



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Χρήση του φουμαρικού οξέους για τον έλεγχο της μηλογαλακτικής ζύμωσης και την μελέτη της επίδρασής του στα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά στο Μοσχοφίλερο

Παναγοπούλου Αναστασία

ΑΜ: 19685083

Επιβλέπων

Ονοματεπώνυμο: 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 Moschophilero**

Panagopoulou Anastasia

Registration Number: 19685083

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 υπογράφωντες 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 στο Μοσχοφίλερο»
και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3^ο Μέλους Επιτροπής)	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

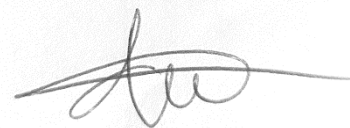
Η κάτωθι υπογράφουσα Αναστασία Παναγοπούλου του Αλεξάνδρου, με αριθμό μητρώου 19685083 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών οίνου αμπέλου και ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«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



Παναγοπούλου Αναστασία

***Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα Καθηγητή**

Ψηφιακή Υπογραφή

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση του φουμαρικού οξέος στη μηλογαλακτική ζύμωση σε λευκό οίνο, που έχει προκύψει από την οινοποίηση σταφυλιών της ποικιλίας Μοσχοφίλερο. Το φουμαρικό οξύ, είναι ένα από τα οργανικά οξέα του οίνου. Το βρίσκουμε στο σταφύλι σε μικρές ποσότητες αλλά πλέον είναι επιτρεπτή από τον ΟΙV (Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου) η προσθήκη του σε ορισμένες ποσότητες για την αναστολή της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Συγκεκριμένα, για αυτή τη μελέτη πραγματοποιήθηκε συνδυασμός προσθήκης διαφορετικών ποσοτήτων φουμαρικού οξέος (0, 300 και 600 mg/L), διαφορετικών ποσοτήτων μηλικού οξέος (0, 3 και 6 g/L) καθώς και προσθήκη ή μη γαλακτικών βακτηρίων του είδους *Oenococcus oeni*. για τη δημιουργία ευνοϊκού περιβάλλοντος για την έναρξη της ζύμωσης. Οι αναλύσεις έγιναν στα δείγματα αμέσως μετά τις προσθήκες και σε διάστημα 3 και 6 μηνών. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν πραγματοποιήθηκε μηλογαλακτική ζύμωση σε κανένα από τα δείγματα, είτε με προσθήκες είτε χωρίς για το διάστημα που έγιναν οι αναλύσεις και στις συγκεκριμένες συνθήκες. Διαφοροποιήσεις ωστόσο παρατηρήθηκαν σε άλλα χαρακτηριστικά του οίνου όπως είναι το χρώμα, το pH, η ογκομετρούμενη οξύτητα καθώς και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε πως η προσθήκη 600 mg/L φουμαρικού οξέος μειώνουν το pH περίπου κατά 0,10, ενώ παράλληλα, με την αύξηση της ποσότητας του μηλικού οξέος παρατηρήθηκε και αύξηση τη τιμής του κόκκινου χρώματος των δειγμάτων.

Λέξεις κλειδιά:

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

ABSTRACT

In this thesis the effect of fumaric acid in malolactic fermentation in white wine, obtained from the vinification of grapes from Moschofilero variety, was examined. Fumaric acid, is one of the organic acids found in wine. It is found in small quantities in the grape but now it is allowed by OIV (International Organisation of Vine and Wine) to be added in certain quantities to inhibit malolactic fermentation. In particular, for this study, there was a combination of adding different amounts of fumaric acid (0, 300 and 600 mg/L), different amounts of malic acid (0, 1 and 3 g/L) and the addition or not of lactic bacteria of the species *Oenococcus oeni*, to create a favorable environment for the initiation of fermentation. Analyses were performed on the samples immediately after the additions and also after 3 and 6 months. The results showed that malolactic fermentation did not take place in any of the samples, either with or without additions for the period of time analyses were performed under the specific conditions. However, variations were observed in other characteristics of the wine such as colour, pH, volumetric acidity and organoleptic characteristics. More specifically, it was observed that the addition of 600 mg/L of fumaric acid reduced pH by 0,10, while an increase in the amount of malic acid was accompanied by an increase in the red colour of the samples.

Key words:

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

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
1. Εισαγωγή.....	10
2. Σκοπός.....	10
3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	11
3.1 Ποικιλία	11
3.2 Μηλογαλακτική Ζύμωση.....	12
3.3 Τα βασικά οργανικά οξέα του οίνου.....	14
3.3.1 Μηλικό οξύ	15
3.3.2 Φουμαρικό οξύ.....	16
3.3.3 Γαλακτικό οξύ.....	17
3.3.4 Οξικό οξύ.....	18
3.4 <i>Oenococcus oeni</i>	19
4. Υλικά και μέθοδοι ανάλυσης.....	21
4.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	21
4.2 Αναλύσεις.....	24
4.2.1 pH.....	24
4.2.2 Ογκομετρούμενη οξύτητα.....	24
4.2.3 CIELab.....	26
4.2.4 Μέτρηση συγκέντρωσης οξέων με ενζυμικό αναλυτή	26
5. Αποτελέσματα	28
5.1 Αναλύσεις χρώματος.....	29
5.2 pH και οξύτητα.....	31
5.3 Μετρήσεις οξέων με ενζυμικό αναλυτή	36
5.3.1 Γαλακτικό οξύ.....	36
5.3.2 Μηλικό οξύ	37
5.3.3. Οξικό οξύ.....	38
6. Οργανοληπτικός έλεγχος.....	38
7. Συζήτηση.....	39
8. Συμπεράσματα.....	40
9. Βιβλιογραφία	41
Παράρτημα.....	43

Κατάλογος εικόνων

<u>Εικόνα 1: Σταφυλή ποικιλίας Μοσχοφίλερου.....</u>	11
<u>Εικόνα 2: Πορεία μηλογαλακτικής ζύμωσης.....</u>	12
<u>Εικόνα 3: Μεταβολισμός L- μηλικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης.....</u>	14
<u>Εικόνα 4: Οι τρεις φάσεις του σιγμοειδούς πρότυπου ανάπτυξης.....</u>	16
<u>Εικόνα 5: Φουμαρικό οξύ (99,9%).....</u>	22
<u>Εικόνα 6: Σκέυασμα γαλακτικών βακτηρίων <i>Oenococcus oeni</i>.....</u>	23
<u>Εικόνα 7: Γράφημα b/a συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 3 και 6 μηνών με τη μέθοδο CIELab.....</u>	29
<u>Εικόνα 8: Γράφημα του L συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 3 και 6 μηνών με τη μέθοδο CIELab.....</u>	30
<u>Εικόνα 9: Γράφημα του ΔΕ συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 3 και 6 μηνών με τη μέθοδο CIELab.....</u>	31
<u>Εικόνα 10: Γράφημα του pH σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού (0, 1 και 3 g/L) οξέος σε διάστημα 0, 3 και 6 μηνών.....</u>	32
<u>Εικόνα 11: Γράφημα της διαφοράς pH συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 0, 3 και 6 μηνών.....</u>	33
<u>Εικόνα 12: Γράφημα της ογκομετρούμενης οξύτητας συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 0, 3 και 6 μηνών.....</u>	34
<u>Εικόνα 13: Γράφημα διαφοράς της ογκομετρούμενης οξύτητας συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 0, 3 και 6 μηνών.....</u>	35
<u>Εικόνα 14: Γράφημα συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 3 μηνών.....</u>	36
<u>Εικόνα 15: Γράφημα συγκέντρωσης μηλικού οξέος συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 6 μηνών.....</u>	37
<u>Εικόνα 16: Γράφημα της συγκέντρωσης οξικού οξέος συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 3 και 6 μηνών.....</u>	38

Κατάλογος σχημάτων

<i>Σχήμα 1: Πορεία προετοιμασίας δειγμάτων.....</i>	<i>21</i>
---	-----------

1. Εισαγωγή

Το αμπέλι είναι από τα παλαιότερα είδη φυτών που εμφανίστηκε στη φύση. Η αρχική χρησιμοποίηση των σταφυλιών για την παραγωγή οίνου χρονολογείται κοντά στο 3000 π.Χ.. Ο οίνος προκύπτει ως αποτέλεσμα της ζύμωσης του γλεύκους, δηλαδή του χυμού των σταφυλιών, από ζυμομύκητες, οι οποίοι ευθύνονται για την μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη (αλκοολική ζύμωση). Έχει μια ιδιαίτερα περίπλοκη σύνθεση από οργανικά και ανόργανα συστατικά, ανάμεσα στα οποία μερικές από τις ουσίες που ξεχωρίζουν είναι τα σάκχαρα, ιδιαίτερα σημαντικά για τους ημίγλυκους και γλυκούς οίνους, τα οργανικά οξέα, στα οποία ευθύνεται η όξινη γεύση του οίνου καθώς και οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες επιδρούν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα το χρώμα, η οσμή και η γεύση.

Όπως προαναφέρθηκε, κατά την αλκοολική ζύμωση, οι ζυμομύκητες, μετατρέπουν τα σάκχαρα σε αιθανόλη. Ωστόσο, εκτός από τη διεξαγωγή της αλκοολικής ζύμωσης που είναι απαραίτητη, για την παραγωγή οίνων ποιότητας, φαίνεται όλο ένα και περισσότερο να κρίνεται αναγκαία και η μηλογαλακτική ζύμωση. Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι ουσιαστικά η βακτηριακή αποκαρβοξυλίωση του L – μηλικού οξέος σε L – γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂). Τα αποτελέσματα που επιφέρει είναι η μείωση της οξύτητας και ως συνεπακόλουθο η αύξηση του pH σε μικρότερο βαθμό. Τα κύρια βακτήρια που διεξάγουν τη μηλογαλακτική ζύμωση στους ερυθρούς οίνους αλλά και με συνεχώς αυξανόμενο ρυθμό και στους λευκούς και αφρώδεις είναι τα γαλακτικά βακτήρια του είδους *Oenococcus oeni*. Το συγκεκριμένο στέλεχος βακτηρίου προτιμάται έναντι άλλων λόγω της αυξημένης του αντοχής στο χαμηλό pH του οίνου, στις υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης αλλά και στην έλλειψη θρεπτικών ουσιών. Το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που θα χρησιμοποιηθεί, ο τύπος του οίνου και ο τρόπος οινοποίησης του είναι μερικοί από τους παράγοντες που θα επηρεάσουν τις αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Γενικότερα, η μηλογαλακτική ζύμωση προσδίδει το χαρακτηριστικό άρωμα βουτύρου, μειώνει τον χορτώδη χαρακτήρα και βελτιώνει τον φρουτώδη χαρακτήρα αλλά και τη διάρκεια της επίγευσης του οίνου.

Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις οίνων, όπως αυτοί που προέρχονται από σταφύλια που έχουν καλλιεργηθεί σε αμπελώνες σε πολύ θερμές περιοχές, όπου είναι επιθυμητή η διατήρηση υψηλής οξύτητας, μέτριας περιεκτικότητας αλκοόλης και των πρωτογενών αρωμάτων. Στις περιπτώσεις αυτές λοιπόν, είναι αναγκαία η παρεμπόδιση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση θειώδους ώστε να επιτευχθεί η αναστολή των γαλακτικών βακτηρίων και κατ' επέκταση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Η χρήση θειώδους όμως ενέχει κινδύνους και μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στον οίνο, όπως για παράδειγμα αλλοίωση στο αρωματικό του προφίλ. Επιπλέον, η επιτρεπτή ποσότητα θειώδους στον οίνο περιορίζεται από τη νομοθεσία (OPIO: ολικό θειώδες σε λευκούς οίνους 200 mg/L και σε ερυθρούς 150 mg/L).

Μια εναλλακτική λύση η οποία εγκρίθηκε τα τελευταία χρόνια ως παράγοντας αναστολής της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι το φουμαρικό οξύ το οποίο έχει βακτηριοκτόνο δράση και σε ορισμένες ποσότητες φαίνεται να έχει την ικανότητα να λειτουργεί ανασταλτικά για τη ζύμωση.

2. Σκοπός

Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η διακοπή ή και η παρεμπόδιση της μηλογαλακτικής ζύμωσης στον οίνο ώστε να μπορέσουν να διατηρηθούν ορισμένα χαρακτηριστικά του. Σκοπός της πτυχιακής αυτής είναι η μελέτη της χρήσης του φουμαρικού οξέος ως εναλλακτική μέθοδος ελέγχου της μηλογαλακτικής ζύμωσης και η επίδραση του στα διάφορα χαρακτηριστικά του οίνου. Αυτό επιτεύχθηκε με την προσθήκη του σε δείγματα οίνου σε διαφορετικές ποσότητες είτε μόνο του είτε

σε συνδυασμό με την προσθήκη μηλικού οξέος και γαλακτικών βακτηρίων και στη συνέχεια με πραγματοποίηση αναλύσεων σε ορισμένα χρονικά διαστήματα.

3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

3.1 Ποικιλία

Το Μοσχοφίλερο (Μοσχόφλερο, Μαυροφίλερο) κατατάσσεται σε μια ομάδα ποικιλιών που ονομάζεται Φιλέρι. Αποτελεί ποικιλία της κεντρικής και δυτικής Πελοποννήσου και καλλιεργείται κυρίως στο νομό Αρκαδίας και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή της Μαντινείας. Επιπλέον, εκτός από τη ζώνη της Μαντινείας, το Μοσχοφίλερο καλλιεργείται και στην Τρίπολη σε έκταση περίπου 11.000 στρέμματα. Γενικά, συνίσταται κυρίως για το αμπελουργικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου ενώ επιτρέπεται και στα νησιά του Ιονίου, τη Θεσσαλία και τη Στερεά Ελλάδα ιδανικά σε υψόμετρο άνω των 350 μέτρων (Σταύρακας Ευστ. Δημήτριος 2015). Στο οροπέδιο της Τρίπολης, παράγεται ο λευκός ξηρός οίνος ΠΟΠ (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης) “Μαντινεία”. Ο οίνος αυτός χαρακτηρίζεται για το ελαφρύ του άρωμα, τη φρεσκάδα του και την ισορροπία που διαθέτει, ενώ αποτελεί εξαιρετικό οίνο βάσης για την παραγωγή αφρωδών οίνων.

Η ζώνη των ΠΟΠ Μαντινείας είναι από τις πιο ψυχρές στην Ελλάδα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αργή ωρίμανση των σταφυλιών και τον όψιμο τρύγο. Το έδαφος είναι σχετικά φτωχό, καλά στραγγιζόμενο. Το κλίμα χαρακτηρίζεται από πολλές βροχές και χιόνια το χειμώνα καθώς και βροχές το καλοκαίρι με χαμηλές θερμοκρασίες συγκριτικά με την υπόλοιπη ηπειρωτική χώρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ωρίμανση των σταφυλιών να παρατηρείται το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Σεπτέμβρη μέχρι και τις πρώτες μέρες του Οκτώβρη (Σουφλερός Ηρ. Ευάγγελος 2015).



Εικόνα 1: Σταφυλή ποικιλίας Μοσχοφίλερου

Το Μοσχοφίλερο είναι η πιο γνωστή γηγενής ερυθρωπή ποικιλία που καλλιεργείται στη χώρα μας. Έχει πολύ ζωηρό πρέμνο ενώ είναι και ποικιλία μεγάλης παραγωγής, με τον καρποφόρο βλαστό να εμφανίζει συνήθως δύο σταφυλές από τον 3^ο έως τον 6^ο κόμβο. Στους παλιούς αμπελώνες η διαμόρφωση των πρέμνων συνήθιζε να είναι σε κυπελλοειδές, πλέον η πλειοψηφία των νέων

αμπελώνων διαμορφώνεται σε αμφίπλευρο γραμμικό Royat. Το κλάδεμα καρποφορίας που εφαρμόζεται είναι βραχύ, συνήθως με 2 έως 3 οφθαλμούς.

Για την καλύτερη ανάπτυξη του πρέμνου της προτιμώνται εδάφη μέτριας γονιμότητας με υψηλό συντελεστή υδατοχωρητικότητας. Γεωλογικά, αποτελούνται από ανοιχτόχρωμους και μαύρους ασβεστόλιθους με λεπτή αργιλώδη ύλη στα κατώτερα στρώματα και αργιλοαμμώδη στα ανώτερα στρώματα. Γενικότερα τα εδάφη είναι αμμοπηλώδη, αργιλοπηλώδη, αμμοαργιλοπηλώδη και με μικρή περιεκτικότητα σε CaCO_3 .

Η ποικιλία έχει μέτρια ευαισθησία στον περονόσπορο καθώς και στο οίδιο. Παρουσιάζει ωστόσο μεγάλη ευαισθησία στην προσβολή από βοτρυτή και στις ιώσεις, κυρίως όταν κατά την ωρίμανση επικρατούν δυσμενείς καιρικές συνθήκες όπως πολλές βροχοπτώσεις και σχετικά υψηλά επίπεδα υγρασίας.

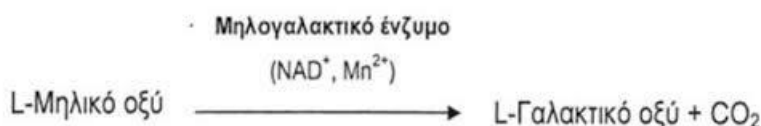
Το γλεύκος του Μοσχοφίλερου περιέχει συνήθως σάκχαρα από 210 – 220 g/L, pH 3,3 – 3,5 και οξύτητα 5,4 – 6,8 g/L εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ. Εκτός από λευκούς ξηρούς οίνους, παράγονται και εξαιρετικοί ροζέ ξηροί οίνοι με ελαφρύ άρωμα μοσχάτου ενώ υπάρχει και η δυνατότητα παραγωγής αφρωδών οίνων εξαιρετικής ποιότητας (Σταύρακας Ευστ. Δημήτριος 2015).

Η υψηλή του περιεκτικότητα σε οξέα (ειδικότερο το χαμηλό pH) καθώς και τα άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κάνουν τον οίνο που προέρχεται από την ποικιλία αυτή να μοιάζει με τους λευκούς ξηρούς οίνους της Αλσατίας (Γαλλία) και τους οίνους της ποικιλίας Riesling (Γερμανία). Για την παραγωγή των οίνων αυτών, η στρεμματική απόδοση των αμπελώνων δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 900kg σταφυλής και η περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 188g/L (Σουφλερός Ηρ. Ευάγγελος 2015).

3.2 Μηλογαλακτική Ζύμωση

Κατά την οινοποίηση συνήθως διαδραματίζονται δύο κύριες ζυμώσεις. Η αλκοολική ζύμωση, η οποία πραγματοποιείται από μια καλλιέργεια ζυμομυκήτων η οποία μετατρέπει τα σάκχαρα σε αιθανόλη και CO_2 και η μηλογαλακτική ζύμωση η οποία διεξάγεται μέσω της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων των γενών *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* και *Leuconostoc*, τα οποία μεταβολίζουν το μηλικό οξύ σε γαλακτικό οξύ και CO_2 (Lerm E. Et al., 2010). Η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιείται μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης ή ταυτόχρονα με αυτή. Χρησιμοποιείται ως μια δεύτερη ζύμωση η οποία συμβάλλει στην ωριμότητα των ερυθρών οίνων ενώ χρησιμοποιείται και σε λευκές ποικιλίες όπως είναι το Chardonnay και το Riesling αλλά και σε αφρώδεις οίνους (Ugliano et al., 2003).

Πιο συγκεκριμένα, ως μηλογαλακτική ζύμωση ορίζεται η μετατροπή του L-μηλικού οξέος ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$) σε L-γαλακτικό οξύ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) από τα γαλακτικά βακτήρια, με ταυτόχρονη παραγωγή CO_2 (αποκαρβοξυλίωση). Ειδικότερα, 1,00 g μηλικού οξέος θα δώσει 0,67 g γαλακτικού οξέος και 0,33 g CO_2 . Τα γαλακτικά βακτήρια από το σταφύλι θα περάσουν στο γλεύκος, όπου εκεί με την παραγωγή της αλκοόλης ο πληθυσμός τους μειώνεται και επιβιώνουν μόνο τα πιο ανθεκτικά, τα οποία προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, αν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές πραγματοποιούν τη μηλογαλακτική ζύμωση.



