



ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ
ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΤΑ ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
ΤΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΟΙΝΩΝ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ
ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΑΣΥΡΤΙΚΟ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΟΕΝΟCΟCСUS ΟΕΝΙ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ
ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

Αναστασία Βενιζέλου ΑΜ: 141010

Βασιλική Τζανετοπούλου-Χρυσού ΑΜ: 141137

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μαρία Δημοπούλου

ΑΘΗΝΑ, 2021

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη επίδρασης της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε ποιοτικά χαρακτηριστικά των λευκών οίνων των ποικιλιών Αηδάνι και Ασύρτικου με χρήση διαφορετικών στελεχών του γαλακτικού βακτηρίου *Oenococcus oeni*

Αναστασία Βενιζέλου
Βασιλική Τζανετοπούλου-Χρυσού

Εξεταστική επιτροπή

Dr. Δημοπούλου Μαρία, Επιστημονικός συνεργάτης του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής (επιβλέπουσα)

Dr. Μπερής Ευάγγελος, Επιστημονικός συνεργάτης του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

Dr. Ταταρίδης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Οινολογίας, Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Βενιζέλου Αναστασία του Δημητρίου, με αριθμό μητρώου 141010 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα
Βενιζέλου Αναστασία

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Τζανετοπούλου-Χρυσού Βασιλική του Σπυρίδωνα, με αριθμό μητρώου 141137 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα
Τζανετοπούλου-Χρυσού Βασιλική

Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή εργασία μελέτησε την επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε λευκούς οίνους των ποικιλιών Αηδάνι και Ασύρτικο από την περιοχή της Σαντορίνης. Πιο ειδικά, σκοπός της μελέτης ήταν να βρεθεί η επιρροή της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος και του στελέχους του γαλακτικού βακτηρίου στην κινητική της μηλογαλακτικής ζύμωσης και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού οίνου. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά εμπορικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων του είδους *Oenococcus oeni* το στέλεχος VP41 (Lallemand) και το στέλεχος B7 Direct (Laffort). Στους οίνους της ίδιας ποικιλίας και στους μάρτυρες προστέθηκαν τα παραπάνω βακτήρια ξεχωριστά και σε διαφορετική συγκέντρωση μηλικού οξέος. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας έγιναν αναλύσεις για τον προσδιορισμό του μηλικού οξέος στα δείγματα με τη βοήθεια ενζυμικού ΚΙΤ. Στη συνέχεια, εφόσον είχε πραγματοποιηθεί η μηλογαλακτική ζύμωση στους οίνους ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των χημικών παραμέτρων με τη χρήση του μηχανήματος WineScan Flex της εταιρείας FOSS. Στο τέλος αξιολογήθηκαν οι οίνοι ως προς τα ποιοτικά γνωρίσματά τους. Η έρευνα που διεξήχθη έδειξε ότι η εφαρμογή γαλακτικών βακτηρίων στη λευκή οινοποίηση επηρεάζει ιδιαίτερα τον οργανοληπτικό προφίλ των οίνων που παράγονται. Συγκεκριμένα, στον οίνο με την ποικιλία Αηδάνι διαπιστώθηκε ότι η χρήση του γαλακτικού βακτηρίου B7 ταίριαζε καλύτερα, καθώς έδινε πιο έντονο άρωμα λουλουδιών από το στέλεχος VP41. Αντίθετα, το Ασύρτικο παρουσίαζε πιο έντονο το φρουτώδες χαρακτήρα στα δείγματα που είχε προστεθεί το γαλακτικό βακτήριο VP41. Όσον αφορά την επίδραση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος, οι οίνοι με την υψηλότερη συγκέντρωση παρουσίασαν χαμηλότερη πτητική οξύτητα και στις δύο ποικιλίες.

Λέξεις κλειδιά: Αηδάνι, Ασύρτικο, λευκός οίνος, μηλογαλακτική ζύμωση, *Oenococcus oeni*, WineScan, οργανοληπτική ανάλυση

Abstract

In this thesis, the effect of malolactic fermentation on white wines of the varieties Aidani and Assyrtiko from the region of Santorini was studied. Especially, the purpose of this study was to find the influence of concentration of malic acid and the strain of lactic acid on kinetics of malolactic fermentation and the sensory characteristics of the final wine. Two different commercial strains of lactic acid bacteria of the species *Oenococcus oeni*, the strain VP41 (Lallemand) and the strain B7 (Laffort) were used. The above bacteria were added to the wines of the same variety and were inoculated separately and in different concentration of malic acid. During the experimental procedure, analyzes were performed to determine the malic acid in the samples by enzymatic KIT. Then, after the malolactic fermentation had taken place in the wines, the chemical parameters were quantified using the WineScan Flex machine of the company FOSS. In the end, the wines were evaluated in terms of their quality features. The research who conducted showed that application of lactic acid bacteria in white vinification has a significant effect on the sensory profile of the wines produced. Specifically, in the wine with the Aidani variety it was found that the use of the lactic acid bacterium B7 was better suited, as it gave a more intense floral aroma than the VP41 strain. On the contrary, Assyrtiko had a more pronounced fruity character in the samples to which the lactic acid bacterium VP41 had been added. Regarding the effect of malic acid concentration, the wines with the highest concentration showed lower volatile acidity in both varieties.

Key words: Aidani, Assyrtiko, white wine, malolactic fermentation, *Oenococcus oeni*, WineScan, organoleptic analysis

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	9
1.1 Λευκοί οίνοι Σαντορίνης.....	9
1.1.1 Η ποικιλία Αηδάνι.....	10
1.1.2 Η ποικιλία Ασύρτικο.....	10
1.2 Τα γαλακτικά βακτήρια του οίνου.....	11
1.3 Πορεία και παράγοντες που επηρεάζουν τη μηλογαλακτική ζύμωση.....	15
1.4 Επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης στους οίνους.....	17
1.4.1 Οξύτητα	17
1.4.2 Μικροβιακή σταθερότητα.....	18
1.4.3 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά οίνου.....	19
2. Σκοπός της μελέτης.....	21
3. Υλικά και Μέθοδοι	22
3.1 Οινοποίηση και Πειραματική πορεία	22
3.2 Αλκοολική ζύμωση.....	22
3.3 Μηλογαλακτική ζύμωση.....	23
3.4 Οινολογικές αναλύσεις	25
3.4.1 Προσδιορισμός μέσω WineScan Flex	25
3.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός μηλικού οξέος με ενζυμικό ΚΙΤ	29
4. Αποτελέσματα.....	31
4.1 Πορεία Μηλογαλακτικής ζύμωσης.....	31
4.2 Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών της μηλογαλακτικής ζύμωσης στα οινολογικά χαρακτηριστικά του οίνου.....	32
4.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος στην ταχύτητα της μηλογαλακτικής ζύμωσης.....	32
4.2.2 Επίδραση του βακτηριακού στελέχους.....	33
4.2.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος.....	36
4.2.4 Επίδραση του στελέχους του <i>O. oeni</i> και της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος	38
4.3 Επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου	39
5. Σχολιασμός και Συμπεράσματα	40
Βιβλιογραφία	42

Πίνακας Εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΑΥΤΟΧΘΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ (KRIEGER -WEBERETAL, 2020).....	11
ΕΙΚΟΝΑ 2: ΠΟΡΕΙΑ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ.....	12
ΕΙΚΟΝΑ 3: ΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ.....	24
ΕΙΚΟΝΑ 4: ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ.....	25

Πίνακας Πινάκων

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΟΥ WINESCAN ΜΕ ΤΙΣ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ.....	26
---	----

Πίνακας Σχημάτων

ΣΧΗΜΑ 1: ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΛΕΥΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΑΣΥΡΤΙΚΟ.....	32
ΣΧΗΜΑ 2: Η ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΛΕΥΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ.....	33
ΣΧΗΜΑ 3: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΣΤΟ ΡΗ ΣΤΟ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΥΡΤΙΚΟ. Η ΣΥΝΘΗΚΗ C ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΙ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΜΑΡΤΥΡΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ Η ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	34
ΣΧΗΜΑ 4: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΣΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ ΣΤΟ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΥΡΤΙΚΟ. Η ΣΥΝΘΗΚΗ C ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΙ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΜΑΡΤΥΡΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ Η ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	34
ΣΧΗΜΑ 5: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΣΤΗ ΠΤΗΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ ΣΤΟ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΥΡΤΙΚΟ. Η ΣΥΝΘΗΚΗ C ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΙ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΜΑΡΤΥΡΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ Η ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	34
ΣΧΗΜΑ 6: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΣΤΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΣΤΟ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΥΡΤΙΚΟ. Η ΣΥΝΘΗΚΗ C ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΙ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΜΑΡΤΥΡΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ Η ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	35
ΣΧΗΜΑ 7: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ ΣΤΟ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΥΡΤΙΚΟ. Η ΣΥΝΘΗΚΗ C ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΙ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΜΑΡΤΥΡΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ Η ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	36
ΣΧΗΜΑ 8: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΣΤΟ ΚΙΤΡΙΚΟ ΟΞΥ ΣΤΟ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΥΡΤΙΚΟ. Η ΣΥΝΘΗΚΗ C ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΙ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΜΑΡΤΥΡΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ Η ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	36
ΣΧΗΜΑ 9: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΗΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ ΡΗ ΣΤΟ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΥΡΤΙΚΟ.....	37
ΣΧΗΜΑ 10: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΗΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ ΣΤΟ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΥΡΤΙΚΟ.....	37
ΣΧΗΜΑ 11: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΗΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ ΠΤΗΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ ΣΤΟ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΥΡΤΙΚΟ.....	38
ΣΧΗΜΑ 12: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΗΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΣΤΟ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΥΡΤΙΚΟ.....	38
ΣΧΗΜΑ 13: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΗΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ ΚΙΤΡΙΚΟ ΟΞΥ ΣΤΟ ΑΗΔΑΝΙ ΚΑΙ ΤΟ ΑΣΥΡΤΙΚΟ.....	38
ΣΧΗΜΑ 14: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΤΟΥ Ο. ΘΕΝΙ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΗΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ ΡΗ, ΣΤΗΝ ΟΛΙΚΗ ΚΑΙ ΠΤΗΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ, ΣΤΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΣΤΟ ΚΙΤΡΙΚΟ ΟΞΥ.....	39

1. Εισαγωγή

1.1 Λευκοί οίνοι Σαντορίνης

Η Σαντορίνη θεωρείται από τις πιο γνωστές αμπελουργικές περιοχές στην Ελλάδα, επειδή οι οίνοι της είναι μοναδικοί στο είδος τους. Αυτό συμβαίνει διότι σημαντικό ρόλο έχουν το κλίμα και το ηφαιστειακό έδαφος του νησιού, αφού προσδίδουν χαμηλές αποδόσεις κλίμακας 300-500 κιλών/στρέμμα (Τσακίρης, 2010). Οι διαδοχικές εκρήξεις που έχουν πραγματοποιηθεί από το ηφαίστειο έχουν καταστήσει το έδαφος ασβεστολιθικό και σχιστολιθικό καλυμμένο από λάβα, τέφρα και ελαφρόπετρα. Επιπλέον το έδαφος του νησιού είναι πλούσιο σε ανόργανα συστατικά, καθώς το κλίμα του νησιού χαρακτηρίζεται από ξηρό και ζεστό καλοκαίρι και ήπιο χειμώνα με λίγες αλλά ισχυρές βροχοπτώσεις και ισχυρούς ανέμους που επικρατούν όλο το χρόνο. Στη Σαντορίνη η ποικιλία που καλλιεργείται και έχει μεγάλη σπουδαιότητα είναι το Ασύρτικο και ακολουθούν σε μικρότερες ποσότητες το Αηδάνι και το Αθήρι. Ο τρόπος καλλιέργειας των αμπελώνων της Σαντορίνης είναι ιδιόμορφος λόγω των δυνατών αέρων, δηλαδή τα αμπέλια φυτεύονται αραιά μεταξύ τους και χαμηλά διαμορφώνοντας ένα στεφάνι (Chara et al., 2001).

Οι λευκοί ξηροί οίνοι της Σαντορίνης χαρακτηρίζονται από λευκοκίτρινο χρώμα και από αρώματα φρούτων, εσπεριδοειδών και λουλουδιών. Η Σαντορίνη και η Θηρασιά αποτελούν τη ζώνη ΟΠΑΠ για λευκούς ξηρούς ή γλυκούς οίνους από τις ποικιλίες Ασύρτικο ή Ασύρτικο και Αηδάνι. Τέλος, αξίζει να αναφερθούν οι δύο πιο παραδοσιακοί οίνοι που χαρακτηρίζουν την οινοπαραγωγή της Σαντορίνης, το Νυχτέρι και το Vinsanto. Το Νυχτέρι είναι ξηρός οίνος βασισμένο στην ποικιλία Ασύρτικο αλλά μπορεί να έχει προέλθει και από προσμίξεις από Αηδάνι και Αθήρι. Ο οίνος αυτός ονομάστηκε έτσι επειδή τα παλιά χρόνια τα σταφύλια συλλέγονταν το πρωί και η επεξεργασία τους γινόταν μέχρι αργά το βράδυ. Το Vinsanto είναι γλυκός οίνος και παράγεται από σταφύλια που έχουν ωριμάσει καλά και ακολούθως απλώνονται στον ήλιο για συνήθως μία έως δύο εβδομάδες (Domizio & Lencioni, 2011).

1.1.1 Η ποικιλία Αηδάνι

Το Αηδάνι είναι μία λευκή ποικιλία οινοποίησης στην Ελλάδα. Παρουσιάζεται ως γενική ονομασία Αηδάνι άσπρο και διαθέτει αρκετά συνώνυμα όπως Αδάνι, Αηδάνι λευκό, Αϊδάνι, Ασπράιδανο και Μοσχάιδανο. Το Αηδάνι καλλιεργείται κυρίως στο νομό των Κυκλάδων, όπως στην Πάρο, τη Νάξο και τη Σαντορίνη και είναι επιρρεπής στον περονόσπορο και το ωίδιο (Σταύρακας, 2015).

Συνήθως το Αηδάνι μπορεί να οινοποιηθεί και με άλλες ποικιλίες και να προσφέρει μία ισορροπημένη γεύση και ανθώδη αρωματική πολυπλοκότητα στο προφίλ του οίνου αποφεύγοντας την μεγάλη οξύτητα και τον υψηλό αλκοολικό βαθμό. Για την παραγωγή του γνωστού γλυκού οίνου της Σαντορίνης, Vinsanto, απαιτείται το λιάσιμο των σταφυλιών. Εκτός από το Ασύρτικο που καταλαμβάνει τουλάχιστον το 51%, το Αηδάνι μπορεί να συμμετέχει μόνο του ή και με άλλες ποικιλίες σε μικρότερες ποσότητες κατά τον Κανονισμό (ΕΚ) 1308/2013.

