

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Δ.Π.Μ.Σ. ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑΣ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΑΝΝΙΝΩΝ ΤΩΝ ΓΙΓΑΡΤΩΝ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ CABERNET
SAUVIGNON.
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΟΤΙΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟΥ ΣΤΗΝ
ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΥΤΩΝ.

ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ ΕΙΡΗΝΗ

ΑΘΗΝΑ 2008

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	1
Περίληψη.....	4
1.1.Γενικά.....	5
1.1.1. Αμπέλι.....	5
1.1.2. Οίνος.....	6
1.1.3. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά της Ράγας.....	7
1.2. Φαινολικά Συστατικά.....	13
1.2.1. Βιοσύνθεση των Φαινολικών Συστατικών.....	14
1.2.2. Φαινολικά Συστατικά της Σταφυλήςκαι του Οίνου.....	19
1.2.3. Χημικές Ιδιότητες των Φαινολών.....	22
1.2.4. Αξιολόγηση της Περιεκτικότητας των Φαινολών στους Ερυθρούς και Λευκούς Οίνους.....	22
1.2.5. Οργανοληπτικές Ιδιότητες των Φαινολικών Συστατικών στους Ερυθρούς Οίνους.....	24
1.2.6. Παράγοντες που Επηρεάζουν τη Συγκέντρωση των Πολυφαινολών στις Ράγες.....	25
1.3. Τανίνες.....	28
1.3.1. Ιδιότητες Τανινών.....	30
1.3.2. Αντιδράσεις Τανινών με Πρωτεΐνες και Πολυσακχαρίτες.....	34
1.3.3. Οξειδωτικές Αντιδράσεις των Προκυανιδινών.....	37
1.3.4. Αντιδράσεις Πολυμερισμού των Προκυανιδινών.....	38

1.3.5. Οργανοληπτικά Στοιχεία που Προσδίδουν τα Φαινολικά Συστατικά στους Ερυθρούς Οίνους.....	41
1.3.6. Πορεία των Τανινών κατά την Ωρίμανση των Σταφυλών.....	42
1.3.7. Αντιδράσεις Τανινών και οι Επιδράσεις τους στη Γεύση των Οίνων.....	45
1.4. Η Ποικιλία Cabernet Sauvignon.....	47
1.5. Χαρακτηριστικά των Υποκειμένων SO4 και 1103 Paulsen.....	49
1.5.1. SO4.....	49
1.5.2. 1103 Paulsen.....	50
1.6. Περιγραφή Μεθόδων Ανάλυσης.....	51
1.6.1. Δείκτης Folin-Ciocalteu.....	51
1.6.2. Μέτρηση Φαινολικών Ουσιών με τη Μέθοδο HPLC.....	53
1.6.3. Μέτρηση Συγκέντρωσης Ταννινών με τη Μέθοδο Habertson.....	55
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	56
2.1. Περιγραφή Πειράματος.....	56
3. Περιγραφή των Μεθόδων Ανάλυσης.....	57
3.1. Εκχυλισματικότητα Χρωστικών και Μέτρηση Δείκτη Φαινολικών Ουσιών.....	57
3.2. Μέτρηση Φαινολικών Ουσιών με τη Μέθοδο HPLC	58
3.3. Μέτρηση της Συγκέντρωσης των Τανινών με τη Μέθοδο Harbertson.....	59
3.4. Δείκτης Folin – Ciocalteau	60
4. Αποτελέσματα.....	61
4.1. Προσδιορισμός Πολυφαινολικής Ωριμότητας.....	61
4.2. Αποτελέσματα Folin – Ciocalteau.....	63

4.3. Αποτελέσματα Τανινών.....	69
4.4. Αποτελέσματα HPLC.....	75
4.5 Αποτελέσματα Εκχυλισματικότητας Τανινών Γιγάρτων	83
4.6. Βάρη και Αριθμός Γιγάρτων 100 Ραγών.....	84
4.7. Βάρη 100 Ραγών.....	85
5. Συμπεράσματα.....	86
Βιβλιογραφία.....	91

Περίληψη

Στη μελέτη που παρουσιάζεται μελετήθηκε το φαινολικό δυναμικό των γιγάρτων της ποικιλίας Cabernet sauvignon. Συγκεκριμένα, το πως επηρεάζονται οι συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων ουσιών από το υποκείμενο και την άρδευση που χρησιμοποιούνται. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα υποκείμενα SO4 και 1103 Paulsen. Ακόμη, εφαρμόστηκαν τρεις τρόποι άρδευσης, στο 1/3 των πρέμνων δεν εφαρμόστηκε άρδευση, στο δεύτερο 1/3 εφαρμόστηκε άρδευση ίση με το 50% της εξατμισοδιαπνοής του πρέμνου και στα υπόλοιπα πρέμνα πλήρης άρδευση.

Από τα παραπάνω πρέμνα ελήφθησαν ώριμες, τεχνολογικά, σταφυλές κατά τα έτη 2005 και 2006. Από τις σταφυλές αυτές απομονώθηκαν τα γίγαρτα, από τα οποία εκχυλίστηκαν τα φαινολικά συστατικά. Στη συνέχεια, με τη μέθοδο της HPLC έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των διαφόρων φλαβονοειδών, ενώ με τη μέθοδο Harbertson έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τανινών. Επιπλέον, με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολών σε mg γαλλικού οξέος.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής διαπιστώθηκε ότι η άρδευση αυξάνει τις συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν για αμφότερα τα υποκείμενα. Βέβαια παρατηρήθηκαν κάποιες διαφορές μεταξύ των υποκειμένων οι οποίες οφείλονται στο βαθμό προσαρμοστικότητας τους στις εδαφικές συνθήκες του αμπελώνα στον οποίο πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

1.1. Γενικά.

1.1.1. Αμπέλι.

Το αμπέλι και η οικογένειά του ήταν γνωστά από την παλαιολιθική εποχή. Σε ανασκαφές που έγιναν βρέθηκαν απολιθώματα οиноφόρου αμπέλου που χρονολογούνται από την ηώκαινη εποχή. Επειδή το αμπέλι δεν αντέχει το ψύχος την εποχή των παγετώνων εγκλιματίστηκε στις παραμεσόγειες περιοχές και στις περιοχές της Κασπίας θάλασσας.

Τα αμπέλια ξεκίνησαν να καλλιεργούνται από την εποχή του χαλκού καθώς κουκούτσια από σταφύλια βρέθηκαν σε κατοικίες της εποχής αυτής. Επίσης σε ιερογλυφικές επιγραφές γίνονται αναφορές στην άμπελο, ενώ διάφορες ζωγραφιές σε τοίχους αναπαριστούν ανθρώπους να καλλιεργούν αμπέλια και να μαζεύουν σταφύλια. Οι εικόνες και οι γραφές αυτές χρονολογούνται 2500 χρόνια π.Χ.

Στην Ελλάδα σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, η πρώτη καλλιέργεια αμπελιού έγινε στην Κρήτη, ενώ για κάποιους άλλους στη Θράκη και χρονολογούνται γύρω στο 1000 π.Χ. Ο Όμηρος αναφέρεται στο αμπέλι και το κρασί με τις ονομασίες οίνη, Οινόη, οινιάδα και άλλα. Στη συνέχεια οι Έλληνες και οι Φοίνικες μετέφεραν αμπέλια στην Ιταλική χερσόνησο και η Σικελία έγινε κέντρο παραγωγής σταφυλιών.

Γύρω στο 600 π.Χ. Φοίνικες διέδωσαν την καλλιέργεια του αμπελιού στη Γαλλία και την περίοδο της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας το αμπέλι φτάνει στη Βρετανία. Το 13^ο αιώνα μ.Χ. οι Άραβες προωθούν τη καλλιέργεια του αμπελιού στην Ισπανία και Πορτογαλία και μέχρι το 17^ο αιώνα το αμπέλι ήταν γνωστό σε όλη σχεδόν την Ευρώπη. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν Ευρωπαϊκά αμπέλια στην Αμερική αλλά καταστράφηκαν μετά από μεγάλη επιδημία φυλλοξήρας. Συνέπεια αυτού ήταν να καλλιεργηθούν άγριες ποικιλίες ντόπιων αμπελιών ανθεκτικών στο έντομο, οι οποίες στις αρχές του 18^{ου} αιώνα έφτασαν να καλλιεργούνται στην Αγγλία και στη Γαλλία. Όμως τα αμπέλια αυτά προσβλήθηκαν από διάφορες άλλες ασθένειες που κατέστρεψαν το 70 τις εκατό των καλλιεργειών. Η λύση δόθηκε με τον εμβολιασμό άγριων αμερικάνικων αμπελιών και τη δημιουργία ανθεκτικών υβριδίων.

1.1.2. Οίνος.

Ο οίνος προέρχεται από την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους το οποίο προέρχεται από την έκθλιψη των σταφυλιών. Η αρχή λοιπόν του οίνου είναι το σταφύλι. Οι ρώγες του περιέχουν τα σάκχαρα τα οποία θα μετατραπούν σε οινόπνευμα κατά την αλκοολική ζύμωση, καθώς επίσης σε οργανικά οξέα και νερό. Για την παραγωγή ερυθρού ή ροζέ οίνου τα σταφύλια κατά κανόνα είναι ερυθρά, ενώ για τους λευκούς οίνους το σταφύλι μπορεί να είναι λευκό ή και ερυθρό. Σημαντική για το τελικό αποτέλεσμα είναι η περιεκτικότητα του σταφυλιού σε σάκχαρα και οξέα, η οποία εξαρτάται από την ποικιλία, το έδαφος, τις κλιματικές συνθήκες και από τη χρονική στιγμή του τρύγου, δηλαδή από το βαθμό ωρίμανσης του σταφυλιού. Όσο περισσότερο αφήνεται να ωριμάσει ένα σταφύλι, τόσο η περιεκτικότητά του σε σάκχαρα αυξάνεται έναντι των οξέων, έτσι είναι καταλληλότερο για την παραγωγή γλυκών οίνων και όχι ξηρών.

Επίσης, η ποιότητα της πρώτης ύλης σε συνδυασμό με τον τρόπο οινοποίησης καθορίζει και την περιεκτικότητά του παραγόμενου οίνου σε φαινολικά και αρωματικά συστατικά. Τα συστατικά αυτά καθορίζουν το χρώμα και το άρωμα των οίνων και ιδιαίτερα των ερυθρών. Σε αυτά τα συστατικά οφείλονται οι διαφορές των ερυθρών από τους λευκούς οίνους.

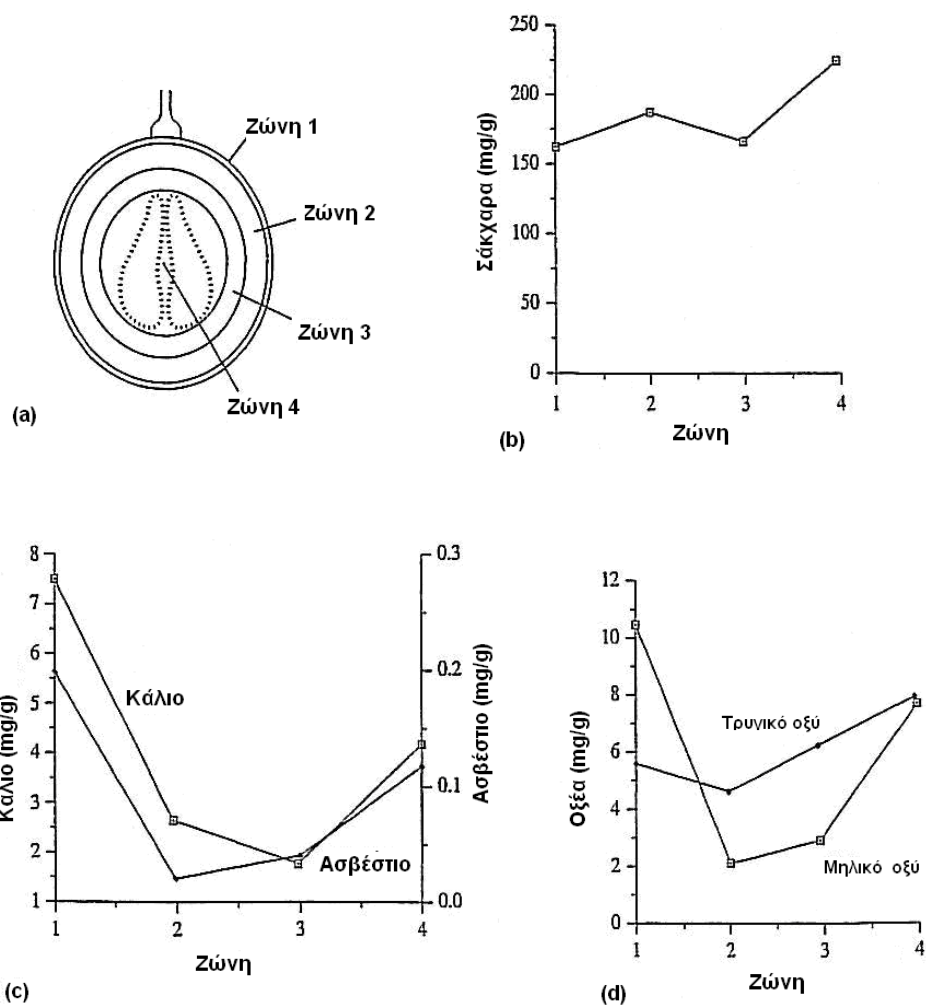
Ανάλογα με τον τρόπο οινοποίησης μεταβάλλεται το χρώμα των οίνων. Υπάρχουν δηλαδή δύο τρόποι οινοποίησης, η λευκή και η ερυθρά οινοποίηση. Στη λευκή οινοποίηση μπορούν να χρησιμοποιηθούν σταφύλια κάθε χρώματος και να δώσουν λευκό κρασί, αρκεί όταν πρόκειται για ερυθρά σταφύλια ο χυμός να ληφθεί αμέσως μετά την πίεση των σταφυλιών και πριν έρθει σε επαφή με τα στέμφυλα. Στην ερυθρά οινοποίηση χρησιμοποιούνται ερυθρά σταφύλια, ενώ τα στέμφυλα είναι παρόντα καθ' όλη τη διάρκεια της οινοποίησης.

