



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Χρήση του Φουμαρικού Οξέος για τον έλεγχο της Μηλογαλακτικής  
Ζύμωσης και μελέτη της επίδρασής του στα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά  
σε οίνο της ποικιλίας Βηλάνα

Πέππα Ελένη  
ΑΜ:18685009

Επιβλέπων: Αραπίτσας Παναγιώτης  
ΑΘΗΝΑ, Σεπτέμβριος 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
SCHOOL OF FOOD SCIENCE  
DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES

BACHELOR THESIS

Use of Fumaric Acid for the control of Malolactic  
Fermentation and study of its effect on the main quality characteristics  
in wine of the Vilana variety

Peppa Eleni  
Registration Number:18685009

Supervisor: Arapitsas Panagiotis  
ATHENS, September 2023



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

**ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:  
«Χρήση του Φουμαρικού Οξέος για τον έλεγχο της Μηλογαλακτικής  
Ζύμωσης και μελέτη της επίδρασής του στα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά  
σε οίνο της ποικιλίας Βηλάννα»  
και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (Αραπίτσας Παναγιώτης)	
Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (Ευάγγελου Αλεξάνδρα)	
Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (Ταταρίδης Παναγιώτης)	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα Πέππα Ελένη του Ευαγγέλου, με αριθμό μητρώου 18685009, φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και 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».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου για 12 μήνες και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή\*

Η Δηλούσα

ΠΕΠΠΑ ΕΛΕΝΗ

ΑΡΑΠΙΤΣΑΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

**\*Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα Καθηγητή**

### **Ψηφιακή Υπογραφή**

\* Σε εξαιρετικές περιπτώσεις και μετά από αιτιολόγηση και έγκριση του επιβλέποντα, προβλέπεται χρονικός περιορισμός πρόσβασης (embargo) 6-12 μήνες. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να υπογράψει ψηφιακά ο/η επιβλέπων/ουσα καθηγητής/τρια, για να γνωστοποιεί ότι είναι ενημερωμένος/η και συναινεί. Οι λόγοι χρονικού αποκλεισμού πρόσβασης περιγράφονται αναλυτικά στις πολιτικές του I.A. (σελ. 6)

## Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	6
Abstract.....	6
Σκοπός.....	7
Ενότητα 1: Εισαγωγή.....	8
1.1) Ποικιλία.....	8
1.2) Οξύτητα στον οίνο.....	8
1.3) Αύξηση Οξύτητας.....	9
1.4) Τρυγικό οξύ.....	9
1.5) Μηλικό οξύ.....	10
1.6) Φουμαρικό οξύ.....	10
1.7) Γαλακτικό οξύ.....	11
1.8) Οξικό οξύ.....	12
1.9) Μηλογαλακτική Ζύμωση.....	12
1.10) Θειώδης Ανυδρίτης.....	14
1.11) Χρώμα των λευκών οίνων.....	15
Ενότητα 2: Υλικά - Μέθοδοι.....	16
2.1) Οίνος προς μελέτη.....	16
2.2) Είδος βακτηρίων.....	16
2.3) Προετοιμασία δειγμάτων.....	16
2.4) Μέτρηση pH.....	19
2.5) Μέτρηση ολικής / ογκομετρούμενης οξύτητας.....	20
2.6) Μέτρηση θειώδους ανυδρίτη.....	21
2.7) CIELab.....	22
2.8) Ενζυμικός αναλυτής.....	24
Ενότητα 3: Αποτελέσματα.....	25
3.1) Μέτρηση οξικού οξέος.....	25
3.2) Μέτρηση μηλικού οξέος.....	27
3.3) Μέτρηση γαλακτικού οξέος.....	29
3.4) Μέτρηση ογκομετρούμενης οξύτητας.....	30
3.5) Μέτρηση σφάλματος ογκομέτρησης.....	33
3.6) Μέτρηση pH.....	35
3.7) Μετρήσεις CIELab.....	37
3.8) Μέτρηση ολικού θειώδους οξέος.....	41
3.9) Μέτρηση ελεύθερου θειώδους οξέος.....	42
3.10) Μέτρηση μοριακού θειώδους οξέος.....	44
Ενότητα 4: Συμπεράσματα.....	45
Βιβλιογραφία.....	46
Πίνακας Αποτελεσμάτων.....	48
Πίνακας 1: Αποτελέσματα Ενζυμικού Αναλυτή.....	48
Πίνακας 2: Αποτελέσματα μετρήσεων ογκομετρούμενης οξύτητας.....	50
Πίνακας 3: Αποτελέσματα μετρήσεων pH.....	52
Πίνακας 4: Αποτελέσματα CIELab.....	54
Πίνακας 5: Αποτελέσματα μετρήσεων Θειώδους Οξέος.....	55

## Περίληψη

Κατά την πτυχιακή εργασία μελετήθηκαν τα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά των οίνων της ποικιλίας Βηλάννα, στους οποίους έχουν προστεθεί διαφορετικές ποσότητες φουμαρικού και μηλικού οξέος, καθώς και στα μισά δείγματα είχε γίνει προσθήκη βακτηρίων. Τα δείγματα μοιράστηκαν σε δύο παρτίδες, μία προς μελέτη στους τρεις μήνες και μία προς μελέτη στους έξι μήνες. Το φουμαρικό οξύ χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της μηλογαλακτικής ζύμωσης, ενώ οι αναλύσεις που έγιναν αφορούν την μέτρηση των επιπέδων της οξύτητας, του pH, του θειώδους οξέος και του χρώματος των δειγμάτων. Οι ποσότητες 300 και 600 mg/L φουμαρικό ήταν ικανές να παρεμποδίσουν την διεξαγωγή της, ενώ σε προσθήκη μηλικού 3 g/L, ακόμα και χωρίς προσθήκη φουμαρικού η μηλογαλακτική δεν διεξήχθη για την χρονική διάρκεια του πειράματος (6 μήνες). Η προσθήκη των δύο οξέων οδήγησε σε αύξηση της οξύτητας, με ταυτόχρονη μείωση του pH. Το φουμαρικό οξύ σε προσθήκη 300 και 600 mg/L οδήγησε σε αύξηση οξύτητας 4-5 και 8-10 meq/L, και μείωση pH 0,05 και 0,10 αντίστοιχα. Το μηλικό οξύ σε προσθήκη 1 και 3 mg/L οδήγησε σε αύξηση οξύτητας 20 και 40 meq/L και μείωση pH 0,1 και 0,3 αντίστοιχα. Τέλος, το χρώμα των δειγμάτων φαίνεται να επηρεάστηκε από το φουμαρικό οξύ με τα δείγματα που είχαν την μέγιστη προσθήκη να εμφανίζουν υψηλότερη ένταση χρώματος και φωτεινότητα. Τα εν λόγω δείγματα εμφανίζουν διαφορές που παρατηρούνται οπτικά σε σχέση με τα δείγματα στα οποία δεν υπήρχαν προσθήκες.

Λέξεις-κλειδιά: Φουμαρικό οξύ, μηλογαλακτική ζύμωση, αύξηση οξύτητας, γαλακτικό οξύ, μηλικό οξύ.

## Abstract

During the thesis, the main quality characteristics of the wines of the Vilana variety were studied, to which different amounts of fumaric and malic acid have been added, as well as bacteria were added to half of the samples. The samples were divided into two batches, one to be studied at three months and one to be studied at six months. Fumaric acid was used to inhibit malolactic fermentation, while the analyzes carried out concern the measurement of the levels of acidity, pH, sulfuric acid and color of the samples. The amounts of 300 and 600 mg/L of fumaric acid were able to prevent the malolactic fermentation from occurring, while with the addition of 3 g/L of malic acid, even without the addition of fumaric, malolactic fermentation was not conducted for the duration of the experiment (6 months). The addition of the two acids led to an increase in acidity, with a simultaneous decrease in pH. Fumaric acid added at 300 and 600 mg/L resulted in an increase in acidity of 4-5 and 8-10 meq/L, and a decrease in pH of 0.05 and 0.10 respectively. Malic acid added at 1 and 3 mg/L resulted in an increase in acidity of 20 and 40 meq/L and a decrease in pH of 0.1 and 0.3, respectively. Finally, the color of the samples appeared to be affected by fumaric acid with the samples having the maximum addition showing higher color intensity and brightness. Said samples show visually observable differences compared to samples in which there were no additions.

Keywords: Fumaric acid, malolactic fermentation, increase of acidity, lactic acid, malic acid.

## Σκοπός

Σκοπός της πτυχιακής είναι η μελέτη και καταγραφή των επιδράσεων του φουμαρικού οξέος στον οίνο σε συνδυασμό με παράγοντες, όπως τα επίπεδα μηλικού οξέος ή η προσθήκη βακτηρίων. Γίνεται χρήση του φουμαρικού οξέος για τον έλεγχο της μηλογαλακτικής ζύμωσης και μελέτη της επίδρασής του στα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά σε οίνο της ποικιλίας Βηλάνα. Κατά την πτυχιακή χρησιμοποιήθηκε οίνος με πρόβλημα στην οξύτητα και πιο συγκεκριμένα κρίθηκε αναγκαία η αύξησή της. Στον οίνο προστέθηκαν διαφορετικές ποσότητες φουμαρικού οξέος, μηλικού οξέος, καθώς και στα μισά δείγματα υπήρξε προσθήκη βακτηρίων, η οποία έγινε σε δύο φάσεις, ώστε να παρατηρηθεί η αποτελεσματικότητα του φουμαρικού οξέος στην αναστολή της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Τα δείγματα διαμοιράστηκαν σε δείγματα των τριών μηνών και των έξι μηνών και οι αναλύσεις έγιναν στον αντίστοιχο χρόνο. Στόχος μας είναι η παρατήρηση της διεξαγωγής ή όχι της μηλογαλακτικής ζύμωσης, των επιπέδων της οξύτητας, του pH, του θειώδους οξέος και του χρώματος των δειγμάτων και ο συσχετισμός των αποτελεσμάτων με το φουμαρικό οξύ.

# Ενότητα 1: Εισαγωγή

## 1.1) Ποικιλία

Η Βηλάνα είναι μία λευκή ποικιλία, που καλλιεργείται κυρίως στην Κρήτη, σε έκταση περίπου 6.100 στρέμματα. Προορίζεται για την παραγωγή φρέσκων ξηρών λευκών οίνων. Σύμφωνα με τη νομοθεσία, η καλλιέργεια της Βηλάνας συνιστάται στο αμπελουργικό διαμέρισμα της Κρήτης.<sup>[3]</sup>

### ⇒ Αμπελογραφικά Χαρακτηριστικά

Η κορυφή του νέου βλαστού είναι ενδιάμεση έως ανοιχτή, χνουδωτή και λευκοπράσινη. Το φύλλο του φυτού είναι μέσου μεγέθους, κυκλικό, πεντάλοβο, ενώ εμφανίζει ανώτερους και κατώτερους πλάγιους κόλπους βαθείς, ροπαλοειδούς σχήματος με χείλη μερικώς επικαλυπτόμενα. Ο μισχικός κόλπος είναι σε σχήμα V ή U κλειστός και με χείλη επικαλυπτόμενα. Διαθέτει έλασμα ελαφρώς κυματώδες, βαθυπράσινο και στιλπνό στην άνω επιφάνεια, ενώ στην κάτω επιφάνεια εμφανίζεται ανοιχτοπράσινο και βαμβακερό. Τα άνθη είναι μορφολογικά και φυσιολογικά ερμαφρόδιτα. Η σταφυλή που δίνει είναι μετρίου έως μεγάλου μεγέθους, κωνική και πυκνή. Η ράγα εμφανίζεται μέσου μεγέθους, ελλειψοειδής, κιτρινοπράσινη έως χρυσοκίτρινη, ο φλοιός είναι παχύς και η σάρκα μαλακή και χυμώδης.<sup>[3]</sup>

Το πρέμνο δίνει μέση προς μεγάλη παραγωγή. Πρόκειται για μια ποικιλία ανθεκτική στη φώμοψη, αλλά ευαίσθητη στο ωίδιο, τον περονόσπορο και τον βοτρυτή, ιδιαίτερα σε περιβάλλον με αυξημένη υγρασία.<sup>[3]</sup>

Συνηθίζεται διαμόρφωση σε χαμηλό κυπελλοειδές και στους νέους αμπελώνες σε γραμμοειδές αμφίπλευρο Royat. Η Βηλάνα εμβολιάζεται στα υποκείμενα 110R, 41B, SO4, 1.103P, όπου έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η εκβλάστηση συμβαίνει την τρίτη εβδομάδα του Μαρτίου, η άνθηση το δεύτερο δεκαήμερο του Μαΐου, ο περκασμός το πρώτο δεκαήμερο του Ιουλίου, ενώ φτάνει την τεχνολογική ωρίμανση την τρίτη εβδομάδα του Αυγούστου.

Δίνει οίνους με μέτρια αλκοόλη 12-13% και μέτρια επίπεδα οξύτητας, ενώ χαρακτηρίζεται από βαθύ κίτρινο χρώμα, μέτρια ένταση αρωμάτων με εσπεριδοειδείς και ανθικούς χαρακτήρες. Η ποικιλία συμμετέχει στον λευκό ξηρό οίνο ΠΟΠ “Σητεία” μαζί με το Θραψαθήρι, ενώ παράγει αποκλειστικά τον λευκό ξηρό οίνο ΠΟΠ “Πεζά”. Επίσης, συμμετέχει στους λευκούς ξηρούς οίνους ΠΓΕ “Ηρακλειώτικος”, “Κισσάμου” και “Λασιθιώτικος”.<sup>[3]</sup>

## 1.2) Οξύτητα στον οίνο

Στο γλεύκος και στον οίνο υπάρχουν ελεύθερα οργανικά οξέα, ανιόντα οργανικών οξέων και ανιόντα ανόργανων οξέων (κυρίως θειϊκά, φωσφορούχα και χλωριούχα). Το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων των οξέων αυτών, είτε βρίσκονται σε διάσταση είτε όχι, αποτελούν την “ολική” οξύτητα. Η ογκομετρούμενη οξύτητα είναι η συγκέντρωση των ογκομετρούμενων πρωτονίων και των αδιάστατων ομάδων ασθενών οργανικών οξέων σε ένα διάλυμα. Το σύνολο των καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση και που αντιστοιχούν στο σύνολο των



πρωτονίων, καθορίζει την “ενεργό” οξύτητα ή pH. Η οξύτητα αποτελεί σημαντικό παράγοντα όσον αφορά τον οργανοληπτικό χαρακτήρα, τη σύσταση, και τη συντήρηση του οίνου.<sup>[1]</sup>

Στον οίνο, υπάρχουν διαφορετικά οξέα, τα οποία επηρεάζουν την όξινη γεύση του. Τα κυριότερα είναι το τρυγικό, το μηλικό, το κιτρικό και το γαλακτικό οξύ. Η οξύτητα ενός οίνου συνήθως εκφράζεται σε meq/L ή σε g/L εκφρασμένα σε τρυγικό οξύ. Η οξύτητα επηρεάζει το τελικό προϊόν στην γεύση, την αίσθηση του στόματος, την ισορροπία και την παλαιωσιμότητά του.<sup>[5]</sup> Επιπλέον, η οξύτητα του οίνου συχνά συγκαλύπτει ή τονίζει την αντίληψη άλλων γεύσεων. Συνήθως συγκαλύπτει την περίσσεια γλυκύτητα, ενώ η αντίληψη της στυπτικότητας τονίζεται όταν συμπίπτει με χαμηλές τιμές pH.<sup>[6]</sup>

### 1.3) Αύξηση Οξύτητας

Η μεταβολή της οξύτητας στον οίνο, με την προσθήκη των επιτρεπόμενων ουσιών, είναι περίπλοκη και τα ακριβή αποτελέσματά της είναι δύσκολο να προβλεφθούν, αφού εξαρτάται και από τη ρυθμιστική ικανότητα του οίνου.<sup>[1]</sup>

Η αύξηση της οξύτητας γίνεται με προσθήκη οξέων που υπάρχουν στο γλεύκος. Ως σκοπό έχει τη βελτίωση της γευστικής ισορροπίας του οίνου. Η συνηθέστερη προσθήκη είναι αυτή του τρυγικού οξέος στον οίνο. Η προσθήκη αυτή αυξάνει τη ρυθμιστική ικανότητα, μειώνοντας σε μικρότερο βαθμό την ενεργό οξύτητα (pH). Το τρυγικό οξύ είναι ανθεκτικό στην αποδόμηση και δεν προσβάλλεται εύκολα από μικρόβια του οίνου, ενώ ταυτόχρονα οι ζύμες και άλλοι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να το μεταβολίσουν.<sup>[8]</sup> Παρόλ’ αυτά, δεν μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια η ποσότητα τρυγικού οξέος που πρέπει να προστεθεί αφού, όπως αναφέρθηκε, το αποτέλεσμα εξαρτάται από την ρυθμιστική ικανότητα του οίνου. Αυξημένη προσθήκη οδηγεί σε αύξηση της γευστικής σκληρότητας του οίνου και πιθανότητα δημιουργίας τρυγικών αλάτων.<sup>[1][36]</sup>

### 1.4) Τρυγικό οξύ

Το τρυγικό οξύ συναντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα σταφύλια. Ο σχηματισμός του οφείλεται κυρίως στη φωτοσύνθεση, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από τις καλλιεργητικές τεχνικές και τον όγκο της ράγας κατά τον τρύγο. Επίσης, εξαρτάται και από την ποικιλία σταφυλιών και την σύσταση του εδάφους του αμπελώνα.<sup>[14]</sup> Το τρυγικό οξύ μαζί με το μηλικό θεωρούνται τα δύο σημαντικότερα οξέα του σταφυλιού και σχηματίζονται από τη γλυκόζη στις ρίζες και στα φύλλα του φυτού. Συνδυαστικά, τα δύο οξέα αποτελούν μέχρι και το 90% της συνολικής οξύτητας του σταφυλιού.<sup>[1]</sup> Το τρυγικό οξύ δεν μεταβολίζεται από το σταφύλι μέσω της αναπνοής με τον ίδιο τρόπο όπως το μηλικό, ενώ η σάρκα που βρίσκεται κοντά στον φλοιό είναι πιο πλούσια σε τρυγικό οξύ.<sup>[8]</sup>

Η εξέλιξη της συγκέντρωσής του συνδέεται με τα αναπνευστικά φαινόμενα της ράγας, ενώ εξαρτάται άμεσα από την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και τις βροχοπτώσεις. Σε θερμοκρασίες μεταξύ 20-30 °C, το τρυγικό οξύ μένει σταθερό σε συγκέντρωση, ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C αρχίζει να μειώνεται.<sup>[1]</sup>

Στο σταφύλι, στο τέλος της βλαστικής ανάπτυξης τα επίπεδά του κυμαίνονται από 4,5 έως 10,0 g/L στο τέλος της φάσης βλαστικής ανάπτυξης, ενώ οι συγκεντρώσεις στα άγουρα σταφύλια μπορούν να φτάσουν τα 15 g/L.<sup>[8]</sup>

Το επίπεδο οξύτητας των σταφυλιών αποτελεί μια σημαντική παράμετρο για την εκτίμηση των παραγόμενων οίνων. Το τρυγικό οξύ αποτελεί το σημαντικότερο οξύ κατά τη διαδικασία της οينوποίησης, έχοντας τον πρωταρχικό ρόλο στη διατήρηση της χημικής σταθερότητας του οίνου και του χρώματος και τέλος στην γεύση του τελικού προϊόντος.<sup>[5]</sup>

### 1.5) Μηλικό οξύ

Το μηλικό οξύ είναι από τα σημαντικότερα οξέα στο σταφύλι, ενώ συναντάται σε αφθονία στα πράσινα μήλα. Η εξέλιξη της συγκέντρωσης του εξαρτάται άμεσα από τα αναπνευστικά φαινόμενα της ράγας και τη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασία άνω των 20 °C, η συγκέντρωση του μηλικού οξέος ελαττώνεται. Η συγκέντρωσή του μειώνεται κατά την ωρίμανση γρήγορα στην αρχή και με πιο αργό ρυθμό στο τέλος.<sup>[1]</sup> Ο χυμός των πράσινων σταφυλιών, λίγο πριν τον περκασμό, μπορεί να έχει συγκέντρωση μηλικού οξέος μέχρι και 25 g/L. Τις πρώτες εβδομάδες μετά τον περκασμό, η συγκέντρωση μηλικού οξέος μειώνεται στο μισό, λόγω της αραίωσης με την αύξηση του μεγέθους των σταφυλιών, και λόγω της καύσης.

