



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 τη μελέτη της επίδρασής του στα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά σε ένα ροζέ οίνο

Αϊνόα-Θωμαΐς Χουμουρίτη

ΑΜ: 19685124

Επιβλέπων καθηγητής:

Αραπίτσας Παναγιώτης

ΑΘΗΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ – 2023



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

BACHELOR THESIS

**Use of Fumaric acid to control the malolactic fermentation and
study its effect on the basic oenological parameters of a rose wine**

Ainoa-Thomais Jumuritis

Registration Number: 19685124

Supervisor name and surname:

Arapitsas Panagiotis

ATHENS, OCTOBER – 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 τη μελέτη της επίδρασής του στα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά σε ένα ροζέ οίνο»

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1^{ου} Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2^{ου} Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3^{ου} Μέλους Επιτροπής)	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα Αϊνόα-Θωμαΐς Χουμουρίτη του Ανδρέα, με αριθμό μητρώου 19685124 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής 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 μέχρι τον Οκτώβριο του 2024 και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η Δηλούσα



Αϊνόα-Θωμαΐς Χουμουρίτη

Αραπίτσας Παναγιώτης

Ψηφιακή Υπογραφή

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φουμαρικό οξύ αποτελεί ένα από τα οργανικά οξέα που βρίσκονται στους οίνους και συναντάται στις ράγες των σταφυλιών. Από το 2021 η χρήση του επιτράπηκε από τον διατροφικό κώδικα «Codex Alimentarius» και τον «Διεθνή Οργανισμό Αμπέλου και Οίνου» (ΟΙΒ) για την αναστολή της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του φουμαρικού οξέος στη μηλογαλακτική ζύμωση και στα βασικά χαρακτηριστικά ροζέ οίνου, υλοποιήθηκε ένα παραγοντικό πείραμα 3x3x2, δηλαδή με τρία επίπεδα προσθήκης φουμαρικού οξέος (0, 300 και 600 mg/L), τρία επίπεδα προσθήκης μηλικού οξέος (0, 1 και 3 g/L) και προσθήκη ή μη γαλακτικών βακτηρίων του είδους *Oenococcus oeni*. Οι αναλύσεις των δειγμάτων διενεργήθηκαν σε διάστημα 3 και 6 μηνών και σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται πως δεν έλαβε χώρα η μηλογαλακτική ζύμωση τόσο στα δείγματα στα οποία έγινε προσθήκη φουμαρικού, όσο και στα τυφλά δείγματα. Σημαντικές αλλαγές ωστόσο, παρατηρήθηκαν στη σύσταση του οίνου όσον αφορά το pH, την οξύτητα και το χρώμα του. Συγκεκριμένα στο διάστημα των 0 μηνών, φαίνεται οι προσθήκες 300 και 600 mg/L φουμαρικού οξέος να μείωσαν το pH κατά 0,05 και 0,11 αντίστοιχα, ενώ οι προσθήκες 1 και 3 g/L μηλικού οξέος κατά 0,20 και 0,33. Αντίστοιχα, σημειώθηκε αύξηση 0,30 και 0,75 g/L στην ογκομετρούμενη οξύτητα κατά την προσθήκη 300 και 600 mg/L φουμαρικού οξέος και 1,87 και 3,30 g/L κατά την προσθήκη 1 και 3 g/L μηλικού οξέος. Επομένως ισχυρότερο οξύ αποδείχθηκε το φουμαρικό. Η μείωση αυτή του pH παράλληλα, προκάλεσε αύξηση του χρώματος των δειγμάτων και μείωση της διαύγειάς τους. Ενδεικτικά η τιμή της χρωματικής έντασης για το δείγμα χωρίς καμία προσθήκη οξέος ήταν 6,18, ενώ η αντίστοιχη τιμή για το δείγμα με συγκέντρωση φουμαρικού 600 mg/L και μηλικού 3 g/L ήταν 7,78 στους 3 μήνες. Μείωση ωστόσο της χρωματικής έντασης και της διαύγειας σημειώθηκε μεταξύ του διαστήματος των 3 και 6 μηνών, με σχετική αύξηση της χρωματικής απόχρωση.

Λέξεις κλειδιά:

φουμαρικό οξύ, μηλικό οξύ, μηλογαλακτική ζύμωση, γαλακτικά βακτήρια, *Oenococcus oeni*

ABSTRACT

Fumaric acid is one of the organic acids found in wines and it can be naturally found in grapes. Since 2021, its use is allowed by the “Codex Alimentarius” and the “International Organization of Vine and Wine” (OIV) to inhibit malolactic fermentation. In this thesis, we conducted a 3x3x2 factorial experiment to study the effects of fumaric acid on malolactic fermentation and on the basic oenological parameters of a rose wine. Specifically, we prepared samples with three different additions of fumaric acid (0, 300 and 600 mg/L), three different additions of malic acid (0, 1 and 3 g/L) and either inoculation or not with *Oenococcus oeni* lactic bacteria species. The sample analyses were carried out at 3 and 6 months, and the results indicate that malolactic fermentation did not occur in both the samples to which fumaric acid was added and the control samples. However, significant changes were observed in the composition of the wine in terms of pH, acidity and colour. In particular, at 0 months, the additions of 300 and 600 mg/L of fumaric acid reduced the pH by 0,05 and 0,11, respectively, while the additions of 1 and 3 g/L of malic acid reduced the pH by 0,20 and 0,33. Similarly, there was an increase of 0,30 and 0,75 g/L in titratable acidity with the addition of 300 and 600 mg/L of fumaric acid, and 1,87 and 3,30 mg/L upon addition of 1 and 3 g/L of malic acid. Fumaric acid was thus proved to be the stronger acid. This decrease in pH also led to an increase in the colour intensity of the samples and a decrease in their clarity. For instance, the chroma value for the sample without any acid addition was 6,18, while the corresponding value for the sample with a concentrations of 600 mg/L of fumaric and 3 g/L of malic was 7,78 at 3 months. However, a decrease in color intensity and clarity was noted between 3 and 6 months, with a relative increase in chroma.

Keywords:

fumaric acid, malic acid, malolactic fermentation, lactic bacteria, *Oenococcus oeni*

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
Κατάλογος εικόνων	9
Κατάλογος σχημάτων	10
1. Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας	11
1.1 Εισαγωγή.....	11
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	12
2.1 Οργανικά οξέα του οίνου.....	12
2.1.1 Μηλικό οξύ	12
2.1.2 Φουμαρικό οξύ	13
2.2 Μηλογαλακτική ζύμωση	15
2.3 Γαλακτικά βακτήρια.....	18
2.4 Θειώδες οξύ	20
2.4.1 Ελεύθερο θειώδες	20
2.4.2 Δεσμευμένο θειώδες	21
2.4.3 Ισορροπία ελεύθερου-δεσμευμένου θειώδους.....	21
3. Σκοπός.....	22
4. Υλικά και μέθοδοι ανάλυσης	22
4.1 Προετοιμασία δειγμάτων	22
4.2 Αναλύσεις.....	27
4.2.1 Ογκομετρούμενη οξύτητα.....	27
4.2.2 pH.....	28
4.2.3 Θειώδες.....	29
4.2.4 Cielab.....	31
4.2.5 Μηλικό οξύ	32
4.2.6 Οξικό οξύ	33
5. Αποτελέσματα.....	34
5.1. pH και οξύτητα	34
5.2 Θειώδες.....	38
5.3 CIELab.....	40
5.4 Οξικό οξύ.....	43
5.5 Μηλικό οξύ.....	44

5.6 Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	44
6. Συζήτηση.....	46
7. Συμπεράσματα.....	47
Βιβλιογραφία.....	49
Παράρτημα.....	51
.....	54

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Κύριες επιπτώσεις της χρήσης φουμαρικού οξέος ως αναστολές της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Morata et al., 2023).....	14
Εικόνα 2. Μεταβολικό μονοπάτι στα γαλακτικά βακτήρια <i>O. oeni</i> Κάντε κλικ εδώ, για να εισαγάγετε κείμενο.(Bauer & Dicks, 2004).	16
Εικόνα 3. Σκεύασμα φουμαρικού οξέος (99,9%)	23
Εικόνα 4. Σκεύασμα γαλακτικών βακτηρίων <i>O. oeni</i>	24
Εικόνα 5. Γράφημα pH σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού οξέος (0,00, 5,14 και 10,28 meq/L) και στην προσθήκη μηλικού οξέος (0,00, 14,92 και 44,75 meq/L), στους 0, 3 και 6 μήνες	34
Εικόνα 6. Γράφημα της μείωσης του pH των δειγμάτων σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος	35
Εικόνα 7. Γράφημα της ογκομετρούμενης οξύτητας σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και οξικού οξέος στους 0, 3 και 6 μήνες	35
Εικόνα 8. Γράφημα της θεωρητικής ογκομετρούμενης οξύτητας σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και οξικού οξέος στους 0, 3 και 6 μήνες	36
Εικόνα 9. Γράφημα της διαφοράς ογκομετρούμενης οξύτητας σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και οξικού οξέος στους 0, 3 και 6 μήνες	37
Εικόνα 10. Γράφημα της πειραματικής ογκομετρούμενης οξύτητας σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και οξικού οξέος στους 0, 3 και 6 μήνες	37
Εικόνα 11. Γράφημα της %πειραματικής ογκομετρούμενης οξύτητας σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και οξικού οξέος στους 0, 3 και 6 μήνες	38
Εικόνα 12. Γράφημα του ολικού θειώδους σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 μήνες.....	39
Εικόνα 13. Γράφημα του ελεύθερου θειώδους σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 μήνες	39
Εικόνα 14. Γράφημα του μοριακού θειώδους σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 μήνες.....	40
Εικόνα 15. Γράφημα του b^*/a^* σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 και 6 μήνες. Τα διαφορετικά χρώματα υποδεικνύουν τις διαφορετικές συγκεντρώσεις μηλικού οξέος (0,00, 14,92 και 44,75 meq/L), ενώ οι αριθμοί πάνω από τις κουκίδες, τις διαφορετικές συγκεντρώσεις φουμαρικού οξέος (0,00, 5,14 και 10,28 meq/L).....	41
Εικόνα 16. Γράφημα του C^*/H^* σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 και 6 μήνες.....	41
Εικόνα 17. Γράφημα του L^* σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 και 6 μήνες.....	42
Εικόνα 18. Γράφημα του ΔE σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 και 6 μήνες.....	43
Εικόνα 19. Γράφημα συγκέντρωσης οξικού οξέος σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 και 6 μήνες.....	43
Εικόνα 20. Γράφημα συγκέντρωσης μηλικού οξέος σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 6 μήνες	44

Κατάλογος σχημάτων

Σχήμα 1. Σχηματική αποικόνιση της προετοιμασίας των δειγμάτων.....	26
---	----

1. Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας

1.1 Εισαγωγή

Στα στάδια παραγωγής ενός οίνου πολλές φορές συναντώνται δύο διαδικασίες ζύμωσης, η αλκοολική ζύμωση και η μηλογαλακτική ζύμωση. Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται από τις ζύμες και έχει ως απώτερο στόχο την μεταβολή των σακχάρων προς παραγωγή αιθανόλης. Αντίθετα, κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση το μηλικό οξύ μεταβολίζεται σε γαλακτικό με τα βοήθεια βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που περιέχουν ένα μηλογαλακτικό ένζυμο. Η μηλογαλακτική ζύμωση λαμβάνει χώρα κυρίως σε ερυθρούς οίνους, ωστόσο συναντάται επίσης σε λευκούς και ροζέ και παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της τελικής ποιότητάς τους. Οι κύριες μεταβολές που παρατηρούνται μετά τη διενέργεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι η μικροβιακή σταθερότητα του οίνου, η μείωση της οξύτητας, η αύξηση του pH και η μεταβολή του αρωματικού προφίλ του οίνου με χαρακτηριστικά αρώματα γάλακτος και βουτύρου (Bauer & Dicks, 2004).

Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε οίνους που παράγονται από σταφύλια που καλλιεργούνται σε πολύ θερμές περιοχές, η διατήρηση της οξύτητας σε υψηλότερα επίπεδα, η μέτρια περιεκτικότητα σε αλκοόλη και η διατήρηση πρωτογενών αρωμάτων είναι επιθυμητή. Στις περιοχές αυτές τα γλεύκη παρουσιάζονται με όλο και υψηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα και χαμηλότερη σε οργανικά οξέα. Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να ανατραπεί με την παρεμπόδιση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Το φουμαρικό οξύ είναι ένα διπρωτικό οξύ το οποίο φαίνεται να έχει αντιβακτηριακή δράση σύμφωνα με έρευνες και πλέον επιτρέπεται η χρήση του για τον συγκεκριμένο σκοπό (Pilone et al., 1974). Παλαιότερα ευρέως διαδεδομένη ήταν η χρήση του θειώδους για την αναστολή της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων. Ωστόσο με το πέρασμα των χρόνων έχει αρχίσει να περιορίζεται η χρήση του τόσο λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζουν ορισμένοι καταναλωτές, όσο και γιατί απογυμνώνει αρωματικά τον οίνο. Ο διεθνής κώδικας οινολογικής πρακτικής επίσης συνιστά ένα όριο υπολειμματικών συγκεντρώσεων ολικού θειώδους στους οίνους που είναι 150 mg/L για τους ερυθρούς και 200 mg/L για τους λευκούς αντίστοιχα (Viridis et al., 2021).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία τα δείγματα οίνου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της ποικιλίας Αγιωργίτικο. Η ερυθρή ποικιλία «Αγιωργίτικο» (*Vitis vinifera* L.) είναι μία από τις πιο ευρέως καλλιεργήσιμες ποικιλίες της Ελλάδας, γνωστή και με τα συνώνυμα: Μαύρο, Μαύρο Νεμέας, Μαυρούδι και Μαυράκι. Προέρχεται από την ανατολική Πελοπόννησο και συγκεκριμένα τους νομούς Αργολίδας και Κορινθίας, με τον δεύτερο να περιλαμβάνει την οριοθετημένη ζώνη παραγωγής οίνου ΠΟΠ «Νεμέα» με ποσοστό φυτεύσεων 80%, ενώ ταυτόχρονα καλλιεργείται στη Στερεά Ελλάδα και τη Μακεδονία (Robinson et al., 2013). Η καλλιεργήσιμη έκταση στη Νεμέα ανέρχεται στα 34.260 στρέμματα, με αποδόσεις 800-1000 kg/στρέμμα για πρέμνα με σχήμα διαμόρφωσης κυπελλοειδές και πάνω από 2000 kg/στρέμμα για γραμμοειδή, ενώ σύμφωνα με το Ινστιτούτο Οίνου οι αμπελώνες στη Νεμέα μπορούν να διακριθούν σε τρεις ζώνες:/στρέμμα για πρέμνα με σχήμα διαμόρφωσης κυπελλοειδές και πάνω από 2000 kg/στρέμμα για γραμμοειδή, ενώ σύμφωνα με το Ινστιτούτο Οίνου οι αμπελώνες στη Νεμέα μπορούν να διακριθούν σε τρεις ζώνες:

- τη χαμηλή: πεδινή και πλαγιές έως 320 m υψόμετρο

- τη μεσαία: ημιορεινή περιοχή με υψόμετρο 300-650 m
- την ορεινή: με υψόμετρο 650-800 m

Η ανομοιογένεια αυτής της ζώνης, συμβάλει στον χαρακτηρισμό «πολυδυναμική» στην ποικιλία Αγιωργίτικο, καθώς η χημική σύσταση του γλεύκους σε διαφορετικά στάδια ωριμότητας, επιτρέπει την παραγωγή διαφορετικών τύπων οίνου όπως ερυθρούς ξηρούς, ημίξηρους, γλυκείς, ημίγλυκους, πλούσιους σε ανθοκυάνες (600 mg/kg σταφυλιών) με υψηλό δυναμικό παλαίωσης, φρέσκους-φρουτώδεις ακολουθώντας την οινοποιητική μέθοδο ανθρακικής αναεροβίωσης ή ακόμα και ροζέ οίνους. Τα χαρακτηριστικά αρώματα της ποικιλίας είναι τα μπαχαρικά, τα κόκκινα φρούτα και η δρυς (Σταύρακας Ευστ. Δημήτριος, 2015).

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1 Οργανικά οξέα του οίνου

Τα ώριμα σταφύλια περιέχουν σημαντικές ποσότητες οργανικών οξέων (10 g/Kg ή και περισσότερα) τα οποία συμβάλουν τόσο στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου, όσο και στη διατήρηση χαμηλού pH για την αποφυγή πρόκλησης αλλοιώσεων από μικροοργανισμούς, όπως τα οξικά και τα γαλακτικά βακτήρια. Το τρυγικό οξύ που βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, καθώς και το μηλικό και κιτρικό οξύ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και σχηματίζονται, μαζί με τα υπόλοιπα οξέα, τόσο κατά την ανάπτυξη των ραγών (δηλαδή προέρχονται από το σταφύλι), όσο και κατά τις ζυμώσεις ή μικροβιακές αλλοιώσεις (Waterhouse et al., 2016). Επίσης, σύμφωνα με τον "Διεθνή Οργανισμό Αμπέλου" (OIV) και τον "Διεθνή οργανισμό τροφίμων και γεωργίας" (FAO) η προσθήκη ορισμένων οργανικών οξέων είναι επιτρεπτή στους οίνους για αύξηση της οξύτητας, καθώς ειδικά στις πιο θερμές χώρες τα οξέα μεταβολίζονται με ταχύτερο ρυθμό και οι τιμές ολικής οξύτητας είναι ανεπαρκείς και το pH αρκετά υψηλό (FAO-WHO. *Codex Alimentarius. 2015, INTERNATIONAL OENOLOGICAL CODEX INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE*). Για παράδειγμα, το μηλικό οξύ σε μορφή L(-) ή DL επιτρέπεται να χρησιμοποιείται ως πρόσθετο από τα κράτη μέλη για την αύξηση της οξύτητας σε γλεύκος και οίνο, όταν αυτή η αύξηση δεν ξεπερνάει τα 4 g/L σε τρυγικό οξύ ήτοι 54 meq/ (Vigne & Vin).

2.1.1 Μηλικό οξύ

Το μηλικό οξύ είναι ένα οργανικό, διπρωτικό οξύ καθώς περιέχει δύο καρβοξυλικές ομάδες (-COOH), δηλαδή περισσότερα από ένα ισοδύναμα κατιόντα υδρογόνου (H⁺) ανά mole. Μαζί με το τρυγικό οξύ, το μηλικό βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στους οίνους μετά την αλκοολική ζύμωση και σχηματίζεται στα σταφύλια νωρίς κατά την καλλιεργητική περίοδο. Τα δύο αυτά οξέα που σε ώριμα σταφύλια βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 3,5-11,0 g/L και 2,0-6,5 g/L αντίστοιχα, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην οργανοληπτική ποιότητα των οίνων, αλλά και τη φυσική, βιοχημική και μικροβιολογική σταθερότητά των οίνων (Volschenk et al., 2017).

Όσον αφορά τη βιοσύνθεση του μηλικού οξέος στο σταφύλι, αυτή ξεκινά παράλληλα με τη σύνθεση σακχάρων κατά την φωτοσύνθεση, όπου λαμβάνει χώρα μια σειρά αντιδράσεων που ξεκινάει από το φωσφο-3-γλυκερικό οξύ, το οποίο σε πρώτη φάση μετατρέπεται σε φωσφο-2-γλυκερικό οξύ. Το φωσφο-2-γλυκερικό οξύ με τη σειρά του μετατρέπεται σε φωσφο-ένολο-πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο, δεσμεύοντας ένα μόριο αερίου διοξειδίου του άνθρακα,

μετατρέπεται σε οξαλοξικό οξύ και τελικά ανάγεται προς σχηματισμό μηλικού οξέος. Κατά τον μεταβολισμό, σχηματίζεται ως ενδιάμεσο προϊόν το L(-) ισομερές, το οποίο συσσωρεύεται σημαντικά στην φάση πριν την ωρίμανση, με τα σάκχαρα να είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό του στις ράγες του σταφυλιού. Από τη στιγμή που ξεκινάει το περκασμός και έπειτα, η συγκέντρωση του μηλικού οξέος αρχίζει να μειώνεται μέχρι να φτάσει τα 1 έως 3 g/L γλεύκους στο τέλος της ωρίμανσης. Η μείωση αυτή οφείλεται είτε στη μετατροπή του σε σάκχαρα, όπως προαναφέρθηκε, είτε στην καύση του μέσω της κυτταρικής αναπνοής, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP και είναι απαραίτητη για την εξέλιξη των αντιδράσεων ωρίμανσης στο σταφύλι. Το μηλικό οξύ παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη βιοχημεία της αναπνοής, καθώς δεσμεύει τα μόρια διοξειδίου του θείου στον κύκλο του Krebs ή τα τρικαρβοξυλικά οξέα μέσω του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέος (Hidalgo, 2018). Αναλυτικότερα, κατά την κυτταρική αναπνοή βιοχημικές αντιδράσεις επιτρέπουν την είσοδο του L-μηλικού οξέος και του οξαλικού οξέος στον κύκλο του Krebs και με τη βοήθεια των ενζύμων φωσφοενυλοπυροσταφυλική αποκορβοξυλάση και μηλική αφυδρογονάση το L-μηλικό συσσωρεύεται στα κενοτόπια των κυττάρων των σταφυλιών. Η αποκαρβοξυλίωση του φωσφοενυλοπυροσταφυλικού καταλύεται από το ένζυμο φωσφοενυλοπυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, παράγοντας έτσι οξαλικό οξύ, το οποίο ανάγεται περαιτέρω από τη μηλική αφυδρογονάση για παραγωγή L-μηλικού οξέος, και ανόργανου φωσφορικού άλατος. Με αυτή τη διαδικασία τα δύο αυτά οξέα εισέρχονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA cycle) (Volschenk et al., 2017; Waterhouse et al., 2016). Σε συνθήκες χαμηλής ηλιοφάνειας η αναλογία σακχάρων/μηλικού οξέος είναι χαμηλή, γεγονός που υποδηλώνει ότι στο ίδιο επίπεδο ωρίμανσης ή σύνθεσης σακχάρων, η περιεκτικότητα σε μηλικό οξύ της συγκομιδής σταφυλιών είναι υψηλότερη, αν και η θερμοκρασία είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για το επίπεδο του μηλικού οξέος στο σταφύλι (Hidalgo, 2018). Η αναλογία σακχάρων/μηλικού οξέος είναι χαμηλή, γεγονός που υποδηλώνει ότι στο ίδιο επίπεδο ωρίμανσης ή σύνθεσης σακχάρων, η περιεκτικότητα σε μηλικό οξύ της συγκομιδής σταφυλιών είναι υψηλότερη, αν και η θερμοκρασία είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για το επίπεδο του μηλικού οξέος στο σταφύλι (Hidalgo, 2018).