1.1.2 Η ποικιλία Ασύρτικο

Το Ασύρτικο είναι μία λευκή ποικιλία χάρη στην οποία παράγονται Ελληνικοί οίνοι υψηλής οξύτητας. Πρόκειται για μία γηγενής ποικιλία που καλλιεργείται κυρίως στο μεγαλύτερο μέρος του αμπελώνα της Σαντορίνης και είναι αρκετά ανθεκτική στις ασθένειες. Όμως, επιτρέπεται η καλλιέργειά της και σε άλλα αμπελουργικά τμήματα αναδεικνύοντας πολλές μορφές οίνων με εξαιρετικά χαρακτηριστικά στην ποιότητα των οίνων που προκύπτουν αντίστοιχα με το μέρος που καλλιεργείται (Chara et al., 2001).

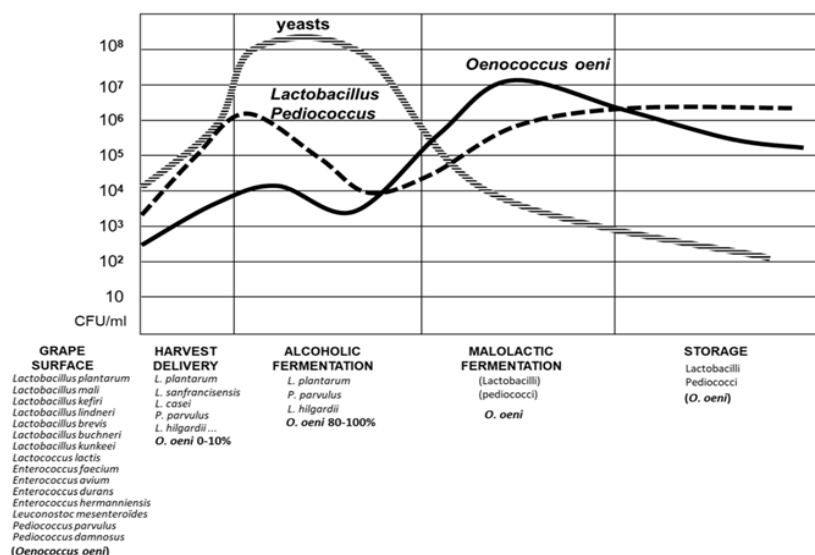
Αυτό που κάνει το Ασύρτικο να ξεχωρίζει είναι η υψηλή οξύτητά του σε συνδυασμό με την ορυκτότητα του εδάφους της Σαντορίνης. Το γλεύκος είναι πλούσιο σε σάκχαρα και οξέα. Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 1308/2013, το Ασύρτικο αποτελεί την βασική ποικιλία της Σαντορίνης και ο λευκός ξηρός οίνος ΠΟΠ Σαντορίνη δημιουργείται από την ποικιλία αυτή σε ποσοστό τουλάχιστον 75% και το υπόλοιπο καλύπτεται από τις ποικιλίες Αηδάνι και Αθήρι. Επίσης, η ελάχιστη ολική οξύτητα του οίνου σε τρυγικό οξύ πρέπει να είναι 5,5 g/L και ο ολικός αλκοολικός τίτλος να είναι τουλάχιστον 12,0% vol. Ο οίνος που παράγεται παρουσιάζει μία ελαφρώς όξινη νότα διατηρώντας την επίγευση και το χρώμα του

είναι λευκοκίτρινο, σχεδόν χρυσίζει. Το άρωμα του δεν είναι πολύ έντονο δίνοντας μία ευχάριστη νότα στο προφίλ του οίνου (Τσακίρης, 2010).

1.2 Τα γαλακτικά βακτήρια του οίνου

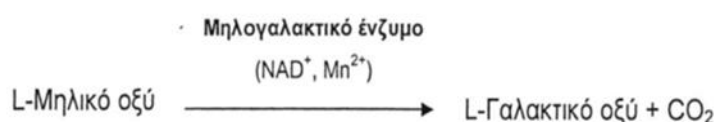
Τα γαλακτικά βακτήρια απαντώνται φυσικά στα σταφύλια, στα φύλλα, στο έδαφος και σε επιφάνειες εξοπλισμού και έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και στον οίνο. Τα πιο συνηθισμένα γαλακτικά βακτήρια ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* και *Oenococcus* (Wibowo et al., 1985, Du Toit et al., 2000). Αυτά τα βακτήρια απαιτούν σαν πηγή θρέψης υδατάνθρακες σε συνδυασμό με αμινοξέα και βιταμίνες (Henick-Kling et al., 1988, Wibowo et al., 1985).

Συνήθως, τα γαλακτικά βακτήρια που αναγνωρίζονται στα γλεύκη σταφυλιών παρουσιάζονται σε πληθυσμό περίπου 10^4 CFU/mL. Η πλειονότητα αυτών των βακτηρίων δεν είναι ανθεκτική στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες που σχετίζονται με την οινοποίηση και ο πληθυσμός τους φθίνει κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Ωστόσο, πολλά είδη είναι σε θέση να επιβιώσουν, ιδίως ο *O. oeni*, ο οποίος επιβιώνει κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (Lonvaud et al., 1991) και βρίσκεται συχνά σε οίνους με pH κάτω από 3,5 (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Εξέλιξη των αυτόχθονων μικροοργανισμών στη διάρκεια της οινοποίησης (Krieger-Weberetal, 2020).

Ανεξάρτητα από το είδος των γαλακτικών βακτηρίων, η κύρια σημασία αυτών των οργανισμών στην παραγωγή οίνου είναι η ικανότητά τους να διεξάγουν τη μηλογαλακτική ζύμωση. Η μηλογαλακτική ζύμωση στον οίνο είναι μια βιοχημική αντίδραση που συμβαίνει συνήθως μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, στη συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται μια βιομετατροπή όπου το δικαρβοξυλικό L-μηλικό οξύ μετατρέπεται σε μονοκαρβοξυλικό L-γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα με την παρουσία του NAD^+ και του Mn^{2+} (Liu et al., 2002, Boulton et al., 1998, Davis et al., 1985). Η χημική αντίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι η εξής:



Εικόνα 2: Πορεία μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Ωστόσο, η ζύμωση αυτή δεν αντιπροσωπεύει μόνο μια διαδικασία βιολογικής μείωσης της οξύτητας, καθώς ασκεί και σημαντικό αντίκτυπο στις οργανοληπτικές πτυχές του οίνου και τα σχετικά αποτελέσματα μπορεί να είναι θετικά ή αρνητικά, ανάλογα το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που θα χρησιμοποιηθεί για τη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Τα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων που επηρεάζουν αρνητικά το τελικό προϊόν μπορεί να προκαλούν ανεπιθύμητες αλλαγές στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου, στην αλλοίωση χρώματος οίνου και εμπλέκονται στην παραγωγή βιογενών αμινών (Beelman et al., 1982).

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, υπάρχουν πολλοί οργανισμοί που είναι ικανοί να πραγματοποιήσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση στον οίνο. Γένη όπως ο *Lactobacillus* ή *Pediococcus* μπορούν να προκαλέσουν ζύμωση, ειδικά σε οίνο που εμφανίζει pH υψηλότερο από 3,5, αλλά συνήθως οδηγεί σε μη αποδεκτούς οίνους ως προς το οργανοληπτικό τους προφίλ. Αυτά τα γένη είναι ανεκτά σε χαμηλό pH και παράγουν ανεπιθύμητες γεύσεις καθώς και υψηλά επίπεδα οξικού οξέος. Μια εξαίρεση σε αυτόν τον κανόνα είναι το είδος του *Lactobacillus plantarum*, το οποίο δεν σχηματίζει σημαντική ποσότητα οξικού οξέος και έχει προταθεί ως κατάλληλος υποψήφιος για

μηλογαλακτική ζύμωση (Murphy et al., 1985). Ωστόσο, λόγω της μέτριας ανοχής του στην αιθανόλη, απαιτεί εμβολιασμό στο γλεύκος πριν από την αλκοολική ζύμωση (Prahl et al., 1988). Άλλα είδη όπως ο *Lactobacillus acidophilus* είναι πιο ανθεκτικά στην αιθανόλη αλλά μπορεί να παράγουν οξικό οξύ και έτσι η χρήση τους ως εκκινητές για εμπορικούς σκοπούς είναι περιορισμένη (Krieger et al., 1990).

Μερικά είδη ζυμών μπορούν επίσης να αποικοδομήσουν το μηλικό οξύ μέσω μιας εναλλακτικής οδού, όπου μπορούν να καταβολίσουν σημαντικές ποσότητες μηλικού οξέος και να το μετατρέψουν σε αιθανόλη παρά σε γαλακτικό οξύ. Το είδος *Schizosaccharomyces pombe* έχει χρησιμοποιηθεί για το μεταβολισμό του μηλικού οξέος στον οίνο (Radler, 1982, Gallander et al., 1977, Bidan, et al., 1974, Rankine et al., 1969), αλλά συνήθως συνοδεύεται από την παραγωγή ανεπιθύμητων ενώσεων στον οίνο, συμπεριλαμβανομένου του υδρόθειου (Bidan et al., 1974, Gallander et al., 1977, Rankine et al., 1969).

Παρά το δυναμικό πολλών γαλακτικών βακτηρίων για χρήση στην παραγωγή οίνου, το *O. oeni* παραμένει το είδος επιλογής για πολλούς παραγωγούς οίνου. Το βακτήριο *O. oeni*, παλαιότερα γνωστό ως *Leuconostoc oenos* (Dicks et al., 1995), είναι ένας προαιρετικός αναερόβιος οργανισμός και μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε ποικιλία μέσων χαμηλού pH (3-4,8). Μια πηγή άνθρακα από σάκχαρα, άζωτο από ελεύθερα αμινοξέα ή κοντά πεπτίδια, βιταμίνες από νικοτινικό οξύ, θειαμίνη, βιοτίνη και παντοθενικό οξύ, ανόργανα ιόντα (Mn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ και Na^+) και παράγωγα πουρίνης (γουανίνη, αδενίνη, ξανθίνη και ουρακίλη) απαιτούνται όλα για τη βέλτιστη ανάπτυξή του. Η ανάπτυξη του βακτηρίου είναι γενικά αργή και μπορεί να διαρκέσει από 5 έως 7 ημέρες για να σχηματιστούν ορατές αποικίες σε θερμοκρασίες επώασης μεταξύ 20°-30 °C (Van Vuuren et al., 1991). Αν και προηγουμένως ομαδοποιήθηκε με το είδος *Leuconostoc*, η ανάλυση DNA των στελεχών *O. oeni* τα έχει τοποθετήσει σε ομάδα που διακρίνεται σαφώς από τα γένη *Leuconostoc*. Η γενετική διαφοροποίηση εκδηλώνεται στην επίδραση του *O. oeni* στον οίνο και το συγκεκριμένο στέλεχος που χρησιμοποιείται μπορεί να έχει σημαντικά διαφορετικά αποτελέσματα στους χαρακτήρες του τελικού προϊόντος (Tracey et al., 1989, Garvie et al., 1980, Garvie et al., 1969).

Το *O. oeni* αντιπροσωπεύει τον καλύτερο υποψήφιο για τη διεξαγωγή μηλογαλακτικής ζύμωσης λόγω της αντίστασης του σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών stress (Bourdineaud et al., 2003), ιδίως των όξινων συνθηκών και των υψηλών επιπέδων

αλκοόλης που είναι χαρακτηριστικά του οίνου. Εμβολιασμένος οίνος με επιλεγμένα στελέχη *O. oeni* έχει το πλεονέκτημα να επιτρέπει στον παραγωγό να ελέγχει καλύτερα την πορεία της ζύμωσης. Αν και γενικά χρησιμοποιείται ένα μόνο βακτηριακό στέλεχος, σε ορισμένες περιπτώσεις ένα μίγμα στελεχών μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο εμβόλιο. Αυτή η διαδικασία μπορεί όχι μόνο να παράγει ορισμένα προτιμώμενα χαρακτηριστικά στον οίνο, αλλά μπορεί επίσης να μεγιστοποιήσει τις πιθανότητες της επιβίωσης βακτηριδίων εάν βρεθεί βακτηριοφάγος σε κάποιο στέλεχος (Henick-Kling et al., 1985).

Ο ακριβής χρόνος της προσθήκης εκκινητών ζύμωσης στον οίνο αποτελεί σημαντική πράξη για την επιτυχία της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αν η αλκοολική ζύμωση καθυστερήσει, υπάρχει μία πιθανότητα τα γαλακτικά βακτήρια να μεταβολίσουν σάκχαρα στο γλεύκος σταφυλιών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε δυσάρεστη παραγωγή αυξημένων επιπέδων οξικού οξέος (Lafon-Lafourcade et al., 1983) στο τελικό προϊόν.

Ο μη εμβολιασμός με μηλογαλακτικά βακτήρια στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης δημιουργεί ένα διαφορετικό σύνολο προβλημάτων. Ο οίνος σε αυτό το στάδιο συχνά εξαντλείται σε θρεπτικά συστατικά και η συγκέντρωση της αιθανόλης είναι γενικά υψηλή. Οι δύο αυτές συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν σημαντική καθυστέρηση στην ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Lafon-Lafourcade et al., 1983, Beelman et al., 1982) ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των γηγενών στελεχών των βακτηρίων. Παρόλο που η αιθανόλη αναστέλλει γενικά την ανάπτυξη βακτηρίων, η ζύμωση μπορεί ακόμη να συμβεί ακόμα και όταν τα κύτταρα δεν διαιρούνται ενεργά, ή διαιρώντας με βραδύτερο ρυθμό. Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι η πρακτική της διατήρησης του οίνου σε επαφή με τις ζυμομύκητες μπορεί να ενισχύσει τη μηλογαλακτική ζύμωση παρέχοντας στα βακτήρια θρεπτικά συστατικά μέσω της διαδικασίας αυτολύσεως ζύμης (Beelman et al., 1982, Fornachon, 1968). Η αυτολυτική δράση της ζύμης οίνου κατά την παραμονή σε οινολάσπες μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τις συγκεντρώσεις των αζωτούχων ενώσεων διαθέσιμων στα μηλογαλακτικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, πεπτιδίων και πρωτεϊνών (Martinez-Rodriguez et al., 2002, Alexandre et al., 2001, Fornairon-Bonnefond et al., 2001). Επιπλέον, μικρές ποσότητες CO₂ που παράγονται από τις ζύμες κατά τη διάρκεια του ζυμωτικού μεταβολισμού παρέχουν ένα περιβάλλον ευνοϊκό για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Έχει προταθεί ότι το να αφήνουμε τον οίνο με τα κύτταρα των ζυμών ειδικά για τη διατήρηση υψηλότερου

επιπέδου CO₂ μπορεί να ενθαρρύνει περαιτέρω τη μηλογαλακτική ζύμωση (Gallander, 1979).

