά τα γόνιμα και βαθιά εδάφη, ενώ έχει και καλή συμπεριφορά στο υδατικό στρες. Έχει υψηλή γονιμότητα οφθαλμών, αλλά παρουσιάζει και ευαισθησίες στην έλλειψη βορίου. Παρουσιάζει σχετική αντοχή στον περονόσπορο, ευαισθησία στο ωίδιο, την ερίνωση, τον βοτρυτή και στις ιώσεις (μολυσματικός εκφυλισμός). Χαρακτηριστικό της είναι οι λίγες ανθοκυάνες που περιέχονται μόνο στον φλοιό της ράγας, οι μαλακές τανίνες και το υψηλό αλκοόλ της. Το αρωματικό της προφίλ θυμίζει άνθη, κανέλλα, μέντα και κόκκινα φρούτα και χρειάζεται δροσερές νύχτες για την ενίσχυση αυτού. Συνοινοποιείται με την ποικιλία Μανδηλαριά και παράγονται οίνοι ΠΟΠ (Πεζά και Αρχάνες). Συμμετέχει, τέλος, στην παραγωγή ΠΓΕ οίνων Κρήτη, Λασιθι, Ηράκλειο και Ρέθυμνο (Αμπελογραφία, 2010).



Εικόνα 17. ΣΤΑΦΥΛΙ ΑΠΟ ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ (ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΑΡΧΕΙΟ)

1.8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, τόσο πριν όσο και μετά την αλκοολική ζύμωση, με την χρήση διάφορων γαλακτικών βακτηρίων που μπορούν να προσδώσουν διαφορετικά χαρακτηριστικά στους τελικούς οίνους. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η ερυθρή κρητική ποικιλία «Κοτσιφάλι».

Θα πραγματοποιηθούν βασικές αναλύσεις στο γλεύκος πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, όπως μέτρηση σακχάρων, μέτρηση μηλικού οξέος και γαλακτικού οξέος, μέτρηση ολικής οξύτητας και μέτρηση ενεργούς οξύτητας. Στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης και πριν τον εμβολιασμό με συγκεκριμένα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων θα γίνουν αναλύσεις για την μέτρηση του ολικού αλκοολικού τίτλου, του γαλακτικού οξέος και του μηλικού οξέος, της ολικής και ενεργής οξύτητας, του δείκτη φαινολικών ουσιών, της έντασης, της απόχρωσης και της πτητικής οξύτητας. Επίσης, μετά τον εμβολιασμό με τα συγκεκριμένα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων θα γίνει η παρακολούθηση της εξέλιξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Τέλος, θα πραγματοποιηθεί και η οργανοληπτική αξιολόγηση των τελικών οίνων από το πάνελ του εργαστηρίου Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στόχος είναι η διερεύνηση των οργανοληπτικών διαφορών στους τελικούς οίνους και η συσχέτισή τους με τα χαρακτηριστικά των γαλακτικών βακτηρίων που θα χρησιμοποιηθούν.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη είναι της εταιρείας Chr - Hansen και σύμφωνα με τον προμηθευτή έχουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά και πρέπει να χειρίζονται ως εξής(<https://www.chr-hansen.com/en>):

- *Viniflora Nova*: Πρόκειται για στέλεχος του *Lactobacillus plantarum* και χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Εμβολιάζεται στο γλεύκος 24 με 48 ώρες πριν τον εμβολιασμό του ζυμομύκητα. Είναι ομοζυμωτικό γαλακτικό βακτήριο, άρα δεν μπορεί να παραχθεί οξικό οξύ από την κατανάλωση των σακχάρων. Με την χρήση του *Viniflora Nova* έχει παρατηρηθεί μια αύξηση στην έκφραση των αρωμάτων από κόκκινα και μαύρα φρούτα.
- *Viniflora CH16*: Πρόκειται για στέλεχος του *Oenococcus oeni*. Έχει επιλεγεί γιατί είναι πολύ ανθεκτικό στην αιθανόλη, ενώ παράλληλα μπορεί να δώσει και μια σημαντική ποσότητα διακετυλίου (αρώματα βουτύρου). Χρησιμοποιείται ευρέως σε ζεστά κλίματα, που η αιθανόλη συνήθως είναι σε υψηλότερα επίπεδα, και μπορεί να δώσει καλά αποτελέσματα με τις περισσότερες ποικιλίες.
- *Viniflora CH11*: Πρόκειται για στέλεχος του *Oenococcus oeni*. Έχει επιλεγεί γιατί είναι ανθεκτικό σε χαμηλό pH και σε χαμηλή θερμοκρασία. Παράγει χαμηλή ποσότητα διακετυλίου, πράγμα που σημαίνει ότι είναι κατάλληλο και για λευκούς οίνους. Σε υψηλότερα pH ή/και υψηλότερες θερμοκρασίες ολοκληρώνει την μηλογαλακτική ζύμωση σε μικρότερο χρονικό διάστημα.
- *Viniflora Cine*: Πρόκειται για στέλεχος του *Oenococcus oeni*. Δεν περιέχει το ένζυμο το οποίο είναι απαραίτητο για τον μεταβολισμό του κιτρικού οξέος από το γαλακτικό βακτήριο, με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται η παραγωγή διακετυλίου. Είναι ένα ιδανικό γαλακτικό βακτήριο για την εξέλιξη και ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε λευκούς και ροζέ οίνους χωρίς την παραγωγή του χαρακτηριστικού αρώματος βουτύρου. Έτσι, διατηρείται καλύτερα το φρέσκο και φρουτώδες άρωμα του οίνου.

2.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ – ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

Σταφύλια ποικιλίας Κοτσιφάλι τρυγήθηκαν από την θέση «Σκουτάλια» στην περιοχή των Πεζών της Π.Ε. Ηρακλείου στις 17/09/2021. Ο συγκεκριμένος αμπελώνας ενός στρέμματος είναι ηλικίας 35 χρόνων, έχει σύστημα μόρφωσης αμφίπλευρο γραμμικό, δεν είναι αρδευόμενος και έχει στρεμματική απόδοση 700kg. Τα σταφύλια, τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν εξ' ολοκλήρου για τις ανάγκες του πειράματος, μεταφέρθηκαν με φορτηγό - ψυγείο στο οινοποιείο «Κλάδος» στο Πάνορμο της Π.Ε. Ρεθύμνης μέσα σε τελάρα 20 κιλών και οινοποιήθηκαν την ίδια ημέρα. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα ερυθρής οινοποίησης, τα οποία ουσιαστικά διαφέρουν στον τρόπο και χρόνο εξέλιξης και ολοκλήρωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Αρχικά, τα σταφύλια σπάνε και γίνονται σταφυλοπολτός με την χρήση ενός σπαστήρα – εκραγιστήρα και μεταφέρονται σε δεξαμενή χωρίς τους βόστρυχες. Εκεί γίνεται μια ανακύκλωση για την καλύτερη ομογενοποίηση του σταφυλοπολτού και πραγματοποιείται η πρώτη δειγματοληψία για την μέτρηση

σακχάρων, την μέτρηση του μηλικού οξέος και του γαλακτικού οξέος, την μέτρηση της ολικής οξύτητας και την μέτρηση της ενεργούς οξύτητας. Κατά την διάρκεια της ανακύκλωσης πραγματοποιούνται προσθήκες με εκχυλιστικά ένζυμα Safizym Color 40g/tn, με πολυσακχαρίτες Springcell Color 150g/tn για την σταθεροποίηση του χρώματος και με οργανικό άζωτο (Springferm extrem 200g/tn) για την θρέψη του ζυμομύκητα με τη μορφή αυτολυμένων κυττάρων ζύμης. Στην συνέχεια, μετά από περίπου 1 ώρα ο σταφυλοπολτός διαχωρίζεται σε 4 δεξαμενές των 200 λίτρων (2 δεξαμενές για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης – NOVA 1 και NOVA 2 - και 2 δεξαμενές για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης αμέσως μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης). Στην κάθε δεξαμενή τοποθετούνται 120 κιλά σταφυλοπολτού.

Για τις 2 δεξαμενές - NOVA 1 και NOVA 2 –πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με τα γαλακτικά βακτήρια *Viniflora Nona* αμέσως μετά τον διαχωρισμό στις επιμέρους δεξαμενές. Η δοσολογία ήταν σε τριπλάσια συγκέντρωση από την συνιστώμενη και η θερμοκρασία στους 22°C. Τα προζυγισμένα βακτήρια διασπείρονται σε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού κι ενσωματώνονται άμεσα στον σταφυλοπολτό με ήπια ανάδευση. Τα βακτήρια αφήνονται προς δράση για 60 ώρες με περιοδικές αναδεύσεις 2 φορές την ημέρα και παράλληλη δειγματοληψία για έλεγχο της ΜΓΖ. Γίνεται δειγματοληψία κάθε 12 ώρες και οι αναλύσεις αφορούν την μέτρηση του μηλικού και γαλακτικού οξέος και της ολικής και ενεργούς οξύτητας. Η έναρξη και η εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, η οποία ελέγχεται με την μέτρηση του μηλικού και του γαλακτικού οξέος, γίνεται με την χρήση του ενζυμικού αναλυτή Midray BS-240Pro.

Μετά το πέρας των 60 ωρών από τον εμβολιασμό των γαλακτικών βακτηρίων, έγινε προσθήκη του εμπορικού παρασκευάσματος ζυμομύκητα SafOeno NDA 21 (Fermentis), σε συγκέντρωση 200g/tn, για την ολοκλήρωση και της αλκοολικής ζύμωσης. Πραγματοποιείται 2 φορές την ημέρα εμβάπτιση για την ανάδευση των στεμφύλων στο γλεύκος (καπέλο) με σκοπό την καλύτερη εκχύλιση των φαινολικών συστατικών και την χορήγηση επαρκούς ποσότητας οξυγόνου στη ζύμωση. Η θερμοκρασία διατηρείται σταθερά στους 22°C και καθημερινά παρακολουθείται η πτώση της σακχαροπεριεκτικότητας με πυκνομετρία (Baume). Μόλις καταναλώθηκε το 1/3 των σακχάρων έγινε και η 2^η προσθήκη θρεπτικών, τόσο οργανικού όσο και ανόργανου αζώτου. Χρησιμοποιήθηκαν 100g/tn Springferm και 100g/tn DAP. Η παρακολούθηση της ζύμωσης συνεχίστηκε μέχρι τον μηδενισμό των σακχάρων στην κλίμακα Baume και στην συνέχεια η πυκνότητα να φτάσει κάτω από 0,995. Τότε πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των στεμφύλων από τον οίνο. Ο οίνος μεταφέρθηκε σε 4 δεξαμενές των 10 λίτρων, όπου και πραγματοποιήθηκε η πρώτη θείωση.

Στην περίπτωση της έναρξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, ο εμβολιασμός με το εμπορικό παρασκεύασμα ζυμομύκητα SafOeno NDA 21 πραγματοποιήθηκε 12 ώρες μετά το σπάσιμο και τον διαχωρισμό του σταφυλοπολτού. Χρησιμοποιήθηκαν 200g/tn από τον συγκεκριμένο ζυμομύκητα. Η έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης παρατηρήθηκε μετά 24 ώρες περίπου, ενώ η λήξη της μετά από 10 ημέρες. Η θερμοκρασία ζύμωσης ήταν σταθερά στους 22°C. Σε γενικές γραμμές ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία στην εμβάπτιση των στεμφύλων, στην θρέψη και στην μέτρηση των σακχάρων με την κλίμακα Baume, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης έγινε ο οίνος διαχωρίστηκε από τα στέμφυλα και μεταφέρθηκε σε 10 δεξαμενές των 10 λίτρων. Στις 2 δεξαμενές προστέθηκε θειώδες αμέσως για την παρεμπόδιση της έναρξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Σε 2 επόμενες η μηλογαλακτική ζύμωση έγινε αυθόρμητα, από γηγενή γαλακτικά βακτήρια, ενώ στις υπόλοιπες 6 δεξαμενές εμβολιάστηκαν τα 3 γαλακτικά βακτήρια (CH16,

CH11, CINE). Η έναρξη και η εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, η οποία ελέγχεται με την μέτρηση του μηλικού και του γαλακτικού οξέος, γίνεται με την χρήση του ενζυμικού αναλυτή Midray BS-240Pro. Στο τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης προστέθηκε θειώδες σε όλες τις δεξαμενές.

Οι οίνοι οι οποίοι παρήχθησαν πήραν το όνομά τους από το γαλακτικό βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε για την μηλογαλακτική ζύμωση. Στον παρακάτω πίνακα 2 φαίνονται οι κωδικοί των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στις επόμενες ενότητες της διατριβής. Όπου 1 και 2 οι βιολογικές επαναλήψεις των επεμβάσεων.

Πίνακας 2. Επεμβάσεις με γαλακτικά βακτήρια πριν και μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Κωδικοποίηση δειγμάτων.

ΧΡΟΝΟΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
Πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης	NOVA 1 / NOVA 2
Μετά την αλκοολική ζύμωση	
Χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση	MART 1 / MART 2
Αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση	AYΘ 1 / AYΘ 2
Προσθήκη στελέχους γαλακτικού βακτηρίου	CINE 1 / CINE 2
Προσθήκη στελέχους γαλακτικού βακτηρίου	CH11 1 / CH11 2
Προσθήκη στελέχους γαλακτικού βακτηρίου	CH16 1 / CH16 2

2.3. ΠΡΟΖΥΜΩΤΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ - ΡΥΘΜΙΣΕΙΣ

Στην πρώτη ύλη (σταφύλια) έγιναν οι ακόλουθες μετρήσεις:

2.3.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΑΡΑΙΟΜΕΤΡΙΑ

Τα σάκχαρα αποτελούν το βασικότερο συστατικό (12–30 %) του γλεύκους, συντίθενται και συσσωρεύονται στις ράγες όσο προχωρεί η ωρίμανση του καρπού, άρα ο προσδιορισμός τους είναι ένδειξη ωριμότητας του καρπού για συγκομιδή αλλά και της οινικής του ποιότητας. Προσδιορίζονται τόσο με χημικές όσο και με φυσικές μεθόδους. Η αραιομετρία, που είναι μια φυσική μέθοδος, δεν χαρακτηρίζεται από μεγάλη ακρίβεια αλλά είναι εύκολη και γρήγορη. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το αραιόμετρο Baume. Είναι αυθαίρετα βαθμονομημένο στους 20°C. Ένας βαθμός Baume ισούται περίπου με 1.8 g σακχάρου ανά 100 g γλεύκους. Επίσημα δεν γίνεται αποδεκτό αλλά χρησιμοποιείται ευρύτατα γιατί οι βαθμοί του είναι περίπου οι αλκοολικοί βαθμοί του οίνου που θα προκύψει όταν ζυμωθεί το γλεύκος (δυναμικός αλκοολικός τίτλος), κυρίως για την περιοχή 10-11 °Be.

Για να γίνει ο προσδιορισμός, μια ποσότητα γλεύκους διηθείται για να απομακρυνθούν τυχόν στερεά και στην συνέχεια, 200 mL περίπου από το διήθημα, μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο 250 mL υπό γωνία 45° προς αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων. Ο κύλινδρος τοποθετείται κατακόρυφα και βυθίζεται σε αυτόν το αραιόμετρο. Αφού αυτό ισορροπήσει, λαμβάνεται η ένδειξη (ανάγνωση κάτω μέρος μηνίσκου). Ταυτόχρονα βυθίζεται το θερμόμετρο και λαμβάνεται η ένδειξη της θερμοκρασίας του γλεύκους. Με την χρήση ειδικών πινάκων γίνεται διόρθωση των βαθμών Be στην θερμοκρασία του γλεύκους και ακολούθως μετατροπή των βαθμών Be σε $g_{\text{σακχάρων}}/L_{\text{γλεύκους}}$ ή σε δυναμικό αλκοολικό τίτλο.

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επίσης και για την παρακολούθηση της εξέλιξης της αλκοολικής ζύμωσης.

2.3.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ

Το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται στο γλεύκος και στον οίνο, είτε σε μοριακή κατάσταση είτε σε μορφή ανιόντων, αποτελεί την ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα. Εξαρτάται από την περιεκτικότητα του γλεύκους ή του οίνου σε οργανικά οξέα, χωρίς να έχει σημασία το είδος τους. Ο προσδιορισμός της στηρίζεται στην εξουδετέρωση των όξινων ομάδων του δείγματος με πρότυπο διάλυμα αλκάλειως παρουσία του δείκτη μπλε της βρωμοθυμόλης.