2.1.2 Φουμαρικό οξύ

Το φουμαρικό οξύ ή (2E)-2-βουτενοδιοϊκό οξύ, είναι ένα οργανικό οξύ το οποίο απομονώθηκε αρχικά από το φυτό *Fumaria officinalis*, από όπου πήρε και το όνομά του (Fernández-Vázquez et al., 2021; Gancel et al., 2022). Παράγεται φυσικά στα φυτά σε μικρές ποσότητες, ενώ συγκεκριμένα στις ράγες των σταφυλιών εντοπίζεται σε ποσότητες 0,07-10,69 mg/L. Λόγω της αντιβακτηριδιακής του δράσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση αντί της χρήσης θειώδους ή λυσοζύμης προκειμένου να αναστείλει τη μηλογαλακτική ζύμωση (Camarasa et al., 2003). Πολλές δημοσιεύσεις επίσης, περιγράφουν την αντιβακτηριακή του δράση κατά τη χρήση του σε τρόφιμα όπως μη θερμικά επεξεργασμένα λαχανικά ή σε ποτά όπως ο μηλίτης εμβολιασμένος με το βακτήριο *E. Coli*, όπου παρεμπόδισε την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων (Gancel et al., 2022; Morata et al., 2019). Έχει τοξική επίδραση απέναντι στα γαλακτικά βακτήρια καθυστερώντας έτσι την εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, για παράδειγμα 150 mg/L έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να καθυστερήσουν την μηλογαλακτική ζύμωση για αρκετές ημέρες, ενώ συγκεντρώσεις των 300 mg/L και άνω μπορούν να αποβούν αποτελεσματικές για την πλήρη

αναστολή της, ανεξάρτητα από το αν η συγκέντρωση γαλακτικών βακτηρίων είναι σε υψηλά επίπεδα (Gancel et al., 2022; Morata et al., 2023). Η χρήση του ως ανασταλτικός παράγοντας εγκρίθηκε από τον ΟΙV στο ψήφισμα: ΟΙV-ΟΕΝΟ 581Α-2021, σύμφωνα με τον οποίο επιτρέπεται η προσθήκη φουμαρικού οξέος σε δόσεις 300 έως 600 mg/L στους οίνους ακριβώς για την παρεμπόδιση της μηλογαλακτικής ζύμωσης (<https://www.oiv.int/public/medias/8084/en-oiv-oen-581a-2021.pdf>). Η μείωση ή η αποφυγή σχηματισμού βιογενών αμινών, εκ των οποίων οι περισσότερες είναι τοξικές και παράγονται κατά τη δεύτερη ζύμωση ή προέρχονται από βακτηριακές αλλοιώσεις, όπως και των καρβαμικών οξέων, είναι θετικές επιπτώσεις της αναστολής της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Ένα όμως από τα κύρια αρνητικά χαρακτηριστικά του είναι η χαμηλή διαλυτότητα που έχει σε σύγκριση με τα υπόλοιπα οξέα. Συγκεκριμένα, στο νερό σε θερμοκρασία 25 °C η διαλυτότητά του είναι 6,6-8,1 g/L (Gancel et al., 2022).



Εικόνα 1. Κύριες επιπτώσεις της χρήσης του φουμαρικού οξέος ως αναστολέα της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Morata et al., 2023).

Σε πολλά τρόφιμα, αλλά και ποτά προστίθεται ως μέσο οξίνισης καθώς έχει αποδειχθεί ασφαλές από τον Codex Alimentarius και είναι έως και 1,5 φορές πιο όξινο από το κιτρικό οξύ (FAO-WHO. Codex Alimentarius. 2015). Έρευνες έχουν δείξει επίσης, πως το φουμαρικό οξύ με $pK_{a1}=3,03$ και $pK_{a2}=4,44$, επηρεάζει περισσότερο το pH (μείωση έως και 0,1 με προσθήκη 600 mg/L) από το

μηλικό και το γαλακτικό οξύ μειώνοντάς το, ανάλογα βέβαια και τη ρυθμιστική ικανότητα του οίνου (Gancel et al., 2022; Morata et al., 2023; Ugliano & Moio, 2005).

Το φουμαρικό οξύ προϋπάρχει στον οίνο καθώς αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου του Krebs (Camarasa et al., 2003). Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης μεταβολίζεται σε L-μηλικό οδηγώντας έτσι σε βιολογική αύξηση της οξύτητας που προέρχεται από το μηλικό οξύ και αν υπάρξει υπόλειμμα σε φουμαρικό τότε αυτό μπορεί και να εμποδίσει την εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, διατηρώντας την οξύτητα. Η μείωση έτσι του pH, συμβάλλει στη διατήρηση υψηλότερων επιπέδων μοριακού SO₂, ενισχύοντας την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή του δράση (Krieger-Weber et al., 2020). Η συνέργεια αυτή επιτρέπει τη μείωση των δόσεων SO₂ που αποτελεί τάση πλέον στον αμπελοοινικό τομέα (Morata et al., 2023, Morata et al., 2020).

Θετική επίδραση φαίνεται να έχει στο χρώμα, καθώς αντίθετα με τη χρήση λυσοζύμης για παρεμπόδιση της εξέλιξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης, αποτρέπει την καταβύθιση φαινολών διατηρώντας ή αυξάνοντας το χρώμα και την πολυπλοκότητα των οίνων. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άχρωμα υδροαλκοολικά διαλύματα γεγονός το οποίο αποδεικνύει πως το φαινόμενο αυτό δεν σχετίζεται με την αλληλεπίδραση ανθοκυανών, αλλά με την προσθήκη του ίδιου του οξέος (Morata et al., 2020).

Οργανοληπτικά το φουμαρικό οξύ έχει φρουτώδη χαρακτήρα και οξύτητα μακράς διάρκειας σχετικά με τα υπόλοιπα οργανικά οξέα των οίνων, λόγω της υδρόφοβης φύσης του. Στους ερυθρούς οίνους βελτιώνει την οξύτητα, την αίσθηση του σώματος και την στυπτικότητα, ενώ στους λευκούς οίνους φαίνεται να έχει χαμηλότερο κατώφλι αντίληψης (1 g/L) από τα υπόλοιπα οξέα (Gancel et al., 2022).

2.2 Μηλογαλακτική ζύμωση

Κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση το μηλικό οξύ μεταβολίζεται σε γαλακτικό από τα γαλακτικά βακτήρια. Η μηλογαλακτική ζύμωση προκαλεί μια σειρά από τροποποιήσεις στον οίνο, οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι σκόπιμες και ωφέλιμες, αλλά σε άλλες ο οίνος μπορεί να υποστεί αλλοιώσεις κατά τη διενέργειά της. Πρέπει επίσης να σημειωθεί, ότι ο μεταβολισμός άλλων συστατικών του οίνου εκτός από το μηλικό οξύ, από τα γαλακτικά βακτήρια, όπως τα σάκχαρα, το κιτρικό οξύ, το τρυγικό οξύ, η γλυκερίνη κ.λπ. οδηγεί στην ανάπτυξη σοβαρών αλλοιώσεων ή ασθενειών στον οίνο, και μόνο όταν είναι επιθυμητή η μηλογαλακτική ζύμωση οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι ωφέλιμοι για τον οίνο (Hidalgo, 2018).

Οι μικροοργανισμοί που παίρνουν μέρος στη μηλογαλακτική ζύμωση είναι τα φυσικά γαλακτικά βακτήρια που υπάρχουν στο κρασί, τα οποία μπορεί να προέρχονται από τα σταφύλια (100 κύτταρα/γραμμάριο σταφυλιού), από επιμολύνσεις στα μηχανήματα και τις εγκαταστάσεις του οινοποιείου ή αντίθετα μπορεί να είναι εξωγενή και να προστίθενται με καλλιέργεια ή βιομηχανική παρασκευή. Περίπου το 60% αυτών είναι σφαιρικοί κόκκοι και το υπόλοιπο 40% είναι επιμήκεις ραβδοειδείς βάκιλλοι. Τα γαλακτικά βακτήρια του οίνου ανήκουν σε τέσσερα γένη: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* και *Pediococcus*. Αυτά μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο οικογένειες: ομοζυμωτικά ή ομογαλακτικά και ετεροζυμωτικά ή ετερογαλακτικά. Στη δεύτερη κατηγορία συναντώνται και τα προαιρετικά ετεροζυμωτικά βακτήρια, τα οποία σχηματίζουν δύο μόρια γαλακτικού οξέος από ένα μόριο γλυκόζης και

Η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιείται σε τρία στάδια: ένα πρώτο στάδιο όπου ένα ειδικό ένζυμο μεταφοράς επιτρέπει την είσοδο του μηλικού οξέος στο κύτταρο μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, ένα δεύτερο στάδιο όπου το μηλογαλακτικό ένζυμο αποκαρβοξυλιώνει το L-μηλικό οξύ στο εσωτερικό του κυττάρου και παράγει L-γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο αυξάνει το ενδοκυτταρικό pH, και ένα τελικό στάδιο όπου το L-γαλακτικό οξύ και το διοξείδιο του άνθρακα αποβάλλονται από το κύτταρο (Hidalgo, 2018).

Συνέπεια αυτού του μετασχηματισμού είναι μια σημαντική μείωση της συνολικής οξύτητας του οίνου, η οποία υπολογίζεται σε περίπου 0,6 g/L τρυγικού οξέος, για κάθε 1,0 g/L μηλικού οξέος που μεταβολίζεται. Ο λόγος αυτής της πτώσης της οξύτητας εξηγείται από τρεις μηχανισμούς:

- 1) Τη μετατροπή ενός ισχυρότερου οξέος με δύο καρβοξυλομάδες (-COOH) σε ένα ασθενέστερο με μία μόνο καρβοξυλομάδα.
- 2) Το μηλικό οξύ βρίσκεται στο κρασί σε ισορροπία με τα άλατά του, σε απόλυτα διαλυτές μορφές. Η μηλογαλακτική ζύμωση εξαλείφει όλο ή μέρος του ελεύθερου μηλικού οξέος, το οποίο με το νόμο της δράσης της μάζας μετατοπίζει την προαναφερθείσα ισορροπία προς την κατεύθυνση που σχηματίστηκαν τα άλατα και προκαλεί την καταβύθιση του τρυγικού οξέος με τη μορφή ουδέτερου τρυγικού ασβεστίου και όξινου τρυγικού καλίου, γεγονός που μειώνει περαιτέρω την οξύτητα του οίνου.
- 3) Την παρουσία μηλικού οξέος στον οίνο, που αυξάνει τη διαλυτότητα του διττανθρακικού καλίου το οποίο είναι όξινο άλας. Έτσι, καθώς το πρώτο εξαφανίζεται πλήρως ή εν μέρει μέσω της μηλογαλακτικής ζύμωσης, το δεύτερο δεν διαλύεται και η συνολική οξύτητα του οίνου μειώνεται (Hidalgo, 2018).

Όπως προαναφέρθηκε τα αποτελέσματα της μηλογαλακτικής ζύμωσης μπορούν να έχουν είτε θετική, είτε αρνητική επίδραση στον οίνο και παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Σημαντική μείωση της ολικής οξύτητας του οίνου, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπερνά το 50% της αρχικής τιμής της οξύτητας και εξομάλυνση του οίνου οργανοληπτικά, καθώς αντικαθίσταται η πιο όξινη και τραχιά αίσθηση που προσδίδει το μηλικό οξύ, με μια πιο απαλή και ολοκληρωμένη.
2. Αύξηση της πτητικής οξύτητας κατά 0,1 έως 0,2 g/L υπό κανονικές συνθήκες, λόγω της αποδόμησης των υπολειμματικών σακχάρων, της παρέμβασης των ετερογαλακτικών βακτηρίων και κυρίως του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος που λαμβάνει χώρα στο τελικό στάδιο της μηλογαλακτικής ζύμωσης.
3. Μείωση της έντασης του χρώματος στους ερυθρούς οίνους, λόγω μεταβολής του pH του οίνου, η οποία μπορεί να συνεπάγεται και καταστροφή των ανθοκυανών.
4. Μεταβολή του αρώματος του οίνου, εν μέρει λόγω της μείωσης των ποικιλιακών αρωμάτων μέσω της αποικοδόμησης ή της υδρόλυσης των αρωματικών ενώσεων του σταφυλιού, είτε λόγω της μείωσης ή της εξαφάνισης των αρωματικών ουσιών που σχηματίζονται κατά την αλκοολική ζύμωση και τέλος, από το σχηματισμό εστέρων όπως ο οξικός αιθυλεστέρας με χαρακτηριστική οσμή κόλλας, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας με γαλακτική οσμή ή ανώτερων αλκοολών. Αλλά ίσως η πιο χαρακτηριστική αρωματική ένωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι το διακετύλιο ή η 2,3-βουτανοδιόλη, που σχηματίζεται μέσω της αποικοδόμησης του κιτρικού οξέος.
5. Συσσώρευση μαννοπρωτεϊνών στον οίνο, οι οποίες προέρχονται από τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών που υφίστανται αυτόλυση και από τα ίδια τα γαλακτικά βακτήρια

και σχηματίζονται από την ένωση μιας αλυσίδας πρωτεΐνης και μιας αλυσίδας μαννόζης, οι οποίες, μόνες τους ή πολυμερισμένες με τανίνες, δίνουν στον οίνο μια ευχάριστη αίσθηση λιπαρότητας και «σώματος» στο στόμα.

6. Μεγαλύτερη βιολογική σταθερότητα του οίνου, λόγω της μείωσης των συγκεντρώσεων σε θρεπτικά συστατικά και παράγοντες ανάπτυξης που μπορεί να βρίσκονται σε αυτόν, καθώς και λόγω της παρουσίας στο μέσο μικροβιακών αναστολέων που σχηματίζονται από τα γαλακτικά βακτήρια, οι οποίοι προστατεύουν από αλλοιώσεις που προέρχονται από μικροοργανισμούς.
7. Αποικοδόμηση των αμινοξέων του οίνου με αποκαρβοξυλίωση, παράγοντας διάφορες ουσίες που ονομάζονται βιογενείς αμίνες.
8. Ενδεχόμενος σχηματισμός εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών, που παράγονται από ορισμένα γαλακτικά βακτήρια, τα οποία επικαλύπτονται με μια παχύρρευστη ουσία γλυκάνης που προέρχεται από τη γλυκόζη, δίνοντας στους οίνους μια πυκνή, παχύρρευστη αίσθηση (Hidalgo, 2018).

2.3 Γαλακτικά βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια είναι μικροοργανισμοί που προϋπάρχουν στο σταφύλι και κατά συνέπεια στο κρασί και μπορούν να αναπτυχθούν ανάλογα τη σύσταση του μέσου, προκαλώντας διάφορες τροποποιήσεις στη σύσταση του γλεύκους που άλλοτε είναι επιθυμητές, όπως στην περίπτωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης και άλλοτε ανεπιθύμητες. Τα ίδια είδη γαλακτικών βακτηρίων είναι ικανά να ακολουθήσουν διαφορετικές μεταβολικές οδούς, ανάλογα τις συνθήκες του μέσου και το διαθέσιμο αποικοδομήσιμο υπόστρωμα (Hidalgo, 2018).

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικά κύτταρα και διαφοροποιούνται από τις ζύμες, που είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, λόγω του μεγέθους και της απουσίας πυρηνικής μεμβράνης που προστατεύει τον πυρήνα του κυττάρου. Τα γαλακτικά βακτήρια διαφοροποιούνται από τα οξικά μέσω της χρώσης Gram (+). Το παχύ κυτταρικό τοίχωμα των Gram θετικών βακτηρίων που αποτελείται από πεπτιδογλυκάνες παγιδεύει τη χρωστική του κρυσταλλικού ιώδους στο κυτταρόπλασμα και τα βακτήρια αποκτούν ένα ιώδες χρώμα. Επιπλέον το προστιθέμενο ιώδιο δημιουργεί σύμπλοκο με το κρυσταλλικό ιώδες που είναι δύσκολο να απομακρυνθεί μέσα από τις πολλαπλές στοιβάδες πεπτιδογλυκανών. Στη συνέχεια η πλύση με το αποχρωματιστικό δεν αφαιρεί το σύμπλοκο αυτό με τη χρωστική και έτσι τα βακτήρια δεν χρωματίζονται με τη δεύτερη κόκκινη χρωστική σαφρανίνη που εφαρμόζεται σ' αυτά. Στα Gram αρνητικά βακτήρια όπου η στοιβάδα της πεπτιδογλυκάνης είναι πολύ πιο λεπτή, κατά τον αποχρωματισμό με το διάλυμα αλκοόλης – ακετόνης η λιπιδική τους στοιβάδα διαλύεται και έτσι η αρχική χρωστική του κρυσταλλικού ιώδους ξεπλένεται, τα βακτήρια αποχρωματίζονται και χρωματίζονται κόκκινα με την εφαρμογή της δεύτερης κόκκινης χρωστικής, της σαφρανίνης (Hidalgo, 2018).

Τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται στην οινολογία ανήκουν σε τέσσερις κατηγορίες: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* και *Pediococcus*, καθώς επίσης μπορούν να ταξινομηθούν και σε ομογαλακτικά ή ετερογαλακτικά ανάλογα τη μεταβολική οδό που ακολουθούν. Τα ομογαλακτικά βακτήρια παράγουν περισσότερο από το 85% του γαλακτικού οξέος κατά την γλυκόλυση, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα δράσης τη γλυκόζη. Αντίθετα, τα ετερογαλακτικά βακτήρια εκτός από γαλακτικό οξύ παράγουν και άλλα προϊόντα όπως οξικό οξύ και αιθανόλη μεταβολίζοντας τη γλυκόζη και πεντόζες (Hidalgo, 2018; Viridis et al., 2021).

Το γένος *Oenococcus* αποτελείται από κύτταρα ελλειψοειδούς σχήματος τα οποία έχουν μέσο μέγεθος 0,5-0,7 μm σε διάμετρο και συναντώνται ομαδοποιημένα σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Αναπτύσσονται σε προαιρετικό αναερόβιο περιβάλλον, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 20 και 30 °C και είναι ετεροζυμωτικά, παράγοντας D(-) γαλακτικό οξύ (Hidalgo, 2018).

Το γαλακτικό οξύ στους οίνους, μπορεί να προέρχεται από διάφορες πηγές, όπως για παράδειγμα από τα σάκχαρα κατά την αλκοολική ζύμωση με τη βοήθεια ζυμών, σχηματίζοντας κυρίως D(-) γαλακτικό οξύ, από τα σάκχαρα που αποικοδομούνται από γαλακτικά βακτήρια σε D(-) και L(+) γαλακτικό οξύ και από το μηλικό οξύ το οποίο μεταβολίζεται κατά την μηλογαλακτική ζύμωση από τα γαλακτικά βακτήρια, σχηματίζοντας L(+) γαλακτικό οξύ (Hidalgo, 2018).

Ο μηχανισμός μετατροπής του μηλικού οξέος σε γαλακτικό από τα γαλακτικά βακτήρια είναι πολύ απλός, καθώς το μηλικό οξύ μετατρέπεται απευθείας σε γαλακτικό οξύ και διοξειδίο του άνθρακα με τη βοήθεια του μηλογαλακτικού ενζύμου, που παράγεται από τα γαλακτικά βακτήρια, μέσω μιας ελαφρώς εξώθερμης αντίδρασης. Ο μεταβολισμός λαμβάνει χώρα στο εσωτερικό των κυττάρων, όπου η πλασματική μεμβράνη εμποδίζει την είσοδο ορισμένων ουσιών του οίνου που αναστέλλουν την αντίδραση αυτή (αλκοόλες, πολυφαινόλες, οξέα κ.λπ.), με αποτέλεσμα η σύνθεσή τους και η άμεση προσθήκη τους στον οίνο να είναι προς το παρόν εντελώς ανέφικτη, καθώς αποικοδομούνται γρήγορα σε αυτό το μέσο λόγω της πρωτεϊνικής τους φύσης. Επίσης, η ανάπτυξη ζυμομυκήτων τροποποιημένων με γονίδια από βακτήρια γαλακτικού οξέος παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον καθώς επιτρέπει την παράλληλη εξέλιξη της αλκοολικής αλλά και την μηλογαλακτικής ζύμωσης, εάν αυτό είναι επιθυμητό (Hidalgo, 2018; Viridis et al., 2021).

Στον οίνο οι τέσσερις κυριότερες κατηγορίες που επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης των βακτηρίων και αυτές είναι: η θερμοκρασία, η οξύτητα, ο αλκοολικός τίτλος και η συγκέντρωση θειώδους οξέος (Hidalgo, 2018).