Εικόνα 2: Πορεία μηλογαλακτικής ζύμωσης

Υπάρχουν τρεις κύριοι λόγοι για τη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης στον οίνο. Η μείωση της οξύτητας (κατά 2 – 4 g/L εκφρασμένα σε τρυγικό οξύ) η οποία έχει ως συνεπακόλουθο την αύξηση του pH (κατά 0,1 – 0,2), και τη μικροβιακή σταθερότητα του οίνου αφού εξαλείφει το μηλικό

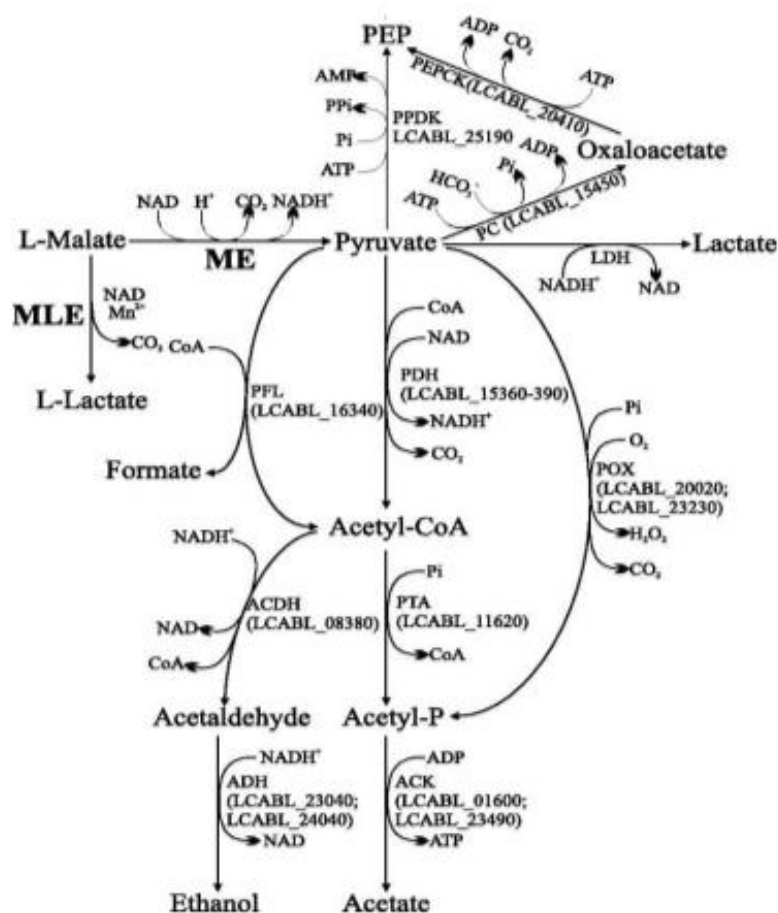
οξύ, το οποίο θα μπορούσε πιθανόν να είναι ένα υπόστρωμα άνθρακα για τους μικροοργανισμούς. Τέλος, μέσω αυτής παράγονται αρωματικές ενώσεις από σάκχαρα, τα οποία τροποποιούν το αρωματικό προφίλ των οίνων. Οι αλλαγές που θα επιφέρει κάθε φορά στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου, εξαρτώνται από το εκάστοτε στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που θα τη διεξάγει, τον τύπο του οίνου, τον τύπο της οινοποίησης του, τη γεύση και το άρωμα του καθώς και από την παρουσία ή μη πτόδρομων αρωματικών ενώσεων. Η μηλογαλακτική ζύμωση γενικότερα, έχει ως αποτέλεσμα της αύξηση του χαρακτηριστικού αρώματος βουτύρου, μείωση του χορτώδους χαρακτήρα, βελτίωση του φρουτώδους χαρακτήρα καθώς και πιο μεγάλης διάρκειας επίγευση του οίνου (Bartowsky & Borneman 2011, Bauer & Dicks 2004).

Η μηλογαλακτική ζύμωση συνήθως είναι προτιμότερο να διεξάγεται στις πιο ψυχρές αμπελουργικές περιοχές, όπου τα σταφύλια μπορεί να έχουν υψηλά επίπεδα μηλικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, για τα “πράσινα” σταφύλια η περιεκτικότητα κυμαίνεται από 15 – 25 g/L, ενώ στα ώριμα μειώνεται στα 2 – 4 g/L. Η μείωση αυτή πραγματοποιείται κατά τη δίογκωση και ωρίμανση της σταφυλής λόγω της καύσης του μηλικού (Ribereau-Gayon, R., et al, 2006). Επιπλέον, είναι επιθυμητή σε στους οίνους προς παλαίωση σε βαρέλια, σε εκείνους που απαιτούν ωρίμανση μεγάλης διάρκειας σε φιάλες (π.χ. Champagne) ή και σε οίνους που απαιτούν ένα συγκεκριμένο αρωματικό προφίλ (π.χ. Chardonnay, λευκοί οίνοι Βουργουνδίας και ερυθροί οίνοι Μπορντώ). Αντίθετα, στους λευκούς και ροζέ οίνους ταχείας κατανάλωσης, η μηλογαλακτική ζύμωση δεν είναι επιθυμητή, αφού το μηλικό οξύ που περιέχουν (1,0 – 2,5 g/L εκφρασμένα σε τρυγικό οξύ) διατηρεί τη φρεσκάδα και τη φρουτώδη γεύση του νέου οίνου (Bauer & Dicks 2004).

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, τα στελέχη των βακτηρίων *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* και *Leuconostoc* επικρατούν κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης καθώς είναι τα μόνα που έχουν ανθεκτικότητα στο χαμηλό pH του οίνου, στις υψηλές συγκεντρώσεις θειώδη ανυδρίτη (50ppm) αλλά και στην αιθανόλη. Ωστόσο, προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, τα στελέχη που διεξάγουν την αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση είναι κυρίως τα *O. oeni* τα οποία παλαιότερα ήταν γνωστά ως *Leuconostoc oenos* (Bauer & Dicks 2004). Η μη ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση, ειδικότερα σε οίνους με υψηλά pH που προέρχονται από θερμότερες αμπελουργικές περιοχές και άρα πιθανόν να έχουν χαμηλότερη συγκέντρωση μηλικού οξέος, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωσή τους. Εκτός από ανεπιθύμητες οργανοληπτικές μεταβολές, μπορεί να μειωθεί το χρώμα των ερυθρών οίνων κατά 30% (Van Vuuren & Dicks 1993) καθώς και να παραχθούν βιογενείς αμίνες (Lonvaud – Funel & Joyeux 1994).

Η αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση είναι γενικότερα απρόβλεπτη καθώς μπορεί να συμβεί οποιαδήποτε στιγμή, κατά τη διάρκεια ή μετά το τέλος την αλκοολικής ζύμωσης. Αυτό μπορεί να επιφέρει ως συνέπεια τα ίδια τα γαλακτικά βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του μηλικού οξέος, να αποικοδομήσουν κάποιο άλλο συστατικό του οίνου, για παράδειγμα τα σάκχαρα, αυξάνοντας έτσι την πτητική οξύτητα και υποβαθμίζοντας τελικά την ποιότητα του παραγόμενου οίνου (Κοτσερίδης Σ. Γεώργιος 2012).

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος μπορούν να ακολουθήσουν 3 πιθανές ενζυμικές οδούς για τη μετατροπή του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό οξύ. Μια πιθανή διαδικασία είναι ο μεταβολισμός του μηλικού οξέος απευθείας με την αποκαρβοξυλίωση του σε γαλακτικό οξύ μέσω του μηλογαλακτικού ενζύμου (MLE), χωρίς την απελευθέρωση ενδιάμεσων. Επιπλέον, μπορεί να γίνει μετατροπή του μηλικού οξέος σε πυροσταφυλικό μέσω του μηλικού ενζύμου (ME) και έπειτα να αναχθεί σε γαλακτικό οξύ μέσω της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος. Τέλος, το μηλικό οξύ μπορεί να αναχθεί σε οξαλοξικό οξύ μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος, να αποκαρβοξυλιωθεί σε πυροσταφυλικό οξύ και στη συνέχεια να αναχθεί σε γαλακτικό οξύ μέσω της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος (Bauer & Dicks 2004).



Εικόνα 3: Μεταβολισμός L- μηλικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης

Σε χαμηλό pH το μηλικό οξύ μεταβολίζεται με γρήγορο ρυθμό, ενώ ο μεταβολισμός των υπολειπόμενων σακχάρων προχωρά με αρκετά μειωμένη ένταση. Η αναμενόμενη αύξηση του pH κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, οδηγεί στη μείωση της αποικοδόμησης του μηλικού οξέος αλλά και στην αύξηση της αποικοδόμησης των υδατανθράκων. Με την εξαφάνιση του μηλικού οξέος, τα γαλακτικά βακτήρια προσβάλλουν το κιτρικό οξύ και προχωρούν στον σχηματισμό οξικού οξέος με αποτέλεσμα μικρή αύξηση της πτητικής οξύτητας. Με το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης θα πρέπει αμέσως να προστεθεί στον οίνο θειώδης ανυδρίτης για να γίνει αναστολή της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων διότι αλλιώς είναι δυνατό να προσβάλλουν τα υπόλοιπα σάκχαρα του οίνου (αραβινόζη, ξυλόζη) τα οποία δεν ζυμώνονται, τη γλυκερίνη, το κιτρικό και το τρυγικό οξύ και να δημιουργηθούν ασθένειες στον οίνο. Επιπλέον, μπορεί να πραγματοποιηθεί παράλληλος σχηματισμός και άλλων οξέων της αλειφατικής σειράς, όπως για παράδειγμα το μυρμηκικό και το βουτυρικό οξύ (Bartowsky & Borneman 2011, Bauer & Dicks 2004).

3.3 Τα βασικά οργανικά οξέα του οίνου

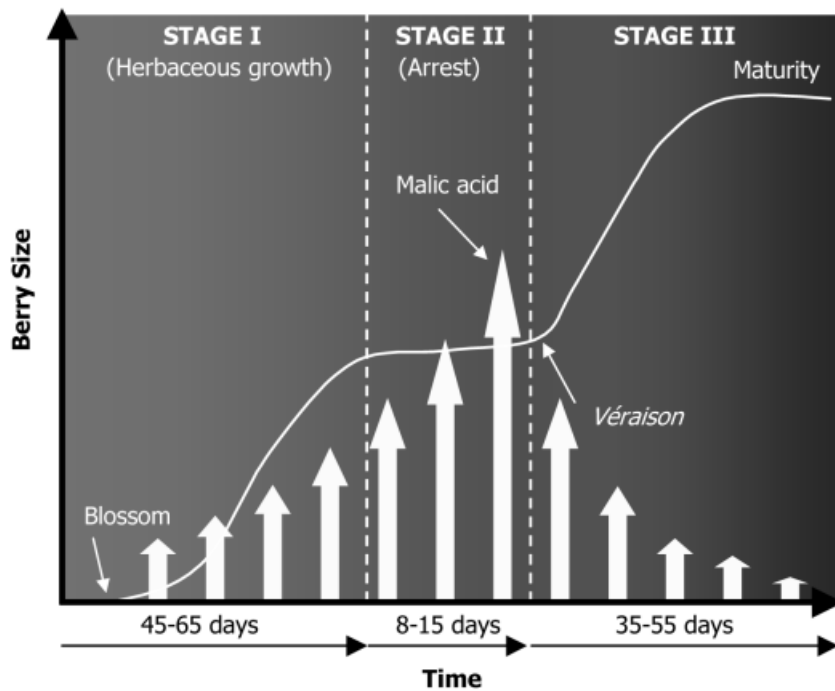
Τα βασικά οργανικά οξέα που βρίσκονται στα σταφύλια είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό οξύ, ενώ κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης οι ζύμες καθώς και τα βακτήρια του γλεύκους παράγουν γαλακτικό, οξικό και ηλεκτρικό οξύ. Τα οξέα αυτά είναι υπεύθυνα για την όξινη γεύση στους οίνους ενώ, φαίνεται πως έχουν μεγάλη επίδραση γενικότερα στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Παράλληλα προσδίδουν φρεσκάδα. Κάθε οξύ επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τον οίνο. Το τρυγικό και το μηλικό είναι “σκληρά” οξέα, ενώ το κιτρικό προσδίδει περισσότερη

φρεσκάδα. Το γαλακτικό οξύ έχει όξινη και στυφή γεύση, ενώ το οξικό παρουσιάζει χαρακτηριστική γεύση ξυδιού. Τέλος, το ηλεκτρικό οξύ έχει έντονη πικρή και αλμυρή γεύση μαζί και θεωρείται πως είναι το οξύ με την περισσότερη γεύση (Reynaud & Blouin 1996, Ribéreau-Gayon et al., 2006). Από αυτά τα οξέα μόνο ορισμένα επιτρέπεται σύμφωνα με τον ΟΙV (Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου) και τον FAO (Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας) να προστεθούν στον οίνο για την αύξηση της οξύτητας, τα οξέα αυτά είναι το τρυγικό, το μηλικό και το γαλακτικό (FAO-WHO. Codex Alimentarius. 2015, n.d.; INTERNATIONAL OENOLOGICAL CODEX INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE).

3.3.1 Μηλικό οξύ

Το μηλικό οξύ είναι ένα οργανικό διπρωτικό οξύ, περιέχει δηλαδή δύο καρβοξυλικές ομάδες (-COOH) και σε θερμοκρασία 25 °C έχει pKa 3,40 και 5,11. Είναι το πιο διαδεδομένο οξύ των φρούτων. Έχει γεύση που θυμίζει μήλο και συμβάλλει πολύ στην αίσθηση της όξινης γεύσης. Χρησιμοποιείται κυρίως για την αύξηση της οξύτητας σε προϊόντα που περιέχουν μήλα όπως ο μηλίτης, λόγω της γεύσης του. Ωστόσο, το μηλικό οξύ έχει μεγάλη επίδραση και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου καθώς, αυξάνει την οξύτητα και τη φρεσκάδα, ενώ παράλληλα μειώνει και το pH. Επιπλέον, παίζει σημαντικό ρόλο και στη βιολογική και φυσιολογική τους σταθερότητα (Waterhouse et al., 2016).

Ο σχηματισμός του μηλικού οξέος στο σταφύλι συμβαίνει ταυτόχρονα με τη διαμόρφωσή της ράγας. Η ανάπτυξη της ράγας εμφανίζει ένα διπλό σιγμοειδές πρότυπο ανάπτυξης που χαρακτηρίζεται από τρεις διαδοχικές φάσεις. Στη φάση I της ανάπτυξης του σταφυλιού – “πράσινη”, αμέσως μετά την άνθιση, οι ράγες είναι σκληρές και πράσινες. Μαζί με την κυτταρική διαφοροποίηση στην οποία υπόκεινται, παρατηρείται και αύξηση του μεγέθους των κενοτοπίων των κυττάρων της ράγας του σταφυλιού λόγω της ταχείας αποθήκευσης του L – μηλικού και του L – τρυγικού οξέος. Κατά τη φάση II όπου η ανάπτυξη των ραγών σταματάει, η οξύτητα των ραγών φτάνει στο μέγιστο λόγω της συσσώρευσης του L – μηλικού και του L – τρυγικού οξέος. Το φαινόμενο αυτό περιορίζεται κατά την φάση III κατά την οποία ξεκινάει η αλλαγή του χρώματος των ραγών λόγω της μείωσης της χλωροφύλλης και της αραίωσης λόγω εισροής νερού. Η ταχεία μείωση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος είναι αποτέλεσμα της μείωσης της βιοσύνθεσης του L – μηλικού οξέος ταυτόχρονα με την απότομη αύξηση της αποικοδόμησης του μέσω της αναπνοής. Παράλληλα, εξελίσσεται και μια δεύτερη βιοχημική αλλαγή, κατά την οποία παρατηρείται μείωση της οξύτητας των σταφυλιών και την αλλαγή της σύστασης των ραγών σε σάκχαρα. Στο στάδιο αυτό, η διαθεσιμότητα σε αναπνευστικό υπόστρωμα, σακχαρόζης, περιορίζεται μέσω της φωτοσύνθεσης λόγω της αποικοδόμησης της χλωροφύλλης. Επομένως, η μεταβολική οδός αλλάζει σε αναπνοή με L – μηλικό οξύ με αποτέλεσμα τη μείωση της βιοσύνθεσης του L – μηλικού οξέος (Volschenk et al., 2017).



Εικόνα 4: Οι τρεις φάσεις του σιγμοειδούς πρότυπου ανάπτυξης

Οι συγκεντρώσεις του είναι συνήθως χαμηλότερες σε θερμότερες περιοχές και σε πιο ώριμα σταφύλια. Σε ψυχρά κλίματα η συγκέντρωση του μπορεί να φτάσει έως και 4,5 – 6,0 g/L, ενώ σε πιο θερμά κλίματα συνήθως φτάνει έως 2 g/L. Βέβαια, έχουν υπάρξει περιπτώσεις σε χρονίες με πολύ ψυχρά καλοκαίρια όπου η συγκέντρωσή του έχει φτάσει ακόμα και τα 15 g/L (Waterhouse et al., 2016).

Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, το L – μηλικό οξύ υφίσταται μηλογαλακτική ζύμωση όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Η απομάκρυνση του μηλικού οξέος μέσω της μηλογαλακτικής ζύμωσης προκαλεί συνήθως μια μέση αύξηση του pH κατά 0,1 έως 0,3. Όταν προστίθεται πριν από τη ζύμωση, το μεγαλύτερο μέρος του L – μηλικού θα απομακρυνθεί με τη μηλογαλακτική και λόγω της ανθεκτικότητας του στη μικροβιακή προσβολή, θα παραμείνει το D – μηλικό διατηρώντας τον οίνο σε χαμηλό pH (Payan, Gancel et al., 2023).

Η προσθήκη ορισμένων οργανικών οξέων, εκ των οποίων και το μηλικό οξύ, για την αύξηση της οξύτητας είναι επιτρεπτή από τη νομοθεσία. Η προσθήκη μηλικού οξέος στον τελικό οίνο θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για οίνους από θερμότερες περιοχές, αφού οι θερμές περιοχές οδηγούν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις μηλικού οξέος. Το μηλικό ωστόσο, αποτελεί ευνοϊκό υπόστρωμα για την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων, τα οποία μέσω των μεταβολικών οδών που θα ακολουθήσουν μπορεί να ενισχύσουν την αρωματική και γευστική πολυπλοκότητα του τελικού οίνου. Ωστόσο, η προσθήκη μηλικού οξέος μπορεί να ξεκινήσει μια δεύτερη μηλογαλακτική ζύμωση και να οδηγήσει σε ένα προϊόν θολό και ελαφρώς αφρώδες. Επομένως, η χρήση του για τη ρύθμιση του pH ή της οξύτητας πρέπει να εξετάζεται (Ribereau-Gayon, R., et al, 2006).

3.3.2 Φουμαρικό οξύ

Το φουμαρικό οξύ ή (2E)-2-βουτενοδιοϊκό οξύ είναι ένα οργανικό, διπρωτικό οξύ το οποίο έχει pKa 3,03 και 4,44 (Payan, Gancel et al., 2023). Το φουμαρικό οξύ πήρε αρχικά το όνομά του από το φυτό *Fumaria officinalis*, από το οποίο προέρχεται και απομονώθηκε για πρώτη φορά (Gancel et al., 2022). Παράγεται φυσικά και υπάρχει σε μικρές ποσότητες τόσο στα ερυθρά όσο και στα λευκά σταφύλια σε συγκεντρώσεις από 0,07 έως 10,69 mg/L. Είναι ένας ενδιάμεσος μεταβολίτης του κύκλου του

κιτρικού οξέος το οποίο μεταβολίζεται σε L -μηλικό μέσω της δράσης του ενζύμου φουμαράση. Λόγω του χαμηλού μοριακού του βάρους, 116,073 g/mol, το φουμαρικό οξύ έχει μεγαλύτερη ρυθμιστική ικανότητα από άλλα οξέα τροφίμων σε pH περίπου 3. Πρόκειται για το φθηνότερο από τα οξέα τροφίμων και δεν είναι τοξικό, έχει χρησιμοποιηθεί ως αντιβακτηριδιακός και οξυντικός παράγοντας στη βιομηχανία τροφίμων και χυμών από το 1946 (Das et al., 2016; Straathof and van Gulik, 2012).

Λόγω των δύο καρβοξυλικών ομάδων του, το φουμαρικό οξύ διαθέτει μεγάλη ικανότητα αύξησης της οξύτητας και συνεπώς μείωσης του pH συγκριτικά με άλλα μονοκαρβοξυλικά οξέα όπως το γαλακτικό και το οξικό οξύ. Όταν προστίθεται πριν τη μηλογαλακτική ζύμωση, όχι μόνο μειώνει το pH αλλά αναστέλλει και τις δραστηριότητες των γαλακτικών βακτηρίων επηρεάζοντας τη βιοσύνθεση των πυριμιδίνων. Αυτό παρατηρήθηκε όταν το φουμαρικό οξύ προστέθηκε σε ποσότητες μεταξύ 0,4 – 1,5 g/L μετά από αλκοολική ζύμωση. Πιο πρόσφατα, έχει αποδειχτεί ότι όταν βρίσκεται σε ποσότητες από 0,3 έως 0,6 g/L και σε pH 3,3, μπορεί και αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξη του *O. oeni*. Επιπλέον, μια μελέτη, έπειτα από προσθήκη του σε διάφορες ποικιλίες έδειξε ότι έχει μακροχρόνια επίδραση στο *O. oeni* και θα μπορούσε να αποτελέσει μια πιο μόνιμη λύση από τη χρήση του SO₂, συνεπώς θα μπορούσε να συμβάλλει στη μείωση της χρήσης του κατά την οινοποίηση (Payan , Gancel 2023). Το φουμαρικό οξύ λοιπόν, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση έναντι της χρήσης λυσοζύμης ή θειώδους για να ανασταλεί η μηλογαλακτική ζύμωση (Morata et al., 2019). Πρόσφατα ο ΟΙV ενέκρινε ένα νέο ψήφισμα, ΟΙV-OENO 581A-2021, όπου ενέκρινε τη χρήση του φουμαρικού οξέος ως ανασταλτικό παράγοντα της μηλογαλακτικής ζύμωσης με προσθήκη 300 – 600 mg/L φουμαρικού οξέος στους οίνους (<https://Www.Oiv.Int/Public/Medias/8084/En-Oiv-Oeno-581a-2021.Pdf>, n.d.)