Σε 10 mL δείγμα, που προηγουμένως αφαιρέθηκε το διοξείδιο του άνθρακα, προστέθηκαν μερικές σταγόνες διαλύματος μπλε της βρωμοθυμόλης και περίπου 30 mL απεσταγμένου νερού. Το μίγμα τιτλοδοτείται με 0.1 N NaOH μέχρι την αλλαγή του χρώματος σε κυανοπράσινο. Η κατανάλωση καταγράφεται. Η ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο (g/L) δίνεται από τον τύπο $A = 0.75 \cdot n$ με ένα δεκαδικό ψηφίο.

2.3.3. ΜΕΤΡΗΣΗ pH

Ενεργή οξύτητα ή pH είναι το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που είναι σε διάσταση και δίνουν H^+ . Εξαρτάται τόσο από την συγκέντρωση όσο και από το είδος των οργανικών οξέων, εξαιτίας του διαφορετικού βαθμού διάστασης των ελεύθερων καρβοξυλομάδων.

Για την μέτρηση χρησιμοποιήθηκε pHμετρο αφού πρώτα βαθμονομήθηκε με ρυθμιστικά διαλύματα pH 4 και 7. Κατόπιν σε ένα ποτήρι ζέσεως, τοποθετήθηκε επαρκής ποσότητα δείγματος έτσι ώστε το ηλεκτρόδιο να είναι εμβαπτισμένο και να μην ακουμπάει στα τοιχώματα του ποτηριού ή στον μαγνήτη. Η θερμοκρασία του δείγματος ήταν μεταξύ 20-25 °C. Όταν η τιμή σταθεροποιήθηκε, σημειώθηκε η μέτρηση. Λήφθηκαν δύο μετρήσεις από το ίδιο δείγμα και καταγράφηκε ο μέσος όρος με δύο δεκαδικά ψηφία.

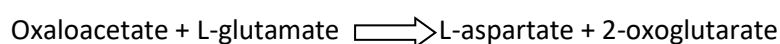
2.4. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

A. Για τον προσδιορισμό του L-μηλικού οξέος και του L-γαλακτικού οξέος χρησιμοποιήθηκε ενζυμική μέθοδος. Ο αναλυτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Midray BS-240Pro.

Η αρχή της μεθόδου για τον προσδιορισμό του L-μηλικού οξέος στηρίζεται στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο οξύ στο δείγμα παράγει NADH, το οποίο μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτόμετρο στα 340nm. Το NAD^+ είναι το συνένζυμο και η αντίδραση καταλύεται από την L-μηλική αφυδρογονάση. Σαν ενδιάμεσο προϊόν είναι το οξαλοξικό.



Στην συνέχεια το οξαλοξικό μετατρέπεται σε ασπαραγινικό παρουσία γλουταμινικού, ενώ η αντίδραση καταλύεται από γλουταμινική – οξαλοξική τρανσαμινάση (GOT).



Ο απαραίτητος εξοπλισμός είναι ένα φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα μέτρησης απορρόφησης στα 340nm και κυψελίδες υάλου με οπτική διαδρομή 1cm. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι:

- Αντιδραστήριο A1: 60mmol/L-μηλική αφυδρογονάση, 0,62mol/L-γλουταμινικό
- Αντιδραστήριο A2: 0,62mol/LGOT
- Αντιδραστήριο B:NAD⁺ 35mmol/L

Για την εξέλιξη του πειράματος είναι απαραίτητη η ανάμιξη του αντιδραστηρίου A1 και του αντιδραστηρίου A2 σε αναλογία 3:1.

Ο παρακάτω πίνακας 3 δείχνει την πορεία της μεθόδου:

Πίνακας 3. Μεθοδολογία για την μέτρηση του L-μηλικού οξέος

	Τυφλό Αντιδραστήριο	Δείγμα
Δείγμα	-	10μL
Απιονισμένο νερό	10μL	-
Αντιδραστήριο A	600μL	600μL
Αντιδραστήριο B	200μL	200μL

Τόσο η απορρόφηση για το δείγμα (A1) όσο και για το τυφλό (A2) μετريέται στα 340nm.

Το τελικό αποτέλεσμα υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\left((A2 - 0,8 \times A1)_{\text{Sample}} - (A2 - 0,8 \times A1)_{\text{RB}} \right) / \left((A2 - 0,8 \times A1)_{\text{Standard}} - (A2 - 0,8 \times A1)_{\text{RB}} \right) \times C_{\text{Standard}} \text{ (g/L)} = C_{\text{Sample}} \text{ (g/L)}$$

Β.Ο υπολογισμός του L-γαλακτικού οξέος στηρίζεται στην αρχή ότι το συγκεκριμένο οξύ στο δείγμα παράγει NADH, το οποίο υπολογίζεται σε φασματοφωτόμετρο στα 340nm. Η αντίδραση είναι:



Ο απαραίτητος εξοπλισμός είναι ένα φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα μέτρησης απορρόφησης στα 340nm και κυψελίδες υάλου με οπτική διαδρομή 1cm. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι:

- Αντιδραστήριο A:L-γαλακτική αφυδρογονάση 0,62 mol/L
- Αντιδραστήριο B:NAD⁺ 25 mmol/L

Πίνακας 4. Μεθοδολογία για την μέτρηση του L-μηλικού οξέος

	Τυφλό Αντιδραστήριο	Δείγμα
Δείγμα	-	10μL
Απιονισμένο νερό	10μL	-
Αντιδραστήριο A	800μL	800μL
Αντιδραστήριο B	200μL	200μL

Τόσο η απορρόφηση για το δείγμα (A1) όσο και για το τυφλό (A2) μετريέται στα 340nm.

Το τελικό αποτέλεσμα υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\left((A2 - 0,8 \times A1)_{\text{Sample}} - (A2 - 0,8 \times A1)_{\text{RB}} \right) / \left((A2 - 0,8 \times A1)_{\text{Standard}} - (A2 - 0,8 \times A1)_{\text{RB}} \right) \times C_{\text{Standard}} \text{ (g/L)} = C_{\text{Sample}} \text{ (g/L)}$$

2.5. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΟΙΝΩΝ

Στους οίνους που προέκυψαν από τις επεμβάσεις εφαρμόστηκαν οι ακόλουθες μέθοδοι. Όπου δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά, οι μέθοδοι ανήκουν στις Επίσημες ή Συνήθειες μεθόδους του ΟΙΒ.

2.5.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ

Η αιθυλική αλκοόλη των οίνων παράγεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης των σακχάρων του γλεύκους. Μετά το νερό, η αλκοόλη βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία στον οίνο. Η μέτρηση της περιεκτικότητας ενός οίνου σε αλκοόλη στηρίζεται στο Gay-Lussac και γίνεται με απόσταξη-πυκνομετρία. Σύμφωνα με τον ΟΙΒ « Αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο ενός οινικού προϊόντος ονομάζεται ο αριθμός των λίτρων της άνυδρης αιθανόλης που περιέχεται σε 100 λίτρα του προϊόντος αυτού, όταν οι δύο όγκοι μετριοούνται σε θερμοκρασία 20°C. Συμβολίζεται ως % vol. Ο προσδιορισμός της στηρίζεται στην απόσταξη της αιθανόλης του οίνου. Στην συνέχεια, το απόσταγμα μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο όπου με το κατάλληλο αλκοολόμετρο λαμβάνεται η ένδειξη και συγχρόνως μέτρηση θερμοκρασίας, η οποία πρέπει να είναι ίδια με την θερμοκρασία του αρχικού οίνου προς απόσταξη. Τέλος, ο φαινομενικός τίτλος διορθώνεται ως προς την θερμοκρασία με την βοήθεια του πίνακα 5:

Πίνακας 5. Αναγωγή του φαινομενικού αλκοολικού τίτλου αποστάγματος οίνου στην θερμοκρασία αναφοράς (20 °C)

		Φαινομενικός αλκοολικός τίτλος																	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Θερμοκρασία (°C)	Προσθήκη	0	0,76	0,77	0,82	0,87	0,95	1,04	1,16	1,31	1,49	1,70	1,95	2,26	2,62	3,03	3,49	4,02	4,56
		1	0,81	0,83	0,87	0,92	1,00	1,09	1,20	1,35	1,52	1,73	1,97	2,26	2,59	2,97	3,40	3,87	4,36
		2	0,85	0,87	0,92	0,97	1,04	1,13	1,24	1,38	1,54	1,74	1,97	2,24	2,54	2,89	3,29	3,72	4,17
		3	0,88	0,91	0,95	1,00	1,07	1,15	1,26	1,39	1,55	1,73	1,95	2,20	2,48	2,80	3,16	3,55	3,95
		4	0,90	0,92	0,97	1,02	1,09	1,17	1,27	1,40	1,55	1,72	1,92	2,15	2,41	2,71	3,03	3,38	3,75
		5	0,91	0,93	0,98	1,03	1,10	1,17	1,27	1,39	1,53	1,69	1,87	2,08	2,33	2,60	2,89	3,21	3,54
		6	0,92	0,94	0,98	1,02	1,09	1,16	1,25	1,37	1,50	1,65	1,82	2,01	2,23	2,47	2,74	3,02	3,32
		7	0,91	0,93	0,97	1,01	1,07	1,14	1,23	1,33	1,45	1,59	1,75	1,92	2,12	2,34	2,58	2,83	3,10
		8	0,89	0,91	0,94	0,98	1,04	1,11	1,19	1,28	1,39	1,52	1,66	1,82	2,00	2,20	2,42	2,65	2,88
		9	0,86	0,88	0,91	0,95	1,01	1,07	1,14	1,23	1,33	1,44	1,57	1,71	1,87	2,05	2,24	2,44	2,65
		10	0,82	0,84	0,87	0,91	0,96	1,01	1,08	1,16	1,25	1,35	1,47	1,60	1,74	1,89	2,06	2,24	2,43
		11	0,78	0,79	0,82	0,86	0,90	0,95	1,01	1,08	1,16	1,25	1,36	1,47	1,60	1,73	1,88	2,03	2,20
		12	0,72	0,74	0,76	0,79	0,83	0,88	0,93	0,99	1,07	1,15	1,24	1,34	1,44	1,56	1,69	1,82	1,96
		13	0,66	0,67	0,69	0,72	0,76	0,80	0,84	0,90	0,96	1,03	1,11	1,19	1,28	1,38	1,49	1,61	1,73
		14	0,59	0,60	0,62	0,64	0,67	0,71	0,74	0,79	0,85	0,91	0,97	1,04	1,12	1,20	1,29	1,39	1,49
		15	0,51	0,52	0,53	0,55	0,58	0,61	0,64	0,68	0,73	0,77	0,83	0,89	0,95	1,02	1,09	1,16	1,24
		16	0,42	0,43	0,44	0,46	0,48	0,50	0,53	0,56	0,60	0,63	0,67	0,72	0,77	0,82	0,88	0,94	1,00
		17	0,33	0,33	0,34	0,35	0,37	0,39	0,41	0,43	0,46	0,48	0,51	0,55	0,59	0,62	0,67	0,71	0,75
		18	0,23	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,29	0,31	0,33	0,35	0,37	0,40	0,42	0,45	0,48	0,51
19	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,20	0,21	0,23	0,24	0,25		
Θερμοκρασία (°C)	Αφαίρεση	21		0,13	0,13	0,14	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,20	0,22	0,23	0,25	0,25	0,26	
		22		0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,39	0,41	0,44	0,47	0,49	0,52
		23		0,40	0,41	0,42	0,44	0,45	0,47	0,49	0,51	0,54	0,57	0,60	0,63	0,66	0,70	0,74	0,78
		24		0,55	0,56	0,58	0,60	0,62	0,64	0,67	0,70	0,73	0,77	0,81	0,85	0,89	0,94	0,99	1,04
		25		0,69	0,71	0,73	0,76	0,79	0,82	0,85	0,89	0,93	0,97	1,02	1,07	1,13	1,19	1,25	1,31
		26		0,85	0,87	0,90	0,93	0,96	1,00	1,04	1,08	1,13	1,18	1,24	1,30	1,36	1,43	1,50	1,57
		27			1,03	1,07	1,11	1,15	1,19	1,23	1,28	1,34	1,40	1,46	1,53	1,60	1,68	1,76	1,84
		28			1,21	1,25	1,29	1,33	1,38	1,43	1,49	1,55	1,62	1,69	1,77	1,85	1,93	2,02	2,11
		29			1,39	1,43	1,47	1,52	1,58	1,63	1,70	1,76	1,84	1,92	2,01	2,10	2,19	2,29	2,39
		30			1,57	1,61	1,66	1,72	1,78	1,84	1,91	1,98	2,07	2,15	2,25	2,35	2,45	2,56	2,67
		31			1,75	1,80	1,86	1,92	1,98	2,05	2,13	2,21	2,30	2,39	2,49	2,60	2,71	2,83	2,94
		32			1,94	2,00	2,06	2,13	2,20	2,27	2,35	2,44	2,53	2,63	2,74	2,86	2,97	3,09	3,22
		33				2,20	2,27	2,34	2,42	2,50	2,58	2,67	2,77	2,88	2,99	3,12	3,24	3,37	3,51
		34				2,41	2,48	2,56	2,64	2,72	2,81	2,91	3,02	3,13	3,25	3,38	3,51	3,65	3,79
		35				2,62	2,70	2,78	2,86	2,95	3,05	3,16	3,27	3,39	3,51	3,64	3,78	3,93	4,08
		36				2,83	2,91	3,00	3,09	3,19	3,29	3,41	3,53	3,65	3,78	3,91	4,05	4,21	4,37
		37					3,13	3,23	3,33	3,43	3,54	3,65	3,78	3,91	4,04	4,18	4,33	4,49	4,65
		38					3,36	3,47	3,57	3,68	3,79	3,91	4,03	4,17	4,31	4,46	4,61	4,77	4,94
		39					3,59	3,70	3,81	3,93	4,05	4,17	4,30	4,44	4,58	4,74	4,90	5,06	5,23
40					3,82	3,94	4,06	4,18	4,31	4,44	4,57	4,71	4,86	5,02	5,19	5,36	5,53		

2.5.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΗΣ – ΕΝΕΡΓΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ

Το γλεύκος και ο οίνος είναι διαλύματα με όξινη αντίδραση και γεύση λόγω των οργανικών οξέων. Τα κυριότερα οξέα είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό και δημιουργούνται ήδη από το σταφύλι. Κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης δημιουργούνται νέα οξέα, ενώ παρατηρείται μια ποσοτική μεταβολή στα ήδη υπάρχοντα. Η ύπαρξή τους επηρεάζει τον οίνο τόσο γευστικά, όσο και μικροβιολογικά και πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού αναφέρθηκαν παραπάνω.

2.5.3. ΠΤΗΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ

Τα οξέα της αλειφατικής σειράς με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα έχουν δυσμενή επίδραση στην ποιότητα του οίνου προσδίδοντάς του άσχημη οσμή και γεύση. Τα κύρια οξέα αυτής της σειράς είναι το οξικό, το βουτυρικό, το μυρμηκικό και το προπιονικό. Ονομάζονται πτητικά γιατί ανιχνεύονται οργανοληπτικά και λαμβάνονται με απόσταξη. Η οξύτητα που λαμβάνεται ονομάζεται πτητική. Κατά την επίσημη μέθοδο της Ε.Ε. η πτητική οξύτητα αποτελείται από τα οξέα της σειράς του οξικού οξέος που απαντούν στους οίνους ελεύθερα ή με μορφή αλάτων. Το επικρατέστερο είναι το οξικό οξύ και για αυτό εκφράζεται σε γραμμάρια οξικού οξέος ανά λίτρο. Ο προσδιορισμός της πτητικής γίνεται με τιτλοδότηση των αντίστοιχων οξέων που διαχωρίζονται με απόσταξη μεθ' υδρατμών και ανακαθαρισμό των ατμών από τον οίνο. Η οξύτητα που οφείλεται στο θειώδες και στο σορβικό οξύ πρέπει να αφαιρείται από το αποτέλεσμα. Η πτητική οξύτητα με νομοθετική ρύθμιση δεν μπορεί να είναι πάνω από 1,08g_{οξικού οξέος}/l για λευκούς και ροζέ οίνους και πάνω από 1,2g/l για τους ερυθρούς.