Όπως και στην ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, έτσι και στην ανάπτυξη βακτηρίων, η θερμοκρασία παίζει κυρίαρχο ρόλο. Σε θερμοκρασίες κάτω από 10-15 °C, όπως και πάνω από 30-35 °C ο ρυθμός ανάπτυξης βακτηρίων περιορίζεται θέτοντας τις τιμές μεταξύ 20-23 °C ως ιδανικές. Αξίζει να σημειωθεί πως ο ρυθμός ανάπτυξης επηρεάζεται και από τον αλκοολικό τίτλο του οίνου σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία. Συγκεκριμένα η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τείνει να μειώνεται όσο αυξάνεται ο αλκοολικός τίτλος του οίνου (Hidalgo, 2018).

Η επίδραση του οξυγόνου στον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων ποικίλει. Υπάρχουν είδη βακτηρίων τα οποία αναπτύσσονται σε πλήρως αναερόβιο περιβάλλον, άλλα σε προαιρετικά αναερόβιο περιβάλλον και άλλα παρουσία οξυγόνου. Γενικά οι καλύτερες συνθήκες για την εξέλιξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης επιτυγχάνονται με μη αυστηρή αναεροβίωση, δηλαδή παρουσία μικρής ποσότητας οξυγόνου που δύσκολα μπορεί να προσδιορισθεί. Αντιθέτως η εξέλιξη της παρουσία οξυγόνου μπορεί να καθυστερήσει την εκκίνηση του πολλαπλασιασμού και της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων, αλλά μακροπρόθεσμα δεν εμποδίζει την ανάπτυξή της (Hidalgo, 2018).

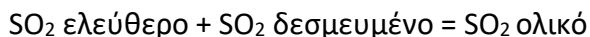
Το pH είναι επίσης ένας παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Τα περισσότερα γαλακτικά βακτήρια δρουν βέλτιστα σε τιμές pH κοντά στο ουδέτερο. Ωστόσο στον οίνο, όπου το επίπεδο αυτό δεν επιτυγχάνεται ποτέ, το βέλτιστο βρίσκεται όσο υψηλότερη

είναι η τιμή του pH. Η κατώτερη οριακή τιμή pH για την αποικοδόμηση του μηλικού οξέος είναι 3,2, ενώ για την αποικοδόμηση των σακχάρων είναι 3,5, οπότε οι ιδανικές συνθήκες για την μηλογαλακτική ζύμωση βρίσκονται μεταξύ αυτών των δύο τιμών, καθώς θα μεταβολιστεί μόνο το μηλικό οξύ και όχι τα σάκχαρα, με αποτέλεσμα να μειωθεί το επίπεδο της πτητικής οξύτητας. Οι χαμηλές τιμές pH σημειώνουν μια καθυστέρηση στην έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης, αλλά στη συνέχεια η εξέλιξη της ζύμωσης είναι πολύ καλή, "ομογαλακτικού" χαρακτήρα, παράγοντας σχεδόν αποκλειστικά γαλακτικό οξύ και ταυτόχρονα διατηρούνται χαμηλά επίπεδα πτητικής οξύτητας. Σε οίνους με αυξημένο pH λειτουργεί καλύτερα το γένος *Lactobacillus*, ενώ σε χαμηλότερο pH τα γένη *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Oenococcus* που παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε τιμές pH 3,0-3,2 (Hidalgo, 2018).

Όπως άλλοι μικροοργανισμοί, έτσι και τα γαλακτικά βακτήρια είναι ευαίσθητα στην παρουσία αιθανόλης στο μέσο ανάπτυξης καθώς αυξάνεται η διαπερατότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων τους προκαλώντας ανισορροπία και παράλυση του μεταβολισμού τους. Η δραστηριότητα των βακτηρίων αρχίζει να περιορίζεται όταν ο αλκοολικός τίτλος είναι μεταξύ 8 και 10% vol, ενώ όταν ξεπεράσει τα 13-14% vol η δραστηριότητα τους είναι αδύνατη. Τα γένη *Pediococcus*, *Oenococcus* και *Leuconostoc* είναι πιο ευαίσθητα στην παρουσία αιθανόλης από το γένος *Lactobacillus* (Hidalgo, 2018).

2.4 Θειώδες οξύ

Το διοξείδιο του θείου (SO_2) παράγεται από την καύση του θείου στον αέρα και είναι ένα αέριο βαρύτερο από τον αέρα με χαρακτηριστική ερεθιστική και αποπνικτική οσμή. Συναντάται σε διάφορες μορφές, όπως διαλυμένο αέριο θείο ή στις διάφορες ανόργανες μορφές του, που ονομάζεται ελεύθερο SO_2 , και ένα άλλο κλάσμα που συνδυάζεται με διάφορες οργανικές ουσίες που περιέχονται στα σταφύλια ή στους οίνους, γνωστό ως δεσμευμένο SO_2 , το άθροισμα των οποίων δίνει το ολικό SO_2 .

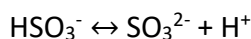
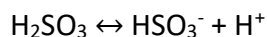


2.4.1 Ελεύθερο θειώδες

Το SO_2 διαλυμένο στο νερό που περιέχεται στο γλεύκος ή στον οίνο συνδυάζεται με αυτό για να σχηματίσει θειώδες οξύ (H_2SO_3).



Αυτό το H_2SO_3 μπορεί να διαλυθεί σε υδατικό μέσο, δημιουργώντας τις ακόλουθες ιοντικές ισορροπίες:



Σε τιμές pH του οίνου, δεν υπάρχει με τη μορφή ουδέτερου θειώδους άλατος (SO_3^{2-}), αλλά συναντάται ως αέριο θειώδης ανυδρίτης (SO_2), θειώδες οξύ (H_2SO_3) και όξινο θειώδες ιόν (HSO_3^-).

). Οι δύο πρώτες μορφές αποτελούν, μέσα στο κλάσμα του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη, τη λεγόμενη "δραστική" μορφή, η οποία διαθέτει τις περισσότερες οινολογικές ιδιότητες αυτής της ένωσης όπως αντιοξειδωτική και αντιοξειδασική δράση. Η πλέον δραστική μορφή, η μοριακή εξαρτάται από το pH του γλεύκους και κυμαίνεται από λίγο κάτω από 1% έως σχεδόν 10%.

$$\text{SO}_2 \text{ μοριακή (\%)} = \frac{100}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK})}}$$

Η τιμή pK εξαρτάται από τη θερμοκρασία του οίνου και τον αλκοολικό τίτλο και έχει τιμές από 1,78 στους 19 °C για ένα γλεύκος με 0% vol μέχρι 2,86 στους 40 °C για 20% vol.

2.4.2 Δεσμευμένο θειώδες

Το μεγαλύτερο μέρος του SO₂ που προστίθεται στο γλεύκος ή στον οίνο συνδυάζεται με διάφορες οργανικές ενώσεις, ιδίως με εκείνες που έχουν καρβονύλιο. Ευκολότερα με τις αλδεΐδες και δυσκολότερα με τις κετόνες. Το κλάσμα αυτό βρίσκεται σε αφθονία σε σχέση με το ελεύθερο SO₂, αλλά δεν έχει τόσο έντονα αντισηπτική και αντιοξειδωτική ικανότητα.

$$\frac{(\text{R-CHO}) \cdot (\text{HSO}_3^-)}{(\text{R-CHOH-SO}_3^-)} = K \quad \frac{(\text{R-CHOH-SO}_3^-)}{(\text{R-CHO})} = \frac{(\text{HSO}_3^-)}{K} = \frac{C}{L}$$

Η τελευταία σχέση αντιπροσωπεύει την αναλογία μεταξύ της δεσμευμένης μορφής του καρβονυλικού μορίου (C) και της ελεύθερης μορφής του (L), κατά τέτοιο τρόπο ώστε όταν η σταθερά διάσπασης έχει χαμηλή τιμή $K < 0,003 \cdot 10^{-3}$, ο συνδυασμός της καρβονυλικής ένωσης με τον θειώδη ανυδρίτη είναι πολύ σταθερός, με το ποσοστό της συνδυασμένης να υπερβαίνει το 99%. Αντίθετα, όταν η σταθερά διάσπασης έχει χαμηλή τιμή $K < 0,003 \cdot 10^{-3}$, ο συνδυασμός της καρβονυλικής ένωσης με τον θειώδη ανυδρίτη είναι πολύ ασταθής.

Στους οίνους, το κλάσμα του δεσμευμένου SO₂ που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία είναι αυτό που αντιστοιχεί στην ένωσή του με την ακεταλδεΐδη ή την αιθανάλη, σχηματίζοντας μια πολύ σταθερή και επομένως μη αναστρέψιμη ένωση. Ωστόσο, με τις υπόλοιπες ενώσεις του οίνου με τις οποίες συνδυάζεται, η ένωση είναι αναστρέψιμη ανάλογα με το επίπεδο του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη με το οποίο βρίσκεται σε ισορροπία και τη θερμοκρασία.

Το διοξείδιο του θείου μπορεί να συνδυαστεί με συνολικά είκοσι ουσίες, ορισμένες από τις οποίες προέρχονται από υγιή σταφύλια, όπως τα σάκχαρα ή τα παράγωγά τους, το γαλακτουρονικό οξύ, τους πολυσακχαρίτες, τις πολυφαινόλες κ.λπ., άλλες που σχηματίζονται από τις ζύμες κατά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης όπως η αιθανάλη, το πυροσταφυλικό οξύ και το α-κετογλουταρικό οξύ. Τέλος συνδέεται και με ουσίες που προέρχονται από σταφύλια προσβεβλημένα από τον μύκητα *Botrytis cinerea*, ο οποίος μπορεί να δεσμεύσει μεγάλη ποσότητα διοξειδίου του θείου, μεγάλη ποσότητα του οποίου είναι απαραίτητη για να διατηρηθεί ικανή ποσότητα ελεύθερου θειώδους στα κατάλληλα επίπεδα.

2.4.3 Ισορροπία ελεύθερου-δεσμευμένου θειώδους

Σε έναν θειωμένο οίνο υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ του ελεύθερου και του δεσμευμένου θειώδους, η οποία καθορίζεται από τις συνθήκες του μέσου, αλλά και από τις επιμέρους

σταθερές διάσπασης των ουσιών που είναι συνδεδεμένες με αυτό. Ασταθής ενώσεις λειτουργούν ως απόθεμα θειώδους και έτσι όταν αποδεσμεύονται το θειώδες αποτελεί μέρος του ελεύθερου και παρατείνει τη δράση του (Hidalgo, 2018).

Μια νέα προσθήκη SO₂ στον οίνο οδηγεί σε αύξηση του κλάσματος του ελεύθερου θειώδους, αλλά και του δεσμευμένου, σε μεταβλητές αναλογίες και στις δύο περιπτώσεις, όπως θα συζητηθεί παρακάτω. Από την άλλη πλευρά, μια μείωση του ελεύθερου θειώδους, λόγω οξειδωσης ή άλλων αιτιών, οδηγεί σε μείωση του δεσμευμένου για την αποκατάσταση της ισορροπίας, αποδεσμεύοντας τις προαναφερθείσες ουσίες και δημιουργώντας έτσι απόθεμα θειώδους (Hidalgo, 2018).

Η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στην προαναφερθείσα ισορροπία, αυξάνοντας το ελεύθερο θειώδες όταν η θερμοκρασία αυξάνεται ή μειώνοντας το όταν η θερμοκρασία μειώνεται. Αυτό συμβαίνει με ρυθμό 1,0- 3,0 mg/L θειώδη ανυδρίτη για κάθε βαθμό Κελσίου της θερμοκρασίας (Hidalgo, 2018).

Όλες οι μορφές του θειώδη ανυδρίτη στους οίνους έχουν αντιβακτηριδιακή δράση, ακόμη και τα πιο σταθερά μόρια συνδεδεμένα με SO₂, όπως η ακεταλδεΐδη και το πυροσταφυλικό οξύ. Όσον αφορά τα γαλακτικά βακτήρια, τα επίπεδα διοξειδίου του θείου που απαιτούνται για τη διακοπή της δραστηριότητάς τους κυμαίνονται από 10 έως 20mg/L ελεύθερου SO₂ για οίνους με χαμηλό pH ή από 20 έως 40 mg/L ελεύθερου SO₂ για οίνους με υψηλό pH (Hidalgo, 2018).

3. Σκοπός

Η αύξηση της μέσης θερμοκρασίας στις αμπελουργικές περιοχές του κόσμου έχουν οδηγήσει σε χαμηλότερη συσσώρευση οργανικών οξέων στα σταφύλια. Παρ' όλα αυτά η φρεσκάδα του οίνου στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό από την συγκέντρωση των οξέων, την οξύτητα. Έτσι κάθε φορά είναι όλο και πιο χρήσιμη η ανεύρεση εναλλακτικών μεθόδων για την αναστολή ή την διακοπή της μηλογαλακτικής ζύμωσης και την διατήρηση του μηλικού οξέος στους οίνους.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής είναι να μελετηθεί η χρήση του φουμαρικού οξέος για τον έλεγχο της μηλογαλακτικής ζύμωσης, αλλά και η επίδρασή του στα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά ενός ροζέ οίνου, όπως για παράδειγμα στην οξύτητα και το χρώμα. Για το σκοπό αυτό δείγματα οίνου εμπλουτίστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις φουμαρικού και μηλικού οξέος και εμβολιάστηκαν με γαλακτικά βακτήρια. Μετά από την παραμονή τους για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ακολούθησαν βασικές αναλύσεις οίνων.

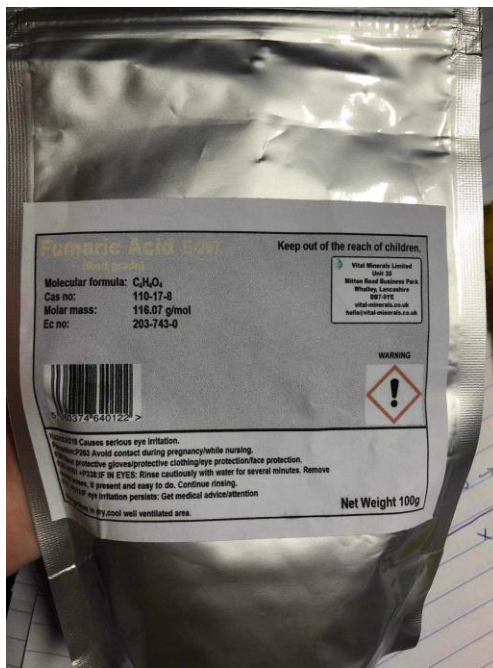
4. Υλικά και μέθοδοι ανάλυσης

4.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την προετοιμασία των δειγμάτων που αναλύθηκαν στους 0, 3 και 6 μήνες, χρησιμοποιήθηκε οίνος της ποικιλίας «Αγιωργίτικο» και σύνολο χρειάστηκαν 18 L οίνου. Τα δείγματα για το διάστημα αυτό φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία ≈25°C. Στα δείγματα του οίνου, όπως παρουσιάζεται και στο σχεδιάγραμμα που ακολουθεί, έγιναν προσθήκες φουμαρικού οξέος, μηλικού οξέος και βακτηρίων.

Οι προσθήκες φουμαρικού οξέος που έγιναν στα δείγματα οίνου ήταν 0 mg/L, 300 mg/L και 600 mg/L. Το φουμαρικό οξύ που χρησιμοποιήθηκε ήταν καθαρό και σε μορφή σκόνης. Σύμφωνα με υπολογισμούς χρειάστηκε να διαλύσουμε 5,4 g φουμαρικού σε 3 L οίνου, ωστόσο διαλύσαμε

6,3 g σε 3,5 L οίνου για τυχόν απώλειες. Σε δοχείο προσθέσαμε 2,5 L οίνου στα οποία διαλύσαμε τα γραμμάρια φουμαρικού σε μαγνητικό αναδευτήρα για 60-90 λεπτά. Αφού παρατηρήσαμε ότι το φουμαρικό οξύ είχε διαλυθεί εντελώς προσθέσαμε το 1 L οίνου το οποίο είχε απομείνει για να συμπληρώσουμε τα 3,5 L.



Εικόνα 3. Σκεύασμα φουμαρικού οξέος (99,9%)

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, σε μεγάλο περιέκτη αρχικά προσθέσαμε τα 2 L από τον παραπάνω οίνο στον οποίο έχουμε διαλύσει φουμαρικό οξύ και με προσθήκη οίνου χωρίς φουμαρικό, φτάνουμε σε τελικό όγκο 3 L. Από το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήσαμε τα 2 L για να την παρασκευή των δειγμάτων οίνου με συγκέντρωση φουμαρικού 600 mg/L και το 1 L για την παρασκευή των δειγμάτων με συγκέντρωση φουμαρικού 300 mg/L. Φέραμε και τα 2 δείγματα σε τελικό όγκο 6 L το κάθε ένα χρησιμοποιώντας οίνο χωρίς καμία προσθήκη.

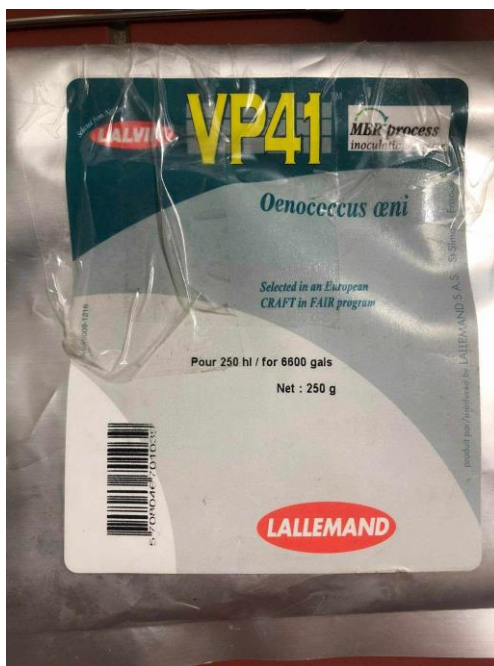
Στη συνέχεια χωρίσαμε τα 6 L του κάθε οίνου με διαφορετική συγκέντρωση φουμαρικού σε 3 ίσα μέρη ώστε να κάνουμε την προσθήκη μηλικού οξέος και βακτηρίων. Όσον αφορά την προσθήκη μηλικού οξέος για τον οίνο με συγκέντρωση 600 mg/L φουμαρικού, κρατήσαμε 2 L στα οποία δεν έγινε προσθήκη μηλικού (0 g/L), τα οποία και χωρίσαμε σε περιέκτες των 500 ml. Σε άλλα 2 L οίνου διαλύσαμε 2 g μηλικού ώστε να έχουμε συγκέντρωση 1 g/L, τα οποία επίσης χωρίσαμε στη συνέχεια σε περιέκτες των 500 ml, ενώ στα τελευταία 2 L διαλύσαμε 6 g μηλικού για την επιθυμητή συγκέντρωση των 3 g/L.

Την ίδια ακριβώς διαδικασία για τις προσθήκες μηλικού οξέος ακολουθήσαμε και για τον οίνο με συγκέντρωση φουμαρικού 300 mg/L. Επίσης, κρατήσαμε 1 L οίνου χωρίς καμία προσθήκη φουμαρικού ή/και μηλικού οξέος για οργανοληπτικό έλεγχο και μέτρηση pH και οξύτητας.

Εφόσον πλέον είχαμε όλα τα δείγματα σε περιέκτες των 500 ml, έγινε η προσθήκη βακτηρίων *Oenococcus oeni*. Τα βακτήρια βρίσκονταν σε ξηρή μορφή οπότε 1^ο βήμα ήταν η ενυδάτωση τους. Γνωρίζοντας ότι για 100 L οίνου χρειαζόμαστε 1 g βακτηρίων, ενυδατώσαμε (σύμφωνα με

τις οδηγίες της εταιρίας) 1 g βακτηρίων σε 10 ml εμφιαλωμένου νερού (χωρίς Cl). Φέραμε το δείγμα των βακτηρίων σε όγκο 1000 ml με προσθήκη οίνου μετά το πέρας των 20 λεπτών που διήρκτησε η ενυδάτωση και εμβολιάσαμε όσα δείγματα έπρεπε να περιέχουν βακτήρια με 0,005 g βακτηρίων, δηλαδή 500 μL με πιπέτα.

Καθώς στις αναλύσεις που έγιναν στους 3 μήνες δεν παρατηρήθηκε καμία δραστηριότητα γαλακτικών βακτηρίων, αποφασίσαμε να εμβολιάσουμε με επιπλέον ποσότητα γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus oeni* ίση με 500 μL. Ωστόσο λόγω λάθους, τα δείγματα με συγκεντρώσεις φουμαρικού 0 mg/L, 600 mg/L και μηλικό 0 g/L και 1 g/L αντίστοιχα, προς ανάλυση στους 6 μήνες εμβολιάστηκαν με ποσότητα βακτηρίων ίση με 5 mL.