1.3 Πορεία και παράγοντες που επηρεάζουν τη μηλογαλακτική ζύμωση

Η μείωση της οξύτητας μέσω της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι ιδιαίτερα επιθυμητή για τους οίνους υψηλής περιεκτικότητας σε οξύ που παράγεται σε περιοχές με ψυχρό κλίμα, όπως η Νέα Ζηλανδία και ο Καναδάς. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται συνήθως από βακτήρια γαλακτικού οξέος που απομονώνονται από οίνο, συμπεριλαμβανομένων των *Oenococcus oeni* (πρώην *Leuconostoc oenos*) (Dicks et al., 1995), *Lactobacillus* spp. και *Pediococcus* spp. (Wibowo et al., 1985). Διάφορες τεχνολογίες, όπως βιοαντιδραστήρες με κύτταρα υψηλής πυκνότητας και ακινητοποιημένα κύτταρα ή ένζυμα, έχουν αναπτυχθεί για να διευκολύνουν την μείωση της οξύτητας του οίνου (Maicas et al., 2001).

Αν και η αποξίνωση μέσω της μηλογαλακτικής ζύμωσης αποτελεί πρωταρχικό στόχο στη ζύμωση του οίνου σε περιοχές με ψυχρό κλίμα, ωστόσο είναι απαραίτητη η γνώση του μεταβολισμού των γαλακτικών βακτηρίων για την εκτίμηση της επίδρασης της ζύμωσης στην ποιότητα του οίνου. Η πολυπλοκότητα και η ποικιλομορφία της μεταβολικής δραστηριότητας των γαλακτικών βακτηρίων υποδηλώνουν ότι η ζύμωση μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του οίνου τόσο θετικά όσο και αρνητικά (Lonvaud-Funel, 1999).

Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ των δύο ζυμώσεων, αλκοολικής και μηλογαλακτικής, εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το pH, την περιεκτικότητα σε αιθανόλη και SO₂. Για να είναι επιτυχημένη η μηλογαλακτική ζύμωση, οι τιμές αυτών των χημικών παραμέτρων πρέπει να αντιστοιχούν σε εκείνες που επιτρέπουν στις βακτηριακές καλλιέργειες να λειτουργούν με επιτυχία (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Αυτοί οι οινολογικοί παράγοντες λειτουργούν σε συνέργεια, δηλαδή, οι ενέργειές τους μαζί έχουν μεγαλύτερο συνολικό αποτέλεσμα από το άθροισμα των μεμονωμένων ενεργειών τους. Ομοίως, ένα ευνοϊκό επίπεδο ενός συστατικού μπορεί να αντισταθμίσει ένα δυσμενές επίπεδο ενός ή περισσότερων από τα άλλα συστατικά. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι πολύ δύσκολο να παραχθεί ένας οίνος του οποίου οι αναλύσεις ανταποκρίνονται σε αυτές τις γενικές παραμέτρους. Για να εξασφαλιστεί μία επιτυχής ζύμωση, πρέπει να τηρούνται οι παράμετροι στα επιτρεπτά όρια που ορίζονται από τους διαφορετικούς παραγωγούς (Bauer et al., 2004, Vivas et

al., 2000, Wibowo et al., 1985). Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι σημαντικό να επιλεγθεί το κατάλληλο στέλεχος ζύμης για την παραγωγή του οίνου, καθώς και το σωστό βακτηριακό στέλεχος για να διεξαχθεί η μηλογαλακτική ζύμωση. Ακόμα και όταν όλοι οι χημικοί παράγοντες εμπίπτουν στις επιθυμητές παραμέτρους, η πορεία της ζύμωσης μπορεί να είναι περιστασιακά προβληματική από εξωγενείς παραμέτρους που δεν είναι γνωστοί ακόμα. Οι παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω αναλύονται παρακάτω:

➤ pH:

Το pH επηρεάζει έντονα τη μηλογαλακτική δραστηριότητα του κυττάρου και του μηλογαλακτικού ενζύμου (Henick-Kling et al., 1990, Lafon-Lafourcade et al., 1970). Οι καλλιέργειες του *O. oeni* που αναπτύσσονται σε χαμηλό pH (3,5) αποικοδομούν το μηλικό οξύ γρηγορότερα από αυτές που αναπτύσσονται σε μεγαλύτερο pH (5,5). Το pH του μέσου ανάπτυξης επίσης επηρεάζει τη συγκεκριμένη δραστηριότητα του μηλογαλακτικού ενζύμου. Η μηλογαλακτική δραστηριότητα είναι μεγαλύτερη σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε pH 3,5-4,0 (Henick-Kling et al., 1990, Lafon-Lafourcade et al., 1970).

➤ Αιθανόλη:

Το ποσοστό 5-12% συγκέντρωση σε αιθανόλη δεν είναι ανασταλτικό της μηλογαλακτικής δραστηριότητας στα περισσότερα είδη των γαλακτικών βακτηρίων, αλλά το δυναμικό ανάπτυξης μειώνεται πάνω από το 6%. Η ποσότητα της αιθανόλης που διοχετεύεται στο μέσο ανάπτυξης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μεταβολισμό των σακχάρων και επίσης εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το pH και τη συγκέντρωση του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας (Tracey and Britz, 1989, Davis et al., 1988, Lafon-Lafourcade et al., 1975).

➤ Θειώδες:

Η συγκέντρωση του SO₂ σε οποιαδήποτε μορφή στον οίνο επηρεάζει το μεταβολισμό του *O. oeni* και τη μηλογαλακτική ζύμωση. Συγκέντρωση ελευθέρου SO₂ (πάνω από 10 mg/L) αναχαιτίζει την ανάπτυξη του *O. oeni*. Η δεσμευμένη μορφή του SO₂ σε υψηλή συγκέντρωση (>30 mg/L) καθυστερεί την ανάπτυξη των κυττάρων στον οίνο, ενώ το δεσμευμένο SO₂ (>50 mg/L) μπορεί να αναστείλει εντελώς την ανάπτυξή τους (Wibowo et al., 1985). Η μηλογαλακτική δραστηριότητα του κυττάρου είναι εξίσου ευαίσθητη στο SO₂. Τα 20 mg/L δεσμευμένου SO₂ μειώνουν τη μηλογαλακτική δραστηριότητα

κατά 13% ,τα 50 mg/L μειώνουν κατά 50% και τα 100 mg/L την αναστέλλουν εντελώς (Lafon-Lafourcade et al., 1970).

➤ Θερμοκρασία:

Ο ρυθμός ανάπτυξης και η φάση προσαρμογής των γαλακτικών βακτηρίων επηρεάζονται από την θερμοκρασία. Για τα στελέχη του *O. oeni* η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 22-25 °C. Η επιρροή της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων εξαρτάται από την περιεκτικότητα της αιθανόλης στους οίνους, δηλαδή σε υψηλές θερμοκρασίες η ανοχή των βακτηρίων σε αιθανόλη μειώνεται. Πιο συγκεκριμένα, η βέλτιστη ανάπτυξη των βακτηρίων σε υψηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη (10-14%) παρατηρείται για θερμοκρασίες από 18-25 °C, ενώ αντιθέτως σε χαμηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (0-4%) η θερμοκρασία ανάπτυξης είναι στους 30 °C (Asmundson et al., 1990, Lafon-Lafourcade et al., 1970).

1.4 Επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης στους οίνους

1.4.1 Οξύτητα

Η μηλογαλακτική ζύμωση δεν εφαρμόζεται μόνο στους ερυθρούς οίνους συμβάλλοντας στην ωριμότητά τους αλλά και σε κάποιες λευκές ποικιλίες, όπως είναι το Chardonnay. Η μηλογαλακτική ζύμωση συμβάλλει στην παραγωγή ποιοτικών οίνων, καθώς με την αποκαρβοξυλίωση του μηλικού οξέος του γλεύκους προς γαλακτικό οξύ οδηγεί στη μείωση της οξύτητας όπου συνεπάγεται η αύξηση της τιμής του pH. Αυτό κάνει τον οίνο να αποκτά λιγότερο όξινη γεύση προσδίδοντάς του απαλή γεύση και σώμα. Όπως προαναφέρθηκε, η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιείται κυρίως σε ψυχρές περιοχές επειδή τα σταφύλια έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε μηλικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα, με τη δράση των γαλακτικών βακτηρίων επιτυγχάνεται η μετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ, δηλαδή μία άμεση αποκαρβοξυλίωση με τη βοήθεια του ενός ένζυμου της μηλικής καρβοξυλάσης. Όμως, κάποια είδη των βακτηρίων αυτών μεταβολίζουν το κιτρικό οξύ και αυτό μπορεί να επηρεάσει αρκετά τον σχηματισμό του διακετυλίου και συνεπώς το προφίλ του παραγόμενου οίνου (Henick-Kling, 1993).

Οι μεταβολές της τιτλοδοτούμενης οξύτητας και του pH χαρακτηρίζουν την μηλογαλακτική μετατροπή όπου πραγματοποιείται μείωση της οξύτητας. Η

οργανοληπτική αντίληψη της όξινης γεύσης προκαλείται από την τιτλοδοτούμενη οξύτητα, η οποία πρέπει να ελαττωθεί στο μισό από εκείνη που είναι πριν να ξεκινήσει η μηλογαλακτική μετατροπή και περιέχει το μηλικό οξύ. Η αύξηση του pH συνδέεται με την ρυθμιστική ικανότητα του μέσου του οίνου και με τις συγκεντρώσεις των ασθενών οξέων που βρίσκονται πριν και μετά την αποκαρβοξυλίωση, όπως είναι το γαλακτικό οξύ που είναι πιο ασθενές από το μηλικό οξύ και το αρχικό pH (Boulton et al., 1998). Με δεδομένο την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής μετατροπής μετά την αλκοολική ζύμωση, σημαντική αλλαγή του pH γίνεται μέχρι και 0,2 μονάδες όταν το αρχικό pH είναι γύρω στο 3,4, ενώ όταν το αρχικό pH είναι μικρότερο παρατηρείται στο pH θεωρητική άνοδο 0,1 μονάδες (Boulton et al., 1998). Ωστόσο, η μείωση της οξύτητας επιδιώκεται σε οίνους που παρουσιάζουν μεγάλη οξύτητα, χαμηλό pH και συνεπώς όξινη γεύση, ώστε να προσφέρει μία πιο απαλή νότα. Τέλος, όταν επικρατούν αρχικές μέτριες ή χαμηλές οξύτητες στα γλεύκη των σταφυλιών ή στους οίνους, τότε ίσως χρειαστεί η εφαρμογή προϊόντων που θα αυξήσουν την οξύτητα στα επιτρεπτά όρια για την τιτλοδοτούμενη οξύτητα και το pH. Τέτοια προϊόντα μπορεί να είναι το μηλικό οξύ και το κιτρικό οξύ τα οποία χρησιμοποιούνται μόνο όταν ο οίνος δεν περιέχει γαλακτικά βακτήρια για να μπορέσει να συνεχιστεί η βακτηριακή δραστηριότητα.

1.4.2 Μικροβιακή σταθερότητα

Η διάσπαση του μηλικού οξέος στο γαλακτικό οξύ προσδίδει μικροβιολογική σταθερότητα, ενώ ο σχηματισμός διαφόρων συστατικών έχει επίσης αισθητική επίδραση. Η συνολική μείωση του οξέος μαζί με τη συνοδευτική αύξηση του pH μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερους, πιο ήπιους οίνους με περισσότερο σώμα και ισορροπημένη γεύση (Bauer et al., 2004, Rankine, 1990, Davis et al., 1985, Wibowo et al., 1985, Kunkee, 1967). Με στόχο τη βακτηριακή σταθεροποίηση, χρησιμοποιείται ένα αξιόπιστο γαλακτικό στέλεχος. Τα γαλακτικά βακτήρια είναι απαιτητικά σε θρεπτικά συστατικά και όσο αναπτύσσονται, εξαντλούν τις πηγές θρέψης και έτσι δεν υπάρχει περισσότερη ανάπτυξη για τους άλλους μικροοργανισμούς. Από τη μηλογαλακτική ζύμωση το αυξημένο pH που δημιουργείται μπορεί να επιτρέψει επιπλέον ανάπτυξη άλλων γηγενών στελεχών των γαλακτικών βακτηρίων που είναι λιγότερο εμπλουτισμένα σε θρεπτικά συστατικά και περισσότερο ευαίσθητα στο

αρχικό χαμηλό pH. Στην περίπτωση που η μηλογαλακτική ζύμωση εκτελείται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ή της ωρίμανσης του νέου οίνου μαζί με τις οινολάσπες, τα θρεπτικά συστατικά είναι σε ικανοποιητικό επίπεδο ώστε να εξελιχθούν περισσότερα γαλακτικά βακτήρια και ο οίνος γίνεται μικροβιακά σταθερό. Μπορεί όμως να προκληθεί μία επαναζύμωση αν γίνει ανάμειξη ενός μικροβιακά σταθεροποιημένου οίνου με ένα μη σταθερό.

1.4.3 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά οίνου

Η μηλογαλακτική ζύμωση επιδιώκεται συνήθως και σε οινοποίηση γλευκών χωρίς να έχουν υψηλή οξύτητα και σε θερμές περιοχές με στόχο τον εμπλουτισμό του αρωματικού προφίλ του οίνου που θα παραχθεί. Ο σχηματισμός του μηλικού οξέος είναι το σημαντικότερο γεγονός κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, καθώς η ολική οξύτητα μειώνεται και το μόριο του L-μηλικού οξέος αντικαθίσταται στοιχειομετρικά από το L-γαλακτικό οξύ και αυτό συμβάλλει στις οργανοληπτικές ιδιότητες του οίνου (Lonvaud-Funel, 1999).

Διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν την ένταση ορισμένων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου. Εκτός από τη μείωση της οξύτητας, τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα μεταδίδονται από τη ζύμωση και περιγράφονται ως βουτυρώδη, γαλακτικά, γήινα κ.ά. Η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί επίσης να προσδώσει φρουτώδη και φυτικά αρώματα, καθώς και την αίσθηση πληρότητας του στόματος του οίνου (Dimoroulou et al., 2014). Η καθαρή επίδραση της ζύμωσης στις αισθητικές ιδιότητες του οίνου θα εξαρτηθεί από παράγοντες όπως τα χαρακτηριστικά των βακτηριακών στελεχών, την ένταση των ποικιλιακών αρωμάτων και τις οινολογικές τεχνικές. Παρακάτω περιγράφονται μερικές από τις σημαντικότερες ενώσεις που σχετίζονται με το μεταβολισμό των γαλακτικών βακτηρίων και επιδρούν οργανοληπτικά στον οίνο.

Τα γαλακτικά βακτήρια είναι γνωστά για την ικανότητά τους να παράγουν διακετύλιο (2,3-βουτανодиόνη), μία έντονα αρωματική δικετόνη που χαρακτηρίζεται με ένα βουτυρώδες άρωμα. Αν και μικρές ποσότητες διακετυλίου, 0,2-0,3 mg/L, μπορούν να παραχθούν κατά την αλκοολική ζύμωση, οι επακόλουθες αυξήσεις στην περιεκτικότητα διακετυλίου συνδέονται τυπικά με την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων και τη μηλογαλακτική ζύμωση (Bartowsky, Henschke, 2004, Martineau et

al., 1995, Laurent et al., 1994, Wibowo et al., 1985). Το κατώφλι αντίληψης του διακετυλίου στον οίνο είναι χαμηλό, 0,2-2,3 mg/L και εξαρτάται από τον τύπο του οίνου (Martineau et al., 1995). Ανάλογα με το στυλ και τον τύπο του οίνου, η παραγωγή μικρών ποσοτήτων διακετυλίου, 1-4 mg/L, συμβάλλει στον βουτυρικό χαρακτήρα και θεωρείται επιθυμητή. Ωστόσο, ο σχηματισμός συγκεντρώσεων άνω των 5-7 mg/L μπορεί να είναι επιζήμιος για την ποιότητα του οίνου και μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση (Wibowo et al., 1985, Rankine et al., 1969). Το διακετύλιο παράγεται από το είδος του *O. oeni* ως προϊόν του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος. Σε αυτή την πορεία, το ενδιάμεσο, πυροσταφυλικό οξύ, αποκαρβοξυλώνεται αναγωγικά σε διακετύλιο. Δεδομένου ότι το διακετύλιο είναι χημικά ασταθές, μπορεί περαιτέρω να μεταβολιστεί σε ακετοΐνη και 2,3-βουτανοδιόλη (Bartowsky, Henschke, 2004, Bauer, Dicks, 2004, Ramos et al., 1995). Εκτός από το κιτρικό οξύ, ο μεταβολισμός του διακετυλίου από τα γαλακτικά βακτήρια συνδέεται στενά με τον μεταβολισμό σακχάρων και μηλικού οξέος.

Αν και τα γαλακτικά βακτήρια του οίνου δεν είναι σε θέση να αναπτυχθούν με κιτρικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα (Liu et al., 1995), ο συν-μεταβολισμός της γλυκόζης και του κιτρικού οξέος από το *O. oeni* ενισχύουν την ανάπτυξη των κυττάρων και είναι ενεργειακά πιο ευνοϊκό από ό,τι η ανάπτυξη στη γλυκόζη μόνο (Ramos, Santos, 1996, Cogan, 1987). Είναι σημαντικό από οινολογικό ενδιαφέρον ότι ο συν-μεταβολισμός του κιτρικού οξέος και της γλυκόζης μετατοπίζει επίσης το φάσμα μεταβολικά του τελικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού 2,3-βουτανοδιόλης και μεγαλύτερης παραγωγής οξικού οξέος.

Επίσης, η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να επηρεάσει την αίσθηση σκληρότητας των ερυθρών οίνων μέσω της αύξησης των ανθοκυανινών και με την συμπύκνωση των τανινών (Vivas et al., 1997). Γενικώς, η μεταβολική αλληλεπίδραση των γαλακτικών βακτηρίων του οίνου με τις φαινολικές ενώσεις και τους πολυσακχαρίτες καθώς και την επακόλουθη επίδρασή τους στη γεύση του οίνου, είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το βακτηριακό στέλεχος καθώς και από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες και τα χημικά χαρακτηριστικά του οίνου.

Τα φρουτώδη αρώματα όχι μόνο δεν καταστρέφονται από τη μηλογαλακτική ζύμωση αλλά ενισχύονται. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, τα γαλακτικά βακτήρια του οίνου μπορεί να παράγουν ορισμένους εστέρες, όπως το γαλακτικό αιθύλιο και το οξικό ισοαμύλιο. Η ενζυμική δραστηριότητα των εστερασών στα γαλακτικά βακτήρια του οίνου θα μπορούσε επίσης να μεταβάλει ενδεχομένως το άρωμα του οίνου κατά τη

διάρκεια της ζύμωσης. Τα ενισχυμένα φρουτώδη αρώματα από τη μηλογαλακτική ζύμωση έχουν επίσης συσχετιστεί με τη μείωση των φυτικών αρωμάτων (Krieger et al., 2004, Henick-Kling et al., 1993).

Με την ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση επιτυγχάνεται η γρήγορη έναρξη και ολοκλήρωση της ζύμωσης αυτής χωρίς την ύπαρξη πιθανών αλλοιώσεων του οίνου από άλλα γαλακτικά βακτήρια, ενώ η εμφάνιση της αυθόρμητης μηλογαλακτικής ζύμωσης προϋποθέτει τη δυνατότητα ανάπτυξης των ενδογενών γαλακτικών βακτηρίων και την ανάπτυξη του πληθυσμού τους μέχρι ένα ικανοποιητικό επίπεδο.

Τα επιλεγμένα γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται με δύο τρόπους:

- σε νοπή μορφή σαν υγρή καλλιέργεια και
- σε ξηρή μορφή

Στη νοπή μορφή το στέλεχος πρέπει να καλλιεργηθεί πρώτα σε αποστειρωμένο γλεύκος και να εμβολιαστεί όταν έχει φτάσει στην στατική φάση μετά από 2 έως 3 ημέρες. Σε ξηρή μορφή το βακτηριακό στέλεχος πρέπει να ενυδατωθεί και να επαναδραστηριοποιηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Σημαντικό σημείο της ελεγχόμενης μηλογαλακτικής ζύμωσης αποτελεί ο χρόνος του εμβολιασμού που μπορεί να πραγματοποιηθεί στο γλεύκος πριν από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης ή στον οίνο στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Συνήθως επιλέγεται ο εμβολιασμός να γίνεται στον οίνο στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς ο εμβολιασμός των βακτηρίων στο γλεύκος μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση του οίνου και στην ανάπτυξη των ζυμών.

2. Σκοπός της μελέτης

Είναι γνωστό ότι η μηλογαλακτική ζύμωση δε προτιμάται στις λευκές ποικιλίες παρά μόνο σε συγκεκριμένες λευκές ποικιλίες, όπως το Chardonnay. Το Αηδάνι και το Ασύρτικο αποτελούν χαρακτηριστικές ποικιλίες για την οξύτητά τους και γι' αυτό δεν

είναι ποικιλίες που εμβολιάζονται με γαλακτικά βακτήρια για να διεξαχθεί η μηλογαλακτική ζύμωση μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Το Ασύρτικο της Σαντορίνης παράγει οίνους με έντονο ορυκτό χαρακτήρα καθώς εκφράζει το «terroir» της περιοχής και μπορούν να υποστούν περαιτέρω παλαίωση, ενώ στις υπόλοιπες περιοχές που καλλιεργείται οι οίνοι έχουν ζωηρά αρώματα φρούτων και ελάχιστο πλούσιο «σώμα». Οι οίνοι που προκύπτουν από το Αηδάνι παρουσιάζουν αρώματα με ορυκτές αναφορές που πλησιάζουν κίτρινα φρούτα και συνήθως αυτή η ποικιλία αναμιγνύεται με το Ασύρτικο Σαντορίνης για να δώσει μία ανθώδη νότα στην ορυκτώδη μορφή του ΠΟΠ Σαντορίνη. Με την πάροδο του χρόνου, οι οίνοι αυτών των ποικιλιών μπορούν να παλαιωθούν και σε αυτό συμβάλλει όχι μόνο από τον τρόπο που έχουν οινοποιηθεί αλλά και λόγω της υψηλής οξύτητας που τα χαρακτηρίζει.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι να αξιολογήσει την επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε λευκούς οίνους, των ποικιλιών Αηδάνι και Ασύρτικο και ως προς τη μείωση της οξύτητας και ως προς την ολική διαμόρφωση των οινολογικών χαρακτηριστικών.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Οινοποίηση και Πειραματική πορεία

Στο πειραματικό μέρος της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο οίνοι διαφορετικών ποικιλιών, Ασύρτικο και Αηδάνι, οι οποίοι είχαν ολοκληρώσει την αλκοολική ζύμωση, ώστε να πραγματοποιηθεί η μηλογαλακτική ζύμωση.

3.2 Αλκοολική ζύμωση

Η παραγωγή των οίνων πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και στο εργαστήριο Οινολογίας όπου και ευγενικά παραχωρήθηκαν για το συγκεκριμένο πείραμα. Για την αλκοολική ζύμωση του οίνου ακολουθήθηκε πρωτόκολλο λευκής οινοποίησης. Η συγκομιδή 65 περίπου κιλών σταφυλιών της ποικιλίας Ασύρτικο και Αηδάνι, που είχαν αποκτήσει 220 gr σακχάρων/L και εν συνεχεία μεταφέρθηκαν σε πλαστικά τελάρα. Για την ακρίβεια, τοποθετήθηκαν σε ψυκτικό θάλαμο στους 1 °C, με στόχο τη μείωση της θερμοκρασίας των σταφυλιών για την αποφυγή οξειδωσής τους. Ύστερα από 24 ώρες ακολούθησε η αποβοστρύχωση χειρωνακτικά και ο εκραγισμός με χειροκίνητο θλιπτήρα. Εν συνεχεία, ο σταφυλοχυμός μαζί με τα στέμφυλα

μεταφέρθηκε σε μία μικρή δεξαμενή οινοποίησης inox με ελεγχόμενη ψύξη στους 10 °C, ώστε να επιτύχουμε εκχύλιση ανθοκυανών για την παραγωγή χρώματος όπου αναδευόταν χειρωνακτικά. Κατά τον εκραγισμό και μετέπειτα στο σταφυλοπολτό πραγματοποιήθηκε θείωση με προσθήκη 3 g/hl sodium metabisulfite, καθώς επίσης και η προσθήκη ενζύμων απολάσπωσης 30 g/tn. Μετά την εκχύλιση πιέστηκε η σταφυλομάζα για την παραλαβή του γλεύκους, το οποίο επανατοποθετήθηκε σε ψυκτικό θάλαμο για καλύτερη στατική απολάσπωση και αποφυγή έναρξης της αλκοολικής ζύμωσης λόγω μικρής ποσότητας θείωσης. Ύστερα από 24 ώρες συλλέχθηκε το καθαρό γλεύκος και ακολούθησε ο εμβολιασμός με ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* 20 g/hl (UCLM S325, Fermentis, France) καθώς επίσης και θρεπτικά για τους ζυμομύκητες 20 g/hl (Bioferm, Fermentis, France). Κατά την αλκοολική ζύμωση, η μέση θερμοκρασία ήταν 20 °C, ενώ όποτε θεωρείτο απαραίτητο γινόταν ανάδευση για την χορήγηση επαρκούς οξυγόνου. Σε καθημερινή βάση για την παρακολούθησή της, γίνονταν οι απαραίτητες μετρήσεις του Baumé, της πυκνότητας και της θερμοκρασίας. Επίσης γινόταν μέτρηση του pH και της ολικής οξύτητας του γλεύκους, όποτε κρινόταν απαραίτητο. Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε μετά από 9 ημέρες.

3.3 Μηλογαλακτική ζύμωση

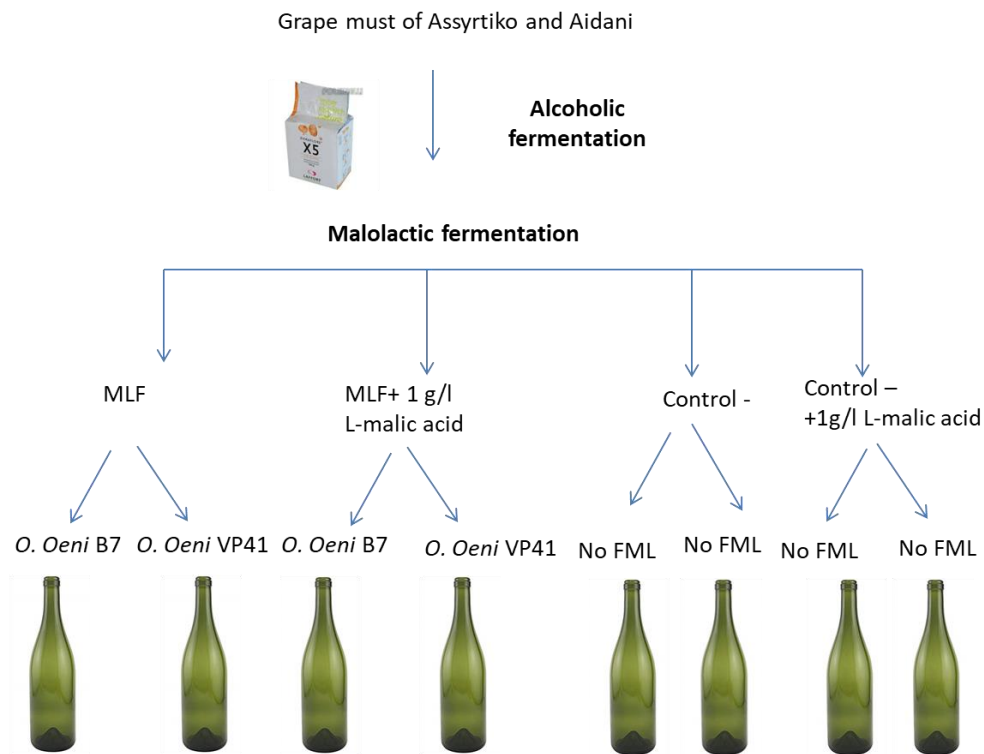
Οι οίνοι ευγενικά παραχωρήθηκαν από το ΓΠΑ. Στην αρχή έγινε μετάγγιση των οίνων σε γυάλινες φιάλες των 750mL τηρώντας τις ασηπτικές συνθήκες (Εικόνα 3). Σε κάθε φιάλη προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα L-μηλικού οξέος για φτάσει τα 1 g/L. Ύστερα, εμβολιάστηκαν όλες οι φιάλες, εκτός από τους μάρτυρες, ξεχωριστά με τα 2 στελέχη βακτηρίων B7 και VP41 και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε σε βιολογική επανάληψη (24 φιάλες). Αφού πέρασαν οι 3 μέρες, οι φιάλες πάρθηκαν και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός μηλικού οξέος με τη διαδικασία του ενζυμικού ΚΙΤ. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε άλλες 3 φορές, ώστε να υπάρξει εξέλιξη και ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων τα ίδια δείγματα μετρήθηκαν και με το μηχάνημα WineScan στην αρχή αλλά και στο τέλος των 4 εβδομάδων. (Εικόνα 4).