Σε 20 mL δείγματος που απομακρύνθηκε το CO₂ γίνεται απόσταξη μεθ' υδρατμών και συλλογή 250 mL αποστάγματος. Το απόσταγμα ογκομετρήθηκε με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0.1 M με δείκτη διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης. Έστω n ο αριθμός των καταναλωθέντων mL. Προστέθηκαν τέσσερις σταγόνες αραιωμένου HCl 1/4, 2 mL διαλύματος αμύλου και μερικοί κρύσταλλοι KI. Το ελεύθερο SO₂ ογκομετρήθηκε με διάλυμα 0.005 M ιωδίου. Έστω n' ο αριθμός των καταναλωθέντων mL. Η πτητική οξύτητα δίνεται από τον τύπο $A = 0,300 (n - 0.1 n')$ κι εκφράζεται σε g οξικού οξέος ανά λίτρο με δύο δεκαδικά ψηφία.

2.5.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ

Το χρώμα των οίνων είναι αποτέλεσμα της απορρόφησης ορισμένων ακτινοβολιών του ηλιακού φάσματος και οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις. Οι ερυθροί οίνοι παρουσιάζουν μέγιστο στα 520 nm και στους νεαρούς ερυθρούς οίνους οφείλεται στο κόκκινο χρώμα των ελεύθερων ανθοκυανών. Κατά την διάρκεια της παλαίωσης, όπου επικρατούν οι διάφορες μορφές τανινών, αυξάνεται η απορρόφηση στα 420 nm, δηλαδή το κίτρινο χρώμα, με ταυτόχρονη μείωση στα 520 nm. Επιπλέον, σε νέους ερυθρούς οίνους υπάρχει και η απορρόφηση στα 620 nm, δηλαδή μπλε χρώμα, η οποία καλύπτει τα βαθιά χρώματα που μπορεί να έχουν. Στους λευκούς οίνους η σημαντικότερη απορρόφηση είναι στα 420 nm και δείχνει τον βαθμό οξειδωσής τους. Το χρώμα, βάσει των μεθόδων του OIV, μπορεί να περιγραφεί με δύο μεγέθη, την ένταση και την απόχρωση.

2.5.4.1. ΕΝΤΑΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ (E)

Είναι το αριθμητικό σύνολο των απορροφήσεων στα 420, 520 και 620 nm και δίνεται από τον τύπο $E = A_{420} + A_{520} + A_{620}$

2.5.4.2. ΑΠΟΧΡΩΣΗ (A)

Είναι ο λόγος της απορρόφησης του γλεύκους ή του οίνου στα 420nm προς την απορρόφηση στα 520 nm και δίνεται από τον τύπο $A = A_{420} / A_{520}$

Και οι δύο μετρήσεις έγιναν σε φασματοφωτόμετρο που ρυθμίστηκε ανάλογα ενώ ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με απιονισμένο νερό. Τα δείγματα πρέπει να είναι διαυγή αλλιώς προηγείται φυγοκέντρηση ή φιλτράρισμα. Στην περίπτωση υψηλών απορροφήσεων το δείγμα αραιώνεται και ο συντελεστής αραιώσης υπολογίζεται στις τελικές μετρήσεις. Η ένταση και η απόχρωση εκφράζονται σαν καθαροί αριθμοί με δύο δεκαδικά ψηφία.

2.5.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Οι φαινολικές ουσίες είναι πολύ σημαντικές γιατί επηρεάζουν τόσο το χρώμα και τις αποχρώσεις του οίνου, όσο και τα γευστικά χαρακτηριστικά αλλά και την δυνατότητα παλαίωσης του οίνου. Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των ουσιών είναι η παρουσία ενός ή περισσότερων φαινολικών δακτυλίων στο μόριό τους. Χωρίζονται στις φλαβονοειδείς και μη φλαβονοειδείς ενώσεις. Βρίσκονται στους φλοιούς, στα γίγαρτα και στους βόστρυχες και περνάνε στο γλεύκος και στον οίνο με την εκχύλιση. Προσδιορίζονται με 2 μεθόδους, ως ΔΦΟ και ως ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

2.5.5.1. ΔΕΙΚΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (ΔΦΟ)

Ο προσδιορισμός βασίζεται στην ισχυρή απορρόφηση που έχουν οι βενζολικοί δακτύλιοι των φαινολικών ενώσεων στο υπεριώδες φως, το μέγιστο της οποίας παρατηρείται στα 280nm. Μετράει τις ανθοκυάνες, τις τανίνες και τα φαινολικά οξέα, καθώς επίσης και κάποιων μη φαινολικών ουσιών. Είναι γρήγορη μέθοδος με επαναληψιμότητα. Μειονέκτημα θα μπορούσε να θεωρηθεί το γεγονός ότι ορισμένες ουσίες όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες δεν παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 280nm. Το σφάλμα θεωρείται μικρό όμως.

Δείγμα οίνου φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 5 min. Στην συνέχεια λαμβάνεται 1 mL από αυτό και μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL όπου αραιώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή (ΣΑ 50). Μετά από μηδενισμό του οργάνου με απιονισμένο νερό, μετριέται η απορρόφηση στα 280 nm με κυψελίδα χαλαζία ή πλαστική κατάλληλη για UV.

Ο ΔΦΟ προκύπτει από τον τύπο $\Delta\Phi\text{O} = A_{280} \times \Sigma\text{A}$

2.5.5.2. ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ (Μέθοδος FOLIN – CIOCALTEU)

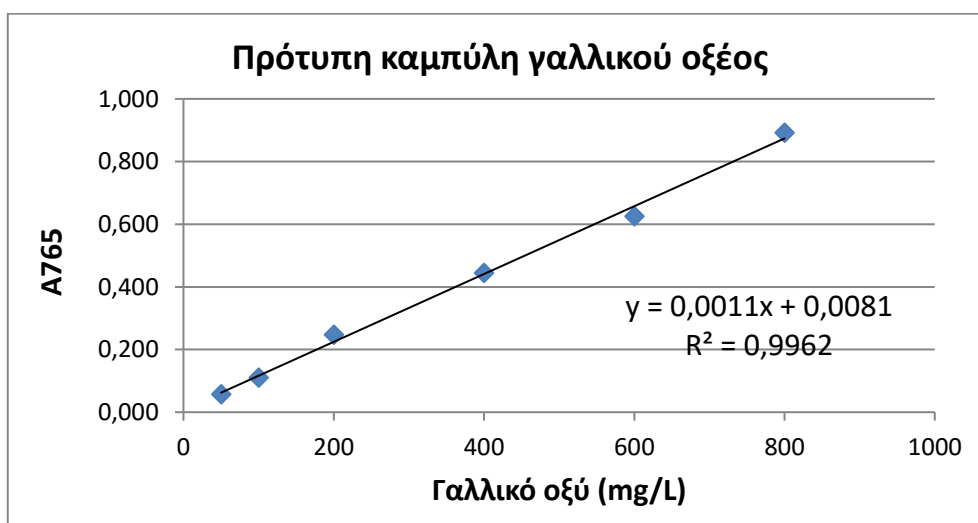
Πρόκειται για την επίσημη μέθοδο του ΟΙV. Είναι μια φωτομετρική μέθοδο, η οποία μετράει το σύνολο των φαινολικών ουσιών και βασίζεται στην οξειδωσή τους από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Η μέγιστη απορρόφηση του σχηματιζόμενου υγρού είναι στα 765nm. Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με την συγκεκριμένη μέθοδο εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος βάσει πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες (εις διπλούν) μεταφέρονται κατά σειρά 2 mL απιονισμένο νερό, 50 μL δείγμα οίνου, 250 μL αντιδραστήριο Folin, 750 μL Na_2CO_3 20% και 1950 μL απιονισμένο νερό. Μετά από κάθε προσθήκη γίνεται ανάδευση στο vortex. Στο τέλος, οι σωλήνες παρέμειναν για 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε ηρεμία, για την ανάπτυξη του χρωμοφόρου και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 765 nm. Για τον μάρτυρα της μεθόδου, στην αντίδραση, αντί για δείγμα χρησιμοποιείται H_2O .

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, από το βασικό διάλυμα γαλλικού οξέος, σε erpendorf των 2 mL παρασκευάστηκαν οι συγκεντρώσεις που φαίνονται στον πίνακα 6 και ακολούθησε ο προσδιορισμός των φαινολικών σύμφωνα με τη μέθοδο.

Πίνακας 6: Πρότυπη Καμπύλη γαλλικού οξέος για τη μέθοδο Folin

[Γαλλικό οξύ] (mg/L)	Πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος 1 g/L (μL)	H ₂ O (μL)
50	100	1900
100	200	1800
200	400	1600
400	800	1200
600	1200	800
800	1600	400

Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων με τις απορροφήσεις κατασκευάστηκε η παρακάτω πρότυπη καμπύλη. Από την ευθεία $y=0,0011x+0,0081$ που προέκυψε υπολογίστηκε η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών του δείγματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) λαμβάνοντας υπόψη και την αραιώση που τυχόν προηγήθηκε.



Σχήμα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (μέθοδος Folin)

2.5.5.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ

Οι ανθοκυάνες είναι ουσίες που βρίσκονται κυρίως στον φλοιό της ράγας και είναι υπεύθυνες για το ερυθρό χρώμα των οίνων. Η κύρια διαφορά μεταξύ μιας λευκής ράγας και μιας ερυθρής αφορά τις ανθοκυάνες. Η συγκεκριμένη μέθοδος, η οποία στηρίζεται στους Ribereau–Gayon και Stonestreet (1965), προσδιορίζει τις ολικές ανθοκυάνες που βρίσκονται στον οίνο προς ανάλυση χρησιμοποιώντας τις 2 βασικές ιδιότητες των ανθοκυανών, δηλαδή τον αποχρωματισμό από τον θειώδη ανυδρίτη και το χρωματισμό σε έντονο ερυθρό χρώμα με την μείωση του pH.

Κατά την διαδικασία της μεθόδου, σε μικρή κωνική φιάλη παρασκευάστηκε το μητρικό διάλυμα από 1 mL δείγμα οίνου, 1 mL αλκοολικό διάλυμα HCl 0,1 % και 20 mL υδατικό διάλυμα HCl 2%. Σε δύο

δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν 5 mL από το παραπάνω διάλυμα στον καθένα. Στον πρώτο σωλήνα προστέθηκαν 2 mL απιονισμένο H₂O και στον δεύτερο σωλήνα, που έφερε βιδωτό πώμα, 2 mL διάλυμα NaHSO₃. Οι σωλήνες έμειναν σε ηρεμία για 20 min και στο τέλος του χρόνου μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των δυο δειγμάτων στα 520 nm με μάρτυρα απιονισμένο H₂O. Η συγκέντρωση των ανθοκυανών δίνεται από τη σχέση:

$$\text{Ανθοκυάνες (mg/L)} = (A_{520, \text{H}_2\text{O}} - A_{520, \text{NaHSO}_3}) * 875$$

Όπου $A_{520, \text{H}_2\text{O}}$ είναι η απορρόφηση του δείγματος στο οποίο προστέθηκε το H₂O και A_{520, NaHSO_3} είναι η απορρόφηση του αποχρωματισμένου δείγματος.

2.5.5.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΑΝΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ BSA

Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στις ερευνητικές εργασίες των Harbertson et al (2002) και Hangerman and Butler (1978) και μετράει τανίνες δείγματος οίνου ή ράγας. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των τανινών με άλλα μόρια, όπως η αλβουμίνη (πρωτεΐνη) και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Στη συνέχεια επαναδιαλύονται σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των τανινών μετά από αντίδραση με χλωριούχο σίδηρο. Τα σύμπλοκα που δημιουργεί ο χλωριούχος σίδηρος έχουν ιώδες χρώμα και προσδιορίζονται ποσοτικά μετρώντας την απορρόφηση στα 510 nm. Η συγκέντρωση των τανινών στα σύμπλοκα τανίνης-πρωτεΐνης είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης του δείγματος.

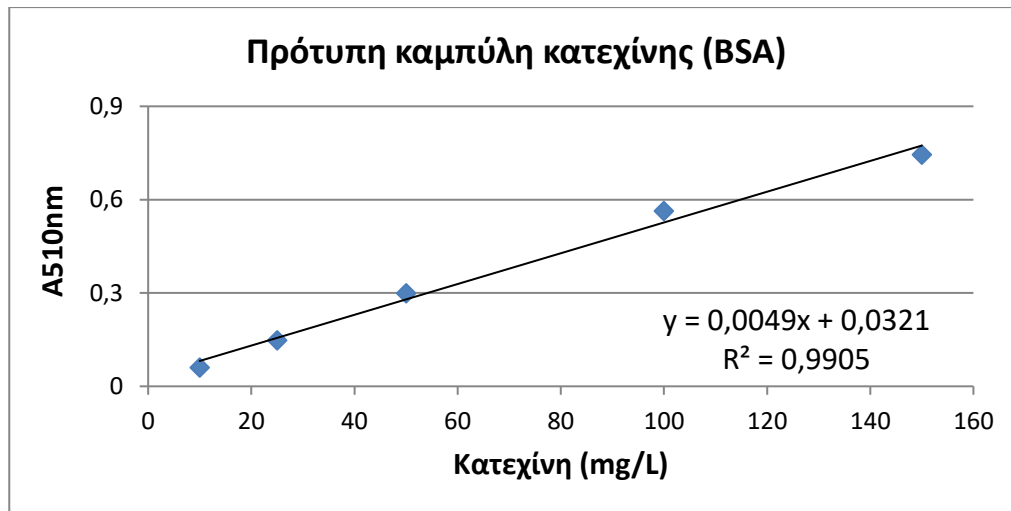
Αφού το δείγμα αραιώθηκε με model wine ανάλογα με τη συγκέντρωση των τανινών του, σε erpendorf τοποθετήθηκαν 500 μL αραιωμένου δείγματος και 1 mL πρωτεϊνικού διαλύματος BSA. Έγινε ήπια ανάδευση για 15 min και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 12500 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκαν 250 μL μη πρωτεϊνικού διαλύματος (διάλυμα Α) χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 min στις 12500 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε εκ νέου. Στο ίζημα προστέθηκαν 875 μL διαλύματος TEA-SDS και αφήθηκε σε ηρεμία για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αναδεύτηκε σε vortex για να διαλυθεί το ίζημα. Μετά την ανάδευση μετρήθηκε η απορρόφηση στα 510 nm (A1) με κυψελίδα στένωσης. Κατόπιν προστέθηκαν 125 μL διαλύματος FeCl₃ και μετά από 15 min μετρήθηκε ξανά η απορρόφηση στα 510 nm (A2). Για τον μηδενισμό του φωτομέτρου (μάρτυρας) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα TEA-SDS.

Για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάστηκαν συγκεντρώσεις, από 50 έως 300 mg/L κατεχίνης, και ακολουθήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα 7:

Πίνακας 7: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης για τανίνες BSA.

Κατεχίνη (mg/L)	διάλυμα κατεχίνης (μL)	διάλυμα TEA-SDS (μL)	Διάλυμα FeCl ₃ (μL)
10	10	865	125
25	25	850	125
50	50	825	125
100	100	775	125
150	150	725	125

Τα μίγματα που δημιουργήθηκαν, αναδεύτηκαν (vortex) και παρέμειναν κλειστά, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 min και μετά λήφθηκαν οι απορροφήσεις στα 510 nm. Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις της κατεχίνης με τις απορροφήσεις τους σε ένα σύστημα αξόνων λαμβάνεται η καμπύλη αναφοράς και η ευθεία που την περιγράφει.



Σχήμα 2. Πρότυπη καμπύλη κατεχίνης για τον προσδιορισμό τανινών BSA

Η τελική συγκέντρωση των τανινών στο διάλυμα μέτρησης υπολογίζεται από την διαφορά $A_{510} = (A_2) - (A_1)$ και με τη βοήθεια της της καμπύλης αναφοράς, σε ισοδύναμα κατεχίνης, έστω C1. Η τελική συγκέντρωση των τανινών στο δείγμα οίνου είναι $C=C1*(\Sigma A)$ mg/L οίνου (όπου ΣΑ: συντελεστής αραιώσης).

2.5.5.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΑΝΙΝΩΝ MCP

Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στα σύμπλοκα που δημιουργούνται όταν ενωθούν οι τανίνες με πολυσακχαρίτες. Η συγκεκριμένη ανάλυση στηρίζεται στην ερευνητική εργασία των Sarneckis et al (2006). Για κάθε δείγμα οίνου ετοιμάζονται δύο erpendorf:

Για το μάρτυρα, σε 50 μL οίνου (αν χρειάζεται έχει προηγηθεί αραιώση) προστέθηκαν 400 μL κορεσμένου θειικού αμμωνίου και 1550 μL απιονισμένου νερού και αναδεύονται σε vortex. Το διάλυμα παρέμεινε σε ηρεμία, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 10 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min στις 10000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε κυψελίδα χαλαζία και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280 nm (A_{280-bl}).