1.1.3. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά της Ράγας.

Η ράγα προέρχεται αποκλειστικά από την ανάπτυξη των ιστών του νουκέλλου της ωοθήκης. Είναι γνήσια ράγα, δηλαδή σαρκώδης καρπός που φέρει μη-αποσχιζόμενο, και σε όλο το βάθος του, σαρκώδες περικάρπιο και περιλαμβάνει δύο συγκαρπικά καρπόφυλλα. Το κάθε καρπόφυλλο αποτελείται από δύο ανάτροπους σπερματικές βλάστες, διατεταγμένες σε αξονική θέση, οι οποίες κατά την ωρίμανση μετατρέπονται σε γίγαρτα.

Υπάρχει πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών στην ονοματολογία των ιστών της ράγας (Pratt, 1971, Viala και Pechoutre 1910, Guillon 1905, Ribereau-Gayon *et al.* 1998). Σύμφωνα με τον Fournioux (1982) ο καρπός αποτελείται από 3 κύρια τμήματα: α) το περικάρπιο ή φλοιό που αποτελείται από την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδερμα, β) το μεσοκάρπιο ή τη σάρκα και γ) το ενδοκάρπιο ή εσωτερικό στρώμα της σάρκας.

Αν χωρίσουμε τη ράγα σε τέσσερις ζώνες, η σύσταση του κάθε τμήματος περιγράφεται από τα κάτωθι σχεδιαγράμματα:



Σχήμα 1: Ανάλυση των κυριότερων συστατικών εντός της ράγας. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε mg/g νωπού βάρους. a) ζώνες της ράγας, b) σάκχαρα, c) κατιόντα και d) οξέα. (Possner και Kliewer, 1985).

Έτσι, σύμφωνα με την εικόνα 2, ο φλοιός (δηλαδή η ζώνη 1) είναι φτωχός σε σάκχαρα ενώ είναι πλούσιος σε οξέα και κατιόντα. Αντίθετα, το μεσοκάρπιο (δηλαδή οι ζώνες 2 και 3) είναι φτωχό σε οξέα και κατιόντα και πλούσιο σε σάκχαρα. Τέλος, το ενδοκάρπιο (ζώνη 4) περιέχει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σακχάρων ενώ είναι πλουσιότερο σε κατιόντα και οξέα συγκριτικά με το μεσοκάρπιο.

Αναλυτικά, για το κάθε μέρος της ράγας ισχύουν τα παρακάτω:

A) Φλοιός :

Ο φλοιός αποτελεί το 5-10% του συνολικού βάρους της ράγας. Οι Considine και Κνοκ (1979, 1981) περιγράφουν το φλοιό της ράγας ως ένα δερματώδες σύστημα που περιλαμβάνει την εφυμενίδα (η οποία καλύπτεται από την κέρινη ανθρότητα), την εξωτερική επιδερμίδα του περικαρπίου (η οποία αποτελείται από ισοδιαμετρικά κύτταρα ίδιου μεγέθους με τα εξωτερικά κύτταρα του μεσοκαρπίου) και το κολλεγχυματικό υπόδερμα. Επίσης, αποτελείται από ιστούς που είναι πλουσιότεροι σε βιταμίνη C από την σάρκα και που αποτελούνται από ουσίες που συνεισφέρουν σημαντικά στο χρώμα, στο άρωμα και στη γεύση (Mullins *et al.*, 1990).

Η εφυμενίδα καλύπτεται από ένα λεπτό στρώμα κηρώδων λεπίων που αποκαλείται κέρινη ανθρότητα. Ο σχηματισμός της κέρινης ανθρότητας αρχίζει 3 εβδομάδες μετά την άνθιση, με την εμφάνιση μικρών, απλών, υδρόφοβων κηρωδών πλακών των οποίων το μέγεθος, ο αριθμός και η πολυπλοκότητά τους αυξάνει καθώς οι ραγές ωριμάζουν. Το πάχος τους κυμαίνεται από 1,6 – 3,8 μm και μειώνεται ελαφρώς κατά την πορεία ανάπτυξης των ραγών. Ο κηρός αυτός αποτελείται κυρίως από ολεανικό οξύ (79%) και από μαλακό κηρό ο οποίος αποτελείται από μεγάλης αλύσου αλκοόλες, λιπαρά οξέα, ίχνη εστέρων, αλδεΐδες και παραφίνες. Η κέρινη ανθρότητα συμβάλλει στην ελκυστικότητα της ράγας (για τις ποικιλίες που προορίζονται για επιτραπέζια χρήση), παρεμποδίζει την απώλεια νερού από τις ραγές, ενισχύει την άμυνα κατά των εγκαυμάτων που προκαλούνται από τις ηλιακές ακτίνες, συμβάλλει στην αντοχή τους από προσβολές από παθογόνα και έντομα, συντελεί στην ταχεία απομάκρυνση της βροχής και συγκρατεί τους ζυμομύκητες. Επίσης, περιέχει συστατικά με μεγάλη θρεπτική αξία για τους ζυμομύκητες.

Η επιδερμίδα αποτελείται από μία ή δύο στοιβάδες εφαπτόμενων, επιμηκυμένων κυττάρων και είναι το στρώμα του φλοιού στο οποίο περιέχονται αρωματικές και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις, χαρακτηριστικές της κάθε ποικιλίας.

Το υπόδημα αποτελείται από 6 – 10 στοιβάδες κυττάρων, από τις οποίες οι 2-3 πρώτες περιέχουν τις ανθοκυάνες ή τις φλαβόνες, χρωστικές στις οποίες οφείλεται το χρώμα των ερυθρών και των λευκών σταφυλιών αντιστοίχως. Το υπόδημα περιλαμβάνει δύο ευδιάκριτες περιοχές: την εξωτερική, η οποία αποτελείται από ορθογώνια κύτταρα, και η εσωτερική περιοχή, η οποία αποτελείται από πολυγωνικά κύτταρα.

Τα κύτταρα του φλοιού έχουν ευδιάκριτο και ενεργό μεταβολισμό ο οποίος συμπεριλαμβάνει πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την πορεία ανάπτυξης των ραγών. Αποτελείται κυρίως από νερό (75-80%) ενώ υπάρχουν ακόμα τανίνες (1-2%), μονομερείς κατεχίνες και ελάχιστη ποσότητα σακχάρων. Επιπλέον, είναι πλούσιος σε αδιάλυτες πηκτίνες, σε κυτταρίνη και σε πρωτεΐνες, καθώς επίσης και σε οξέα όπως είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό οξύ. Τέλος, ο αριθμός των στοιβάδων του φλοιού και το μέγεθός τους αποτελεί χαρακτηριστικό της κάθε ποικιλίας.

B) Σάρκα:

Η σάρκα αποτελείται από παρεγχυματικά κύτταρα τα οποία αποτελούνται από κυτταρικές κύστες που περιέχουν το κυτταρικό χυμό. Ο κυτταρικός χυμός αποτελεί το 64-90% του βάρους των ραγών. Η σάρκα απαρτίζεται από τα κύτταρα του μεσοκαρπίου και από τα κύτταρα της εξωτερικής και εσωτερικής στοιβάδας του ενδοκαρπίου. Αποτελείται από 20-30 περίπου στοιβάδες, κατά πλειονότητα, μεγάλων πενταγωνικών ή εξαγωνικών κυττάρων. Τα τοιχώματα των κυττάρων των πρώτων κύριων στοιβάδων (κυρίως στις ποικιλίες οινοποίησης) είναι λεπτά και εύθραυστα με αποτέλεσμα να δημιουργείται κάτω από το φλοιό μια πλήρη ζώνη υγρού.

Η σάρκα περιέχει νερό (65 – 80%), σάκχαρα (10 -30%) και οργανικά οξέα, ανόργανα συστατικά, αζωτούχες ουσίες, πηκτινικές ύλες, αρωματικές ουσίες και τανίνες. Στις βαφικές ποικιλίες υπάρχουν και χρωστικές ουσίες εντός της σάρκας.

Γ) Γίγαρτα:

Τα γίγαρτα προέρχονται από την γονιμοποίηση της σπερματικής βλάστης ενώ το έμβρυο από την ανάπτυξη του εμβρυόσακκου. Όπως προαναφέρθηκε, η ωοθήκη αποτελείται από δύο καρπόφυλλα και το κάθε καρπόφυλλο από δύο σπερματικές βλάστες. Συνεπώς, ο αριθμός των γιγάρτων κυμαίνεται από 0 έως 4. Οι περιπτώσεις στις οποίες έχουμε ανάπτυξη αγίγαρτων ραγών ή ραγών με γίγαρτα τα οποία στερούνται εμβρύων οφείλονται στο φαινόμενο της εξ ερεθισμού παρθενοκαρπίας και στο φαινόμενο της στενοσπερμοκαρπίας αντίστοιχα.

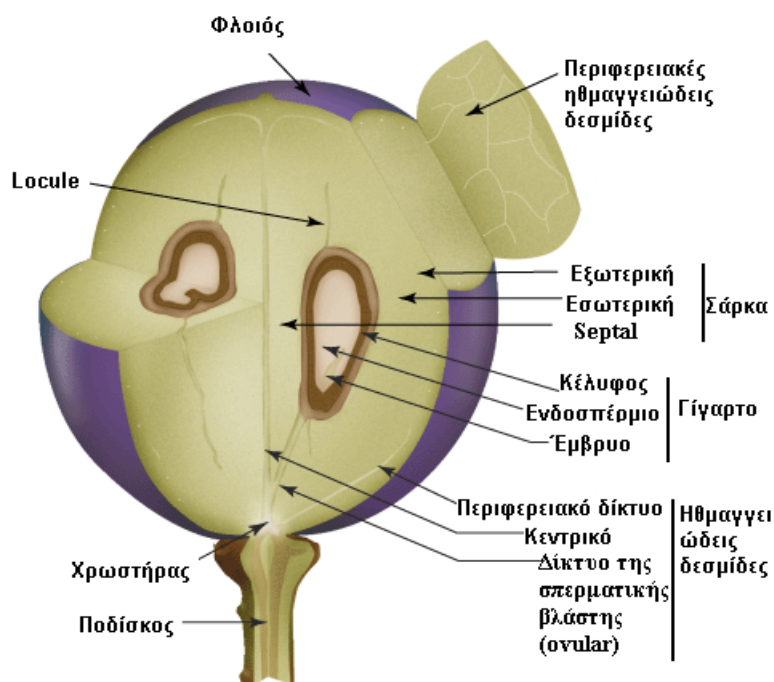
Τα γίγαρτα αποτελούνται από το οξύ μέρος, το οποίο καλείται ράμφος, και από το ωοειδές τμήμα, το οποίο καλείται σώμα. Το σώμα διαιρείται από ένα αυλάκι σε δύο λοβούς. Κάνοντας μία τομή στο γίγαρτο παρατηρούμε ότι αυτό αποτελείται από ένα ζωντανό τμήμα το οποίο καλείται σάρκα ή ιστός, το οποίο εξωτερικά προστατεύεται από το κέλυφος. Στο εσωτερικό της σάρκας του γιγάρτου και προς το μέρος του ράμφους βρίσκεται το έμβρυο.

Το κέλυφος του γιγάρτου αποτελείται από τρία στρώματα: το εξωτερικό, το μεσαίο και το εσωτερικό στρώμα. Το εξωτερικό στρώμα είναι μαλακό, αποτελεί το φλοιό του γιγάρτου και περιέχει κόκκους αμύλου και ραφίδες οξαλοξικού ασβεστίου. Το μεσαίο στρώμα είναι το σκληρό τμήμα του γιγάρτου, είναι αδιαπέραστο από το νερό και συνίσταται από 2-3 στοιβάδες κυττάρων τα οποία έχουν πολύ παχιά τοιχώματα. Επίσης, είναι πλούσιο σε τανίνες. Το στρώμα αυτό αποτελεί τον κερατοειδή ιστό. Το εσωτερικό στρώμα του κελύφους περιέχει λίγο άμυλο και αποτελείται από 2-3 στοιβάδες κυττάρων με μαλακά τοιχώματα.

Τα γίγαρτα αποτελούν το 10% του βάρους των ραγών. Γενικά, είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά (τανίνες και μονομερείς κατεχίνες) τα οποία συνεισφέρουν στις τανίνες του κρασιού (5-8%). Επιπλέον περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ελαιωδών ουσιών (10%) και λιγότερες συγκεντρώσεις ρητινωδών συστατικών. Επίσης αποτελούν έδρα σχηματισμού φυτορρυθμιστικών ουσιών. Έχει σημειωθεί ότι οι εγγίγαρτες ποικιλίες περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις αυξητικών ουσιών και αμπισικού οξέος σε σχέση με τις αγίγαρτες. Η διαπίστωση αυτή δικαιολογεί το γεγονός ότι στις εγγίγαρτες ποικιλίες παρατηρείται μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης του μεγέθους των ραγών κατά

την αρχική τους φάση ανάπτυξης και εντονότερη επίσχεση του ρυθμού αύξησης κατά την φάση II.