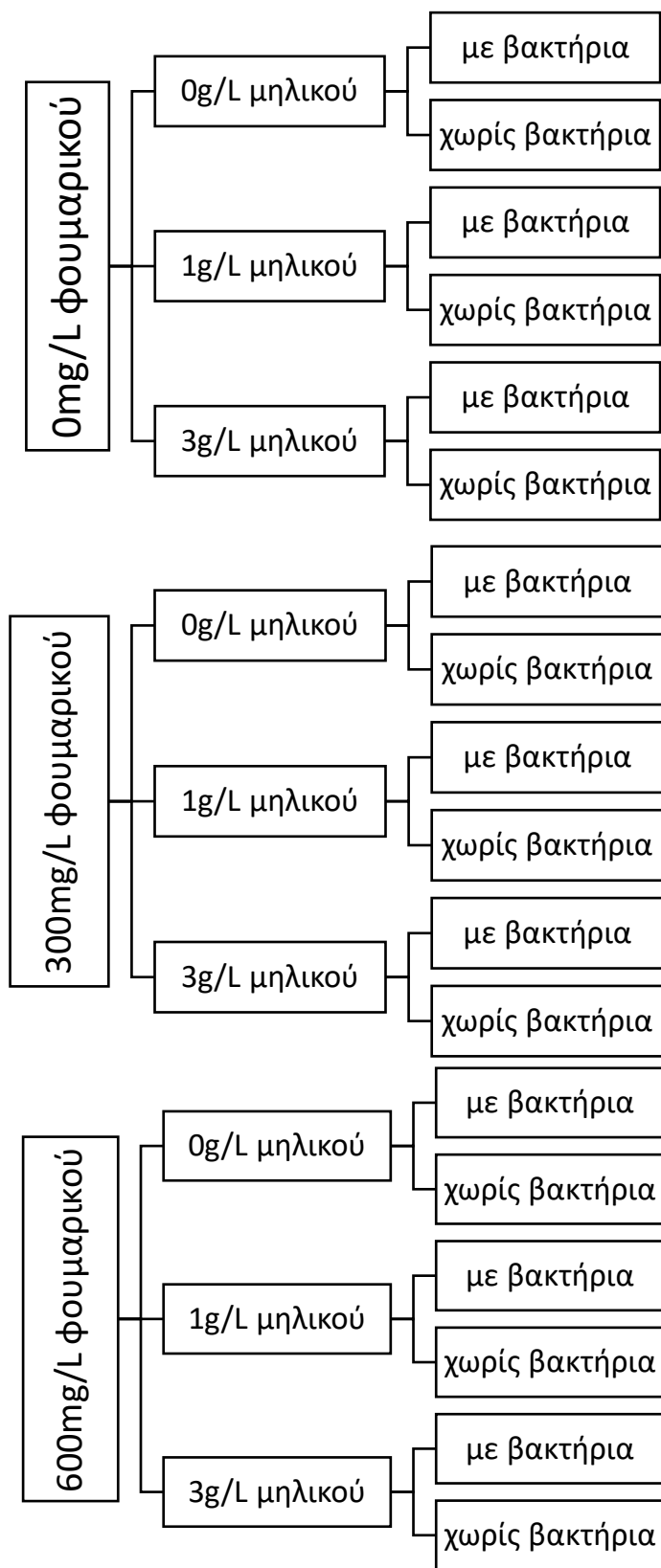


Εικόνα 4. Σκεύασμα γαλακτικών βακτηρίων *O. oeni*

Τη χρονική στιγμή μηδέν, δηλαδή την περίοδο που παρασκευάστηκαν τα δείγματα έγιναν οι αναλύσεις του pH και της ογκομετρούμενης οξύτητας σε όλα τα δείγματα. Για κάθε μία από τις αναλύσεις αναμείξαμε για κάθε δείγμα μέρος του οίνου στον οποίο είχαν προστεθεί βακτήρια και μέρος οίνου χωρίς προσθήκη βακτηρίων. Παρακάτω παρουσιάζονται τα πρωτόκολλα σύμφωνα με τα οποία έγιναν οι αρχικές αναλύσεις, τις οποίες επαναλάβαμε στους 3 και στους 6 μήνες, πλέον χωριστά για κάθε δείγμα μαζί με σύνολο άλλων αναλύσεων.

Την ίδια στιγμή έγινε και οργανοληπτικός έλεγχος πρότυπων δειγμάτων που ετοιμάστηκαν με συγκεντρώσεις φουμαρικού οξέος 0, 300 και 600 mg/L. Όσον αφορά το χρώμα τα δείγματα δεν είχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ωστόσο το δείγμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση φουμαρικού είχε ελαφρώς πιο σκουρόχρωμο. Στο στόμα, όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του φουμαρικού οξέος τόσο πιο έντονη ήταν η οξύτητα, με το δείγμα συγκέντρωσης 600 mg/L να είναι ταυτόχρονα και πιο στυπτικό από τα υπόλοιπα. Το δείγμα με συγκέντρωση 300 mg/L είχε πιο γεμάτο σώμα σε σύγκριση με αυτό με την μεγαλύτερη συγκέντρωση. Μετά από μερική ώρα,

το δείγμα χωρίς προσθήκη φουμαρικού ήταν πιο πικρό από τα άλλα δύο που σε αντίθεση έχαναν αυτό το χαρακτηριστικό και επικρατούσε η οξύτητα.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση της προετοιμασίας των δειγμάτων

4.2 Αναλύσεις

4.2.1 Ογκομετρούμενη οξύτητα

Ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα καλείται το άρθροισμα των ογκομετρούμενων οξέων, όταν το pH του οίνου ρυθμίζεται σε τιμή 7 με προσθήκη τιτλοδοτούμενου αλκαλικού διαλύματος. Καθορίζεται από το σύνολο των καρβοξυλομάδων του γλεύκους ή του οίνου και εξαρτάται τόσο από την περιεκτικότητα των οργανικών οξέων, όσο και από την περιεκτικότητα σε ανόργανα ανιόντα και κατιόντα, αλλά όχι από το είδος των οξέων. Στην ολική οξύτητα δεν περιλαμβάνεται το διοξείδιο του άνθρακα.

Αντιδραστήρια:

- ρυθμιστικά διαλύματα αναφοράς (buffer) με pH=4 και pH=7, που κυκλοφορούν στο εμπόριο
- απιονισμένο νερό
- διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 0,1 M
- διάλυμα υδροχλωρίου (HCl) 0,1 M
- δείκτης φαινολοφθαλεΐνης
- δείγμα οίνου προς ανάλυση

Υλικά:

- ποτήρια ζέσεως
- κωνική φιάλη 250 ml
- ογκομετρική φιάλη 250 ml
- σιφώνια πλήρωσης 10 ml, 20 ml, 25 ml
- πουάρ
- προχοΐδα
- λουτρό υπερήχων
- πεχάμετρο

Μέθοδος:

Για τη μέτρηση της ογκομετρούμενης οξύτητας αρχικά χρειάστηκε να προσδιορίσουμε τον τίτλο του διαλύματος NaOH με πρότυπο διάλυμα HCl 0,1 M. Σε ογκομετρική φιάλη 250 ml μεταφέραμε 20 ml διαλύματος NaOH και συμπληρώσαμε με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Με σιφώνιο 25 ml μεταφέραμε διάλυμα NaOH σε κωνική των 250 ml, προσθέσαμε 2-3 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης και ογκομετρήσαμε με το πρότυπο διάλυμα HCl 0,1 M. Σημειώσαμε την κατανάλωση και επαναλάβαμε την ογκομέτρηση άλλες 2 φορές.

Εφόσον πλέον γνωρίζαμε τον τίτλο του διαλύματος NaOH, σειρά είχε η βαθμονόμηση του μετρητή pH σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιώντας τα ρυθμιστικά διαλύματα buffer. Προετοιμάσαμε τα δείγματα προς ανάλυση. Σε ένα ποτήρι ζέσεως προσθέσαμε περίπου 20 ml οίνου και σε λουτρό υπερήχων αφαιρέσαμε το CO₂. Στη συνέχεια με σιφώνι πλήρωσης μεταφέραμε 10 ml οίνου σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο τοποθετήσαμε πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα και προσθέσαμε πρότυπο διάλυμα NaOH έως ότου η ένδειξη του πεχάμετρου δείξει 7. Την ίδια διαδικασία ακολουθήσαμε για όλα τα δείγματα.

Τα αποτελέσματα της ογκομετρούμενης οξύτητας αρχικά τα εκφράσαμε σε g/L τρυγικού οξέος, ενώ στη συνέχεια σε meq/L ώστε να μπορέσουμε να συγκρίνουμε την επίδραση του κάθε οξέος ξεχωριστά στα δείγματα.

Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε g/L τρυγικού οξέος:

- ογκομετρούμενη οξύτητα (g/L) = $\frac{\alpha}{V} * N * 75,04$

όπου α είναι η κατανάλωση πρότυπου διαλύματος NaOH, V είναι ο όγκος του δείγματος οίνου και N η κανονικότητα του πρότυπου διαλύματος NaOH.

$M_{\text{τρυγικού}} = 150,09 \text{ g/mole}$. Το τρυγικό οξύ έχει δύο καρβοξυλομάδες στο μόριο του άρα το ισοδύναμο βάρος του είναι: $150,09/2 = 75,04 \text{ g}$

Το πρότυπο διάλυμα NaOH που ετοιμάστηκε για τις αναλύσεις στους 3 μήνες είχε κανονικότητα 0,1 M, οπότε για την έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ο τύπος: ογκομετρούμενη οξύτητα (g/L) = $\alpha * 0,75$. Αντιθέτως το πρότυπο διάλυμα NaOH που παρασκευάστηκε στους 6 μήνες είχε κανονικότητα 0,09 M και κατά συνέπεια ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ογκομετρούμενη οξύτητα (g/L) = $\alpha * 0,675$.

Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε meq/L:

- ογκομετρούμενη οξύτητα (meq/L) = $\frac{\text{g} * 1000}{\text{L} * \text{eq. wt.}}$

όπου g/L η ογκομετρούμενη οξύτητα εκφρασμένη σε τρυγικό και eq. wt. το ισοδύναμο βάρος του τρυγικού οξέος. Γνωρίζοντας πως το τρυγικό οξύ έχει δύο όξινα υδρογόνα το ισοδύναμο βάρος του είναι eq. wt. = $150,09/2 = 75,04 \text{ g/mol}$

4.2.2 pH

Η μέτρηση του pH στηρίζεται στη διαφορά δυναμικού μεταξύ δύο ηλεκτροδίων βυθισμένων στο δείγμα προς ανάλυση. Τα δύο αυτά ηλεκτρόδια διαφέρουν μεταξύ τους, καθώς το δυναμικό του ενός είναι συνάρτηση του pH του υγρού, ενώ το δυναμικό του δεύτερου είναι σταθερό και αποτελεί το ηλεκτρόδιο αναφοράς.

Αντιδραστήρια:

- ρυθμιστικά διαλύματα αναφοράς (buffer) με pH=4 και pH=7, που κυκλοφορούν στο εμπόριο
- δείγμα οίνου προς ανάλυση

Υλικά:

- ποτήρι ζέσεως
- πεχάμετρο
- ηλεκτρόδια

Μέθοδος:

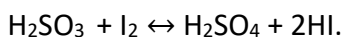
Πριν τη μέτρηση του pH κάθε δείγματος, απαραίτητος είναι ο μηδενισμός του πεχάμετρου σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή, χρησιμοποιώντας τα ρυθμιστικά διαλύματα buffer. Μετά το μηδενισμό του οργάνου, σε ποτήρι ζέσεως μεταφέραμε μικρή αλλά ικανή ποσότητα του οίνου προς ανάλυση, τέτοια ώστε και τα δύο ηλεκτρόδια του πεχάμετρου να είναι βυθισμένα στο δείγμα του του οποίου η θερμοκρασία ήταν μεταξύ 20-25 °C και σημειώσαμε την ένδειξη.

4.2.3 Θειώδες

Το ελεύθερο θειώδες οξύ στον οίνο μπορεί να βρίσκεται υπό τη μορφή H_2SO_3 που είναι η μοριακή ή την μορφή HSO_3^- που είναι η ιονισμένη. Η ισορροπία που διαμορφώνεται είναι η εξής και εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία:



Ο προσδιορισμός του ελεύθερου θειώδους γίνεται με άμεση τιτλοδότηση με διάλυμα ιωδίου παρουσία δείκτη αμύλου και βασίζεται σε μία αντίδραση οξειδοαναγωγής:



Για την μέτρηση του ελεύθερου θειώδους οξέος, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η οξίνιση του οίνου προς ανάλυση με σκοπό την αποφυγή της οξειδωσης των πολυφαινολών από το ιώδιο.

Το ολικό θειώδες στους οίνους αντιπροσωπεύει το σύνολο των διαφόρων μορφών διοξειδίου του θείου, δεσμευμένο και ελεύθερο. Ο προσδιορισμός του ολικού θειώδους γίνεται με ιωδομετρική τιτλοδότηση, αφού προηγηθεί αλκαλική υδρόλυση. Με την αλκαλική υδρόλυση πετυχαίνουμε την απελευθέρωση του θειώδους οξέος από τα σουλφονικά παράγωγα.

4.2.3.1 Ελεύθερο θειώδες

Αντιδραστήρια:

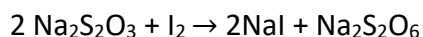
- 50ml οίνου
- 3ml δείκτη αμύλου (5 g/L)
- 3ml διαλύματος θειϊκού οξέος (H_2SO_4) (25% v/v)
- Διάλυμα ιωδίου (I_2) 0,01 N
- διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 N

Υλικά:

- σιφώνι πλήρωσης 10 ml, 50 ml
- σιφώνι 5 ml
- πουάρ
- κωνική φιάλη 250 ml
- προχοΐδα

Μέθοδος:

Το διάλυμα του I_2 με το οποίο προσδιορίσαμε το θειώδη ανυδρίτη χρειάστηκε αρχικά να ελεγχθεί όσον αφορά την κανονικότητά του. Για το σκοπό αυτό μεταφέραμε 10 ml διαλύματος $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N σε κωνική φιάλη των 250 ml, προσθέσαμε 2-3 σταγόνες δείκτη αμύλου και τιτλοδοτήσαμε με το διάλυμα του ιωδίου (I_2). Επιβεβαιώθηκε ότι η κανονικότητα του διαλύματος I_2 ήταν 0,01 N.



Για τον προσδιορισμό του ελεύθερου θειώδους μεταφέραμε αρχικά 50 ml του προς ανάλυση οίνου σε κωνική φιάλη των 250 ml αποφεύγοντας την ανάδευση και τον αερισμό του οίνου πριν τον προσδιορισμό. Στη συνέχεια, στην κωνική φιάλη προσθέσαμε 3 ml διαλύματος H_2SO_4 και 3 ml δείκτη αμύλου και ξεκινήσαμε άμεσα την τιτλοδότηση με διάλυμα I_2 0,01 N έως ότου παρατηρηθεί αλλαγή χρώματος σε κυανό και παραμένει για 10-15 sec. Επαναλάβαμε την ίδια

διαδικασία για 2^η φορά και χρησιμοποιώντας τον μέσο όρο των καταναλώσεων εκφράσαμε το ελεύθερο θειώδες σε mg/L.

$$\bullet \text{HSO}_3^- \text{ (mg/L)} = \frac{n \cdot N \cdot 32 \cdot 1000}{V} = n \cdot 6,4$$

Όπου n η κατανάλωση διαλύματος I₂ 0,01 N, N η κανονικότητα του διαλύματος I₂ και V ο όγκος οίνου που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό.

4.2.3.2 Ολικό θειώδες

Αντιδραστήρια:

- 20 ml οίνου
- 10 ml NaOH 4 M
- διάλυμα HCl 0,1 M
- 3 ml δείκτη αμύλου (5 g/L)
- 6 ml διαλύματος H₂SO₄ (25% v/v)
- διάλυμα I₂ 0,01 N

Υλικά:

- σιφώνι πλήρωσης 20 ml
- σιφώνι 5 ml, 10 ml
- πουάρ
- κωνική φιάλη 250 ml
- προχοΐδα

Μέθοδος:

Πρώτο βήμα πριν την έναρξη του προσδιορισμού του ολικού θειώδους ήταν ο υπολογισμός του τίτλου του διαλύματος NaOH 4 M που χρησιμοποιήθηκε για την αλκαλική υδρόλυση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε πρότυπο διάλυμα HCl 0,1 M στην τιτλοδότηση, επαναλάβαμε την τιτλοδότηση για 3 φορές συνολικά και πήραμε τον μέσο όρο των καταναλώσεων. Επιβεβαιώθηκε πως η γραμμομοριακότητα κατ' όγκο (M) του διαλύματος NaOH ήταν 4 M.

Για τον προσδιορισμό του ολικού θειώδους μεταφέραμε αρχικά 20 ml του προς ανάλυση οίνου σε κωνική φιάλη των 250 ml αποφεύγοντας την ανάδευση και τον αερισμό του οίνου πριν τον προσδιορισμό και 10 ml πυκνού διαλύματος NaOH. Στη συνέχεια, κλείσαμε με εσφυρισμένο πώμα την κωνική φιάλη και την τοποθετήσαμε σε σκοτεινό μέρος για 10-15 min. Μετά το πέρας των 10-15 min προσθέσαμε στην κωνική φιάλη 6 ml διαλύματος H₂SO₄ και 3 ml δείκτη αμύλου και ξεκινήσαμε άμεσα την τιτλοδότηση με διάλυμα I₂ 0,01 N έως ότου παρατηρηθεί αλλαγή χρώματος σε κυανό και παραμένει για 10-15 sec. Επαναλάβαμε την ίδια διαδικασία για 2^η φορά και χρησιμοποιώντας τον μέσο όρο των καταναλώσεων εκφράσαμε το ολικό θειώδες σε mg/L.

$$\bullet \text{HSO}_3^- \text{ (mg/L)} = \frac{n \cdot N \cdot 32 \cdot 1000}{V} = n \cdot 16$$

Όπου n η κατανάλωση διαλύματος I₂ 0,01 N, N η κανονικότητα του διαλύματος I₂ και V ο όγκος οίνου που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό.

4.2.3.3 Μοριακό θειώδες

Έχοντας υπολογίσει το ελεύθερο θειώδες αλλά και το pH στα δείγματα των οίνων μπορούμε να υπολογίσουμε το μοριακό θειώδες (H₂SO₃), την πλέον δραστική μορφή του θειώδη ανυδρίτη. Για τον υπολογισμό του, χρησιμοποιήσαμε τον εξής τύπο:

- $$\text{molecular SO}_2 \text{ (mg/L)} = \frac{\text{freeSO}_2}{1 + 10^{(\text{pH}-1.81)}}$$

4.2.4 Cielab

Το χρώμα ενός οίνου είναι ένα από τα σημαντικότερα οπτικά του χαρακτηριστικά, το οποίο μας παρέχει σημαντικό αριθμό πληροφοριών για την ποιότητά του. Για τον προσδιορισμό του χρώματος των δειγμάτων μας, χρησιμοποιήσαμε μια φασματοφωτομετρική μέθοδο η οποία σύμφωνα με την επιτροπή Internationale de l'Eclairage (CIE, 1976), προσπαθεί να μιμηθεί πραγματικούς παρατηρητές όσον αφορά την αίσθηση του χρώματος.

Για την περιγραφή του χρώματος του οίνου χρησιμοποιούνται 3 χαρακτηριστικά, η τονικότητα, η φωτεινότητα και ο χρωματισμός. Η τονικότητα, αφορά το ίδιο το χρώμα και είναι το πιο χαρακτηριστικό. Περιγράφεται με βάση 4 χρώματα, κόκκινο, κίτρινο, πράσινο και μπλε. Η φωτεινότητα προσδιορίζει το πόσο φωτεινή ή σκοτεινή είναι η οπτική αίσθηση, ενώ ο χρωματισμός σχετίζεται με την ένταση του χρώματος. Ο συνδυασμός αυτών των τριών εννοιών επιτρέπει τον προσδιορισμό πολλαπλών αποχρώσεων του χρώματος που μπορεί να παρουσιάζουν οι οίνοι.

Η διαύγεια (L*), η χρωματική συνιστώσα κόκκινο/πράσινο (a*), η χρωματική συνιστώσα μπλε/κίτρινο (b*) και τα παράγωγα μεγέθη χρωματική ένταση (C*), χρωματική απόχρωση (H*) καθορίζουν τις χρωματικές συντεταγμένες στο χώρο CIElab που βασίζεται σε ένα καρτεσιανό σύστημα τριών ορθογώνιων αξόνων L*, a* και b*.

Συγκεκριμένα η συντεταγμένη L* που αντιπροσωπεύει τη διαύγεια παίρνει τιμές από 0=μαύρο έως 100= άχρωμο. Το μέγεθος a* για θετικές τιμές αναφέρεται στο κόκκινο χρώμα, ενώ για αρνητικές στο πράσινο και αντίστοιχα το b* για θετικές τιμές στο κίτρινο και για αρνητικές τιμές στο μπλε. Όσον αφορά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων σε περίπτωση που έχουμε παραπάνω από ένα δείγματα προς ανάλυση, η τιμή ΔE* που εκφράζει τη συνολική χρωματική διαφορά μεταξύ 2 οίνων βοηθάει στην κατανόηση των αποτελεσμάτων. Η τιμή ΔE* δίνεται από τον τύπο:

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

Αντιδραστήρια:

- απιονισμένο νερό
- δείγμα οίνου

Υλικά:

- κυψελίδες 2 mm
- μικροπιπέτες
- χρωματόμετρο (Colorimeter MINOLTA, model CT-310)

Μέθοδος:

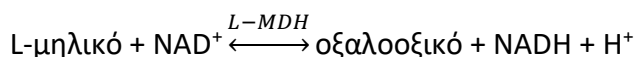
Το Chroma Meter CT-310 που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις χρώματος είναι ένα χρωματομετρικής μικρών δειγμάτων για τη μέτρηση της διαπερατότητας και του χρώματος των υγρών. Τρεις διαφορετικές κυψέλες δειγμάτων (με μήκη οπτικής διαδρομής 2 mm, 10 mm και

20 mm) και δύο ρυθμίσεις ευαισθησίας επιτρέπουν μετρήσεις υγρών με ευρύ φάσμα πυκνοτήτων. Κατά τη ανάλυση των δειγμάτων στο χρωματόμετρο απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα δείγματα προς ανάλυση να είναι διαυγή.