Για το δείγμα, σε 50 μL οίνου (αν χρειάζεται έχει προηγηθεί αραιώση) προστέθηκαν 600 μL διάλυμα μεθυλ-κυτταρίνης. Το μίγμα αναδεύτηκε ήπια με αναστροφή μερικές φορές και αφέθηκε σε ηρεμία για 2-3 min. Κατόπιν προστέθηκαν 400 μL κορεσμένου θειικού αμμωνίου και 950 μL απιονισμένου νερού και αναδεύονται σε vortex. Το διάλυμα παρέμεινε σε ηρεμία, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 10 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min στις 10000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε κυψελίδα χαλαζία και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280 nm (A_{280-s}). Για τον μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε H_2O .

Για την καμπύλη αναφοράς της μεθόδου παρασκευάστηκαν οι συγκεντρώσεις κατεχίνης που φαίνονται στον πίνακα 6, από 10 έως 100 mg/L σε τελικό όγκο 2 mL.

Για την καμπύλη αναφοράς της μεθόδου παρασκευάστηκαν οι συγκεντρώσεις κατεχίνης που φαίνονται στον πίνακα 8, από 10 έως 100 mg/L σε τελικό όγκο 2 mL. Λήφθηκαν κατευθείαν απορροφήσεις των συγκεντρώσεων στα 280 nm. Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις της κατεχίνης με τις απορροφήσεις τους σε ένα σύστημα αξόνων λαμβάνεται ή καμπύλη αναφοράς (σχήμα 3) και η ευθεία που την περιγράφει $y=0,0109x+ 0,0022$.

Από τη διαφορά $A_{280,tan} = (A_{280,bl}) - (A_{280,s})$ υπολογίζεται η απορρόφηση που οφείλεται στις τανίνες και από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση των τανινών, σε ισοδύναμα κατεχίνης, στο διάλυμα μέτρησης (C_{ds}). Η τελική συγκέντρωση των τανινών στο δείγμα οίνου, σε (mg/L), είναι:

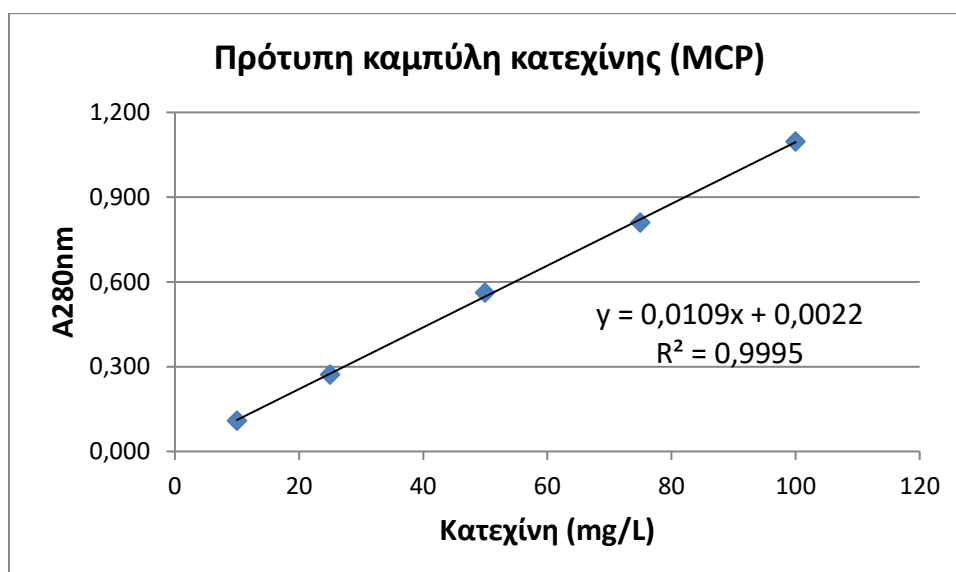
$$C_{wine} = C_{ds} * 40 * (\text{αραίωση})$$

όπου 40: ο συντελεστής αραίωσης του δείγματος στο διάλυμα μέτρησης.

Πίνακας 8: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης για ταννίνες MCP

[Κατεχίνη](mg/L)	Πρότυπο διάλυμα κατεχίνης 1 g/L (μL)	H ₂ O (μL)
10	20	1980
25	50	1950
50	100	1900
75	150	1850
100	200	1800

Λήφθηκαν κατευθείαν απορροφήσεις των συγκεντρώσεων στα 280 nm. Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις της κατεχίνης με τις απορροφήσεις τους σε ένα σύστημα αξόνων λαμβάνεται ή καμπύλη αναφοράς (σχήμα 3) και η ευθεία που την περιγράφει της μορφής $y=ax+\beta$.



Σχήμα 3: Πρότυπη καμπύλη κατεχίνης για τον προσδιορισμό τανινών MCP

2.6. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Για την μελέτη της επίδρασης των χειρισμών με τα διαφορετικά στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων στον οργανοληπτικό χαρακτήρα των οίνων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Περιγραφικής Ανάλυσης.

Οι οίνοι αξιολογήθηκαν από πάνελ 8 εκπαιδευμένων δοκιμαστών. Ο χώρος της αξιολόγησης ήταν φωτεινός και καλά αεριζόμενος. Οι οίνοι αφέθηκαν να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20°C) και σερβιρίστηκαν σε διαφανή ποτήρια γευσιγνωσίας INAO (ISO, 1977) καλυμμένα με πλαστικά τρυβλία Petri για να μην διαφεύγουν ή αναμιγνύονται οι οσμές. Η επισήμανση έγινε με 3-ψήφιους τυχαίους κωδικούς σε μια μοναδική ακολουθία. Ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να αξιολογήσουν οπτικά, οσφρητικά και γευστικά τον κάθε οίνο χρησιμοποιώντας κλίμακα 1-5 (χαμηλή ένταση-υψηλή ένταση). Οι περιγραφικοί όροι στους οποίους αξιολογήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 9:

Πίνακας 9. Περιγραφικοί όροι στους οποίους αξιολογήθηκαν οι οίνοι από τις διαφορετικές επεμβάσεις με γαλακτικά βακτήρια

Για οπτική αξιολόγηση	- Ένταση χρώματος (χαμηλή – υψηλή) - Απόχρωση (κεραμιδί – ιώδες)	COLOUR INTENSITY HUE
Για οσφρητική αξιολόγηση	- Ένταση αρώματος - Κόκκινα φρούτα (κεράσι, φράουλα) - Μαύρα φρούτα (βατόμουρα, δαμάσκηνο) - Άνθη - Μπαχαρικά - Βοτανικότητα - Καραμέλα	AROMA INTENSITY RED FRUIT BLACK FRUIT BLOSSOMS SPICES VEGETATIVE CAMEL
Για γευστική αξιολόγηση	- Οξύτητα - Στυπτικότητα - Πικρό	ACIDITY ASTRINGENCY BITTER
	- Γενική ποιότητα	OVERALL QUALITY

Μεταξύ των δειγμάτων υπήρχαν επαρκή χρονικά διαλείμματα. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Compusense Cloud, Academic Consortium (Compusense, Guelph, ON, Καναδάς).

2.7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για την δημιουργία των πινάκων και των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το Microsoft Excel. Όταν τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε γράφημα, παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (ως μπάρες) και η τυπική απόκλιση των επαναλήψεων.

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό JMP-11. Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων (τιμή επιπέδου σημαντικότητας $p < 0,05$ ή όριο εμπιστοσύνης 95%) αξιολογήθηκαν μέσω της εφαρμογής της ανάλυσης διακύμανσης με έναν

παράγοντα (OneWay ANOVA) με χρήση του Tukey HSD τεστ για την σύγκριση των μέσων και για τον εντοπισμό των συγκεκριμένων ζευγών που εμφανίζουν στατιστικές διαφορές. Με a, b, c κ.ο.κ. χαρακτηρίζεται η στατιστική διαφορά των δειγμάτων (σε επίπεδο 0.05%). Δείγματα με ίδιο γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

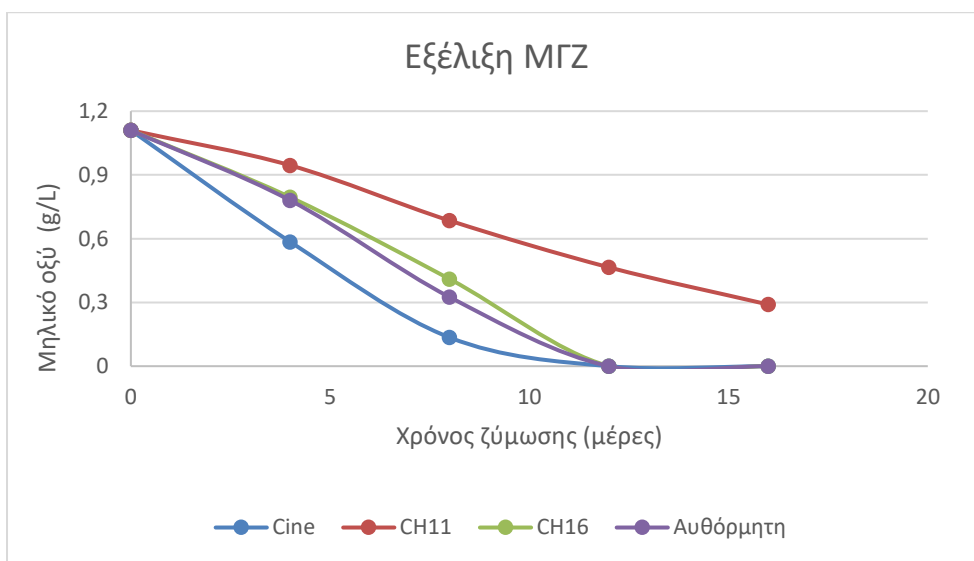
Για την ομαδοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η Πολυπαραγοντική Ανάλυση μέσω της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

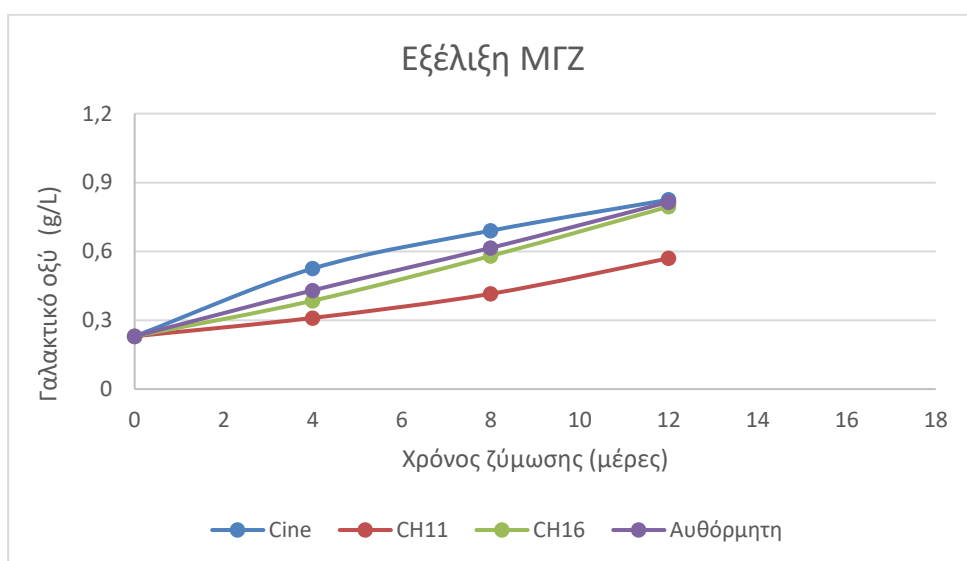
Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθενται και συγκρίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που παραλήφθηκαν από την πειραματική διαδικασία, η οποία στηρίχτηκε στην παρακολούθηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης με 5 διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των βασικών αναλύσεων των οίνων, η ανάλυση χρώματος και των φαινολικών συστατικών καθώς επίσης και η οργανοληπτική αξιολόγηση των τελικών οίνων.

3.1. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

Για την παρακολούθηση της εξέλιξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης χρησιμοποιήθηκε ενζυμική μέθοδος προσδιορισμού της μείωσης του μηλικού οξέος με αυτόματο αναλυτή (Midray BS-240Pro).



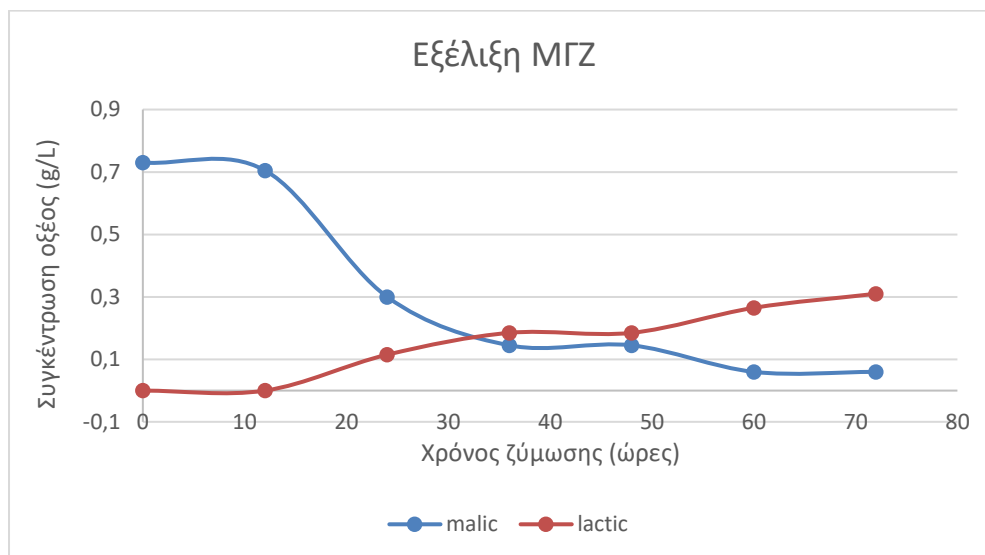
Σχήμα 4. Κατανάλωση μηλικού οξέος από εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων και αυθόρμητης ζύμωσης μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι



Σχήμα 5. Παραγωγή γαλακτικού οξέος από εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων και αυθόρμητης ζύμωσης μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι

Στο σχήμα 4 φαίνεται η κατανάλωση του μηλικού οξέος για την μηλογαλακτική ζύμωση που έλαβε χώρα αμέσως μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης από τα 4 γαλακτικά βακτήρια. Παρατηρείται ότι μόνο το *Viniflora* CH11 είχε δυσκολία στην κατανάλωση του μηλικού οξέος και χρειάστηκε περισσότερο από 15 ημέρες για την τελική ολοκλήρωση της συγκεκριμένης ζύμωσης. Τα *Viniflora* CH16 και το *Viniflora* Cine καθώς επίσης και τα βακτήρια της ενδογενούς μικροχλωρίδας που ξεκίνησαν και ολοκλήρωσαν την μηλογαλακτική ζύμωση αυθόρμητα χρειάστηκαν περίπου 12 ημέρες για την πλήρη κατανάλωση του μηλικού οξέος.

Σαν αποτέλεσμα του μεταβολισμού του μηλικού οξέος, στο σχήμα 5 φαίνεται η παραγωγή του γαλακτικού οξέος για την μηλογαλακτική ζύμωση που έλαβε χώρα αμέσως μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης από τα 4 γαλακτικά βακτήρια. Διακρίνεται μια μικρότερη παραγωγή του συγκεκριμένου οξέος από το γαλακτικό βακτήριο *Viniflora* CH11 κατά την 12^η μέρα οπότε και ολοκληρώθηκε η κατανάλωση μηλικού οξέος από τα υπόλοιπα στελέχη. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε απόλυτη αντιστοιχία με το σχήμα 4 μιας και το συγκεκριμένο στέλεχος καθυστέρησε την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Όμως, η ποσότητα του γαλακτικού οξέος που παράχθηκε τελικά από το γαλακτικό βακτήριο *Viniflora* CH11 λίγες ημέρες αργότερα ήταν ίδια με τα υπόλοιπα στελέχη.