Κατά την ωρίμανση, τα γλεύκη τα οποία προέρχονται από κρύα κλίματα περιέχουν 4,0-6,5 g/L μηλικό οξύ, ενώ σε θερμά κλίματα, οι συγκεντρώσεις ανέρχονται μόλις στα 1,0-2,0 g/L. Αυξημένες συγκεντρώσεις μηλικού οξέος, 15,0-16,0 g/L, μπορούν να βρεθούν σε σταφύλια που η συγκομιδή τους συμβαίνει κατά τη διάρκεια κρύων καλοκαιριών σε αμπελουργικές περιοχές με δροσερό κλίμα.<sup>[5]</sup>

Στο λευκό οίνο, η ισορροπία γλυκού-ξινού θεωρείται απαιτούμενη αισθητηριακή ποιότητα. Αυτή η ισορροπία προσδίδει αναζωογονητικούς τόνους. Αυξημένες ποσότητες μηλικού οξέος προσδίδουν στον οίνο οξινή γεύση, που θυμίζει άγουρο μήλο.<sup>[6]</sup>

### 1.6) Φουμαρικό οξύ

Το φουμαρικό οξύ είναι ένα οργανικό οξύ, το οποίο αρχικά απομονώθηκε από το φυτό *Fumaria officinalis*, από το οποίο πήρε και το όνομά του. Παράγεται σε μικρές ποσότητες από μικροοργανισμούς, αφού αποτελεί βασικό ενδιάμεσο στον κύκλο των κιτρικών. Το φουμαρικό οξύ είναι επίσης γνωστό ως (E)-2-βουτανοδιοϊκό οξύ ή trans-1,2-αιθυλενοδικαρβοξυλικό οξύ.<sup>[16]</sup>

Το φουμαρικό οξύ παράγεται με χημικό τρόπο από μηλεϊνικό ανυδρίτη, που με την σειρά του παράγεται από το βουτάνιο. Ωστόσο, καθώς ο μηλεϊνικός ανυδρίτης είναι παράγωγο πετρελαίου και δεδομένου ότι η τιμή του πετρελαίου αυξάνεται, ερευνάται η παραγωγή του φουμαρικού οξέος με ζύμωση που ήταν λειτουργική κατά τη δεκαετία του 1940, αλλά διακόπηκε.<sup>[16]</sup>

Το φουμαρικό οξύ, μαζί με τα ηλεκτρικό και μηλικό οξύ, έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα δέκα κορυφαία χημικά συστατικά που μπορούν να παραχθούν από σάκχαρα μέσω βιολογικής ή χημικής μετατροπής.<sup>[16]</sup>

Το φουμαρικό οξύ αποτελεί ένα ισχυρό μέσο οξίνισης του οίνου, αφού είναι ένα ισχυρό οξύ και η προσθήκη 1 g/L φουμαρικού οξέος αντιστοιχεί σε προσθήκη τρυγικού οξέος 1,2 g/L.<sup>[37]</sup> Το φουμαρικό οξύ προστίθεται στον οίνο ως πρόσθετο σε ποσότητες 300-600 mg/L, με στόχο τον έλεγχο της ανάπτυξης και της δραστηριότητας των γαλακτικών βακτηρίων, τα οποία πραγματοποιούν την μηλογαλακτική ζύμωση. Ακόμη, στοχεύει στην μείωση της ποσότητας του θειώδους ανυδρίτη που προστίθεται και τέλος συμβάλλει στη διατήρηση της οξύτητας που οφείλεται στο μηλικό οξύ.<sup>[23]</sup>

Το φουμαρικό έχει την ικανότητα αναστολής της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων, ενώ έχει περιγραφεί και ως αντιμικροβιακό κατά των *E. coli*, *L. monocytogenes* και *Salmonella sp.*. Επιπλέον, φαίνεται ότι το φουμαρικό είναι ικανό να αναστέλλει το σύστημα GAD, το οποίο μετατρέπει το γλουταμικό σε γ-αμινοβουτυρικό οξύ, αφαιρώντας ένα πρωτόνιο και λειτουργεί ως σύστημα αντίστασης σε οξύ. Οι ζυμομύκητες, όπως ο *Saccharomyces cerevisiae*, δεν είναι ευαίσθητοι σε αυτόν τον μηχανισμό επειδή έχουν πολλές μεταφορικές πρωτεΐνες ικανές να αποβάλλουν πρωτόνια και καρβοξυλικά ανιόντα για να μειώσουν την τοξικότητα. Επομένως, το φουμαρικό είναι ένα ενδιαφέρον εργαλείο για την αναστολή της μηλογαλακτικής χωρίς να επηρεάζεται η αλκοολική ζύμωση, επομένως μπορεί να είναι χρήσιμο να εφαρμοστεί σε ζύμωση σε μπουκάλια φυσικών αφρωδών οίνων<sup>[15]</sup> ή να μελετηθεί η οικονομική παραγωγή φουμαρικού οξέος από βιομάζα.<sup>[17]</sup>

### 1.7) Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ δεν υπάρχει στο σταφύλι. Σχηματίζεται από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση σε μικρή ποσότητα και κατά την δράση των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Είναι ένα οργανικό οξύ, το οποίο περιλαμβάνεται στην συνολική οξύτητα του οίνου. Οι συγκεντρώσεις του κυμαίνονται έως 2,5 g/L στους οίνους, όμως είναι υψηλότερες σε οίνους που έχουν υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση. Σε αντίθεση με το μηλικό οξύ και το τρυγικό οξύ, το γαλακτικό είναι ηπιότερο οξύ, περιέχοντας μόνο ένα καρβοξύλιο στο μόριό του και συμβάλλει στην πιο κρεμώδη αίσθηση του οίνου.<sup>[1]</sup>

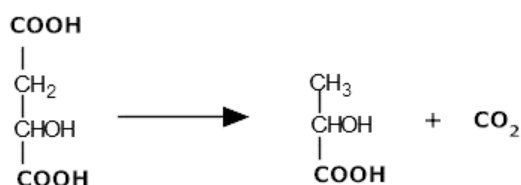
Τα γαλακτικά βακτήρια συναντώνται σε όλα τα γλεύκη τους οίνους που παράγονται από τις διάφορες ποικιλίες της αμπέλου.<sup>[1]</sup> Η παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια δεν επιφέρει ελαττώματα στον οίνο. Παρόλα αυτά, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος έχουν την ικανότητα αλλοίωσης άλλων χαρακτηριστικών στον οίνο, όπως την αποικοδόμηση των τερπενίων και άλλων αρωματικών μορίων, τα οποία είναι παράγωγα της αλκοολικής ζύμωσης. Επίσης, μπορούν να παράξουν ανεπιθύμητες αρωματικές ενώσεις, όπως το διακετύλιο.<sup>[8]</sup>

### 1.8) Οξικό οξύ

Το οξικό οξύ είναι ένα πτητικό οξύ και μαζί με μερικά ακόμα πτητικά οξέα που βρίσκονται σε μικρές ποσότητες, αποτελούν την πτητική οξύτητα του οίνου. Η παρουσία του στον οίνο οφείλεται στα οξικά βακτήρια που μετατρέπουν την αιθυλική αλκοόλη σε οξικό οξύ και άλλα προϊόντα, και στην χημική οξειδωση της αλκοόλης σε οξικό οξύ παρουσία O<sub>2</sub>. Η συγκέντρωσή του αποτελεί κριτήριο των συνθηκών οινοποίησης και συντήρησης του οίνου, επειδή παράγεται σε μεγάλες ποσότητες μόνο από βακτηριακές προσβολές των οίνων. Το οξικό οξύ δεν δρα μόνο όπως τα άλλα οξέα αυξάνοντας την όξινη γεύση, αλλά προκαλεί και στέγνωμα της γλώσσας και κάψιμο στον ουρανίσκο σε ένταση ανάλογη με την περιεκτικότητά του, υποβαθμίζοντας έτσι την ποιότητα του οίνου.<sup>[1]</sup>

### 1.9) Μηλογαλακτική Ζύμωση

Ως μηλογαλακτική ζύμωση ορίζεται η μετατροπή του L(-) μηλικού οξέος σε L(+) γαλακτικό οξύ από τα γαλακτικά βακτήρια, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Το γαλακτικό οξύ που έχει στο μόριό του ένα καρβοξύλιο, αντικαθιστά το μηλικό οξύ, που το χαρακτηρίζει η σκληρή γεύση του. Τα γαλακτικά βακτήρια υπάρχουν στον φλοιό του σταφυλιού και μεταφέρονται στο γλεύκος, όπου, με την εμφάνιση της αιθανόλης, τα περισσότερα είδη γαλακτικών βακτηρίων δεν επιβιώνουν. Τα πιο ανθεκτικά, μετά από μια περίοδο αναμονής αρχίζουν να αναπτύσσονται και όταν φτάσουν τον απαιτούμενο πληθυσμό (10<sup>6</sup>/mL) γίνεται η έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης.<sup>[1]</sup>

Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χαρακτηριστεί ως αλλοίωση στον οίνο, όμως όταν πραγματοποιηθεί σωστά μπορεί να αποτελέσει ένα επιθυμητό στάδιο της οινοποίησης. Γενικά, σε τιμές pH κάτω από 3,5, η μηλογαλακτική πραγματοποιείται κυρίως από στελέχη *Oenococcus oeni*.<sup>[13]</sup>

Η εκδήλωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης φαίνεται να εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι το pH, το οποίο επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων. Τα περισσότερα είδη γαλακτικών βακτηρίων αναπτύσσονται σε ουδέτερες τιμές pH. Ακόμη, επηρεάζει την δραστηριότητα του μηλογαλακτικού ενζύμου. Για στελέχη *Oenococcus oeni*, η βέλτιστη τιμή είναι 3,2-3,5.<sup>[13][37]</sup>

Άλλο παράγοντα αποτελεί η θερμοκρασία, καθώς σε περιβάλλον όπως αυτό που επικρατεί κατά την οινοποίηση, τα γαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 20-23 °C. Παρόλα αυτά, το εύρος της θερμοκρασίας περιορίζεται ανάλογα με την παρουσία αιθανόλης, καθώς σε

αλκοολικό βαθμό 13-14%, η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων σταματάει στους 14-15 °C. Για στελέχη *Oenococcus oeni*, η βέλτιστη τιμή είναι περίπου 20 °C.<sup>[13]</sup>

Η παρουσία αιθανόλης είναι ακόμη ένας παράγοντας που επηρεάζει την εκδήλωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Τα γαλακτικά βακτήρια είναι ευαίσθητα στην αιθανόλη, ενώ αλκοολικός βαθμός της τάξεως του 10%, μπορεί να αναστείλει την δραστηριότητά τους. Τα στελέχη *Oenococcus oeni* αναπτύσσονται σε αιθανόλη 5-6%, ενώ σε αλκοολικούς βαθμούς άνω των 13-14%, η ανάπτυξή τους είναι σχεδόν αδύνατη.<sup>[13]</sup>

Παρεμποδιστική δράση έχει η παρουσία του θειώδους ανυδρίτη. Η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων αναστέλλεται σε συγκεντρώσεις ολικού θειώδους 100 mg/L και ελεύθερου 10 mg/L.<sup>[13]</sup>

Τα φαινορικά συστατικά φαίνεται, επίσης, να επηρεάζουν την εκδήλωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Σε μελέτες που έγιναν στο *Oenococcus oeni*, αποδείχθηκε πως το βανιλικό οξύ, οι προκυανιδίνες των γιγάρτων και οι ελλαγικές τανίνες του βαρελιού, εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων, ενώ αντίθετα το γαλλικό οξύ και οι μη πολυμερισμένες την ενθαρρύνουν.<sup>[13]</sup>

Τέλος, η παρουσία οξυγόνου επιδρά στον πολλαπλασιασμό των γαλακτικών βακτηρίων, αφού αυτά χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: Προαιρετικά αναερόβια, αεροανεκτικά και μικροαερόφιλα. Συγκεκριμένα, το στέλεχος βακτηρίων *Oenococcus oeni* είναι προαιρετικά αναερόβιο, δηλαδή η ανάπτυξή του δεν επηρεάζεται από το οξυγόνο, όμως αναπτύσσεται καλύτερα απουσία του.<sup>[13]</sup>

Οι κυριότεροι λόγοι που επιθυμείται η εκδήλωση μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι οι εξής:

- Μείωση της ολικής οξύτητας: Η μείωση της ολικής οξύτητας είναι συνάρτηση του αρχικά περιεχομένου μηλικού οξέος και μπορεί να φτάσει μέχρι 3 g/L.<sup>[1]</sup>
- Αύξηση του pH: Η αλλαγή του pH που προκύπτει από την μηλογαλακτική μετατροπή δεν είναι τόσο εύκολα προβλέψιμη. Η αύξηση του pH εξαρτάται από την ρυθμιστική ικανότητα του οίνου, καθώς και από το αρχικό pH. Η αύξηση υπολογίζεται στις 0,1-0,3 μονάδες.<sup>[1]</sup>
- Μικροβιολογική σταθεροποίηση: ελαττώνονται οι πηγές ενέργειας των βακτηρίων και με αυτόν τον τρόπο, ο οίνος σταθεροποιείται μικροβιολογικά.<sup>[13]</sup>
- Βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων: Το ποικιλιακό άρωμα μπορεί να εξασθενήσει, γι' αυτό σε μερικούς αρωματικούς λευκούς οίνους, η μηλογαλακτική ζύμωση δεν προτείνεται. Η γεύση γίνεται πιο απαλή λόγω της αντικατάστασης του μηλικού, με το γαλακτικό που είναι πιο απαλό και λιγότερο επιθετικό.<sup>[13]</sup>

Κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, η ολική οξύτητα ελαττώνεται απότομα για να σταθεροποιηθεί τελικά, ενώ η πτητική οξύτητα αυξάνεται σε ένα μικρό ποσοστό. Τα επίπεδα οξύτητας, μετά το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης μειώνονται, αφού το μηλικό οξύ είναι λιγότερο όξινο σε σχέση με το γαλακτικό.<sup>[1]</sup>

Μετά τη ζύμωση των σακχάρων από τις ζύμες, τα γαλακτικά βακτήρια προσβάλουν αρχικά το μηλικό οξύ που είναι βιολογικά ασταθές. Όμως, μετά την κατανάλωση του μηλικού οξέος, τα βακτήρια μπορούν να αποικοδομήσουν τις πεντόζες, τη γλυκερόλη, το τρυγικό οξύ και τα υπολειμματικά σάκχαρα του οίνου, που θα οδηγήσουν σε ελάττωμα στο τελικό προϊόν. Έτσι, αναγκαίος είναι ο έλεγχος της διαδικασίας αυτής. Πρόωρη απομάκρυνση των γαλακτικών βακτηρίων, δηλαδή πριν την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, δεν εξασφαλίζει τη

βιολογική σταθερότητα του οίνου, καθώς υπάρχει ο κίνδυνος επαναμόλυνσης του οίνου με βακτήρια.<sup>[1]</sup>

### 1.10) Θειώδης Ανυδρίτης

Το διοξείδιο του θείου (SO<sub>2</sub>) χρησιμοποιείται από τους οινοποιούς ως συντηρητικό. Σε υδατικά διαλύματα συμπεριφέρεται ως ασθενές διπρωτικό οξύ. Το θείο με καύση δίνει αέριο SO<sub>2</sub> που ονομάζεται σωστότερα θειώδης ανυδρίτης.<sup>[1]</sup>

Ο θειώδης ανυδρίτης είναι σημαντικός κατά τη διαδικασία της οινοποίησης, αφού βοηθάει στην πρόληψη της μικροβιακής ανάπτυξης και οξειδωσης του οίνου. Στη λευκή οινοποίηση, η προσθήκη θειώδους οξέος γίνεται στο σταφυλοπολλτό ή στο γλεύκος και είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς περιέχει ελάχιστες φαινολικές ενώσεις, οι οποίες είναι ευοξειδωτες, προστατεύοντας έτσι τις υπόλοιπες οξειδώσιμες ενώσεις και κυρίως τις αρωματικές. Επίσης, ο θειώδης ανυδρίτης εκτός από αντιοξειδωτικό, λειτουργεί και ως αντιοξειδασικό, καταστρέφοντας τις οξειδάσες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις οξειδώσεις στο γλεύκος. Η θείωση του γλεύκους προστατεύει το χρώμα στον λευκό οίνο, που οξειδωμένο δίνει πιο βαθιά κίτρινη απόχρωση, αποτέλεσμα της δράσης των οξειδωτικών ενζύμων.<sup>[1]</sup> Η προσθήκη του θειώδους μπορεί να ελαττωθεί με τον συνδυασμό της προζυμωτικής απολάσπωσης, τη ρύθμιση του pH (3,00 - 3,45), τον εμβολιασμό του γλεύκους και την ελεγχόμενη ζύμωση (15 - 20 °C).<sup>[1]</sup>

Η χρήση του γίνεται σε μικρές ποσότητες (50 – 70 mg/L) και εξαρτάται από την υγιεινή κατάσταση των σταφυλιών. Αρχικά, εξασφαλίζει την αντιοξειδασική και αντισηπτική προστασία στο γλεύκος, για να εμποδιστεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών, που μπορούν να έχουν αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου.