Εκτός από τη μείωση του pH, το φουμαρικό οξύ μελέτες έχουν αποδείξει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τις αντιβακτηριδιακές του ιδιότητες, οι οποίες έχουν εφαρμοστεί σε διάφορα τρόφιμα και ποτά όπως μη θερμικά επεξεργασμένα λαχανικά ή σε ποτά όπως ο μηλίτης εμβολιασμένος με το βακτήριο *E. coli*, όπου παρεμπόδισε την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων. Επίσης έχει και αντιμυκητιακές ιδιότητες (Gancel et al., 2022).

Το κατώτατο όριο αντίληψης του φουμαρικού οξέος στους λευκούς οίνους φαίνεται να είναι 1 g/L , το οποίο είναι το χαμηλότερο όριο σε σύγκριση με το τρυγικό και το κιτρικό οξύ. Στο ερυθρό κρασί, το κατώφλι αντίληψης είναι περίπου 1387 mg/L. Επιπλέον, γίνεται αντιληπτό ως πιο όξινο και από το κιτρικό και από το μηλικό οξύ, ενώ μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι σε συγκεντρώσεις 0,6 g/L το φουμαρικό οξύ βελτιώνει την αντίληψη της οξύτητας του οίνου στο στόμα (Gancel et al., 2022, Morata et al., 2019).

Όσον αφορά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, το φουμαρικό οξύ έχει φρουτώδη χαρακτήρα και οξύτητα μακράς διάρκειας συγκριτικά με τα υπόλοιπα οργανικά οξέα του οίνου, λόγω της υδρόφοβης φύσης του. Στους ερυθρούς οίνους φαίνεται να βελτιώνει την οξύτητα, το σώμα και την στυπτικότητα (Gancel et al., 2022).

Ωστόσο, ένα αρνητικό χαρακτηριστικό του φουμαρικού οξέος είναι πως είναι αρκετά δυσδιάλυτο. Πιο συγκεκριμένα, είναι πολύ δύσκολο να διαλυθεί στο νερό, καθώς έχει διαλυτότητα λιγότερο από 10 g/L (6,6 – 8,1 g/L). Αλλά και στον οίνο, η διαλυτότητά του είναι περίπου 15 g/L στους 25 °C, γεγονός που το καθιστά ένα από τα λιγότερο διαλυτά οργανικά οξέα στον οίνο σε σύγκριση με τα τρυγικό, μηλικό και κιτρικό οξύ (αντίστοιχα 1049,3 g/L, 1047,0 g/L , 1079,7 g/L) (Gancel et al., 2022).

3.3.3 Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ (L – γαλακτικό και D - γαλακτικό) ή 2 - υδροξυπροπανοϊκό οξύ, είναι ένα μονοπρωτικό οξύ, του οποίου η pKa στους 25°C είναι 3,86, που σημαίνει ότι είναι ασθενέστερο από το τρυγικό και από το μηλικό οξύ. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιείται ως συντηρητικό, ως παράγοντας σκλήρυνσης και ως αρωματικός παράγοντας (E270).

Το γαλακτικό οξύ προέρχεται από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ως D(-) - γαλακτικό οξύ, ενώ το L(+) - ισομερές του παράγεται ελάχιστα. Κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση τα γαλακτικά βακτήρια μετατρέπουν το μηλικό οξύ σε γαλακτικό και παράγεται το L(+) ισομερές του. Η L(+) μορφή του γαλακτικού οξέος αποτελεί δείκτη εκδήλωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Επειδή το γαλακτικό οξύ είναι πιο όξινο από το μηλικό, η μηλογαλακτική ζύμωση μειώνει τη συνολική οξύτητα και προκαλεί μέση αύξηση του pH κατά 0,1 έως 0,3. Η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να αποφευχθεί προκειμένου να διατηρηθεί η υψηλότερη οξύτητα σε οίνους όπου αυτό είναι επιθυμητό, όπως για παράδειγμα αυτούς που προέρχονται από θερμές περιοχές. Το γαλακτικό οξύ συμβάλλει στην αύξηση της οξύτητας του οίνου παρατείνοντας την αίσθηση του όξινου.

Όταν τα γαλακτικά βακτήρια προσβάλλουν τα σάκχαρα του γλεύκους, την γλυκερίνη ή το τρυγικό οξύ παράγουν άλλα το D(-) ισομερές και άλλα το L(+) ισομερές του γαλακτικού οξέος. Γενικότερα ισχύει πως το D(-) - γαλακτικό οξύ συνδέεται με την αλκοολική ζύμωση, το L(+) - γαλακτικό οξύ σχετίζεται με την μηλογαλακτική ζύμωση, ενώ όταν βρεθούν τα δύο σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 0,4 g/L και μεγαλύτερη από 3 g/L αντίστοιχα τότε πρόκειται για ασθένεια (γαλακτική προσβολή) (Ribereau-Gayon, R., et al, 2006).

Υπάρχουν τρία πλεονεκτήματα για την προσθήκη γαλακτικού οξέος στον οίνο. Η προσθήκη του ακριβώς πριν την εμφιάλωση χωρίς κίνδυνο καθίζησης, παράγει πιο στρογγυλή και απαλή αίσθηση στο στόμα σε σχέση με το μηλικό οξύ και προσδίδει στο κρασί γλυκύτητα (Payan, Gancel, Jourdes, Christmann, Teissedre 2023).

3.3.4 Οξικό οξύ

Το οξικό οξύ είναι ένα μονοπρωτικό οργανικό οξύ και είναι το κύριο συστατικό της πτητικής οξύτητας του γλεύκους των σταφυλιών και των οίνων. Μπορεί να σχηματιστεί πριν ή κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ή ως προϊόν του μεταβολισμού των οξικών και των γαλακτικών βακτηρίων, τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα υπολειπόμενα σάκχαρα για να αυξήσουν την πτητική οξύτητα. Το οξικό οξύ έχει αρνητικό αντίκτυπο στην επίδοση των ζυμών κατά τη ζύμωση και επηρεάζει την ποιότητα ορισμένων τύπων οίνου όταν υπάρχει πάνω από ορισμένη συγκέντρωση σε αυτόν (Ribereau-Gayon, R., et al, 2006).

Η πτητική οξύτητα προέρχεται τα οξέα της οξικής σειράς που υπάρχουν στον οίνο τόσο σε ελεύθερη κατάσταση όσο και συνδυασμένα ως άλατα. Η πτητική οξύτητα των οίνων πρέπει να είναι πάντα χαμηλή καθώς σε υπερβολικές ποσότητες τα πτητικά οξέα θεωρούνται ως ένα χαρακτηριστικό αλλοίωσης που προσδίδει στον οίνο μια πικρή γεύση και ένα δυσάρεστο άρωμα ξυδιού. Πιο συγκεκριμένα, το οξικό οξύ συνήθως εμφανίζεται στους οίνους σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,2 – 0,6 g/L, αλλά μπορεί να είναι και υψηλότερη κάτω από ορισμένες συνθήκες. Σύμφωνα με τον OIV, το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο για την πτητική οξύτητα στους περισσότερους οίνους είναι 1,2 g/L οξικού οξέος. Αναφέρεται πως χρειάζεται συγκέντρωση τουλάχιστον 0,9 g/L για να γίνει αντιληπτή πικρή, ξινή επίγευση στον οίνο και δεν προκαλεί έντονη οσμή (A Vilela-Moura 2011).

Τα υψηλά επίπεδα πτητικής οξύτητας ωστόσο, μπορεί να είναι αποδεκτά σε ορισμένους τύπους οίνου όπως οι παγωμένοι οίνοι και οι οίνοι που έχουν παραχθεί από σταφύλια προσβεβλημένα από τον *Botrytis cinerea*, με μέγιστο όριο οξικού οξέος 2,1 g/L. Το οξικό οξύ μπορεί να σχηματιστεί ανά πάσα στιγμή από την αρχή της παραγωγής του οίνου (στα σταφύλια), μέχρι το τελικό προϊόν (εμφιαλωμένος οίνος). Για παράδειγμα, μπορεί να παραχθεί πριν από την αλκοολική ζύμωση από βακτηριακή αλλοίωση σταφυλιών που έχουν προσβληθεί από *Botrytis cinerea*. Η μυκητιακή αυτή μόλυνση οδηγεί σε ρήξη του φλοιού του σταφυλιού, επιτρέποντας στα βακτήρια την πρόσβαση στο εσωτερικό του και κατά συνέπεια τον σχηματισμό οξικού οξέος (Ribereau-Gayon, R., et al, 2006).

Το οξικό οξύ σχηματίζεται επίσης ως παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης από τον *Saccharomyces cerevisiae*. Έρευνες έχουν δείξει ότι σχηματίζεται κυρίως στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης και η παραγωγή του επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως, το στέλεχος της ζύμης, την σύσταση του γλεύκους, τις συνθήκες της ζύμωσης (περιεκτικότητα σε άζωτο, βιταμίνες, αρχική συγκέντρωση σακχάρων) και άλλους φυσικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία. Επιπλέον, οι αναερόβιες

συνθήκες, οι τιμές pH κάτω από 3,1 ή πάνω από 4,0 και η υπερβολική διαύγαση του σταφυλοπολτού είναι μεταξύ άλλων παραγόντων που ευνοούν την παραγωγή οξικού οξέος από τον *S. cerevisiae* (Ribereau-Gayon, R., et al, 2006).

Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στον σχηματισμό του οξικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του γλεύκους, είναι μεταξύ άλλων, προϊόντα που προέρχονται από την ανισορροπία θρεπτικών συστατικών και τον ανταγωνισμό μεταξύ συνυπαρχόντων ζυμομυκήτων και βακτηριακών πληθυσμών κατά την ταυτόχρονη μηλογαλακτική ζύμωση. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος ή/και τα βακτήρια οξικού οξέος (*Acetobacter pasteurianus* και *Acetobacter liquefaciens*) που επιβιώνουν κατά της διάρκεια της ζύμωσης μπορούν επίσης να αυξήσουν την περιεκτικότητα σε οξικό οξύ και να προκαλέσουν αλλοίωση στον οίνο. Τέλος, ακόμη και μετά την εμφιάλωση, οι ερυθροί οίνοι μπορεί κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες, να φέρουν έναν μικρό πληθυσμό οξικών βακτηρίων που μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε φιάλες που αποθηκεύονται σε όρθια θέση, αλλοιώνοντας τον οίνο (A Vilela-Moura 2011).

3.4 *Oenococcus oeni*

Τα γαλακτικά βακτήρια είναι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο σταφύλι και κατά συνέπεια και στον οίνο. Ανάλογα τη σύσταση του μέσου αναπτύσσονται και προκαλούν διάφορες τροποποιήσεις στη σύσταση του γλεύκους, κάποιες φορές επιθυμητές όπως η μηλογαλακτική ζύμωση και άλλες ανεπιθύμητες. Ακόμα και αν πρόκειται για το ίδιο είδος γαλακτικών βακτηρίων, είναι ικανά να ακολουθήσουν διαφορετικές μεταβολικές οδούς, ανάλογα με το διαθέσιμο αποικοδομησιμο υπόστρωμα (Togores, 2018).

Τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται στον οίνο εκτός από την κατηγορία στελέχους στην οποία ανήκουν, ταξινομούνται επίσης και σε ομογαλακτικά ή ετερογαλακτικά ανάλογα τη μεταβολική οδό που ακολουθούν. Τα ομογαλακτικά βακτήρια παράγουν γαλακτικό οξύ κατά τη γλυκόλυση, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη γλυκόζη, ενώ τα ετερογαλακτικά βακτήρια εκτός από γαλακτικό οξύ παράγουν ταυτόχρονα και άλλα προϊόντα όπως είναι το οξικό οξύ και η αιθανόλη (Togores, 2018).

Το γένος *Oenococcus oeni* αποτελείται από κύτταρα ελλειψοειδούς σχήματος τα οποία έχουν μέγεθος 0,5 – 0,7 μm σε διάμετρο και συναντώνται είτε σε ζεύγη είτε σε μικρές αλυσίδες. Αναπτύσσονται σε προαιρετικά αναερόβιο περιβάλλον, η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους κυμαίνεται από 20 – 30 °C και είναι ετερογαλακτικά (Togores, 2018). Ο *O. oeni* είναι το κύριο γαλακτικό βακτήριο που εμπλέκεται στην οινοποίηση και ο κύριος ρόλος του είναι η διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης (MLF), δηλαδή της αποκαρβοξυλίωσης του L – μηλικού οξέος σε L – γαλακτικό και CO₂ (J Vicente et al., 2022). Η δράση του αφορά όλους τους ερυθρούς οίνους και έναν διαρκώς αυξανόμενο αριθμό λευκών και στις βάσεις των αφρωδών. Την τελευταία δεκαετία, γίνεται όλο και πιο γνωστό ότι ο *O. oeni* εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα δευτερογενών μεταβολικών δραστηριοτήτων κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, οι οποίες έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Αυτές οι δευτερογενείς δραστηριότητες περιλαμβάνουν τον μεταβολισμό των οργανικών οξέων, των υδατανθράκων, των πολυσακχαριτών και των αμινοξέων και ενός μεγάλου αριθμού ενζύμων όπως οι γλυκοζιδάσες, οι εστεράσες και οι πρωτεάσες, οι οποίες παράγουν πτητικές ενώσεις, πολύ πιο πάνω από το όριο ανίχνευσης της οσμής τους (Bartowsky & Borneman 2011).

Υπάρχει αρκετά μεγάλη φαινοτυπική παραλλαγή μεταξύ των στελεχών του *O. oeni* και είναι βασικός παράγοντας για την παραγωγή οίνων διαφορετικού στυλ. Επιπλέον, τα στελέχη αυτά διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να μεταβολίζουν το L - μηλικό οξύ, ωστόσο, τα στελέχη που επιλέγονται για εμπορική χρήση, επιλέγονται συνήθως με βάση την ικανότητά τους να μεταβολίζουν αποτελεσματικά το μηλικό οξύ και να προσδίδουν στον οίνο επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Παράλληλα πρόσφατα, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τον χαρακτηρισμό στελεχών *O. oeni* που είναι μοναδικά σε συγκεκριμένες γεωγραφικές οινοπαραγωγικές περιοχές, προκειμένου να ενισχυθεί η τοπικότητα των οίνων (Bartowsky & Borneman 2011).

Το βακτήριο *O. oeni* έχει μια εκτεταμένη σειρά μεταβολικών οδών και ενζύμων που παράγουν δευτερογενείς πτητικές ενώσεις σε συγκεντρώσεις πολύ πάνω από το κατώφλι ανίχνευσης οσμών, οι ενώσεις αυτές συμπεριλαμβάνουν τον αιθυλεστέρα και τους οξικούς εστέρες, τις ανώτερες αλκοόλες, τα καρβονύλια, τα λιπαρά πτητικά οξέα και τις θειούχες ενώσεις. Οι συγκεντρώσεις και ο τύπος των παραπάνω ενώσεων που παράγονται στον οίνο επηρεάζονται από την παραλλαγή από στέλεχος σε στέλεχος των βακτηρίων και από τις μεταβολικές τους ικανότητες. Για παράδειγμα, κάποια στελέχη *O. oeni* συνεισφέρουν στο πιο ουδέτερο άρωμα και γεύση στον ερυθρό και τον λευκό οίνο ενώ άλλα ενισχύουν το φρουτώδη ή τον βουτυρώδη χαρακτήρα (Bartowsky & Borneman 2011).

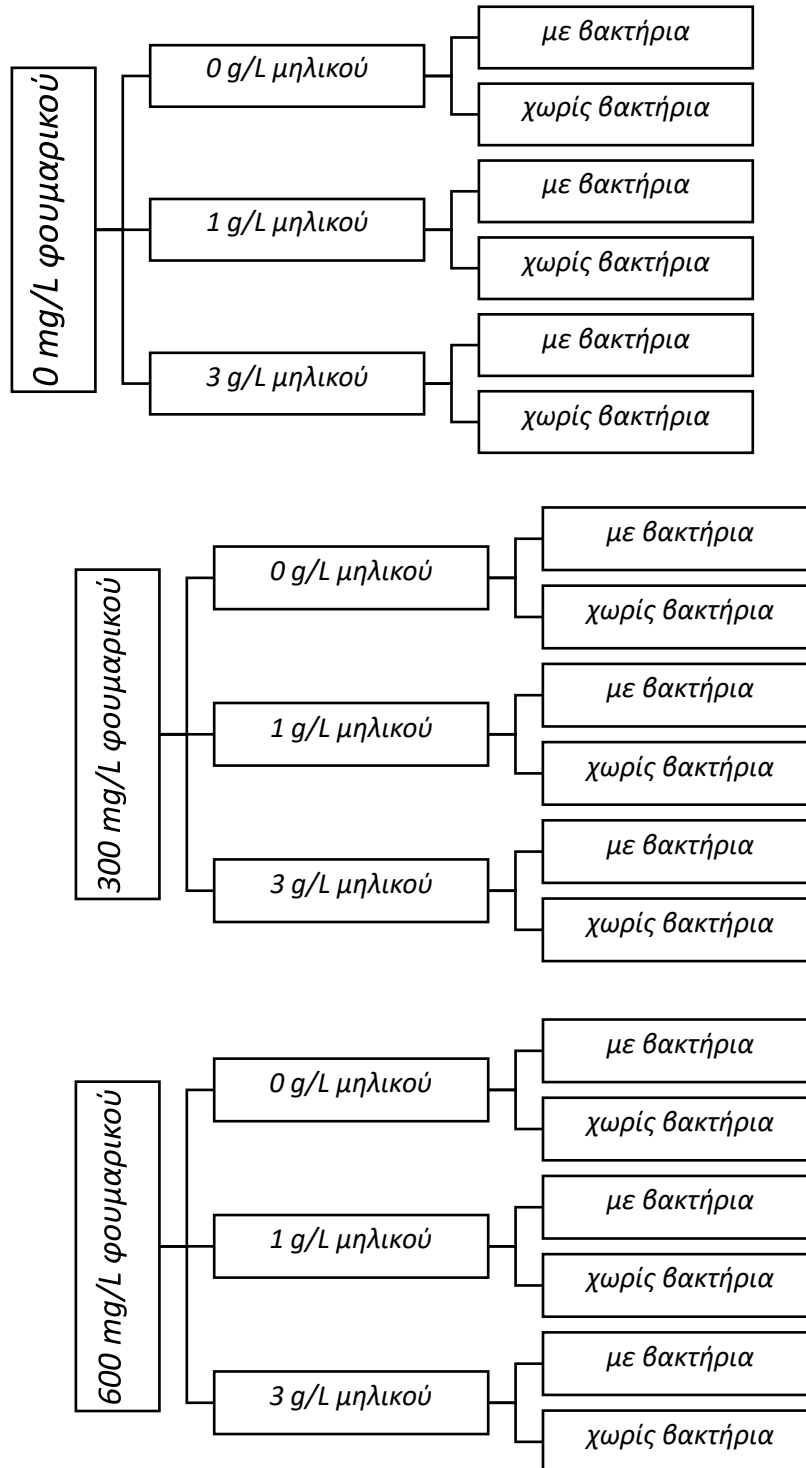
Το *O. oeni* λειτουργεί ως οδηγός για τον μεταβολισμό του κιτρικού οξέος κατά διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Το διακετύλιο είναι ένας σημαντικός δευτερογενής μεταβολίτης που σχετίζεται με την παραπάνω διαδικασία. Η τελική συγκέντρωση του διακετυλίου που θα παραχθεί κατά τη ζύμωση εξαρτάται από το στέλεχος του *O. oeni*. Τα στελέχη που παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να ενισχυθούν μέσω της οινοποιητικής τεχνικής που θα χρησιμοποιηθεί και επιπλέον, μέσω αυτής, να διατηρηθεί η επιθυμητή συγκέντρωση διακετυλίου ώστε να τονιστεί ο βουτυρένιος χαρακτήρας του οίνου (Bartowsky and Henschke et al., 2004).

Τέλος, το *O. oeni*, διαθέτει πολυάριθμες γλυκοζιδάσες, των οποίων οι δραστηριότητες συμβάλλουν στην απελευθέρωση πολυάριθμων αρωματικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων των μονοτερπενίων, των νορισοπρενοειδών και των αλειφατικών ενώσεων, εκ των οποίων όλες συμβάλλουν στον φρουτώδη και ανθικό χαρακτήρα του οίνου (EJ Bartowsky AR Borneman et al., 2011).