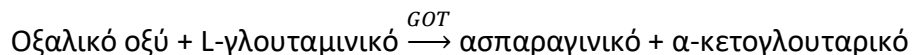
Αρχικά χρησιμοποιώντας κυψελίδα με ίδιο οπτικό πάχος με αυτή που θα χρησιμοποιούσαμε για τα δείγματα του οίνου (2 mm), μηδενίσαμε το χρωματόμετρο χρησιμοποιώντας απεσταγμένο νερό ως αναφορά. Η διαπερατότητα μετρήθηκε από τα 380 έως τα 780 nm κάθε 5 nm. Πριν από κάθε μέτρηση επόμενου δείγματος ξεπλύναμε την κυψελίδα με το προς ανάλυση δείγμα τουλάχιστον 2 φορές. Σημειώσαμε τις ενδείξεις L*, a*, b*, C* και H* για κάθε δείγμα.

4.2.5 Μηλικό οξύ

Για την ανάλυση του μηλικού οξέος στα δείγματα του οίνου βασιστήκαμε σε ενζυμικές αντιδράσεις. Το L-μηλικό οξύ οξειδώνεται από το νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (NAD) σε οξαλοξικό, σε μια αντίδραση που καταλύεται από την L-μηλική αφυδρογονάση (L-MDH).



Η ισορροπία της αντίδρασης αυτής στρέφεται κανονικά προς τη δημιουργία L-μηλικού. Υπάρχει όμως δυνατότητα να μετατοπιστεί προς τα δεξιά, δηλαδή προς τη δημιουργία οξαλοξικού, απομακρύνοντας το οξαλοξικό, παρουσία L-γλουταμινικού. Έτσι το οξαλοξικό μετατρέπεται σε L-ασπαρτικό σε μια αντίδραση που καταλύεται από τη οξαλική γλουταμινική τρανσαμινάση (GOT).



Ο ποσοτικός προσδιορισμός του μηλικού οξέος μπορεί να γίνει με τον προσδιορισμό του παραγόμενου NADH. Το NADH απορροφά έντονα στα 340 nm και απομένως ο προσδιορισμός γίνεται φασματοφωτομετρικά. Από τη στοιχειομετρία της αντίδρασης το ποσό του NADH που σχηματίζεται αντιστοιχεί στο ποσό του μηλικού οξέος.

Για τον ενζυμικό προσδιορισμό του L-μηλικού οξέος χρησιμοποιήσαμε έναν πολυπαραμετρικό αναλυτή HYPERLAB SMART, ο οποίος έχει σχεδιαστεί για 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. Ο ενζυμικός αναλυτής έχει ανώτατο όριο ανίχνευσης για το μηλικό οξύ τα 1,25 g/L και το σφάλμα ανέρχεται στα 0,01-0,02 g/L για τους ροζέ οίνους. Η ροή του υγρού ελέγχεται από τρεις περισταλτικές αντλίες που τίθενται σε λειτουργία καθοδηγούμενες από το λογισμικό καθώς και από όλους τους ρομποτικούς χειρισμούς του συστήματος.

Όσον αφορά τη λειτουργία του ενζυμικού αναλυτή, τα δείγματα τοποθετούνται σε κυψελίδες χωρίς να προηγείται καμία επεξεργασία.

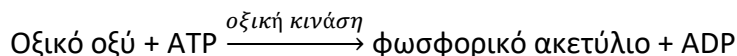
Η επιφάνεια εργασίας στεγάζει την πλάκα υποδοχής αντιδραστήριου, την πλάκα υποδοχής δείγματος, τις κυψελίδες, τον βραχίονα δειγματοληψίας υψηλής ακρίβειας εξοπλισμένο με βελόνα από χάλυβα AISI 316 και έναν σταθμό πλύσης της βελόνας. Ο ενιαίος βραχίονας είναι τοποθετημένος έτσι ώστε να εκτελεί όλες τις λειτουργίες δειγματοληψίας και διανομής υγρών.

Ο βραχίονας περιστρέφεται κατά 360° ξεκινώντας και τερματίζοντας τη στροφή στη μέση του πιάτου αντιδραστήριου. Συνδεδεμένος σε υπολογιστή, οδηγείται από ειδικό λογισμικό. Κατά τη διάρκεια του κύκλου ανάλυσης, η βελόνα περνά πάνω από όλα τα δοχεία αντιδραστήριων, τις κυψελίδες αντίδρασης και τα σωληνάκια δείγματος.

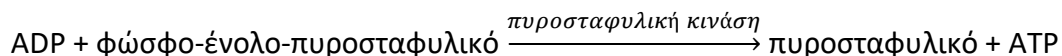
Η προετοιμασία του προϊόντος της αντίδρασης αρχίζει με την απόσυρση του αντιδραστήριου που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί και του δείγματος που διαχωρίζεται με διάκενο αέρα, τη διανομή στην κυψελίδα αντίδρασης, την ανάμιξη και τη φωτομετρική ανάγνωση για την αξιολόγηση της χρωματικής παρεμβολής του δείγματος δοκιμής. Στη συνέχεια, στην κυψελίδα αντίδρασης διανέμεται το δεύτερο αντιδραστήριο, σύμφωνα με την αναλυτική μέθοδο. Το σύστημα, καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης λαμβάνει φωτομετρικές μετρήσεις για να ελέγχει τη σωστή εξέλιξη της κινητικής της αντίδρασης. Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης που αναπτύχθηκε διαβάζεται στο προγραμματισμένο μήκος κύματος, η καταγεγραμμένη απορρόφηση μετατρέπεται σε συγκέντρωση μέσω κατάλληλων υπολογιστικών αλγορίθμων και εκφράζεται σε g/L μηλικού οξέος.

4.2.6 Οξικό οξύ

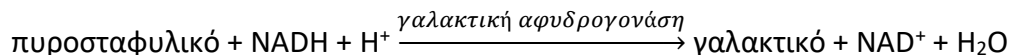
Με τον ίδιο ενζυμικό αναλυτή που αναφέρεται στον υπολογισμό του μηλικού οξέος αναλύσαμε τα δείγματα για να δούμε την περιεκτικότητά τους σε οξικό οξύ. Για το οξικό οξύ το μηχάνημα είναι ικανό να ανιχνεύσει έως 2 g/L με σφάλμα μεθόδου για το ροζέ κρασί 0,003 έως 0,007 g/L. Το οξικό οξύ, παρουσία τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μετατρέπεται σε φωσφορικό ακετύλιο σε μία αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο οξική κινάση.



Η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) που σχηματίζεται από την αντίδραση αυτή μετατρέπεται εκ νέου σε ATP σε μια αντίδραση με φώσφο-ένολο-πυροσταφυλικό που καταλύεται από την κινάση του πυροσταφυλικού.



Το πυροσταφυλικό στη συνέχεια ανάγεται σε L-γαλακτικό από την ανηγμένη μορφή του νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου (NADH) που καταλύεται από τη γαλακτική αφυδρογονάση.



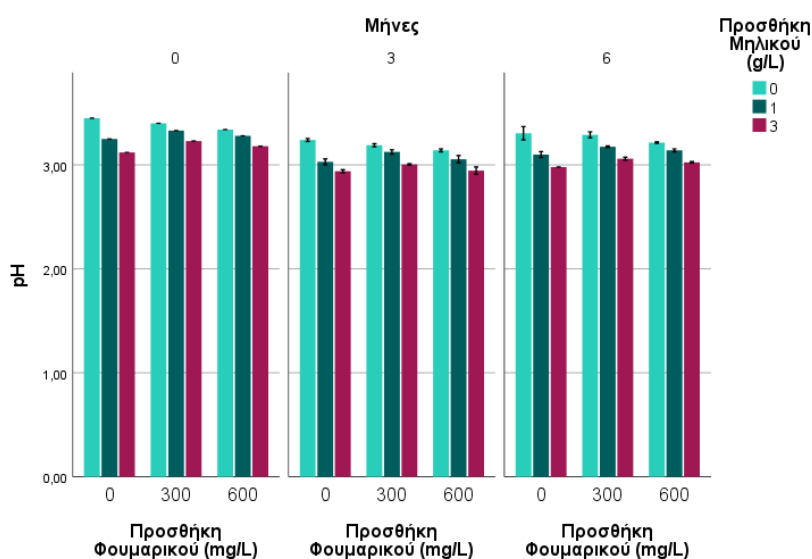
Η ποσότητα του οξειδωμένου NADH που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του οξικού οξέος προσδιορίζεται από την απορρόφηση στα 340 nm.

5. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα όλων των αναλύσεων επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης IBM SPSS Statistics (“Statistical Package for the Social Sciences”) Παρακάτω παρουσιάζονται και αναλύονται τα γραφήματα των αποτελεσμάτων.

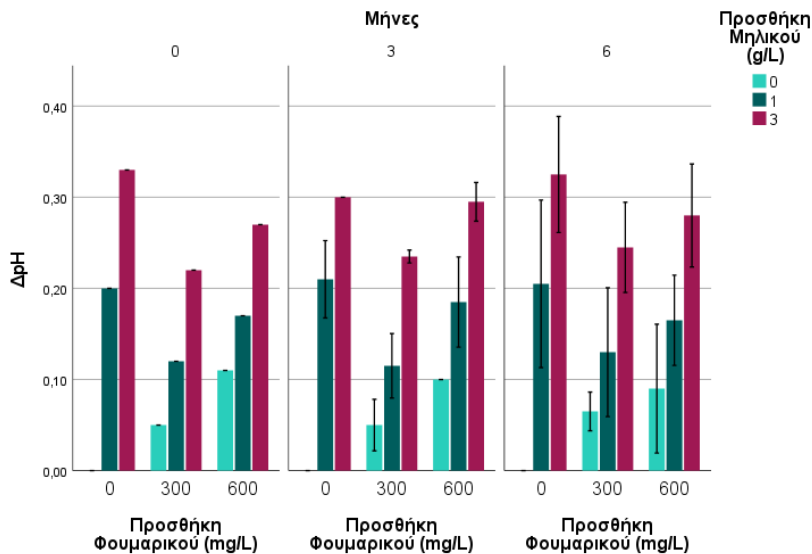
5.1. pH και οξύτητα

Στο γράφημα όπου παρουσιάζεται το pH σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού οξέος, ενώ τα διαφορετικά χρώματα συμβολίζουν τις διαφορετικές προσθήκες μηλικού οξέος στα δείγματα. Είναι εμφανές ότι όσο αυξάνεται η προσθήκη οξέος, τόσο του μηλικού, όσο και του φουμαρικού τόσο μειώνεται η τιμή του pH. Παράλληλα οι τιμές pH από το διάστημα των 0 μηνών έως αυτό των 6 μηνών φαίνεται να σημειώνουν μείωση.



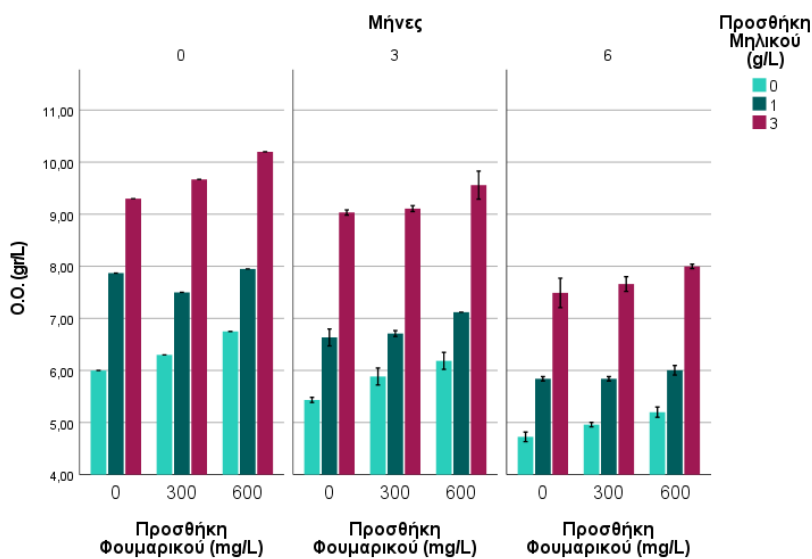
Εικόνα 5. Γράφημα pH σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού οξέος (0, 300 και 600 mg/L) και στην προσθήκη μηλικού οξέος (0, 1 και 3 g/L), στους 0, 3 και 6 μήνες

Στο δεύτερο γράφημα παρουσιάζεται η διαφορά του pH μεταξύ του δείγματος που δεν έχει καμία προσθήκη και των υπολοίπων. Σε κάθε περίπτωση το τυφλό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαφορετικό. Για παράδειγμα στους 3 μήνες χρησιμοποιήσαμε ως τυφλό το δείγμα χωρίς καμία προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος για τα δείγματα με και χωρίς προσθήκη βακτηρίων. Έτσι και στα υπόλοιπα δείγματα. Στο γράφημα δεν έχουμε λάβει υπόψιν τον παράγοντα «βακτήρια» καθώς είδαμε πως δεν επηρέαζαν σημαντικά τις τιμές του pH. Φαίνεται πως η διαφορά μεταξύ των τιμών του pH επηρεάζεται περισσότερο από τις προσθήκες μηλικού οξέος, παρά φουμαρικού. Για παράδειγμα, φαίνεται πως η προσθήκη 1 g/L μηλικού οξέος (14,92 meq/L) μειώνει το pH κατά 0,20, ενώ η προσθήκη 0,6 g/L φουμαρικού (10,28 meq/L) μειώνει το pH κατά 0,10, δηλαδή το μισό. Ταυτόχρονα η διαφορά στο pH που προκαλεί η προσθήκη οξέων, φαίνεται να διατηρείται στο χρόνο.



Εικόνα 6. Γράφημα της μείωσης του pH των δειγμάτων σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος

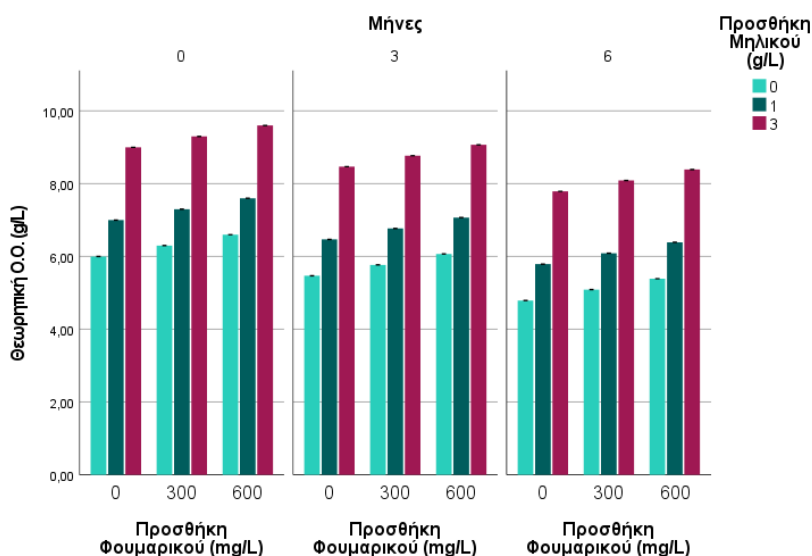
Όσον αφορά τις μετρήσεις της ογκομετρούμενης οξύτητας, φαίνεται να έχουμε αυξανόμενη πορεία όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των οξέων, ενώ παράλληλα οι τιμές της οξύτητας μειώνονται με το πέρασμα του χρόνου. Μεγαλύτερη μείωση της οξύτητας σημειώνεται στα δείγματα των 6 μηνών και συγκεκριμένα σε αυτά με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μηλικού οξέος.



Εικόνα 7. Γράφημα της ογκομετρούμενης οξύτητας σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και οξικού οξέος στους 0, 3 και 6 μήνες

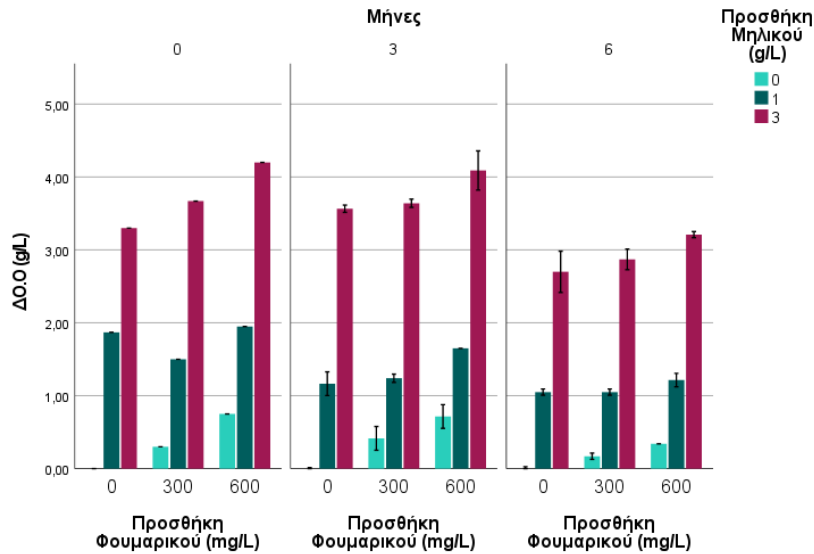
Οι διαφορές μεταξύ των τιμών της θεωρητικής ογκομετρούμενης οξύτητας με την υπολογίσιμη-πραγματική δεν είναι μεγάλες, όπως αποδεικνύεται από το παρακάτω γράφημα. Θεωρητικά οι τιμές σημειώνουν αύξηση όσον αφορά την προσθήκη οξέος και σταδιακή μείωση με το πέρασμα

του χρόνου όπως αποτυπώνεται και στις υπολογίσιμες τιμές, όπου εκεί βέβαια η μείωση είναι μεγαλύτερης κλίμακας.



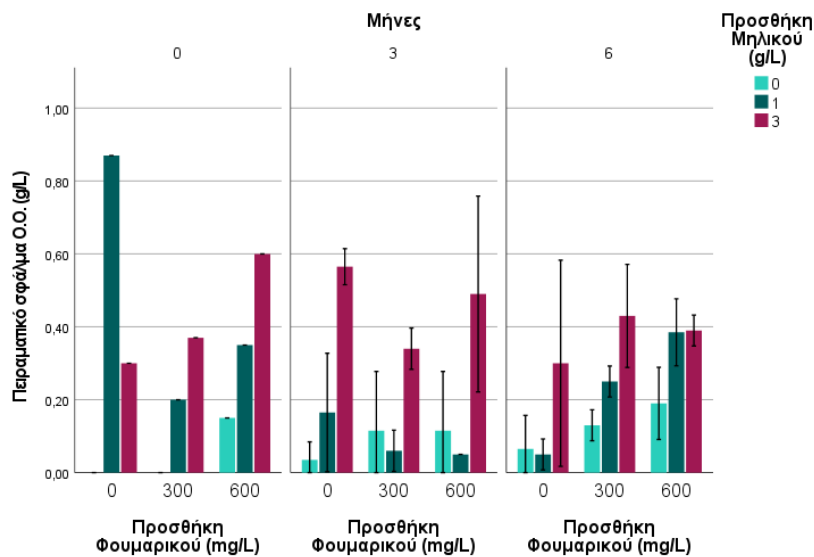
Εικόνα 8. Γράφημα της θεωρητικής ογκομετρούμενης οξύτητας σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και οξικού οξέος στους 0, 3 και 6 μήνες

Στο γράφημα που ακολουθεί απεικονίζεται η διαφορά των τιμών της ογκομετρούμενης οξύτητας μεταξύ των τυφλών δειγμάτων (χωρίς καμία προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος) και των υπόλοιπων. Από το γράφημα αυτό, μετατρέποντας τις προσθήκες οξέων και τις ογκομετρούμενες οξύτητες σε meq/L φαίνεται πως το φουμαρικό οξύ έχει μεγαλύτερη επίδραση από το μηλικό οξύ όσον αφορά την οξύτητα. Συγκεκριμένα, η προσθήκη 300 και 600 mg/L φουμαρικού οξέος που αντιστοιχούν σε 5,14 και 10,28 meq/L προκαλούν αύξηση της ογκομετρούμενης οξύτητας κατά 4,00 και 9,99 meq/L αντίστοιχα. Ενώ η προσθήκη 1 και 3 g/L μηλικού οξέος που αντιστοιχούν σε 14,94 και 44,75 meq/L αυξάνουν την ογκομετρούμενη οξύτητα κατά 24,92 και 43,97 meq/L αντίστοιχα.

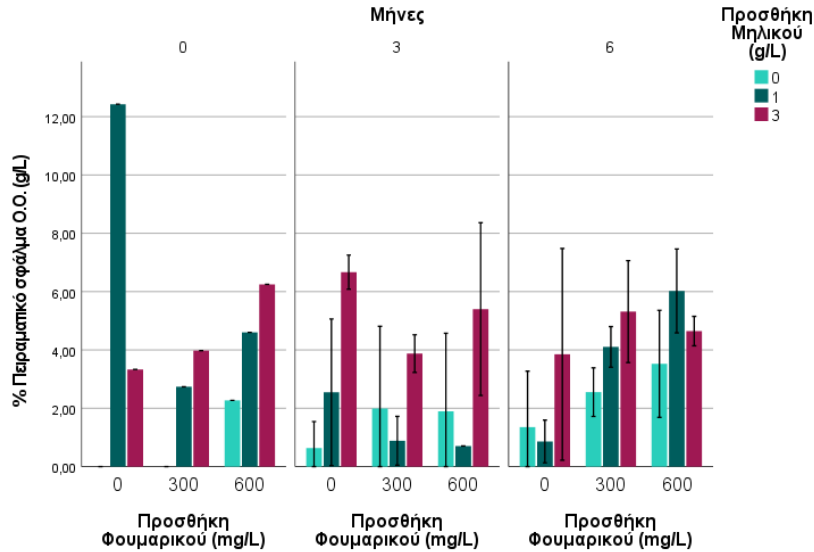


Εικόνα 9. Γράφημα της διαφοράς ογκομετρούμενης οξύτητας σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και οξικού οξέος στους 0, 3 και 6 μήνες

Στα γραφήματα όπου παρουσιάζεται το πειραματικό σφάλμα ογκομέτρησης, συγκρίνεται η θεωρητική τιμή με την πραγματική κάθε δείγματος. Το σφάλμα οφείλεται στη διαφορά μεταξύ του τελικού και του ισοδύναμου σημείου της ογκομέτρησης και όσο μικρότερη η τιμή, τόσο πιο ακριβής η ογκομέτρηση. Η πιο ακριβής μέτρηση φαίνεται να έχει γίνει στις μετρήσεις των 6 μηνών, ενώ στις αναλύσεις τη χρονική στιγμή 0 οι τιμές παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις.