Ο θειώδης ανυδρίτης αποφεύγεται σε υψηλές δόσεις, διότι σε αυξημένη συγκέντρωση είναι τοξικός για τον άνθρωπο. Ακόμη, μπορεί να προκαλέσει αλλεργία και για αυτό τα επίπεδά του πρέπει να ελέγχονται και να ρυθμίζονται στον οίνο.<sup>[30]</sup> Τα επιτρεπόμενα όρια που έχουν καθοριστεί από την νομοθεσία είναι 1,5 mg/kg/ημέρα.

Ο θειώδης ανυδρίτης στον οίνο βρίσκεται σε δύο μορφές, ελεύθερος και δεσμευμένος.<sup>[1]</sup> Μικρό μέρος του ελεύθερου θειώδους βρίσκεται με τη μορφή που ονομάζεται μοριακή μορφή. Αποτελεί την μορφή που είναι υπεύθυνη για την αντιμικροβιακή ιδιότητα του θειώδους, εμποδίζοντας τις αλλοιώσεις. Η συγκέντρωση του μοριακού θειώδους είναι άμεσα εξαρτώμενη από το pH του οίνου και η μεταβολή του επιφέρει μεγάλη αλλαγή στο ποσοστό του. Για τιμές pH 3,0, το ποσοστό του μοριακού θειώδους είναι 6% του ελεύθερου, ενώ για τιμές pH 4,0 το ποσοστό αυτό ανέρχεται μόλις στο 0,6%. Το δεσμευμένο θειώδες είναι αυτό που στον οίνο βρίσκεται δεσμευμένο με ενώσεις που έχουν στο μόριο τους αλδεϋδική ή κετονική ομάδα.<sup>[1]</sup>

Η συνηθέστερη μορφή, στην οποία προστίθεται ο θειώδης ανυδρίτης είναι το μεταθειώδες κάλιο K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Metabisulfite). Αυτή η μορφή έχει το πλεονέκτημα να έχει μικρότερη οσμή και να προστίθεται με ακρίβεια, διότι μπορεί να ζυγιστεί. Προστίθεται αφού πρώτα διαλυθεί σε νερό και εμπλουτίζει τον οίνο σε κάλιο.<sup>[1]</sup>

### 1.11) Χρώμα των λευκών οίνων

Η εκτίμηση του χρώματος των λευκών οίνων είναι περισσότερη σύνθετη σε σχέση με αυτή των ερυθρών, καθώς το φάσμα δεν έχει προσδιορισμένο μέγιστο στο ορατό φάσμα. Η απορρόφηση είναι συνεχής από τα 500 έως τα 280 nm με ένα μέγιστο στο υπεριώδες, στα 420 nm, όπου σε αυτό το μήκος κύματος γίνεται η απορρόφηση του κίτρινου χρώματος.<sup>[1]</sup>

Η μελέτη των φαινολικών συστατικών είναι ιδιαίτερα σημαντική για την Οινολογία, καθώς είναι η κύρια πηγή χρώματος και στυφής αίσθησης των οίνων. Οι φαινολικές ενώσεις είναι αυτές που διαφοροποιούν τον οίνο στο χρώμα και τη γεύση και η διερεύνηση της σύστασης και της δομής τους, ακόμη και με σύγχρονες τεχνικές, παραμένει εξαιρετικά δύσκολη εξαιτίας της μεγάλης ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν.<sup>[22]</sup>

Ο σχηματισμός τους γίνεται με συμπύκνωση τριών μορίων οξικού οξέος ή από τη γλυκόζη. Το είδος των φαινολικών ουσιών εξαρτάται από την ποικιλία της αμπέλου, τις κλιματολογικές συνθήκες, την παραγωγικότητα και την οινοποιητική τεχνική.<sup>[22]</sup>

Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε μη φλαβονοειδής και φλαβονοειδής. Στις πρώτες ανήκουν μονομοριακά παράγωγα του βενζοϊκού ή του κινναμωμικού οξέος, αλλά και άλλες ενώσεις όπως τα στυλβένια. Τα κύρια φαινολικά συστατικά της σάρκας είναι φαινολικά οξέα. Έχουν παρεμποδιστική δράση κατά των βακτηρίων και έχουν χαρακτηριστική οσμή.<sup>[22]</sup>

Στις φλαβονοειδείς φαινόλες ανήκουν οι φλαβανόνες, οι φλαβονόλες, οι κατεχίνες, οι προανθοκυανιδίνες, καθώς και οι ανθοκυάνες και τανίνες. Οι φλαβανόνες δεν συναντώνται στα σταφύλια, καθώς πηγή τους είναι το ξύλο του βαρελιού. Αντίθετα, οι φλαβονόλες είναι συστατικά του φλοιού των σταφυλιών και βρίσκονται τόσο σε λευκά όσο και σε ερυθρά σταφύλια. Στους λευκούς οίνους υπάρχουν σε μικρές ποσότητες, καθώς κατά την οινοποίηση δεν γίνεται εκχύλιση των φλοιών και έτσι θεωρείται ότι δεν συμβάλλουν στη διαμόρφωση του χρώματος των λευκών οίνων.<sup>[22]</sup>

Η κατεχίνη και η επικατεχίνη ως μονομερή βρίσκονται στο σταφύλι, ενώ έχουν βρεθεί και οι προανθοκυανιδίνες που η δομή τους είναι όμοια με τις κατεχίνες με ένα υδροξύλιο παραπάνω. Το καφέτιασμα του οίνου οφείλεται στην οξειδωση των παραπάνω και για αυτό η παρουσία τους στους λευκούς οίνους είναι ιδιαίτερα ανεπιθύμητη.<sup>[22]</sup>

## Ενότητα 2: Υλικά - Μέθοδοι

### 2.1) Οίνος προς μελέτη

Ο εξεταζόμενος οίνος ανήκει στην ποικιλία Βηλάννα και έχει παραχθεί στο Ηράκλειο Κρήτης το έτος 2022. Έχει φιλτραριστεί και έχει υποστεί θείωση σε ποσότητα μικρότερη των 15 mg/L.

### 2.2) Είδος βακτηρίων

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το είδος βακτηρίων *Oenococcus oeni* του γένους *Oenococcus*. Λήφθηκε 1,5 g βακτηρίων, ενυδατώθηκε σε 10 mL απιονισμένο νερό, και έπειτα από αναμονή 20-30 λεπτά, μεταγγίστηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και έγινε πλήρωση μέχρι τη χαραγή με τον εξεταζόμενο οίνο.

### 2.3) Προετοιμασία δειγμάτων

- Σε 2,5 L του αρχικού οίνου (Οίνος Α) προστίθενται 5,4 g φουμαρικού οξέος σε σκόνη, που έχει ζυγιστεί σε ζυγό ακριβείας. Έπειτα, προστέθηκαν ακόμη 0,5 L Οίνου Α για την δημιουργία οίνου Β με τελικό όγκο 3 L.
  - Ο Οίνος Β χωρίζεται σε δύο μέρη, ένα του 1 L (οίνος Γ) και ένα των 2 L (οίνος Δ).
  - Στον οίνο Γ προστίθενται 5 L οίνου Α, που οδηγεί στην παρασκευή 6 L οίνου με συγκέντρωση 300 mg/L φουμαρικού οξέος (οίνος ΣΤ).
  - Στον οίνο Δ προστίθενται 4 L οίνου Α, που οδηγεί στην παρασκευή 6 L οίνου με συγκέντρωση 600 mg/L φουμαρικού οξέος (οίνος Ε).
  - Ο οίνος Ε χωρίζεται σε 3 μέρη των 2 L το καθένα, τους οίνους Ε.1, Ε.2, Ε.3.
- ❖ Ο οίνος Ε.1 χωρίζεται σε 4 μπουκάλια των 0,5 L στα δύο από τα οποία προστίθενται 0,5 mL βακτηρίων (2.2) με σιφώνι και προκύπτουν τα παρακάτω δείγματα:
- VIL1\_600\_0\_C\_3 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 3 μήνες)
  - VIL1\_600\_0\_C\_6 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 6 μήνες)
  - VIL1\_600\_0\_O\_3 (με προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 3 μήνες)
  - VIL1\_600\_0\_O\_6 (με προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 6 μήνες)
- ❖ Στον οίνο Ε.2 προστίθενται 2 g μηλικού οξέος και έπειτα διαχωρίζεται σε 4 μπουκάλια των 0,5 L στα δύο από τα οποία προστίθενται 0,5 mL βακτηρίων (2.2) με σιφώνι και προκύπτουν τα παρακάτω δείγματα:
- VIL1\_600\_1\_C\_3 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)
  - VIL1\_600\_1\_C\_6 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 6 μήνες)
  - VIL1\_600\_1\_O\_3 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)
  - VIL1\_600\_1\_O\_6 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 6 μήνες)



❖ Στον οίνο E.3 προστίθενται 6 g μηλικού οξέος και έπειτα διαχωρίζεται σε 4 μπουκάλια των 0,5 L στα δύο από τα οποία προστίθενται 0,5 mL βακτηρίων (2.2) με σιφώνι και προκύπτουν τα παρακάτω δείγματα:

→ VIL1\_600\_3\_C\_3 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_600\_3\_C\_6 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 6 μήνες)

→ VIL1\_600\_3\_O\_3 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_600\_3\_O\_6 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 6 μήνες)

• Ο οίνος ΣΤ χωρίζεται σε 3 μέρη των 2 L το καθένα, τους οίνους ΣΤ.1, ΣΤ.2, ΣΤ.3.

❖ Ο οίνος ΣΤ.1 διαχωρίζεται σε 4 μπουκάλια των 0,5 L στα δύο από τα οποία προστίθενται 0,5 mL βακτηρίων (2.2) με σιφώνι και προκύπτουν τα παρακάτω δείγματα:

→ VIL1\_300\_0\_C\_3 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_300\_0\_C\_6 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 6 μήνες)

→ VIL1\_300\_0\_O\_3 (με προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_300\_0\_O\_6 (με προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 6 μήνες)

❖ Στον οίνο ΣΤ.2 προστίθενται 2 g μηλικού οξέος και έπειτα διαχωρίζεται σε 4 μπουκάλια των 0,5 L στα δύο από τα οποία προστίθενται 0,5 mL βακτηρίων (2.2) με σιφώνι και προκύπτουν τα παρακάτω δείγματα:

→ VIL1\_300\_1\_C\_3 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_300\_1\_C\_6 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 6 μήνες)

→ VIL1\_300\_1\_O\_3 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_300\_1\_O\_6 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 6 μήνες)

❖ Στον οίνο ΣΤ.3 προστίθενται 6 g μηλικού οξέος και έπειτα διαχωρίζεται σε 4 μπουκάλια των 0,5 L στα δύο από τα οποία προστίθενται 0,5 mL βακτηρίων (2.2) με σιφώνι και προκύπτουν τα παρακάτω δείγματα:

→ VIL1\_300\_3\_C\_3 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_300\_3\_C\_6 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 6 μήνες)

→ VIL1\_300\_3\_O\_3 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_300\_3\_O\_6 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 6 μήνες)

• 6 L του οίνου A χωρίζονται σε 3 μέρη των 2 L το καθένα, τους οίνους A.1, A.2, A.3

❖ Ο οίνος A.1 διαχωρίζεται σε 4 μπουκάλια των 0,5 L στα δύο από τα οποία προστίθενται 0,5 mL βακτηρίων (2.2) με σιφώνι και προκύπτουν τα παρακάτω δείγματα:

→ VIL1\_000\_0\_C\_3 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_000\_0\_C\_6 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 6 μήνες)

→ VIL1\_000\_0\_O\_3 (με προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_000\_0\_O\_6 (με προσθήκη βακτηρίων για μελέτη στους 6 μήνες)

❖ Στον οίνο A.2 προστίθενται 2 g μηλικού οξέος και έπειτα διαχωρίζεται σε 4 μπουκάλια των 0,5 L στα δύο από τα οποία προστίθενται 0,5 mL βακτηρίων (2.2) με σιφώνι και προκύπτουν τα παρακάτω δείγματα:

→ VIL1\_000\_1\_C\_3 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_000\_1\_C\_6 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 6 μήνες)

→ VIL1\_000\_1\_O\_3 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_000\_1\_O\_6 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 1 g/L για μελέτη στους 6 μήνες)

❖ Στον οίνο A.3 προστίθενται 6 g μηλικού οξέος και έπειτα διαχωρίζεται σε 4 μπουκάλια των 0,5 L στα δύο από τα οποία προστίθενται 0,5 mL βακτηρίων (2.2) με σιφώνι και προκύπτουν τα παρακάτω δείγματα:

→ VIL1\_000\_3\_C\_3 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_000\_3\_C\_6 (χωρίς προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 6 μήνες)

→ VIL1\_000\_3\_O\_3 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 3 μήνες)

→ VIL1\_000\_3\_O\_6 (με προσθήκη βακτηρίων και συγκέντρωση μηλικού οξέος 3 g/L για μελέτη στους 6 μήνες).

Τα παραπάνω δείγματα θα παραμείνουν σε θερμοκρασία δωματίου.

## 2.4) Μέτρηση pH

Το σύνολο των καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση και που αντιστοιχεί στο σύνολο των πρωτονίων, καθορίζει την “ενεργό” οξύτητα ή pH.<sup>[1]</sup>

Μετράτε η διαφορά δυναμικού μεταξύ δύο ηλεκτροδίων βυθισμένων στο υπό δοκιμή υγρό. Το ένα από αυτά τα δύο ηλεκτρόδια έχει δυναμικό που είναι συνάρτηση του pH του υγρού, ενώ το άλλο έχει σταθερό και γνωστό δυναμικό και αποτελεί το ηλεκτρόδιο αναφοράς.<sup>[18]</sup>

Σε ένα δείγμα από κάθε τετράδα από τους οίνους E.1, E.2, E.3, ΣΤ.1, ΣΤ.2, ΣΤ.3, Α.1, Α.2, Α.3 μεταγγίζονται περίπου 30 mL δείγματος σε ένα ποτήρι ζέσεως και πραγματοποιείται μέτρηση με το pHμετρο που απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 1).

### Μέθοδος Μέτρησης

- Το όργανο μηδενίζεται πριν από οποιαδήποτε μέτρηση, σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται από τον κατασκευαστή του pHμέτρου.
- Το ηλεκτρόδιο βυθίζεται στο δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί, η θερμοκρασία του οποίου πρέπει να είναι μεταξύ 20 και 25 °C και όσο το δυνατόν πλησιέστερα στους 20 °C.
- Διαβάστε την τιμή του pH απευθείας από την κλίμακα.

*Εικόνα 1: pH-μετρο*



## 2.5) Μέτρηση ολικής / ογκομετρούμενης οξύτητας

Η ολική οξύτητα του οίνου (ή ογκομετρούμενη οξύτητα) είναι το άθροισμα των τιτλοδοτούμενων οξέων του όταν τιτλοδοτείται σε pH 7 έναντι ενός τυπικού αλκαλικού διαλύματος.<sup>[12]</sup> Το διοξείδιο του άνθρακα δεν περιλαμβάνεται στη συνολική οξύτητα, για αυτό και γίνεται αποβολή του. Στην ογκομέτρηση προσδιορίζονται ελεύθερα οργανικά οξέα, ανιόντα οργανικών οξέων και ανιόντα ανόργανων οξέων (θειικά, φωσφορικά, χλωριούχα, κτλ). Η μέθοδος δεν μας δίνει πληροφορίες για την φύση των ογκομετρούμενων οξέων.<sup>[1]</sup>

→ Σε ένα δείγμα από κάθε τετράδα που δημιουργήθηκε από τους οίνους E.1, E.2, E.3, ΣΤ.1, ΣΤ.2, ΣΤ.3, Α.1, Α.2, Α.3 αποβάλλεται το διοξείδιο του άνθρακα με μηχανήμα καθαρισμού υπερήχων (Εικόνα 2).

### Μέθοδος τιτλοδότησης με NaOH

- Σε μία κωνική φιάλη των 250 mL μεταγγίζονται με σιφώνι πληρώσεως 10 mL δείγματος.
- Προστίθενται 10 mL απιονισμένου νερού και 4-5 σταγόνες διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης.
- Με συνεχόμενη ανάδευση προσθέτουμε προοδευτικά, από τη προχοΐδα διάλυμα NaOH 0,1 M, μέχρι να εμφανιστεί ροδίζουσα χροιά και να διατηρηθεί για 15 sec.
- Σημειώθηκε η συνολική κατανάλωση NaOH.



Εικόνα 2: Μηχάνημα καθαρισμού υπερήχων

Η ογκομετρούμενη οξύτητα υπολογίστηκε από τον τύπο:

**Ογκομετρούμενη οξύτητα (g/L) = (καταναλωθέντα mL NaOH 0.1 N) x 0,75**

## 2.6) Μέτρηση θειώδους ανυδρίτη

Το ολικό διοξείδιο του θείου ορίζεται ως το άθροισμα όλων των διαφορετικών μορφών διοξειδίου του θείου που υπάρχουν στον οίνο σε ελεύθερη μορφή ή συνδεδεμένο με τα συστατικά του οίνου.<sup>[20]</sup>

Το ελεύθερο θειώδες αφορά το ποσοστό του θειώδους που παραμένει ελεύθερο στον οίνο, μετά την προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας θειώδους ανυδρίτη.