4. Υλικά και μέθοδοι ανάλυσης

4.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα οίνου που έπρεπε να παρασκευάσουμε προέρχονται από Μοσχοφίλερο και είναι τα εξής:

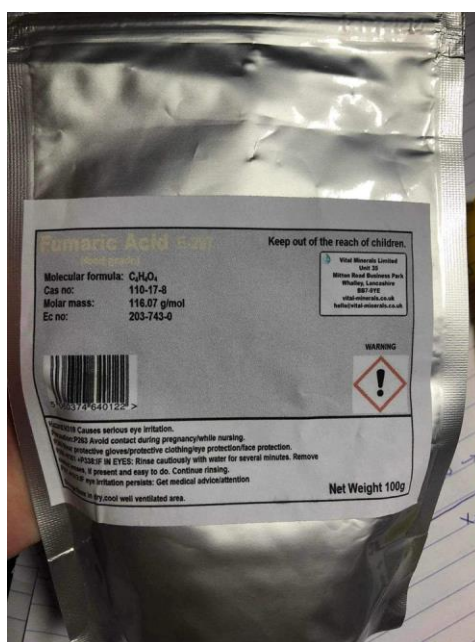


Σχήμα 1: Πορεία προετοιμασίας δειγμάτων

Συνολικά λοιπόν, χρειαστήκαμε 18 L οίνου τα οποία χωρίσαμε σε 36 διαφορετικά δείγματα των 500 mL τα οποία βάλουμε σε πλαστικά μπουκάλια ώστε εκτός από τις αρχικές μετρήσεις, να πραγματοποιήσουμε μετρήσεις και σε 3 και σε 6 μήνες. Όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα, οι προσθήκες που έγιναν αφορούν το φουμαρικό οξύ, το μηλικό οξύ και βακτήρια του στελέχους *Oenococcus oeni*. Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασίες περίπου 25 °C.

i. Προετοιμασία φουμαρικού οξέος

Χρησιμοποιήθηκε φουμαρικό οξύ σε σκόνη και οι προσθήκες που έγιναν ήταν 0 mg/L, 300 mg/L και 600 mg/L. Μετά από υπολογισμούς, βρέθηκε πως χρειάστηκε να διαλυθούν 5,4 g φουμαρικού οξέος σε 3L οίνου, ωστόσο διαλύθηκαν 6,3 g σε 3,5 L οίνου για τυχόν απώλειες. Σε μεγάλο δοχείο προστέθηκαν 2,5 L οίνου στα οποία προστέθηκε η ποσότητα του φουμαρικού οξέος που ήταν προς διάλυση και τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα για 60 – 90 λεπτά. Αφού διαλύθηκε εντελώς το φουμαρικό οξύ, συμπληρώθηκε και η υπόλοιπη ποσότητα του οίνου για να συμπληρωθούν τα 3,5 L.



Εικόνα 5: Φουμαρικό οξύ (99,9%)

Στη συνέχεια, σε έναν μεγάλο περιέκτη προστέθηκαν τα 2 L από τον οίνο με το διαλυμένο φουμαρικό οξύ που παρασκευάστηκε και συμπληρώσαμε 1 L οίνου χωρίς φουμαρικό ώστε να φτάσει συνολικά σε όγκο 3 L. Από αυτό το διάλυμα των 3 L τα 2 L χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή δειγμάτων με περιεκτικότητα 600 mg φουμαρικού/L και το υπόλοιπο 1 L για την παρασκευή δειγμάτων με περιεκτικότητα 300 mg φουμαρικού/L, φέρνοντας τα σε συνολικό όγκο 6 L το κάθε ένα χρησιμοποιώντας οίνο χωρίς προσθήκη φουμαρικού.

Από τον συνολικό όγκο των 6 L οίνου που παρασκευάστηκε, με περιεκτικότητα 600 mg φουμαρικού/L, χρησιμοποιήθηκαν 2 L ως έχουν (ώστε να μην έχουν καθόλου μηλικό οξύ – 0 g/L), σε 2 L προστέθηκαν 2 g μηλικού οξέος και σε 2 L προστέθηκαν 6 g μηλικού οξέος, οπότε τα δείγματα είχαν τελικά συγκέντρωση 1 g/L και 3 g/L αντίστοιχα. Κάθε δείγμα των 2 L θα μοιραστεί σε 4 μπουκαλάκια των 500 mL.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε για την προσθήκη του μηλικού οξέος και για την παρασκευή δειγμάτων με περιεκτικότητα 0 mg φουμαρικού/L και 300 mg φουμαρικού/L.

Επιπλέον κρατήθηκε και 1 L οίνου χωρίς καμία προσθήκη για τυχόν λάθη που μπορεί να συμβούν. Αφού πλέον τα δείγμα ήταν έτοιμα, ακολούθησε η προσθήκη των βακτηρίων *Oenococcus oeni*.

ii. Προετοιμασία βακτηρίων:

Τα βακτήρια που χρησιμοποιήσαμε ήταν αρχικά σε ξηρή μορφή οπότε έπρεπε να τα ενυδατώσουμε πριν τη χρήση. Γνωρίζουμε πως για κάθε 100L οίνου, χρειάζεται 1g βακτηρίων.

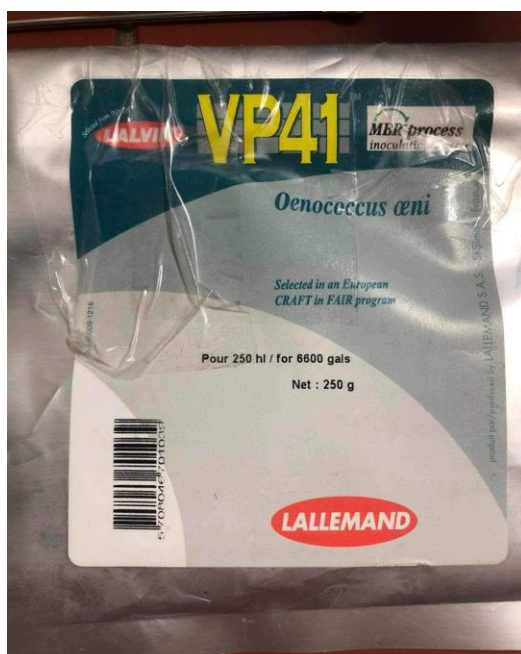
Αντιδραστήρια:

1. 1,1g βακτήρια *Oenococcus oeni*
2. 10mL εμφιαλωμένο νερό (απουσία χλωρίου)
3. 90mL δείγματος οίνου

Υλικά:

- ποτήρι ζέσεως
- αναλυτικός ζυγός
- σιφόνιο 10mL και 50mL
- ογκομετρική φιάλη 100mL
- μικροπιπέτα

Τα βακτήρια ήταν σε ξηρή μορφή οπότε το πρώτο πράγμα που χρειαζόταν να γίνει είναι η ενυδάτωση τους. Γνωρίζουμε πως για 100 L οίνου, χρειαζόμαστε 1g βακτηρίων για να ενυδατωθεί, κάθε 1 g βακτηρίων θα ενυδατωθεί σε 10 mL εμφιαλωμένο νερό (χωρίς χλώριο). Θέλαμε το τελικό δείγμα να είναι 100 mL μαζί με προσθήκη κρασιού (προσθέτουμε κρασί για να μην πάθουν “σοκ” τα βακτήρια από την αλλαγή συνθηκών), άρα διαλύσαμε 1,1 g βακτηρίων σε 10 mL νερό για περίπου 20 λεπτά και έπειτα προσθέτουμε 90 mL οίνου. Επομένως κάθε μπουκαλάκι των 500 mL με οίνο, εμβολιάστηκε με 0,005 g βακτηρίων (500 μ L με πιπέτα).



Εικόνα 6: Σκεύασμα γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus oeni*

4.2 Αναλύσεις

4.2.1 pH

Η τιμή του pH είναι ένα μέτρο ισορροπίας της συγκέντρωσης ή δραστηριότητας των ιόντων υδρογόνου (H^+), των καρβοξυλομάδων που βρίσκονται στο γλεύκος ή στον οίνο σε διάσταση διαδικασία μέτρησης του pH βασίζεται στη διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων βυθισμένων στο υπό δοκιμή δείγμα. Το ένα από αυτά τα δύο ηλεκτρόδια έχει δυναμικό που είναι συνάρτηση του pH του υγρού, ενώ το άλλο έχει σταθερό και γνωστό δυναμικό και αποτελεί το ηλεκτρόδιο αναφοράς.

Αντιδραστήρια:

1. δείγμα οίνου προς ανάλυση
2. ρυθμιστικά διαλύματα αναφοράς – buffer με pH 4 και pH 7, έτοιμα από το εμπόριο

Υλικά:

- pHμετρο
- Ηλεκτρόδια

Μέθοδος:

Πριν από οποιαδήποτε μέτρηση πρέπει να πραγματοποιηθεί μηδενισμός του pHμετρου, σύμφωνα με τις οδηγίες που δίνονται από τον εκάστοτε κατασκευαστή, χρησιμοποιώντας τα ρυθμιστικά διαλύματα buffer. Έπειτα, βυθίσαμε το ηλεκτρόδιο στο δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί, του οποίου η θερμοκρασία ήταν μεταξύ 20 – 25 °C και σημειώσαμε την ένδειξη. Η ένδειξη του οίνου αναφέρεται με δύο δεκαδικά ψηφία.

4.2.2 Ογκομετρούμενη οξύτητα

Ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα του οίνου, είναι το άθροισμα των τιτλοδοτούμενων οξέων του όταν γίνεται τιτλοδότηση σε $pH = 7$ με τη χρήση ενός τυπικού αλκαλικού διαλύματος, πιο συγκεκριμένα, αντιστοιχεί στην ποσότητα καυστικού νατρίου ($NaOH$ 0,1N) που χρειάζεται για την εξουδετέρωση των όξινων ομάδων ώστε το pH να γίνει 7.

Η ολική οξύτητα καθορίζεται από το σύνολο των καρβοξυλομάδων του γλεύκους ή του οίνου και εξαρτάται από την περιεκτικότητά του σε οργανικά οξέα ενώ όχι από το είδος τους, καθώς και από την περιεκτικότητά του σε ανόργανα ανιόντα και κατιόντα. Το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) δεν περιλαμβάνεται στη συνολική οξύτητα.

Αντιδραστήρια:

1. αποσταγμένο νερό
2. διάλυμα καυστικού νατρίου ($NaOH$ 0,1N)
3. διάλυμα υδροχλωρίου (HCl 0,1M)
4. δείκτης φαινολοφθαλεΐνης
5. δείγμα οίνου προς ανάλυσης

Υλικά:

- ποτήρια ζέσεως
- ογκομετρική φιάλη 250 mL
- σιφώνια πλήρώσεως 10 mL, 20 mL, 25 mL
- κωνική φιάλη 250 mL
- προχοΐδα
- λουτρό υπερήχων

- υδροβολέας

Μέθοδος:

Πριν τον προσδιορισμό της ογκομετρούμενης οξύτητας χρειάστηκε να γίνει τιτλοδότηση του διαλύματος NaOH με πρότυπο διάλυμα HCl 0,1M. Σε ογκομετρική φιάλη 250 mL μεταφέραμε 20mL διαλύματος NaOH με σιφώνιο πλήρωσεως 20 mL και συμπληρώσαμε με αποσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Στη συνέχεια, σε κωνική φιάλη 250 mL μεταφέραμε 25 mL από το διάλυμα NaOH που παρασκευάσαμε με σιφώνιο πλήρωσεως 25 mL, προσθέσαμε 2 – 3 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης και πραγματοποιήσαμε ογκομέτρηση με πρότυπο διάλυμα HCl 0,1M. Σημειώσαμε την κατανάλωση και η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές. Έτσι βρήκαμε τον τίτλο του διαλύματος.

Έπειτα, ακολούθησε η προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση. Σε ένα ποτήρι ζέσεως προσθέσαμε περίπου 20 mL οίνου και το τοποθετήσαμε σε λουτρό υπερήχων για περίπου 30 δευτερόλεπτα ώστε να αφαιρέσουμε το CO₂. Από το ποτήρι ζέσεως μεταφέραμε με σιφώνιο πλήρωσεως 10 mL οίνου σε μια κωνική φιάλη 250 mL, προσθέσαμε 10 mL αποσταγμένο νερό και 2 – 3 σταγόνες φαινολοφθαλεΐνης. Με συνεχόμενη ανάδευση προσθέσαμε προοδευτικά, από την προχοΐδα πρότυπο διάλυμα NaOH 0,1M μέχρι να εμφανιστεί ροδίζουσα χροιά και να διατηρηθεί για 10 -15 sec. Σημειώσαμε τα καταναλωθέντα mL του διαλύματος NaOH 0,1M. Την ίδια διαδικασία ακολουθήσαμε για όλα τα δείγματα.

Αρχικά υπολογίσαμε την ογκομετρούμενη οξύτητα εκφρασμένη σε g/L τρυγικού οξέος, στη συνέχεια την υπολογίσαμε και σε meq/L ώστε να συγκρίνουμε την επίδραση του κάθε οξέος ξεχωριστά στα δείγματά μας.

Για την έκφραση της ογκομετρούμενης οξύτητας σε g/L τρυγικού οξέος:

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

όπου α: η κατανάλωση του πρότυπου διαλύματος NaOH

V: ο όγκος του δείγματος οίνου

N: η κανονικότητα του πρότυπου διαλύματος NaOH

επιπλέον, το $M_{\text{τρυγικού}} = 150,09 \text{ g/mole}$, όμως το τρυγικό οξύ είναι διπρωτικό, δηλαδή έχει δύο καρβοξυλομάδες στο μόριό του, επομένως το ισοδύναμο βάρος του είναι: $150,09 / 2 = 75,04 \text{ g/mole}$.

Το πρότυπο διάλυμα NaOH που χρησιμοποιήσαμε για τον υπολογισμό της ογκομετρούμενης οξύτητας στους 3 μήνες είχε κανονικότητα 0,1M, άρα για την εύρεση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήσαμε τον τύπο ογκομετρούμενη οξύτητα (g/L) = α * 0,75. Στους 6 μήνες ωστόσο, το πρότυπο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είχε κανονικότητα 0,09M, συνεπώς ο τύπος που χρησιμοποιήσαμε είναι ογκομετρούμενη οξύτητα (g/L) = α * 0,675.

Για την έκφραση της ογκομετρούμενης οξύτητας σε meq/L:

$$\bullet \text{ ογκομετρούμενη οξύτητα (meq/L) = [(g/L) * 1000] / eq. wt.}$$

Όπου g/L: η ογκομετρούμενη οξύτητα εκφρασμένη σε τρυγικό οξύτητας

et. wt.: το ισοδύναμο βάρος του τρυγικού οξέος (το οποίο όπως αναφέραμε και πριν είναι 75,04g αφού το τρυγικό οξύ είναι διπρωτικό).

4.2.3 CIELab

Το χρώμα του οίνου είναι ένα από τα σημαντικότερα οπτικά του χαρακτηριστικά, αφού μας παρέχει έναν αρκετά σημαντικό αριθμό πληροφοριών για την ποιότητά του. Σύμφωνα με την επιτροπή Internationale de l'Éclairage (CIE, 1976), η φασματοφωτομετρική μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε για τον προσδιορισμό του χρώματος των δειγμάτων μας, προσπαθεί να μιμηθεί πραγματικούς παρατηρητές όσον αφορά την αίσθηση του χρώματος.

Το χρώμα του οίνου μπορεί να περιγραφεί χρησιμοποιώντας 3 χαρακτηριστικά της όρασης, την τονικότητα, την φωτεινότητα και τον χρωματισμό. Η τονικότητα περιγράφει το ίδιο το χρώμα και είναι το πιο χαρακτηριστικό. Περιγράφεται με βάση τα τέσσερα χρώματα, κόκκινο, κίτρινο, πράσινο ή μπλε. Η φωτεινότητα αναφέρεται στο πόσο φωτεινή ή σκοτεινή είναι η οπτική αίσθηση του οίνου ενώ ο χρωματισμός προσδιορίζει την ένταση του χρώματος.

Τα χρωματικά χαρακτηριστικά του οίνου καθορίζονται από τις χρωματικές συντεταγμένες στο χώρο του CIELab το οποίο βασίζεται σε ένα καρτεσιανό σύστημα τριών ορθογωνίων αξόνων L^* , a^* , b^* , όπου (L^*) είναι η φωτεινότητα, (a^*) η χρωματική συνιστώσα κόκκινο / πράσινο, (b^*) η χρωματική συνιστώσα μπλε / κίτρινο. Επιπλέον προσδιορίζονται και από τα παρακάτω παράγωγα μεγέθη: (C^*) η χρωματική ένταση και (h^*) η χρωματική απόχρωση.

Ειδικότερα, η συντεταγμένη (L^*) που αντιστοιχεί στη διαύγεια μπορεί να πάρει τιμές από 0 = μαύρο μέχρι 100 = άχρωμο. Η συντεταγμένη (a^*) όταν παίρνει θετικές τιμές αναφέρεται στο κόκκινο χρώμα ενώ για αρνητικές στο πράσινο χρώμα, αντίστοιχα η συντεταγμένη (b^*) για θετικές τιμές αφορά το κίτρινο χρώμα ενώ όταν παίρνει αρνητικές τιμές το μπλε χρώμα.

Αντιδραστήρια:

1. δείγμα οίνου
2. απιονισμένο νερό

Υλικά:

- κυψελίδα 10mm
- CIELab

Μέθοδος:

Για να πραγματοποιήσουμε ανάλυση των δειγμάτων στο CIELab είναι απαραίτητο τα δείγματα να είναι διαυγή. Η διαπερατότητα μετρήθηκε από τα 380 έως τα 780nm κάθε 5nm. Αρχικά, χρησιμοποιώντας κυψελίδα ίδιου πάχους με αυτή που θα χρησιμοποιούσαμε για τις μετρήσεις των δειγμάτων του οίνου, μηδενίσαμε το CIELab χρησιμοποιώντας απιονισμένο νερό ως σημείο αναφοράς. Πριν από την ανάλυση κάθε δείγματος η κυψελίδα ξεπλενόταν με το δείγμα προς ανάλυση. Από το CIELab πήραμε τις τιμές των a^* , b^* , L^* , C^* , h^* .

4.2.4 Μέτρηση συγκέντρωσης οξέων με ενζυμικό αναλυτή

Χρησιμοποιήθηκε ένας πολυπαραμετρικός αναλυτής, HYPERLAB SMART, σχεδιασμένος να εκτελεί με πλήρη αυτοματισμό τις ενζυμικές και χρωματομετρικές αναλύσεις που είναι απαραίτητες για τον έλεγχο των διαδικασιών οινοποίησης και ποιότητας του ίδιου του οίνου. 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.

Η επιφάνεια εργασίας στεγάζει την πλάκα υποδοχής του αντιδραστηρίου, την πλάκα υποδοχής του δείγματος, τις κυψελίδες, τον βραχίονα δειγματοληψίας υψηλής ακρίβειας εξοπλισμένο με χαλύβδινη βελόνα AISI 316 και έναν σταθμό πλύσης της βελόνας. Ο βραχίονας είναι τοποθετημένος εκεί ώστε να εκτελεί όλες τις λειτουργίες δειγματοληψίας και διανομής υγρών. Ο βραχίονας περιστρέφεται 360° ξεκινώντας και τελειώνοντας τη στροφή στη μέση του δίσκου αντιδραστηρίου. Συνδεδεμένος

σε υπολογιστή, οδηγείται από ειδικό λογισμικό. Κατά τη διάρκεια του κύκλου ανάλυσης, η βελόνα περνά πάνω από όλα τα δοχεία αντιδραστηρίων, τις κυψελίδες αντίδρασης και τα σωληνάρια δείγματος.

Η προετοιμασία του προϊόντος της αντίδρασης ξεκινάει με την απόσυρση του αντιδραστήριου που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί και του δείγματος που διαχωρίζεται με κενό αέρα, τη διανομή στην κυψελίδα αντίδρασης, την ανάμιξη και τη φωτομετρική ανάγνωση για την αξιολόγηση της φωτομετρικής παρεμβολής του δείγματος δοκιμής. Στην κυψελίδα αντίδρασης διανέμεται στη συνέχεια το δεύτερο αντιδραστήριο, σύμφωνα με την αναλυτική μέθοδο. Το σύστημα καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης λαμβάνει φωτομετρικές αναλύσεις για να ελέγχει τη σωστή ανάπτυξη της κινητικής αντίδρασης. Στο τέλος του χρόνου που ορίζεται από τη μέθοδο, το προϊόν της αντίδρασης που αναπτύχθηκε, διαβάζεται στο προγραμματισμένο μήκος κύματος και η καταγεγραμμένη απορρόφηση μετατρέπεται σε συγκέντρωση μέσω κατάλληλων υπολογιστικών αλγορίθμων.

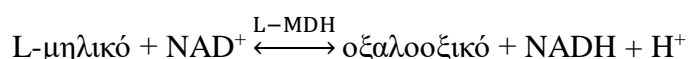
Να σημειωθεί ότι τα δείγματα τοποθετούνται στον ενζυμικό αναλυτή χωρίς να προηγηθεί κάποια επεξεργασία, πρέπει όμως να είναι διαυγή.

Για να είναι δυνατή η ανίχνευση του μηλικού, του γαλακτικού και του οξικού οξέος στο δείγμα, οι συγκεντρώσεις τους πρέπει να είναι έως 1,25 g/L, 2,5 g/L και 2 g/L αντίστοιχα. Διαφορετικά χρειάζεται να γίνει αραιώση στα δείγματα πριν την ανάλυση.