Εικόνα 3: Οι πειραματικές φιάλες.

Για κάθε ποικιλία (Ασύρτικο και Αηδάνι) , χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες σε διπλή επανάληψη:

- Μάρτυρας (μη πραγματοποίηση μηλογαλακτικής ζύμωσης)
- Μάρτυρας +1 g/L μηλικού οξέος
- Προσθήκη του στελέχους *O.oeni* B7
- Προσθήκη του στελέχους *O.oeni* B7 +1 g/L μηλικού οξέος
- Προσθήκη του στελέχους *O.oeni* VP41
- Προσθήκη του στελέχους *O.oeni* VP41 +1 g/L μηλικού οξέος



Εικόνα 4: Σχεδιάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας.

3.4 Οινολογικές αναλύσεις

3.4.1 Προσδιορισμός μέσω WineScan Flex

Η πορεία της ζύμωσης μελετήθηκε μέσω του ειδικού μηχανήματος WineScan Flex. Το WineScan Flex αποτελείται από το λογισμικό του αναλυτή και του ολοκληρωτή Foss. Ο προσωπικός υπολογιστής δεν περιλαμβάνεται. Οι επιλογές για το WineScan Flex περιλαμβάνουν τη δυνατότητα αναβάθμισης με την ενότητα χρωμάτων και την αυτόματη έκδοση με το XY Auto Sampler. Για την προετοιμασία δειγμάτων πρέπει να προσφέρεται μια μονάδα χειροκίνητης ή αυτόματης διήθησης.

Το WineScan Flex έχει χειροκίνητη λήψη δειγμάτων. Οι μετρήσεις του είναι κυρίως οι εξής:

- σε τελικό οίνο μετράει: αιθανόλη, γλυκόζη, φρουκτόζη, μηλικό οξύ, πτητικό οξύ, ολικό οξύ και pH, ενώ
- σε μούστο μετράει: μηλικό οξύ, τρυγικό οξύ, ολικό οξύ, πυκνότητα, brix και pH.

Για τις σημαντικότερες από τις παραπάνω αναλυτικές παραμέτρους δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί οι παρακάτω προδιαγραφές :

Πίνακας 1: Παράμετροι του WineScan με τις παρακάτω προδιαγραφές.

Αναλυτική παράμετρος (σε έτοιμο οίνο)	Ακρίβεια	Επαναληψιμότητα
Αιθυλική αλκοόλη	0,08 +/- 0,005	0,01 +/- 0,005
Ολική οξύτητα	0,01 +/- 0,003	0,009 +/- 0,0005
Πτητική οξύτητα	0,03 +/- 0,005	0,007 +/- 0,0005
pH	0,03 +/- 0,005	0,005 +/- 0,0005
Ανάγοντα σάκχαρα	0,5 +/- 0,05	0,09 +/- 0,005
Μηλικό οξύ	0,18 +/- 0,005	0,045 +/- 0,005

Το WineScan είναι η λύση για το πολυάσχολο εργαστήριο που απαιτεί γρήγορη και ακριβή ανάλυση. Οι έτοιμες βαθμονομήσεις επιτρέπουν ταυτόχρονη ανάλυση των σημαντικών ποιοτικών παραμέτρων του οίνου. Η προετοιμασία των δειγμάτων είναι εύκολη, καθώς δεν απαιτείται προθέρμανση ή χημική προ επεξεργασία. Το κόστος ανά δείγμα είναι χαμηλό καθώς δεν απαιτούνται δαπανηρά αντιδραστήρια. Η αυτόματη λειτουργία ροής και η λειτουργία ρύθμισης zero εξασφαλίζουν αξιόπιστα και συνεπή αποτελέσματα. Τα δείγματα οίνου στις βαθμονομήσεις αντιπροσωπεύουν κόκκινους, λευκούς και ροζέ οίνους, οι οποίοι τελικά προσφέρουν αξιόπιστη βαθμονόμηση.

Συνοπτικά, τα χαρακτηριστικά του WineScan Flex είναι τα παρακάτω:

- γρήγορη και ευέλικτη λύση ως προς τις αναλύσεις των ποιοτικών παραμέτρων στον οίνο,
- προσδιορισμός των κύριων παραμέτρων ποιότητας σε μία μόνο ανάλυση,
- χαμηλό κόστος του αντιδραστηρίου ανά ανάλυση και εύκολη η προετοιμασία του δείγματος,
- η πλατφόρμα λογισμικού Foss Integrator με εργαλεία ιχνηλασιμότητας, απόδοση πρόβλεψης και ανίχνευση εξωστρέφειας εξασφαλίζει την ασφάλεια διαχείρισης και αποθήκευσης των δεδομένων,
- το προαιρετικό πακέτο λογισμικού διευκολύνει την ανάπτυξη εξατομικευμένων βαθμονομήσεων ή νέων παραμέτρων,

- δυνατότητα μέτρησης των A₄₂₀, A₅₂₀ και A₆₂₀ με οπτική φασματοσκοπία και
- ευέλικτη λύση με ποικιλία προαιρετικών ενοτήτων και εφαρμογές που ταιριάζουν με τις ανάγκες ανάλυσης.

Το WineScan Flex διαθέτει ένα FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) συμβολόμετρο που σαρώνει το πλήρες φάσμα υπέρυθρων. Η συλλογή δεδομένων από όλο το φάσμα επιτρέπει την ανάλυση πολλών παραμέτρων. Η ανάλυση των νέων παραμέτρων είναι μόνο ζήτημα της εξέλιξης βαθμονόμησης.

Στην πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε το WineScan Flex, στην αρχή από τα δείγματα λήφθηκαν 50 mL για να φυγοκεντρηθούν. Όταν ολοκληρώθηκε η φυγοκέντρωση, με το σιφώνι των 10 mL λήφθηκαν 10 mL δείγματος από καθένα και τοποθετήθηκαν στους δοκιμαστικούς σωλήνες στο στατό που διαθέτει το WineScan Flex για τα δείγματα. Τα 10 mL που φυγοκεντρήθηκαν για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της μέτρησης που περιγράφεται παρακάτω:

Πρωτόκολλο μηχανήματος WineScan Flex

1. Προετοιμάζονται αρχικά τα αντιδραστήρια zero και clean ώστε να τοποθετηθούν στα ειδικά δοχεία που βρίσκονται μέσα στο μηχάνημα. Για το zero χρειάζεται ένα κουταλάκι από το αντιδραστήριο σε 500 mL νερού, ενώ για το clean χρειάζονται 10 mL από το αντιδραστήριο σε 1 L νερού και σε κάθε περίπτωση ανακατεύουμε.
2. Ενεργοποιείται ο υπολογιστής και εισέρχεται στο πρόγραμμα λειτουργίας του WineScan.
3. Τοποθετούνται τα δείγματα που θα μετρηθούν στη σειρά στους κυλίνδρους επάνω στο στατό.
4. Αφού ξεκινήσει το πρόγραμμα, τοποθετείται ο ανάλογος κωδικός ούτως ώστε να ξεκινήσει να λειτουργεί το μηχάνημα και αφού πρασινίσουν οι κουκίδες που θα εμφανιστούν στην οθόνη, το πρόγραμμα είναι έτοιμο για λειτουργία.
5. Αρχικά μηδενίζεται το μηχάνημα έτσι ώστε να μην υπάρξουν λάθη στις μετρήσεις.
6. Αφού επιλεγεί τι δείγμα θα μετρηθεί (οίνος, μούστος κ.λ.π.), επιλέγεται από ποια σειρά θα παίρνει δείγμα και επιλέγεται ο οίνος ή το μούστο αντίστοιχα.
7. Το μηχάνημα αφού πάρει το δείγμα εμφανίζει τα αποτελέσματα στην οθόνη και κάθε φορά που ολοκληρώνει μια μέτρηση κάνει clean μόνο του.

8. Όταν σταματήσει η προηγούμενη διαδικασία πραγματοποιείται μέτρηση στο επόμενο δείγμα.

9. Αφού ολοκληρωθούν όλες οι μετρήσεις, αποθηκεύονται τα αποτελέσματα σε φάκελο και μπορεί να κλείσει το πρόγραμμα και ο υπολογιστής, ενώ το WineScan θα παραμείνει σε λειτουργία.

Το WineScan αφού λειτουργήσει και εμφανίσει τα αποτελέσματα για το δείγμα που μετρήθηκε, εμφανίζει τις παραμέτρους τις οποίες θα χρειαστούν για τη διεξαγωγή του πειράματος. Οι παράμετροι αυτοί ονομαστικά είναι οι εξής:

- ο αλκοολικός βαθμός (% vol),
- το pH,
- η πυκνότητα (Density),
- το μηλικό οξύ (MalAcid),
- η ολική οξύτητα (TotAcid),
- η πτητική οξύτητα (VolAcid),
- τα ανάγοντα σάκχαρα κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη (GluFruc),
- ο οξικός αιθυλεστέρας (EthylAcet),
- το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FolinC),
- το γλυκονικό οξύ (GluAcid),
- η γλυκερίνη (Glycer),
- το γαλακτικό οξύ (LactAcid), τ
- ο κιτρικό οξύ (CitrAcid),
- το τρυγικό οξύ (TartAcid),
- η περιεκτικότητα σε σάκχαρα (RedSug) και
- οι περιοχές φάσματος A_{420} , A_{520} και A_{620} .

Με βάση τις μετρήσεις αυτών θα πραγματοποιηθεί η σύγκριση των αποτελεσμάτων ούτως ώστε να γίνει αντιληπτό κατά πόσο το πείραμα ήταν επιτυχές.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι για την επιβεβαίωση αξιοπιστίας του μηχανήματος όσον αφορά τα αποτελέσματα αλλά και τη σωστή λειτουργία του, δόθηκαν δείγματα οίνου, τα οποία είχαν ήδη μετρηθεί από την ομάδα οινοποίησης της σχολής, και τοποθετήθηκαν στο WineScan ώστε να μετρηθούν ξανά και τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν παρόμοια με πολύ μικρές αποκλίσεις μεταξύ τους.

Ύστερα, πάρθηκαν τα η δείγματα οίνου με τα οποία πραγματοποιήθηκε η εργασία και ξεκίνησαν οι μετρήσεις.

3.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός μηλικού οξέος με ενζυμικό ΚΙΤ

Η πιο συχνή ποσοτική αναλυτική μέθοδος για την παρακολούθηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι ο ενζυματικός προσδιορισμός του L-μηλικού οξέος. Έτσι, για τον προσδιορισμό της ποσότητας του μηλικού οξέος στους οίνους χρησιμοποιήσαμε ενζυμικό ΚΙΤ (Enzymatic L-malic acid kit), το οποίο παρουσιάζει εξαιρετική ακρίβεια αν και είναι αρκετά δαπανηρό και έχει μικρή διάρκεια ζωής μετά την ενεργοποίηση των αντιδραστηρίων.

Πιο συγκεκριμένα, αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί το ένζυμο μηλική αφυδρογονάση (L-MDH) που αντιδρά ειδικά με το L-μηλικό οξύ και στο τέλος της αντίδρασης το δείγμα περνάει από φασματοφωτόμετρο ορατού με υπεριώδη ακτινοβολία για παρακολούθηση της προόδου της ενζυμικής αντίδρασης. Όσο αφορά τις ποσότητες ακολουθήθηκε το ακριβές πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Στην αγορά υπάρχουν σετ από κατασκευαστές που περιέχουν όλα τα αντιδραστήρια, τα ένζυμα και τις διαδικασίες που απαιτούνται για την μέτρηση. Αυτή η ενζυμική τεχνική είναι ικανή της ποσοτικοποίησης του L-μηλικού οξέος σε πολύ χαμηλά επίπεδα και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν απαιτείται αραιώση του δείγματος. Αν όμως το δείγμα είναι υπερβολικά θολό, τότε θα πρέπει να διευκρινιστεί με φυγοκέντρηση ή διήθηση πριν από την ανάλυση. Τα αντιδραστήρια πρέπει να ψύχονται και πριν την χρήση τους να επιστρέφονται σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου είναι συνήθως διαθέσιμα εντός 30 λεπτών ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που αναλύονται. Ένα υπολογιστικό φύλλο υπολογισμών συμβάλλει στην διεξαγωγή των υπολογισμών που απαιτούνται σε κάθε τεστ με γρήγορο και εύκολο τρόπο.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό του μηλικού οξέος με το ενζυμικό ΚΙΤ παρουσιάζονται παρακάτω:

- solution 1: ρυθμιστικό διάλυμα με pH 10,0, γλουταμινικό οξύ
- solution 2: συνένζυμο NAD

- solution 3: εναιώρημα του ενζύμου τρανσαμινάση του γλουταμινικού-οξαλοξικού (160 U)
- solution 4: διάλυμα του ενζύμου μηλική αφυδρογονάση (2400 U)
- solution 5: διάλυμα ελέγχου ανάλυσης L-μηλικού οξέος για σκοπούς ελέγχου ανάλυσης

Διαδικασία προσδιορισμού μηλικού οξέος με ενζυμικό ΚΙΤ:

1. Αρχικά εκτελείται φιλτράρισμα των οίνων με τη βοήθεια φίλτρου 0,2 mm.
2. Στη συνέχεια σε δύο ογκομετρικές φιάλες, καθώς υπάρχουν δύο οίνοι και δύο μάρτυρες, πραγματοποιήθηκε αραίωση 1:10 στα δείγματα. Συνεπώς, στην ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε 1 mL οίνου και μετά συμπληρώθηκε 9 mL απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.
3. Ύστερα προσθέσαμε σε όλες τις κυψελίδες τα ακόλουθα:
 - 500 μl από το solution 1
 - 100 μl από το solution 2
 - 5 μl από το solution 3
 - 50 μl δείγματος στις 2 κυψελίδες που θα έχουν τους μάρτυρες
 - 50 μl solution 5 στο standard
 - 450 μl απιονισμένο νερό σε όλες τις κυψελίδες εκτός από το blank
 - 500 μl απιονισμένο νερό μόνο στο blank
4. Αφού έχει ανοιχτεί το φασματοφωτόμετρο εκτελούνται τα παραπάνω βήματα και ακολούθως ανακινείται με ειδικό κούμπωμα το περιεχόμενο που βρίσκεται στις κυψελίδες και αφήνονται για 3 λεπτά εν ηρεμία.
5. Μετά τα 3 λεπτά ακινητοποίησης των κυψελίδων, μηδενίζεται το φασματοφωτόμετρο με μία κυψελίδα με απιονισμένο νερό και μετρούνται οι απορροφήσεις των κυψελίδων στα 340 nm και έτσι προκύπτει το A_1 σε κάθε περίπτωση.
6. Προστίθεται 5 μl από το solution 4 σε όλες τις κυψελίδες και αφού ανακατευτεί το περιεχόμενο τους αφήνονται για 10 λεπτά εν ηρεμία.
7. Αφού περάσουν τα 10 λεπτά μηδενίζεται ξανά το φασματοφωτόμετρο με μία κυψελίδα με απιονισμένο νερό και μετρούνται οι απορροφήσεις των κυψελίδων στα 340 nm και προκύπτει το A_2 σε κάθε περίπτωση.