Το ελεύθερο θειώδες οξύ στον οίνο διαμορφώνεται από τις εξής μορφές :  $\text{SO}_2(\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{HSO}_3^-$ .<sup>[21]</sup>

### Προσδιορισμός Ολικού Θειώδους ανυδρίτη

- Σε μία κωνική φιάλη των 250 mL μεταγγίζονται με σιφώνι πληρώσεως 20 mL δείγματος.
- Προστίθενται 10 mL NaOH 4 M.
- Η φιάλη σφραγίζεται με parafilm και αφήνεται σε σκιερό μέρος για 10-15 min.
- Προσθέτονται 3 mL δείκτη αμύλου και 6 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- Με συνεχόμενη ανάδευση προσθέτουμε προοδευτικά, από τη προχοΐδα διάλυμα ιωδίου (N/50) μέχρι εμφάνισης κυανού χρώματος, που να διατηρείται για 15 sec.
- Σημειώνεται η συνολική κατανάλωση.

### Προσδιορισμός Ελεύθερου Θειώδους ανυδρίτη

- Σε μία κωνική φιάλη των 250mL μεταγγίζονται με σιφώνι πληρώσεως 50mL δείγματος.
- Προσθέτονται 3 mL δείκτη αμύλου και 3 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- Με συνεχόμενη ανάδευση προσθέτουμε προοδευτικά, από τη προχοΐδα διάλυμα ιωδίου (N/50) μέχρι εμφάνισης κυανού χρώματος, που να διατηρείται για 15 sec.
- Σημειώνεται η συνολική κατανάλωση.

Οι ανάλογες μετρήσεις υπολογίστηκαν από τον εξής τύπο:

$$\text{SO}_2 \text{ (mg/L)} = [(V_k \cdot N_{I_2} \cdot M_{r_{\text{SO}_2}}) / V_{\text{οίνου}}] / 1000$$

$V_k$  = καταναλωθέντα mL ιωδίου

$N_{I_2}$  = κανονικότητα ιωδίου

$M_{r_{\text{SO}_2}}$  = μοριακό βάρος θειώδους

$V_{\text{οίνου}}$  = Όγκος δείγματος

### Προσδιορισμός Μοριακού Θειώδους ανυδρίτη

Από τα αποτελέσματα του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη, υπολογίστηκε το ποσοστό του μοριακού ελεύθερου θειώδους που περιέχει το αντίστοιχο δείγμα.

$$\text{Μοριακό SO}_2 = \text{Ελεύθερο SO}_2 / [1 + 10(\text{pH}_{\text{δείγματος}} - 1.81)]$$

## 2.7) CIELab

Το χρώμα του οίνου αποτελεί σημαντικό οπτικό χαρακτηριστικό που αντιλαμβανόμαστε οπτικά από τη διάθλαση ή αντανάκλαση του φωτός στην επιφάνεια των αντικειμένων. Για παράδειγμα, η αίσθηση των πολύ σκούρων κόκκινων οίνων είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου λόγω του γεγονότος ότι η προσπίπτουσα ακτινοβολία απορροφάται από τον οίνο.<sup>[10]</sup>

Ο σκοπός αυτής της φασματοφωτομετρικής μεθόδου είναι ο ορισμός της μέτρησης και υπολογισμού των χρωματικών χαρακτηριστικών των οίνων και άλλων ποτών που προέρχονται από τριχρωματικά συστατικά: X, Y και Z, επιχειρώντας την μίμηση πραγματικών παρατηρητών όσον αφορά τις χρωματικές τους αισθήσεις.<sup>[10]</sup>

Η περιγραφή του χρώματος του οίνου μπορεί να γίνει με την χρήση τριών ιδιοτήτων της οπτικής αίσθησης. Η τονικότητα είναι η πιο χαρακτηριστική και ορίζει τα χρώματα κόκκινο, κίτρινο, πράσινο ή μπλε. Η φωτεινότητα είναι η ιδιότητα της οπτικής αίσθησης, σύμφωνα με την οποία ο οίνος φαίνεται να είναι περισσότερο ή λιγότερο φωτεινός. Ωστόσο, ο χρωματισμός συσχετίζεται με το επίπεδο της έντασης χρώματος. Οι ιδιότητες αυτές καθιστούν εφικτό τον ορισμό των πολλαπλών αποχρώσεων που παρουσιάζουν οι οίνοι (Εικόνα 3).<sup>[10]</sup>

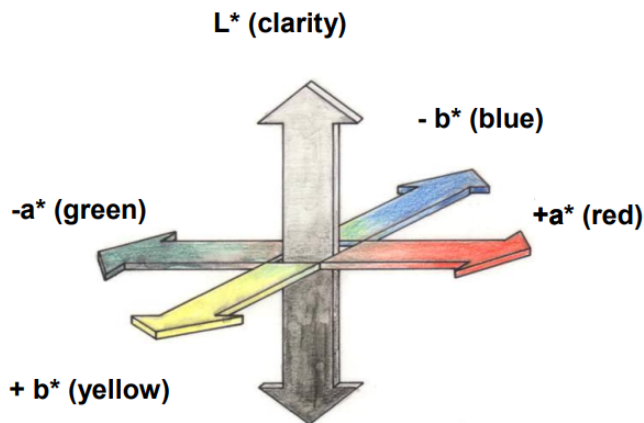
(a\*):  $a^* > 0$  κόκκινο χρώμα ,  $a^* < 0$  πράσινο χρώμα

(b\*):  $b^* > 0$  κίτρινο χρώμα ,  $b^* < 0$  μπλε χρώμα

(C): ένταση

(h\*): απόχρωση

(L): φωτεινότητα [ $L^*=0$  μαύρο,  $L^*=100$  άχρωμο]



Εικόνα 3: Έκφραση παραμέτρων CIELab

Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή της μέτρησης είναι το Chroma Meter CT-310 είναι ένα μικρό δείγμα χρωματόμετρο τριδιέγερσης για τη μέτρηση της διαπερατότητας και του χρώματος των υγρών. Τρεις διαφορετικές κυψελίδες δειγμάτων (με μήκη οπτικής διαδρομής 2 mm, 10 mm και 20 mm) και δύο ρυθμίσεις ευαισθησίας επιτρέπουν μετρήσεις υγρών με μεγάλο εύρος πυκνοτήτων.<sup>[19]</sup>

### Πειραματική πορεία

- Για την ανάλυση λευκού οίνου, γίνεται χρήση κυψελίδας 10mm.
- Η κυψελίδα πληρείται με απιονισμένο νερό, τοποθετείται προς μέτρηση με σκοπό την βαθμονόμηση του οργάνου.
- Έπειτα, η κυψελίδα πληρείται με το δείγμα και τοποθετείται στην υποδοχή προς μέτρηση.
- Σημειώθηκε το αποτέλεσμα της μέτρησης.

Το CIELab χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $H^*$ ,  $L$  και με τα αποτελέσματα υπολογίστηκε το  $\Delta E^*$  (διαφορά από το δείγμα χωρίς προσθήκες), μέσω του τύπου:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$



Εικόνα 4: Χρωματόμετρο

## 2.8) Ενζυμικός αναλυτής

Ο ενζυμικός αναλυτής *HYPERLAB SMART* (Εικόνα 4, Εικόνα 5) είναι ένας συμπαγής και ευέλικτος πολυπαραμετρικός αναλυτής σχεδιασμένος να εκτελεί με πλήρη αυτοματισμό τις ενζυμικές και χρωματομετρικές αναλύσεις που είναι απαραίτητες για τον έλεγχο των διαδικασιών οινοποίησης και της ποιότητας του ίδιου του οίνου. Το *HYPERLAB SMART* είναι ένα απαραίτητο εργαλείο για τον οινοποιό, επιτρέποντας τη μείωση του χρόνου ανάλυσης χωρίς να θυσιάζεται η ευαισθησία και η ακρίβεια του αποτελέσματος. Οι μηχανικές κινήσεις του *HYPERLAB SMART* οδηγούνται από βηματικούς κινητήρες τελευταίας τεχνολογίας. Η ροή του υγρού ελέγχεται από τρεις περισταλτικές αντλίες που τίθενται σε λειτουργία οδηγούμενη από λογισμικό καθώς και όλος ο ρομποτικός χειρισμός του συστήματος είναι οδηγούμενος από λογισμικό.<sup>[9]</sup>



Εικόνα 4: Hyperlab Smart



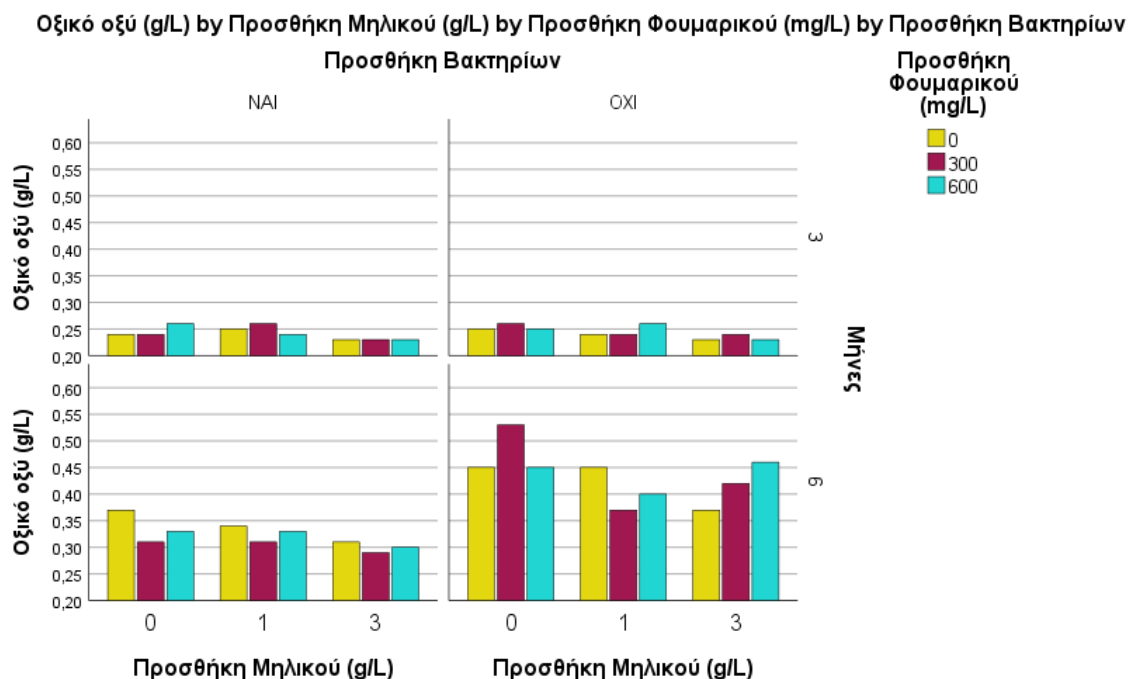
Εικόνα 5: Hyperlab Smart



## Ενότητα 3: Αποτελέσματα

### 3.1) Μέτρηση οξικού οξέος

Η μέτρηση οξικού οξέος έγινε με την χρήση του ενζυμικού αναλυτή στους 3 και 6 μήνες. Τα δείγματα μετρήθηκαν στους αντίστοιχους χρόνους και έπειτα από στατιστική επεξεργασία, απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 6). Στον άξονα y εμφανίζεται η συγκέντρωση του οξικού οξέος, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού οξέος που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων. Επίσης, το διάγραμμα χωρίζεται σε δύο γραμμές, στην πάνω εμφανίζονται τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 3 μήνες, ενώ στην κάτω τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 6 μήνες.



Εικόνα 6: Διάγραμμα μέτρησης οξικού οξέος με χρήση ενζυμικού αναλυτή (2.8) σε συνάρτηση με την προσθήκη μηλικού οξέος.

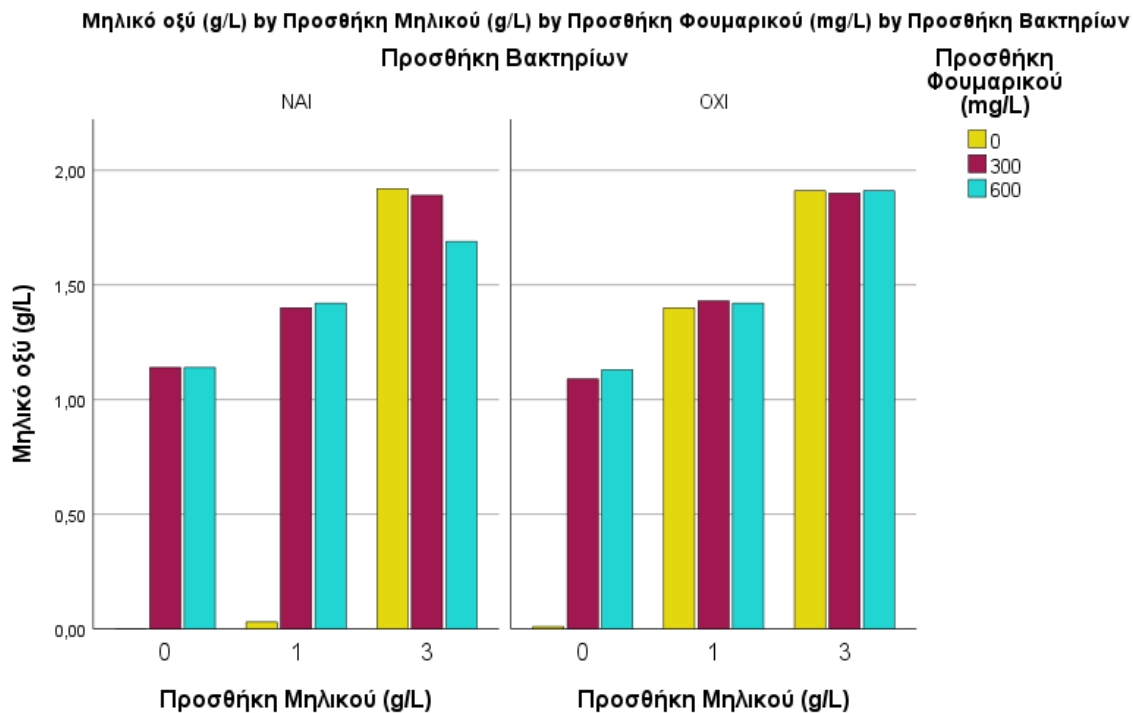
- Όπως φανερώνει το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 6), στον χρόνο των 6 μηνών η συγκέντρωση οξικού οξέος αυξήθηκε. Από τα αποτελέσματα, πιθανολογείται πως κατά την αποθήκευση των δειγμάτων, υπήρξε επαφή του οίνου με το οξυγόνο, το οποίο οδήγησε στην δραστηριοποίηση των οξικών βακτηρίων. Φαίνεται πως έχουν δραστηριοποιηθεί τα βακτήρια οξικού οξέος, τα οποία είναι υποχρεωτικά αερόβια

αρνητικά κατά Gram βακτήρια, τα οποία βρίσκονται ευρέως στην επιφάνεια των λουλουδιών και των φρούτων.<sup>[24]</sup> Στο γλεύκος, η ανάπτυξη των οξικών βακτηρίων είναι ιδιαίτερα περιορισμένη, ενώ μπορούν να παραμείνουν βιώσιμα, χωρίς την δυνατότητα για καλλιέργεια. Χρησιμοποιούνται συνήθως κατά την οξοποίηση, λόγω της ισχυρής τους ικανότητας για οξείδωση αιθανόλης σε οξικό οξύ, καθώς και της αντοχής τους στην υψηλή συγκέντρωση οξέων.<sup>[25]</sup> Η διαδικασία αυτή ονομάζεται οξειδωτική ζύμωση.<sup>[24]</sup>

- Στο διάγραμμα (Εικόνα 6), επίσης, παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στα δείγματα που δεν έχουν προσθήκη βακτηρίων σε σχέση με αυτά που έχουν. Τα δείγματα με προσθήκη γαλακτικών βακτηρίων φαίνεται να έχουν μικρότερη παραγωγή οξικού οξέος. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός πως η παραγωγή οξικού οξέος προκύπτει από την οξείδωση της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη, η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε οξικό οξύ. Τα γαλακτικά βακτήρια, όμως μπορούν να αφομοιώσουν την ακεταλδεΐδη και έτσι να προκύψει μικρότερη παραγωγή οξικού οξέος.<sup>[1]</sup>
- Γενικά με την πάροδο του χρόνου, είναι αναμενόμενη μια μικρή αύξηση του οξικού οξέος. Ένα μέρος του οξικού οξέος, 0,2-0,3 g/L, προέρχεται από την αλκοολική ζύμωση και 0,1-0,2 g/L είναι αποτέλεσμα της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

### 3.2) Μέτρηση μηλικού οξέος

Η μέτρηση μηλικού οξέος έγινε με την χρήση του ενζυμικού αναλυτή στους 6 μήνες. Τα δείγματα μετρήθηκαν στους αντίστοιχους χρόνους και έπειτα από στατιστική επεξεργασία, απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 7). Στον άξονα y εμφανίζεται η συγκέντρωση του μηλικού οξέος, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού οξέος που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων. Επίσης, το διάγραμμα χωρίζεται σε δύο γραμμές, στην πάνω εμφανίζονται τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 3 μήνες, ενώ στην κάτω τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 6 μήνες.



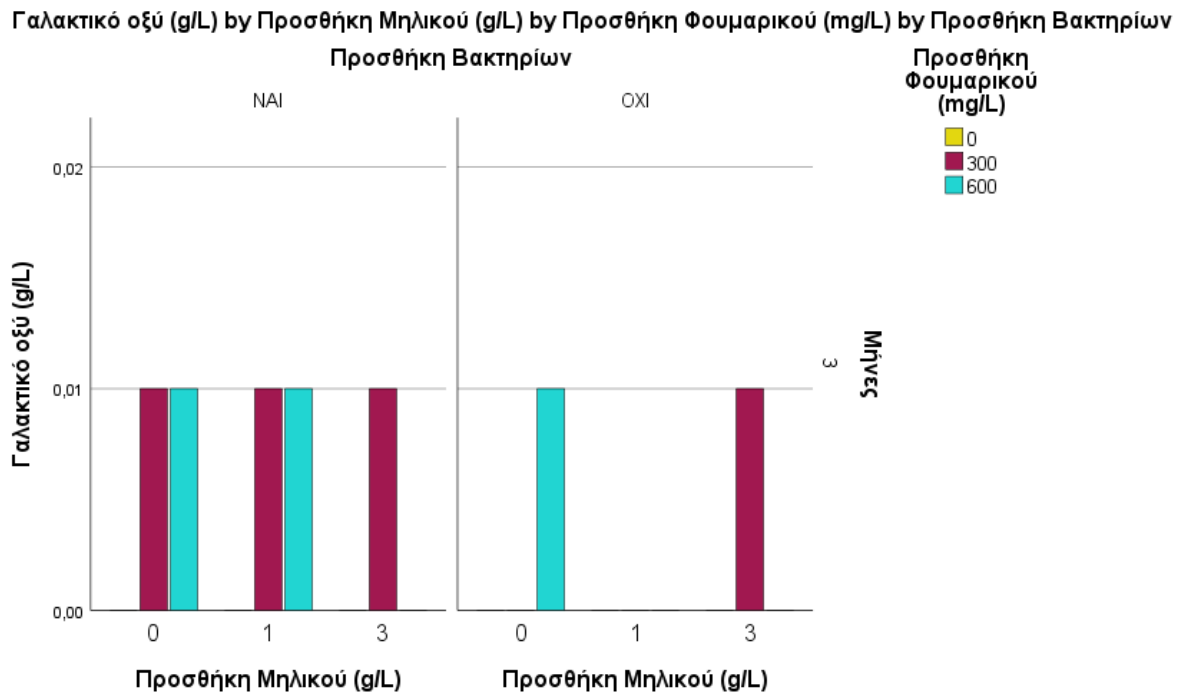
Εικόνα 7: Διάγραμμα μέτρησης μηλικού οξέος με χρήση ενζυμικού αναλυτή (2.8) σε συνάρτηση με την προσθήκη μηλικού οξέος.