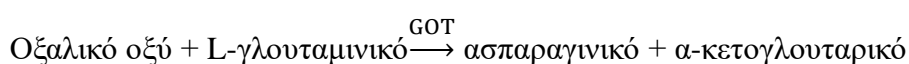
Για τις μετρήσεις των οξέων στα δείγματα βασιστήκαμε στις παρακάτω ενζυμικές αντιδράσεις:

- Μηλικό οξύ

Το L – μηλικό οξύ οξειδώνεται από το νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (NAD) σε οξαλοοξικό, σε μια αντίδραση που καταλύεται από την L – μηλική αφυδρογονάση (L – MDH):



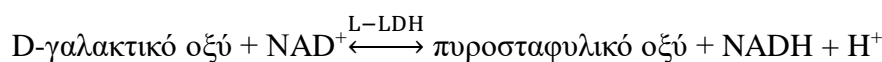
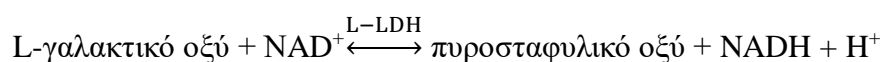
Η ισορροπία της αντίδρασης κανονικά στρέφεται πιο έντονα προς τη δημιουργία του L – μηλικού. Σε περίπτωση όμως απομάκρυνσης του οξαλοοξικού, η ισορροπία μετατοπίζεται προς τα δεξιά (δηλαδή προς τη δημιουργία οξαλοοξικού). Έτσι, παρουσία L – γλουταμινικού, το οξαλοοξικό μετατρέπεται σε L – ασπαρτικό σε μια αντίδραση που καταλύεται από την οξαλική γλουταμινική τρανσαμινάση (GOT):



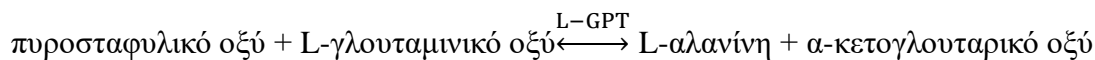
Ένας τρόπος προσδιορισμού του μηλικού οξέος είναι μέσω της ποσότητας NADH που σχηματίζεται. Μετράται η απορρόφηση του NADH σε μήκος κύματος 340nm και από τη στοιχειομετρία της αντίδρασης βλέπουμε ότι η ποσότητα του NADH είναι ανάλογη με την ποσότητα του L – μηλικού που αρχικά υπήρχε.

- Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ (L – γαλακτικό και D – γαλακτικό) οξειδώνονται από το νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (NAD) σε πυροσταφυλικό οξύ σε μια αντίδραση που καταλύεται από την L – γαλακτική αφυδρογονάση (L – LDH) και την D – γαλακτική αφυδρογονάση (D – LDH).



Η ισορροπία της αντίδρασης κανονικά στρέφεται πιο έντονα προς τη δημιουργία του γαλακτικού οξέος. Σε περίπτωση όμως απομάκρυνσης του πυροσταφυλικού οξέος, η ισορροπία μετατοπίζεται προς τα δεξιά (δηλαδή προς τη δημιουργία πυροσταφυλικού οξέος). Έτσι, παρουσία L – γλουταμινικού, το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε L – αλανίνη σε μια αντίδραση που καταλύεται από την πυροσταφυλική γλουταμινική τρανσαμινάση (GPT):

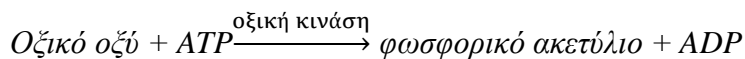


Ένας τρόπος προσδιορισμού του γαλακτικού οξέος είναι μέσω της ποσότητας NADH που σχηματίζεται. Μετράται η απορρόφηση του NADH σε μήκος κύματος 340nm και από τη στοιχειομετρία της αντίδρασης βλέπουμε ότι η ποσότητα του NADH είναι ανάλογη με την ποσότητα του γαλακτικού οξέος που υπήρχε αρχικά.

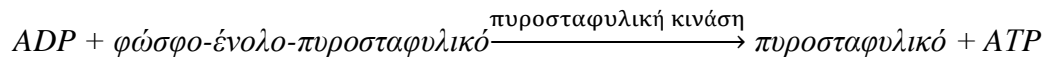
Το L – γαλακτικό και το D – γαλακτικό μπορούν να προσδιοριστούν και ξεχωριστά χρησιμοποιώντας τις αντιδράσεις (1) και (3) και (2) και (3) αντίστοιχα.

- Οξικό οξύ

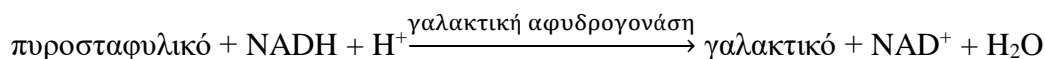
Παρουσία τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) το οξικό οξύ μετατρέπεται σε φωσφορικό ακετύλιο σε μια αντίδραση που καταλύεται από την οξική κινάση.



Η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) που σχηματίζεται από την αντίδραση αυτή μετατρέπεται ξανά σε ATP σε μια αντίδραση με φωσφο-ένολο-πυροσταφυλικό που καταλύεται από την πυροσταφυλική κινάση.



Έπειτα, το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται σε L – γαλακτικό από την ανηγμένη μορφή του νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου (NADH) που καταλύεται από τη γαλακτική αφυδρογονάση.



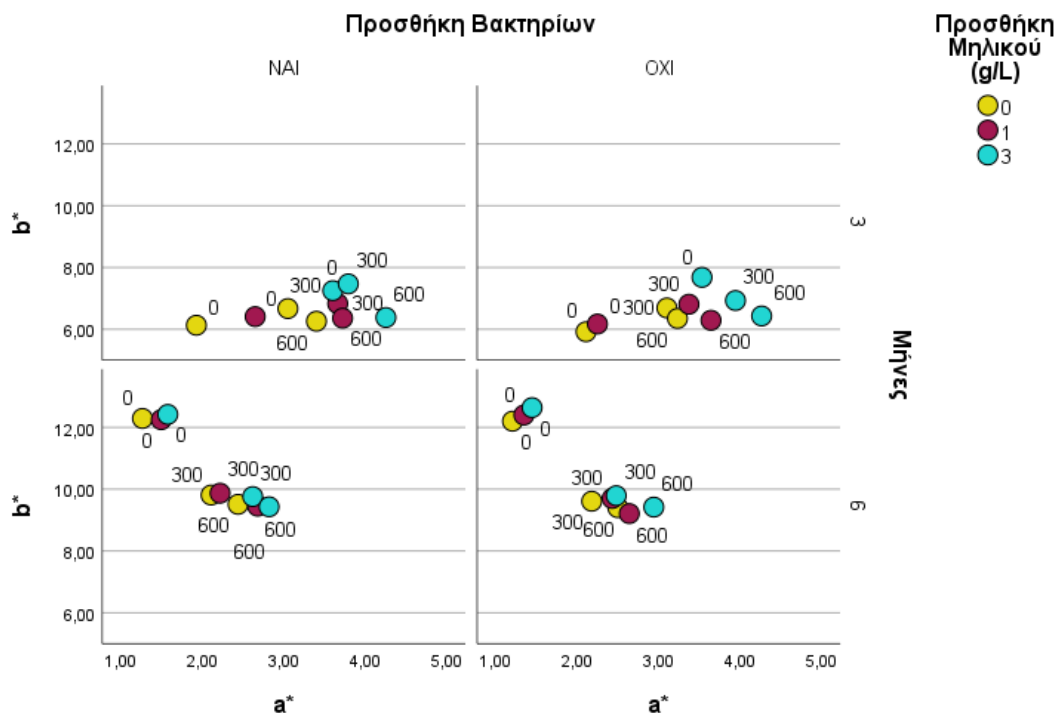
Η ποσότητα του οξειδωμένου NADH στην αντίδραση (3) καθορίζεται από την απορρόφηση σε μήκος κύματος 340nm και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του οξικού οξέος στον οίνο.

5. Αποτελέσματα

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα του οίνου, τα οποία επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης IBM SPSS Statistics (“Statistical Package for the Social Sciences”), προέκυψαν τα γραφήματα που θα σχολιαστούν παρακάτω. Αναλυτικότερα παρουσιάζονται οι αναλύσεις που έγιναν για τον προσδιορισμό του χρώματος όσον αφορά την ένταση, την απόχρωση, τη φωτεινότητα αλλά και τη χρωματική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων. Γενικότερα η χρωματική ένταση υπολογίζεται από το άθροισμα των απορροφήσεων σε μήκος κύματος 420 nm, 520 nm και 620 nm στις οποίες αντιστοιχεί το κίτρινο, το κόκκινο και το κυανό χρώμα αντίστοιχα. Από την άλλη, η χρωματική απόχρωση του οίνου υπολογίζεται από το πηλίκιο της απορρόφησης στα 420 nm προς αυτήν στα 520 nm. Στην προκειμένη περίπτωση όμως και οι δύο αυτές τιμές

υπολογίστηκαν από το CIELab χωρίς να χρειάζονται περαιτέρω υπολογισμοί. Στη συνέχεια, αναφέρονται τα αποτελέσματα μέτρησης του pH ή ενεργού οξύτητας, της ογκομετρούμενης οξύτητας αλλά και τις διαφορές τους ανάμεσα στα δείγματα οίνου που μετρήθηκαν. Τέλος, παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα της μέτρησης της συγκέντρωσης του μηλικού, γαλακτικού και οξικού οξέος μέσω του ενζυμικού αναλυτή, τα οποία μας δίνουν σημαντικές ενδείξεις για την πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

5.1 Αναλύσεις χρώματος



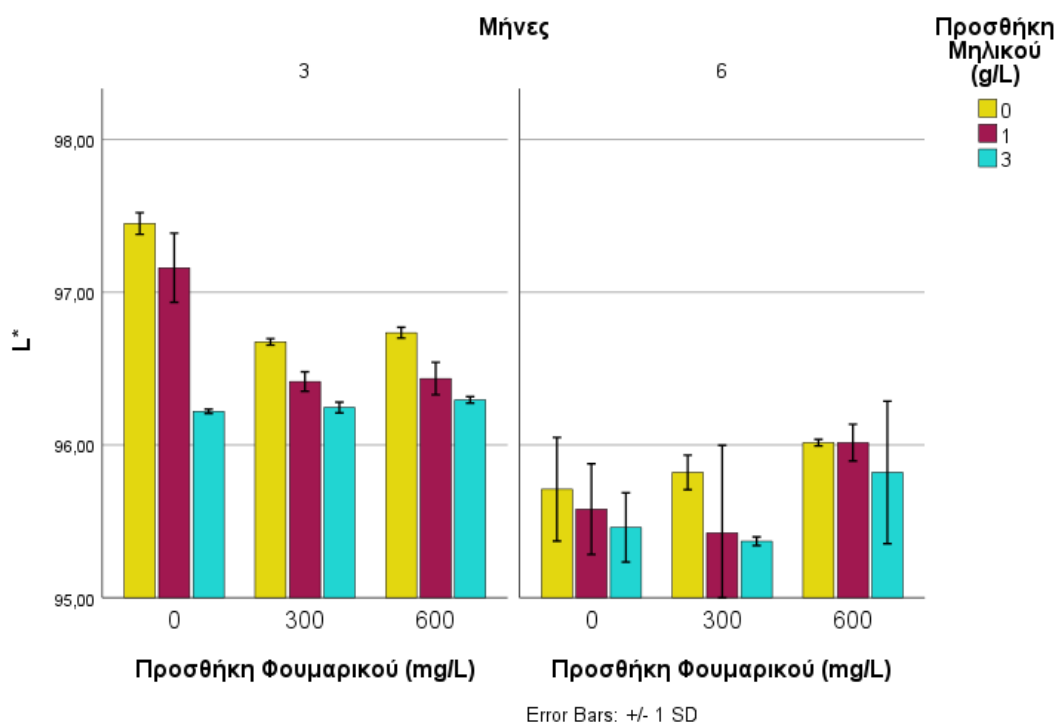
Εικόνα 7: Γράφημα b/a συναρτήσεως της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 3 και 6 μηνών με τη μέθοδο CIELab

Τα “πραγματικά” χρώματα περιγράφονται με τη χρήση των δύο αξόνων στο οριζόντιο επίπεδο. Ο άξονας a^* είναι ο άξονας για το πράσινο ($-a^*$) – κόκκινο ($+a^*$) και ο άξονας b^* πηγαίνει από το μπλε ($-b^*$) στο κίτρινο ($+b^*$). Κάθε χρώμα αντιπροσωπεύεται από ένα χρωματικό σημείο (L^* , a^* , b^*) στον χρωματικό χώρο – τα L^* , a^* και b^* είναι χρωματικές συντεταγμένες του χρωματικού σημείου. Το σύμβολο αστερίσκου (*) των L^* , a^* και b^* υποδηλώνει ότι πρόκειται για το νέο σύστημα χρωμάτων, δηλαδή είναι η συνέχεια του παλαιότερου συστήματος CIELab. Το νέο σύστημα, χρησιμοποιείται πλέον καθολικά για την ποσοτικοποίηση των χρωμάτων, αν και συχνά χρησιμοποιείται η απλουστευμένη σημειογραφία των τιμών, χωρίς το σύμβολο *.

Στην αριστερή στήλη του γραφήματος απεικονίζονται οι τιμές a^* και b^* για τα δείγματα οίνου στα οποία έχει γίνει προσθήκη βακτηρίων *O. oeni*, ενώ στη δεξιά εκείνα στα οποία δεν έχει γίνει προσθήκη βακτηρίων. Επιπλέον, το διάγραμμα είναι χωρισμένο στα αποτελέσματα των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν στο διάστημα 3 και 6 μηνών.

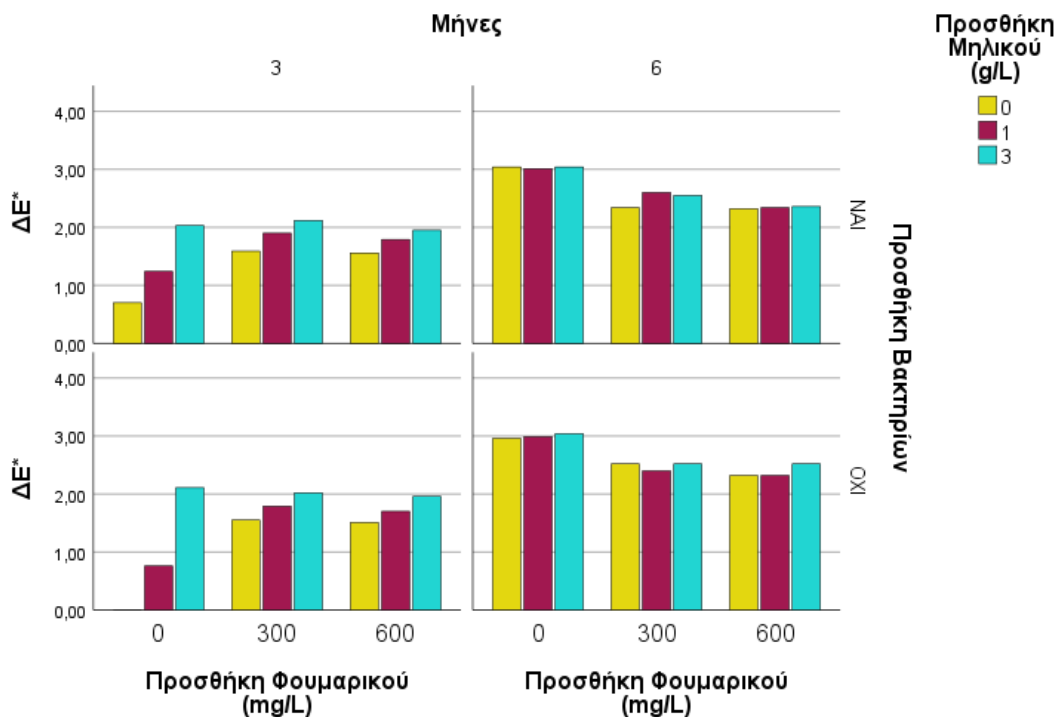
Από το διάγραμμα λοιπόν παρατηρούμε πως η προσθήκη βακτηρίων δεν έχει επιφέρει κάποια διαφοροποίηση στο χρώμα. Φαίνεται επίσης πως με την αύξηση της ποσότητας του μηλικού οξέος, παρατηρείται και αύξηση της τιμής του a^* , δηλαδή αύξηση του κόκκινου χρώματος. Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό καθώς με την προσθήκη μηλικού οξέος, το pH μειώνεται επομένως, θα έχουμε

μεγαλύτερο ποσοστό ανθοκυανών στην ιονισμένη τους μορφή (φλαβύλια), δηλαδή την κόκκινη. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι στους 6 μήνες έχει αυξηθεί και η τιμή του b^* από 2 έως 6 μονάδες περίπου. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην οξείδωση του οίνου κατά την αποθήκευσή του. Η οξείδωση αυτή οδηγεί στην ποιοτική υποβάθμιση των οίνων, η οποία εκφράζεται κυρίως μέσα από την αλλαγή του χρώματός τους. Το χρώμα των λευκών οίνων, όπως και των δειγμάτων μας, μετατρέπεται σε καφέ – πορτοκαλί αποχρώσεις, γνωστό και ως browning. Τέλος, βλέπουμε πως στα δείγματα που δεν έχει γίνει καμία προσθήκη φουμαρικού οξέος, έχει γίνει η μεγαλύτερη αύξηση του κίτρινου χρώματος. Αυτό ίσως να σημαίνει πως το φουμαρικό οξύ καθυστερεί ή εμποδίζει σε ένα βαθμό την οξείδωση του οίνου, ωστόσο αυτό δεν έχει μελετηθεί περαιτέρω.



Εικόνα 8: Γράφημα του L^* συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 3 και 6 μηνών με τη μέθοδο CIELab

Ο άξονας L^* δίνει τη φωτεινότητα. Ένα λευκό αντικείμενο έχει τιμή L^* ίση με 100, ενώ η τιμή ενός μαύρου αντικειμένου ισούται με 0. Τα λεγόμενα αχρωματικά χρώματα, δηλαδή αυτά που υπόκεινται στις αποχρώσεις του γκρι βρίσκονται πάνω στον άξονα L^* . Επομένως συμπεραίνουμε πως όσο πιο μικρό είναι το L^* τόσο πιο σκούρο είναι το δείγμα, δηλαδή λιγότερο φωτεινό. Εδώ παρατηρήθηκε πως στα δείγματα με το περισσότερο μηλικό οξύ η φωτεινότητα ήταν πιο μικρή, αυτό οφείλεται στη μείωση του pH λόγω της προσθήκης του οξέος, με αποτέλεσμα να αλλάζει το χρώμα, να γίνεται πιο κόκκινο και άρα πιο σκούρο. Η προσθήκη των δύο οξέων και κυρίως του μηλικού οξέος, αυξάνει το ποσοστό του κόκκινου χρώματος όπως προαναφέρθηκε, αυτό παρατηρήθηκε και σε άλλες αντίστοιχες έρευνες όπως αυτή του Morata et al., (2019) ο οποίος χρησιμοποίησε άχρωμα υδραλκοολικά διαλύματα στα οποία έγινε προσθήκη οξέων. Παράλληλα, τη φωτεινότητα στο διάστημα των 3 μηνών φάνηκε να επηρεάζει η προσθήκη του φουμαρικού οξέος, καθώς τα δείγματα του οίνου στα οποία είχε γίνει η προσθήκη ήταν πιο σκουρόχρωμα, γεγονός που φαίνεται να μην ισχύει για τα δείγματα στο διάστημα των 6 μηνών.



Εικόνα 9: Γράφημα του ΔE^* συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 3 και 6 μηνών με τη μέθοδο CIELab

Το ΔE^* εκφράζει τη συνολική χρωματική διαφορά των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, το ΔE^* είναι η απόσταση μεταξύ των χρωματικών σημείων δύο χρωμάτων. Για παράδειγμα, το ΔE^*_{ab} είναι η διαφορά μεταξύ των χρωμάτων “1” και “2” που έχουν συντεταγμένες L^*_1, a^*_1, b^*_1 και L^*_2, a^*_2, b^*_2 , αντίστοιχα. Μικρή τιμή του ΔE^*_{ab} υποδηλώνει ότι τα χρώματα είναι κοντά το ένα στο άλλο. Για τη δημιουργία του γραφήματος, ως μάρτυρας, δηλαδή ως τιμή αναφοράς, χρησιμοποιήθηκε το δείγμα στο οποίο δεν έχει γίνει καμία προσθήκη και από αυτό μετρήθηκαν οι αντίστοιχες αποστάσεις του κάθε δείγματος.

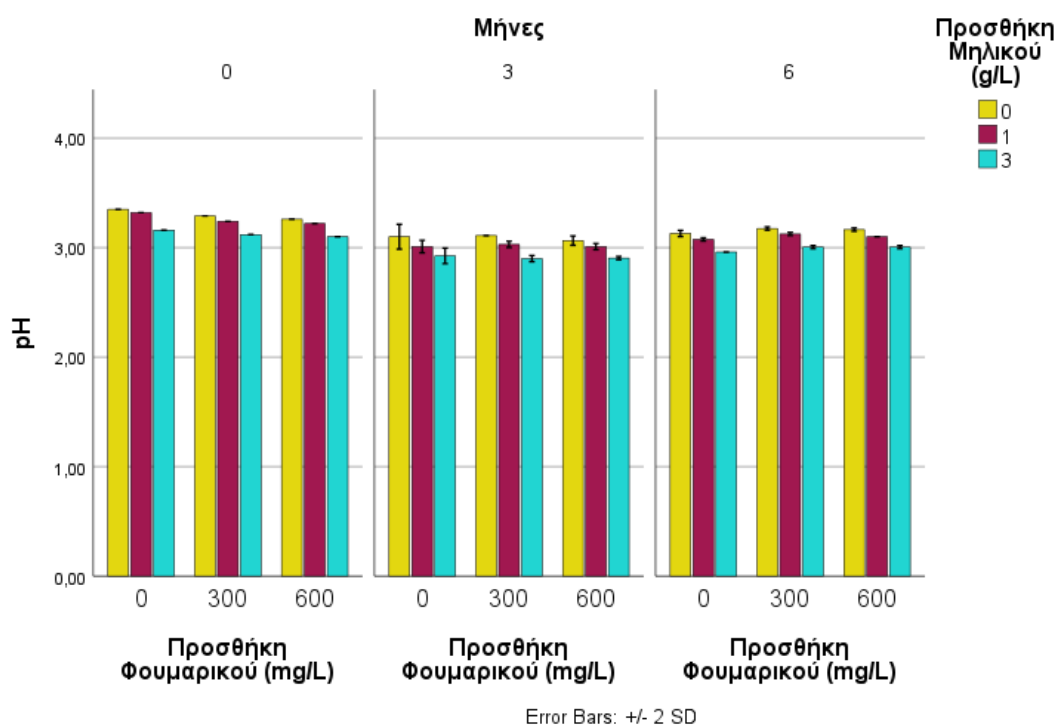
Στο παραπάνω διάγραμμα βλέπουμε ότι είχαμε διαφοροποιήσεις μεταξύ των τιμών στους 3 και στους 6 μήνες σε όλα τα δείγματα, ωστόσο η μεγαλύτερη διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στα δείγματα χωρίς την προσθήκη του φουμαρικού οξέος το οποίο είναι λογικό αφού είχαν και τη μεγαλύτερη αύξηση της τιμής του b^* . Σε αυτά η διαφοροποίηση είναι μεταξύ των τιμών 2 και 3, δηλαδή είναι στο όριο όπου γίνεται η διαφορά αυτή αντιληπτή με το μάτι. (Για να γίνει αντιληπτή η διαφοροποίηση πρέπει το $\Delta E > 2$,). Το μηλικό οξύ δεν φαίνεται να έχει επηρεάσει.