Εικόνα 10. Γράφημα της πειραματικής ογκομετρούμενης οξύτητας σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και οξικού οξέος στους 0, 3 και 6 μήνες

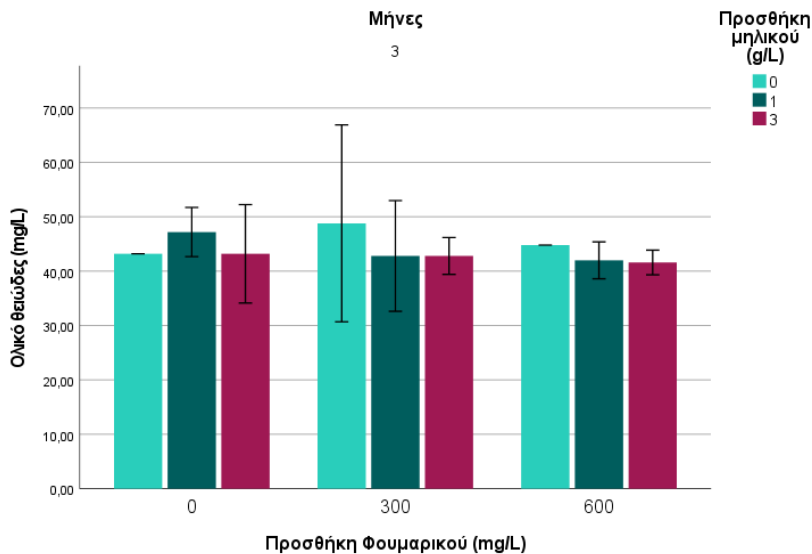


Εικόνα 11. Γράφημα της %πειραματικής ογκομετρούμενης οξύτητας σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και οξικού οξέος στους 0, 3 και 6 μήνες

5.2 Θειώδες

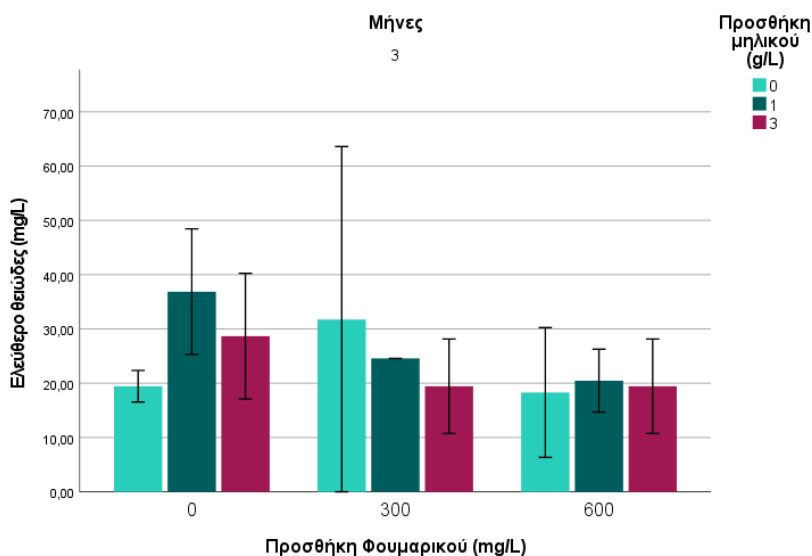
Οι μετρήσεις θειώδους έγιναν στους 3 και 6 μήνες, ωστόσο παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα μόνο των 3 μηνών λόγω λάθους κατά την τιτλοδότηση του διαλύματος I_2 που χρησιμοποιήθηκε για την ογκομέτρηση του SO_2 στις αναλύσεις των 6 μηνών.

Οι τιμές του ολικού θειώδους στους 3 μήνες φαίνεται να είναι μεταξύ 40 και 50 mg/L, παρουσιάζοντας κάποιες διακυμάνσεις οι οποίες είναι φυσιολογικές δεδομένου του περιθωρίου τεχνικού σφάλματος, αλλά και της βιολογικής διακύμανσης των δειγμάτων. Οι τιμές του ολικού θειώδους για τα δείγματα μέγιστης συγκέντρωσης μηλικού οξέος (3 g/L) δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες αποκλίσεις. Ωστόσο το δείγμα με συγκέντρωση φουμαρικού οξέος 300 mg/L και συγκέντρωση μηλικού οξέος 0 g/L παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση όπως φαίνεται στο γράφημα που μπορεί να οφείλεται σε λάθος κατά την μέτρηση του ολικού SO_2 , εφόσον πρόκειται για δείγματα του ίδιου οίνου.



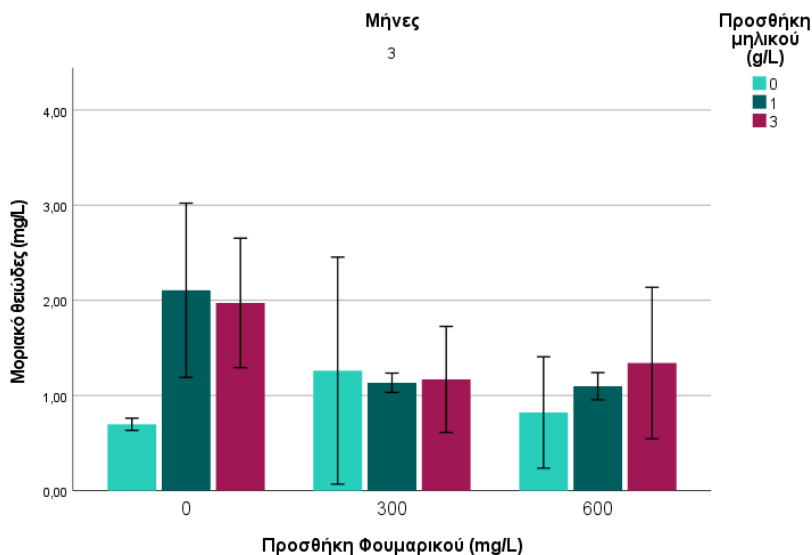
Εικόνα 12. Γράφημα του ολικού θειώδους σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 μήνες

Οι τιμές ελεύθερου SO_2 σε γενικές γραμμές παρουσιάζουν μείωση όσο αυξάνεται η συγκέντρωση φουμαρικού οξέος, εκτός από το δείγμα στο οποίο δεν έχει γίνει προσθήκη κανενός οξέος που παρουσιάζει χαμηλότερη τιμή. Παρατηρείται επίσης μεγάλη διακύμανση του ελεύθερου SO_2 στο δείγμα με προσθήκη 300 mg/L φουμαρικού οξέος, χωρίς προσθήκη μηλικού οξέος, όπως ακριβώς συνέβη και στη μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού SO_2 στο ίδιο δείγμα. Συγκεκριμένα η μέση τιμή που μετρήθηκε ήταν 43,01 mg/L, που διαφέρει σημαντικά από τις υπόλοιπες μετρήσεις. Η υψηλή αυτή τιμή ελεύθερου και ολικού SO_2 (55,20 mg/L) για το συγκεκριμένο δείγμα μπορεί να οφείλονται στην υψηλή θείωση του οίνου σε συνδυασμό με τις συνθήκες φύλαξης του δείγματος.



Εικόνα 13. Γράφημα του ελεύθερου θειώδους σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 μήνες

Έτσι και στο γράφημα του μοριακού SO₂ όσο αυξάνεται η συγκέντρωση φουμαρικού οξέος μειώνεται η συγκέντρωση μοριακού SO₂, ενώ ταυτόχρονα τα δείγματα με συγκεντρώσεις μηλικού 1 και 3 g/L και φουμαρικού 300 και 600 mg/L δεν σημειώνουν σημαντικές αποκλίσεις. Το μοριακό θειώδες είναι η πλέον δραστική μορφή SO₂ καθώς μόνο αυτό μπορεί να περάσει μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες των ζυμομυκήτων και των βακτηρίων, στο εσωτερικό των κυττάρων όπου το pH είναι υψηλό (~ 6). Στο υψηλό αυτό pH, το μοριακό θειώδες μετατρέπεται στο όξινο θειώδες ιόν (HSO₃) το οποίο συνδέεται εύκολα με άλλες ενώσεις, όπως πρωτεΐνες, και θανατώνει τα κύτταρα.



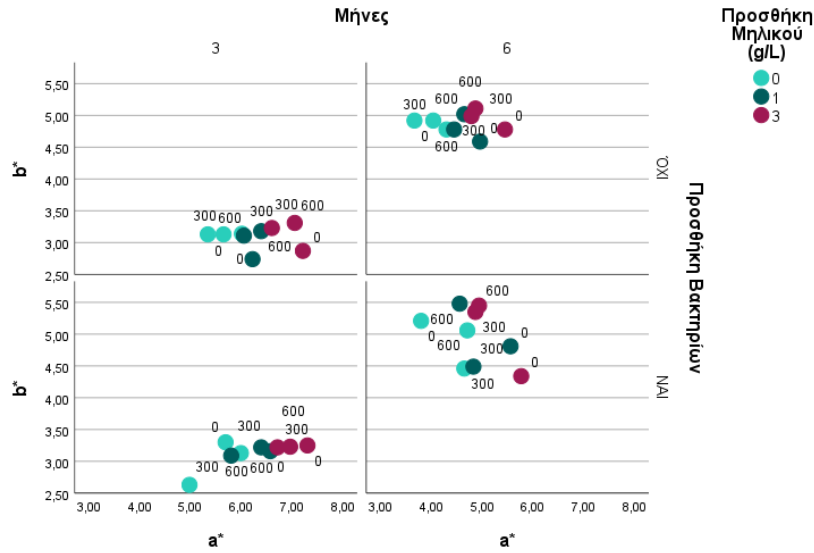
Εικόνα 14. Γράφημα του μοριακού θειώδους σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 μήνες

5.3 CIELab

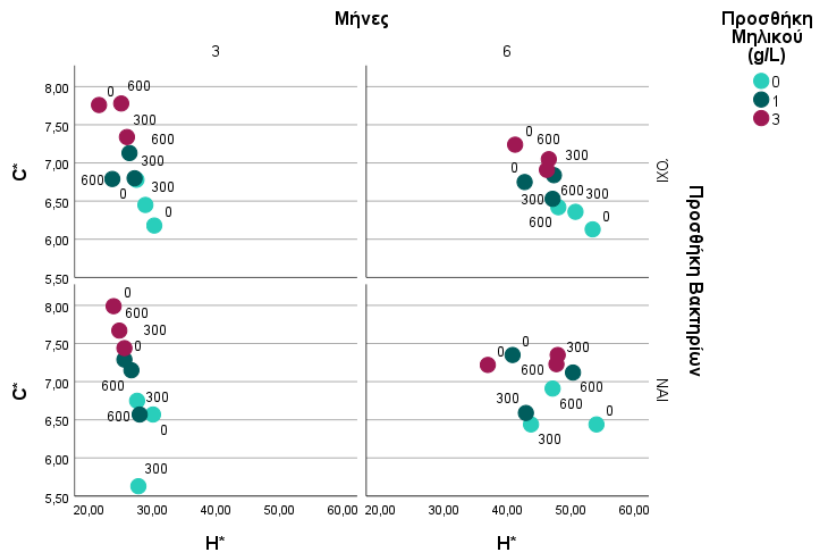
Ο χρωματικός χώρος CIELab χρησιμοποιεί μετρήσεις των τιμών L*, a* και b* ενός χρώματος για να σχεδιάσει τη θέση του σε ένα διάγραμμα που περιέχει έναν άπειρο αριθμό πιθανών χρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων χρωμάτων εκτός του φάσματος του ορατού φωτός. Το L* αντιπροσωπεύει τη φωτεινότητα από το μαύρο στο λευκό σε μια κλίμακα από το 0 έως το 100, ενώ τα a* και b* αντιπροσωπεύουν το χρώμα χωρίς συγκεκριμένα αριθμητικά όρια. Το αρνητικό a* αντιστοιχεί στο πράσινο, το θετικό a* αντιστοιχεί στο κόκκινο, το αρνητικό b* αντιστοιχεί στο μπλε και το θετικό b* αντιστοιχεί στο κίτρινο. Τιμές που αφορούν το χρώμα παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα και είναι όλες θετικές. Τόσο στο γράφημα b*/a*, όσο και στο C*/H* (χρωματική ένταση/χρωματική απόχρωση) προκύπτει ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος στα δείγματα, αυξάνεται και το ποσοστό του κόκκινου χρώματος, δηλαδή τα δείγματα παρουσιάζονται πιο δεξιά στο διάγραμμα. Αυτό αποδεικνύεται και από το γράφημα χρωματικής έντασης σε συνάρτηση με την χρωματική απόχρωση όπου η χρωματική ένταση παρουσιάζει αύξηση και η χρωματική απόχρωση ($A = A_{420}/A_{520}$) μικρή μείωση όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του μηλικού στα δείγματα των 3 μηνών.

Συγκριτικά με τις αναλύσεις των 3 μηνών, τα δείγματα στους 6 μήνες φαίνεται να έχουν κερδίσει αρκετό ποσοστό κίτρινου χρώματος και έχουν χάσει ποσοστό κόκκινου χρώματος, άρα και χρωματική ένταση.

Όσον αφορά τα βακτήρια, στους 6 μήνες δίνουν μια πιο «διάσπαρτη» εικόνα στα αποτελέσματα των αναλύσεων που δεν παρουσιάζεται στα αποτελέσματα των 3 μηνών.

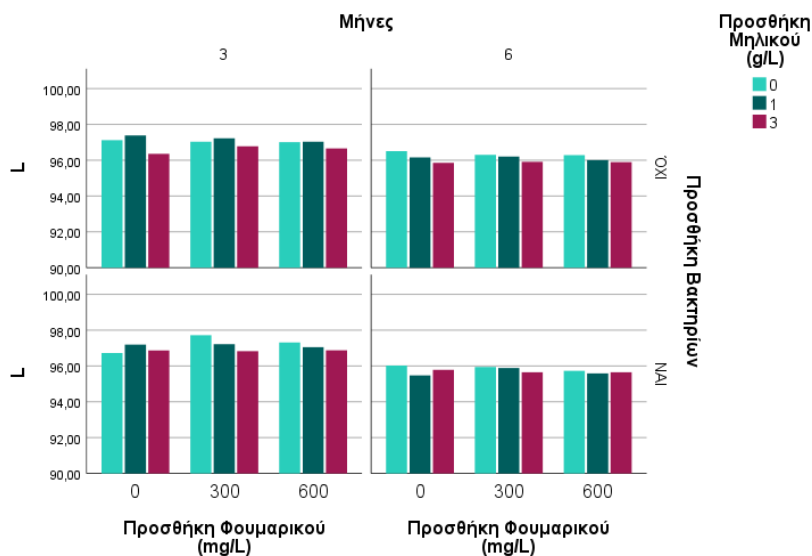


Εικόνα 15. Γράφημα του b^*/a^* σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 και 6 μήνες. Τα διαφορετικά χρώματα υποδεικνύουν τις διαφορετικές συγκεντρώσεις μηλικού οξέος (0, 1 και 3 g/L), ενώ οι αριθμοί πάνω από τις κουκίδες, τις διαφορετικές συγκεντρώσεις φουμαρικού οξέος (0, 300 και 600 mg/L).



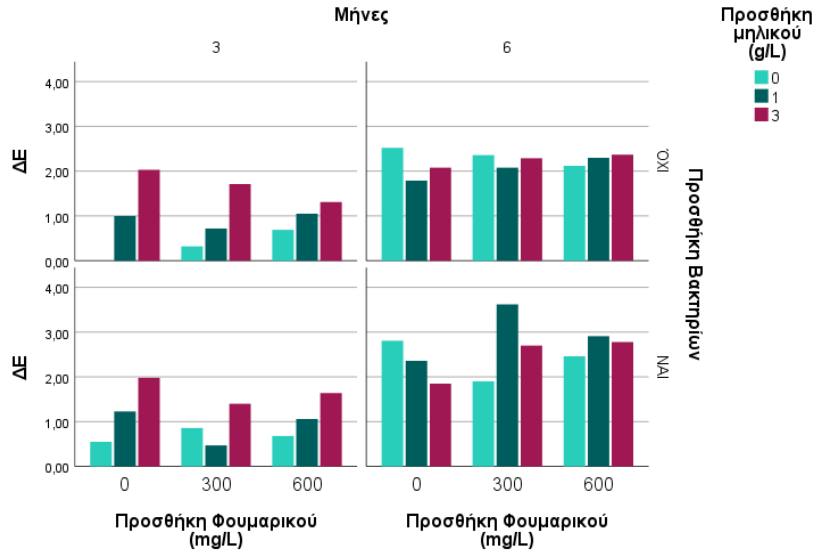
Εικόνα 16. Γράφημα του C^*/H^* σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 και 6 μήνες

Σε γενικές γραμμές, οι τιμές της διαύγεια παρουσιάζουν μείωση όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των οξέων στα δείγματα, δηλαδή όσο μειώνεται το pH, αλλά και όσο αυξάνεται το χρώμα στο χρονικό διάστημα στο οποίο λαμβάνουν χώρα οι αναλύσεις. Τα βακτήρια φαίνεται να έχουν προκαλέσει επιπλέον μείωση της διαύγειας στα δείγματα που αναλύθηκαν στους 6 μήνες.



Εικόνα 17. Γράφημα του L* σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 και 6 μήνες

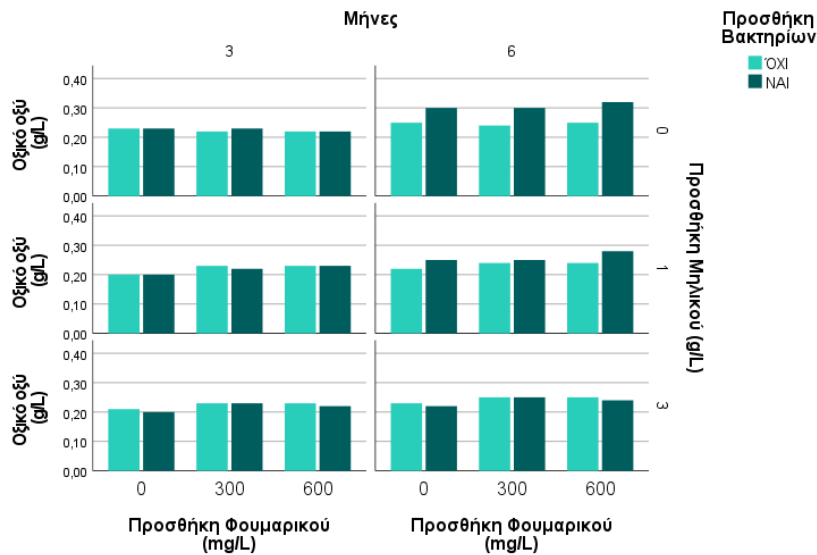
Το ΔΕ είναι η ποσοτικοποίηση της διαφοράς μεταξύ συγκεκριμένων χρωμάτων. Όταν η διαφορά αυτή είναι >2-3 τότε η διαφορά στο χρώμα είναι αισθητή με γυμνό μάτι. Οι τιμές ΔΕ που εκφράζουν τη συνολική χρωματική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων των οίνων είναι μεγαλύτερη στους 6 μήνες όπου αυτή η διαφορά σε αρκετά δείγματα ήταν εμφανής και με γυμνό μάτι. Στις αναλύσεις που πήραν μέρος στους 3 μήνες τα δείγματα με τη μεγαλύτερη διαφορά, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως είναι αυτά με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μηλικού οξέος. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο στα δείγματα που αναλύθηκαν στους 6 μήνες, όπου περίπου τα περισσότερα δείγματα (ιδίως αυτά στα οποία δεν έγινε προσθήκη βακτηρίων) παρουσιάζουν μικρή διακύμανση στις τιμές.