Γενικά, το μέγεθος και η σύνθεση των ραγών επηρεάζεται από την παρουσία των γιγάρτων: όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των γιγάρτων τόσο μεγαλύτερου όγκου είναι η ράγα με συγκριτικά μικρότερες συγκεντρώσεις σε σάκχαρα και νιτρώδη συστατικά αλλά με μεγαλύτερα επίπεδα οξύτητας.



Σχήμα 3: Δομή της ώριμης ράγας (Kennedy, 2002).

1.2. Φαινολικά Συστατικά.

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν σημαντικό παράγοντα για τη παραγωγή οίνου. Είναι υπεύθυνα για όλες τις διαφορές μεταξύ των ερυθρών και λευκών οίνων, ιδιαίτερα για το χρώμα και το άρωμα των ερυθρών οίνων. Έχουν σημαντικές θεραπευτικές ιδιότητες και χαρακτηρίζονται ως η βασική αιτία του 'γαλλικού παράδοξου'. Έχουν αντιοξειδωτικές, βακτηριοκτόνες και βιταμινούχες ιδιότητες. Έχει τεκμηριωθεί επιστημονικά ότι οι ουσίες αυτές προστατεύουν τους καταναλωτές από καρδιαγγειακές παθήσεις (Kinsella et al., 1993).

Από χημική άποψη, τα φαινολικά συστατικά έχουν βενζολικό πυρήνα ο οποίος φέρει μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες και ταξινομούνται σε μη φλαβονοειδή και φλαβονοειδή με σκελετό C₆-C₃-C₆. Οι πολυφαινόλες περιλαμβάνουν εκτός από τα πιο πάνω συστατικά και παράγωγά τους όπως εστέρες, μεθυλεστέρες, γλυκοζίτες κ.ά. τα οποία προκύπτουν με υποκατάσταση της βασικής τους δομής.

Η δραστικότητα των ενώσεων αυτών οφείλεται στην παρουσία της φαινυλομάδας, η οποία λόγω ευκινησίας του ατόμου του υδρογόνου εμφανίζει όξινο χαρακτήρα, και στον βενζολικό πυρήνα που μπορεί να υποστεί ηλεκτρονιόφιλες υποκαταστάσεις.

Η τεχνική οινοποίησης που εφαρμόζεται καθορίζει την εκχύλιση των πολυφαινολών από τα διάφορα μέρη της σταφυλής και τις μετέπειτα αντιδράσεις των μορίων αυτών, συνεισφέροντας έτσι με ουσιαστικό τρόπο στην πολυφαινολική σύσταση των οίνων. Η σωστή γνώση λοιπόν της διαφορετικής δομής των πολυφαινολών που απαντούν στη σταφυλή και των μηχανισμών εξέλιξης τους κατά την οινοποίηση και παλαίωση, είναι απαραίτητα στοιχεία για να εκτιμηθεί ο ρόλος τους στην οινολογία και στην εξέλιξη των τεχνικών οινοποίησης.

1.2.1. Βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών.

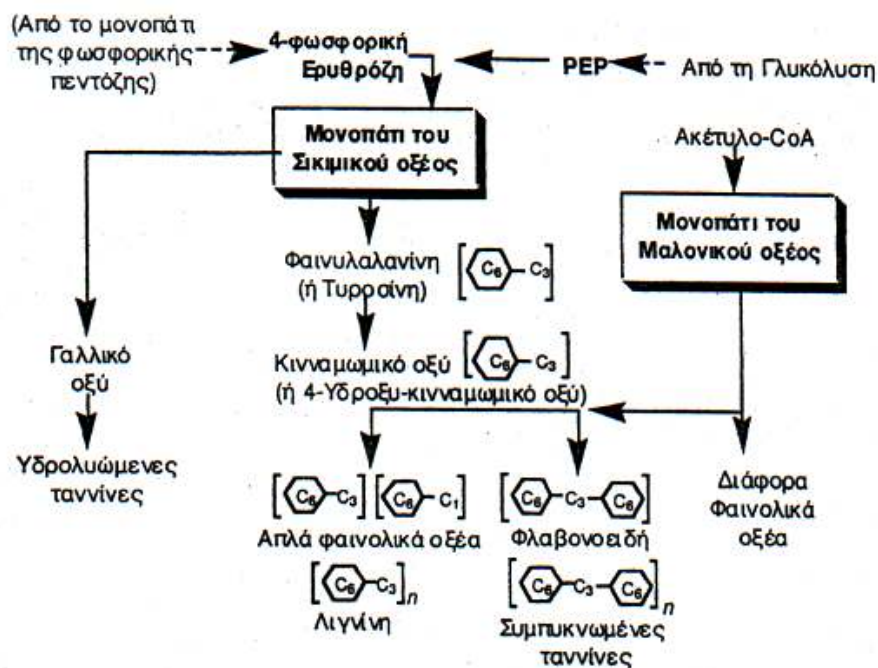
Σχεδόν όλα τα ανώτερα φυτά και πολλοί μικροοργανισμοί περιέχουν διάφορα είδη και διαφορετικές ποσότητες φαινολικών συστατικών. Τα συστατικά αυτά είναι ίσως τα πιο άφθονα από όλες εκείνες τις φυτικές χημικές ουσίες που περιλαμβάνονται στην κατηγορία των φυσικών ή δευτερογενών προϊόντων. Αν εξαιρέσουμε μεμονωμένες περιπτώσεις, η λειτουργία των περισσότερων φαινολών είναι ασαφής. Σήμερα για τις περισσότερες γνωρίζουμε ότι είναι παραπροϊόντα του μεταβολισμού με ενεργό δραστηριότητα, όπως δυτικές ορμόνες, οξειδοαναγωγικοί συμπαράγοντες (π.χ. το συνένζυμο Q-ουβικινόνη), χρωστικές των φλαβονοειδών κ.λ.π. Στη φύση απαντούν πολλές φορές υπό μορφή γλυκοζιτών μάλλον, παρά σε ελεύθερη κατάσταση και συνεπώς πολλές φαινόλες αποτελούν το άγλυκο τμήμα γλυκοζιτών. Το σάκχαρο που συμμετέχει μπορεί να είναι η γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη καθώς επίσης και άλλα σάκχαρα λιγότερο γνωστά.

Όλα τα φαινολικά συστατικά έχουν έναν αρωματικό δακτύλιο ο οποίος φέρει τουλάχιστον μια υδροξυλική ομάδα συνδεδεμένη με άνθρακα του πυρήνα ή δραστικά παράγωγα, όπως καρβοξυλικές ή μεθοξυλικές ομάδες (-O-CH₃), καθώς επίσης και άλλες δομές μη αρωματικού δακτυλίου. Οι πιο γνωστές φαινόλες είναι η φαινόλη, η κατεχόλη, η υδροκινόνη και η φλωρογλυκινόλη. Οι φυτικές φαινόλες παρουσιάζουν μια ετερογένεια ως προς τη διαλυτότητά τους, αφού μερικές είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, μερικές είναι υδατοδιαλυτές (κυρίως καρβοξυλικά οξέα και γλυκοζίτες), ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή. Οι ιδιότητες αυτές προσδίδουν ξεχωριστούς χαρακτήρες στις φαινόλες και ταυτόχρονα τις ξεχωρίζουν από τα άλλα χημικά συστατικά.

Σε σχέση με τη χημική τους ποικιλότητα οι φαινόλες εκδηλώνουν διάφορους ρόλους στα φυτά. Μερικές έχουν κάποιους αμυντικούς ρόλους κατά των

φυτοφάγων ζώων και των παθογόνων οργανισμών. Άλλες λειτουργούν για μηχανική υποστήριξη, άλλες για την προσέλκυση επικονιαστών και τη διασπορά των καρπών, ενώ άλλες για τη μείωση της αύξησης των γειτονικών ανταγωνιστικών φυτών (Hill et al., 1981).

Οι φυτικές φαινόλες βιοσυντίθενται με αρκετά διαφορετικές πορείες και κατά συνέπεια συνιστούν μια ετερογενή ομάδα από άποψη μεταβολικής διαδικασίας. Συμμετέχουν δύο κυρίως μονοπάτια. Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του μαλονικού οξέος (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Βιοσύνθεση φυτικών φαιολών από διαφορετικά μονοπάτια. (Καράταγλης Σ., 1994).

Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος συμμετέχει στη βιοσύνθεση των περισσότερων φυτικών φαινολών. Η σημασία της πορείας αυτής δεν οφείλεται μόνο στο σχηματισμό των φαινολών, αλλά κυρίως επειδή προμηθεύει τον αρωματικό δακτύλιο για το σχηματισμό των αρωματικών αμινοξέων, της φαινυλαλανίνης, της τυροσίνης και της θρυπτοφάνης. Το μονοπάτι αυτό έχει βρεθεί τόσο στους μικροοργανισμούς όσο και στους μύκητες και τα ανώτερα φυτά.

Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος αρχίζει από απλούς υδατάνθρακες και προχωράει προς αρωματικά αμινοξέα. Επειδή ένα από τα ενδιάμεσα προϊόντα του μονοπατιού αυτού είναι το σικιμικό οξύ, έγινε αφορμή να δώσει το όνομα του σε όλη τη σειρά των αντιδράσεων. Οι απλοί αυτοί υδατάνθρακες προέρχονται από τη γλυκόλυση (PEP) και από το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης (4-P-ερυθρόζη). Η ένωση των δύο αυτών υδατανθράκων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας ένωσης με επτά άτομα άνθρακα, η οποία κυκλοποιείται και δίνει το 5-δεϋδροκινικό οξύ. Η ένωση αυτή βρίσκεται σε ισορροπία με το κινικό οξύ. Το 5-δεϋδρο-κινικό οξύ στη συνέχεια μετατρέπεται σε 5-δεϋδρο-σικιμικό οξύ, από το οποίο είναι δυνατό να σχηματιστούν είτε γαλλικό οξύ είτε πρωτοκατεχικό, είτε σικιμικό οξύ. Το τελευταίο μετά από φωσφορυλίωση και τη προσθήκη ενός μορίου PEP μετατρέπεται στον 5-φωσφορικό εστέρα του 3-ενολοπυροσταφυνιλο-σικιμικού οξέος. Η ένωση αυτή με τη σειρά της μετατρέπεται σε χωριστικό οξύ. Από το στάδιο αυτό η βιοσυνθετική πορεία χωρίζεται σε δύο διαφορετικές κατευθύνσεις. Η μία κατεύθυνση μέσω του ανθρανλικού οξέος οδηγεί στο σχηματισμό της θρυπτοφάνης και από αυτή στο σχηματισμό της φυτορμόνης ινδολυλοξικό οξύ (IAA). Η άλλη πορεία οδηγεί στο σχηματισμό του πρεφενικού οξέος. Αυτό με τη σειρά του σχηματίζει το αρογενικό οξύ, το οποίο μας δίδει είτε τυροσίνη είτε φαινυλαλανίνη. Έτσι λοιπόν σχηματίζονται τα τρία βασικής σημασίας αρωματικά αμινοξέα.

Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος έχει βρεθεί στα ανώτερα φυτά, στους μύκητες και τα βακτήρια, αλλά δεν υπάρχει στα ζώα. Τα ζώα επομένως δεν έχουν τρόπο να συνθέσουν τα τρία αυτά αρωματικά αμινοξέα και συνεπώς τα

προμηθεύονται έτοιμα από το φυτικό βασίλειο αφού είναι βασικές θρεπτικές ουσίες στη διατροφή τους (Καράταγλης Σ., 1994).

Πολλές ομάδες των δευτερογενών φυτικών φαινολικών προϊόντων προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη και τυροσίνη, όπως για παράδειγμα τα οξέα κινναμωμικό, π-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό, χλωρογενικό, πρωτοκατεχικό και γαλλικό. Τα πρώτα τέσσερα προέρχονται αποκλειστικά από τη φαινυλαλανίνη και τυροσίνη. Θεωρούνται σπουδαία όχι μόνο γιατί είναι άφθονα σε ελεύθερη μορφή, αλλά διότι μετατρέπονται σε διάφορα παράγωγα, τα οποία περιλαμβάνουν τις φυτοαλεξίνες, τις κουμαρίνες, τη λιγνίνη, διάφορα φλαβονοειδή όπως οι ανθοκυανίνες κλπ. Ένα κύριο βήμα για τη σύνθεση αυτών των παραγώγων είναι η μετατροπή της φαινυλαλανίνης σε κινναμωμικό οξύ με την αποβολή ενός μορίου αμμωνίας. Η αντίδραση καταλύεται από την αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (Phenylalanine Ammonia-Lyase, PAL). Σε μερικά φυτά, η βασική αυτή αντίδραση μετατροπής φαίνεται πως γίνεται με ανάλογη μετατροπή της τυροσίνης και καταλυτική δράση της αμμωνιακής λυάσης της τυροσίνης (Tyrosine Ammonia-Lyase, TAL).