Σχήμα 6. Εξέλιξη μηλογαλακτικής ζύμωσης με το εμπορικό στέλεχος *Viniflora* Nona πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης σε σταφυλοπολιτό ποικιλίας Κοτσιφάλι

Στο σχήμα 6 παρουσιάζεται η πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης πριν της έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Χρησιμοποιήθηκε το γαλακτικό βακτήριο *Viniflora* Nona, το οποίο ανήκει στο γένος *Lactobacillus* και στο είδος *plantarum*. Πρόκειται για ένα ομοζυμωτικό στέλεχος, πράγμα που σημαίνει ότι δεν έχει την δυνατότητα να μεταβολίσει τα σάκχαρα και να παραχθεί οξικό οξύ με αποτέλεσμα η πτητική οξύτητα να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Επιπλέον, πρόκειται για ένα στέλεχος ιδανικό για γλεύκη με χαμηλή περιεκτικότητα σε μηλικό οξύ, όπως το συγκεκριμένο γλεύκος από Κοτσιφάλι, όπου υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για προσβολή από μη επιθυμητά γαλακτικά βακτήρια και την παραγωγή υψηλής πτητικής οξύτητας (<https://www.chr-hansen.com/>). Το *Viniflora* Nona έχει την δυνατότητα να ολοκληρώσει την μηλογαλακτική ζύμωση σε γλεύκη με χαμηλή περιεκτικότητα σε μηλικό οξύ σε περίπου 3 ημέρες.

3.2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

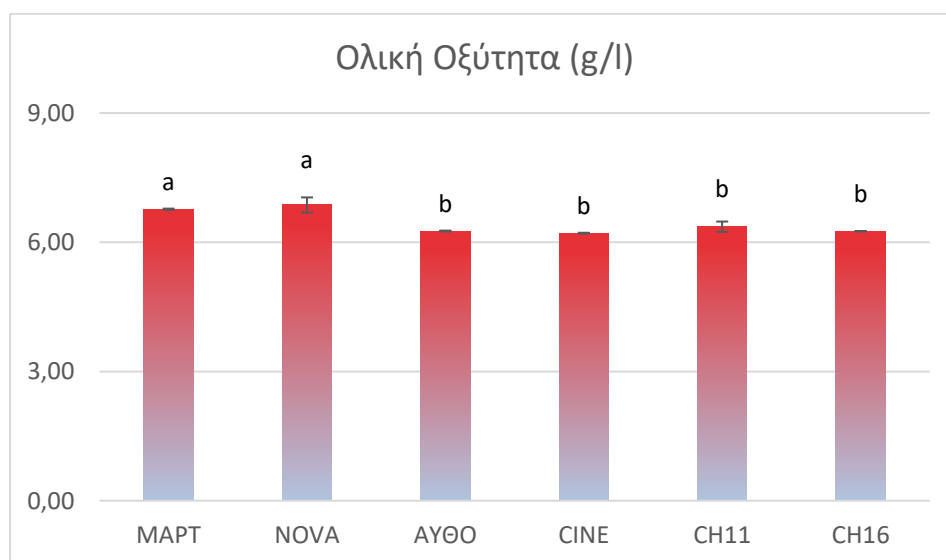
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των βασικών αναλύσεων στους τελικούς οίνους, ενώ στην συνέχεια ακολουθούν τα σχετικά διαγράμματα της στατιστικής ανάλυσης. Στα διαγράμματα οι ράβδοι προέκυψαν από τους ΜΟ των μετρήσεων κι εμφανίζονται επίσης η τυπική απόκλιση και οι χαρακτήρες στατιστικής διαφοροποίησης. Ίδιοι χαρακτήρες δεν διαφοροποιούν τα μεγέθη στατιστικά ενώ διαφορετικοί χαρακτήρες προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 9. Βασικές οινολογικές αναλύσεις των πειραματικών οίνων

ΣΤΕΛΕΧΗ	ΟΛΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ (g/l)	pH	ΠΗΤΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ (g/l)	ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ (%vol)
MAPT	6,77	3,34	0,30	13,80
NOVA	6,87	3,34	0,33	13,80
ΑΥΘΟ	6,26	3,39	0,44	13,75
CINE	6,21	3,39	0,45	13,80
CH11	6,36	3,39	0,42	13,70
CH16	6,26	3,40	0,43	13,75

3.2.1. ΟΛΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ

Η ολική οξύτητα αναφέρεται στο σύνολο των οξέων που περιέχονται στον οίνο και προέρχονται είτε από το σταφύλι, είτε από την αλκοολική είτε από την μηλογαλακτική ζύμωση. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η ολική οξύτητα εκφρασμένη σε g/l τρυγικού οξέος αμέσως μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

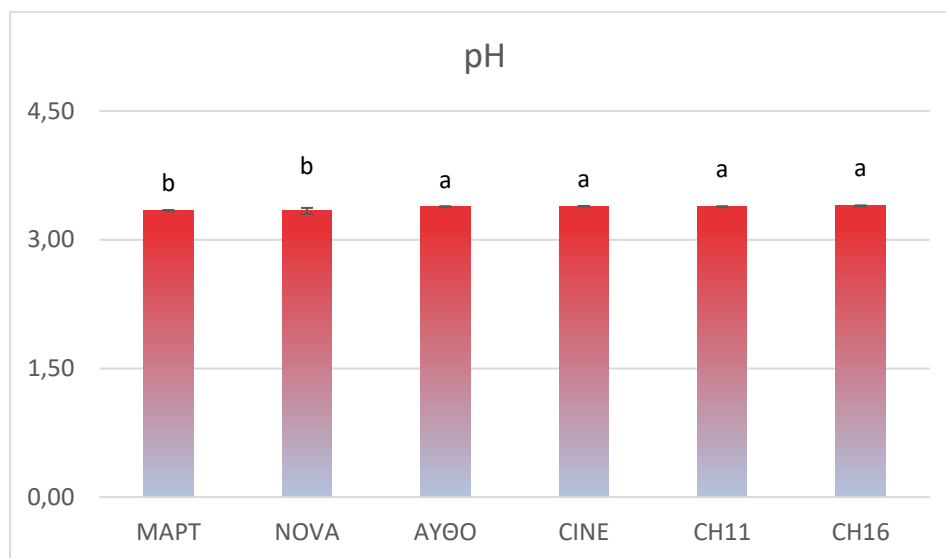


Σχήμα 7. Ολική οξύτητα των οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση και οι χαρακτήρες στατιστικής διαφοροποίησης (HSDTukeytest, $p=0,05$ %)

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 7, το εύρος τιμών της ολικής οξύτητας για τα 6 γαλακτικά βακτήρια κυμαίνεται από 6,21 έως 6,87g/l. Πρόκειται για τιμές ολικής οξύτητας σχετικά υψηλές για οίνους από την ποικιλία Κοτσιφάλι, πράγμα που θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από την ηλικία του αμπελώνα, το υψόμετρο, την χαμηλή στρεμματική απόδοση και το κυπελλοειδές σύστημα διαμόρφωσης. Ο οίνος που ολοκλήρωσε την μηλογαλακτική ζύμωση πριν από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης με το γαλακτικό βακτήριο *Lactobacillus plantarum* (Viniflora Nova) και ο οίνος στον οποίο προστέθηκε θειώδης ανυδρίτης για την αποφυγή της έναρξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης (μάρτυρας) παρουσίασαν την υψηλότερη ολική οξύτητα και στατιστικά διαφορετική σε σχέση με τους οίνους που η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε μετά την αλκοολική ζύμωση. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα δικαιολογείται από το γεγονός ότι ο μάρτυρας δεν πραγματοποίησε την μηλογαλακτική ζύμωση άρα δεν μεταβολίστηκε το ισχυρό μηλικό οξύ προς το πιο αδύναμο γαλακτικό οξύ με αποτέλεσμα την ελάττωση της οξύτητας. Επίσης, το γαλακτικό βακτήριο Viniflora Nova δεν συμβάλει στην ελάττωση της οξύτητας (Davis, 1985) πράγμα που το καθιστά ιδανικό γαλακτικό βακτήριο στις θερμές οινοπαραγωγικές περιοχές (<https://www.chr-hansen.com/>).

3.2.2. ΕΝΕΡΓΗ ΟΞΥΤΗΤΑ

Η ενεργή οξύτητα (pH) είναι το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση και δίνουν H^+ . Εξαρτάται από την συγκέντρωση αλλά κυρίως από το είδος των οργανικών οξέων.



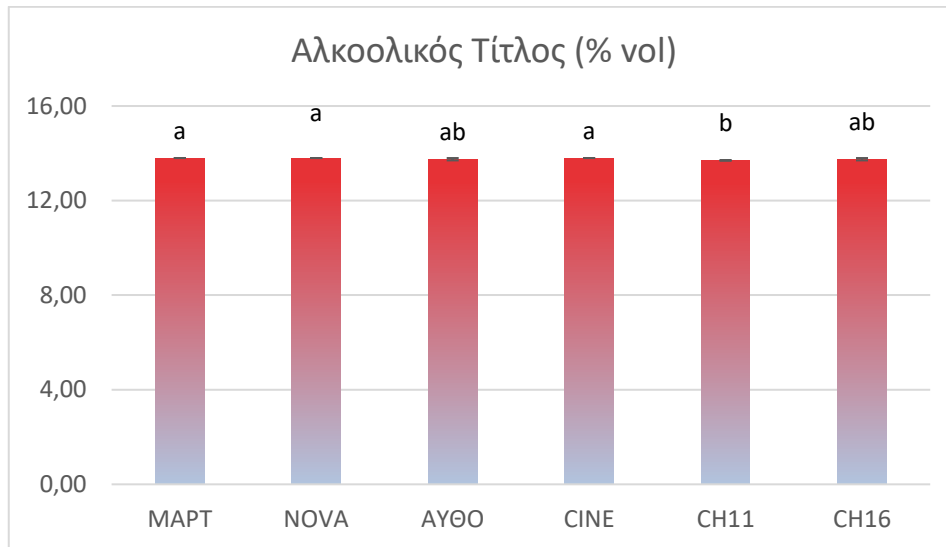
Σχήμα 8. Ενεργή οξύτητα των οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση και οι χαρακτηριστικές στατιστικές διαφοροποίησης (HSD Tukey test, $p=0,05$ %)

Το εύρος τιμών της ενεργού οξύτητας κυμαίνεται από 3,34 έως 3,4. Πρόκειται για μετρήσεις στο χαμηλότερο όριο της ενεργού οξύτητας για το Κοτσιφάλι (Σταυρακάκης, 2010). Ωστόσο, οι συγκεκριμένες τιμές δικαιολογούνται απόλυτα από την μεγάλη ηλικία των πρέμνων, το κυπελλοειδές σύστημα διαμόρφωσης, το υψόμετρο του αμπελώνα και την όψιμη ημερομηνία του τρύγου. Τόσο ο μάρτυρας, όσο και ο οίνος στον οποίο ολοκληρώθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση με το γαλακτικό βακτήριο Viniflora Nova, παρουσίασαν στατιστικά χαμηλότερη ενεργή οξύτητα σε σχέση με τους

υπόλοιπους οίνους. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε απόλυτη αντιστοίχιση με τα αποτελέσματα της ολικής οξύτητας.

3.2.3. ΑΙΘΥΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ

Η αιθυλική αλκοόλη που βρίσκεται στους οίνους παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους και αντιπροσωπεύει το 9-15% του όγκου τους. Η αιθυλική αλκοόλη των παραγόμενων οίνων ήταν μεταξύ 13,7 και 13,8%. Οι συγκεκριμένες τιμές είναι τυπικές για την συγκεκριμένη ποικιλία στο γεωγραφικό διαμέρισμα της Κρήτης (Αμπελογραφία, 2010) και δεν υπάρχουν ιδιαίτερες αποκλίσεις μεταξύ τους.



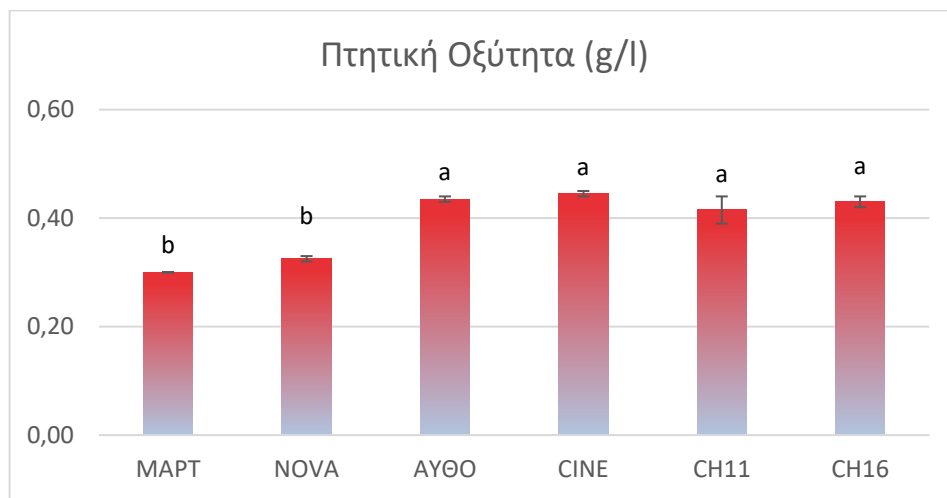
Σχήμα 9. Αιθυλική αλκοόλη των οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση και οι χαρακτηριστικές στατιστικής διαφοροποίησης (HSDTukeytest, $p=0,05$ %)

3.2.4. ΠΤΗΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ

Η πτητική οξύτητα αποτελείται από τα οξέα της σειράς του οξικού οξέος που απαντούν στους οίνους ελεύθερα ή με την μορφή αλάτων. Το επικρατέστερο από αυτά το οξέα είναι το οξικό οξύ και έτσι η πτητική οξύτητα εκφράζεται σε γραμμάρια οξικού οξέος ανά λίτρο.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 10, το εύρος τιμών είναι μεταξύ 0,30 και 0,45g/l. Πρόκειται για φυσιολογικές μετρήσεις πτητικής οξύτητας για οίνους που έχουν προέλθει από υγιή αλκοολική αλλά και μηλογαλακτική ζύμωση, γεγονός που αποδεικνύει την ορθότητα των χειρισμών κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο οίνος που ολοκλήρωσε την μηλογαλακτική ζύμωση πριν από την έναρξη της αλκοολικής με το εμπορικό παρασκεύασμα Viniflora Nova και ο οίνος στον οποίο προστέθηκε θειώδης ανυδρίτης για την αποφυγή της έναρξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης (μάρτυρας) παρουσίασαν χαμηλότερη πτητική οξύτητα σε σχέση με τους οίνους που η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε μετά την αλκοολική ζύμωση με στατιστικά σημαντική διαφορά. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα δικαιολογείται από το γεγονός ότι ο μάρτυρας δεν πραγματοποίησε την μηλογαλακτική ζύμωση άρα δεν μεταβολίστηκαν τα σάκχαρα και το κιτρικό οξύ που θα είχαν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή οξικού οξέος και πτητικής οξύτητας. Επίσης, το γαλακτικό βακτήριο Viniflora Nova δεν συμβάλει ουσιαστικά στην αύξηση της πτητικής οξύτητας δεδομένο ότι πρόκειται για ομοζυμωτικό

γαλακτικό βακτήριο και δεν μεταβολίζει τα σάκχαρα (<https://www.chr-hansen.com/>). Τα υπόλοιπα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι ετεροζυμωτικά, δηλαδή μεταβολίζουν τα σάκχαρα, με αποτέλεσμα την παραγωγή οξικού οξέος.