Εικόνα 18. Γράφημα του ΔΕ σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 και 6 μήνες

5.4 Οξικό οξύ

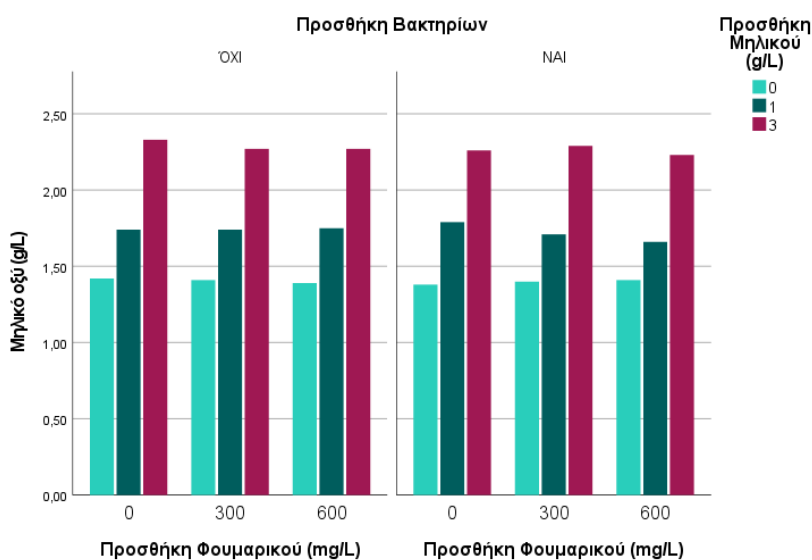
Από το γράφημα στο οποίο παρουσιάζεται η συγκέντρωση οξικού οξέος στα δείγματα, παρατηρείται αύξηση αυτού στους 6 μήνες στα δείγματα εμβολιασμένα με βακτήρια και προσθήκη μηλικού 0 και 1 g/L, ενώ τα δείγματα με προσθήκη μηλικού 3 g/L δεν παρουσιάζουν καμία διακύμανση. Ο ενζυμικός αναλυτής HYPERLAB SMART, όπως αναφέρθηκε ανιχνεύει συγκεντρώσεις οξικού οξέος έως 2 g/L με σφάλμα μεθόδου για το ροζέ κρασί 0,003 έως 0,007 g/L.



Εικόνα 19. Γράφημα συγκέντρωσης οξικού οξέος σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 3 και 6 μήνες

5.5 Μηλικό οξύ

Στο γράφημα του μηλικού οξέος που αναλύθηκε στους 6 μήνες με χρήση του ενζυμικού αναλυτή, προκύπτει ότι το L-μηλικό δεν μεταβλήθηκε παρουσία και μη γαλακτικών βακτηρίων, ενώ όπως είναι λογικό μεγαλύτερες ποσότητες ανιχνεύθηκαν στα δείγματα όπου είχε πραγματοποιηθεί μεγαλύτερη προσθήκη μηλικού οξέος, ίση με 3 g/L. Ταυτόχρονα φαίνεται τα δείγματα στα οποία έχει γίνει προσθήκη βακτηρίων και προσθήκη μηλικού 1 g/L, να παρουσιάζουν μικρή μείωση στη συγκέντρωση μηλικού οξέος που ανιχνεύθηκε, αυξανόμενης της συγκέντρωσης φουμαρικού οξέος. Ωστόσο όπως φαίνεται στο γράφημα η συγκέντρωση που μετρήθηκε στα δείγματα όπου έγινε προσθήκη 3 g/L δεν είναι ίση με 3 g/L καθώς στον ενζυμικό αναλυτή μετρήθηκε μόνο η συγκέντρωση L-μηλικού οξέος στα δείγματα. Τα δείγματα φαίνεται αρχικά να είχαν συγκέντρωση μηλικού οξέος περίπου 1,40 g/L, ενώ κατά την προσθήκη 1 g/L μηλικού (μορφής DL-μηλικού) για παράδειγμα στο δείγμα χωρίς προσθήκη φουμαρικού οξέος η συγκέντρωση που μετρήθηκε ήταν 1,74 g/L μηλικού οξέος. Υπενθυμίζουμε ότι ο ενζυμικός αναλυτής που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της συγκέντρωσης L-μηλικού οξέος έχει ανώτατο όριο ανίχνευσης τα 1,25 g/L και σφάλμα μέτρησης 0,01-0,02 g/L για τους ροζέ οίνους. Το μηλικό που προσθέσαμε είχε 50% περιεκτικότητα L μορφής και 50% D μορφής, ωστόσο η αύξηση δεν ήταν αντίστοιχη, γεγονός το οποίος μπορεί να αποδεικνύει έναρξη δραστηριότητας των γαλακτικών βακτηρίων προς κατανάλωση L-μηλικού οξέος.



Εικόνα 20. Γράφημα συγκέντρωσης μηλικού οξέος σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού και μηλικού οξέος στους 6 μήνες

5.6 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Ταυτόχρονα με την προετοιμασία των δειγμάτων οίνου που αναλύθηκαν σε διάστημα 3 και 6 μηνών, παρασκευάστηκαν και δείγματα του ίδιου οίνου, στα οποία έγινε προσθήκη μόνο φουμαρικού οξέος σε συγκεντρώσεις 300 και 600 mg/L. Τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν οργανοληπτικά από πάνελ 7 δοκιμαστών όσον αφορά τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Σε γενικές γραμμές δεν παρατηρήθηκαν στα δείγματα ιδιαίτερες διαφορές όσον αφορά το αρωματικό προφίλ και καμία διαφορά στο χρώμα των δειγμάτων. Οι περισσότεροι

παρατήρησαν ανθηκά αρώματα, όπως τριαντάφυλλο, λευκά άνθη και νότες εσπεριδοειδών στα δείγματα με προσθήκη 0 και 300 mg/L φουμαρικού, ενώ πιο φρουτώδη αρώματα, κόκκινα φρούτα, φρούτα του δάσους, επικρατούσαν στο δείγμα με συγκέντρωση φουμαρικού 600 mg/L. Ωστόσο η αρωματική ένταση ήταν χαμηλή.

Η διαφορά επίσης της οξύτητας δεν ήταν σημαντική μεταξύ των δειγμάτων, όπως ακριβώς συνέβη και σε τριγωνικές δοκιμές που πραγματοποίησε στην ερευνά του ο Morata et al.,(2020) με δείγματα στα οποία είχε προστεθεί φουμαρικό οξύ σε συγκεντρώσεις 300 και 600 mg/L (Morata et al., 2019, 2020). Το δείγμα με προσθήκη φουμαρικού σε συγκέντρωση 300 mg/L χαρακτηρίστηκε ως ελαφρώς πιο όξινο και στυφό από 2 άτομα, ενώ 3 άτομα χαρακτήρισαν το δείγμα με συγκέντρωση φουμαρικού 600 mg/L ως πιο όξινο και πικρό από τα 3 δείγματα. Ένα άτομο επίσης χαρακτήρισε το δείγμα με προσθήκη φουμαρικού οξέος σε συγκέντρωση 300 mg/L ως πιο τανικό. Η πλειοψηφία δεν βρήκε ιδιαίτερες αποκλίσεις μεταξύ των πρότυπων δειγμάτων, ωστόσο χαρακτήρισαν ως πιο ισορροπημένο το δείγμα στο οποίο είχε γίνει προσθήκη 300 mg/L. τυπων δειγμάτων, ωστόσο χαρακτήρισαν ως πιο ισορροπημένο το δείγμα στο οποίο είχε γίνει προσθήκη 300 mg/L.

6. Συζήτηση

Σε αντίστοιχα πειράματα, όπως το συγκεκριμένο που διενεργήσαμε, παρατηρήθηκε αναστολή ή διακοπή της εξέλιξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης από βακτήρια του γαλακτικού οξέος. Σημαντικές διαφορές επίσης, παρουσιάστηκαν και σε ποιοτικά χαρακτηριστικά των οίνων που αναλύθηκαν, όπως για παράδειγμα στο pH, στην οξύτητα, το χρώμα.

Στη μέτρηση pH, η διαφορά μεταξύ των τιμών που παρουσιάζει το δείγμα χωρίς καμία προσθήκη οξέος, με το δείγμα στο οποίο η προσθήκη φουμαρικού ήταν της τάξης των 600 mg/L φαίνεται να είναι $\approx 0,10$. Σύμφωνα με αντίστοιχο πείραμα που πραγματοποίησαν οι Morata et al., οι ερευνητές παρατήρησαν επίσης μείωση του pH κατά 0,10 με την ίδια προσθήκη φουμαρικού οξέος. Το ποσοστό βέβαια της μείωσης, εξαρτάται και από την ρυθμιστική ικανότητα του οίνου που αναλύεται. Οι χαμηλότερες τιμές pH μπορεί να οφείλονται τόσο στην οξίνιση από την προσθήκη φουμαρικού οξέος, όσο και μηλικού οξέος, ή και διατήρησης της οξύτητας του μηλικού λόγω μη διενέργειας της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Στο χρονικό διάστημα από 0 έως και 3 μήνες οι αναλύσεις του γαλακτικού οξέος που έγιναν με τη βοήθεια ενζυμικού αναλυτή (τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παράρτημα) αποδεικνύουν πως δεν παρατηρήθηκε καμία δραστηριότητα μεταβολισμού του μηλικού οξέος όπως ακριβώς συνέβη στην έρευνα των Morata et al. Παρ' όλα αυτά ενώ το pH φαίνεται να μειώνεται από τους 0 στους 3 μήνες, το ίδιο παρατηρείται και με την ογκομετρούμενη οξύτητα το οποίο δεν είναι λογικό. Το pH ισοδυναμεί με τον αρνητικό λογάριθμο της συγκέντρωσης των διαλυμένων υδρογονοϊόντων (H^+) σε ένα διάλυμα, άρα η σχέση ογκομετρούμενης οξύτητας και pH είναι αντιστρόφως ανάλογη. Η χρήση διαφορετικού οργάνου μέτρησης pH (πεχαμέτρου) στους 3 και στους 6 μήνες μπορεί να ευθύνεται για τα αποτελέσματα αυτά.

Όπως προαναφέρθηκε τα αποτελέσματα των αναλύσεων για τις μορφές θειώδους στα δείγματα οίνου παρουσιάζονται μόνο για τους 3 μήνες. Το pH του μέσου μετατοπίζει τις ισορροπίες του SO_2 και συγκεκριμένα σε χαμηλό pH προάγονται υψηλότερα επίπεδα μοριακού SO_2 , γεγονός το οποίο συναντάται στα δείγματα που αναλύσαμε όσον αφορά τις προσθήκες μηλικού οξέος, δηλαδή τα δείγματα στα οποία η προσθήκη μηλικού ήταν ίση με 3 g/L παρουσιάζουν υψηλότερη ποσότητα μοριακού SO_2 σε σχέση με αυτά στα οποία η προσθήκη ήταν μηδενική ή ίση με 1 g/L. Ωστόσο το δείγμα στο οποίο δεν έγινε καμία προσθήκη οξέος, πράγματι παρουσιάζει τη χαμηλότερη συγκέντρωση μοριακού θειώδους, που σημαίνει ότι θα είναι πιο ευαίσθητο σε οξειδώσεις και μικροβιακές αλλοιώσεις. Συγκέντρωση μοριακού θειώδους ίση με 0,5-0,8 mg/L είναι ικανή για να εμποδίσει την δραστηριότητα βακτηρίων (Hidalgo, 2018). Τιμές μικρότερες από αυτή τη συγκέντρωση μετρήθηκαν στις αναλύσεις των 6 μηνών, όπου είναι πιθανό να σημειώθηκε δραστηριότητα των βακτηρίων. Όσον αφορά τη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος, δεν φαίνεται οι αυξημένες συγκεντρώσεις του στα δείγματα να έχουν αυξήσει και τα επίπεδα μοριακού SO_2 στα δείγματα, όπως θα περιμέναμε λόγω της τάσης του να αυξάνει την οξύτητα του μέσου στο οποίο προστίθεται.

Σε οίνους με χαμηλό pH το ελεύθερο θειώδες σε συγκεντρώσεις 10-20 mg/L είναι ικανό να διακόψει τη μηλογαλακτική ζύμωση. Το επίπεδο ελεύθερου θειώδους που μετρήσαμε στους 3 μήνες στο δείγμα που δεν είχε καμία προσθήκη οξέος, είναι 20,48 mg/L, άρα ικανό να καθυστερήσει τη μηλογαλακτική ζύμωση, αλλά όχι απαραίτητα να τη διακόψει καθώς το ελεύθερο SO_2 μπορεί να συνδεθεί με μόρια μακροπρόθεσμα, μειώνοντας την ανασταλτική του δράση, σε αντίθεση με το φουμαρικό οξύ το οποίο είναι πολύ πιο σταθερό. Όσο αυξάνονταν η

συγκέντρωση του φουμαρικού, τα δείγματα (ανεξάρτητα την συγκέντρωση μηλικού) παρουσίαζαν μικρότερες αποκλίσεις στη συγκέντρωση του ελεύθερου SO₂. Στα δείγματά μας φαίνεται η προσθήκη οξέων, ιδιαίτερα η προσθήκη μηλικού οξέος, να αυξάνει το ποσοστό κόκκινου χρώματος στα δείγματα και την χρωματική ένταση γεγονός που παρατήρησαν και οι Morata et al., (Morata et al., 2019) και επαληθεύεται από προσθήκες οξέων που έγιναν σε άχρωμα υδροαλκοολικά διαλύματα που αναφέρονται στην ερευνά τους. Μετά το πέρας όμως των 6 μηνών η χρωματική ένταση των δειγμάτων με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μηλικού οξέος μειώνεται, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η χρωματική απόχρωση, δηλαδή η ποσότητα του κίτρινου στα δείγματα, διαφορά που ήταν εμφανής με γυμνό μάτι και μπορεί να οφείλεται σε οξείδωση των δειγμάτων. Επίσης, μπορεί να οφείλεται στην μικρή αύξηση που σημείωσε το pH, το οποίο επηρεάζει την χρωματική ένταση και συγκεκριμένα την μειώνει όσο αυξάνεται, όπως συμβαίνει κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση. Έρευνες έχουν δείξει επίσης πως για την απώλεια του χρώματος στους οίνους μπορεί να οφείλονται και τα ίδια τα γαλακτικά βακτήρια (Benito et al., 2011; Burns & Osborne, 2013; Dev & Anu-Appaiah, 2020; Devi et al., 2020), μέσω του μεταβολισμού της ακεταλδεΐδης. Η ακεταλδεΐδη είναι ζωτικής σημασίας για το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση του χρώματος του οίνου. Διαφορετικά στελέχη βακτηρίων μπορούν να απορροφούν γλυκοζίτες ανθοκυανών και να παράγουν ένζυμα β-γλυκοζιδάσης τα οποία διασπούν τους γλυκοζυτικούς δεσμούς των ανθοκυανών (Virdis et al., 2021.).

Μετά το πέρας όμως των 6 μηνών η χρωματική ένταση των δειγμάτων με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μηλικού οξέος μειώνεται, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η χρωματική απόχρωση, δηλαδή η ποσότητα του κίτρινου στα δείγματα, διαφορά που ήταν εμφανής με γυμνό μάτι και μπορεί να οφείλεται σε οξείδωση των δειγμάτων (Virdis et al., 2021).

7. Συμπεράσματα

Στο παρόν πείραμα εξετάστηκε η χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων φουμαρικού οξέος ως ανασταλτικός παράγοντας της εξέλιξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης, σε δείγματα ροζέ οίνου της ποικιλίας «Αγιωρίτικο» στα οποία προστέθηκε επίσης μηλικό οξύ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και ακολούθησε εμβολιασμός τους με γαλακτικά βακτήρια *O. oeni*. Ακολούθησαν βασικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στον οίνο σε διάστημα 3 και 6 μηνών από την προετοιμασία των δειγμάτων. Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήσαμε τα πρωτόκολλα ανάλυσης του OIV.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται να μην έχει διενεργηθεί η μηλογαλακτική ζύμωση έως τώρα. Ενδιαφέρον ωστόσο θα είχε τα δείγματα να εξεταστούν και μετά το πέρας μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος, ώστε να παρατηρηθεί η δράση των γαλακτικών βακτηρίων. Η διαφορά στην αλλαγή του χρώματος, η μείωση της ογκομετρούμενης οξύτητας και η μικρή αύξηση της συγκέντρωσης οξικού οξέος στα δείγματα εμβολιασμένα με γαλακτικά βακτήρια μπορεί να υποδεικνύουν την αρχή της έναρξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αν για παράδειγμα πάρουμε το δείγμα με τις μέγιστες συγκεντρώσεις οξέων (600 mg/L φουμαρικού οξέος και 3 g/L μηλικού οξέος), οι τιμές του χρώματος, της ογκομετρούμενης οξύτητας και της συγκέντρωσης του οξικού οξέος παρουσιάζουν αντίστοιχα τις εξής διακυμάνσεις μεταξύ των 3 και 6 μηνών: χρώμα από 7,67 μείωση σε 7,35, ογκομετρούμενη οξύτητα από 9,75 g/L εκφρασμένα σε τρυγικό οξύ μείωση σε 7,97 g/L και συγκέντρωση οξικού οξέος από 0,22 g/L αύξηση σε 0,24 g/L. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις SO₂ που είχε αρχικά ο οίνος μπορεί να αποτελεί έναν από τους κυριότερους

παράγοντες που εμπόδισαν τη διενέργεια της μηλογαλακτικής ακόμα και στα δείγματα όπου δεν είχε γίνει καμία προσθήκη φουμαρικού οξέος. Όσον αφορά τη χρήση φουμαρικού, φαίνεται να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσω οξίνισης ειδικότερα σε περιοχές που επικρατούν υψηλότερες θερμοκρασίες, για διατήρηση της φρεσκάδας και της τραγανότητας των οίνων. Απαιτείται, όπως αποδείχθηκε, πολύ μικρή ποσότητα για να μειώσει του pH, ενώ ταυτόχρονα οργανοληπτικά το κρασί δεν μεταβάλλεται σημαντικά. Στη μηλογαλακτική ζύμωση επίσης δρα ως ανασταλτικός παράγοντας δημιουργώντας πιο σταθερούς δεσμούς, και έτσι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική μέθοδος της χρήσης SO₂, το οποίο απογυμνώνει αρωματικά τους οίνους (Guzzo et al., 2000).

Βιβλιογραφία

- Bauer, R., & Dicks, L. M. T. (2004). *Control of Malolactic Fermentation in Wine. A Review*.
- Benito, S., Morata, A., Palomero, F., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2011). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. *Food Chemistry*, *124*(1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.05.096>
- Burns, T. R., & Osborne, J. P. (2013). Impact of malolactic fermentation on the color and color stability of pinot noir and Merlot wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *64*(3), 370–377. <https://doi.org/10.5344/AJEV.2013.13001>
- Camarasa, C., Grivet, J. P., & Dequin, S. (2003). Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways of succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology*, *149*(9), 2669–2678. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.26007-0/CITE/REFWORKS>
- Dev, A., & Anu-Appaiah, K. A. (2020). Yeast–Bacterial Interactions during Malolactic Inoculations Affecting Anthocyanin Adsorption and Content in Shiraz Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *71*(2), 105–113. <https://doi.org/10.5344/AJEV.2019.19033>
- Devi, A., Konerira Aiyappaa, A. A., & Waterhouse, A. L. (2020). Adsorption and biotransformation of anthocyanin glucosides and quercetin glycosides by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* in model wine solution. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(5), 2110–2120. <https://doi.org/10.1002/JSFA.10234>
- *FAO-WHO. Codex Alimentarius. 2015*. Retrieved May 15, 2023, from https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fshared%2BDocuments%252FArchive%252FMeetings%252FCCFA%252Fccfa47%252Ffa47_10s.pdf
- Fernández-Vázquez, D., Rozès, N., Canals, J. M., Bordons, A., Reguant, C., & Zamora, F. (2021). New enzymatic method for estimating fumaric acid in wines. *Oeno One*, *55*(3), 273–281. <https://doi.org/10.20870/OENO-ONE.2021.55.3.4825>
- Gancel, A. L., Payan, C., Koltunova, T., Jourdes, M., Christmann, M., & Teissedre, P. L. (2022). Solubility, acidifying power and sensory properties of fumaric acid in water, hydro-alcoholic solutions, musts and wines compared to tartaric, malic, lactic and citric acids. *Oeno One*, *56*(3), 137–154. <https://doi.org/10.20870/oenone.2022.56.3.5455>
- Guzzo, J., Jobin, M. P., Delmas, F., Fortier, L. C., Garmyn, D., Tourdot-Maréchal, R., Lee, B., & Diviès, C. (2000). Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *International Journal of Food Microbiology*, *55*(1–3), 27–31. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00209-9)
- Hidalgo Togados, J. (2018). *Tratado de Enología* (Ediciones Mundi-Prensa, Ed.; 3a edición).
- <https://www.oiv.int/public/medias/8084/en-oiv-oenone-581a-2021.pdf>. Retrieved May 15, 2023, from <https://www.oiv.int/public/medias/8084/en-oiv-oenone-581a-2021.pdf>

- Krieger-Weber, S., Heras, J. M., & Suarez, C. (2020). Lactobacillus plantarum, a new biological tool to control malolactic fermentation: A review and an outlook. In *Beverages* (Vol. 6, Issue 2, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/beverages6020023>
- 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), 16. <https://doi.org/10.3390/beverages9010016>
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1684574>
- Morata, A., Escott, C., Bañuelos, M. A., Loira, I., Manuel Del Fresno, J., González, C., & Antonio Suárez-Lepe, J., *biomolecules Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to Wine Freshness. A Review*. <https://doi.org/10.3390/biom10010034>
- Pilone, G. J., Rankine, B. C., & Pilone, D. A. (1974). *Respectively Fulbright Postdoctorate Fellow, Officer in charge of Technical Services, and Technical Officer, The Australian Wine Research Institute*.
- Robinson, J., Harding, J., & Vouillamoz, J. (2013). *Wine Grapes: A complete guide to 1,368 vine varieties, including their origins and flavours*. Penguin Books Limited.
- Ugliano, M., & Moio, L. (2005). Changes in the Concentration of Yeast-Derived Volatile Compounds of Red Wine during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of Oenococcus oeni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10134–10139. <https://doi.org/10.1021/JF0514672>
- Vigne, D. LA, & Vin, D. *INTERNATIONAL CODE OF OENOLOGICAL PRACTICES ORGANISATION INTERNATIONALE*.
- Viridis, C., Sumbly, K., Bartowsky, E., & Jiranek, V. (2021). Lactic Acid Bacteria in Wine: Technological Advances and Evaluation of Their Functional Role. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612118>
- 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>
- Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry*. John Wiley & Sons.
- Σταύρακας Ευστ. Δημήτριος. (2015). *Αμπελογραφία* (2nd edition). Ζήτη.
- Τσακίρης, Α. (2008). *Οινολογία από το σταφύλι στο κρασί*. Ψύχαλος.