- Η μηλογαλακτική ζύμωση εκδηλώθηκε ανεξάρτητα από την προσθήκη βακτηρίων.
- Η προσθήκη βακτηρίων ευνόησε την εκδήλωση της μηλογαλακτικής στην περίπτωση της προσθήκης 1g/L μηλικό και χωρίς προσθήκη φουμαρικού. Με την προσθήκη βακτηρίων, πιθανότερα ο βακτηριακός πληθυσμός έφτασε στο επιθυμητό επίπεδο και μπόρεσε να εκδηλωθεί η μηλογαλακτική ζύμωση. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, ο απαιτούμενος πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων για την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι  $10^6$ /mL.

- Στα δείγματα που υπήρξε προσθήκη φουμαρικού, δεν έχει εκδηλωθεί μηλογαλακτική ζύμωση, καθώς η προσθήκη του κατάφερε να εμποδίσει την εκδήλωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Οι οίνοι που περιείχαν ποσότητα φουμαρικού οξέος ήταν πιο σταθεροί μακροπρόθεσμα και υπήρξε διατήρηση του μηλικού οξέος λόγω της απουσίας της μηλογαλακτικής. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι ακόμα και σε υψηλό πληθυσμό γαλακτικών βακτηρίων, η προσθήκη φουμαρικού ανέτρεψε την μηλογαλακτική. Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίζει και η παρακάτω έρευνα, όπου μελετήθηκε η προσθήκη φουμαρικού οξέος για την αναστολή της μηλογαλακτικής ζύμωσης.<sup>[27]</sup>
- Στα δείγματα, τα οποία περιείχαν ποσότητα μηλικού οξέος 3 g/L, δεν ήταν εφικτή η μηλογαλακτική ζύμωση. Η οξύτητα του οίνου ρυθμίζει τον ρυθμό ανάπτυξης των βακτηρίων.<sup>[1]</sup> Έτσι, το pH, το οποίο όπως είδαμε παραπάνω διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διεξαγωγή της μηλογαλακτικής, στα δείγματα που περιέχουν ποσότητες μηλικού οξέος 3 g/L, είναι χαμηλότερο (της τάξεως του 3,1 - 3,2). Το γεγονός αυτό κάνει την διεξαγωγή της μηλογαλακτικής δυσκολότερη, αφού ο *Oenococcus oeni* αναπτύσσεται βέλτιστα σε τιμές pH 3,2 - 3,5.<sup>[37]</sup>

### 3.3) Μέτρηση γαλακτικού οξέος

Η μέτρηση γαλακτικού οξέος έγινε με την χρήση του ενζυμικού αναλυτή στους 3 μήνες. Τα δείγματα μετρήθηκαν στους αντίστοιχους χρόνους και έπειτα από στατιστική επεξεργασία, απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 8). Στον άξονα y εμφανίζεται η συγκέντρωση του μηλικού οξέος, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού οξέος που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων. Επίσης, το διάγραμμα χωρίζεται σε δύο γραμμές, στην πάνω εμφανίζονται τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 3 μήνες, ενώ στην κάτω τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 6 μήνες.



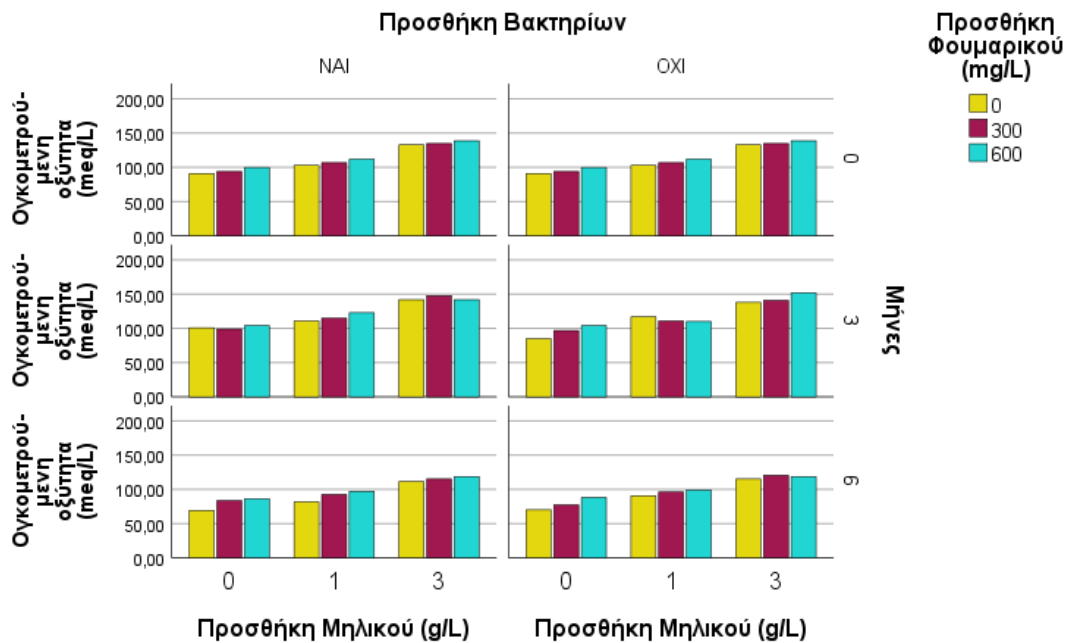
Εικόνα 8: Διάγραμμα μέτρησης γαλακτικού οξέος με χρήση ενζυμικού αναλυτή (2.8) σε συνάρτηση με την προσθήκη μηλικού οξέος.

- Από τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα 8), φαίνεται πως στους 3 μήνες δεν υπάρχει εκδήλωση μηλογαλακτικής ζύμωσης. Οι μετρήσεις των δειγμάτων είναι στα όρια του σφάλματος του ενζυμικού αναλυτή, όπου για τους λευκούς οίνους είναι 0,560 g/L.<sup>[9]</sup> Έτσι τα αποτελέσματα δεν μπορούν να ληφθούν υπόψη.
- Η εκδήλωση της μηλογαλακτικής υποθέτουμε πως έχει γίνει μετά την πάροδο των 3 μηνών σε ορισμένα δείγματα, αφού σε συνάρτηση με τα αποτελέσματα του μηλικού που αναφέρονται στο χρόνο των 6 μηνών, υπήρξε κατανάλωση του μηλικού οξέος.

### 3.4) Μέτρηση ογκομετρούμενης οξύτητας

Η ογκομετρούμενη οξύτητα μετρήθηκε με τιτλοδότηση. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε meq/L και απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 9). Στον άξονα y εμφανίζεται η ογκομετρούμενη οξύτητα, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων. Επίσης, το διάγραμμα χωρίζεται σε τρεις γραμμές, στην πρώτη εμφανίζονται τα δείγματα που μετρήθηκαν στον αρχικό χρόνο, στην δεύτερη τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 3 μήνες, ενώ στην τρίτη τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 6 μήνες.

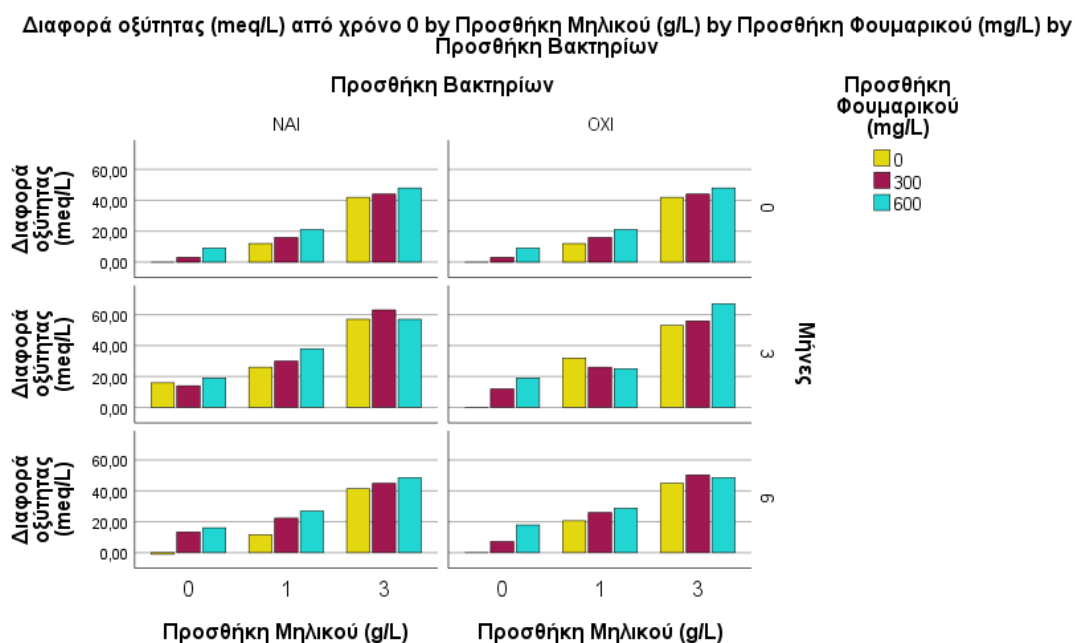
Ογκομετρούμενη οξύτητα (meq/L) by Προσθήκη Μηλικού (g/L) by Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L) by Προσθήκη Βακτηρίων



Εικόνα 9: Διάγραμμα μέτρησης ογκομετρούμενης οξύτητας (2.5) σε συνάρτηση με την προσθήκη μηλικού οξέος.

Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 10) παρουσιάζεται η διαφορά οξύτητας ανάμεσα στα δείγματα που είχαν υποστεί προσθήκη μηλικού, φουμαρικού και βακτηρίων, από το δείγμα που δεν περιείχε καμία προσθήκη στον αντίστοιχο χρόνο. Στον άξονα y εμφανίζεται η διαφορά οξύτητας, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων. Επίσης, το διάγραμμα χωρίζεται σε τρεις γραμμές, στην

πρώτη εμφανίζονται τα δείγματα που μετρήθηκαν στον αρχικό χρόνο, στην δεύτερη τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 3 μήνες, ενώ στην τρίτη τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 6 μήνες.



Εικόνα 10: Διάγραμμα μέτρησης διαφοράς τιμής ογκομετρούμενης οξύτητας δειγμάτων από το αντίστοιχο δείγμα χωρίς προσθήκες.

- Η προσθήκη των δύο οξέων αυξάνει τα επίπεδα της ογκομετρούμενης οξύτητας. Από τα διαγράμματα φαίνεται πως η οξύτητα αυξάνει αναλογικά με την ποσότητα οξέων που περιέχουν τα δείγματα. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα (Εικόνα 9), η προσθήκη φουμαρικού σε ποσότητα 600 mg/L, οδηγεί σε αύξηση οξύτητας περίπου κατά 8-10 meq/L, ενώ η προσθήκη μηλικού οξέος 3 g/L οδηγεί σε αύξηση περίπου κατά 40 meq/L. Έτσι, η διαφορά οξύτητας του δείγματος, με τις μέγιστες προσθήκες ανέρχεται στα 50 meq/L. Με οδηγό τα παραπάνω αποτελέσματα και υπολογίζοντας τις διαφορετικές ποσότητες των οξέων που έχουν προστεθεί, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η προσθήκη φουμαρικού οξέος, οδηγεί σε παρόμοια αύξηση της ογκομετρούμενης οξύτητας με αυτή της προσθήκης του μηλικού. Υπολογίζουμε πως το φουμαρικό σε ποσότητα 3 g/L, θα αύξανε την ογκομετρούμενη οξύτητα κατά 40 meq/L, επίσης. Τα αποτελέσματα αυτά διασταυρώνονται και με αντίστοιχες έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε σχέση με το φουμαρικό οξύ ως μέσο οξίνισης του οίνου.<sup>[27]</sup>
- Στους 3 μήνες, η ογκομετρούμενη οξύτητα εμφανίζεται σχεδόν σταθερή. Παρατηρείται μια μικρή αύξηση, η οποία μπορεί να οφείλεται σε τυχόν οξείδωση των οίνων. Η αύξηση είναι της τάξεως των 10 meq/L και παρατηρείται σε όλα τα δείγματα.
- Η ογκομετρούμενη οξύτητα κατά τους 6 μήνες έχει ελαττωθεί. Στα δείγματα χωρίς προσθήκη φουμαρικού, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα του μηλικού, εκδηλώθηκε

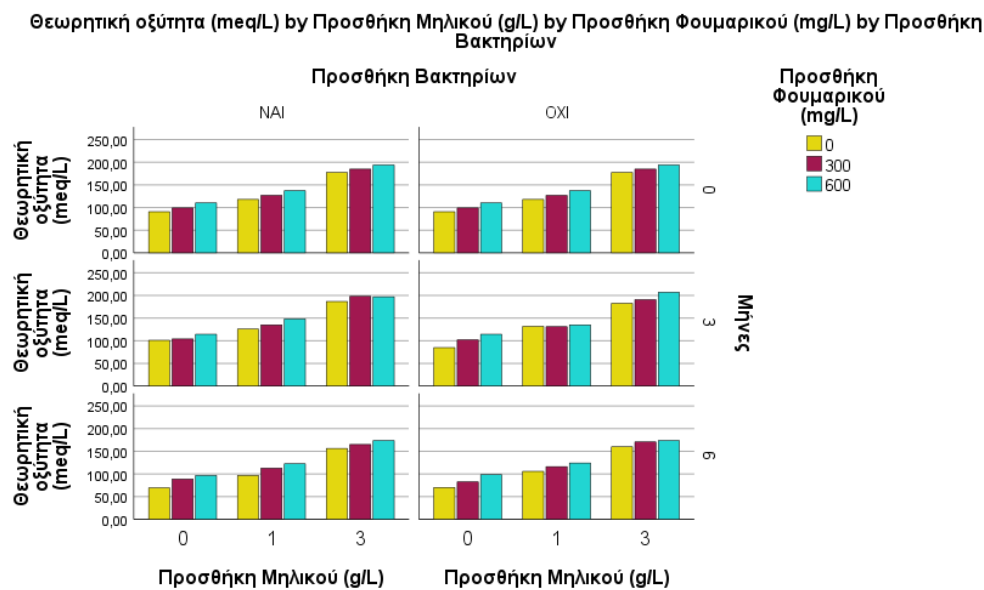
μηλογαλακτική ζύμωση και για αυτόν τον λόγο, η μεταβολή της ογκομετρούμενης οξύτητας είναι μεγαλύτερη, αφού το μηλικό οξύ είναι πιο ισχυρό από το γαλακτικό.<sup>[1]</sup>

- Στα δείγματα τα οποία μελετήθηκαν στους 6 μήνες, φαίνεται μείωση της ογκομετρούμενης οξύτητας. Αυτή η μείωση πιθανότερα οφείλεται σε τεχνικό λάθος που συνέβη κατά τη μέτρηση.



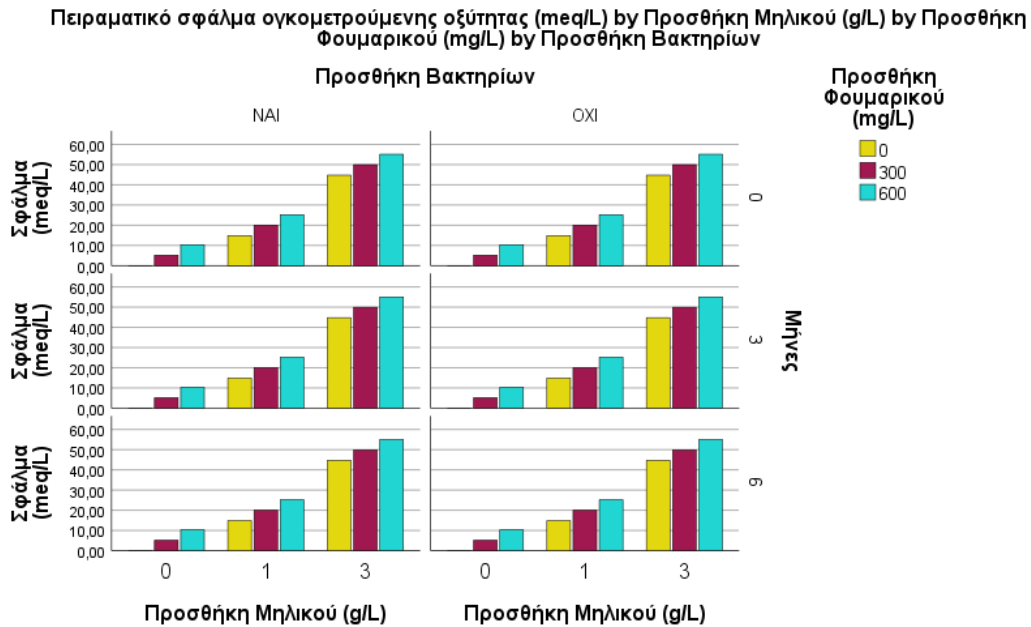
### 3.5) Μέτρηση σφάλματος ογκομέτρησης

Το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 11) απεικονίζει την θεωρητική τιμή οξύτητας που, σύμφωνα με τις αντίστοιχες προσθήκες, έπρεπε να έχουν τα δείγματα. Στον άξονα y εμφανίζεται η θεωρητική ογκομετρούμενη οξύτητα, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων. Επίσης, το διάγραμμα χωρίζεται σε τρεις γραμμές, στην πρώτη εμφανίζονται τα δείγματα του αρχικού χρόνου, στην δεύτερη τα δείγματα των 3 μηνών, ενώ στην τρίτη τα δείγματα των 6 μηνών.