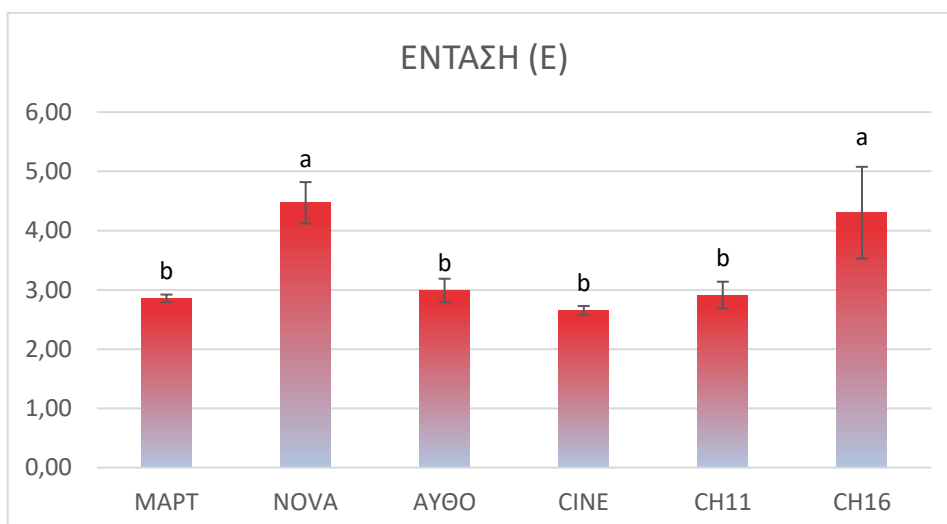
Σχήμα 10. Πτητική οξύτητα των οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση και οι χαρακτηριστικές στατιστικής διαφοροποίησης (HSDTukeytest, $p=0,05$ %)

3.3. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την πειραματική διαδικασία και τα διαγράμματα για τις αναλύσεις χρώματος και φαινολικών συστατικών για όλους τους οίνους.

3.3.1. ΕΝΤΑΣΗ

Η ένταση του χρώματος είναι το άθροισμα των απορροφήσεων στα 420, 520 και στα 620nm.

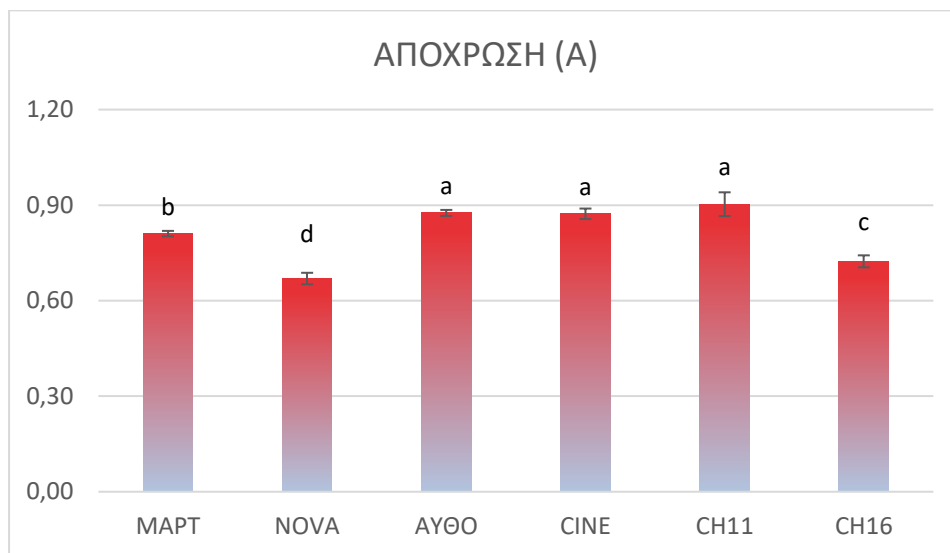


Σχήμα 11. Ένταση χρώματος των οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση και οι χαρακτηριστικές στατιστικής διαφοροποίησης (HSDTukeytest, $p=0,05$ %)

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 11, το εύρος τιμών της έντασης χρώματος κυμαίνεται από 2,65 έως 4,47. Πρόκειται για ερυθρούς οίνους μικρής έντασης, σύνηθες φαινόμενο στα κρασιά από την ποικιλία Κοτσιφάλι. Συγκεκριμένα, το Viniflora Nova και το Viniflora CH16 έδωσαν, στατιστικά αποδεδειγμένα, πιο έντονους χρωματικά οίνους. Αντιθέτως, το Viniflora Cine έδωσε τον ασθενέστερο χρωματικά οίνο αλλά χωρίς στατιστική διαφορά από τα υπόλοιπα γαλακτικά βακτήρια της πειραματικής διαδικασίας.

3.3.2. ΑΠΟΧΡΩΣΗ

Η απόχρωση είναι ο λόγος της απορρόφησης του γλεύκου ή του οίνου στα 420nm προς την απορρόφηση στα 520nm. Το εύρος τιμών της απόχρωσης στον παραπάνω σχήμα είναι από 0,67 έως 0,90. Οι τιμές θεωρούνται ως τυπικές φρέσκων οίνων, όπου η κύρια απορρόφηση είναι αυτή των μονομερών ανθοκυανών στα 520nm, και οι οίνοι της πειραματικής διαδικασίας το επιβεβαιώνουν μιας και οι μετρήσεις έγιναν 4 μήνες μετά την παραγωγή τους. Παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων με το Viniflora Nova να δίνει την μικρότερη απόχρωση από τους υπόλοιπους οίνους, στατιστικώς αποδεδειγμένο, ενώ για το Viniflora CH11 υπάρχει η τάση να παρουσιάζει μεγαλύτερη απόχρωση χωρίς όμως στατιστική διαφορά από το Viniflora Cine και τα γαλακτικά βακτήρια που συμμετείχαν στην αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση.



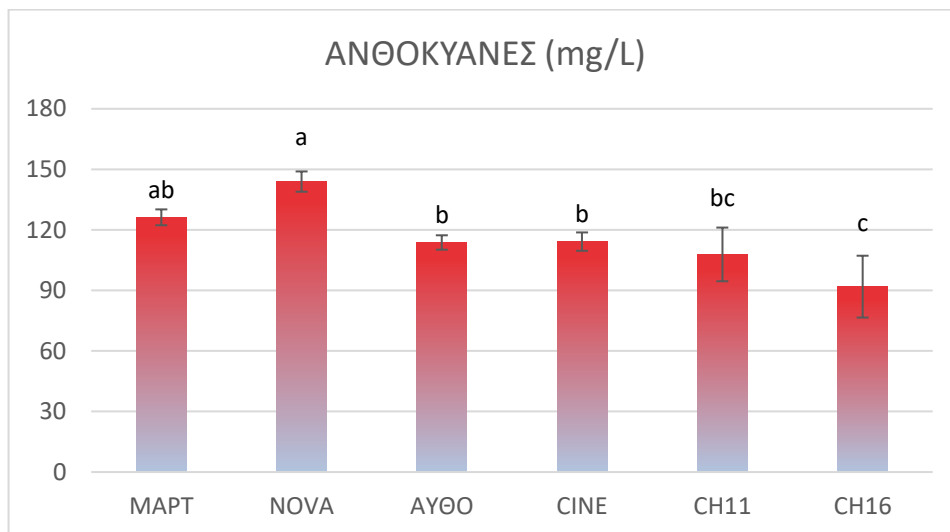
Σχήμα 12. Απόχρωση των οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση και οι χαρακτηριστικές στατιστικής διαφοροποίησης (HSDTukeytest, $p=0,05$ %)

3.3.3. ΟΛΙΚΕΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΕΣ

Με την μέθοδο των ολικών ανθοκυανών προσδιορίζονται τα έγχρωμα συστατικά των οίνων και βασίζεται στην ιδιότητά τους να αποχρωματίζονται παρουσία θειώδη ανυδρίτη.

Από το σχήμα 13 φαίνεται ότι το εύρος τιμών για τις ολικές ανθοκυάνες στους τελικούς οίνους κυμαίνεται από 91,88 έως 143,94 mg/L. Πρόκειται για ερυθρούς οίνους με χαμηλή περιεκτικότητα σε ολικές ανθοκυάνες, πράγμα που έρχεται σε πλήρη αντιστοιχία με τα χαρακτηριστικά της ποικιλίας Κοτσιφάλι. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων. Ο οίνος που προήλθε μετά από την μηλογαλακτική ζύμωση με Viniflora Nova

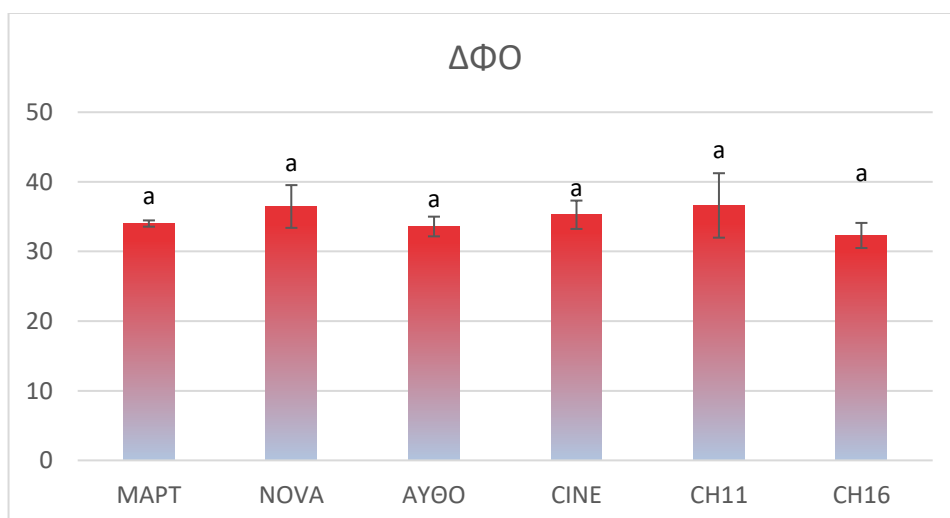
έχει στατιστικώς αποδεδειγμένα την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ολικές ανθοκυάνες ακολουθούμενο από τον μάρτυρα (χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση). Οι οίνοι που προέκυψαν από μηλογαλακτική ζύμωση μετά την αλκοολική έχουν μικρότερες συγκεντρώσεις ανθοκυανών με το *Viniflora* CH16 να εμφανίζει την πιο μικρή.



Σχήμα 13. Ολικές ανθοκυάνες των οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση και οι χαρακτηριστικές στατιστικής διαφοροποίησης (HSDTukeytest, $p=0,05$ %)

3.3.4. ΔΕΙΚΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Ο δείκτης φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ) είναι μια γρήγορη και εύκολη μέθοδος εκτίμησης του συνολικού φαινολικού φορτίου, και κατά συνέπεια της δυνατότητάς του για παλαίωση, η οποία στηρίζεται στην απορρόφηση των βενζολικών δακτυλίων των φαινολικών ενώσεων στα 280 nm.



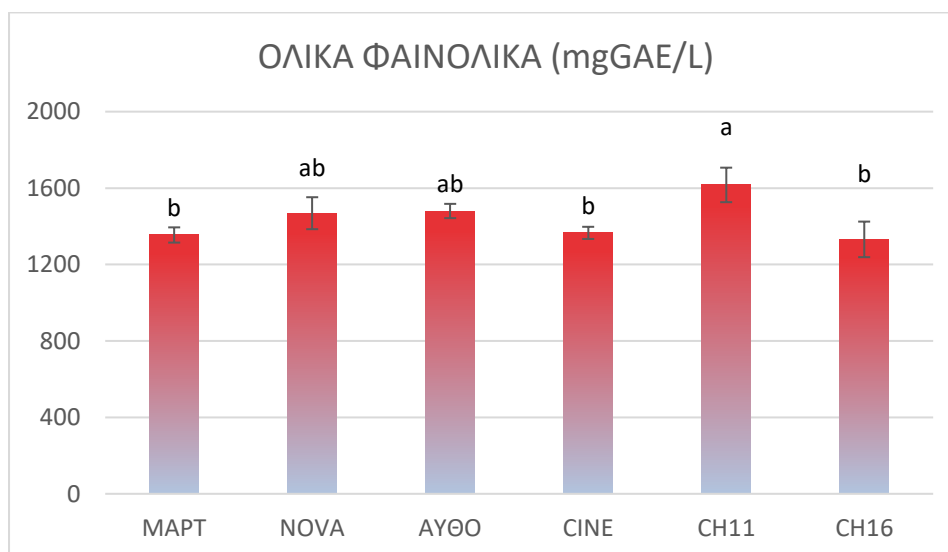
Σχήμα 14. Δείκτης φαινολικών ουσιών των οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση και οι χαρακτηριστικές στατιστικής διαφοροποίησης (HSDTukeytest, $p=0,05$ %)

Το εύρος τιμών για τον δείκτη φαινολικών ουσιών είναι από 32,3 έως 36,61. Πρόκειται για σχετικά χαμηλές τιμές του συγκεκριμένου δείκτη για ερυθρούς οίνους, αλλά από την άλλη, η ποικιλία Κοτσιφάλι δεν χαρακτηρίζεται για τον φαινολικό πλούτο της. Στο σχήμα 14, που παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των μετρήσεων και η στατιστική επεξεργασία τους, παρατηρείται ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γαλακτικών βακτηρίων και του μάρτυρα στην μέτρηση του ΔΦΟ. Υπάρχει, όμως, η τάση το Viniflora CH11 να παρουσιάζει μεγαλύτερη απορρόφηση στα 280nm και έτσι να έχει μεγαλύτερο δείκτη φαινολικών ουσιών, σε αντίθεση με το Viniflora CH16 που έχει την τάση να έχει μικρότερο δείκτη φαινολικών ουσιών.

3.3.5. ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ (ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN – CIOCALTEAU)

Πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων του οίνου από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου των οίνων.

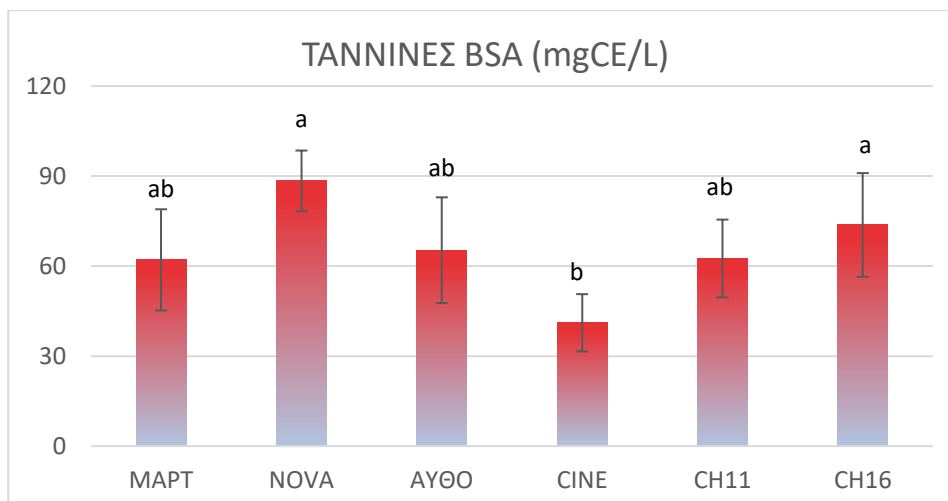
Από το παρακάτω σχήμα 15 παρατηρείται ότι το εύρος τιμών για τα ολικά φαινολικά κυμαίνεται από 1332 έως 1617 mg GAE/L και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν σαν τυπικές τιμές για την ποικιλία Κοτσιφάλι (Hasanaliyeva, 2017). Παρατηρούνται σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων με το Viniflora CH11 να έχει στατιστικώς αποδεδειγμένα την μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών. Αντιθέτως, το Viniflora CH16 παρουσιάζει την μικρότερη συγκέντρωση χωρίς όμως στατιστική διαφορά από το Viniflora Cine και τον μάρτυρα.



Σχήμα 15. Ολικά φαινολικά των οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση και οι χαρακτήρες στατιστικής διαφοροποίησης (HSDTukeytest, $p=0,05$ %)

3.3.6. ΤΑΝΙΝΕΣ BSA

Η συγκεκριμένη μέθοδος μετράει τανίνες δείγματος οίνου ή ράγας και η αρχή της βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις τανινών με πρωτεΐνες και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων τα οποία καθιζάνουν. Το τελικό αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μεθόδου σχετίζεται με την στυφή αίσθηση του οίνου στο στόμα.