Παράρτημα

Δείγμα	Μοσχοφίλερο	Κωδικός	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Προσθήκη Φουμαρικού (meq/L)	Προσθήκη Μηλικού (g/L)	Προσθήκη Μηλικού (meq/L)	Προσθήκη Βακτηρίων	Μήνες
2	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_0_C_3	0	0,00	0	0,00	ΌΧΙ	0
3	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_0_C_3	300	5,14	0	0,00	ΌΧΙ	0
4	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_0_C_3	600	10,28	0	0,00	ΌΧΙ	0
5	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_1_C_3	0	0,00	1	14,92	ΌΧΙ	0
6	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_1_C_3	300	5,14	1	14,92	ΌΧΙ	0
7	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_1_C_3	600	10,28	1	14,92	ΌΧΙ	0
8	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_3_C_3	0	0,00	3	44,75	ΌΧΙ	0
9	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_3_C_3	300	5,14	3	44,75	ΌΧΙ	0
10	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_3_C_3	600	10,28	3	44,75	ΌΧΙ	0
11	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_0_O_3	0	0,00	0	0,00	ΝΑΙ	0
12	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_0_O_3	300	5,14	0	0,00	ΝΑΙ	0
13	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_0_O_3	600	10,28	0	0,00	ΝΑΙ	0
14	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_1_O_3	0	0,00	1	14,92	ΝΑΙ	0
15	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_1_O_3	300	5,14	1	14,92	ΝΑΙ	0
16	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_1_O_3	600	10,28	1	14,92	ΝΑΙ	0
17	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_3_O_3	0	0,00	3	44,75	ΝΑΙ	0
18	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_3_O_3	300	5,14	3	44,75	ΝΑΙ	0
19	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_3_O_3	600	10,28	3	44,75	ΝΑΙ	0
20	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_0_C_6	0	0,00	0	0,00	ΌΧΙ	0
21	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_0_C_6	300	5,14	0	0,00	ΌΧΙ	0
22	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_0_C_6	600	10,28	0	0,00	ΌΧΙ	0
23	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_1_C_6	0	0,00	1	14,92	ΌΧΙ	0
24	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_1_C_6	300	5,14	1	14,92	ΌΧΙ	0
25	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_1_C_6	600	10,28	1	14,92	ΌΧΙ	0
26	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_3_C_6	0	0,00	3	44,75	ΌΧΙ	0
27	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_3_C_6	300	5,14	3	44,75	ΌΧΙ	0
28	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_3_C_6	600	10,28	3	44,75	ΌΧΙ	0
29	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_0_O_6	0	0,00	0	0,00	ΝΑΙ	0
30	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_0_O_6	300	5,14	0	0,00	ΝΑΙ	0
31	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_0_O_6	600	10,28	0	0,00	ΝΑΙ	0
32	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_1_O_6	0	0,00	1	14,92	ΝΑΙ	0
33	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_1_O_6	300	5,14	1	14,92	ΝΑΙ	0
34	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_1_O_6	600	10,28	1	14,92	ΝΑΙ	0
35	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_3_O_6	0	0,00	3	44,75	ΝΑΙ	0
36	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_3_O_6	300	5,14	3	44,75	ΝΑΙ	0
37	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_3_O_6	600	10,28	3	44,75	ΝΑΙ	0
2	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_0_C_3	0	0,00	0	0,00	ΌΧΙ	3
3	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_0_C_3	300	5,14	0	0,00	ΌΧΙ	3
4	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_0_C_3	600	10,28	0	0,00	ΌΧΙ	3
5	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_1_C_3	0	0,00	1	14,92	ΌΧΙ	3
6	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_1_C_3	300	5,14	1	14,92	ΌΧΙ	3
7	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_1_C_3	600	10,28	1	14,92	ΌΧΙ	3
8	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_3_C_3	0	0,00	3	44,75	ΌΧΙ	3
9	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_3_C_3	300	5,14	3	44,75	ΌΧΙ	3
10	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_3_C_3	600	10,28	3	44,75	ΌΧΙ	3
11	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_0_O_3	0	0,00	0	0,00	ΝΑΙ	3
12	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_0_O_3	300	5,14	0	0,00	ΝΑΙ	3
13	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_0_O_3	600	10,28	0	0,00	ΝΑΙ	3
14	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_1_O_3	0	0,00	1	14,92	ΝΑΙ	3
15	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_1_O_3	300	5,14	1	14,92	ΝΑΙ	3
16	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_1_O_3	600	10,28	1	14,92	ΝΑΙ	3
17	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_3_O_3	0	0,00	3	44,75	ΝΑΙ	3
18	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_3_O_3	300	5,14	3	44,75	ΝΑΙ	3
19	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_3_O_3	600	10,28	3	44,75	ΝΑΙ	3
20	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_0_C_6	0	0,00	0	0,00	ΌΧΙ	6
21	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_0_C_6	300	5,14	0	0,00	ΌΧΙ	6
22	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_0_C_6	600	10,28	0	0,00	ΌΧΙ	6
23	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_1_C_6	0	0,00	1	14,92	ΌΧΙ	6
24	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_1_C_6	300	5,14	1	14,92	ΌΧΙ	6
25	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_1_C_6	600	10,28	1	14,92	ΌΧΙ	6
26	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_3_C_6	0	0,00	3	44,75	ΌΧΙ	6
27	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_3_C_6	300	5,14	3	44,75	ΌΧΙ	6
28	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_3_C_6	600	10,28	3	44,75	ΌΧΙ	6
29	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_0_O_6	0	0,00	0	0,00	ΝΑΙ	6
30	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_0_O_6	300	5,14	0	0,00	ΝΑΙ	6
31	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_0_O_6	600	10,28	0	0,00	ΝΑΙ	6
32	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_1_O_6	0	0,00	1	14,92	ΝΑΙ	6
33	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_1_O_6	300	5,14	1	14,92	ΝΑΙ	6
34	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_1_O_6	600	10,28	1	14,92	ΝΑΙ	6
35	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_3_O_6	0	0,00	3	44,75	ΝΑΙ	6
36	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_3_O_6	300	5,14	3	44,75	ΝΑΙ	6
37	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_3_O_6	600	10,28	3	44,75	ΝΑΙ	6

Μήνες	Ο.Ο. (gr/L)	Ο.Ο. (meq/L)	Θεωρητική Ο.Ο. (meq/L)	Πειραματικό σφάλμα Ο.Ο. (meq/L)	% Πειραματικό σφάλμα Ο.Ο. (meq/L)	pH	Διαφορά Ο.Ο (g/L)	Διαφορά Ο.Ο. (meq/L)	Διαφορά pH
0	6,00	79,95	79,95	0,00	0,00	3,45	0,00	0,00	0,00
0	6,30	83,95	85,09	1,14	1,34	3,40	0,30	4,00	0,05
0	6,75	89,95	90,23	0,29	2,28	3,34	0,75	9,99	0,11
0	7,87	104,87	94,87	10,00	12,44	3,25	1,87	24,92	0,20
0	7,50	99,94	100,01	0,07	2,74	3,33	1,50	19,99	0,12
0	7,95	105,94	105,15	0,78	4,62	3,28	1,95	25,98	0,17
0	9,30	123,93	124,70	0,78	3,34	3,12	3,30	43,97	0,33
0	9,67	128,86	129,84	0,99	3,98	3,23	3,67	48,90	0,22
0	10,20	135,92	134,98	0,94	6,26	3,18	4,20	55,97	0,27
0	6,00	79,95	79,95	0,00	0,00	3,45	0,00	0,00	0,00
0	6,30	83,95	85,09	1,14	1,34	3,40	0,30	4,00	0,05
0	6,75	89,95	90,23	0,29	2,28	3,34	0,75	9,99	0,11
0	7,87	104,87	94,87	10,00	12,44	3,25	1,87	24,92	0,20
0	7,50	99,94	100,01	0,07	2,74	3,33	1,50	19,99	0,12
0	7,95	105,94	105,15	0,78	4,62	3,28	1,95	25,98	0,17
0	9,30	123,93	124,70	0,78	3,34	3,12	3,30	43,97	0,33
0	9,67	128,86	129,84	0,99	3,98	3,23	3,67	48,90	0,22
0	10,20	135,92	134,98	0,94	6,26	3,18	4,20	55,97	0,27
0	6,00	79,95	79,95	0,00	0,00	3,45	0,00	0,00	0,00
0	6,30	83,95	85,09	1,14	1,34	3,40	0,30	4,00	0,05
0	6,75	89,95	90,23	0,29	2,28	3,34	0,75	9,99	0,11
0	7,87	104,87	94,87	10,00	12,44	3,25	1,87	24,92	0,20
0	7,50	99,94	100,01	0,07	2,74	3,33	1,50	19,99	0,12
0	7,95	105,94	105,15	0,78	4,62	3,28	1,95	25,98	0,17
0	9,30	123,93	124,70	0,78	3,34	3,12	3,30	43,97	0,33
0	9,67	128,86	129,84	0,99	3,98	3,23	3,67	48,90	0,22
0	10,20	135,92	134,98	0,94	6,26	3,18	4,20	55,97	0,27
0	6,00	79,95	79,95	0,00	0,00	3,45	0,00	0,00	0,00
0	6,30	83,95	85,09	1,14	1,34	3,40	0,30	4,00	0,05
0	6,75	89,95	90,23	0,29	2,28	3,34	0,75	9,99	0,11
0	7,87	104,87	94,87	10,00	12,44	3,25	1,87	24,92	0,20
0	7,50	99,94	100,01	0,07	2,74	3,33	1,50	19,99	0,12
0	7,95	105,94	105,15	0,78	4,62	3,28	1,95	25,98	0,17
0	9,30	123,93	124,70	0,78	3,34	3,12	3,30	43,97	0,33
0	9,67	128,86	129,84	0,99	3,98	3,23	3,67	48,90	0,22
0	10,20	135,92	134,98	0,94	6,26	3,18	4,20	55,97	0,27
3	5,47	72,89	72,89	0,00	0,00	3,25	0,00	0,00	0,00
3	6,00	79,95	78,03	1,92	3,98	3,18	0,53	7,06	0,07
3	6,07	80,88	83,17	2,28	0,01	3,15	0,60	8,00	0,10
3	6,75	89,95	87,81	2,14	4,33	3,01	1,28	17,06	0,24
3	6,67	88,88	92,95	4,07	4,38	3,11	1,20	15,99	0,14
3	7,12	94,88	98,09	3,21	0,72	3,03	1,65	21,99	0,22
3	9,07	120,86	117,64	3,22	7,09	2,95	3,60	47,97	0,30
3	9,07	120,86	122,78	1,92	3,42	3,01	3,60	47,97	0,24
3	9,37	124,86	127,92	3,06	3,32	2,97	3,90	51,97	0,28
3	5,40	71,96	71,96	0,00	0,00	3,23	-0,07	0,00	0,00
3	5,77	76,89	77,10	0,93	1,22	3,20	0,30	4,93	0,03
3	6,30	83,95	82,24	1,71	3,80	3,13	0,83	11,99	0,10
3	6,52	86,88	86,88	0,00	0,78	3,05	1,05	14,92	0,18
3	6,75	89,95	92,02	0,67	0,75	3,14	1,28	17,99	0,09
3	7,12	94,88	97,16	2,28	0,72	3,08	1,65	22,92	0,15
3	9,00	119,93	116,71	3,22	6,26	2,93	3,53	47,97	0,30
3	9,15	121,93	121,85	0,08	4,34	3,00	3,68	49,97	0,23
3	9,75	129,92	126,99	2,94	7,51	2,92	4,28	57,97	0,31
6	4,79	63,83	63,83	0,00	0,00	3,26	0,00	0,00	0,00
6	4,93	65,69	68,97	3,27	4,75	3,31	0,14	1,87	0,05
6	5,27	70,22	74,11	3,88	5,24	3,22	0,34	6,40	0,04
6	5,87	78,22	78,75	1,07	1,39	3,12	1,08	14,39	0,14
6	5,87	78,22	83,89	5,67	6,76	3,18	1,08	14,39	0,08
6	5,94	79,15	89,03	9,88	11,09	3,13	1,15	15,32	0,13
6	7,69	102,47	108,58	6,11	5,62	2,98	2,90	38,64	0,28
6	7,76	103,40	113,72	10,31	9,07	3,05	2,97	39,58	0,21
6	8,03	107,00	118,86	11,86	9,97	3,02	3,24	43,17	0,24
6	4,66	62,10	62,10	0,00	0,00	3,35	-0,13	0,00	0,00
6	4,99	66,49	67,24	0,40	0,60	3,27	0,20	4,40	0,08
6	5,13	68,36	72,38	4,02	5,55	3,21	0,34	6,26	0,14
6	5,81	77,42	77,02	2,00	2,66	3,08	1,02	15,32	0,27
6	5,81	77,42	82,16	4,74	5,76	3,17	1,02	15,32	0,18
6	6,07	80,88	87,30	6,41	7,34	3,15	1,28	18,79	0,20
6	7,29	97,14	106,85	9,70	9,08	2,98	2,50	35,05	0,37
6	7,56	100,74	111,99	11,25	10,04	3,07	2,77	38,64	0,28
6	7,97	106,20	117,13	10,92	9,33	3,03	3,18	44,11	0,32

Δείγμα	Μοσχοφίλερο	Κωδικός	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Προσθήκη Φουμαρικού (meq/L)	Προσθήκη Μηλικού (g/L)	Προσθήκη μηλικού (meq/L)	Προσθήκη Βακτηρίων	Μήνες
2	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_0_C_3	0	0,00	0	0,00	OXI	3
3	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_0_C_3	300	5,14	0	0,00	OXI	3
4	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_0_C_3	600	10,28	0	0,00	OXI	3
5	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_1_C_3	0	0,00	1	14,92	OXI	3
6	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_1_C_3	300	5,14	1	14,92	OXI	3
7	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_1_C_3	600	10,28	1	14,92	OXI	3
8	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_3_C_3	0	0,00	3	44,75	OXI	3
9	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_3_C_3	300	5,14	3	44,75	OXI	3
10	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_3_C_3	600	10,28	3	44,75	OXI	3
11	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_0_O_3	0	0,00	0	0,00	NAI	3
12	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_0_O_3	300	5,14	0	0,00	NAI	3
13	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_0_O_3	600	10,28	0	0,00	NAI	3
14	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_1_O_3	0	0,00	1	14,92	NAI	3
15	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_1_O_3	300	5,14	1	14,92	NAI	3
16	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_1_O_3	600	10,28	1	14,92	NAI	3
17	ΠΑΔΑ	ROZ1_000_3_O_3	0	0,00	3	44,75	NAI	3
18	ΠΑΔΑ	ROZ1_300_3_O_3	300	5,14	3	44,75	NAI	3
19	ΠΑΔΑ	ROZ1_600_3_O_3	600	10,28	3	44,75	NAI	3

Ποσότητα (mL)	Ελεύθερο SO ₂ (mg/L)	Όξινο SO ₂ (mg/L)	Όλικο SO ₂ (mg/L)	Ελεύθερο SO ₂ (mg/L)	Ελεύθερο SO ₂ (mg/L)	Δεσμευμένο SO ₂ (mg/L)	Μοριακό SO ₂ (mg/L)	
500	<15	1	40,0/46,4	43,20	20,48/20,48	20,48	22,72	0,72
500	<15	1	40,0/44,8	42,40	20,48/20,48	20,48	21,92	0,84
500	<15	1	46,4/43,2	44,80	24,58/16,38	14,08	30,72	0,62
500	<15	1	48,0/49,6	48,80	40,96/40,96	40,96	7,84	2,43
500	<15	1	40,0/38,4	39,20	24,58/24,58	24,58	14,62	1,17
500	<15	1	41,6/40,0	40,80	16,38/20,48	18,43	22,37	1,05
500	<15	1	48,0/44,8	46,40	28,67/36,86	32,77	13,63	2,21
500	<15	1	44,8/43,2	44,00	16,38/16,38	16,38	27,62	0,97
500	<15	1	40,0/41,6	40,80	16,38/16,38	16,38	24,42	1,06
500	<15	1	43,2/43,2	43,20	16,38/20,48	18,43	24,77	0,68
500	<15	1	57,6/52,8	55,20	45,06/40,96	43,01	12,19	1,68
500	<15	1	49,6/40,0	44,80	20,48/24,58	22,53	22,27	1,03
500	<15	1	44,8/46,4	45,60	32,77/32,77	32,77	13,63	1,78
500	<15	1	44,8/48,0	46,40	24,58/24,58	24,58	21,02	1,10
500	<15	1	43,2/43,2	43,20	20,48/24,58	22,53	20,67	1,15
500	<15	1	40,0/40,0	40,00	24,58/24,58	24,58	15,42	1,73
500	<15	1	41,6/41,6	41,60	24,58/20,48	22,53	19,07	1,37
500	<15	1	40,0/44,8	42,40	24,58/20,48	22,53	19,87	1,62

Κωδικός	a	b	L	C	ho	L	ΔE	Οξικό οξύ (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μηλικό οξύ (g/L)
ROZ1_000_0_C_3	5,34	3,13	97,12	6,18	30,30	97,12	0,00	0,23	0,03	
ROZ1_300_0_C_3	5,65	3,13	97,04	6,45	28,90	97,04	0,32	0,22	0,01	
ROZ1_600_0_C_3	6,01	3,14	97,01	6,78	27,50	97,01	0,69	0,22	0,01	
ROZ1_000_1_C_3	6,22	2,74	97,39	6,79	23,70	97,39	1,00	0,20	0,00	
ROZ1_300_1_C_3	6,05	3,11	97,23	6,80	27,20	97,23	0,72	0,23	0,00	
ROZ1_600_1_C_3	6,39	3,18	97,04	7,13	26,40	97,04	1,05	0,23	0,01	
ROZ1_000_3_C_3	7,21	2,87	96,36	7,76	21,60	96,36	2,03	0,21	0,00	
ROZ1_300_3_C_3	6,60	3,23	96,78	7,34	26,00	96,78	1,71	0,23	0,01	
ROZ1_600_3_C_3	7,05	3,31	96,66	7,78	25,10	96,66	1,31	0,23	0,01	
ROZ1_000_0_O_3	5,69	3,30	96,73	6,57	30,10	96,73	0,55	0,23	0,01	
ROZ1_300_0_O_3	4,98	2,63	97,72	5,63	27,80	97,72	0,86	0,23	0,01	
ROZ1_600_0_O_3	5,99	3,13	97,32	6,75	27,60	97,32	0,68	0,22	0,01	
ROZ1_000_1_O_3	6,57	3,16	97,20	7,29	25,60	97,20	1,23	0,20	0,01	
ROZ1_300_1_O_3	5,80	3,09	97,22	6,57	28,00	97,22	0,47	0,22	0,00	
ROZ1_600_1_O_3	6,39	3,22	97,05	7,15	26,70	97,05	1,06	0,23	0,00	
ROZ1_000_3_O_3	7,30	3,25	96,87	7,99	23,90	96,87	1,98	0,20	0,00	
ROZ1_300_3_O_3	6,71	3,22	96,83	7,44	25,60	96,83	1,40	0,23	0,00	
ROZ1_600_3_O_3	6,96	3,23	96,88	7,67	24,80	96,88	1,64	0,22	0,01	
ROZ1_000_0_C_6	3,67	4,92	96,51	6,13	53,40	96,51	2,52	0,25		1,42
ROZ1_300_0_C_6	4,04	4,92	96,30	6,36	50,70	96,30	2,36	0,24		1,41
ROZ1_600_0_C_6	4,30	4,78	96,29	6,42	48,00	96,29	2,12	0,25		1,39
ROZ1_000_1_C_6	4,96	4,59	96,16	6,75	42,70	96,16	1,79	0,22		1,74
ROZ1_300_1_C_6	4,45	4,78	96,21	6,53	47,10	96,21	2,08	0,24		1,74
ROZ1_600_1_C_6	4,65	5,02	96,01	6,84	47,30	96,01	2,30	0,24		1,75
ROZ1_000_3_C_6	5,45	4,78	95,86	7,24	41,20	95,86	2,08	0,23		2,33
ROZ1_300_3_C_6	4,79	4,99	95,91	6,91	46,20	95,91	2,29	0,25		2,27
ROZ1_600_3_C_6	4,87	5,11	95,90	7,05	46,50	95,90	2,37	0,25		2,27
ROZ1_000_0_O_6	3,80	5,21	96,03	6,44	54,00	96,03	2,81	0,3		1,38
ROZ1_300_0_O_6	4,65	4,46	95,95	6,44	43,70	95,95	1,90	0,3		1,40
ROZ1_600_0_O_6	4,71	5,06	95,73	6,91	47,10	95,73	2,46	0,32		1,41
ROZ1_000_1_O_6	5,56	4,81	95,48	7,35	40,80	95,48	2,36	0,25		1,79
ROZ1_300_1_O_6	4,83	4,49	95,89	6,59	42,90	95,89	3,62	0,25		1,71
ROZ1_600_1_O_6	4,56	5,48	95,59	7,12	50,30	95,59	2,91	0,28		1,66
ROZ1_000_3_O_6	5,77	4,34	95,79	7,22	36,90	95,79	1,85	0,22		2,26
ROZ1_300_3_O_6	4,87	5,35	95,65	7,23	47,70	95,65	2,70	0,25		2,29
ROZ1_600_3_O_6	4,94	5,45	95,65	7,35	47,90	95,95	2,78	0,24		2,23