Άρα, η φαινυλαλανίνη με απαμίνωση μετατρέπεται αρχικά σε κινναμωμικό οξύ και αυτό με υδροξυλίωση σε π-κουμαρικό οξύ, ενώ η τυροσίνη με απαμίνωση μετατρέπεται απευθείας σε π-κουμαρικό οξύ. Στη συνέχεια το π-κουμαρικό οξύ με την προσθήκη υποκαταστατών μας δίνει μια σειρά ενώσεων που αποτελούν μέλη της οικογένειας του κινναμωμικού οξέος. Συγκεκριμένα, το κινναμωμικό οξύ μετατρέπεται σε π-κουμαρικό οξύ με την προσθήκη μιας OH ομάδας στην πάρα θέση του κινναμωμικού οξέος. Στη συνέχεια το π-κουμαρικό οξύ με την προσθήκη μιας άλλης υδροξυλικής ομάδας προσκείμενη στην ομάδα OH-ομάδα του π-κουμαρικού σχηματίζει το καφεϊκό οξύ. Προσθήκη μιας μεθυλικής ομάδας από την SAM (S-αδενόσυλο-μεθειονίνη) στη δεύτερη από τις OH-ομάδες του καφεϊκού οξέος μας δίνει το φερουλικό οξύ. Το τελευταίο υδροξυλιώνεται και μετατρέπεται σε υδροξυ-φερουλικό οξύ, το οποίο μεθυλιούμενο μετατρέπεται σε σιναπικό οξύ.

Η αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL), είναι ένα ενδιαφέρον ένζυμο του δευτερογενούς μεταβολισμού, η δραστηριότητα της οποίας στα φυτά ελέγχεται από ποικίλους εξωτερικούς και εσωτερικούς παράγοντες, όπως π.χ. από τις ορμόνες, από τα επίπεδα των θρεπτικών ουσιών, από το φως (μέσω της δράσης του στο φυτόχρωμα), από τη μόλυνση με μύκητες, από τραυματισμούς κλπ. Η επίδραση κάποιου από τους παράγοντες αυτούς π.χ. προσβολή από μύκητα, έχει ως αποτέλεσμα την αντιγραφή του αγγελιοφόρου RNA που κωδικοποιεί την PAL και έτσι αυξάνεται η σύνθεση τη PAL, η οποία με τη σειρά της διεγείρει τη σύνθεση των φαινολικών συστατικών. Το προϊόν της PAL, όπως είδαμε, είναι το κινναμωμικό οξύ, ένα απλό C₉ φυτικό φαινολικό συστατικό γνωστό και ως φαινυλοπροπάνιο, επειδή περιέχει ένα βενζοϊκό δακτύλιο (C₆) και μία C₃ πλευρική αλυσίδα. Τα φαινυλοπροπάνια παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί είναι οι βασικές δομικές μονάδες των περισσότερων σύμπλοκων φαινολικών συστατικών (Καράταγλης Σ., 1994).

Τα φαινολικά συστατικά πολυμερίζονται με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολύ σημαντικών για τα φυτά ουσιών, όπως η λιγνίνη.

1.2.2. Φαινολικά Συστατικά της Σταφυλής και του Οίνου.

Το 1963 ο Hermann ανέφερε ότι τα σταφύλια περιέχουν και άλλες φαινολικές ουσίες, πλην των ανθοκυανών. Τέτοιες ουσίες είναι το χλωρογενικό οξύ, το ισοχλωρογενικό οξύ, το νέοχλωρογενικό οξύ, ο εστέρας του π-κουμαρικού οξέος, φλαβανοδιόλες και προανθοκυανιδίνες όπως (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, (+)γαλοκατεχίνη, (-)-επιγαλοκατεχίνη, epicatechin gallate, φλαβονόλες και φλαβονόνες όπως ισοκερκετίνη, κερκετίνη, μυρικτρίνη, γλυκοσιδάση της καμφορόλης και άλλα φαινολικά συστατικά όπως το γαλλικό οξύ, το ελαγικό οξύ και το προκατεχικό οξύ.

Τα σταφύλια και το κρασί περιέχουν βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα. Οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται στα 100-200 mg/L στους ερυθρούς οίνους και 10-20 mg/L στους λευκούς. Έχουν ταυτοποιηθεί επτά βενζοϊκά οξέα (σχήμα 5). Τα δύο από αυτά ανευρίσκονται σε ίχνη, αυτά είναι το σαλικυλικό οξύ και το γεντισικό οξύ. Τα διάφορα οξέα διαφοροποιούνται ως προς την υποκατάσταση στον βενζολικό δακτύλιο. Στη σταφυλή, βρίσκονται σε συνδυασμό με γλυκοσιδάσες, από τις οποίες αποδεσμεύονται με όξινη υδρόλυση και από τους εστέρες (γαλλο- και ελάγι-τανίνες) με αλκαλική υδρόλυση. Οι ελεύθερες μορφές είναι παρούσες, κυρίως στα ερυθρά κρασιά, εξαιτίας της υδρόλυσης αυτών των συμπλόκων και των αντιδράσεων θερμικής διάσπασης των πιο περίπλοκων μορίων (Galvin, 1993).

Πολλά κινναμωμικά οξέα, όπως το π-κουμαρικό, το καφεϊκό και το φερουλικό, υπάρχουν στα σταφύλια και το κρασί. Έχουν ανιχνευθεί σε μικρές ποσότητες σε ελεύθερη μορφή, αλλά κυρίως εστεροποιημένα και μάλιστα με τρυγικό οξύ (Ribereau-Gayon, 1965). Οι εστέρες του τρυγικού οξέος, ιδιαίτερα το καφταρικό οξύ, είναι εξαιρετικά οξειδώσιμα συστατικά του σταφυλικού χυμού και είναι υπεύθυνα για το καφέτιασμα των λευκών οίνων (Cheynier et al., 1989). Τα κινναμωμικά οξέα συνδυαζόμενα με μονογλυκοζίτες των ανθοκυανινών σχηματίζουν ακυλιωμένες ανθοκυάνες, μέσω της εστεροποίησης του καφεϊκού οξέος και του π-κουμαρικού οξέως με τη γλυκόζη του γλυκοζίτη.

Τα φαινολικά οξέα όταν βρίσκονται διαλυμένα σε αλκοολικό διάλυμα είναι άχρωμα, αλλά μπορεί να γίνουν κίτρινα εξαιτίας της οξείδωσης. Από οργανοληπτική πλευρά, τα συστατικά αυτά δεν έχουν ιδιαίτερη γεύση ή άρωμα. Παρόλα αυτά, είναι πρόδρομοι των αρωματικών φαινολών οι οποίες παράγονται με τη δράση συγκεκριμένων μικροοργανισμών (ζύμες του γένους *Brettanomyces* και βακτηρίων). Οι αιθύλ-φαινόλες, με οσμές ζώων, και οι αιθύλ-γουαϊακόλες βρίσκονται στους ερυθρούς οίνους. Στους λευκούς οίνους, οι βινύλ-φαινόλες, με οσμή διαλυτικού. Συνοδεύονται από βινύλ-γουαϊακόλες. Έχει αποδειχθεί ότι αυτά τα συστατικά προέρχονται από τη διάσπαση του π-κουμαρικού και του φερουλικού οξέος (Chatonnet, 1995).

Οι οίνοι όταν παλαιώνουν σε δρύινα βαρέλια, εξαιτίας των διεργασιών που γίνονται κατά την κατασκευή των βαρελιών προκαλείται η διάσπαση των λιγνινών και ο σχηματισμός διαφόρων συστατικών της ίδιας οικογένειας, με μια ποικιλία οσμών ξύλου και καπνού. Οι ουσίες που είναι υπεύθυνες γι'αυτές τις οσμές είναι η γουαϊακόλη, η μεθύλ-γουαϊακόλη, η προπύλ-γουαϊακόλη, η ισοευγενόλη, η συριγκόλη και η μεθύλ-συριγκόλη.

Η τυροσόλη ή π-υδροξυ-φενυλ-αιθυλ-αλκοόλη μπορεί να περιλαμβάνεται σε αυτή την ομάδα συστατικών (Ribereau-Gayon και Sapis, 1965). Υπάρχει και στα κόκκινα και στα λευκά κρασιά (20-30 mg/l) και σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση από την τυροσίνη, δηλαδή συντίθεται από τις ζύμες. Το συστατικό αυτό, το οποίο παραμένει σε σταθερές ποσότητες κατά την ωρίμανση, συνοδεύεται από άλλες δύο αλκοόλες, την τρυπτοφόλη (0-1 mg/L) και φαινυλ-αιθυλ αλκοόλη (10-75 mg/L).

Οι κουμαρίνες μπορεί να θεωρηθούν παράγωγα των κινναμωμικών οξέων, σχηματίζονται από την εστεροποίηση ενός φαινολικού ΟΗ. Αυτά τα μόρια είναι συστατικά του βαρελιού, είτε σε γλυκοζιλιωμένη μορφή στο πράσινο ξύλο ή σε άγλυκη μορφή στο φυσικά ώριμο ξύλο. Παρόλαυτά μικρές ποσότητες κουμαρινών βρίσκονται σε οίνους παλαιωμένους σε βαρέλια, επίσης έχουν επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, καθώς οι γλυκοζίτες είναι πικροί και οι αγλυκόνες είναι όξινες, με μια συγκέντρωση στα ερυθρά κρασιά της τάξης των 3 mg/L.

Μια άλλη οικογένεια πιο περίπλοκων πολυφαινολών υπάρχει στα σταφύλια, στο κρασί και στα ξύλο δρυός. Τα στιλβένια έχουν δύο βενζολικούς δακτυλίους, ενωμένους με αιθάνιο ή πιθανότατα αιθυλένιο. Μεταξύ αυτών των trans-ισομερών συστατικών, ο ρεσβερατρόλης ή 3,5,4-τρι-υδροξυστιλβένιο, παράγεται από την άμπελο ως προστατευτικό σε μια μυκητολογική ασθένεια (Langcake, 1981). Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται στους φλοιούς, εξάγεται από αυτούς κατά την οινοποίηση των ερυθρών οίνων και φαίνεται ότι έχει κάποιες ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία. Οι συγκεντρώσεις είναι της τάξης 1-3 mg/L . Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι

υπάρχουν πολλά ολιγομερή του ρεσβερατρόλη στα είδη του *Vitis vinifera* (Jeandet et al., 1995, Bourhis et al., 1996)

1.2.3. Χημικές Ιδιότητες των Φαινολών.

Αν αντικατασταθεί ένα υδροξύλιο με ένα υδρογόνο στο βενζολικό δακτύλιο παράγεται μια φαινόλη με μικρή οξύτητα το οποίο αντιδρά με ηλεκτρόφιλα αντιδραστήρια. Σε αλκαλικό μέσο, το πρωτόνιο αντικαθίσταται με ένα μέταλλο.

Οι ελεύθερες θέσεις του βενζολίου με αρνητικό φορτίο ενώνονται με ελεύθερα μόρια οξυγόνου. Δημιουργείται έτσι μια ένωση ηλεκτρονίων, η οποία σε οριακές περιπτώσεις εμφανίζει θετικό φορτίο στο άτομο του οξυγόνου και αρνητικό στον δακτύλιο του βενζολίου (Riberaeu-Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu).

1.2.4. Αξιολόγηση της Περιεκτικότητας των Φαινολών στους Ερυθρούς και Λευκούς Οίνους.

Οι οίνοι περιέχουν ιδιαίτερα μεταβλητές ποσότητες σε φαινολικά συστατικά. Η ιδανική μέθοδος για τον υπολογισμό των φαινολικών συστατικών θα ήταν ο διαχωρισμός όλων των συστατικών και η καταγραφή αυτών ξεχωριστά. Αυτό δεν είναι πάντα εφικτό, λαμβάνοντας υπόψη τη διαφορετικότητα των μορίων και τη δυσκολία του να αναλυθούν όλα αυτά. Επιπλέον, ακόμη και οι πιο αποτελεσματικές μέθοδοι είναι συχνά δύσκολο να εφαρμοστούν, και τα αποτελέσματα δεν είναι πλήρη και είναι δύσκολα να αξιοποιηθούν. Παρόλαυτά είναι χρήσιμα για ερευνητικούς σκοπούς, αυτές οι τεχνικές δεν είναι εύκολα εφαρμόσιμες στη πρακτική οινοποίηση.

Μια παγκόσμια αξιολόγηση της περιεκτικότητας των φαινολών του οίνου, εκφρασμένη σε αριθμητική μορφή, είναι μια ιδιαίτερα ελκυστική ιδέα, μαζί με τη συνολική οξύτητα η οποία δίνει στους οινοπαραγωγούς μια ικανοποιητική εικόνα για την οξύτητα του οίνου. Αυτό θα έκανε δυνατή την κατηγοριοποίηση των οίνων ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε φαινολικά συστατικά και θα αξιολογούσε την επίδραση του τρόπου οινοποίησης στην εξαγωγή αυτών των στοιχείων. Επιπλέον, η έκφραση με μια συνολική αξία του συνδυασμού του βάρους των διαφόρων στοιχείων (οινολογικές τανίνες, γαλλικό οξύ, κατεχίνη κ. τ. λ.) τα οποία αντιπροσωπεύουν ένα τμήμα των φαινολών του μέσου, είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί.