Εικόνα 11: Διάγραμμα υπολογισμού της θεωρητικής τιμής ογκομετρούμενης οξύτητας στα δείγματα σύμφωνα με τις προσθήκες που έχουν γίνει σε συνάρτηση με την προσθήκη μηλικού οξέος.

Το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 12) αναφέρεται στο σφάλμα το οποίο υπάρχει ανάμεσα στην πραγματική τιμή οξύτητας των οίνων και την θεωρητική. Στον άξονα y εμφανίζεται το σφάλμα, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων. Επίσης, το διάγραμμα χωρίζεται σε τρεις γραμμές, στην πρώτη εμφανίζονται τα δείγματα του αρχικού χρόνου, στην δεύτερη τα δείγματα των 3 μηνών, ενώ στην τρίτη τα δείγματα των 6 μηνών.



Εικόνα 12: Διάγραμμα υπολογισμού του σφάλματος που συνέβη κατά την ογκομέτρηση σε συνάρτηση με την προσθήκη μηλικού οξέος.

- Στα παραπάνω διαγράμματα (Εικόνα 11, Εικόνα 12) παρουσιάζεται η τιμή της οξύτητας που θεωρητικά έπρεπε να έχει ο οίνος, σύμφωνα με τις προσθήκες που του έχουν εφαρμοστεί. Επίσης, στο επόμενο διάγραμμα φαίνεται το σφάλμα το οποίο έχει προκύψει ανάμεσα στην τιμή της θεωρητικής οξύτητας και της ογκομετρούμενης οξύτητας που προσδιορίστηκε με την μέθοδο τιτλοδότησης.
- Τα δείγματα που εμφανίζουν την μεγαλύτερη απόκλιση των δύο τιμών είναι αυτά που έχουν υποβληθεί στις μεγαλύτερες προσθήκες. Η απόκλιση στα δείγματα με 3 g/L μηλικό οξύ και 600 mg/L φουμαρικό οξύ, είναι της τάξεως του 50-55 meq/L, καθώς όπως αναμένεται, σε αυτά υπάρχουν και οι μεγαλύτερες απώλειες.
- Από τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα 12) φαίνεται πως η θεωρητική τιμή οξύτητας των δειγμάτων δεν αντιστοιχεί στην οξύτητα που μετρήθηκε. Αυτό είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι η ογκομετρούμενη οξύτητα είναι πάντα μικρότερη από την αναμενόμενη, λόγω ενός συγκεκριμένου μηχανισμού ανταλλαγής πρωτονίων των οξέων των σταφυλιών και των ιόντων καλίου (και σε μικρότερο βαθμό των ιόντων νατρίου).<sup>[28]</sup>

### 3.6) Μέτρηση pH

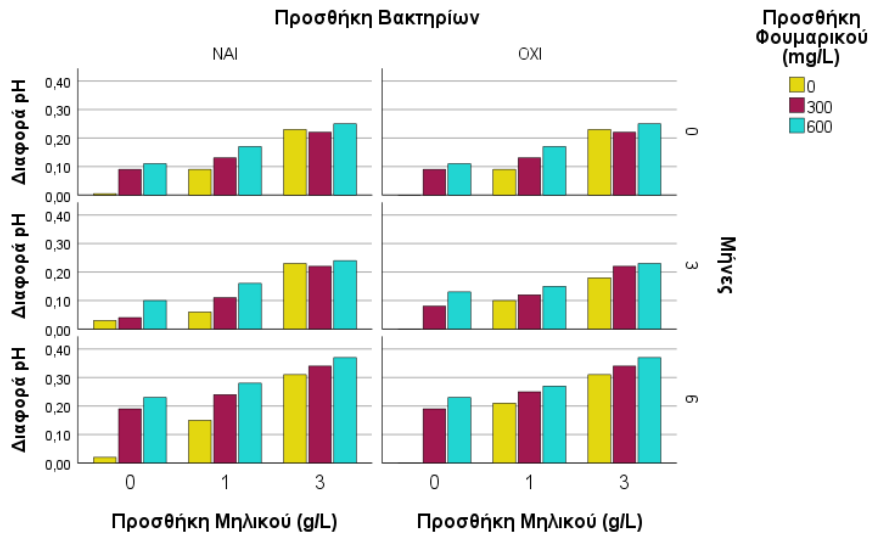
Στα δείγματα μετρήθηκε η τιμή pH στους αντίστοιχους χρόνους και έπειτα από στατιστική επεξεργασία, απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 13). Στον άξονα y εμφανίζεται η τιμή pH, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων. Επίσης, το διάγραμμα χωρίζεται σε τρεις γραμμές, στην πρώτη εμφανίζονται τα δείγματα που μετρήθηκαν στον αρχικό χρόνο, στην δεύτερη τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 3 μήνες, ενώ στην τρίτη τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 6 μήνες.



Εικόνα 13: Διάγραμμα μέτρησης pH

Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 14), εμφανίζεται η διαφορά pH ανάμεσα στα δείγματα που είχαν υποστεί προσθήκη μηλικού, φουμαρικού και βακτηρίων, από το δείγμα που δεν περιείχε καμία προσθήκη στον αντίστοιχο χρόνο. Στον άξονα y εμφανίζεται η διαφορά τιμής pH, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων. Επίσης, το διάγραμμα χωρίζεται σε τρεις γραμμές, στην πρώτη εμφανίζονται τα δείγματα που μετρήθηκαν στον αρχικό χρόνο, στην δεύτερη τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 3 μήνες, ενώ στην τρίτη τα δείγματα που μετρήθηκαν στους 6 μήνες.

Διαφορά pH από δείγμα χωρίς προσθήκες by Προσθήκη Μηλικού (g/L) by Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L) by Προσθήκη Βακτηρίων

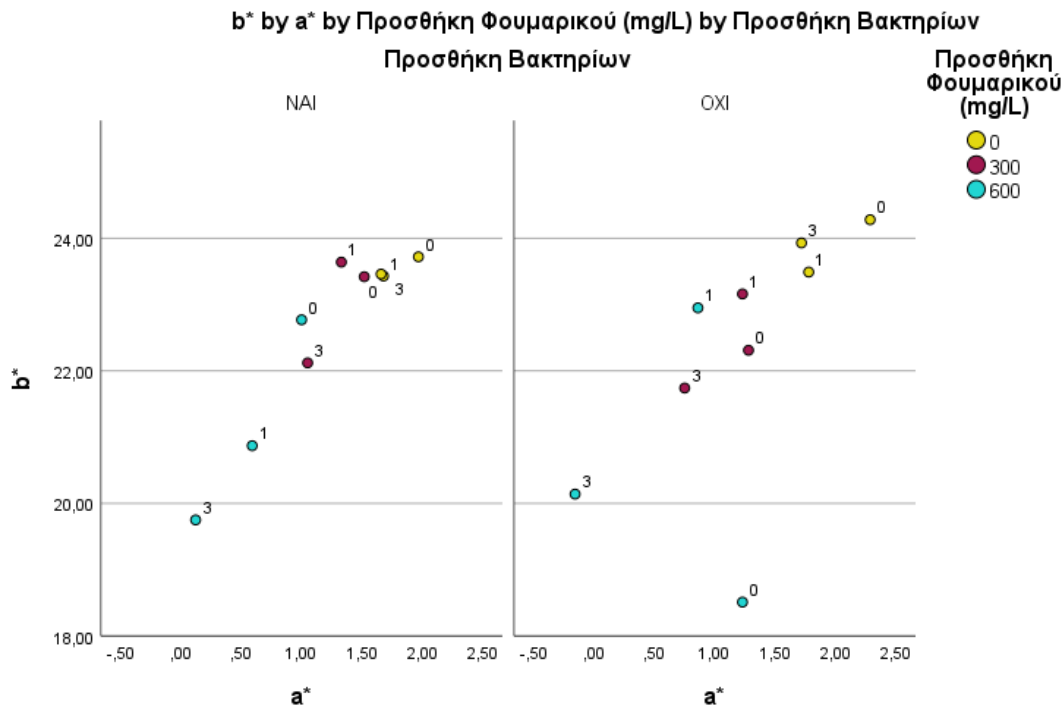


Εικόνα 14: Διάγραμμα μέτρησης διαφοράς τιμής pH δειγμάτων από το αντίστοιχο δείγμα χωρίς προσθήκες.

- Στα δείγματα που όπως είδαμε παραπάνω έχει εκδηλωθεί η μηλογαλακτική ζύμωση, παρατηρείται αύξηση του pH κατά 0,15 μονάδες περίπου, από τους 3 στους 6 μήνες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός, ότι κατά την μηλογαλακτική ζύμωση παρατηρείται αύξηση του pH κατά 0,1 - 0,3 μονάδες, καθώς το μηλικό οξύ που καταναλώνεται κατά την εν λόγω ζύμωση, αντικαθιστάται από το γαλακτικό που είναι λιγότερο ισχυρό οξύ.<sup>[1]</sup>
- Η προσθήκη των οξέων συνοδεύεται από ταυτόχρονη μείωση του pH. Συγκεκριμένα, στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 13, Εικόνα 14) φαίνεται πως το pH μειώνεται κατά 0,1 με την μέγιστη προσθήκη φουμαρικού οξέος που είναι τα 600 mg/L, ενώ η προσθήκη μηλικού σε ποσότητα 1 g/L οδηγεί επίσης σε μείωση του pH περίπου κατά τις ίδιες μονάδες. Το δείγμα με την προσθήκη 3 g/L μηλικού οξέος και 600 mg/L φουμαρικού οξέος έχει την μεγαλύτερη μεταβολή, από τον αρχικό χρόνο. Επιπλέον, παρατηρείται χαμηλότερο pH τόσο λόγω της οξίνισης με φουμαρικό, όσο και της διατήρησης της οξύτητας που οφείλεται στο μηλικό οξύ.<sup>[15]</sup> Τα αποτελέσματα μπορούν να διασταυρωθούν και με αντίστοιχες έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με το φουμαρικό οξύ, όπου φαίνεται πως η προσθήκη 600 mg/L φουμαρικού οξέος οδήγησε σε πτώση της τιμής του pH κατά 0,1 μονάδες περίπου.<sup>[27]</sup>
- Το pH των οίνων μπορεί να υποστεί μεταβολές κατά τη διάρκεια της παλαίωσης λόγω της μηλογαλακτικής ζύμωσης, της καθίζησης όξινου τρυγικού καλίου και της μερικής εστεροποίησης του τρυγικού οξέος.<sup>[14]</sup>

### 3.7) Μετρήσεις CIELab

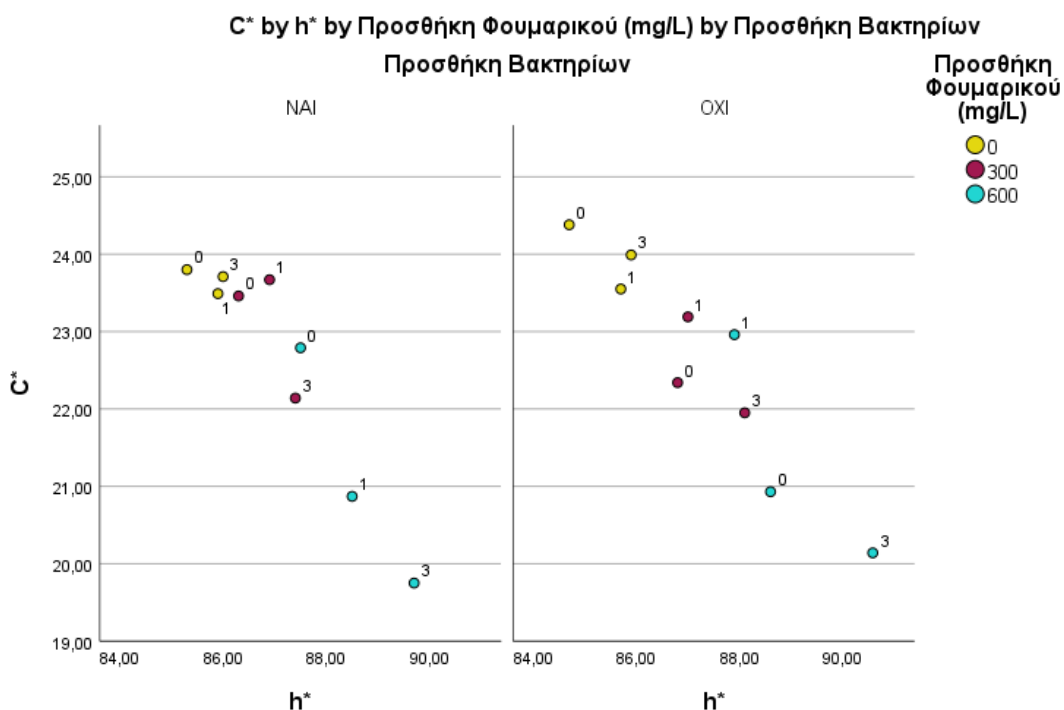
Το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 15) αναφέρεται στη μέτρηση του χρώματος στους 3 μήνες. Στον άξονα y, εμφανίζονται οι τιμές του  $b^*$ , το οποίο αντιπροσωπεύει το χρώμα μπλε/κίτρινο, ενώ στον άξονα x, εμφανίζονται οι τιμές του  $a^*$ , το οποίο αντιπροσωπεύει την φωτεινότητα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων, ενώ οι δείκτες στα σημεία των αποτελεσμάτων, αφορούν την προσθήκη μηλικού οξέος που έγινε αρχικά στα δείγματα.



Εικόνα 15: Διάγραμμα μέτρησης  $b^*$  σε συνάρτηση  $a^*$  με χρήση CIELab (2.7).

- Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 15), δεν υπάρχει εμφανής διαφορά ανάμεσα στα δείγματα που έχουν προσθήκη βακτηρίων και σε αυτά που δεν έχουν.
- Στον άξονα  $a^*$ , όλα τα δείγματα έχουν τιμές που πλησιάζουν το 0. Αυτό σημαίνει πως δεν εμφανίζεται πράσινο ή κόκκινο χρώμα στον οίνο και πως το χρώμα του καθορίζεται από την παράμετρο  $b^*$ .
- Επίσης, φαίνεται πως τα δείγματα με την προσθήκη φουμαρικού, τοποθετούνται χαμηλότερα στον άξονα  $b^*$ , έχουν, λοιπόν, λιγότερο κίτρινο χρώμα. Έτσι, τα δείγματα χωρίς την προσθήκη φουμαρικού εμφανίζονται πιο κίτρινα.

Το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 16) αναφέρεται στη μέτρηση του χρώματος στους 3 μήνες. Στον άξονα y, εμφανίζονται οι τιμές του  $C^*$ , το οποίο αντιπροσωπεύει την ένταση, ενώ στον άξονα x, εμφανίζονται οι τιμές του  $h^*$  το οποίο αντιπροσωπεύει την απόχρωση. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων, ενώ οι δείκτες στα σημεία των αποτελεσμάτων, αφορούν την προσθήκη μηλικού οξέος που έγινε αρχικά στα δείγματα.

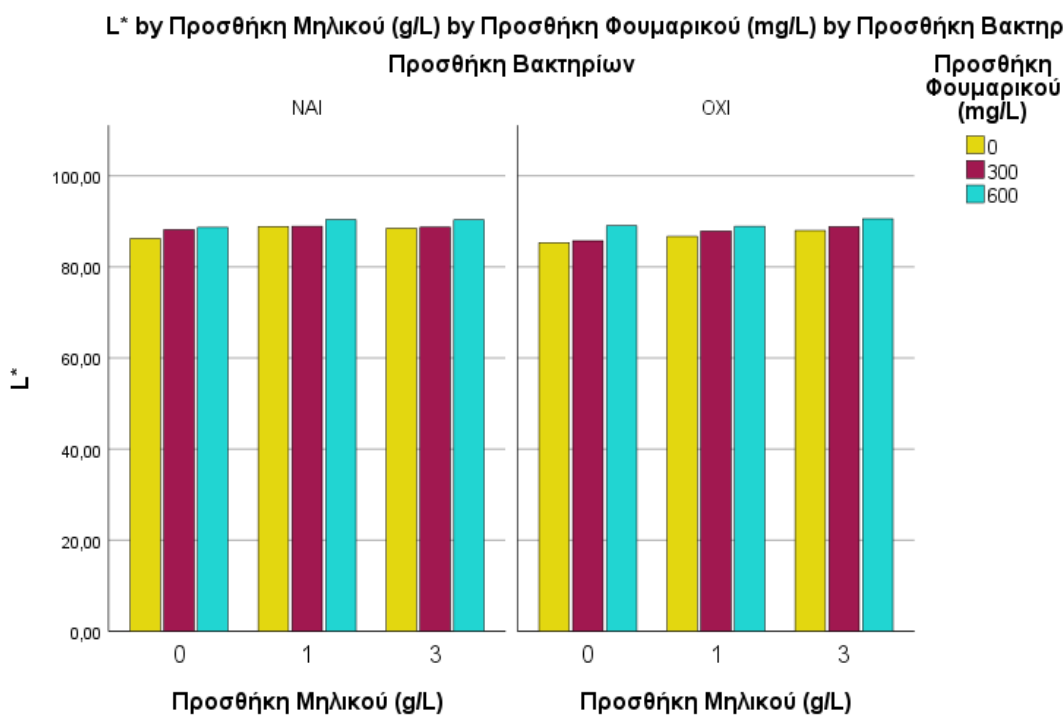


Εικόνα 16: Διάγραμμα μέτρησης  $C^*$  σε συνάρτηση  $h^*$  με χρήση CIELab (2.7).