8. Στο τέλος υπολογίζουμε τη συγκέντρωση με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου έχοντας τα παραπάνω αποτελέσματα από τις απορροφήσεις A_1 και A_2 :

$$c = [V * MW / \epsilon * d * v * 1000] * \Delta A \text{ \{g/L\}} \quad (3.1)$$

Όπου:

V: τελικός όγκος {mL}

v: όγκος δείγματος {mL}

MW: μοριακό βάρος μηλικού {g/mol}

d: πάχος κυψελίδας {cm}

ϵ : συντελεστής απορρόφησης του NADH, 340nm: $\epsilon = 6,3 \{1 * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}\}$

ΔA : διαφορά απορρόφησης δείγματος-blank

Αντικαθιστώντας την (3.1.) προκύπτει για το μηλικό οξύ:

$$c = [2,220 * 134,09 / \epsilon * 1,00 * 0,100 * 1000] * \Delta A = [2,977 / \epsilon] * \Delta A \text{ \{g μηλικού οξέος /L δείγματος solution\}} \quad (3.2)$$

Στην περίπτωση που το δείγμα αραιώθηκε κατά την προετοιμασία της διαδικασίας, πρέπει η ποσότητα του μηλικού οξέος που υπολογίστηκε (3.2) να πολλαπλασιαστεί με τον συντελεστή αραιώσης F, ώστε να υπολογιστεί η σωστή περιεκτικότητα του μηλικού οξέος στο δείγμα.

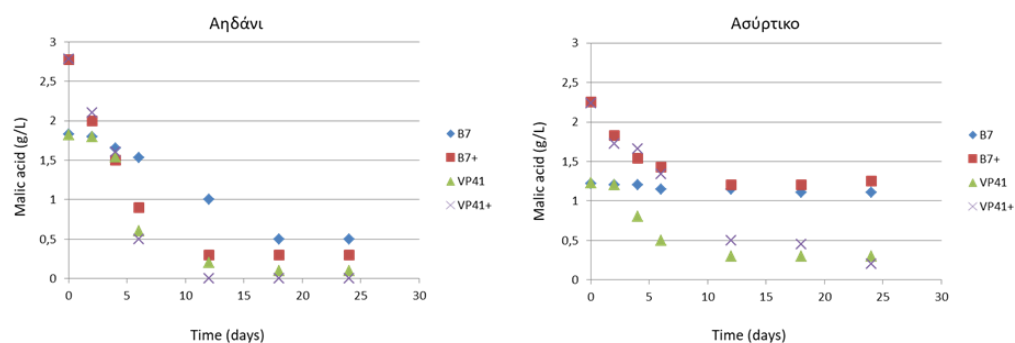
4. Αποτελέσματα

4.1 Πορεία Μηλογαλακτικής ζύμωσης

Αρχικά στους παραγόμενους οίνους μελετήθηκε η ζυμωτική ικανότητα των δυο στελεχών του γαλακτικού βακτηρίου, VP41 και B7, να πραγματοποιήσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση σε οίνους της ποικιλίας Αηδάνι και Ασύρτικο, σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις μηλικού οξέος σε κάθε περίπτωση. Η συγκέντρωση των οίνων σε L-μηλικό οξύ για την ποικιλία Αηδάνι ήταν αρχικά στα 1,7 g/L, ενώ στην ποικιλία Ασύρτικο 1,3 g/L και προστέθηκε σε κάθε περίπτωση και 1 g/L για να φτάσει τελική συγκέντρωση 2,7 g/L και 2,3 g/L αντίστοιχα.

Με βάση τα αποτελέσματα το στέλεχος VP41 του *O.oeni* κατάφερε να μεταβολίσει το μηλικό οξύ (τελικό $C < 0,2$ g/L) σε όλες τις συνθήκες μετά από 24 μέρες. Αντίθετα το στέλεχος B7 κατάφερε να μεταβολίσει τελείως το μηλικό οξύ μόνο

στην περίπτωση του οίνου της ποικιλίας Αηδάνι και μόνο στον οίνο με προστιθέμενη ποσότητα οξέος. Στις υπόλοιπες συνθήκες είτε παρέμεινε 0,5 g/L L-μηλικού οξέος είτε όπως στην ποικιλία Ασύρτικο παρέμεινε πάνω από 1 g/L του συγκεκριμένου οξέος.

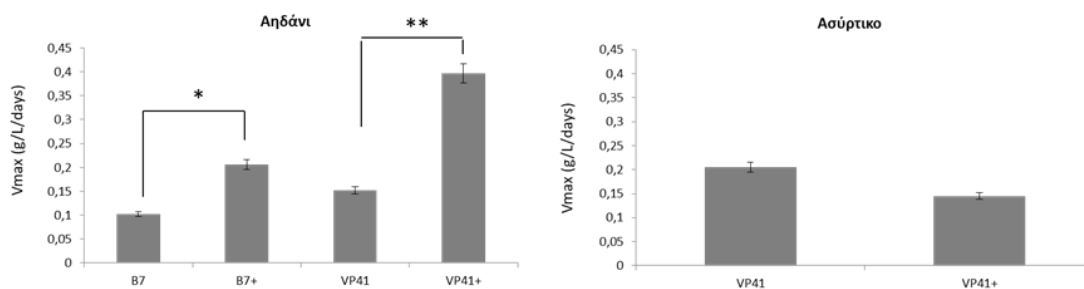


Σχήμα 1: Πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης στους λευκούς οίνους Αηδάνι και Ασύρτικο.

4.2 Επίδραση των διαφορετικών συνθηκών της μηλογαλακτικής ζύμωσης στα οινολογικά χαρακτηριστικά του οίνου

4.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος στην ταχύτητα της μηλογαλακτικής ζύμωσης

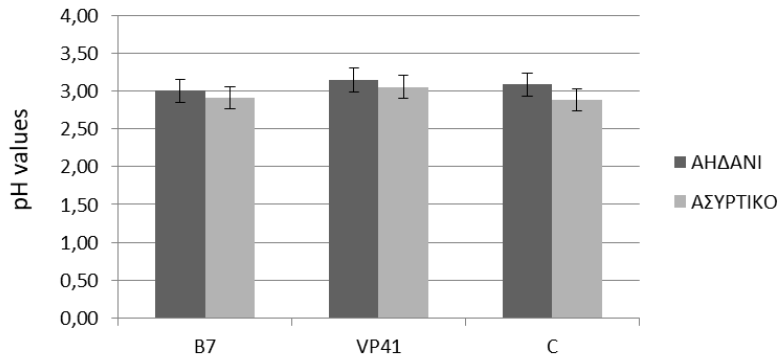
Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται ο ρυθμός μεταβολισμού του μηλικού οξέος στις δύο ποικιλίες, Αηδάνι και Ασύρτικο, με τη χρήση των διαφορετικών στελεχών του γαλακτικού βακτηρίου, B7 και VP41. Η προσθήκη 1 g/L μηλικού οξέος αυξάνει το ρυθμό της μηλογαλακτικής ζύμωσης και για τα δύο στελέχη στον οίνο της ποικιλίας Αηδάνι. Στην περίπτωση του Ασύρτικου παρατηρείται μία τάση για μείωση στην ταχύτητα της μηλογαλακτικής ζύμωσης για το στέλεχος VP41.



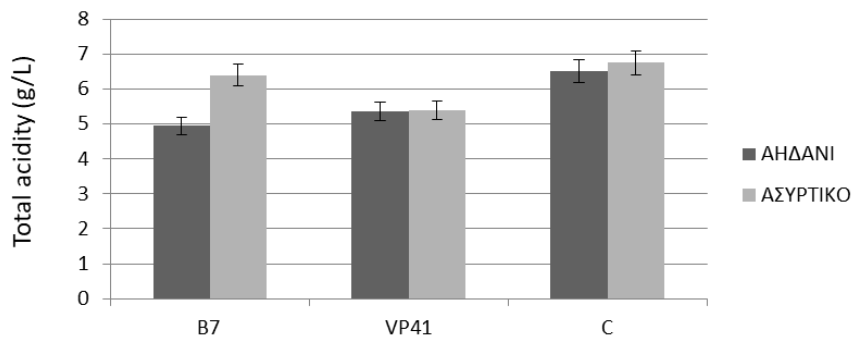
Σχήμα 2: Η ταχύτητα της μηλογαλακτικής ζύμωσης στους διαφορετικούς λευκούς οίνους.

4.2.2 Επίδραση του βακτηριακού στελέχους

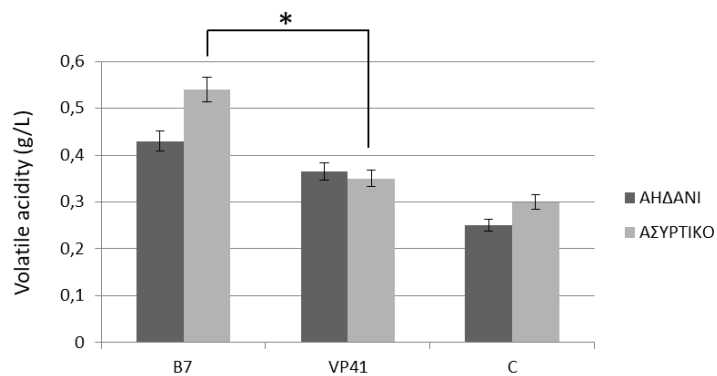
Η χρήση του διαφορετικού βακτηριακού στελέχους δίνει την δυνατότητα να διαφοροποιηθούν οινολογικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων τόσο μεταξύ του όσο και με τον οίνο μάρτυρα (C) που δεν πραγματοποίησε τη μηλογαλακτική ζύμωση. Οι 2 μάρτυρες με και χωρίς την προσθήκη μηλικού οξέος παρουσιάζονται σαν C για ευκολία παρουσίασης των αποτελεσμάτων καθώς σε κανέναν δεν πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση. Οι μετρήσεις που έγιναν με τη βοήθεια του WineScan παρουσιάζονται στα διαγράμματα και δείχνουν ότι το pH είναι περίπου ίδιο και στις δύο περιπτώσεις και κυμαίνεται κοντά στο 3,00 που είναι στα επιτρεπτά όρια για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων χωρίς να διαφοροποιεί σημαντικά τις συνθήκες μεταξύ τους. Η τιμή του μάρτυρα και για τις δύο ποικιλίες δεν είναι σημαντικά χαμηλότερη όπως θα ήταν αναμενόμενο (Σχήμα 3). Η ολική οξύτητα μειώνεται σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς όμως η παρατηρούμενη διαφορά να είναι σημαντική (Σχήμα 4). Αντιθέτως όσον αφορά την παραγωγή οξικού οξέος η πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης με το στέλεχος *O.oeni* B7 αυξάνει σημαντικά σε σχέση με τις δύο άλλες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση 0,1 g/L για τον οίνο της ποικιλίας Αηδάνι και 0,2 g/L για τον οίνο από την ποικιλία Ασύρτικο (Σχήμα 5).



Σχήμα 3: Επίδραση του βακτηριακού στελέχους στο pH στο Αηδάνι και το Ασύρτικο. Η συνθήκη C αντιστοιχεί στον οίνο Μάρτυρα που δεν πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση.

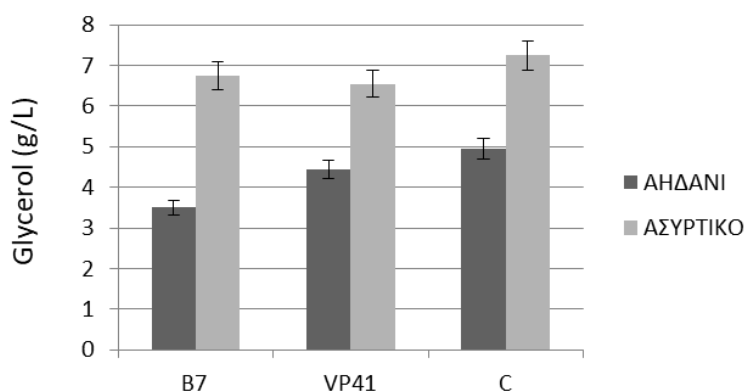


Σχήμα 4: Επίδραση του βακτηριακού στελέχους στην ολική οξύτητα στο Αηδάνι και το Ασύρτικο. Η συνθήκη C αντιστοιχεί στον οίνο Μάρτυρα που δεν πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση.



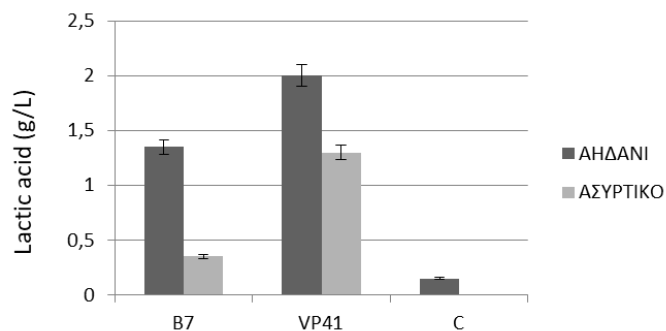
Σχήμα 5: Επίδραση του βακτηριακού στελέχους στη πτητική οξύτητα στο Αηδάνι και το Ασύρτικο. Η συνθήκη C αντιστοιχεί στον οίνο Μάρτυρα που δεν πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση.