5.2 pH και οξύτητα

Η ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα εκφράζει το σύνολο των καρβοξυλομάδων των οξέων είτε βρίσκονται σε διάσταση είτε όχι. Η ολική οξύτητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση των οξέων και όχι από το είδος τους. Η ολική οξύτητα του γλεύκους αποτελείται από την συγκέντρωση κυρίως του τρυγικού και μηλικού οξέος και από την ποσότητα των αλάτων αυτών και ειδικά του όξινου τρυγικού καλίου.

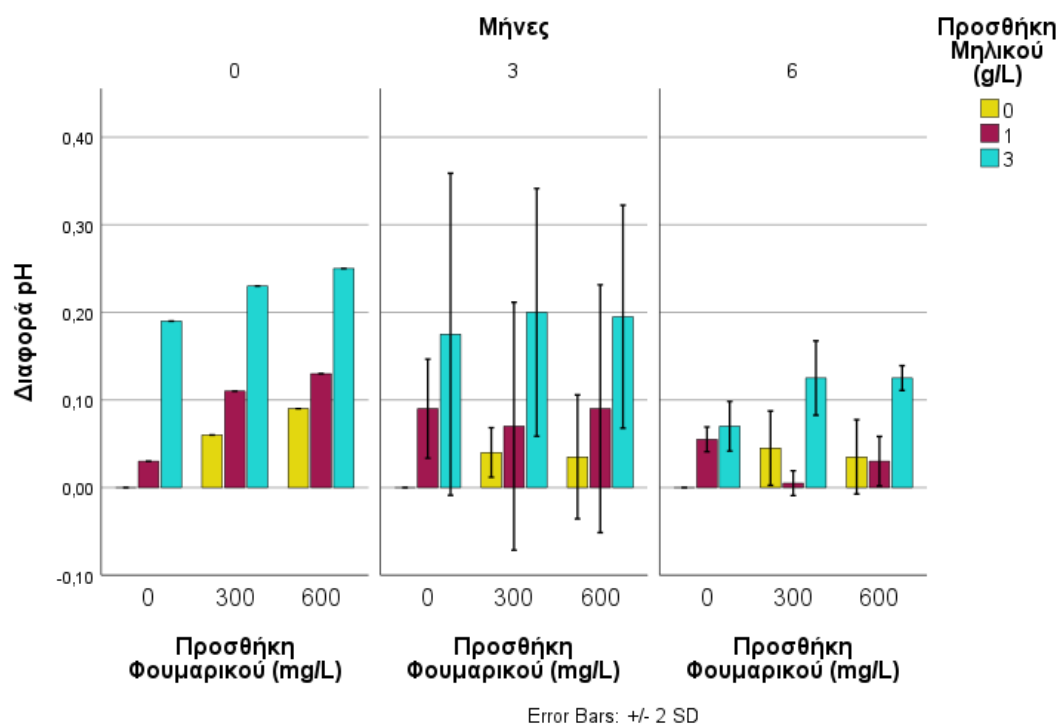
Όσον αφορά την ενεργό οξύτητα (pH), αυτή είναι που εκφράζει το σύνολο των καρβοξυλομάδων που βρίσκεται σε διάσταση και που αντιστοιχεί στο σύνολο των κατιόντων H^+ που υπάρχουν ελεύθερα στο κρασί ή στο γλεύκος και μας κάνει να αντιληφθούμε το μέγεθος της οξύτητας (έκκριση σάλιου) στον στόμα για ένα κρασί. Η ενεργός οξύτητα εξαρτάται από το είδος και από τη συγκέντρωση των οξέων καθώς κάθε ένα έχει διαφορετική σταθερά διάστασης, π.χ. ένα κρασί που περιέχει τρυγικό οξύ είναι περισσότερο όξινο από ένα άλλο που έχει ίδια ποσότητα ηλεκτρικού οξέος,

επειδή το τρυγικό οξύ είναι πιο ισχυρό. Το σύνολο των καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση ρυθμίζουν την όξινη γεύση του οίνου.



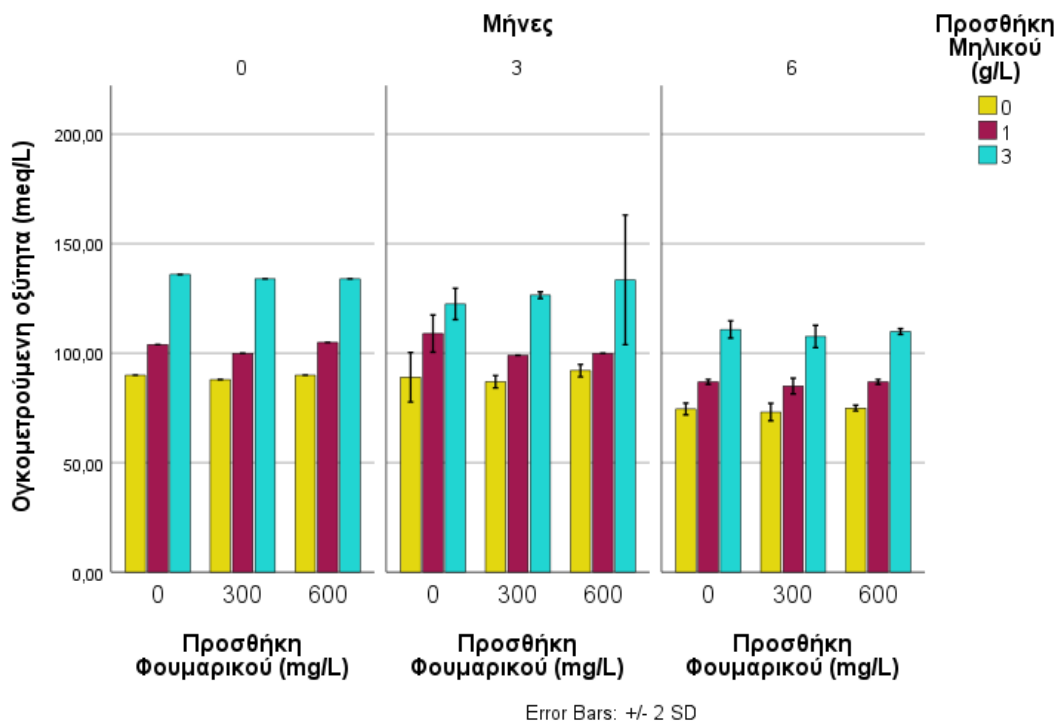
Εικόνα 10: Γράφημα του pH σε συνάρτηση με την προσθήκη φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού (0, 1 και 3 g/L) οξέος σε διάστημα 0, 3 και 6 μηνών

Παρατηρήθηκε πως με την προσθήκη του μηλικού οξέος σημειώθηκε μεγαλύτερη διαφορά στην τιμή του pH από ότι με την προσθήκη του φουμαρικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα όπου έχει γίνει προσθήκη 3 g/L μηλικού οξέος παρατηρείται τιμή pH 0,15 – 0,20 μονάδες πιο χαμηλή από την αντίστοιχη τιμή pH στα δείγματα όπου δεν έχει γίνει προσθήκη, ενώ στα δείγματα όπου έχει γίνει προσθήκη 600 mg/L φουμαρικού οξέος η τιμή pH είναι 0,05 – 0,10 μονάδες πιο χαμηλή από εκείνη στα δείγματα όπου δεν έχει προστεθεί φουμαρικό οξύ. Αντίστοιχη μείωση στην τιμή του pH ανάλογα με την ποσότητα του φουμαρικού που προστίθεται παρατήρησε και ο Morata et al., (2023) σε αντίστοιχο πείραμα που πραγματοποίησε. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση της τιμής του μεταξύ των αρχικών και αυτών των 3 μηνών (όπου και σημειώθηκαν οι μικρότερες). Στους 6 μήνες υπάρχει πάλι αύξηση του. Η πιο χαμηλή τιμή pH που μετρήθηκε ήταν 2,90 και ήταν στους 3 μήνες στο δείγμα με προσθήκη 3g/L μηλικού και 300 mg/L φουμαρικού, ενώ η υψηλότερη ήταν 3,35 στο δείγμα όπου δεν είχε γίνει καμία προσθήκη και οι αναλύσεις έγιναν αμέσως.



Εικόνα 11: Γράφημα της διαφοράς pH συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 0, 3 και 6 μηνών

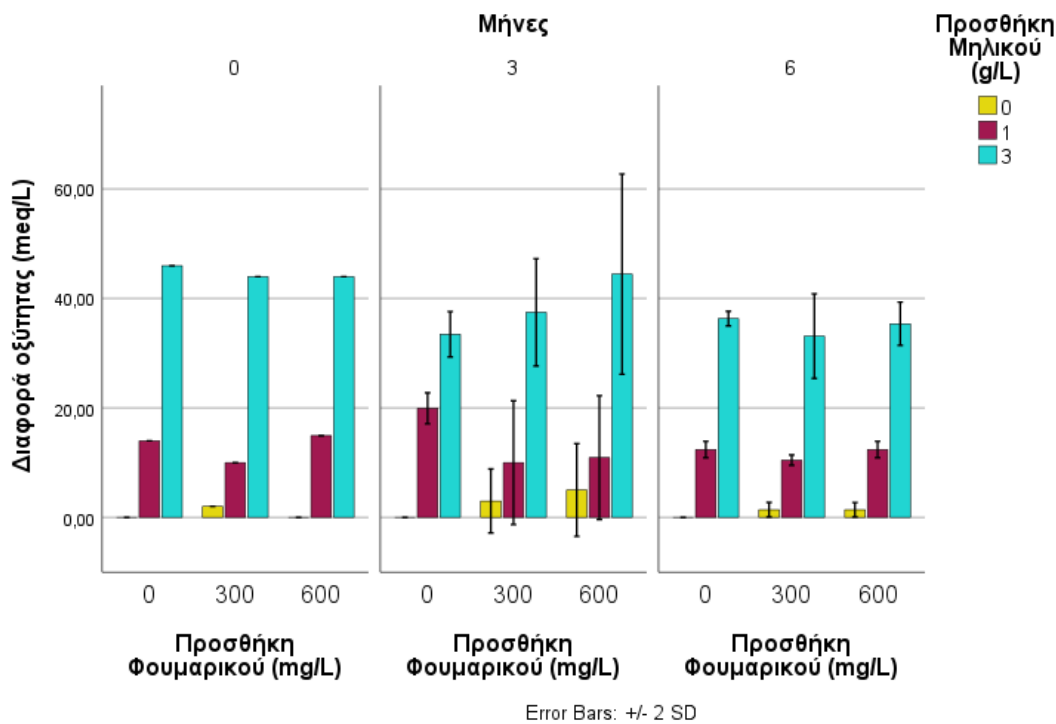
Στο γράφημα αυτό αποτυπώνεται η διαφορά του pH μεταξύ του δείγματος χωρίς καμία προσθήκη με τα υπόλοιπα. Το τυφλό δείγμα ήταν διαφορετικό κάθε φορά ανάλογα με το διάστημα στο οποίο γίνονταν οι αναλύσεις (0, 3 και 6 μήνες) και την προσθήκη ή μη βακτηρίων. Το φουμαρικό οξύ έχει μεγαλύτερη επίπτωση στη διαφορά pH του οίνου από το μηλικό οξύ, ενώ βλέπουμε ότι η διαφορά του μειώνεται σταδιακά από τους 0 έως τους 6 μήνες. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε πως σχεδόν η μισή ποσότητα φουμαρικού οξέος προκαλεί την τριπλάσια μείωση του pH σε σχέση με το μηλικό οξύ. Βλέπουμε στις αρχικές αναλύσεις πως 600 mg/L φουμαρικού οξέος προκαλούν μείωση pH 0,09 ενώ 1 g/L μηλικό οξύ επιφέρει μείωση 0,03. Η επίδραση των βακτηρίων στη διαφορά ήταν αμελητέα οπότε δεν συμπεριλήφθηκε και στο γράφημα.



Εικόνα 12: Γράφημα της ογκομετρούμενης οξύτητας συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 0, 3 και 6 μηνών

Αρχικά έγινε μετατροπή της ογκομετρούμενης οξύτητας από mg/L σε meq/L ώστε να μπορέσει να γίνει πιο εύκολα η σύγκριση της επίδρασης των δύο οξέων σε αυτή.

Η ογκομετρούμενη οξύτητα των δειγμάτων παρέμεινε στα ίδια επίπεδα από τις αρχικές μετρήσεις έως τις μετρήσεις των 3 μηνών, ενώ στους 6 μήνες έχει μειωθεί. Το μηλικό είναι και εδώ το οξύ που έχει επηρεάσει περισσότερο τις τιμές της οξύτητας σε σχέση με το φουμαρικό οξύ που δεν έχει επιφέρει ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή των δειγμάτων χωρίς προσθήκη μηλικού οξέος έχουν τιμή ογκομετρούμενης οξύτητας περίπου 40,00 – 45,00 meq/L πιο χαμηλή από εκείνη που έχουν τα δείγματα με ροσθήκη 3 g/L μηλικού, ενώ όσον αφορά το φουμαρικό, η μεγαλύτερη διαφορά στην τιμή μεταξύ των δειγμάτων που δεν έχει γίνει προσθήκη με εκείνα με προσθήκη 600 mg/L είναι μικρότερη από 10,00 meq/L. Επιπλέον, η ογκομετρούμενη οξύτητα είναι αντιστρόφως ανάλογη του pH, αυτό σημαίνει πως το γράφημα στους 3 μήνες δεν αντιστοιχεί με εκείνο του pH στους 3 μήνες καθώς εδώ παρατηρείται η οξύτητα να μένει σχεδόν αμετάβλητη ενώ στο παρατηρείται μείωση.

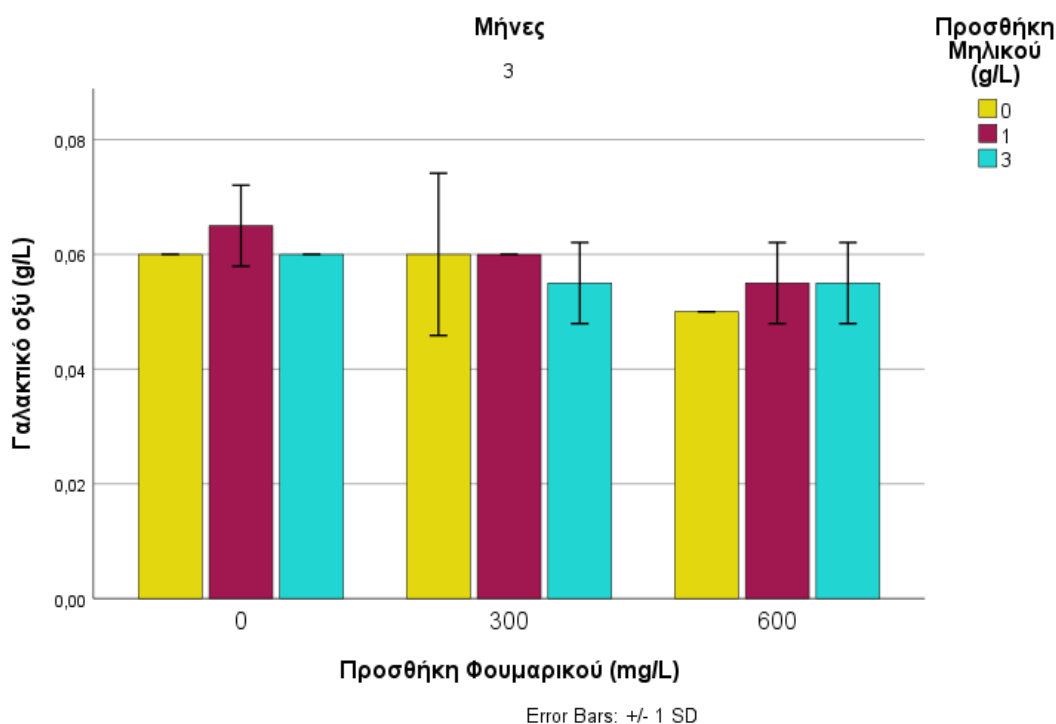


Εικόνα 13: Γράφημα διαφοράς της ογκομετρούμενης οξύτητας συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 0, 3 και 6 μηνών

Η διαφορά της ογκομετρούμενης οξύτητας υπολογίστηκε με παρόμοιο τρόπο με αυτόν που υπολογίστηκε και η διαφορά του pH. Η διαφορά αυτή οφείλεται πάλι κατά κύριο λόγο στο μηλικό οξύ του οποίου, όσο αυξάνεται η προστιθέμενη ποσότητα, τόσο αυξάνεται και η διαφορά στην οξύτητα. Πιο συγκεκριμένα, μεταξύ των δειγμάτων που δεν είχαν προσθήκη μηλικού οξέος και εκείνων με προσθήκη 3 g/L παρατηρήθηκε διαφορά στην τιμή κατά 35,00 – 45,00 meq/L ενώ στα δείγματα χωρίς προσθήκη φουμαρικού οξέος με εκείνα που είχαν προστεθεί 600 mg/L η μεγαλύτερη διαφορά στην τιμή ήταν 10,00 meq/L.

5.3 Μετρήσεις οξέων με ενζυμικό αναλυτή

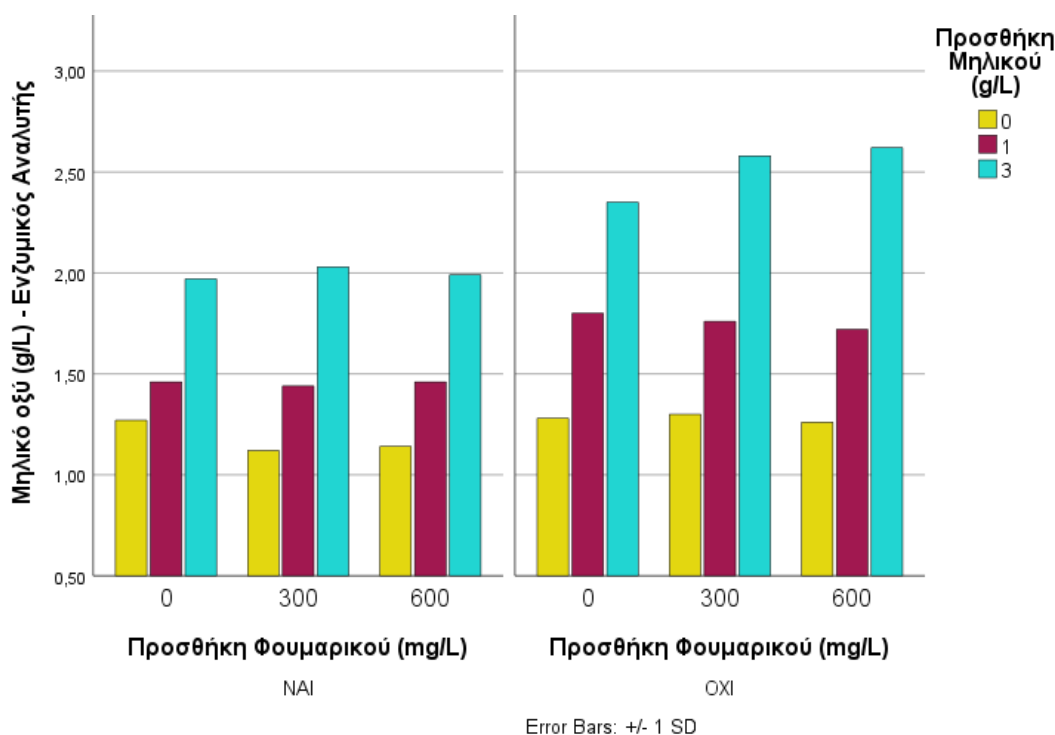
5.3.1 Γαλακτικό οξύ



Εικόνα 14: Γράφημα συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 3 μηνών

Οι τιμές του γαλακτικού οξέος κυμαίνονται περίπου από 0,05 – 0,07 g/L. Η υψηλότερη τιμή σημειώνεται στο δείγμα με προσθήκη 1 g/L μηλικού οξέος και καθόλου φουμαρικού και η χαμηλότερη στο δείγμα χωρίς προσθήκη μηλικού οξέος και με προσθήκη 600 mg/L φουμαρικού. Οι χαμηλότερες τιμές φαίνεται να είναι στα δείγματα με 600 mg/L φουμαρικό οξύ. Γνωρίζοντας ότι η τυπική απόκλιση είναι 0,005 – 0,009 θεωρούμε πως οι διαφοροποιήσεις στις τιμές δεν υπόκεινται στο σφάλμα του μηχανήματος. Όπως έχει προαναφερθεί, κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση το μηλικό οξύ μεταβολίζεται σε γαλακτικό με τη βοήθεια γαλακτικών βακτηρίων, αυτό συνεπάγεται τη μείωση του μηλικού οξέος και την ταυτόχρονη αύξηση του γαλακτικού, αυτό όπως φαίνεται δεν συνέβη. Στους 3 μήνες λοιπόν, δεν έχουμε δείγματα μηλογαλακτικής ζύμωσης καθώς η ποσότητα του γαλακτικού οξέος παρέμεινε σταθερή ανεξαρτήτως προσθήκης ή μη γαλακτικών βακτηρίων και δεν φαίνεται να διαφοροποιείται από τις προσθήκες του φουμαρικού οξέος.