Οι μέθοδοι οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση αυτή θα πρέπει να υπακούουν σε τρία βασικά κριτήρια. Θα πρέπει, αρχικά, να είναι γρήγορες, τα αποτελέσματα θα πρέπει να μπορούν να αναπαραχθούν και

τέλος θα πρέπει να περιλαμβάνουν όλα τα μόρια των φαινολών. Οι διάφορες μέθοδοι βασίζονται στις χημικές ιδιότητες των μορίων αυτών.

Η τιμή του υπερμαγγανικού άλατος δεν χρησιμοποιείται πια (Ribereau-Gayon et al., 1982). Η τιμή του Folin-Ciocalteu (Ribereau-Gayon, 1970) χρησιμοποιεί οξειδώσιμα συστατικά, όπως το υπερμαγγανικό κάλιο και το Folin-Ciocalteu (μίγμα H3 PW12 O40 και φωφομολυβδικό – H3PMO12O40 –οξύ) τα οποία δρουν στις φαινόλες εξαιτίας των ιδιοτήτων αναγωγής που διαθέτουν. Στη πρώτη αντίδραση, στη φάση του μπλε, παράγεται ένα κίτρινο διάλυμα, το οποίο αξιολογείται με το μάτι. Η δεύτερη μέθοδος χαρακτηρίζεται από μπλε χρωματισμό και μετράται με σπεκτοφωτόμετρο. Μια Τρίτη μέθοδος βασίζεται στη χαρακτηριστική απορρόφηση των βενζολικών δακτυλίων της πλειοψηφίας των φαινολών στα 280 nm (Flanzky και Roux 1958, Ribereau-Gayon, 1970).

Για το διαχωρισμό και τον υπολογισμό της ποσότητας των φαινολικών συστατικών από περίπλοκα μίγματα, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι αυτή που χρησιμοποιείται σήμερα. Αυτή η χρωματογραφική τεχνική έχει το πλεονέκτημα ότι είναι συμπληρωματική σε άλλες.

1.2.5. Οργανοληπτικές Ιδιότητες των Φαινολικών Συστατικών στους Ερυθρούς Οίνους.

Τα φαινολικά συστατικά παίζουν ένα ζωτικό ρόλο στη γεύση των ερυθρών οίνων. Είναι υπεύθυνες για κάποια θετικά γευστικά χαρακτηριστικά, αλλά επίσης για κάποιες αρνητικές, όχι ευχάριστες ιδιότητες. Το σώμα, η υφή, η γεμάτη γεύση και η στρογγυλότητα είναι οι ιδιότητες ποιότητας

χαρακτηριστικές των μεγάλων ερυθρών οίνων. Από την άλλη μεριά, η πικράδα, η σκληρότητα, η επιθετικότητα και η λεπτότητα είναι ελαττώματα τα οποία θα πρέπει να αποφεύγονται καθώς είναι ασύμβατα με την ποιότητα.

Η γενική οργανοληπτική εντύπωση βασίζεται στην αρμονική ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο τύπων αισθήσεων, συνδέονται άμεσα με τον τύπο και τη συγκέντρωση των διαφόρων μορίων, όπως οι ανθοκυάνες και ιδιαίτερα οι τανίνες. Μία από τις ιδιότητες είναι να αντιδρά με γλυκοπρωτεΐνες στη μυκίνη και πρωτεΐνες στη στοματική κοιλότητα, διαφοροποιώντας τη κατάστασή τους και τις λιπαντικές τους ιδιότητες.

Ανάλογα με τον τύπο και τη συγκέντρωση των τανινών, μπορεί να δημιουργηθεί μια απαλή, ισορροπημένη εντύπωση ή αντίθετα μια ιδιαίτερη επιθετικότητα η οποία είναι αντιληπτή ως πικρότητα στο πίσω μέρος του ουρανίσκου ή στυφάδα κατά την επίγευση.

Το να γίνουν ξεχωριστές μετρήσεις των βασικών αυτών αισθήσεων είναι ιδιαίτερα δύσκολο. Όμως η μέτρηση των ζελατινών μπορεί να δώσει τη δυνατότητα υπολογισμού της ικανότητας αντίδρασης με τις πρωτεΐνες. Η εντονότερη αντίδραση των φαινολών με τη ζελατίνη εξαρτάται από τις συνθήκες του μέσου. Η οξύτητα είναι ένας επιθυμητός παράγοντας, αντίθετα από τη περιεκτικότητα σε αλκοόλ, η οποία περιορίζει την αντίδραση και δίνει μια πιο γλυκιά γεύση. Η πιο πάνω αντίδραση είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση των τανινών σε τιμές μεγαλύτερες από 50 mg/L (Glories, 1983). Κάτω όμως από δεδομένες συνθήκες στις οποίες μπορεί να γίνει η αντίδραση, είναι δυνατό να κατηγοριοποιηθούν κάποιες πολυφαινόλες με βάση την ικανότητά τους να δεσμεύονται.

Η αντίδραση μεταξύ των τανινών και πρωτεϊνών εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού των προκυανιδινών (Lea, 1992). Η επιθετικότητα αυξάνεται μέχρις ορίου και μετά μειώνεται καθώς τα μόρια γίνονται μεγαλύτερα. Η μέγιστη επιθετικότητα παρατηρείται στις τετραμερείς προκυανιδίνες (Riberaeu-Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu).

1.2.6. Παράγοντες που Επηρεάζουν τη Συγκέντρωση των Πολυφαινολών στις Ράγες.

- Εδαφοκλιματικές Συνθήκες.

Η ωριμότητα του καρπού είναι σημαντική για τη συνολική ποιότητα του ερυθρού οίνου, ακόμα όμως δεν είναι ξεκάθαρο σε ποιο βαθμό οι τανίνες των γιγάρτων μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μονομερή της 3-φλαβανόλης και οι τανίνες με μικρό μοριακό βάρος μειώνονται κατά τη φάση της ωρίμανσης (Czochanska et al., 1979, Romeyer et al., 1986). Όμως, το μοριακό βάρος των τανινών των γιγάρτων μπορεί να φτάσει τα 3000 D (Foo και Porter, 1981, Prieur et al., 1994), δεν υπάρχει όμως καμία πληροφορία για το μοριακό βάρος και τις μεταβολές στη σύνθεση κατά τη περίοδο αυτή. Κάποιες ενδείξεις, οι οποίες βασίζονται στο ότι το βάρος των γιγάρτων αυξάνεται κατά την ωρίμανση του καρπού, δείχνουν ότι τα γίγαρτα συνεχίζουν να εξελίσσονται και κατά τη περίοδο αυτή (Staudt et al., 1986) και η εξέλιξη αυτή μπορεί να επηρεάσει τις τανίνες. Παράλληλα με την ωρίμανση του καρπού, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες (που επηρεάζουν την υδατική κατάσταση του πρέμνου) προκαλούν μεταβολές στις πολυφαινόλες των σταφυλιών. Είναι ξεκάθαρο ότι η υδατική κατάσταση του πρέμνου επηρεάζει την ανάπτυξη του καρπού (Matthews et al., 1987), τη συγκέντρωση των ολικών φαινολών (Matthews και Anderson, 1988) και την αίσθηση στυφάδας στο κρασί (Matthews et al., 1990). Ακόμη δεν έχει διευκρινιστεί αν οι μεταβολές στην πολυφαινολική σύνθεση των γιγάρτων είναι αποτέλεσμα των μεταβολών στην άρδευση. Η υδατική κατάσταση στην οποία βρίσκεται το πρέμνο εξαρτάται όχι μόνο από την άρδευση που εφαρμόζεται αλλά και από τον τύπο του εδάφους, τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής που βρίσκεται το πρέμνο και από το υποκείμενο που έχει επιλεγεί και συγκεκριμένα από το πόσο

αντέχει στις συνθήκες (κυρίως θερμοκρασίας και υγρασίας) που επικρατούν στη περιοχή όπου βρίσκεται το πρέμνο και από τη συμφωνία του με τη ποικιλία που επιλέγεται.

Ακόμη, εκτός από υδατική κατάσταση του πρέμνου, τη συσσώρευση των φαινολών επηρεάζουν και οι κλιματικές συνθήκες στις οποίες βρίσκεται το πρέμνο. Πρόσφατα πειράματα εφαρμογής σκίασης στην ποικιλία “Cabernet sauvignon” έδειξαν ότι η ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας επηρεάζει, μεταξύ των άλλων συστατικών, τις ανθοκυάνες και τις ολικές φαινόλες. Ο βαθμός της επίδρασης στους παραπάνω παράγοντες επηρεάζεται από την σχέση ερυθρή : υπέρυθη ακτινοβολία (R:FR) (Mullins *et al.*, 1990).

- ο Ποικιλία

Η κάθε ποικιλία έχει διαφορετική ικανότητα συσσώρευσης φαινολικών ουσιών. Για παράδειγμα, μετά από έρευνες βρέθηκε ότι η ποικιλία Touriga Nacional είναι πιο πλούσια σε 3-φλαβανόλες μικρού μοριακού βάρους σε σχέση με τη ποικιλία Touriga Francesa. Αντίθετα, η Touriga Francesa περιείχε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προανθοκυανιδινών (Mateus, Marques *et al.*, 2001).

Ακόμη, μεταξύ των ποικιλιών μεταβάλλονται και οι ποσότητες των διαφόρων φαινολικών ουσιών. Συγκεκριμένα, η ποικιλία Cabernet Sauvignon έχει μεγαλύτερες ποσότητες προκυανιδινών μικρού μοριακού βάρους σε σχέση με τη ποικιλία Merlot (de Freitas, Glories, Monique, 2000).

- ο Καλλιεργητική Τεχνική.

Στη καλλιεργητική τεχνική περιλαμβάνονται παράγοντες όπως άρδευση, υποκείμενο και χλωρά κλαδεύματα.

Η άρδευση, όπως είπαμε πιο πάνω επηρεάζει την υδατική κατάσταση του πρέμνου. Το υποκείμενο επηρεάζει την υδατική αλλά και τη θρεπτική κατάσταση του πρέμνου.

Από έρευνες έχει βρεθεί ότι μια σχετική έλλειψη νερού μπορεί να έχει θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα στη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ανάλογα με τον τύπο του συστατικού που μελετάται, τη περίοδο που εφαρμόζεται και το βαθμό της έλλειψη νερού (Ojeda, Andary et al., 2002). Υπάρχουν βέβαια και πειράματα τα οποία έδειξαν ότι έλλειψη νερού δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη συγκέντρωση των τανινών των γιγάρτων, όπως επηρεάζει για παράδειγμα τις ανθοκυάνες. Όμως, η συγκέντρωση των τανινών των γιγάρτων φαίνεται ότι αυξάνεται με την αύξηση του μεγέθους των ραγών στις ράγες με πολλά γίγαρτα. Αντίθετα με τις ανθοκυάνες, οι τανίνες των γιγάρτων φαίνεται να μεταβάλλονται περισσότερο σε σχέση με το μέγεθος της ράγας και λιγότερο με την υδατική κατάσταση του πρέμνου. Η μείωση του μεγέθους της ράγας φαίνεται ότι επηρεάζει περισσότερο τη συγκέντρωση των ανθοκυανών και των τανινών των φλοιών από ότι των τανινών των γιγάρτων (Roby, Harbertson, Adams και Matthews, 2004) .

1.3. Τανίνες.

Εκτός από τη λιγνίνη ένα άλλο επίσης σημαντικό πολυμερές των φυτικών φαινολών είναι οι τανίνες. Το όνομά τους προέρχεται από την κελτική λέξη 'tan' που σημαίνει βελανιδιά, στα φύλλα της οποίας σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες τανινών. Επίσης ο όρος τανίνες χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τις ουσίες εκείνες που θα μπορούσαν να μετατρέψουν τα ακατέργαστα ζωϊκά δέρματα σε κατεργασμένα άσηπτα δέρματα με τη διαδικασία της δέψης.

Οι τανίνες βρίσκονται σε πολλά φυτικά είδη, κυρίως όμως συντίθενται εντονότερα μετά από τραυματισμό του φυτικού ιστού, οπότε καταστρέφονται τα κύτταρα και κατά συνέπεια και η υπάρχουσα διαμερισματοποίησή τους. Λόγω αυτής της καταστροφής έρχονται σε επαφή οι πολυφαινολικές οξειδάσες με τα φαινολικά υποστρώματα όπως το γαλλικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και τα φλαβονοειδή. Η οξειδωση των φαινολικών ενώσεων από τις πολυφαινολικές οξειδάσες παράγει κινόνες, οι οποίες πολυμερίζονται και σχηματίζουν τανίνες. Οι τελευταίες θεωρούνται προστατευτικές ουσίες απέναντι στην προσβολή των φυτών από μικροοργανισμούς.

Οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των τανινών αποδίδονται στην ικανότητά τους να συνδέονται με τις πρωτεΐνες σχηματίζοντας αδιάλυτα σύμπλοκα και σε αυτό ενδεχομένως να οφείλονται οι αντισηπτικές τους ιδιότητες. Πιστεύεται ότι οι φυτικές τανίνες ενώνονται με τις πρωτεΐνες στο έντερο των φυτοφάγων ζώων με υδρογονικούς δεσμούς, μεταξύ των υδροξυλικών ομάδων των φαινολών και των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να αδρανοποιούνται τα πεπτικά ένζυμα των φυτοφάγων και τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα τανινών και φυτικών πρωτεϊνών να είναι δύσκολο να χωνευτούν. Τέλος, πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνες για το φαιό χρώμα μερικών φύλλων κατά το φθινόπωρο και το χρώμα που παίρνει το κομμένο μήλο ή η πατάτα όταν αφεθεί στο αέρα.