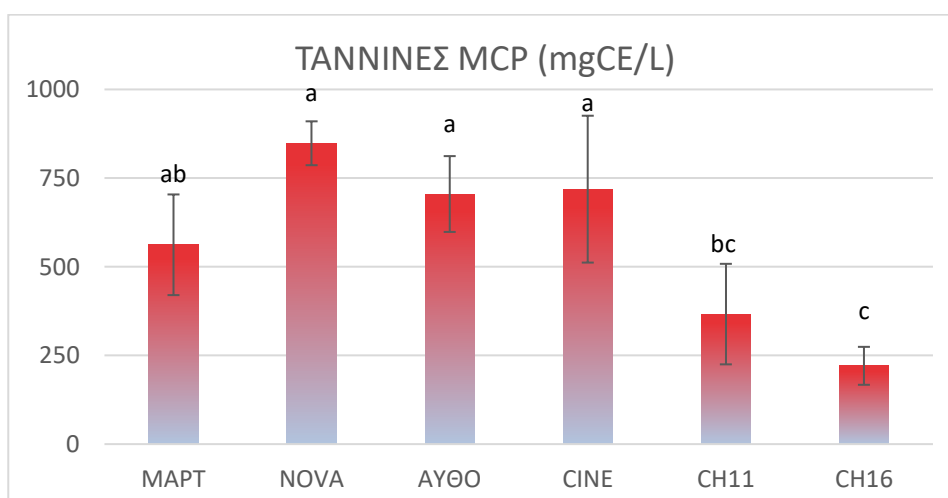


Σχήμα 16. Τανίνες BSAτων οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση και οι χαρακτήρες στατιστικής διαφοροποίησης (HSDTukeytest, $p=0,05$ %)

Το εύρος τιμών για τις τανίνες BSA στους τελικούς οίνους είναι από 41,11 έως 88,41mg CE/L. Παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων με το Viniflora Nova να έχει στατιστικώς αποδεδειγμένα την μεγαλύτερη συγκέντρωση τανινών BSA, ενώ το Viniflora Cineέχει στατιστικώς αποδεδειγμένα την μικρότερη. Στην οργανοληπτική αξιολόγηση των πειραματικών οίνων Κοτσιφάλι θα διερευνηθεί και η συσχέτιση των επεμβάσεων με τα διαφορετικά στελέχη με την στυπτικότητα.

3.3.7. TANNINES MCP

Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην συμπλοκοποίηση των τανινών με την βοήθεια ενός πολυμερούς, της μεθυλοκυτταρίνης, και στην καταβύθιση τους με φυγοκέντρηση. Στο υπερκείμενο μετρίεται η απορρόφηση στα 280 nm και υπολογίζεται η παρουσία τανινών έναντι μάρτυρα σαν ισοδύναμα κατεχίνης (mgCE/L)



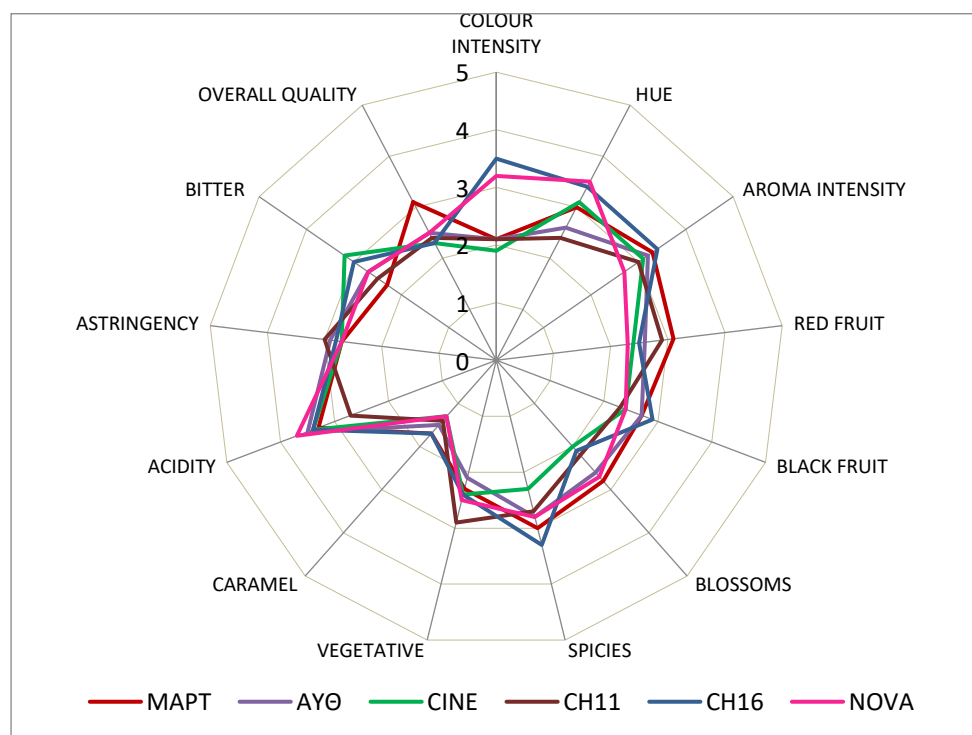
Σχήμα 17. Τανίνες MCPτων οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια. Οι μπάρες είναι μέσοι όροι 2 επαναλήψεων. Εμφανίζεται η τυπική απόκλιση και οι χαρακτήρες στατιστικής διαφοροποίησης (HSDTukeytest, $p=0,05$ %)

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 17, το εύρος τιμών των τανινών MCP είναι από 220,73 έως 848,26mgCE/L. Παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γαλακτικών βακτηρίων με το Viniflora Nova να έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση τανινών MCP στατιστικά επιβεβαιωμένη, ενώ το Viniflora CH16 έχει την μικρότερη. Λαμβάνοντας υπόψη και το προφίλ των τανινών BSA, φαίνεται ότι ο οίνος που προέκυψε από την ζύμωση του μηλικού με το στέλεχος Viniflora Nova είναι, από άποψη τανινών, ο περισσότερο πλούσιος.

3.4. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η μηλογαλακτική ζύμωση με τα διάφορα στελέχη και πρωτόκολλα, αλλά και η απουσία της, έδωσε τους πειραματικούς οίνους που αναλύθηκαν ως προς τις βασικές οινολογικές τους παραμέτρους και ως προς τα φαινορικά τους συστατικά. Σαν αναπόσπαστο κομμάτι της μελέτης τους ακολούθησε οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων από το πάνελ γευσιγνωστών του εργαστηρίου Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του ΓΠΑ.

Στους οίνους από κάθε γαλακτικό βακτήριο και από τον μάρτυρα πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική αξιολόγηση με κριτήρια που αφορούσαν το άρωμα, το χρώμα και την γεύση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο αραχνόγραμμα παρακάτω (σχήμα 18). Στις κορυφές του αραχνογράμματος εμφανίζονται τα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία αξιολογήθηκαν τα δείγματα με κλίμακα από το 1 έως το 5.



Σχήμα 18. Αραχνόγραμμα οργανοληπτικής αξιολόγησης των οίνων ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν μετά την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια.

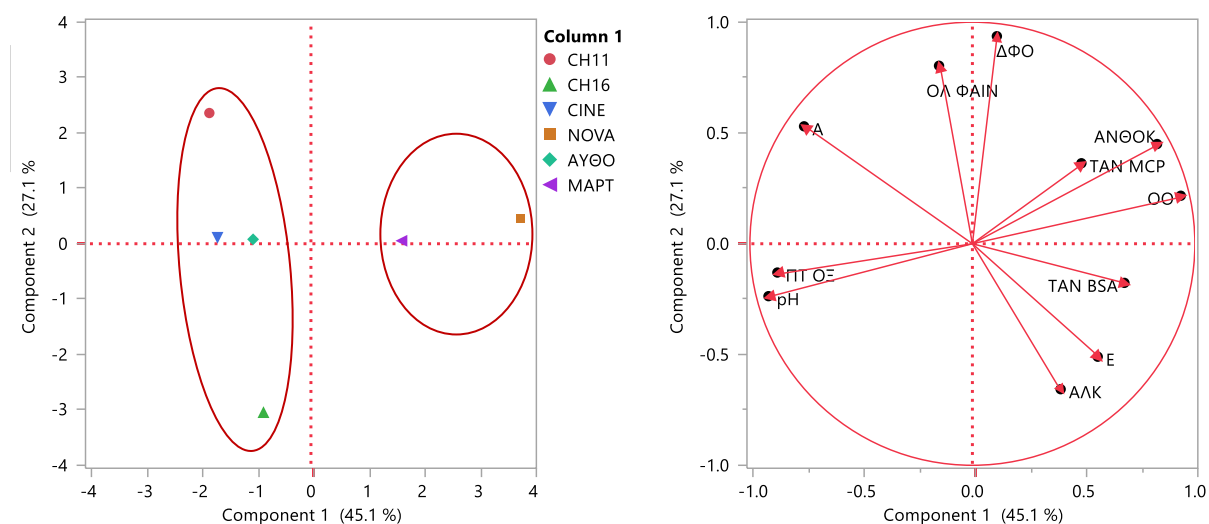
Γενικά η βαθμολογία των κριτηρίων για όλους τους οίνους κυμάνθηκαν σε μέσα επίπεδα. Οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στην ένταση του χρώματος και την απόχρωση, όπου και στα δύο κριτήρια το Viniflora CH16 και το Viniflora Nova παρουσιάζουν τα υψηλότερα σκορ.

Επίσης, το Viniflora Nona παρουσιάζει μια τάση για χαμηλότερη αρωματική ένταση, ενώ το Viniflora CH11 για την χαμηλότερη αίσθηση οξύτητας. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε υψηλότερη περιεκτικότητα σε αρώματα κόκκινων φρούτων και ανθέων για τον μάρτυρα, ενώ για το Viniflora CH16 περισσότερα αρώματα μαύρων φρούτων και μπαχαρικών. Επιπλέον, το Viniflora CH11 χαρακτηρίστηκε για την πιο έντονη στυπτικότητα, ενώ το Viniflora Cine για την πιο έντονη αίσθηση του πικρού. Τέλος, στην κατηγορία 'γενική ποιότητα' ο μάρτυρας έλαβε την υψηλότερη βαθμολογία σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους οίνους.

3.5. ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (PCA)

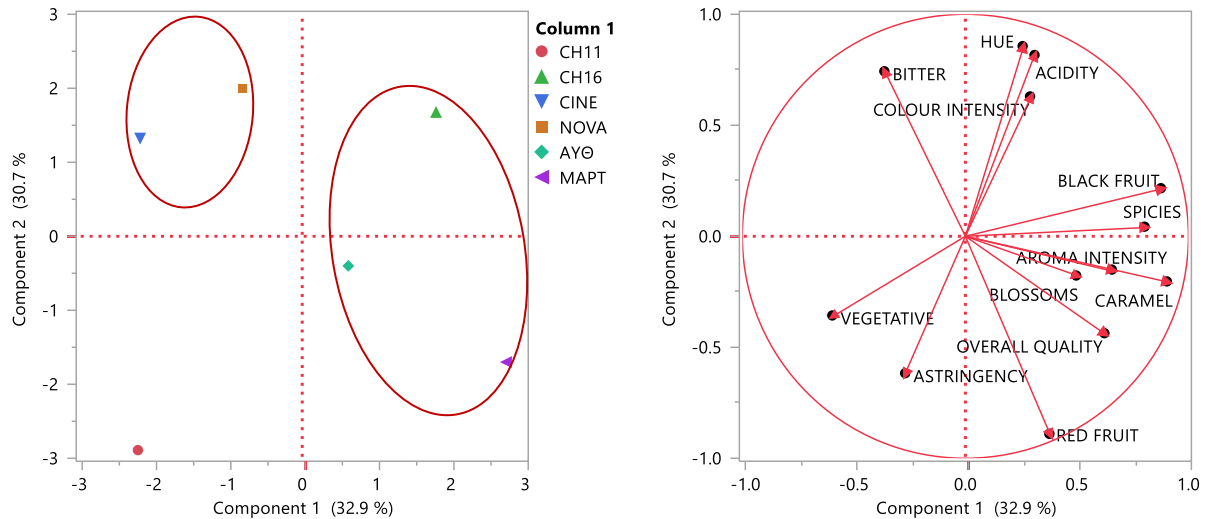
Ανακεφαλαιώνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα των βασικών οινολογικών αναλύσεων και των αναλύσεων χρώματος και φαινολικών συστατικών, και με την βοήθεια της πολυπαραγοντικής ανάλυσης (Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών - PCA), προέκυψε το σχήμα 19 όπου παρουσιάζεται η συσχέτιση των πειραματικών οίνων με το σύνολο των αναλυτικών αποτελεσμάτων. Η κάθε παράμετρος, και ανάλογα με την βαρύτητα που έχει, συμμετέχει στην δημιουργία των δύο Κύριων Συνιστωσών component 1 και component 2 που περιγράφουν το 54,1 και το 27,1 της πληροφορίας αντίστοιχα.

Παρατηρείται ότι οι οίνοι Μάρτυρας και Nona, που δεν έγινε μηλογαλακτική ζύμωση ή έγινε πριν την αλκοολική ζύμωση εμφάνισαν θετική συσχέτιση με τις περισσότερες παραμέτρους, ιδιαίτερα με όσες αφορούν τα φαινολικά συστατικά. Παράλληλα, προσμετρείται η αρνητική σχέση τους με την πτητική οξύτητα και την απόχρωση. Οι υπόλοιποι οίνοι ομαδοποιούνται στο αρνητικό σκέλος της συνιστώσας 1 παρουσιάζοντας αρνητική σχέση με τις περισσότερες παραμέτρους και δείχνοντας ενισχυμένες τα Ολικά φαινολικά και το pH, την πτητική οξύτητα και την απόχρωση. Βέβαια, οι αυξημένες τιμές στις δύο τελευταίες δεν αποτελούν ευνοϊκά χαρακτηριστικά για φρέσκο οίνο.



Σχήμα 19. Ανάλυση κύριων συνιστωσών αποτελεσμάτων βασικών οινολογικών αναλύσεων και αναλύσεων φαινολικών συστατικών για τους οίνους ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν από την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια.

Αντίστοιχα, στην Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών για τα κριτήρια οργανοληπτικής αξιολόγησης, και ανάλογα με την βαρύτητα που το καθένα συμμετέχει, σχηματίστηκαν οι δύο συνιστώσες component 1 και component 2 του σχήματος 20 οι οποίες περιγράφουν το 32,9 και 30,7 % της πληροφορίας αντίστοιχα.



Σχήμα 19. Ανάλυση κύριων συνιστωσών αποτελεσμάτων οργανοληπτικής αξιολόγησης για τους οίνους ποικιλίας Κοτσιφάλι που προέκυψαν από την διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης με διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς επίσης οίνου-μάρτυρα χωρίς διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης και οίνου με ενδογενή βακτήρια.

Οι οίνοι που εμφανίζουν θετική συσχέτιση με τα περισσότερα οργανοληπτικά κριτήρια, και που ομαδοποιούνται στο θετικό σκέλος του Component 1, είναι ο μάρτυρας (χωρίς μηλογαλακτική ζύμωση), ο οίνος που η μηλογαλακτική ζύμωση έγινε αυθόρμητα από την ενδογενή μικροβιακή χλωρίδα και ο οίνος που εμβολιάστηκε με το εμπορικό στέλεχος *Viniflora* CH16. Ο οίνος του CH11 χαρακτηρίστηκε για την στυπτικότητα του και την βοτανική του οσμή ενώ οι οίνοι Nova και CiNe για τους αυξημένους δείκτες χρώματος αλλά και την αρνητική συσχέτιση με τα κριτήρια αρώματος.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό να μελετήσει την επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε οίνο προερχόμενο από την ποικιλία Κοτσιφάλι. Επιπλέον, εφαρμόστηκε και μια σχετικά νέα τάση, η οποία στηρίζεται στην πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 3 στελέχη του *Oenococcus oeni* (Viniflora CH11, CH16 και CiNe) υπεύθυνα για την έναρξη και ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης και 1 στέλεχος του *Lactobacillus plantarum* (Viniflora Nova) ικανό να φέρει εις πέρας την μηλογαλακτική ζύμωση πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Επίσης, σε μια περίπτωση, η μηλογαλακτική ζύμωση έγινε αυθόρμητα, δηλαδή αφέθηκαν τα γηγενή γαλακτικά βακτήρια να εκκινήσουν και να φέρουν σε πέρας την διεξαγωγή της. Τέλος, σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα στο οποίο προστέθηκε ποσότητα θειώδους ανυδρίτη ικανή για να αποτρέψει την διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων που διενεργήθηκαν μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω:

Αρχικά, θα ήταν σημαντικό να αναφερθεί ότι στο δείγμα που ολοκληρώθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης από το εμπορικό στέλεχος Viniflora Nova δεν παρατηρήθηκε καμία δυσκολία στην ομαλή πορεία της αλκοολικής ζύμωσης. Επιπλέον, το συγκεκριμένο γαλακτικό βακτήριο είναι ιδανικό για γλεύκη με χαμηλή περιεκτικότητα σε μηλικό οξύ, όπως το συγκεκριμένο γλεύκος από Κοτσιφάλι, μιας και ολοκληρώνει την μηλογαλακτική ζύμωση σε 2-3 ημέρες αποτρέποντας μια μελλοντική προσβολή από γηγενή γαλακτικά βακτήρια με ανεξέλεγκτα αποτελέσματα. Τέλος, το συγκεκριμένο στέλεχος, όπως φάνηκε και από την συγκεκριμένη μελέτη, είναι ικανό να ξεκινήσει την μηλογαλακτική ζύμωση σε pH από 3,35 περίπου (<https://www.chr-hansen.com/en/>).