- Όπως φαίνεται, δεν υπάρχει εμφανής διαφορά ανάμεσα στα δείγματα που έχουν προσθήκη βακτηρίων και σε αυτά που δεν έχουν.
- Στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 16) φαίνεται πως τα δείγματα τα οποία δεν έχουν υποστεί προσθήκη φουμαρικού οξέος έχουν περισσότερη ένταση χρώματος από αυτά που έχουν υποστεί προσθήκη.
- $h^*$  ορίζεται η γωνία της απόχρωσης στο επίπεδο  $a^*-b^*$  και μετράται σε μοίρες. Η απόχρωση, επίσης, φαίνεται να επηρεάζεται από το φουμαρικό οξύ, καθώς τα δείγματα που έχουν συγκέντρωση φουμαρικού 600mg/L, τείνουν προς τα δεξιά στον άξονα του  $h^*$ . Αυτό σημαίνει πως τα δείγματα με την μεγαλύτερη προσθήκη φουμαρικού, τείνουν προς το κίτρινο χρώμα, καθώς η τιμή  $h^*$  90, είναι το καθαρό κίτρινο χρώμα.<sup>[4]</sup> Για τους λευκούς

οίνους, η ένταση του κίτρινου, εφόσον δεν οφείλεται σε παρατεταμένη οξειδωση, δείχνει την ωριμότητα της ηλικίας του.<sup>[1]</sup>

Το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 17) αναφέρεται στη μέτρηση του χρώματος στους 3 μήνες. Στον άξονα y, εμφανίζονται οι τιμές του L\*, το οποίο αντιπροσωπεύει την φωτεινότητα, ενώ στον άξονα x, εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων.

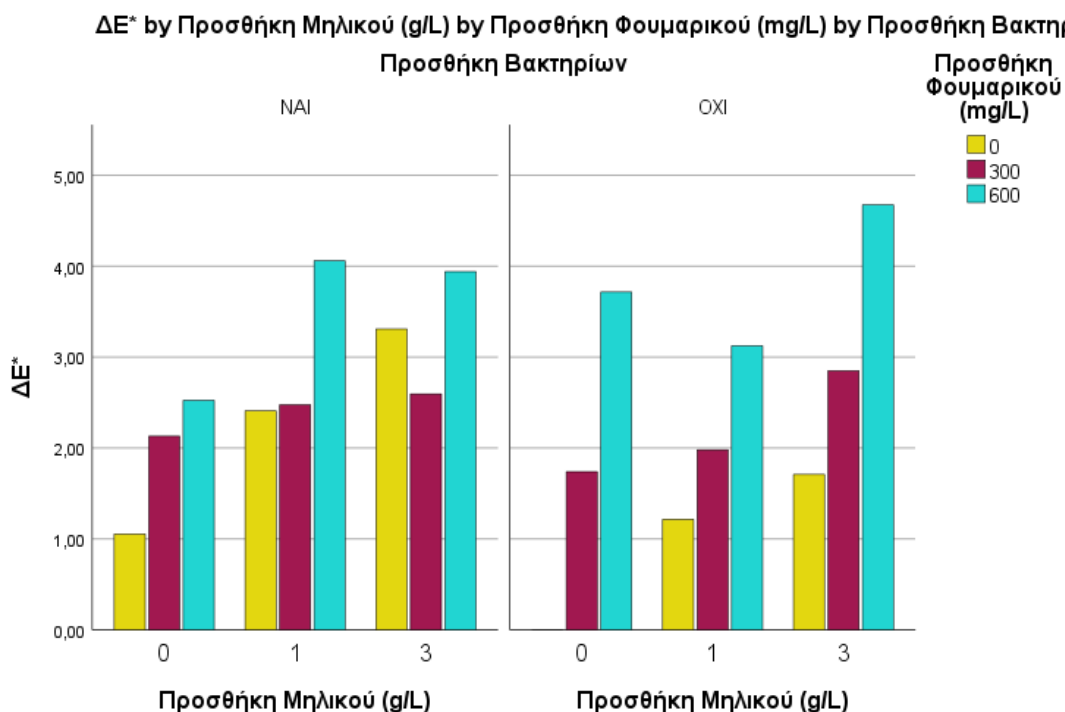


Εικόνα 17: Διάγραμμα μέτρησης L\* σε συνάρτηση με την προσθήκη μηλικού με χρήση CIELab (2.7).

- Στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 17) δεν εντοπίζεται διαφορά στην φωτεινότητα ανάμεσα στα δείγματα, που να σχετίζεται με τις προσθήκες που έχουν υποστεί. Τα επίπεδα φωτεινότητας κυμαίνονται από 85 έως 90, με την τιμή L=100, να είναι ένα διαυγές υγρό.<sup>[31]</sup>

Το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 18) αναφέρεται στη μέτρηση του χρώματος στους 3 μήνες. Στον άξονα y, εμφανίζονται οι τιμές του ΔΕ\*, το οποίο αντιπροσωπεύει την ένταση, ενώ στον άξονα x, εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα

εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων, ενώ οι δείκτες στα σημεία των αποτελεσμάτων, αφορούν την προσθήκη μηλικού οξέος που έγινε αρχικά στα δείγματα.



Εικόνα 18: Διάγραμμα μέτρησης ΔΕ\* σε συνάρτηση με την προσθήκη μηλικού με χρήση CIELab (2.7).

- Το ΔΕ υπολογίζει την συνολική χρωματική διαφορά ανάμεσα σε δύο δείγματα, προσμετρώντας τις παραμέτρους  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ .<sup>[31]</sup>
- Μελετώντας το διάγραμμα (Εικόνα 18), φαίνεται πως η προσθήκη φουμαρικού οξέος στην μέγιστη ποσότητα αύξησε έως και 4,5 μονάδες το ΔΕ, διαφορά η οποία παρατηρείται και οπτικά.<sup>[31]</sup> Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα παραπάνω διαγράμματα, καθώς με την προσθήκη 600 mg/L φουμαρικού οξέος, τα δείγματα έχουν την μεγαλύτερη διαφορά τιμών  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  και  $h^*$ .



### 3.8) Μέτρηση ολικού θειώδους οξέος

Το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 19) απεικονίζει την μέτρηση του ολικού θειώδους οξέος που έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 2.6 στους 3 μήνες. Στον άξονα y εμφανίζεται η τιμή του ολικού θειώδους οξέος, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων.

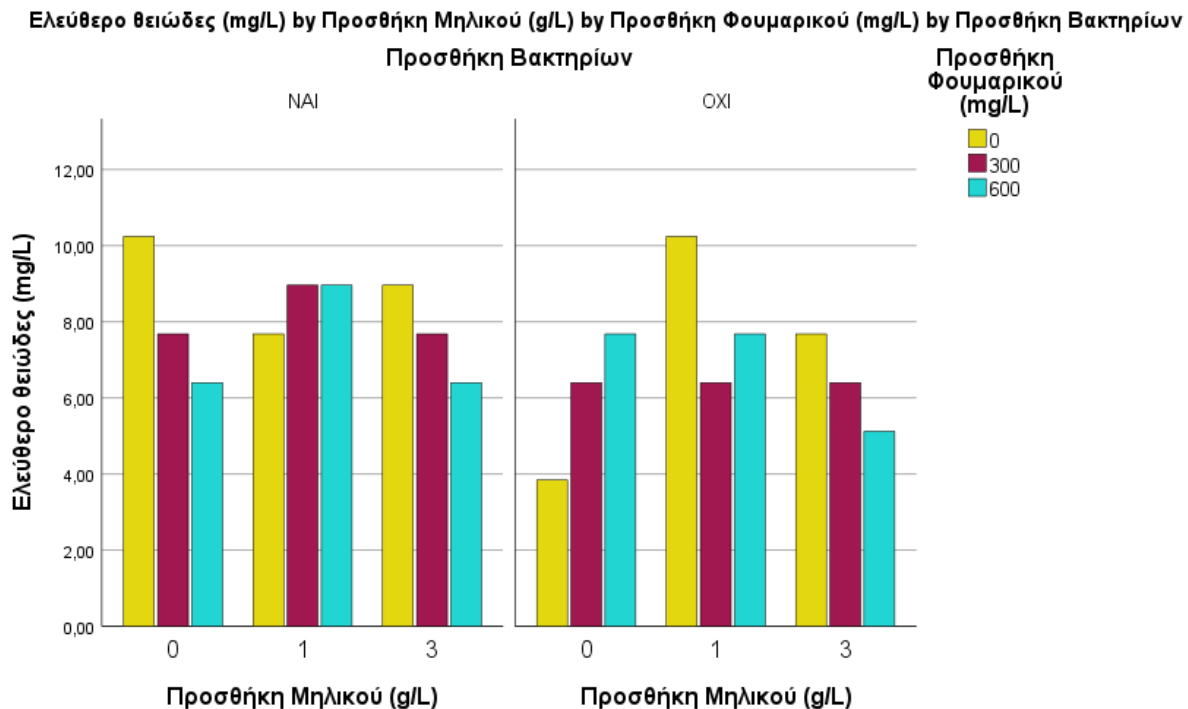


Εικόνα 19: Διάγραμμα μέτρησης ολικού θειώδους σε συνάρτηση με την προσθήκη μηλικού.

- Από το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 19), φαίνεται πως η προσθήκη φουμαρικού δεν επηρεάζει την ποσότητα του θειώδους στον οίνο. Τα επίπεδα του ολικού θειώδους δεν μεταβάλλονται σημαντικά, καθώς το τεχνικό σφάλμα μεθόδου είναι 6 mg/L και σε συνδυασμό με λάθος του χειριστή κατά τη μέτρηση. Έτσι, τυχόν αποκλίσεις μπορούν να αποδοθούν σε σφάλμα.<sup>[20]</sup>
- Στα επίπεδα που παρουσιάζονται παραπάνω, υπάρχει δυνατότητα διεξαγωγής της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Συγκεντρώσεις ολικού θειώδους έως 100 mg/L δεν είναι απαγορευτικές για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων.<sup>[37]</sup>

### 3.9) Μέτρηση ελεύθερου θειώδους οξέος

Το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 20) απεικονίζει την μέτρηση του ελεύθερου θειώδους οξέος στους 3 μήνες. Στον άξονα y εμφανίζεται η τιμή του ολικού θειώδους οξέος, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων.



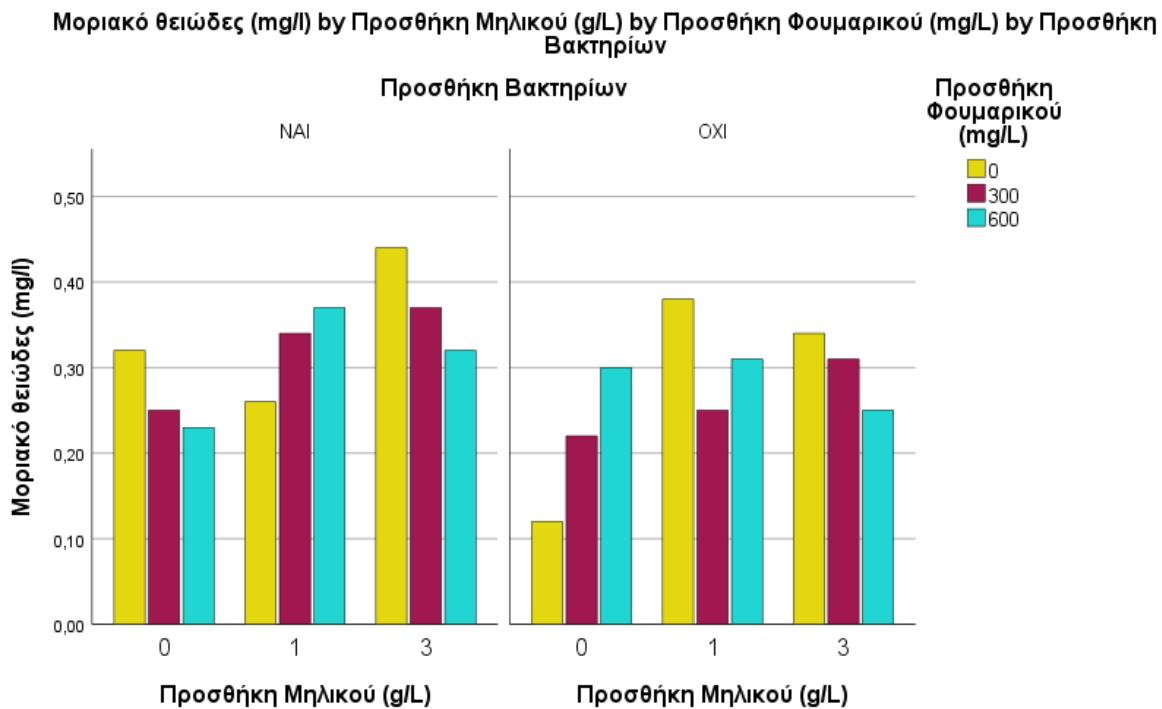
Εικόνα 20: Διάγραμμα μέτρησης ελεύθερου θειώδους σε συνάρτηση με την προσθήκη μηλικού.

- Από το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 20), φαίνεται πως η ποσότητα του ελεύθερου θειώδους κυμαίνεται από 4 έως 10 mg/L, χωρίς να υπάρχει κάποια ακολουθία ή μοτίβο σε σχέση με τις προσθήκες στα δείγματα. Η μέτρηση του θειώδους και των μορφών του είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς το ελεύθερο θειώδες παρέχει την επιθυμητή μικροβιακή σταθερότητα. Όταν προστίθεται σε ένα υδατικό σύστημα, είτε από πηγή ορυκτών όπως το μεταδιθειώδες κάλιο (KMBS,  $K_2S_2O_5$ ) είτε ως αέριο, το διοξείδιο του θείου σχηματίζει μια ισορροπία τριών μορφών, μοριακής  $SO_2$ , διθειώδους ( $HSO_3^{2-}$ ), και θειώδη ( $SO_3^{2-}$ ).<sup>[29]</sup> Ενώ η αξία του ελεύθερου  $SO_2$  εκφράζεται ως το άθροισμα και των τριών μορφών, η τιμή που συχνά έχει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι η συγκέντρωση της μοριακής μορφής, με 0,8 mg/L να είναι η απαραίτητη ποσότητα για την προστασία του οίνου.<sup>[29]</sup> Παρόλα αυτά, η συγκέντρωση ελεύθερου θειώδους αναστέλλει την μηλογαλακτική ζύμωση σε συγκεντρώσεις 10 mg/L, το οποίο δεν συμβαίνει σε κανένα από τα δείγματα.<sup>[35]</sup>

- Η μέθοδος μέτρησης ελεύθερου θειώδους, ενώ είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη σε οινοποιεία, το εργαστηριακό σφάλμα μειώνει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Σε λευκούς οίνους, υπάρχει 35% πιθανότητα το σφάλμα να υπερβαίνει τα 3 mg/L και 13% πιθανότητα το σφάλμα να υπερβαίνει τα 5 mg/L.<sup>[35]</sup>

### 3.10) Μέτρηση μοριακού θειώδους οξέος

Το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 20) απεικονίζει την μέτρηση του μοριακού θειώδους οξέος στους 3 μήνες. Στον άξονα y εμφανίζεται η τιμή του μοριακού θειώδους οξέος, ενώ στον άξονα x εμφανίζεται η προσθήκη μηλικού που έγινε αρχικά στα δείγματα. Με κίτρινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που δεν περιέχουν προσθήκη φουμαρικού οξέος, με κόκκινο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 300 mg/L και τέλος με γαλάζιο εμφανίζονται τα δείγματα με προσθήκη φουμαρικού οξέος 600 mg/L. Το διάγραμμα διαχωρίζεται σε δύο στήλες, αριστερά είναι τα δείγματα με προσθήκη βακτηρίων και δεξιά τα δείγματα χωρίς προσθήκη βακτηρίων.



Εικόνα 21: Διάγραμμα μέτρησης μοριακού θειώδους σε συνάρτηση με την προσθήκη μηλικού.

- Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 21), κανένα από τα δείγματα δεν περιέχει την ποσότητα του μοριακού θειώδους που είναι απαραίτητη για την προστασία του. Το μοριακό θειώδες έχει αντισηπτική δράση όταν η συγκέντρωσή του είναι μεγαλύτερη από 0,8 mg/L. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο pH που επικρατεί σε όλα τα δείγματα που όπως είδαμε παραπάνω κυμαίνεται από 3,20 έως 3,40. Σε τέτοιες τιμές pH, το ποσοστό του μοριακού θειώδους είναι ιδιαίτερα μειωμένο, πλησιάζοντας μόνο το 3%, σε σχέση με το ποσοστό του ιονισμένου θειώδους, το οποίο κυμαίνεται στο 97%.<sup>[14]</sup>

## *Ενότητα 4: Συμπεράσματα*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας φαίνεται ότι το φουμαρικό οξύ θα μπορούσε να είναι ένα επιπλέον εργαλείο στα χέρια των οινολόγων ώστε να αναστέλλουν την μηλογαλακτική ζύμωση, ακόμη και με προσθήκη βακτηρίων. Ακόμη και με προσθήκη εμπορικών γαλακτικών βακτηρίων στους οίνους, δεν μετρήθηκε κατανάλωση του προστιθέμενου μηλικού οξέος κατά την διάρκεια του πειράματος (6 μήνες). Οι ποσότητες 300 και 600 mg/L φουμαρικό ήταν ικανές να παρεμποδίσουν την διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης, ενώ στα δείγματα με προσθήκη μηλικού 3 g/L, ακόμα και χωρίς προσθήκη φουμαρικού η μηλογαλακτική δεν πραγματοποιήθηκε. Στα δείγματα που η προσθήκη του μηλικού ήταν μικρότερη από 3 g/L και δεν προστέθηκε φουμαρικό, φαίνεται ότι η μηλογαλακτική ζύμωση διεξάχθηκε, αλλά με αργούς ρυθμούς. Άρα, η οξύτητα που οφείλεται στο μηλικό οξύ θα μπορούσε να είναι μακροπρόθεσμα σταθερή στο μπουκάλι λόγω της αντιμικροβιακής δράσης του φουμαρικού. Η προσθήκη των δύο οξέων οδήγησε σε αύξηση της οξύτητας, με ταυτόχρονη μείωση του pH. Το φουμαρικό οξύ σε προσθήκη 300 και 600 mg/L οδήγησε σε αύξηση οξύτητας 4-5 και 8-10 meq/L αντίστοιχα, και μείωση pH 0,05 και 0,10 αντίστοιχα. Το μηλικό οξύ σε προσθήκη 1 και 3 mg/L οδήγησε σε αύξηση οξύτητας 20 και 40 meq/L αντίστοιχα και μείωση pH 0,1 και 0,3 αντίστοιχα. Τέλος, το χρώμα των δειγμάτων φαίνεται να επηρεάστηκε από το φουμαρικό οξύ με τα δείγματα που είχαν την μέγιστη προσθήκη να εμφανίζουν πράσινες αποχρώσεις και υψηλότερη ένταση χρώματος και φωτεινότητα. Τα εν λόγω δείγματα εμφανίζουν διαφορές που παρατηρούνται οπτικά σε σχέση με τα δείγματα στα οποία δεν υπήρχαν προσθήκες.