Διακρίνουμε δύο κατηγορίες τανινών, τις συμπυκνωμένες και τις υδρολυόμενες.

Οι συμπυκνωμένες τανίνες είναι συστατικά που σχηματίζονται από μεγάλου βαθμού συμπυκνωμένα προϊόντα των κατεχινών (3-φλαβονολών) και 3,4-φλαβονοδιολών.

Ο ακριβής τρόπος πολυμερισμού δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, πιστεύεται όμως ότι πραγματοποιείται είτε ως αυτόματη συμπύκνωση είτε ως ενζυμική κατάλυση με πολυφαινολικές οξειδάσες.

Οι συμπυκνωμένες τανίνες κατεργαζόμενες με ισχυρά οξέα υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες και γι' αυτό ονομάζονται προανθοκυανιδίνες από μερικούς ερευνητές.

Οι υδρολυόμενες τανίνες είναι ετερογενή πολυμερή που περιέχουν ένα σάκχαρο και άφθονα μόρια γαλλικού οξέος. Τα μόρια του γαλλικού οξέος, στο μόριο της υδρολυόμενης τανίνης, συνδέονται μεταξύ τους κατά ποικίλους τρόπους, ενώ στο μόριο της τανίνης υπάρχει πάντα ένα σάκχαρο, το οποίο συνήθως είναι γλυκόζη, χωρίς όμως να αποκλείεται η παρουσία κάποιου άλλου σακχάρου εκτός της γλυκόζης. Γενικά το μόριο των υδρολυόμενων είναι μικρότερο από ότι των συμπυκνωμένων τανινών και πιθανώς υδρολύονται ευκολότερα σε σάκχαρο και φαινολικά οξέα.

Τέλος, οι τανίνες προκαλούν μια θολότητα στην μύρα και τα κρασιά λόγω της σύνδεσής τους με τις πρωτεΐνες. Επίσης, προκαλούν ανεπιθύμητες γεύσεις σε μερικές τροφές και κυρίως σε εκείνες που προέρχονται από φρούτα. Η έντονη στυφάδα μερικών τροφών οφείλεται κατ' εξοχήν στην παρουσία των τανινών.

Οι τανίνες επηρεάζουν την γευστικότητα των σταφυλιών και των προϊόντων τους. Σε μικρές ποσότητες συμβάλει θετικά στη γεύση των επιτραπέζιων σταφυλιών, στο χυμό των σταφυλιών και του οίνου. Στους οίνους επίσης βελτιώνουν το σώμα, σταθεροποιούν το χρώμα και συμβάλουν στο καλλάρισμα. Όταν τα σταφύλια χρησιμοποιούνται στη κονσερβοποιεία ή μεταχειρίζονται με χημικά οι τανίνες των γιγάρτων δεν είναι αποδεκτές, αφού

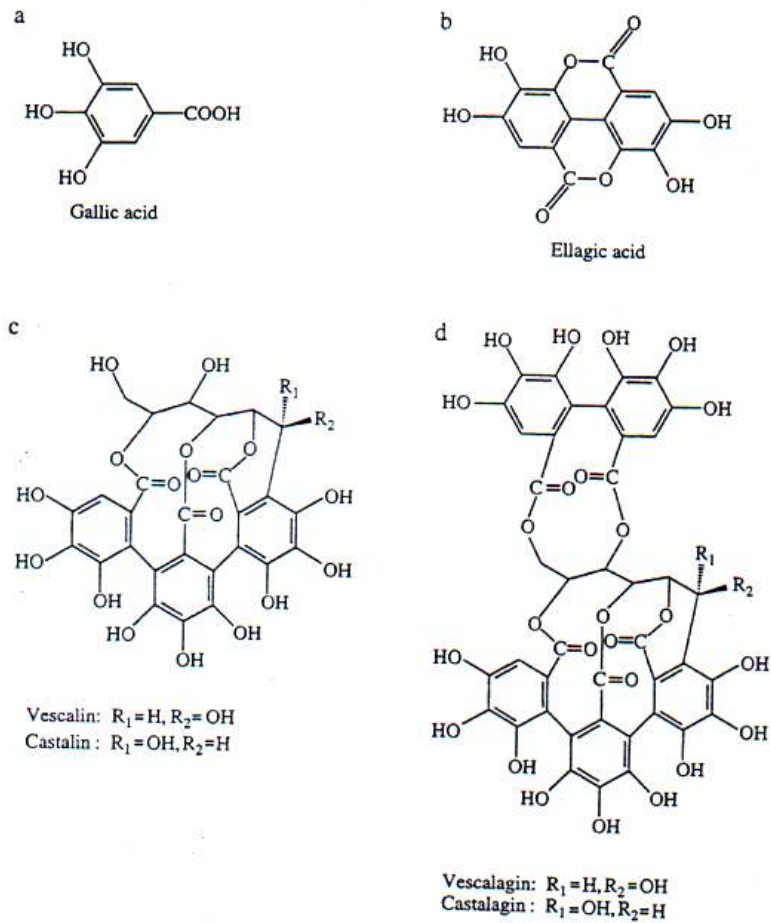
μπορεί να εμπλουτίσουν το προϊόν και να του προσδώσουν στυφή γεύση. Σε κάποιες ποικιλίες οι τανίνες είναι περισσότερο αντιληπτές στους ώριμους ή υπερώριμους καρπούς (Καράταγλης, 1994).

1.3.1. Ιδιότητες Τανινών.

Οι τανίνες είναι από τη φύση τους ικανές να δημιουργούν σταθερές ενώσεις με πρωτεΐνες και άλλα φυτικά πολυμερή όπως οι πολυσακχαρίτες. Η μετατροπή των δερμάτων των ζώων σε ανθεκτικό δέρμα οφείλεται σε αυτή την ιδιότητα των τανινών. Η ιδιότητα αυτή των τανινών χρησιμοποιείται για το κολλάρισμα των οίνων.

Από χημική άποψη, οι τανίνες είναι ιδιαίτερα μεγάλα φαινολικά μόρια, παράγονται από τον πολυμερισμό των βασικών μορίων με φαινολικά τμήματα. Θα πρέπει να είναι ικανοποιητικά μεγάλα ώστε να δημιουργήσουν σταθερούς δεσμούς με τις πρωτεΐνες, αλλά αν είναι υπερβολικά μεγάλα είναι πιθανό να βρίσκονται πολύ μακριά από το ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών. Τα μοριακά βάρη των ενεργών τανινών ποικίλουν από 600 έως 3500. Οι υδρολυόμενες ή γάλλο-τανίνες διαφοροποιούνται από τις συμπυκνωμένες ή κατεχικές τανίνες ως προς τον τύπο των πρωταρχικών μορίων.

Οι υδρολυόμενες τανίνες περιλαμβάνουν γαλλοτανίνες και ελαγίτανίνες οι οποίες οδηγούν σε γαλλικό και ελαγικό οξύ αντίστοιχα (σχήμα 2), μετά από οξειδωτική υδρόλυση. Επίσης, περιλαμβάνουν ένα μόριο γλυκόζης. Τα δύο κύρια ισομερή των ελαγίτανινών της δρυός που χρησιμοποιούνται για τόνωση των οίνων είναι η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη (σχήμα 2). Αυτά τα μόρια περιέχουν εξα-υδροξυ-διφενικό οξύ και μονο-υδροξυ-τριφενικό οξύ, εστεροποιημένα με μια ευθεία γλυκόζη. Η μερική υδρόλυση της βεσκαλαγίνης και κασταλαγίνης, περιλαμβάνοντας την απώλεια του εξα-υδροξυ-διφενικού οξέος, παράγει βεσκαλαγίνη και κασταλαγίνη.



Σχήμα 5. Α και Β Φαινολικά οξέα. Γ και Δ ελάγι-τανίνες από εκχύλισμα από ξύλο δρυός. (Vivas και Glories, 1996).

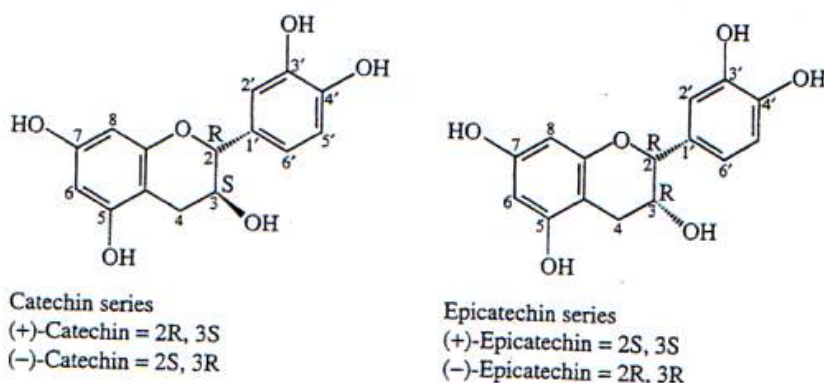
Τα διάφορα μόρια αυτά είναι υδατοδιαλυτά και καθιζάνουν γρήγορα σε μέσα τα οποία περιέχουν αλκοόλη όπως οι οίνοι και τα μπράντυ (Moutounet et al., 1989). Παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στη παλαίωση των ερυθρών και λευκών οίνων σε δρύινα βαρέλια, εξαιτίας της οξειδωσιμότητάς τους (Vivas και Glories, 1993, 1996) και των ιδιοτήτων της γεύσης τους (Pocock et al., 1994).

Η σύνθεση των ελάγι-τανινών του εκχυλίσματος από το ξύλο εξαρτάται από τα είδη της δρυός. Συνολικά υπάρχουν τέσσερις μονομερείς και τέσσερις

διμερείς ελαγτανίνες στα τρία είδη της Ευρωπαϊκής δρυός, ενώ τα Αμερικανικά είδη δεν έχουν διμερείς.

Οι υδρολυόμενες τανίνες δεν απαντώνται φυσικά στα σταφύλια. Όμως, είναι οι κύριες εμπορικές τανίνες που νόμιμα αναγνωρίζονται για προσθήκη στους οίνους. Οι ελάγτανίνες στον οίνο προέρχονται είτε από τους ξύλινους περιέκτες ή από τη προσθήκη των οινολογικών τανινών. Βέβαια στους οίνους υπάρχει και το γαλλικό οξύ το οποίο προέρχεται από τους φλοιούς και τα γίγαρτα.

Οι συμπυκνωμένες τανίνες στα σταφύλια και τους οίνους είναι περισσότερο ή λιγότερο σύνθετα πολυμερή των φλαβαν-3-ολών ή των κατεχινών. Οι βασικές δομικές μονάδες είναι η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη.



Θερμαίνοντας όξινα διαλύματα αυτών των πολυμερών ελευθερώνονται ασταθή καρβοκατιόντα τα οποία μετατρέπονται σε καστανά υγροποιημένα προϊόντα, κυρίως κόκκινες κυανιδίνες, έτσι εξηγείται γιατί αυτά τα στοιχεία είναι γνωστά ως 'προκυανιδίνες', αντικαθιστώντας τον επίσημο όρο 'λευκοκυανιδίνη' (Bate-Smith, 1954, Laborde, 1910).

Η ανάλυση αυτών των μορίων είναι ιδιαίτερα περίπλοκη, εξαιτίας της μεγάλης διαφοροποίησης των βασικών στοιχείων η οποία προκύπτει από το μεγάλο αριθμό των υδροξυλιωμένων ομάδων, των θέσεών τους πάνω στον

αρωματικό δακτύλιο, τη στερεοχημεία των ασύμμετρων ανθράκων στον πυρανικό δακτύλιο, όπως επίσης τον αριθμό και τον τύπο των δεσμών μεταξύ των βασικών μονάδων. Παρόλη τη πρόοδο που έχει σημειωθεί στην υγρή χρωματογραφία, την NMR και τη σπεκτομετρία μάζας, δεν έχουν αναλυθεί όλα τα στοιχεία, μόνο τα διμερή των προκυανιδινών και κάποια από τα τριμερή έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως.

Αυτή η ποικιλομορφία εξηγεί την ύπαρξη τανινών με διαφορετικές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα στη γεύση, σε διάφορους τύπους σταφυλιών και οίνων. Κάθε ανάλυση που αφορά τις τανίνες δε θα πρέπει μόνο να λαμβάνει υπόψη τις διαφορές στη συγκέντρωσή τους, αλλά θα πρέπει επίσης να αξιολογεί τη ποιότητα, η οποία εξαρτάται από τη μοριακή δομή.

Είναι δυνατό να απομονωθούν και να διαχωριστούν τα ακόλουθα συστατικά από σταφύλια και οίνους: (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, διμερείς, τριμερείς, ολιγομερείς και συμπυκνωμένες προκυανιδίνες. Οι βασικές 'κατεχινικές' μονάδες μπορούν να μη θεωρηθούν ως τανίνες, καθώς το μοριακό τους βάρος είναι πολύ μικρό και έχουν πολύ περιορισμένες ιδιότητες σε σχέση με τις πρωτεΐνες. Αρκετό μοριακό βάρος, για να σχηματίσουν σταθερούς δεσμούς με πρωτεΐνες, έχουν μόνο οι διμερείς μορφές.