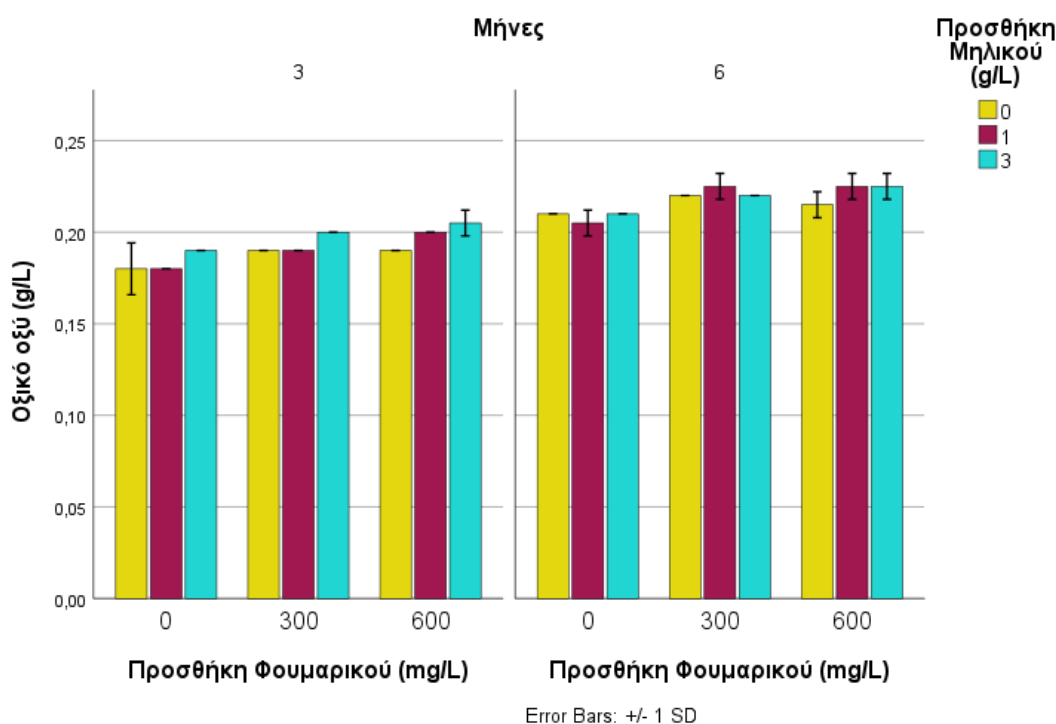
5.3.2 Μηλικό οξύ



Εικόνα 15: Γράφημα συγκέντρωσης μηλικού οξέος συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 6 μηνών παρουσία ή μη γαλακτικών βακτηρίων

Το μηλικό οξύ στους 6 μήνες φαίνεται να έχει μειωθεί στα δείγματα όπου έχει γίνει προσθήκη βακτηρίων, αυτό πιθανώς να σημαίνει πως στα δείγματα αυτά ξεκίνησε η μηλογαλακτική ζύμωση αλλά ήταν ακόμα σε αρκετά πρώιμο στάδιο. Ειδικότερα, στα δείγματα χωρίς μηλικό οξύ και με προσθήκη ποσότητας 3 g/L παρατηρείται διαφορά στις τιμές 0,75 – 1,20 g/L ενώ μεταξύ αυτών χωρίς προσθήκη φουμαρικού οξέος και με προσθήκη 600 mg/L η μεγαλύτερη διαφορά είναι κοντά στο 0,50 g/L. Παρατηρήθηκε επίσης πως παρόλο που σε κάποια από τα δείγματα έχει γίνει προσθήκη 3 g/L μηλικού οξέος, δεν σημειώνονται οι αντίστοιχες τιμές μέσα από τις αναλύσεις του ενζυμικού αναλυτή. Για παράδειγμα, στα δείγματα αυτά η μεγαλύτερη τιμή που σημειώθηκε είναι λίγο περισσότερο από 2,50 g/L παρόλο που η προσθήκη ήταν μεγαλύτερης ποσότητας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως ο ενζυμικός αναλυτής μετράει μόνο τη συγκέντρωση του L – μηλικού οξέος στα δείγματα του οίνου και όχι και το D – μηλικό, επομένως η ποσότητα του μηλικού που δεν εμφανίζεται στο γράφημα αντιστοιχεί στο D – μηλικό οξύ που δεν μετρήθηκε. Το φουμαρικό οξύ δεν φαίνεται να έχει επιδράσει στη μεταβολή της ποσότητας του μηλικού οξέος. Σημειώνεται πως το σφάλμα του μηχανήματος για την μέτρηση του μηλικού οξέος είναι 0,01 – 0,04 g/L.

5.3.3. Οξικό οξύ



Εικόνα 16: Γράφημα της συγκέντρωσης οξικού οξέος συναρτήσει της προσθήκης φουμαρικού (σε ποσότητες 0, 300 και 600 mg/L) και μηλικού οξέος σε διάστημα 3 και 6 μηνών

Οι τιμές που μετρήθηκαν κυμαίνονται από περίπου 0,17 – 0,23 g/L με τις χαμηλότερες να παρατηρούνται στους 3 μήνες και τις υψηλότερες στους 6. Κι εδώ η επίδραση του φουμαρικού οξέος φαίνεται να είναι αμελητέα. Γενικότερα, παρατηρείται μικρή αύξηση στα δείγματα που αναλύθηκαν στους 6 μήνες ωστόσο, δεν έχουμε μεγάλη διαφοροποίηση των τιμών και γνωρίζουμε πως αυτές δεν υπόκεινται στο σφάλμα του ενζυμικού αναλυτή που χρησιμοποιήθηκε αφού αυτό είναι 0,004 – 0,007 g/L για λευκούς οίνους. Επομένως, η αύξηση του οξικού οξέος μπορεί να οφείλεται σε πιθανή οξείδωση, στον μεταβολισμό του κιτρικού οξέος σε οξικό οξύ ή ως αποτέλεσμα δράσης γαλακτικών βακτηρίων (Viridis et al., 2021).

6. Οργανοληπτικός έλεγχος

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος στα δείγματα στα ίδια χρονικά διαστήματα που έγιναν και οι αναλύσεις, δηλαδή αμέσως μετά τις προσθήκες και σε διάστημα 3 και 6 μηνών. Ο τρόπος δοκιμής αποτελείται από τα εξής στάδια:

Κάθε δείγμα εισάγεται σε πανομοιότυπα ποτήρια κρασιού, σε σχήμα τουλίπας. Γεμίζεται περίπου το 1/4 με 1/3 του ποτηριού, δηλαδή 8 -10 mL. Το δείγμα αρχικά τοποθετείται πάνω από ένα λευκό φωτεινό φόντο για την καλύτερη παρατήρηση της έντασης και απόχρωσης του οίνου προς εξέταση. Στη συνέχεια, ακολουθεί ανάδευση του οίνου με περιστροφικές κινήσεις, ώστε να διευρυνθεί η επιφάνεια εξάτμισης και συνεπώς να υπάρξει μεγαλύτερη απελευθέρωση των αρωμάτων και άρα πιο ακριβής οσφρητική εξέταση. Έπειτα, γίνεται εισαγωγή μιας μικρής ποσότητας του δείγματος στο

στόμα και “μετακινείται” για να καλυφθούν όλες οι επιφάνειες της στοματικής κοιλότητας και να μπορέσουν να γίνουν αντιληπτές οι διάφορες γεύσεις (γλυκό, πικρό, ξινό κ.α.), η διάρκεια τους στο χρόνο, η έντασή τους αλλά και τα αρωματικά συστατικά του (OIV 2009, Ronald S.J., 2002).

Αμέσως μετά τις προσθήκες των οξέων στα δείγματα μας ήταν πολύ ξεκάθαρη στην αίσθηση του στόματος η αύξηση της οξύτητας ανάλογα με την ποσότητα των οξέων που είχε προστεθεί. Στους 3 μήνες τα δείγματα ήταν πιο ισορροπημένα και δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις και διακυμάνσεις μεταξύ τους. Η οξύτητα φάνηκε ελαφρώς μειωμένη, ενώ τα αρώματα που επικρατούσαν ήταν τα λευκά άνθη. Στους 6 μήνες στα περισσότερα δείγματα είχαν εμφανιστεί αρώματα οξειδωσης ενώ μερικά από αυτά είχαν και αναγωγικές οσμές (κλούβιο αυγό).

7. Συζήτηση

Στα δείγματα του οίνου που τέθηκαν προς ανάλυση με ενζυμική μέθοδο, για τη μέτρηση ανεξαρτήτως προσθήκης βακτηρίων του στελέχους *Oenococcus oeni* και της ποσότητας μηλικού και φουμαρικού οξέος που προστέθηκε, της συγκέντρωσης του γαλακτικού και μηλικού οξέος, βρέθηκε πως δεν πραγματοποίησαν μηλογαλακτική ζύμωση. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες.

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές τεχνικές που μπορεί να επηρεάσουν τη ζύμωση αυτή. Οι θρεπτικές και οι περιβαλλοντικές συνθήκες των βακτηρίων φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο. Ειδικότερα, ορισμένοι από αυτούς τους παράγοντες είναι:

- I. Χαμηλό pH
- II. Θερμοκρασία
- III. Περιεκτικότητα θειώδη ανυδρίτη (> 50 ppm)

I. Όσο μεγαλύτερη είναι η οξύτητα, τόσο πιο πιθανή είναι η αναστολή των βακτηρίων άρα τόσο δυσκολότερη είναι και η πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων, όπως είναι και το *Oenococcus oeni*, είναι βέλτιστη σε pH μεταξύ 4,2 – 4,5. Στο pH που έχει συνήθως ο οίνος (3,0 – 4,0), αυξάνεται η ταχύτητα της ζύμωσης καθώς αυξάνεται και το pH. Η ανάπτυξη τους ωστόσο, περιορίζεται σε pH 2,9 έως και 3,2, όσο είναι και το pH των δειγμάτων μας. Επομένως, αυτός είναι ένας παράγοντας που μπορεί να έχει συντελέσει στη μη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης αφού τα βακτήρια ίσως να μην ήταν στο κατάλληλο περιβάλλον για να αναπτυχθούν.

II. Η θερμοκρασία είναι άλλος ένας καταλυτικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Μια πολύ υψηλή θερμοκρασία μπορεί να επιδράσει αρνητικά στην ανάπτυξη και στη λειτουργία των γαλακτικών βακτηρίων. Το ιδανικό εύρος θερμοκρασιών για τη ζύμωση είναι μεταξύ 20 και 25 °C, σε άλλη περίπτωση επιβραδύνεται. Τα δείγματα μας λοιπόν, ίσως δεν φυλάχθηκαν στις κατάλληλες θερμοκρασίες ώστε να ευνοηθεί η διαδικασία αυτή.

III. Η θείωση του γλεύκους στην αρχή της οινοποίησης με 50 – 100 mg/L SO₂ γίνεται με στόχο την παρεμπόδιση της δράσης των γηγενών ζυμών των γενών *Kloeckera* και *Hanseniaspora* και των οξικών βακτηρίων. Στο χαμηλό pH των οίνων ο SO₂ επικρατεί στην ελεύθερη μορφή του, κυρίως ως HSO₃⁻¹ και λιγότερο ως μοριακός SO₂ και SO₃⁻². Ο μοριακός SO₂ είναι η μόνη μορφή που μπορεί να διαπεράσει τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών και των βακτηρίων, να αντιδράσει με τις πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και τους συμπαράγοντες (cofactors) των κυττάρων, και επομένως να επηρεάσει την ανάπτυξή τους. Τα στελέχη του *O. oeni* έχουν ανθεκτικότητα στον θειώδη ανυδρίτη έως και 30 mg/L (Bayer & Dicks, 2004). Το γεγονός αυτό, καθιστά δύσκολη έως και αδύνατη τη μηλογαλακτική ζύμωση. Ο οίνος που

χρησιμοποιήσαμε για τις αναλύσεις μας πιθανόν να είχε εν τέλη τόση ποσότητα θείου που τα βακτήρια να μην μπόρεσαν να δράσουν στον συγκεκριμένο χρόνο και συνθήκες ώστε να αρχίσει η μηλογαλακτική ζύμωση.

Επιπλέον, αφού δεν πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση το pH και η οξύτητα θεωρητικά θα έπρεπε να διατηρηθούν σε σταθερά επίπεδα, αυτό όμως δεν ισχύει για τα δείγματα του οίνου που αναλύθηκαν. Παρατηρήθηκε πως στις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 6 μήνες το pH ήταν αυξημένο σε σχέση με αυτές των 3 μηνών, ενώ η οξύτητα αντίστοιχα είχε μειωθεί. Μια πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο αυτό είναι πως αρχικά υπήρχε αρκετή ποσότητα θείου ώστε τα γαλακτικά βακτήρια του στελέχους *Oenococcus oeni* να μη μπορούν να δράσουν. Στην πορεία ωστόσο όταν καταναλώθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα του ελεύθερου θειώδους τα βακτήρια ξεκίνησαν να λειτουργούν όμως αντί να μετατρέπουν το μηλικό οξύ, έγινε εκτροπή του τρυγικού οξέος σε γαλακτικό οξύ και γι' αυτό υπήρξε η αλλαγή αυτή στο pH και την οξύτητα (Bauer & Dicks 2004).

Όσον αφορά το χρώμα, η προσθήκη του μηλικού οξέος ήταν αυτή που φάνηκε να έχει επηρεάσει περισσότερο, αφού αυτό ήταν που αύξησε το ποσοστό του κόκκινου χρώματος στον οίνο (όσο μεγαλύτερη ποσότητα, τόσο μεγαλύτερη αύξηση) και κατά συνέπεια και τη χρωματική ένταση. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί και μέσα από έρευνες που έχουν γίνει χρησιμοποιώντας βέβαια υδραλκοολικό διάλυμα και όχι δείγματα οίνου (Morata et al., 2019). Επιπλέον, παρόλο που δεν πραγματοποιήθηκε η μηλογαλακτική ζύμωση παρατηρήθηκαν μεταβολές στις χρωματικές παραμέτρους μας στις μετρήσεις του CIELab, σύμφωνα με αντίστοιχη έρευνα, η μείωση του χρώματος του οίνου θα μπορούσε να αποδοθεί στην απορρόφηση των πολυφαινολών από τα κυτταρικά τοιχώματα των γαλακτικών βακτηρίων (Costantini et al., 2009; Burns & Osborne, 2013). Στο διάστημα των 6 μηνών, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του κίτρινου χρώματος και ιδιαίτερα στα δείγματα εκείνα που δεν είχαν προσθήκη κάποιας ποσότητας φουμαρικού οξέος. Αυτό μπορεί να είναι ένα δείγμα πως η προσθήκη του φουμαρικού οξέος συντελεί στην καθυστέρηση της οξειδωσης, αλλά αυτό δεν μελετήθηκε περαιτέρω.

8. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη είχε σκοπό να μελετήσει την επίδραση του φουμαρικού οξέος στην αναστολή της μηλογαλακτικής ζύμωσης σε οίνο της ποικιλίας Μοσχοφίλερο. Η μελέτη βασίστηκε σε έρευνες που έχουν δείξει πως η προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας φουμαρικού οξέος έχει την ικανότητα να καθυστερεί ή και να αναστέλλει τη μηλογαλακτική ζύμωση. Στα δείγματα προστέθηκαν ακόμη ποσότητες μηλικού οξέος και γαλακτικών βακτηρίων *Oenococcus oeni*. Βασικές αναλύσεις του οίνου πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά τις προσθήκες καθώς και σε διάστημα 3 και 6 μηνών. Μελετώντας συνολικά τα αποτελέσματα, φαίνεται πως εν τέλη, στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και πειραματικές συνθήκες, η μηλογαλακτική ζύμωση δεν έχει πραγματοποιηθεί ή βρίσκεται σε πολύ αρχικό στάδιο και δεν έχει προλάβει να επιφέρει ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματά μας. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες με τον κυριότερο να είναι η επίδραση του θειώδους που σε μεγάλες ποσότητες αναστέλλει τη μηλογαλακτική ζύμωση ανεξαρτήτως παρουσίας φουμαρικού οξέος (Guzzo et al., 2000). Ωστόσο, παρά το ότι δεν κατάφερε να μελετηθεί η επίδραση του φουμαρικού οξέος στη μηλογαλακτική ζύμωση, από τα αποτελέσματα είδαμε πως επηρεάζει διάφορα χαρακτηριστικά του οίνου όπως είναι το pH το οποίο καταφέρνει να μειώσει ακόμα και με προσθήκη πολύ μικρής ποσότητας (300 – 600 mg/L). Όπως έχει προαναφερθεί βρέθηκε πως 600 mg/L φουμαρικού οξέος μειώνουν το pH κατά 0,10, ενώ επίσης παρατηρήθηκε πως το φουμαρικό οξύ έχει μεγαλύτερη επίδραση στο pH από ότι το μηλικό οξύ καθώς σχεδόν η μισή ποσότητα φουμαρικού οξέος, προκαλεί την τριπλάσια μείωση του pH. Για την οξύτητα ωστόσο δεν παρατηρήθηκε το ίδιο, αφού το μηλικό οξύ φάνηκε να έχει μεγαλύτερη

επίδραση χωρίς όμως αυτό να σημαίνει πως το φουμαρικό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό μέσω οξίνισης του οίνου διατηρώντας παράλληλα τη φρεσκάδα του. Τέλος, να σημειωθεί πως ίσως αν πραγματοποιούνταν αναλύσεις και σε κάποιο διάστημα μετά το πέρας των 6 μηνών, ο οίνος να είχε ξεκινήσει να διενεργεί τη μηλογαλακτική ζύμωση και να μπορούσαμε να παρατηρήσουμε και τη δράση του φουμαρικού οξέος ως ανασταλτικό παράγοντα.

9. Βιβλιογραφία

- Bartowsky, E. J., & Borneman, A. R. (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 441-447.
- Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2004). The ‘buttery’ attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. *International journal of food microbiology*, 96(3), 235-252.
- Bauer, R., & Dicks, L. M. T. (2004). Control of Malolactic Fermentation in Wine. A Review.
- 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.
- Costantini, A., García-Moruno, E., & Moreno-Arribas, M. V. (2009). Biochemical transformations produced by malolactic fermentation. In *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 27-57). New York, NY: Springer New York.
- Das, R. K., Brar, S. K., & Verma, M. (2016). Fumaric Acid. In *Platform Chemical Biorefinery* (pp. 133–157). Elsevier.
- FAO-WHO. *Codex Alimentarius*. 2015. (n.d.). Retrieved May 15, 2023, from https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FShared%2BDocuments%252FArchive%252FMeetings%252FCcfa%252Fccfa47%252Ffa47_10s.pdf
- 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.
- 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.
- Hunter, J. J., Volschenk, C. G., & Booysse, M. (2017). Vineyard row orientation and grape ripeness level effects on vegetative and reproductive growth characteristics of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz/101-14 Mgt. *European journal of agronomy*, 84, 47-57.
- Lerm, E., Engelbrecht, L., & Du Toit, M. (2010). Malolactic fermentation: the ABC’s of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 186-212.
- Lonvaud-Funel, A., & Joyeux, A. (1994). Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Microbiology*, 77(4), 401-407.
- 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.
- Payan, C., Gancel, A. L., Jourdes, M., Christmann, M., & Teissedre, P. L. (2023). Wine acidification methods: a review. *OENO One*, 57(3), 113-126.

- Peynaud, E., & Blouin, J. (1996). *The taste of wine: The art science of wine appreciation*. John Wiley & Sons.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu D., Doneche B. and Lonvaud A., (2006), Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition., John Wiley & Sons Ltd, Bordeaux, France.
- Ronald S.J., (2002), Wine Tasting: A Professional Handbook. Elsevier Academic Press.
- Straathof, A. J. J., & van Gulik, W. M. (2012). Production of Fumaric Acid by Fermentation. In X. Wang, J. Chen, & P. Quinn (Eds.), *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways* (pp. 225– 240). Springer Netherlands.
- Togores, J. H. (2018). *Tratado de Enología (vol. I y II)*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Ugliano, M., Genovese, A., & Moio, L. (2003). Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5073-5078.
- Van Vuuren, H. J. J., & Dicks, L. M. T. (1993). *Leuconostoc oenos*: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(1), 99-112.
- Vicente, J., Baran, Y., Navascués, E., Santos, A., Calderón, F., Marquina, D., ... & Benito, S. (2022). Biological management of acidity in wine industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 375, 109726.
- Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Silva, R. D., Chaves, S. R., Sousa, M. J., & Côrte-Real, M. (2011). The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 271-280.
- 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.
- 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).
- Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry*. John Wiley & Sons.
- Κοτσερίδης Γ., Καλλιθρακά Σ., Προξενιά Ν. (2012). *Εργαστηριακές Ασκήσεις. Οινολογία I & II*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Αθήνα.
- Σταύρακας Ευστ. Δημήτριος. (2015). *Αμπελογραφία* (2nd edition).
- Σουφλερός Ηρ. Ευάγγελος (2015). *Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία*, Τρίτη Έκδοση, Θεσσαλονίκη.