## Βιβλιογραφία

01. Οινολογία, από το σταφύλι στο κρασί, Τσακίρης Α., Εκδόσεις Ψυχάλου, 2008
02. Αμπελοργία, για κρασιά ποιότητας, Τσακίρης Α., Εκδόσεις Ψυχάλου, 2016
03. Αμπελογραφία, Σταύρακας Δ., Εκδόσεις Ζήτη, 2015
04. [https://www.researchgate.net/figure/CieLAB-colour-space-and-representation-of-hue-angle-h-and-Colour-Development-Index\\_fig1\\_360720411#:~:text=Hue%20\(h\\*\)%20is%20an,et%20a.%2C%202022](https://www.researchgate.net/figure/CieLAB-colour-space-and-representation-of-hue-angle-h-and-Colour-Development-Index_fig1_360720411#:~:text=Hue%20(h*)%20is%20an,et%20a.%2C%202022)
05. *Handbook of Enology* (pp. 1–56), Pascal Ribéreau-Gayon, Yves Glories, Alain Maujean, Denis Dubourdieu, Philippe Darriet, John Towey, Wiley, 2021
06. Volschenk, H., van Vuuren, H. J. J., & Viljoen-Bloom, M. (2017). Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 27(2). <https://doi.org/10.21548/27-2-1613>
07. Morata, A., Bañuelos, M. A., López, C., Chenli, S., Vejarano, R., Loira, I., Palomero, F., & Lepe, J. A. S. (2019). The oenological interest of fumaric acid: Stop malolactic fermentation and preserve the freshness of wines. *BIO Web of Conferences*, 15, 02034. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191502034>
08. Chidi, B. S., Bauer, F. F., & Rossouw, D. (2018). Organic acid metabolism and the impact of fermentation practices on wine acidity - A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39(2). <https://doi.org/10.21548/39-2-3172>
09. [https://www.steroglass.it/en/multiparametric-analyzer-hyperlab-smart?fbclid=IwAR2MYPY4PdWWkfBZnYn8ZaefjVWFJ-bcfKapc\\_NxCZwRJktHps\\_FC7VwRdU](https://www.steroglass.it/en/multiparametric-analyzer-hyperlab-smart?fbclid=IwAR2MYPY4PdWWkfBZnYn8ZaefjVWFJ-bcfKapc_NxCZwRJktHps_FC7VwRdU)
10. <https://www.oiv.int/public/medias/2478/oiv-ma-as2-11.pdf>
11. <https://www.ulprospector.com/knowledge/10780/pc-the-cielab-lab-system-the-method-to-quantify-colors-of-coatings/>
12. <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-3-acids/total-acidity-%28type-i%29>
13. Μικροβιολογία οίνου, Νεραντζής Η., Ταταρίδης Π., Λιούνη Μ., Βαρελάς Β., Εκδόσεις Έμβρυο
14. Οινολογία, βασικές αρχές και μέθοδοι οينوποίησης, Ντουρτόγλου Β., Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2018
15. Morata, A., Adell, E., López, C., Palomero, F., Suárez, E., Pedrero, S., Bañuelos, M. A., & González, C. (2023). Use of Fumaric Acid to Inhibit Malolactic Fermentation in Bottled Rioja Wines: Effect in pH and Volatile Acidity Control. *Beverages*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/beverages9010016>
16. Roa Engel, C. A., Straathof, A. J. J., Zijlmans, T. W., van Gulik, W. M., & van der Wielen, L. A. M. (2008). Fumaric acid production by fermentation. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 78, Issue 3, pp. 379–389).
17. Yang, S. T., Zhang, K., Zhang, B., & Huang, H. (2011). Fumaric Acid. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 3, 163–177.
18. <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-3-acids/ph-%28type-i%29>
19. <https://sensing.konicaminolta.us/us/products/ct-310-chroma-meter/>
20. <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-2-non-organic-compounds/section-3-2-3-other-non-organic-compounds/total-sulfur-dioxide-%28titrimetry%29-%28type-ii%29>

21. <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-2-non-organic-compounds/section-3-2-3-other-non-organic-compounds/free-sulfur-dioxide-%28titrimetry%29-%28type-iv%29>
22. Οινολογία, έρευνα και μετατροπές, Τσακίρης Α., Εκδόσεις Ψυχάλου
23. <https://www.oiv.int/standards/international-code-of-oenological-practices/part-ii-oenological-treatments-and-practices/wines/treatment-with-fumaric-acid-to-inhibit-malolactic-fermentation>
24. He, Y., Xie, Z., Zhang, H., Liebl, W., Toyama, H., & Chen, F. (2022). Oxidative Fermentation of Acetic Acid Bacteria and Its Products. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A.
25. Qiu, X., Zhang, Y., & Hong, H. (2021). Classification of acetic acid bacteria and their acid resistant mechanism. In *AMB Express* (Vol. 11, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01189-6>
26. Mas, A., Torija, M. J., García-Parrilla, M. D. C., & Troncoso, A. M. (2014). Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2014). <https://doi.org/10.1155/2014/394671>
27. Morata, A., Bañuelos, M. A., López, C., Song, C., Vejarano, R., Loira, I., Palomero, F., & Suarez Lepe, J. A. (2020). Use of fumaric acid to control pH and inhibit malolactic fermentation in wines. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 37(2), 228–238.
28. Boulton, R. (1980). A Hypothesis for the Presence, Activity, and Role of Potassium/Hydrogen, Adenosine Triphosphatases in Grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31(3), 283–287. <https://doi.org/10.5344/ajev.1980.31.3.283>
29. Ashmore, P. L., Valdez, F., Harbertson, J. F., Boulton, R. B., & Collins, T. S. (2023). Rapid determination of free sulfur dioxide in wine and cider by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1695. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463936>
30. Monro, T. M., Moore, R. L., Nguyen, M. C., Ebendorff-Heidepriem, H., Skouroumounis, G. K., Eelsey, G. M., & Taylor, D. K. (2012). Sensing free sulfur dioxide in wine. *Sensors (Switzerland)*, 12(8), 10759–10773.
31. <https://www.oiv.int/standards/compendium-of-international-methods-of-wine-and-must-analysis/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-2-physical-analysis/chromatographic-characteristics-%28type-i%29>
32. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0606>
33. <https://www.ajevonline.org/content/39/2/143.short>
34. Understanding Wine Chemistry, Andrew L. Waterhouse, Gavin L. Sacks, David W. Jeffery, Wiley, 2016
35. <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/63/2/194/5701906>
36. Dabare, P. R., Reilly, T., Mierczynski, P., Bindon, K., Vasilev, K., & Mierczynska-Vasilev, A. (2023). A novel solution to tartrate instability in white wines. *Food Chemistry*, 422, 136159. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2023.136159>
37. Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures, Kenneth C. Fugelsang, Charles G. Edwards, Springer, 2nd ed., 2007

## Πίνακας Αποτελεσμάτων

Πίνακας 1: Αποτελέσματα Ενζυμικού Αναλυτή

Δείγμα	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Προσθήκη Μηλικού (g/L)	Προσθήκη Βακτηρίων	Μήνες	Οξικό οξύ (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μηλικό οξύ (g/L)
1	0	0	OXI	0	--	--	--
2	0	0	OXI	3	0,25	0,00	--
3	300	0	OXI	3	0,26	0,00	--
4	600	0	OXI	3	0,25	0,01	--
5	0	1	OXI	3	0,24	0,00	--
6	300	1	OXI	3	0,24	0,00	--
7	600	1	OXI	3	0,26	0,00	--
8	0	3	OXI	3	0,23	0,00	--
9	300	3	OXI	3	0,24	0,01	--
10	600	3	OXI	3	0,23	0,00	--
11	0	0	NAI	3	0,24	0,00	--
12	300	0	NAI	3	0,24	0,01	--
13	600	0	NAI	3	0,26	0,01	--
14	0	1	NAI	3	0,25	0,00	--
15	300	1	NAI	3	0,26	0,01	--
16	600	1	NAI	3	0,24	0,01	--
17	0	3	NAI	3	0,23	0,00	--
18	300	3	NAI	3	0,23	0,01	--
19	600	3	NAI	3	0,23	0,00	--
20	0	0	OXI	6	0,45	--	0,01
21	300	0	OXI	6	0,53	--	1,09
22	600	0	OXI	6	0,45	--	1,13
23	0	1	OXI	6	0,45	--	1,40
24	300	1	OXI	6	0,37	--	1,43
25	600	1	OXI	6	0,40	--	1,42
26	0	3	OXI	6	0,37	--	1,91
27	300	3	OXI	6	0,42	--	1,90
28	600	3	OXI	6	0,46	--	1,91
29	0	0	NAI	6	0,37	--	0,00
30	300	0	NAI	6	0,31	--	1,14
31	600	0	NAI	6	0,33	--	1,14



32	0	1	NAI	6	0,34	--	0,03
33	300	1	NAI	6	0,31	--	1,40
34	600	1	NAI	6	0,33	--	1,42
35	0	3	NAI	6	0,31	--	1,92
36	300	3	NAI	6	0,29	--	1,89
37	600	3	NAI	6	0,30	--	1,69

**Πίνακας 2: Αποτελέσματα μετρήσεων ογκομετρούμενης οξύτητας**

Δείγμα	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Προσθήκη Μηλικού (g/L)	Προσθήκη Βακτηρίων	Μήνες	Ογκ. οξύτητα (meq/L) αρχική	Διαφορά οξύτητας σε χρόνο 0 (meq/L)	Ογκ. οξύτητα (meq/L)	Διαφορά από 3 και 6 μήνες	Θεωρητική οξύτητα (meq/L)	Πειραματικό σφάλμα ογκ. οξύτητας (meq/L)
1	0	0	OXI	0	--	--	--	--	--	--
2	0	0	OXI	3	90.88	0	84.88	0	84.88	0
3	300	0	OXI	3	93.94	3.06	96.88	12	102.05	5.17
4	600	0	OXI	3	99.94	9.06	103.94	19.06	114.28	10.34
5	0	1	OXI	3	102.87	11.99	116.86	31.98	131.78	14.92
6	300	1	OXI	3	106.87	15.99	110.87	25.99	130.95	20.08
7	600	1	OXI	3	111.93	21.05	109.93	25.05	135.18	25.25
8	0	3	OXI	3	132.85	41.97	137.92	53.04	182.67	44.75
9	300	3	OXI	3	134.85	43.97	140.85	55.97	190.77	49.92
10	600	3	OXI	3	138.85	47.97	151.91	67.03	206.99	55.08
11	0	0	NAI	3	90.88	0	100.87	15.99	100.87	0
12	300	0	NAI	3	93.94	3.06	98.87	13.99	104.04	5.17
13	600	0	NAI	3	99.94	9.06	103.94	19.06	114.28	10.34
14	0	1	NAI	3	102.87	11.99	110.87	25.99	125.79	14.92
15	300	1	NAI	3	106.87	15.99	114.86	29.98	134.94	20.08
16	600	1	NAI	3	111.93	21.05	122.86	37.98	148.11	25.25
17	0	3	NAI	3	132.85	41.97	141.91	57.03	186.66	44.75
18	300	3	NAI	3	134.85	43.97	147.91	63.03	197.83	49.92
19	600	3	NAI	3	138.85	47.97	141.91	57.03	196.99	55.08
20	0	0	OXI	6	90.88	0	70.22	0	70.22	0
21	300	0	OXI	6	93.94	3.06	77.42	7.2	82.59	5.17
22	600	0	OXI	6	99.94	9.06	88.21	17.99	98.55	10.34
23	0	1	OXI	6	102.87	11.99	90.88	20.66	105.8	14.92
24	300	1	OXI	6	106.87	15.99	96.21	25.99	116.29	20.08
25	600	1	OXI	6	111.93	21.05	99.01	28.79	124.26	25.25
26	0	3	OXI	6	132.85	41.97	115.13	44.91	159.88	44.75
27	300	3	OXI	6	134.85	43.97	120.59	50.37	170.51	49.92
28	600	3	OXI	6	138.85	47.97	118.73	48.51	173.81	55.08
29	0	0	NAI	6	90.88	0	69.29	-0.93	69.29	0
30	300	0	NAI	6	93.94	3.06	83.68	13.46	88.85	5.17
31	600	0	NAI	6	99.94	9.06	86.35	16.13	96.69	10.34
32	0	1	NAI	6	102.87	11.99	81.82	11.6	96.74	14.92

33	300	1	NAI	6	106.87	15.99	92.61	22.39	112.69	20.08
34	600	1	NAI	6	111.93	21.05	97.14	26.92	122.39	25.25
35	0	3	NAI	6	132.85	41.97	111.53	41.31	156.28	44.75
36	300	3	NAI	6	134.85	43.97	115.13	44.91	165.05	49.92
37	600	3	NAI	6	138.85	47.97	118.73	48.51	173.81	55.08

Πίνακας 3: Αποτελέσματα μετρήσεων pH

Δείγμα	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Προσθήκη Μηλικού (g/L)	Προσθήκη Βακτηρίων	Μήνες	pH αρχικό	pH	ΔpH
1	0	0	OXI	0			
2	0	0	OXI	3	3.41	3.3	0
3	300	0	OXI	3	3.32	3.25	0.08
4	600	0	OXI	3	3.3	3.2	0.13
5	0	1	OXI	3	3.32	3.23	0.1
6	300	1	OXI	3	3.28	3.21	0.12
7	600	1	OXI	3	3.24	3.18	0.15
8	0	3	OXI	3	3.18	3.15	0.18
9	300	3	OXI	3	3.19	3.11	0.22
10	600	3	OXI	3	3.16	3.1	0.23
11	0	0	NAI	3	3.41	3.3	0.03
12	300	0	NAI	3	3.32	3.29	0.04
13	600	0	NAI	3	3.3	3.23	0.1
14	0	1	NAI	3	3.32	3.27	0.06
15	300	1	NAI	3	3.28	3.22	0.11
16	600	1	NAI	3	3.24	3.17	0.16
17	0	3	NAI	3	3.18	3.1	0.23
18	300	3	NAI	3	3.19	3.11	0.22
19	600	3	NAI	3	3.16	3.09	0.24
20	0	0	OXI	6	3.41	3.49	0
21	300	0	OXI	6	3.32	3.3	0.19
22	600	0	OXI	6	3.3	3.26	0.23
23	0	1	OXI	6	3.32	3.28	0.21
24	300	1	OXI	6	3.28	3.24	0.25
25	600	1	OXI	6	3.24	3.22	0.27
26	0	3	OXI	6	3.18	3.18	0.31
27	300	3	OXI	6	3.19	3.15	0.34
28	600	3	OXI	6	3.16	3.12	0.37
29	0	0	NAI	6	3.4	3.47	0.02
30	300	0	NAI	6	3.32	3.3	0.19
31	600	0	NAI	6	3.3	3.26	0.23
32	0	1	NAI	6	3.32	3.34	0.15
33	300	1	NAI	6	3.28	3.25	0.24
34	600	1	NAI	6	3.24	3.21	0.28

35	0	3	NAI	6	3.18	3.18	0.31
36	300	3	NAI	6	3.19	3.15	0.34
37	600	3	NAI	6	3.16	3.12	0.37

Πίνακας 4: Αποτελέσματα CIELab

Δείγμα	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Προσθήκη Μηλικού (g/L)	Προσθήκη Βακτηρίων	Μήνες	a	b	L	C	h	ΔE
1	0	0	OXI	0	-	-	-	-	-	-
2	0	0	OXI	3	2.29	24.28	85.32	24.38	84.7	0
3	300	0	OXI	3	1.28	22.31	85.76	22.34	86.8	2.26
4	600	0	OXI	3	1.23	18.51	89.05	20.93	88.6	6.95
5	0	1	OXI	3	1.78	23.49	86.71	23.55	85.7	1.68
6	300	1	OXI	3	1.23	23.16	87.87	23.19	87	2.98
7	600	1	OXI	3	0.86	22.95	88.93	22.96	87.9	4.1
8	0	3	OXI	3	1.72	23.93	88.01	23.99	85.9	2.77
9	300	3	OXI	3	0.75	21.74	88.83	21.95	88.1	4.6
10	600	3	OXI	3	-0.16	20.14	90.58	20.14	90.58	7.13
11	0	0	NAI	3	1.97	23.72	86.23	23.8	85.3	1.12
12	300	0	NAI	3	1.52	23.42	88.21	23.46	86.3	3.11
13	600	0	NAI	3	1	22.77	88.67	22.79	87.5	3.89
14	0	1	NAI	3	1.68	23.43	88.87	23.49	85.9	3.7
15	300	1	NAI	3	1.33	23.64	88.93	23.67	86.9	3.79
16	600	1	NAI	3	0.59	20.87	90.36	20.87	88.5	6.32
17	0	3	NAI	3	1.66	23.46	88.48	23.71	86	3.32
18	300	3	NAI	3	1.05	22.12	88.7	22.14	87.4	4.2
19	600	3	NAI	3	0.12	19.75	90.33	19.75	89.7	7.09

Πίνακας 5: Αποτελέσματα μετρήσεων Θειώδους Οξέος

Δείγμα	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Προσθήκη Μηλικού (g/L)	Προσθήκη Βακτηρίων	Μήνες	Ολικό θειώδες (mg/L)	Ελεύθερο θειώδες (mg/L)	Μοριακό θειώδες (mg/l)
1	0	0	ΟΧΙ	0			
2	0	0	ΟΧΙ	3	52.48	3.84	0.12
3	300	0	ΟΧΙ	3	56.32	6.4	0.22
4	600	0	ΟΧΙ	3	56.32	7.68	0.3
5	0	1	ΟΧΙ	3	57.6	10.24	0.38
6	300	1	ΟΧΙ	3	58.88	6.4	0.25
7	600	1	ΟΧΙ	3	57.6	7.68	0.31
8	0	3	ΟΧΙ	3	64	7.68	0.34
9	300	3	ΟΧΙ	3	64	6.4	0.31
10	600	3	ΟΧΙ	3	49.92	5.12	0.25
11	0	0	ΝΑΙ	3	62.72	10.24	0.32
12	300	0	ΝΑΙ	3	67.84	7.68	0.25
13	600	0	ΝΑΙ	3	60.16	6.4	0.23
14	0	1	ΝΑΙ	3	60.16	7.68	0.26
15	300	1	ΝΑΙ	3	64	8.96	0.34
16	600	1	ΝΑΙ	3	55.04	8.96	0.37
17	0	3	ΝΑΙ	3	57.6	8.96	0.44
18	300	3	ΝΑΙ	3	58.88	7.68	0.37
19	600	3	ΝΑΙ	3	55.04	6.4	0.32