Οι κατεχίνες έχουν δύο βενζολικούς δακτυλίους ενωμένους με έναν κορεσμένο οξειδωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο. Αυτό το μέρος έχει δύο ασύμμετρους άνθρακες (C_2 και C_3) οι οποίοι αποτελούν τη βάση των τεσσάρων ισομερών. Οι πιο σταθερές μορφές είναι η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη.

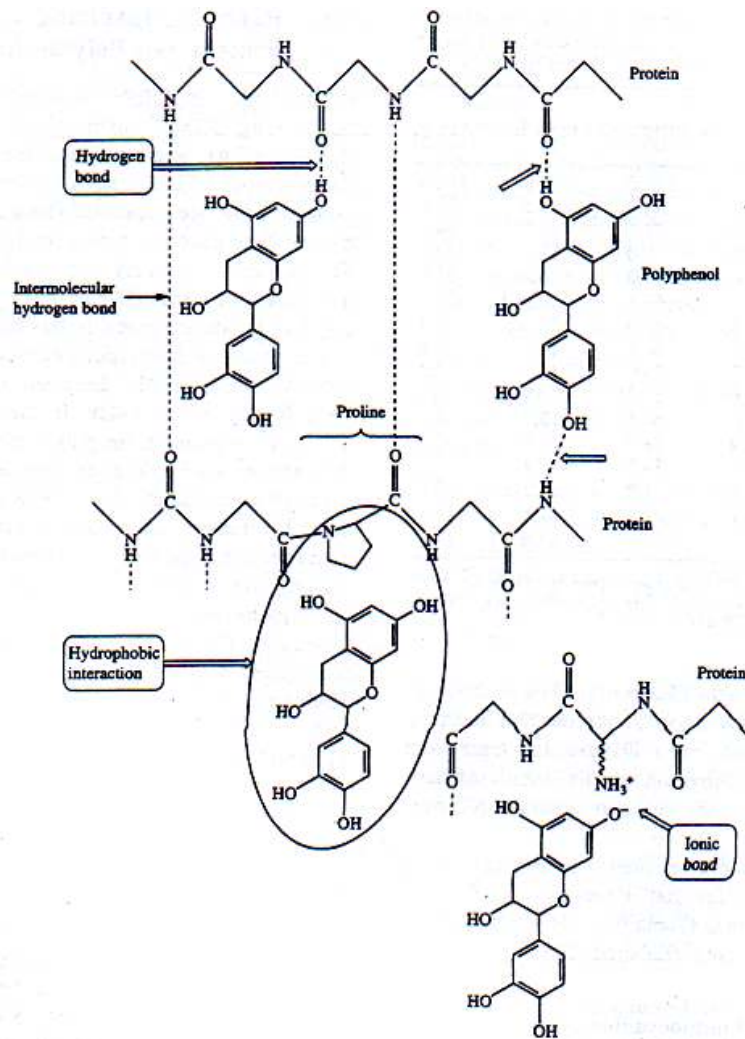
Οι συμπυκνωμένες τανίνες, ιδιαίτερα οι προκυανιδίνες και οι κατεχίνες, είναι παρούσες σε όλα τα βασικά μέρη του σταφυλιού (φλοιός, γίγαρτα, βόστρυχοι), εκχυλίζονται από αυτά τα μέρη στον οίνο όταν αυτός έρχεται σε επαφή με τους φλοιούς. Οι συγκεντρώσεις στους ερυθρούς οίνους διαφέρουν ανάλογα με τη ποικιλία των σταφυλιών, και σε μεγαλύτερο βαθμό, τις μεθόδους οινοποίησης. Κυμαίνεται μεταξύ 1 και 4 g/L. Σε ξηρούς λευκούς οίνους, η ποιότητα εκχύλισης καθορίζει τη συγκέντρωση των τανινών.

Κυμαίνεται από 100 mg/L όταν το γλεύκος διαχειρίζεται σωστά, μέχρι 200 ή 300 mg/L όταν η εκχύλιση γίνεται παρουσία βοστρύχων. Οι λευκοί γλυκείς οίνοι οι οποίοι φτιάχνονται από σταφύλια στα οποία έχει αναπτυχθεί βοτρυτής πάνω τους έχουν πολύ μικρές συγκεντρώσεις τανινών, αυτό γιατί τα συστατικά αυτά διασπώνται ολοκληρωτικά από τους μύκητες.

Οι φλαβανόλες, καθώς είναι ιδιαίτερα δραστικές, ενώνονται μεταξύ τους. Αντίθετα οι ανθοκυάνες και οι φλαβονόλες δεν απαντώνται σε γλυκοζιλιωμένη μορφή. Όμως μπορεί να ενωθούν με πολυσακχαρίτες στα σταφύλια και να παραληφθούν ως σύμπλοκα κατά τη διαδικασία της οινοποίησης (Riberaeu-Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu).

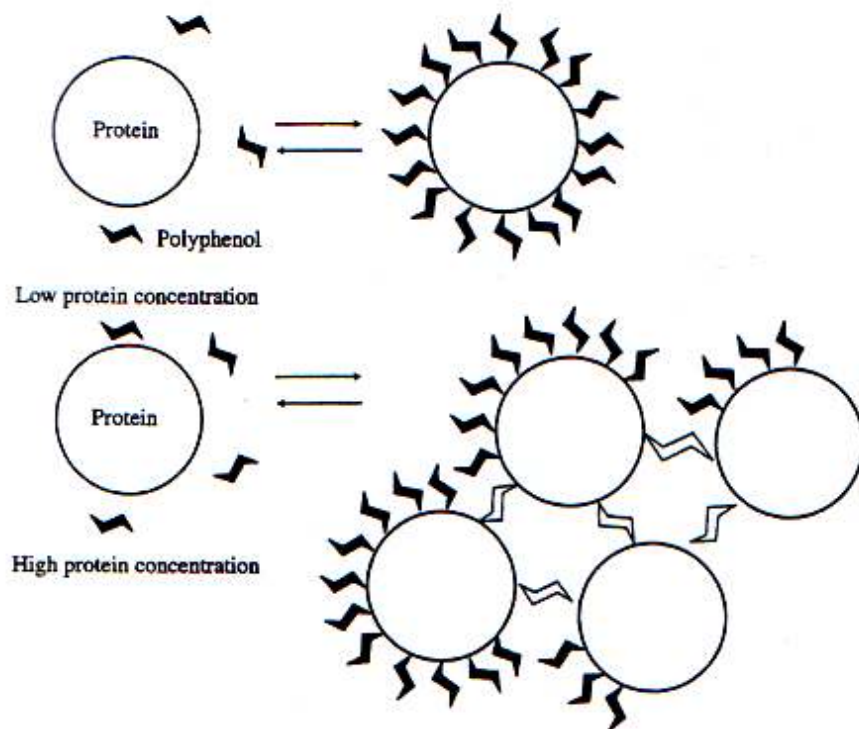
1.3.2. Αντιδράσεις Τανινών με Πρωτεΐνες και Πολυσακχαρίτες.

Οι πολυφαινόλες και ιδιαίτερα οι τανίνες είναι ικανές να σχηματίζουν σταθερούς συνδυασμούς με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Παρόλο που έχουν ανακαλυφθεί διάφορων ειδών αντιδράσεις μεταξύ τανινών και πρωτεϊνών, ο μηχανισμός δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Οι δύο κυριότεροι τύποι είναι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και υδρογονικοί δεσμοί (σχήμα 6).



Σχήμα 6. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και πολυφαινολών (Asano et al., 1982).

Το μοντέλο αλληλεπιδράσεων μεταξύ τανινών και πρωτεϊνών (σχήμα 7) περιγράφηκε από τον Haslam το 1981 και ισχύει ακόμη και σήμερα.



Σχήμα 7. Μοντέλο καταβύθισης των πρωτεϊνών από τις πολυφαινόλες. (Haslam, 1981).

Στη περίπτωση όπου υπάρχουν μικρές ποσότητες πρωτεϊνών, οι πολυφαινόλες τοποθετούνται γύρω από την επιφάνειά τους σε μια απλή στοιβάδα, μειώνοντας έτσι τον υδροφιλικό τους χαρακτήρα. Οι πρωτεΐνες ενώνονται μεταξύ τους και τελικά καταβυθίζονται. Όταν η συγκέντρωση των πρωτεϊνών αυξάνεται, τα φαινολικά συστατικά σκορπίζονται γύρω από την επιφάνειά τους λειτουργώντας ως 'γέφυρες' μεταξύ των διαφόρων μορίων. Η επιφανειακή υδροφοβική στοιβάδα τότε ξαναενώνεται προκαλώντας έτσι την καταβύθιση των πρωτεϊνών. Έτσι οι υπάρχουσες συγκεντρώσεις των τανινών και των πρωτεϊνών επηρεάζουν το σχηματισμό και τη καταβύθιση των συμπλόκων τανινών – πρωτεϊνών.

Μια σειρά παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του pH, χρόνου αντίδρασης, θερμοκρασίας, διαλυτών και ιοντική ικανότητα, επιδρούν στο σχηματισμό συμπλόκων τανινών-πρωτεϊνών. Επιπλέον, ο τύπος και το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών φαίνεται να παίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στο σχηματισμό των αδιάλυτων συμπλόκων. Οι Hagerman και Butler (1980) απέδειξαν ότι οι πρωτεΐνες με υψηλή συγκέντρωση προλίνης έχουν μεγάλη επίδραση στη διαλυτοποίηση των τανινών. Οι παράγοντες αυτοί είναι σημαντικοί για το κολλάρισμα των οίνων (Lagune, 1994) και εξηγούν τη σπουδαιότητα της σύνθεσης των πρωτεϊνών στο κολλάρισμα.

Οι προκυανιδίνες και οι πολυσακχαρίτες είναι συνδεδεμένοι στα κυτταρικά τοιχώματα των φλοιών (Amrani-Joutei, 1993) και συνιστούν έναν άλλο τύπο συμπλόκων, με έναν λιγότερο καλά-κατανοητό μηχανισμό. Οι πολυσακχαρίτες (πηκτίνες), με το α-D-γαλακτουρονικό οξύ ως τον κύριο μονοσακχαρίτη τους, και οι αραβινογαλακτάνες αντιδρούν ισχυρά. Στη περίπτωση των πρωτεϊνών, προωθούν το σχηματισμό σύμπλοκων με τανίνες οι οποίες αποτελούν έναν από τους παράγοντες οι οποίοι συντηρούν ένα σταθερό αφρό στη μύρα και φυσαλίδες με διάρκεια στους αφρώδεις οίνους (Siebert et al., 1996).

1.3.3. Οξειδωτικές Αντιδράσεις των Προκυανιδινών.

Η οξειδωσιμότητα είναι χαρακτηριστικό του συνόλου των φαινολικών (Ribereau-Gayon, 1968), ιδιότητα που τους προσδίδει έναν προστατευτικό ρόλο ενάντια στην οξείδωση, ιδιαίτερα στα σταφύλια και τους ερυθρούς οίνους. Η αντίδραση αυτή μπορεί να είναι είτε χημική είτε ενζυματική. Οι φαινολικές ουσίες της σταφυλής οξειδώνονται κυρίως από ένζυμα της σταφυλής (τυροσινάση) και από τον *Botrytis cinerea* (λακκάση).

Επιπλέον, υπάρχει αξιοσημείωτο ενδιαφέρον για τη μελέτη των οξειδωτικών-αναγωγικών ιδιοτήτων των πολυφαινολών εξαιτίας των ιατρικών και θρεπτικών

τους ιδιοτήτων. Μια από τις ιδιότητές τους είναι η εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποδόμηση των ιστών, η οποία συνδέεται με τη γήρανση.

Οι οξειδωτικοί μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται είναι ιδιαίτερα περίπλοκοι, ιδιαίτερα σε όξινο μέσο. Το φως και η θερμοκρασία, όπως επίσης η παρουσία υπεροξειδασών και κάποιων μετάλλων, προωθούν το σχηματισμό οξειδώσιμων ριζών (Waters, 1964). Το μοριακό οξυγόνο, O_2 , έχει διπλή ιδιότητα. Είναι δυνατό να απαντάται σε υπεροξειδική ρίζα $HO_2\cdot$ ή ως υπεροξειδωμένο ανιόν O_2^- , υπεύθυνο για τη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού οξειδώσιμων ελεύθερων ριζών. Τα υπεροξειδία που σχηματίζονται μπορεί να προκαλέσουν την οξειδωτική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και άλλων μορίων (υδατάνθρακες, ακόρεστα λιπαρά κτλ.). Συγκεκριμένα, τα φαινολικά συστατικά (τανίνες) προηγούνται στην οξείδωση και συμβάλουν στο περιορισμό των ελεύθερων ριζών.

Για να συνοψίσουμε, οι φλαβανόλες, οι προκυανιδίνες και τελικά οι συμπυκνωμένες τανίνες αντιδρούν λιγότερο ή περισσότερο εύκολα με τις ελεύθερες ρίζες, ανάλογα με τη θέση των μερών. Οι αντιδράσεις αυτές σχηματίζουν καστανά πολυμερή με διάφορα σύμπλοκα α οποία καταβυθίζονται. Στους οίνους, τα φαινόμενα αυτά εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των φαινολών. Η κινητική των οξειδωτικών αυτών αντιδράσεων είναι πιο αργή σε σχέση με όταν πραγματοποιούνται σε ένα ιδανικό μέσο, πιθανότατα εξαιτίας της παρουσίας άλλων περισσότερο εύκολα οξειδώσιμων συστατικών, τα οποία εμπλέκονται επίσης από την οξείδωση των προκυανιδινών.