Παράρτημα

Δείγμα	Μοσχοφίλερο	Κωδικός	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Τελικό Μηλικό (g/L)	Προσθήκη Βακτηρίων	Μήνες
2	ΠΑΔΑ	MOC1_000_0_C_3	0	0	OXI	0
3	ΠΑΔΑ	MOC1_300_0_C_3	300	0	OXI	0
4	ΠΑΔΑ	MOC1_600_0_C_3	600	0	OXI	0
5	ΠΑΔΑ	MOC1_000_1_C_3	0	1	OXI	0
6	ΠΑΔΑ	MOC1_300_1_C_3	300	1	OXI	0
7	ΠΑΔΑ	MOC1_600_1_C_3	600	1	OXI	0
8	ΠΑΔΑ	MOC1_000_3_C_3	0	3	OXI	0
9	ΠΑΔΑ	MOC1_300_3_C_3	300	3	OXI	0
10	ΠΑΔΑ	MOC1_600_3_C_3	600	3	OXI	0
11	ΠΑΔΑ	MOC1_000_0_O_3	0	0	NAI	0
12	ΠΑΔΑ	MOC1_300_0_O_3	300	0	NAI	0
13	ΠΑΔΑ	MOC1_600_0_O_3	600	0	NAI	0
14	ΠΑΔΑ	MOC1_000_1_O_3	0	1	NAI	0
15	ΠΑΔΑ	MOC1_300_1_O_3	300	1	NAI	0
16	ΠΑΔΑ	MOC1_600_1_O_3	600	1	NAI	0
17	ΠΑΔΑ	MOC1_000_3_O_3	0	3	NAI	0
18	ΠΑΔΑ	MOC1_300_3_O_3	300	3	NAI	0
19	ΠΑΔΑ	MOC1_600_3_O_3	600	3	NAI	0
20	ΠΑΔΑ	MOC1_000_0_C_6	0	0	OXI	0
21	ΠΑΔΑ	MOC1_300_0_C_6	300	0	OXI	0
22	ΠΑΔΑ	MOC1_600_0_C_6	600	0	OXI	0
23	ΠΑΔΑ	MOC1_000_1_C_6	0	1	OXI	0
24	ΠΑΔΑ	MOC1_300_1_C_6	300	1	OXI	0
25	ΠΑΔΑ	MOC1_600_1_C_6	600	1	OXI	0
26	ΠΑΔΑ	MOC1_000_3_C_6	0	3	OXI	0
27	ΠΑΔΑ	MOC1_300_3_C_6	300	3	OXI	0
28	ΠΑΔΑ	MOC1_600_3_C_6	600	3	OXI	0
29	ΠΑΔΑ	MOC1_000_0_O_6	0	0	NAI	0
30	ΠΑΔΑ	MOC1_300_0_O_6	300	0	NAI	0
31	ΠΑΔΑ	MOC1_600_0_O_6	600	0	NAI	0
32	ΠΑΔΑ	MOC1_000_1_O_6	0	1	NAI	0
33	ΠΑΔΑ	MOC1_300_1_O_6	300	1	NAI	0
34	ΠΑΔΑ	MOC1_600_1_O_6	600	1	NAI	0
35	ΠΑΔΑ	MOC1_000_3_O_6	0	3	NAI	0
36	ΠΑΔΑ	MOC1_300_3_O_6	300	3	NAI	0
37	ΠΑΔΑ	MOC1_600_3_O_6	600	3	NAI	0

Κωδικός	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Τελικό Μηλικό (g/L)	Μήνες	Φουμαρικό (meq/L)	Μηλικό (meq/L)	pH	ΔpH
MOC1_000_0_C_3	0	0	0	0,00	0,00	3,35	0
MOC1_300_0_C_3	300	0	0	5,17	0,00	3,29	0,06
MOC1_600_0_C_3	600	0	0	10,34	0,00	3,26	0,09
MOC1_000_1_C_3	0	1	0	0,00	14,92	3,32	0,03
MOC1_300_1_C_3	300	1	0	5,17	14,92	3,24	0,11
MOC1_600_1_C_3	600	1	0	10,34	14,92	3,22	0,13
MOC1_000_3_C_3	0	3	0	0,00	44,75	3,16	0,19
MOC1_300_3_C_3	300	3	0	5,17	44,75	3,12	0,23
MOC1_600_3_C_3	600	3	0	10,34	44,75	3,1	0,25
MOC1_000_0_O_3	0	0	0	0,00	0,00	3,35	0
MOC1_300_0_O_3	300	0	0	5,17	0,00	3,29	0,06
MOC1_600_0_O_3	600	0	0	10,34	0,00	3,26	0,09
MOC1_000_1_O_3	0	1	0	0,00	14,92	3,32	0,03
MOC1_300_1_O_3	300	1	0	5,17	14,92	3,24	0,11
MOC1_600_1_O_3	600	1	0	10,34	14,92	3,22	0,13
MOC1_000_3_O_3	0	3	0	0,00	44,75	3,16	0,19
MOC1_300_3_O_3	300	3	0	5,17	44,75	3,12	0,23
MOC1_600_3_O_3	600	3	0	10,34	44,75	3,1	0,25
MOC1_000_0_C_6	0	0	0	0,00	0,00	3,35	0
MOC1_300_0_C_6	300	0	0	5,17	0,00	3,29	0,06
MOC1_600_0_C_6	600	0	0	10,34	0,00	3,26	0,09
MOC1_000_1_C_6	0	1	0	0,00	14,92	3,32	0,03
MOC1_300_1_C_6	300	1	0	5,17	14,92	3,24	0,11
MOC1_600_1_C_6	600	1	0	10,34	14,92	3,22	0,13
MOC1_000_3_C_6	0	3	0	0,00	44,75	3,16	0,19
MOC1_300_3_C_6	300	3	0	5,17	44,75	3,12	0,23
MOC1_600_3_C_6	600	3	0	10,34	44,75	3,1	0,25
MOC1_000_0_O_6	0	0	0	0,00	0,00	3,35	0
MOC1_300_0_O_6	300	0	0	5,17	0,00	3,29	0,06
MOC1_600_0_O_6	600	0	0	10,34	0,00	3,26	0,09
MOC1_000_1_O_6	0	1	0	0,00	14,92	3,32	0,03
MOC1_300_1_O_6	300	1	0	5,17	14,92	3,24	0,11
MOC1_600_1_O_6	600	1	0	10,34	14,92	3,22	0,13
MOC1_000_3_O_6	0	3	0	0,00	44,75	3,16	0,19
MOC1_300_3_O_6	300	3	0	5,17	44,75	3,12	0,23
MOC1_600_3_O_6	600	3	0	10,34	44,75	3,1	0,25

Κωδικός	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Τελικό Μηλικό (g/L)	Μήνες	Ο.Ο (gr/L)	Ο.Ο (meq/L)	Διαφορά οξύτητας (meq/L)
MOC1_000_0_C_3	0	0	0	6,75	89,95	0,00
MOC1_300_0_C_3	300	0	0	6,60	87,95	2,00
MOC1_600_0_C_3	600	0	0	6,75	89,95	0,00
MOC1_000_1_C_3	0	1	0	7,80	103,94	13,99
MOC1_300_1_C_3	300	1	0	7,50	99,94	9,99
MOC1_600_1_C_3	600	1	0	7,87	104,87	14,92
MOC1_000_3_C_3	0	3	0	10,20	135,92	45,97
MOC1_300_3_C_3	300	3	0	10,05	133,92	43,97
MOC1_600_3_C_3	600	3	0	10,05	133,92	43,97
MOC1_000_0_O_3	0	0	0	6,75	89,95	0,00
MOC1_300_0_O_3	300	0	0	6,60	87,95	2,00
MOC1_600_0_O_3	600	0	0	6,75	89,95	0,00
MOC1_000_1_O_3	0	1	0	7,80	103,94	13,99
MOC1_300_1_O_3	300	1	0	7,50	99,94	9,99
MOC1_600_1_O_3	600	1	0	7,87	104,87	14,92
MOC1_000_3_O_3	0	3	0	10,20	135,92	45,97
MOC1_300_3_O_3	300	3	0	10,05	133,92	43,97
MOC1_600_3_O_3	600	3	0	10,05	133,92	43,97
MOC1_000_0_C_6	0	0	0	6,75	89,95	0,00
MOC1_300_0_C_6	300	0	0	6,60	87,95	2,00
MOC1_600_0_C_6	600	0	0	6,75	89,95	0,00
MOC1_000_1_C_6	0	1	0	7,80	103,94	13,99
MOC1_300_1_C_6	300	1	0	7,50	99,94	9,99
MOC1_600_1_C_6	600	1	0	7,87	104,87	14,92
MOC1_000_3_C_6	0	3	0	10,20	135,92	45,97
MOC1_300_3_C_6	300	3	0	10,05	133,92	43,97
MOC1_600_3_C_6	600	3	0	10,05	133,92	43,97
MOC1_000_0_O_6	0	0	0	6,75	89,95	0,00
MOC1_300_0_O_6	300	0	0	6,60	87,95	2,00
MOC1_600_0_O_6	600	0	0	6,75	89,95	0,00
MOC1_000_1_O_6	0	1	0	7,80	103,94	13,99
MOC1_300_1_O_6	300	1	0	7,50	99,94	9,99
MOC1_600_1_O_6	600	1	0	7,87	104,87	14,92
MOC1_000_3_O_6	0	3	0	10,20	135,92	45,97
MOC1_300_3_O_6	300	3	0	10,05	133,92	43,97
MOC1_600_3_O_6	600	3	0	10,05	133,92	43,97

*Οι τιμές στους 3 παραπάνω πίνακες αφορούν τις αρχικές μετρήσεις στις οποίες δεν έχουν ληφθεί υπόψη οι προσθήκες βακτηρίων καθώς και οι μήνες που αναγράφονται στους κωδικούς των δειγμάτων παραμόνο οι διαφορετικές προσθήκες οξέων. Επομένως, κάποιες τιμές επαναλαμβάνονται γιατί στην ουσία αφορούν το ίδιο δείγμα (π.χ. MOC1_000_0_C_3, MOC1_000_0_O_3, MOC1_000_0_C_6, MOC1_000_0_O_6).

Δείγμα	Μοσχοφίλερο	Κωδικός	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Τελικό Μηγλικό (g/L)	Προσθήκη Βακτηρίων	Μήνες	O.O (g/L)	O.O (meq/L)	Διαφορά οξύτητας (meq/L)	pH	ΔpH
1	ΠΑΔΑ	MOC1_000_0_C_0	0	0	OXI	0					
2	ΠΑΔΑ	MOC1_000_0_C_3	0	0	OXI	3	6,38	85,02	0,00	3,14	0,00
3	ΠΑΔΑ	MOC1_300_0_C_3	300	0	OXI	3	6,45	85,95	0,93	3,11	0,03
4	ΠΑΔΑ	MOC1_600_0_C_3	600	0	OXI	3	6,98	93,01	7,99	3,08	0,06
5	ΠΑΔΑ	MOC1_000_1_C_3	0	1	OXI	3	7,95	105,94	20,92	3,03	0,11
6	ΠΑΔΑ	MOC1_300_1_C_3	300	1	OXI	3	7,43	99,01	13,99	3,02	0,12
7	ΠΑΔΑ	MOC1_600_1_C_3	600	1	OXI	3	7,50	99,94	14,92	3,00	0,14
8	ΠΑΔΑ	MOC1_000_3_C_3	0	3	OXI	3	9,00	119,93	34,91	2,90	0,24
9	ΠΑΔΑ	MOC1_300_3_C_3	300	3	OXI	3	9,45	125,92	40,91	2,89	0,25
10	ΠΑΔΑ	MOC1_600_3_C_3	600	3	OXI	3	9,23	122,99	37,97	2,90	0,24
11	ΠΑΔΑ	MOC1_000_0_O_3	0	0	NAI	3	6,98	93,01	0,00	3,06	0,00
12	ΠΑΔΑ	MOC1_300_0_O_3	300	0	NAI	3	6,60	87,95	5,06	3,11	0,05
13	ΠΑΔΑ	MOC1_600_0_O_3	600	0	NAI	3	6,83	91,01	2,00	3,05	0,01
14	ΠΑΔΑ	MOC1_000_1_O_3	0	1	NAI	3	8,40	111,93	18,92	2,99	0,07
15	ΠΑΔΑ	MOC1_300_1_O_3	300	1	NAI	3	7,43	99,01	6,00	3,04	0,02
16	ΠΑΔΑ	MOC1_600_1_O_3	600	1	NAI	3	7,50	99,94	6,93	3,02	0,04
17	ΠΑΔΑ	MOC1_000_3_O_3	0	3	NAI	3	9,38	124,99	31,98	2,95	0,11
18	ΠΑΔΑ	MOC1_300_3_O_3	300	3	NAI	3	9,53	126,99	33,98	2,91	0,15
19	ΠΑΔΑ	MOC1_600_3_O_3	600	3	NAI	3	10,80	143,91	50,90	2,91	0,15
20	ΠΑΔΑ	MOC1_000_0_C_6	0	0	OXI	6	5,66	75,42	0,00	3,12	0,00
21	ΠΑΔΑ	MOC1_300_0_C_6	300	0	OXI	6	5,59	74,49	0,93	3,18	0,06
22	ΠΑΔΑ	MOC1_600_0_C_6	600	0	OXI	6	5,59	74,49	0,93	3,17	0,05
23	ΠΑΔΑ	MOC1_000_1_C_6	0	1	OXI	6	6,55	87,28	11,86	3,07	0,05
24	ΠΑΔΑ	MOC1_300_1_C_6	300	1	OXI	6	6,47	86,21	10,79	3,12	0,00
25	ΠΑΔΑ	MOC1_600_1_C_6	600	1	OXI	6	6,55	87,28	11,86	3,10	0,02
26	ΠΑΔΑ	MOC1_000_3_C_6	0	3	OXI	6	8,42	112,20	36,78	2,96	0,06
27	ΠΑΔΑ	MOC1_300_3_C_6	300	3	OXI	6	7,94	105,80	30,38	3,01	0,11
28	ΠΑΔΑ	MOC1_600_3_C_6	600	3	OXI	6	8,21	109,40	33,98	3,00	0,12
29	ΠΑΔΑ	MOC1_000_0_O_6	0	0	NAI	6	5,52	73,56	0,00	3,14	0,00
30	ΠΑΔΑ	MOC1_300_0_O_6	300	0	NAI	6	5,38	71,69	1,87	3,17	0,03
31	ΠΑΔΑ	MOC1_600_0_O_6	600	0	NAI	6	5,66	75,42	1,86	3,16	0,02
32	ΠΑΔΑ	MOC1_000_1_O_6	0	1	NAI	6	6,49	86,48	12,92	3,08	0,06
33	ΠΑΔΑ	MOC1_300_1_O_6	300	1	NAI	6	6,28	83,68	10,12	3,13	0,01
34	ΠΑΔΑ	MOC1_600_1_O_6	600	1	NAI	6	6,49	86,48	12,92	3,10	0,04
35	ΠΑΔΑ	MOC1_000_3_O_6	0	3	NAI	6	8,21	109,40	35,84	2,96	0,08
36	ΠΑΔΑ	MOC1_300_3_O_6	300	3	NAI	6	8,21	109,40	35,84	3,00	0,14
37	ΠΑΔΑ	MOC1_600_3_O_6	600	3	NAI	6	8,28	110,33	36,77	3,01	0,13

Δείγμα	Μοσχοφίλερο	Κωδικός	Προσθήκη Φουμαρικού (mg/L)	Τελικό Μηλικό (g/L)	Προσθήκη Βακτηριών	Μήνες	a	b	L	C	h	ΔΕ	Οξύ οξύ (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μηλικό οξύ (g/L)	
1	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_0_С_0	0	0	OXI	0										
2	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_0_С_3	0	0	OXI	3	2,11	5,92	97,50	6,28	70,50	0,00	0,17	0,06	0,06	
3	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_0_С_3	300	0	OXI	3	3,10	6,69	96,69	7,37	65,20	1,55	0,19	0,05	0,05	
4	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_0_С_3	600	0	OXI	3	3,23	6,35	96,76	7,12	63,10	1,51	0,19	0,05	0,05	
5	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_1_С_3	0	1	OXI	3	2,25	6,17	97,32	6,56	70,00	0,76	0,18	0,06	0,06	
6	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_1_С_3	300	1	OXI	3	3,37	6,81	96,46	7,59	63,70	1,79	0,19	0,06	0,06	
7	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_1_С_3	600	1	OXI	3	3,64	6,29	96,51	7,26	60,00	1,70	0,20	0,06	0,06	
8	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_3_С_3	0	3	OXI	3	3,53	7,68	96,23	8,45	65,40	2,11	0,19	0,06	0,06	
9	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_3_С_3	300	3	OXI	3	3,94	6,93	96,27	7,97	60,40	2,02	0,20	0,05	0,05	
10	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_3_С_3	600	3	OXI	3	4,26	6,43	96,31	7,71	56,50	1,96	0,21	0,05	0,05	
11	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_0_Ο_3	0	0	NAI	3	1,93	6,13	97,40	6,42	72,60	0,7	0,19	0,06	0,06	
12	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_0_Ο_3	300	0	NAI	3	3,05	6,67	96,66	7,33	65,50	1,59	0,19	0,07	0,07	
13	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_0_Ο_3	600	0	NAI	3	3,40	6,26	96,71	7,12	61,60	1,56	0,19	0,05	0,05	
14	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_1_Ο_3	0	1	NAI	3	2,65	6,41	97,00	6,93	67,60	1,24	0,18	0,07	0,07	
15	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_1_Ο_3	300	1	NAI	3	3,66	6,83	96,37	7,74	61,90	1,90	0,19	0,06	0,06	
16	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_1_Ο_3	600	1	NAI	3	3,72	6,36	96,36	7,36	59,70	1,79	0,20	0,05	0,05	
17	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_3_Ο_3	0	3	NAI	3	3,60	7,25	96,21	8,09	63,60	2,03	0,19	0,06	0,06	
18	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_3_Ο_3	300	3	NAI	3	3,79	7,47	96,22	8,37	63,10	2,12	0,20	0,06	0,06	
19	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_3_Ο_3	600	3	NAI	3	4,25	6,38	96,28	7,66	56,40	1,95	0,20	0,06	0,06	
20	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_0_С_6	0	0	OXI	6	1,21	12,20	95,95	12,25	84,4	2,96	0,21		1,28	
21	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_0_С_6	300	0	OXI	6	2,18	9,61	95,74	9,85	77,3	2,52	0,22		1,30	
22	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_0_С_6	600	0	OXI	6	2,50	9,40	96,00	9,72	75,2	2,32	0,21		1,26	
23	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_1_С_6	0	1	OXI	6	1,35	12,40	95,79	12,47	83,8	2,99	0,20		1,80	
24	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_1_С_6	300	1	OXI	6	2,43	9,70	95,83	9,99	76,0	2,40	0,22		1,76	
25	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_1_С_6	600	1	OXI	6	2,64	9,21	95,93	9,58	74,1	2,32	0,22		1,72	
26	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_3_С_6	0	3	OXI	6	1,45	12,64	95,62	12,72	83,5	3,04	0,21		2,35	
27	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_3_С_6	300	3	OXI	6	2,48	9,79	95,39	10,09	75,9	2,52	0,22		2,58	
28	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_3_С_6	600	3	OXI	6	2,94	9,42	95,49	9,86	72,7	2,52	0,23		2,62	
29	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_0_Ο_6	0	0	NAI	6	1,27	12,29	95,47	12,35	84,2	3,04	0,21		1,27	
30	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_0_Ο_6	300	0	NAI	6	2,11	9,81	95,90	10,03	77,9	2,34	0,22		1,12	
31	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_0_Ο_6	600	0	NAI	6	2,44	9,51	96,03	9,81	75,7	2,32	0,22		1,14	
32	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_1_Ο_6	0	1	NAI	6	1,50	12,25	95,37	12,34	83,1	3,01	0,21		1,46	
33	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_1_Ο_6	300	1	NAI	6	2,22	9,87	95,02	10,11	77,4	2,60	0,23		1,44	
34	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_1_Ο_6	600	1	NAI	6	2,68	9,45	96,10	9,82	74,2	2,34	0,23		1,46	
35	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_000_3_Ο_6	0	3	NAI	6	1,58	12,42	95,30	12,52	82,8	3,04	0,21		1,97	
36	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_300_3_Ο_6	300	3	NAI	6	2,62	9,76	95,35	10,10	75,1	2,55	0,22		2,03	
37	ΠΑΔΑ	ΜΟС1_600_3_Ο_6	600	3	NAI	6	2,82	9,43	96,15	9,84	73,4	2,36	0,22		1,99	