Συγκρίνοντας τη συγκέντρωση της γλυκερόλης στους παραγόμενους οίνους, παρατηρείται ότι η μηλογαλακτική ζύμωση με τα δύο συγκεκριμένα στελέχη τείνει να μειώσει αλλά όχι σημαντικά την ποσότητα της υπάρχουσας γλυκερόλης συγκριτικά με το μάρτυρα. Η παρατήρηση αυτή είναι πιο έντονη για το στέλεχος B7 και στον οίνο της ποικιλίας Αηδάνι. Είναι σημαντικό ότι οι οίνοι πριν τη μηλογαλακτική ζύμωση περιείχαν διαφορετική συγκέντρωση γλυκερόλης ενώ ζυμώθηκαν με το ίδιο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*.



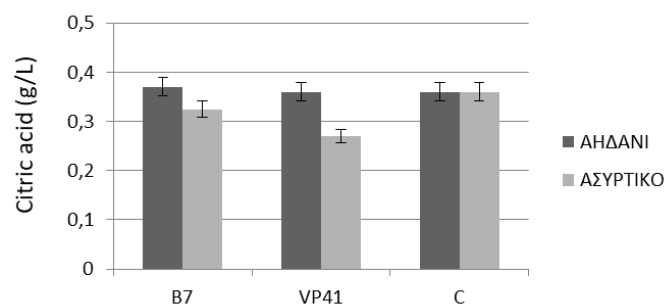
Σχήμα 6: Επίδραση του βακτηριακού στελέχους στη γλυκερόλη στο Αηδάνι και το Ασύρτικο. Η συνθήκη C αντιστοιχεί στον οίνο Μάρτυρα που δεν πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση.

Με την επίτευξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ προσδίδοντας μικροβιακή σταθερότητα στον παραγόμενο οίνο. Το στέλεχος VP41 παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος σε αντίθεση με το B7 όπως και ήταν αναμενόμενο καθώς το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίασε ιδιαίτερα χαμηλή ζυμωτική ικανότητα ιδιαίτερα στον οίνο της ποικιλίας Ασύρτικο (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Επίδραση του βακτηριακού στελέχους στο γαλακτικό οξύ στο Αηδάνι και το Ασύρτικο. Η συνθήκη C αντιστοιχεί στον οίνο Μάρτυρα που δεν πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση.

Η ικανότητα μεταβολισμού του κιτρικού οξέος του οίνου συσχετίζεται άμεσα με το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου *O.oeni* που θα χρησιμοποιηθεί για να πραγματοποιήσει τη μηλογαλακτική ζύμωση. Με βάσει τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης ο μεταβολισμός του κιτρικού οξέος δεν εξαρτάται μόνο από το στέλεχος του εκάστοτε βακτηρίου αλλά και από την ποικιλία του οίνου. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση του κιτρικού οξέος, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά, για το στέλεχος VP41 στην ποικιλία Ασύρτικο (Σχήμα 8).

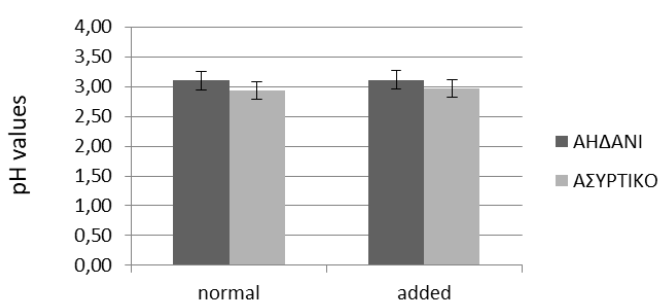


Σχήμα 8: Επίδραση του βακτηριακού στελέχους στο κιτρικό οξύ στο Αηδάνι και το Ασύρτικο. Η συνθήκη C αντιστοιχεί στον οίνο Μάρτυρα που δεν πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση.

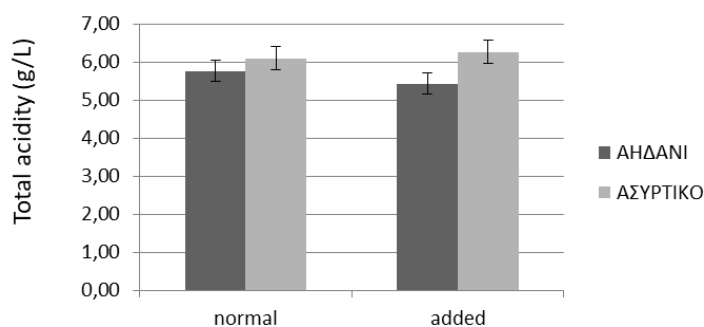
4.2.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος

Η παρούσα μελέτη στόχευε να μελετήσει όχι μόνο την επίδραση της μηλογαλακτικής ζύμωσης στις λευκές ποικιλίες οίνου αλλά και στο κατά πόσο επηρεάζει η συγκέντρωση του μηλικού οξέος που μεταβολίζεται κατά τη διάρκεια της

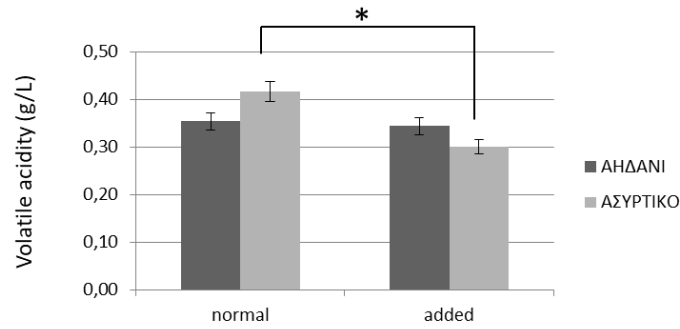
συγκεκριμένης βιομετατροπής. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήμα 9-13) αποτελούν το μέσο όρο των οίνων που ζυμώθηκαν και από τα δύο στελέχη του γαλακτικού βακτηρίου με την προσθήκη L-μηλικού οξέος (1 g/L). Με βάση τα αποτελέσματα η συγκέντρωση του μηλικού οξέος που μεταβολίζεται από τα γαλακτικά βακτήρια δεν επηρεάζει την τιμή το pH του τελικού οίνου (Σχήμα 9), την ολική οξύτητα (Σχήμα 10), το ποσοστό γλυκερόλης (Σχήμα 12) ή κιτρικού οξέος (Σχήμα 13). Αντίθετα, επηρεάζεται η πτητική οξύτητα του οίνου σε σημαντικό βαθμό, καθώς η υψηλότερη συγκέντρωση μηλικού μειώνει την τελική πτητική οξύτητα κατά 0,1 g/L για τον οίνο της ποικιλίας Ασύρτικο (Σχήμα 11).



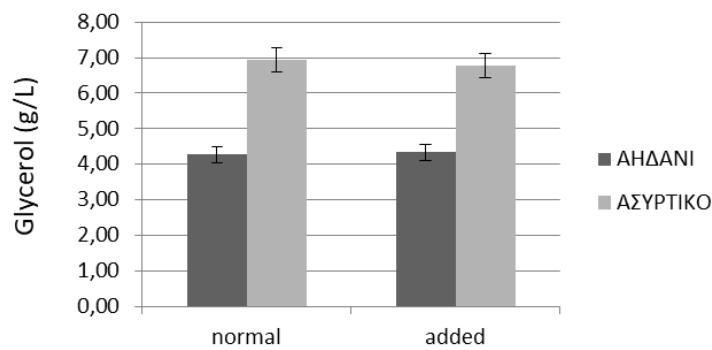
Σχήμα 9: Επίδραση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος στο pH στο Αηδάνι και το Ασύρτικο.



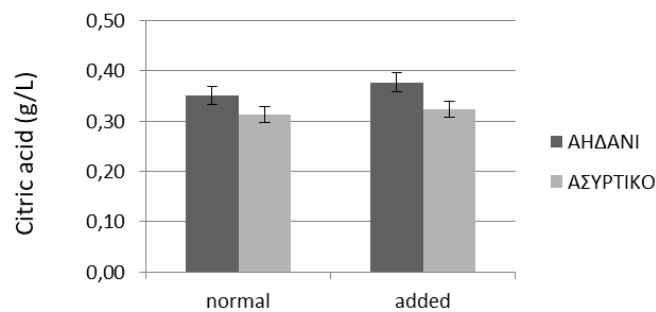
Σχήμα 10: Επίδραση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος στην ολική οξύτητα στο Αηδάνι και το Ασύρτικο.



Σχήμα 11: Επίδραση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος στην πτητική οξύτητα στο Αηδάνι και το Ασύρτικο.



Σχήμα 12: Επίδραση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος στη γλυκερόλη στο Αηδάνι και το Ασύρτικο.

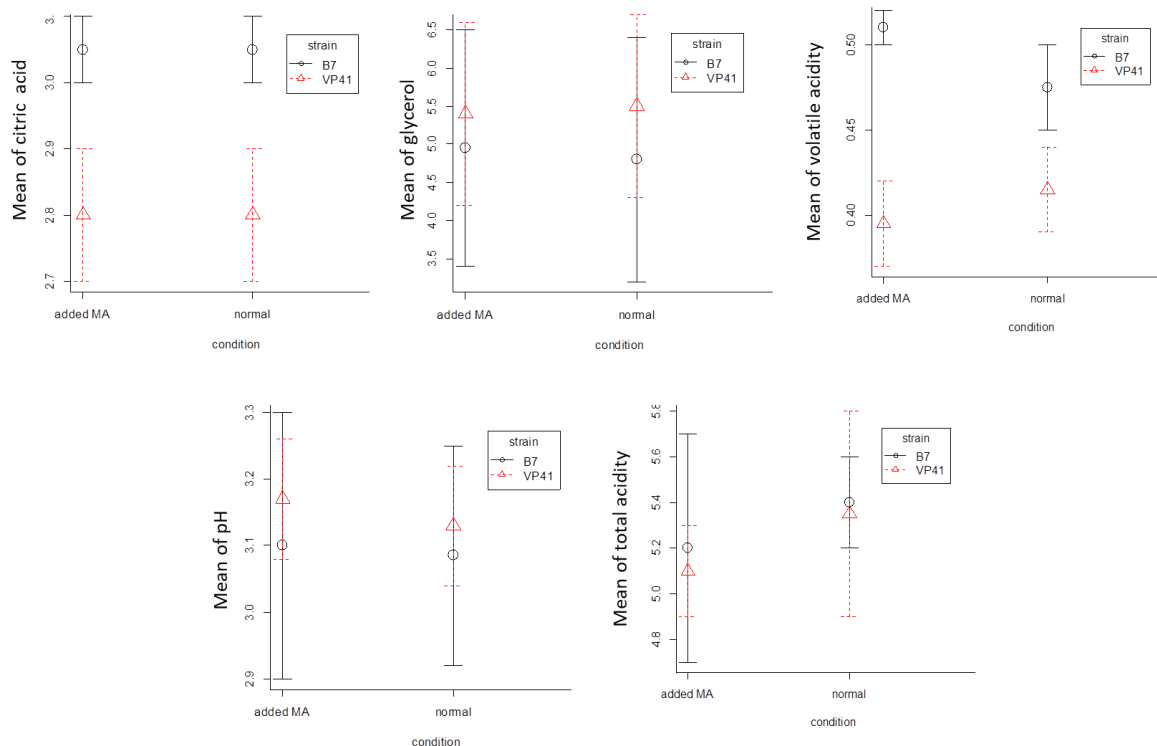


Σχήμα 13: Επίδραση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος στο κιτρικό οξύ στο Αηδάνι και το Ασύρτικο.

4.2.4 Επίδραση του στελέχους του *O. oeni* και της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος

Στη συγκεκριμένη ενότητα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και ως προς την επίδραση του διαφορετικού στελέχους του γαλακτικού βακτηρίου και ως προς τη

διαφορετική συγκέντρωση του L-μηλικού οξέος στα οινολογικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ των δύο στελεχών για την τελική τιμή του κιτρικού οξέος και για τις δύο συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν (Σχήμα 14). Παράλληλα, η τελική συγκέντρωση της πτητικής οξύτητας διαφοροποιήθηκε και μεταξύ των στελεχών και μεταξύ των δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων που δοκιμάστηκαν.



Σχήμα 14: Επίδραση του στελέχους του *O. oeni* και της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος στο pH, στην ολική και πτητική οξύτητα, στη γλυκερόλη και στο κιτρικό οξύ.

4.3 Επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου

Με γνώμονα τη γευστική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε με περιγραφική ανάλυση και σειρά προτίμησης των παραγόμενων οίνων παρατηρήθηκε αρχικά διαφοροποίηση τόσο μεταξύ των οίνων που πραγματοποίησαν τη μηλογαλακτική ζύμωση σε σχέση με το μάρτυρα τόσο και μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αρχικά, στις περισσότερες περιπτώσεις η μηλογαλακτική ζύμωση βελτίωσε μερικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε όλους τους οίνους. Πιο συγκεκριμένα με βάση τη σειρά προτίμησης το στέλεχος του *O. oeni* VP41 ήταν προτιμότερο για τους οίνους της ποικιλίας Ασύρτικο ενώ το στέλεχος B7 για τους οίνους της ποικιλίας Αηδάνι. Στη πρώτη περίπτωση η μύτη

παρέμεινε απαλή με νότες λεμονιού και αίσθηση ορυκτότητας ενώ στο στόμα ήταν φρέσκο και μαλακό. Στη δεύτερη περίπτωση ο οίνος διατήρησε το έντονο άρωμα λουλουδιών και ενισχύθηκε η διάρκεια της επίγευσης των εσπεριδοειδών αρωμάτων στο στόμα. Σε όλες τις περιπτώσεις η αίσθηση της φρεσκάδας στο στόμα διατηρήθηκε.

5. Σχολιασμός και Συμπεράσματα

Οι οίνοι που παράγονται από την ποικιλία Ασύρτικο και ειδικά από την Σαντορίνη έχουν υψηλή οξύτητα και παρουσιάζουν τον χαρακτήρα της ορυκτότητας λόγω του ηφαιστειογενούς εδάφους και των κλιματικών συνθηκών της. Από την άλλη, το Αηδάνι είναι μία ποικιλία πιο αρωματική σε σχέση με το Ασύρτικο με χαρακτηριστικές νότες λουλουδιών και πυρηνόκαρπων φρούτων και με μικρότερη οξύτητα αλλά με έντονη φρεσκάδα. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση με χρήση διαφορετικών στελεχών του γαλακτικού βακτηρίου *O. oeni* στους οίνους Αηδάνι και Ασύρτικο με σκοπό την βελτίωση των περισσότερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους. Ο εμβολιασμός με τα γαλακτικά βακτήρια του *O. oeni* έγινε με τα στελέχη B7 και VP41 που κυκλοφορούν στο εμπόριο από διαφορετικές εταιρίες. Παράλληλα εξετάστηκε εάν επηρεάζει η συγκέντρωση του μηλικού οξέος που θα μεταβολιστεί κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί την πρώτη ερευνητική προσπάθεια μελέτης της επίδρασης των γαλακτικών βακτηρίων σε οίνους των δύο λευκών ελληνικών ποικιλιών.

Τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων του οίνου διαφοροποιούνται σε μεγάλο βαθμό ως προς τη πληθώρα χαρακτηριστικών με οινολογικό ενδιαφέρον. Από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η ικανότητα ανάπτυξής τους στο «αφιλόξενο» περιβάλλον του οίνου, δηλαδή η ανάγκη τους σε θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξή τους (Jiang et al., 2018). Τα πιο ανθεκτικά από τα στελέχη αυτά μπορεί να έχουν τη δυνατότητα μεταβολισμού φαινολικών ουσιών (Vivas et al., 2000), οξέα του οίνου ή άλλων ενώσεων που έχουν παραχθεί από τις ζύμες όπως η γλυκερόλη ή αμινοξέα (Pozo-Bayón, 2005, Alexandre et al., 2004). Συνεπώς, τα στελέχη αυτά συνήθως είναι και πιο ικανά να πραγματοποιήσουν την μηλογαλακτική ζύμωση φτάνοντας έναν ικανοποιητικό πληθυσμό βιώσιμων κυττάρων λίγες μέρες μετά τον εμβολιασμό τους στον οίνο. Τα δύο στελέχη που

χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη διαφοροποιήθηκαν ως προς τη ζυμωτική τους ικανότητα και την επίδρασή τους στο αρωματικό προφίλ του οίνου. Πολύ πιθανό σε αυτό να οφείλεται η δράση των διαφορετικών γλυκοσιδασών που απελευθέρωσαν τερπενικές ενώσεις στον οίνο και ενίσχυσαν το αρωματικό προφίλ (Swiegers et al., 2005). Αντίστοιχο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί σε ερυθρούς οίνους. Παράλληλα τα δύο συγκεκριμένα στελέχη του *O.oeni* έχει αποδειχθεί ότι παράγουν στον οίνο εξωπολυσακχαρίτες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, χαρακτηριστικό που επηρεάζει τη λιπαρότητα του οίνου (Dimoroulou et al., 2018). Με βάσει τα αποτελέσματα το οργανοληπτικό προφίλ του οίνου επηρεάστηκε όχι μόνο από το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου αλλά και από την ποικιλία του οίνου. Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει ότι τα βακτήρια μπορούν να μεταβολίσουν και ενώσεις που συσχετίζονται με το πρωτογενές άρωμα του οίνου ή αλλιώς ποικιλιακό (Campbell-Sills et al., 2017).

Η πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης αν και δε συνηθίζεται στις λευκές ποικιλίες, με εξαίρεση σε ορισμένες περιπτώσεις σε οίνους της ποικιλίας Chardonnay αλλά και στους αφρώδεις οίνους, μπορεί να βελτιώσει κάποια χαρακτηριστικά του οργανοληπτικού προφίλ του οίνου και να δημιουργηθεί ένας πιο ελαφρύς τύπος σε οίνους με μεγάλη οξύτητα, όπως στο Ασύρτικο αλλά και στο Αηδάνι. Θα ήταν ενδιαφέρον να δοκιμαστεί στο μέλλον σε συνεργασία με κάποιο οινοποιείο η πραγματοποίηση ζύμωσης με διαφορετικά στελέχη βακτηρίων σε λευκούς οίνους με υψηλή οξύτητα και ανάλυση του οργανοληπτικού προφίλ με αέρια χρωματογραφία και οργανοληπτικό έλεγχο.

Βιβλιογραφία

- Σταύρακας, Δ. (2015). "Αμπελογραφία", Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις ΖΗΤΗ.
- Τσακίρης, Α. (2010). "Ελληνική οινογνωσία", Αθήνα: Εκδόσεις ΨΥΧΑΛΟΣ.
- Alexandre, H., P. J. Costello, F. Remize, J. Guzzo, and M. Guilloux-Benatier. (2004). *Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus Oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Journal Food Microbiol.* Jun. 1: 93(2):141-154.
- Alexandre, H., D. Heintz, D. Chassagne, M. Guilloux- Benatier, C. Charpentier, and M. Feuillat. (2001). Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in oenological conditions. *Journal Ind. Microbiol. Biotech.* 26:235-240.
- Bartowsky, E. J., and P. A. Henschke. (2004). The "buttery" attribute of wine- diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int. Journal Food Microbiol.* 96:235-252.
- Bauer, R., and L. M. T. Dicks. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A review. *S. Afr. Journal Enol. Vitic.* 25:74-88.
- Beelman, R. B., R. M. Keen, M. J. Banner, and S. W. King. (1982). Interactions between wine and malolactic bacteria under wine conditions. *Dev. Ind. Microbiol.* 23:107-121.
- Bidan, P., J. P. Meyer, and A. Schaeffer. (1974). Les *Schizosaccharomyces* en œnologie. *Bull. OIV.* 47:682-706.
- Boulton, R. B., V. L. Singleton, L. F. Bisson, and R. E. Kunkee. (1998). Malolactic fermentation. In: *Principles and practices of winemaking.* Chapman & Hall, Aspen Publishers, Maryland.
- Bourdineaud, J., B. Nehmé, S. Tesse, and A. Lonvaud-Funel. (2003). The *fts H* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2515-2520.
- Campbell-Sills, H., M. E. Khoury, M. Gammacurta, C. Miot-Sertier, L. Dutilh, J. Vestner, V. Capozzi, D. Sherman, C. Hubert, O. Claisse, G. Spano, G. de Revel, P. Lucas. (2017). Two different *Oenococcus Oeni* lineages are associated to either red or white

- wines in Burgundy: genomics and metabolomics insights. *OENO One Vine and Wine Open Access Journal*. 51: 4:1861
- Chapa, R., C. Fallis, P. Farrel. (2001). *The Global Encyclopedia of Wine*, Forrestal P., Ed., Wine Appreciation Guild: San Francisco. 213.
- Charpentier, C., and M. Feuillat. (1993). Yeast autolysis. In: Fleet, G. H. (Ed), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 225-242.
- Claudio Delfini, Joseph V. Formica, (2001). “*Wine Microbiology Science and Technology*”, United States: CRC Press.
- Cogan, T. M. (1987). Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: effects on growth, substrates and products. *Journal Appl. Bacteriol.* 63:551-558.
- Davis, C. R., D. Wibowo, T. H. Eschenbruch, and G. H. Fleet. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. Journal Enol. Vitic.* 36:290-301.
- Dicks, L. M. T., F. Dellaglio, and M. D. Collins. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:395-397.
- Dimopoulou, M. (2018). *Oenococcus oeni* Exopolysaccharide Biosynthesis, a Tool to Improve Malolactic Starter Performance. *Front Microbiol.* 2018: 9:1276
- Domizio, P., L. Lencioni. (2011). Vin Santo. *Advances in Food and Nutrition Research*, volume 63. Jackson, R. S., Ed. 41-100.
- Du Toit, M., and I. S. Pretorius. (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature’s own arsenal– a review. *S. Afr. Journal Enol. Vitic.* 21:74-96.
- Fornachon, J. C. M. (1968). Influence of different yeasts on growth of lactic acid bacteria in wine. *Journal Sci. Food Agric.* 19:374- 378.
- Fornairon-Bonnefond, C., C. Camarasa, M. Moutounet, and J.-M. Salmon. (2001). État des connaissances scientifiques actuelles sur le phénomène d’autolyse des levures et l’élevage des vins sur lies. *Journal Int. Sci. Vigne Vin* 35:57-78.
- Gallander, J. F. (1979). Effect of time of bacterial inoculation on the stimulation of malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 30:157-159.
- Gallander, J. F. (1977). Deacidification of Eastern table wines with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. Journal Enol. Vitic.* 28:65-68.

- Garvie, E. I., and J. A. E. Farrow. (1980). The differentiation of *Leuconostoc oenos* from non-acidophilic species of *Leuconostoc*, and the identification of five strains from the American Type Culture Collection. *Am Journal Enol. Vitic.* 31:154-157.
- Garvie, E. I. (1969). Lactic dehydrogenases of strains of the genus *Leuconostoc*. *Journal Gen. Microbiol.* 58:85-94.
- Henick-Kling, T. (1993). Malolactic fermentation. In: Fleet, G. H. (Ed). "Wine Microbiology and Biotechnology", New York: Taylor & Francis Inc. 289-326.
- Henick-Kling, T., T. E. Acree, S. A. Krieger, and M. H. Laurent. (1993). Sensory aspects of malolactic fermentation. Stockley, C. S, R. S. Johnston, P. A. Leske, and T. H. Lee (Eds) Proceedings of the eighth Australian wine industry technical conference, 26-28 October 1992, Melbourne, Vic, Winetitles, SA. 148-152.
- Henick-Kling, T. (1988). Yeast and bacterial control in winemaking. In: Linskens, H. F. and J. F. Jackson (Eds). *Modern Methods of Plant Analysis, New Series, Vol.6.* Springer-Verlag. 276-316.
- Henick-Kling, T. (1985). Phage infection of malolactic fermentation. In: Lee, T. H. (Ed) *Malolactic fermentation. Proc. Seminar, 16 August 1984, Melbourne.* The Australian Wine Research Institute, Glen Osmond, South Australia. 128-143.
- Jiang, J., K. M. Sumby, J. F. Sundstrom, P. R. Grbin, V. Jiranek. (2018). Directed evolution of *Oenococcus oeni* strains for more efficient malolactic fermentation in a multi-stressor wine environment, *Food Microbiol.* 2018: 8: 73:150-159.
- Kenneth, C. Fugelsang, Charles G. Edwards (2007). "Wine Microbiology, Practical Applications & Procedures", Second edition, New York: SPRINGER.
- Krieger, S. A., T. Henick-Kling, U. Fischer, H. P. Bach, and G. Pickering. (2004). Management of malolactic fermentation in white wine. Proceedings of the 14th International symposium for Enology and viticulture Intervitis/ Interfucta. Germany: Stuttgart.
- Krieger, S. A., W. P. Hammes, and T. Henick-Kling (1990). Management of malolactic fermentation using starter cultures. *Vineyard Winery Manage.* Nov/Dec 45-50.
- Kunkee, R. E. (1967). Malolactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 9: 235-279.
- Lafon-Lafourcade, S., E. Carre, and P. Ribéreau-Gayon (1983). Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 874-880.
- Lafon-Lafourcade, S. (1975). L'histamine des vins. *Connaiss. Vigne Vin.* 2: 103-115.

- Lafon-Lafourcade, S. (1970). Étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques non proliférantes isolées des vins. *Ann. Technol. Agric.* 19: 141-154.
- Laurent, M. H., T. Henick-Kling, and T. E. Acree. (1994). Changes in the aroma and odour of Chardonnay wine due to malolactic fermentation. *Vitic. Enol. Sci.* 49: 3-10.
- Liu, S. Q., C. R. Davis, and J. D. Brooks. (1995). Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. *Am. Journal Enol. Vitic.* 46: 166-174.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76: 317-331.
- Lonvaud-Funel, A., A. Joyeux, and O. Ledoux. (1991). Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *Journal Appl. Bacteriol.* 71: 501-508.
- Maicas, S., I. Padro, and S. Ferrer. (2001). The potential of positively charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using *Oenococcus oeni*. *Enzyme Microb. Technol.* 28: 415-419.
- Martineau, B., T. Henick-Kling, and T. E. Acree. (1995). Reassessment of the influence of malolactic fermentation on the concentration of diacetyl in wines. *Am. Journal Enol. Vitic.* 46: 385-388.
- Martinez-Rodriguez, A. J. et al. (2002). Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. *Journal Ind. Microbiol. Biotech.* 29: 314-322.
- Murphy, M. G., O' Connor, L. and S. Condon. (1985). Oxygen- dependent lactate utilization by *Lactobacillus plantarum*. *Archives for Microbiology.* 141, 75-79.
- Pozo-Bayón, M. A. (2005). Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation effect of *Oenococcus Oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *Journal Food Chem.* Nov. 2: 53(22): 8729-35.
- Prahl, C., Lonvaud-Funel, A., Korsgaard, S., Morrison, E. and Joyeux, A. (1988). Étude d'un nouveau procédé de déclenchement de la fermentation malolactique. *Connaissance de la Vigne et du Vin.* 22, 197-207.
- Radler, F. (1982). The metabolism of organic acids by *Saccharomyces*. *Proc. Univ. Calif., Davis, Grape and Wine Cent. Symp.* 103-108.
- Ramos, A., H. Santos. (1996). Citrate and sugar cofermentation in *Leuconostoc oenos*, a ¹³C nuclear magnetic resonance study. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2577-2585.

- Ramos, A., J. S. Lolkema, W. N. Konings, and H. Santos. (1995). Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1303-1310.
- Rankine, B. (1990). Malolactic fermentation is more complex than it appears. *The Australian Grapegrower and Winemaker.* 14.
- Rankine, B. C., J. C. M. Fornachon, and D. A. Bridson. (1969). Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis.* 8: 129-134.
- Ribéreau- Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche, and A. Lonvaud-Funel. (2000). *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications*, England: Wiley.
- Roger B. Boulton, Vernon L. Singleton, Linda F. Bisson, Ralph E. Kunkee, Επιμέλεια Έκδοσης-Πρόλογος: Βασίλειος Γ. Ντουρτόγλου (2018). "Οινολογία Βασικές Αρχές & Μέθοδοι Οινοποίησης", Κύπρος: Εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ , BROKEN HILL PUBLISHERS LTD.
- Swiegers, J. H., E. Bartowsky, P. A. Henschke, I. S. Pretorius. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* Jan. 11(2): 139-173.
- Tracey, R. P., and T. J. Britz. (1989). Cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*. *Journal Appl. Bacteriol.* 66: 445-456.
- Van Vuuren, H. J. J., and L. M. T. Dicks. (1991). *Leuconostoc oenos*: A review. *Am. Journal Enol. Vitic.* 44: 99-112.
- Vivas, N., M. Augustin, and A. Lonvaud-Funel. (2000). Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus Oeni* (*Leuconostoc Oenos*, 8413). *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 80: 1675-1678.
- Vivas, N., A. Lonvaud-Funel, Y. Glories, and M. Augustin. (1997). Effect of malolactic fermentation in barrels and tanks on red wine composition and quality. *Practical Winery and Vineyard.* May/June: 68-77.
- Wibowo, D. E., R. Eschenbruch, C. R. Davis, G. H. Fleet, and T. H. Lee. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wines. A review. *Am. Journal Enol. Vitic.* 36(4): 302-313.