Όσον αφορά τις βασικές αναλύσεις παρατηρήθηκε ότι τόσο ο μάρτυρας όσο και το δείγμα που ολοκληρώθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης έχουν διατηρήσει υψηλότερη οξύτητα και άρα χαμηλότερο pH σε σχέση με τα δείγματα όπου η μηλογαλακτική ζύμωση ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι από την μία στον μάρτυρα δεν καταναλώθηκε το μηλικό οξύ και από την άλλη στο δείγμα που η μηλογαλακτική ζύμωση έγινε από το Viniflora Nova πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στην οξύτητα (<https://www.chr-hansen.com/en/>) παρά το γεγονός της κατανάλωσης του μηλικού οξέος γιατί αρχικά το συγκεκριμένο στέλεχος καταναλώνει λίγα σάκχαρα και παράγει μόνο γαλακτικό οξύ. Για αυτόν τον λόγο, το συγκεκριμένο γαλακτικό βακτήριο είναι ιδανικό για ζυμώσεις σε οίνους που προέρχονται από θερμά κλίματα, όπου το υψηλό pH μπορεί να δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα. Επιπλέον, η πτητική οξύτητα διατηρήθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα για το Viniflora Nova. Αυτό οφείλεται τόσο στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο στέλεχος είναι ομοζυμωτικό, πράγμα που σημαίνει ότι δεν έχει την δυνατότητα να μεταβολίσει τα σάκχαρα και να παραχθεί οξικό οξύ, όσο και στην ισχυρή βιοπροστασία που παρέχει πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης εναντίον των οξικών βακτηρίων (<https://www.chr-hansen.com/en/>). Αντίστοιχα χαμηλή πτητική οξύτητα παρατηρήθηκε και για τον μάρτυρα, όπου εκεί δεν πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση ύστερα από την προσθήκη θειώδους.

Η ένταση είναι υψηλότερη για το *Viniflora Nova*, πράγμα που βασίζεται στο χαμηλότερο pH που σημειώθηκε για το συγκεκριμένο γαλακτικό βακτήριο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον μεγαλύτερο βαθμό ιονισμού των ανθοκυανών και άρα πιο έντονο χρώμα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος CH16 έχει υψηλή ένταση. Σύμφωνα με την προμηθεύτρια εταιρεία, το συγκεκριμένο γαλακτικό βακτήριο παράγει αρκετή ποσότητα διακετυλίου, την μεγαλύτερη από τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν. Πιθανόν λοιπόν, η παρουσία του διακετυλίου, μιας και είναι μια ουσία που δεσμεύει τον θειώδη ανυδρίτη που με την σειρά του ενώνεται και αποχρωματίζει τις ανθοκυάνες, να οδηγεί σε αυξημένη ένταση χρώματος. Βέβαια, η κυρίαρχη παράμετρος που επηρεάζει το χρώμα κατά την μηλογαλακτική ζύμωση είναι η αλλαγή του pH. Η απόχρωση είναι μικρότερη για το *Viniflora Nova* και το CH16, πράγμα που συνδέεται απόλυτα με την μεγαλύτερη απορρόφηση στα 520nm που παρουσίασαν τα συγκεκριμένα 2 γαλακτικά βακτήρια. Τέλος, τα αποτελέσματα για τον ΔΦΟ και τα ολικά φαινολικά ουσιαστικά αλληλοσυνδέονται. Και στις 2 αυτές αναλύσεις ο *Viniflora Nova* παρουσιάζει σταθερά υψηλούς δείκτες.

Όσον αφορά τις τανίνες BSA και MCP, σε αντιστοιχία με τα προηγούμενα αποτελέσματα, φαίνεται ότι ο οίνος που η μηλογαλακτική ζύμωση ολοκληρώθηκε από το *Viniflora Nova* παρουσιάζει μια διαφορά σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι η παραμονή των στεμφύλων με τον οίνο διήρκησε περίπου 48h περισσότερο στα δείγματα που εμβολιάστηκαν με τα γαλακτικά βακτήρια *Viniflora Nova* σε σχέση με τους οίνους που ο εμβολιασμός έγινε αμέσως με τον *Saccharomyces cerevisiae* (Canals, 2005) και στο γεγονός ότι τα γαλακτικά βακτήρια έχουν την δυνατότητα να εκκρίνουν ένζυμα εκχύλισης των φαινολικών ουσιών από τους φλοιούς της ράγας (Devi, 2021).

Όσον αφορά στην οργανοληπτική αξιολόγηση οι βαθμολογίες κυμάνθηκαν σε μέσα επίπεδα. Έχει ιδιαίτερη σημασία να αναφερθεί ότι, ενώ το στέλεχος *Viniflora Nova* παρουσιάζει μεγαλύτερες μετρήσεις τόσο στις τανίνες BSA όσο και στις τανίνες MCP, στον οργανοληπτικό έλεγχο παρουσιάζει την μικρότερη αίσθηση στυπτικότητας. Αυτό το αποτέλεσμα, ενδεχομένως, οφείλεται στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο στέλεχος εμβολιάστηκε πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης και παρέμεινε εκεί σε όλη την διάρκειά της. Η αλκοολική ζύμωση πρόκειται για μια δυναμική διαδικασία που μπορεί να προκαλέσει την λύση των βακτηρίων και την ελευθέρωση ουσιών που μπορούν να προσφέρουν πιο στρογγυλή και μαλακή γεύση (Zambonelli, 2002). Επίσης, τα γαλακτικά βακτήρια, και κυρίως τα *Lactobacillus*, είναι σε θέση να ελευθερώνουν ένζυμα τα οποία μπορούν να παραμείνουν στο μέσο για αρκετό διάστημα μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης επιταχύνοντας και διευκολύνοντας την λύση των κυττάρων των ζυμών και των βακτηρίων (Matthews, 2006). Τέλος, παρατηρήθηκε ότι όταν έγινε η οργανοληπτική αξιολόγηση, δηλαδή περίπου 4 μήνες μετά το τέλος όλων των μηλογαλακτικών ζυμώσεων, το στέλεχος *Viniflora Nova* παρουσίασε την μικρότερη αρωματική ένταση και τον λιγότερο φρουτώδη χαρακτήρα. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με την έντονη δραστηριότητα ενζύμων εστεράσης του συγκεκριμένου στελέχους (Brizuela, 2018).

Ανακεφαλαιώνοντας από το συγκεκριμένο πείραμα θα μπορούσαν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Ο μάρτυρας, οίνος στον οποίο δεν έγινε μηλογαλακτική ζύμωση, παρουσίασε υψηλές τιμές ολικής οξύτητας και χαμηλές τιμές pH και πτητικής οξύτητας σε σχέση με τα δείγματα όπου η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας της αλκοολικής. Επιπλέον, οι τιμές στις αναλύσεις χρώματος και φαινολικών συστατικών κυμάνθηκαν σε μέσο επίπεδο. Τέλος, στην οργανοληπτική ανάλυση ο μάρτυρας αξιολογήθηκε συνολικά ως το πιο ποιοτικό δείγμα

με υψηλή αρωματική ένταση και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε αρώματα κόκκινων φρούτων και ανθέων. Φαίνεται να φέρει σε μεγαλύτερο ποσοστό πρωτογενή ποικιλιακά αρώματα αλλά και οσμές από την ζύμωση.

- Στο δείγμα όπου η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης με την χρήση του εμπορικού στελέχους γαλακτικού βακτηρίου *Viniflora Nona* παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές ολικής οξύτητας και χαμηλές τιμές pH και πτητικής οξύτητας. Επίσης, στις αναλύσεις χρώματος και φαινολικών συστατικών το συγκεκριμένο γαλακτικό βακτήριο σημείωσε τα υψηλότερα αποτελέσματα στην ένταση, στις ολικές ανθοκυάνες, στις τανίνες MCP και BSA, ενώ συγχρόνως παρουσίασε την χαμηλότερη τιμή στην απόχρωση. Τέλος, στον οργανοληπτικό έλεγχο παρουσίασε μια τάση για την χαμηλότερη αρωματική ένταση και την υψηλότερη αίσθηση οξύτητας.
- Το δείγμα όπου η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε αυθόρμητα παρουσίασε ανάλογες τιμές στις βασικές αναλύσεις με τα υπόλοιπα δείγματα όπου η μηλογαλακτική ζύμωση έγινε μετά την αλκοολική ζύμωση. Στις αναλύσεις χρώματος και φαινολικών συστατικών το συγκεκριμένο δείγμα παρουσίασε σχετικά υψηλές τιμές στις τανίνες MCP, στα ολικά φαινολικά και στην απόχρωση. Τέλος, στην οργανοληπτική αξιολόγηση διακρίθηκε για την υψηλή αρωματική ένταση με αρώματα μαύρων φρούτων και μπαχαρικών.
- Το δείγμα όπου η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε με το γαλακτικό βακτήριο *Viniflora Cine* παρουσίασε την μικρότερη ολική οξύτητα και μια τάση για την μεγαλύτερη πτητική οξύτητα. Επιπλέον, παρουσίασε μια τάση για την μικρότερη ένταση και για τις χαμηλότερες τιμές για τις τανίνες BSA, ενώ συγχρόνως είχε υψηλές τιμές για την απόχρωση και για τις τανίνες MCP. Στον οργανοληπτικό έλεγχο παρουσίασε τον πιο έντονο πικρό χαρακτήρα από όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν.
- Το δείγμα όπου η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε με το γαλακτικό βακτήριο *Viniflora CH11* παρουσίασε μια τάση για την υψηλότερη απόχρωση και τον υψηλότερο δείκτη φαινολικών ουσιών, ενώ είχε και την υψηλότερη τιμή στα ολικά φαινολικά. Στην οργανοληπτική ανάλυση αξιολογήθηκε ως το δείγμα με τον υψηλότερο βοτανικό και στυπτικό χαρακτήρα.
- Το δείγμα όπου η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε με το γαλακτικό βακτήριο *Viniflora CH16* χαρακτηρίζεται από τις υψηλές τιμές στην ένταση και στις τανίνες BSA. Αντίθετα, παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές στις ολικές ανθοκυάνες, στην απόχρωση και στις τανίνες MCP. Επιπλέον, δείχνει μια τάση για την χαμηλότερη τιμή στα ολικά φαινολικά. Στην οργανοληπτική ανάλυση αξιολογήθηκε με την υψηλότερη βαθμολογία στην αρωματική ένταση, στα αρώματα μαύρων φρούτων και μπαχαρικών. Την ίδια στιγμή όμως παρουσίασε υψηλούς δείκτες στην στυφή αίσθηση και την πικρή γεύση των οίνων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1. ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Apramita Devi, K.A. Anu-Appaiah, Tsair-FuhLin (2021). Timing of inoculation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* in mixed malo-lactic culture along with compatible native yeast influences the polyphenolic, volatile and sensory profile of the Shiraz wines

Bartowsky EJ, PA Henschke - Australian Grapegrower and Winemaker (Australia), (1995). Malolactic fermentation and wine flavor. EJ Bartowsky, PA Henschke - Australian Grapegrower and Winemaker (Australia), (1995). Malolactic fermentation and wine flavor

Bartowsky Eveline J, Anthony R Borneman (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Nov;92(3):441-7

Brizuela N.S., E. Franco-Luesma, B.M. Bravo-Ferrada, M. Pérez-Jiménez, L. Semorile, E.E. Tymczyszyn, M.A. Pozo-Bayon (2018). Influence of Patagonian *Lactiplantibacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains on sensory perception of Pinot Noir wine after malolactic fermentation

Canals R, M C Llaudy, J Valls, J M Canals, F Zamora (2005). Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening

Dimopoulou Maria, Tiphaine Bardeau, Pierre Yves Ramonet, Cécile MiotCertier, Olivier Claisse, Thierry Doco, Melina Petrel, Patrick Lucas, Marguerite Dols-Lafargue (2016). Exopolysaccharides produced by *Oenococcus oeni*: From genomic and phenotypic analysis to technological valorization.

Du ToitMaret, Lynn Engelbrecht, Elda Lerm, Sibylle Krieger-Weber (2010). *Lactobacillus*: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures—an Overview

Fugelsang Kenneth C., Charles G. Edwards (2007). *Wine Microbiology, Practical Applications and Procedures.* USA. Springer

Gultakin Hasanaliyeva (2017). Effect of organic production methods on antioxidant activity and concentrations in grapes, grape juice and wine; results from metaanalyses, and farm and retail surveys

Jackson Ronald S. (2008). *Wine Science, Principles and Applications*, Third edition. USA. Elsevier Inc.

Lucio, O.I. Pardo, J.M. Heras, S. Krieger-Weber, S. Ferrer (2017). Use of starter cultures of *Lactobacillus* to induce malolactic fermentation in wine

Marchand S., De Revel G., Bertrand A. (2000). Approaches to wine aroma: release of aroma compounds from reactions between cysteine and carbonyl compounds in wine.

Paramithiotis Spiros, Vasiliki Stasinou, Aikaterini Tzamourani, Yorgos Kotseridis and Maria Dimopoulou (2022). Malolactic Fermentation—Theoretical Advances and Practical Considerations.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications (Vol. 1).* John Wiley & Sons

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 2: The chemistry of wine stabilization and treatments.* John Wiley & Sons

Zambonelli Carlo, Cristiana Chiavari, Marzia Benevelli and Fabio Coloretto (2002). Effects of Lactic Acid Bacteria Autolysis on Sensorial Characteristics of Fermented Foods

Zeeman, W., Snyman, J.P. & van Wyk, C.J., (1982). The influence of yeast strain and malolactic fermentation on some volatile bouquet substances and on the quality of table wines.

5.2. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Σταυρακάκη Μαριτίνα – Μανόλης Σταυρακάκης (2018). Κρητική Αμπελογραφία. Αθήνα. Εκδόσεις ΤΡΟΠΗ

Σταυρακάκης Μανόλης (2010). Αμπελογραφία. Αθήνα. Εκδόσεις ΤΡΟΠΗ

Τσακίρης Αργύρης (1994). Οινολογία από το σταφύλι στο κρασί. Αθήνα. Εκδόσεις Ψυχάλου

Σουφλερός Ευάγγελος (2000). Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τόμος 1. Θεσσαλονίκη. Τυπογραφία Παπαγεωργίου

Σουφλερός Ευάγγελος (2000). Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τόμος 2. Θεσσαλονίκη. Τυπογραφία Παπαγεωργίου

Κουράκου Σταυρούλα (2013). Έκθεση σχετικά με τις προστατευόμενες ονομασίες προέλευσης Χάνδακας – Candia και Malvasia Χάνδακας – Candia

Σουφλερός Ευάγγελος (2015). Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, 3^η Έκδοση. Θεσσαλονίκη. Τσιαρτσιάνης Αθ. & Σια Ο.Ε.

Τσακίρης Αργύρης (2014). Οινολογία από το σταφύλι στο κρασί, 4^η Έκδοση. Αθήνα. Εκδόσεις Ψυχάλου

Κοτσερίδης Γ., Προξενιά Ν. (2015), Οινολογία Ι Εργαστηριακές ασκήσεις, Εργαστήριο Οινολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κοτσερίδης Γ., Καλλίθρακα Σ., Προξενιά Ν. (2017), Οινολογία ΙΙ Εργαστηριακές ασκήσεις, Εργαστήριο Οινολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Παπανδρέου Σ. (2016). Έρευνα για την επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε ερυθρό οίνο ποικιλίας Αγιωργίτικο με χρήση γαλακτικών βακτηρίων (Μεταπτυχιακή διατριβή). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

5.3. ΙΣΤΟΤΟΠΟΙ

<https://www.rethemnosnews.gr>

<https://www.winesofcrete.gr>

www.minagric.gr

www.infowine.gr

<https://www.wikipedia.org/>

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

<https://fermentis.com/>

<https://www.lev2050.com/>

<https://winefolly.com/>