1.3.4. Αντιδράσεις Πολυμερισμού των Προκυανιδινών.

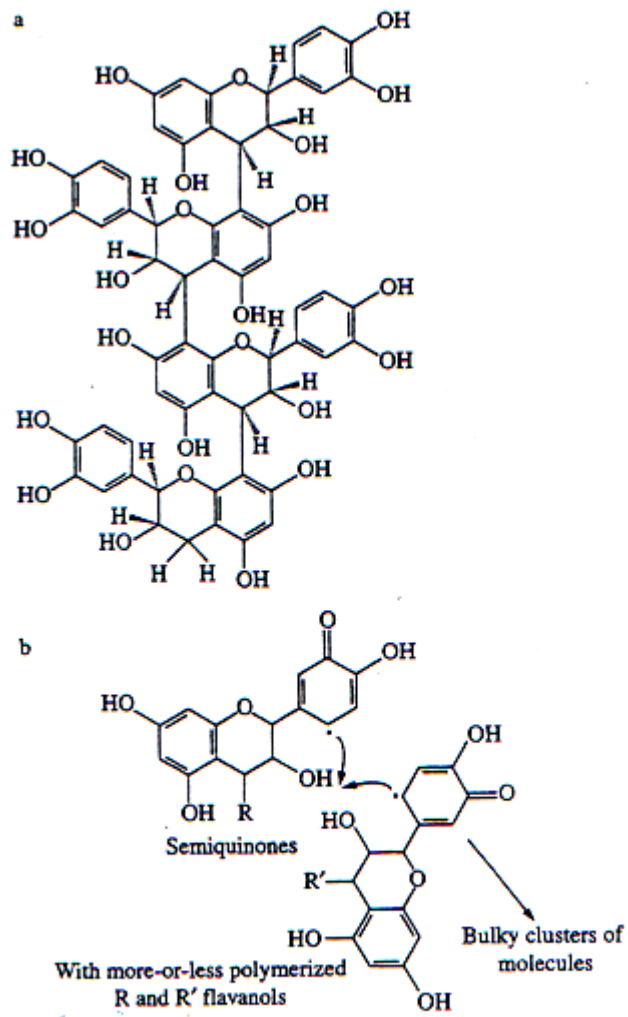
Τα όξινα διαλύματα διμερών, oligομερών και πολυμερισμένων προκυανιδινών είναι ασταθή. Ακόμη και υπό την επίδραση αζώτου με θειώδη ανυδρίτη υπό την επίδραση του φωτός το χρώμα γίνεται κίτρινο, μετά καφετιάζει και μετά από μικρό χρονικό διάστημα δημιουργείται ένα ίζημα. Σε

pH 3.2, η αντίδραση χρειάζεται περίπου 10 μήνες στους 5⁰ C, μερικούς μήνες στους 20⁰ C και έναν με δύο μήνες στους 30⁰ C. Παρουσία οξυγόνου από τον αέρα, και ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες, η διάλυση είναι πιο έντονη και τα ιζήματα είναι διαφορετικά. Είναι αδύνατο να διαλυθούν σε οποιοδήποτε άλλο διαλύτη εκτός από το φορμικό οξύ. Αυτά μπορούν να μελετηθούν μόνο μετά από ακετυλίωση. Αποτελέσματα από μετρήσεις με TSK, NMR και σπεκτρομετρία μάζας έδειξαν ότι αυτά τα περίπλοκα πολυμερή έχουν μοριακά βάρη πάνω από 3000.

Σε όξινο περιβάλλον χωρίς παρουσία οξυγόνου, οι προκυανιδίνες είναι ικανές να σχηματίσουν ένα καρβοκατιόν το οποίο είναι πιθανό να αντιδράσει με αρνητικές μονάδες άλλων προκυανιδινών και έτσι αυξάνεται ο βαθμός πολυμερισμού τους. Όταν ένα διάλυμα προκυανιδίνης B₂ αποθηκευτεί, παράγει το τριμερές C₁, διάφορα πολυμερή και (-)-επικατεχίνη. Αντίθετα, διαλύματα (+)-κατεχίνης και η (-)-επικατεχίνης είναι απόλυτα σταθερά στις ίδιες συνθήκες. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι αντιδράσεις αυτές καθορίζονται από τη θερμοκρασία είναι ξεκάθαρο ότι θα σχηματιστεί ένα καρβοκατιόν. Έτσι οι πολυμερισμένες προκυανιδίνες παράγονται από έναν C₄-C₈ ή C₄-C₆ 'οργανωμένο' πολυμερισμό (σχήμα 8 α).

Ο τύπος αυτός πολυμερισμού σπάνια πραγματοποιείται στους οίνους, καθώς η κατεχίνη είναι πάντα παρούσα. Ακόμη και όταν αυτή περιορίζεται, ξαναεμφανίζεται μετά από παλαίωση μερικών εβδομάδων.

Σε ένα ισχυρά οξειδωτικό μέσο, ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών συνοδεύεται από οξειδωτικό πολυμερισμό (σχήμα 8 β). Βέβαια με ελεγχόμενο αερισμό, η ταυτόχρονη οξείδωση των προκυανιδινών οδηγεί στο σχηματισμό αιθανάλης από αιθανόλη. Το μόριο αυτό είναι υπεύθυνο για τη τροποποίηση της δομής της προκυανιδίνης. Η αντίδραση αυτή είναι πολύ πιο γρήγορη από τον πολυμερισμό και παράγει πολυμερή τα οποία είναι δυνατό να καταβυθιστούν, ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού τους και τη συγκέντρωσή τους.



Σχήμα 8. Παράδειγμα πολυμερισμού τανινών. Α) Πολυμερισμός τανινών και β) αντίδραση πολυμερισμού τανινών με ελεύθερες ρίζες (Galvin, 1993).

1.3.5. Οργανοληπτικά Στοιχεία που Προσδίδουν τα Φαινολικά Συστατικά στους Ερυθρούς Οίνους.

Τα φαινολικά συστατικά παίζουν σπουδαίο ρόλο στη γεύση των ερυθρών οίνων. Είναι υπεύθυνα για κάποια θετικά γευστικά χαρακτηριστικά, αλλά επίσης και για κάποια ιδιαίτερα ανεπιθύμητα, αρνητικά στοιχεία. Το σώμα, ο χαρακτήρας, η δομή, η πληρότητα και η στρογγυλότητα είναι όλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των μεγάλων ερυθρών οίνων. Από την άλλη μεριά η πικρότητα, η σκληρότητα, η επιθετικότητα και τα χωρίς ιδιαιτερότητα χαρακτηριστικά είναι ελαττώματα τα οποία θα πρέπει να αποφεύγονται καθώς δεν συνάδουν με την έννοια της ποιότητας.

Η γενική οργανοληπτική εντύπωση βασίζεται σε μια αρμονική ισορροπία μεταξύ των δύο αυτών τύπων αισθήσεων, οι οποίες συνδέονται άμεσα με τον τύπο και τη συγκέντρωση των διαφόρων μορίων, όπως οι ανθοκυάνες και ιδιαίτερα οι τανίνες. Μια από τις ιδιότητες τους είναι το να αντιδρούν με γλυκοπρωτεΐνες στη μυκίνη και τις πρωτεΐνες στη στοματική κοιλότητα, τροποποιώντας τη κατάσταση και τις ιδιότητές τους.

Ανάλογα με τον τύπο και τη συγκέντρωση των τανινών, μπορεί να δημιουργήσουν μια μαλακή, ισορροπημένη εντύπωση ή αντίθετα μια ιδιαίτερη επιθετικότητα αντιληπτή είτε ως πικρότητα προς το τέλος της γευστικής δοκιμής ή ως στυφάδα κατά την επίγευση.

Η πραγματοποίηση αντικειμενικών μετρήσεων των βασικών αυτών αισθήσεων είναι ιδιαίτερα περίπλοκη. Όμως, η μέτρηση της τιμής της ζελατίνης δίνει μια εκτίμηση της ικανότητας αντίδρασης με τις πρωτεΐνες. Η δυνατότητα αντίδρασης των πολυφαινολών με τη ζελατίνη εξαρτάται από τις συνθήκες του μέσου. Η οξύτητα είναι ένας επιθυμητός παράγοντας, αντίθετα με τη περιεκτικότητα σε αλκοόλ, η οποία περιορίζει την αντίδραση και δίνει μια πιο γλυκιά γεύση. Η αντίδραση είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση των τανινών σε τιμές πάνω από 50 mg/L (Glories, 1983). Κάτω από δεδομένες

συνθήκες αντίδρασης, είναι δυνατό να κατηγοριοποιηθούν οι διάφορες φαινόλες με βάση την ικανότητα αντίδρασής τους.

Η αντίδραση μεταξύ των τανινών και πρωτεϊνών εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού των προκυανιδινών (Lea, 1992). Η επιθετικότητα αυξάνεται μέχρι ένα σημείο, και αφού αυξηθεί ο αριθμός των μορίων πάνω από ένα όριο, μετά μειώνεται. Η μέγιστη πικρότητα επισυμβαίνει με τετραμερείς προκυανιδίνες.

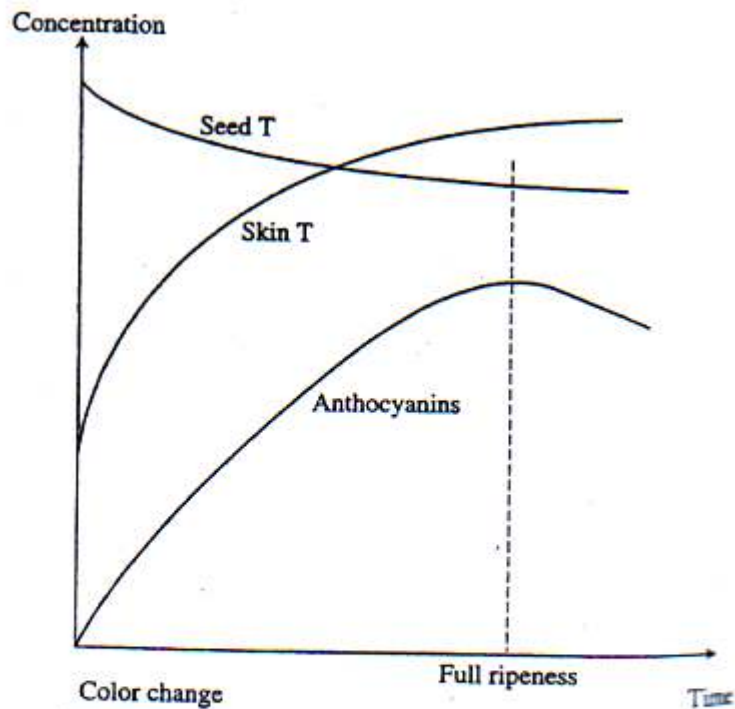
1.3.6. Πορεία των Τανινών κατά την Ωρίμανση των Σταφυλών.

A) Μεταβολές στη συγκέντρωση

Η συγκέντρωση των τανινών αυξάνεται με αξιοσημείωτο ρυθμό, όμως είναι ιδιαίτερα υψηλή κατά το στάδιο της μεταβολής του χρώματος (Guilloux, 1981).

Στα γίγαρτα, η συγκέντρωση των τανινών γενικά μειώνεται μετά τη μεταβολή του χρώματος, καθώς ωριμάζουν τα σταφύλια. Μειώνονται σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν κατά την ωρίμανση, και είναι στενά συνδεδεμένες με τη συσσώρευση των ανθοκυανών στους φλοιούς (Darne, 1991). Όμως υπάρχουν περιπτώσεις όπου η μείωση συμβαίνει σε νωρίτερο στάδιο, πριν τη μεταβολή του χρώματος, και η συγκέντρωση μετά παραμένει σχεδόν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης.

Η μείωση των τανινών των γιγάρτων επίσης ποικίλει μεταξύ των ποικιλιών. Κάποιες έχουν μικρή συγκέντρωση (Cabernet sauvignon) ενώ άλλες έχουν πολύ υψηλότερα επίπεδα (Cabernet Franc, Pinot Noir). Οι συγκεντρώσεις των τανινών στους βόστρυχες είναι πολύ υψηλή κατά τη μεταβολή του χρώματος και μεταβάλλονται κατά την ωρίμανση. Το ίδιο φαινόμενο συμβαίνει στους λευκούς οίνους (Voyatzis, 1984), οι τανίνες συσσωρεύονται στους φλοιούς, ενώ οι συγκεντρώσεις μειώνονται σταδιακά (σχήμα 9).



Σχήμα 9. Πορεία των συγκεντρώσεων ανθοκυανών και τανινών στους φλοιούς και τα γίγαρτα καθώς ωριμάζουν τα σταφύλια (Glories, 1986).

Αναλύσεις με HPLC που αφορούσαν το σχηματισμό διμερών και τριμερών προκυανιδινών και απλών φλαβονολών που παραλήφθηκαν από φλοιούς και γίγαρτα λευκών και ερυθρών σταφυλιών, έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις μειώνονται σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό, αλλά ποτέ δεν αυξάνονται (de Freitas, 1995). Βρέθηκε ότι η προκυανιδίνη B₂ είναι το πιο κοινό διμερές σε ώριμα σταφύλια από Merlot και Cabernet sauvignon, ακολουθούμενο από το τριμερές C₁. Όλα τα διμερή είναι παρόντα στα γίγαρτα, ενώ οι προκυανιδίνες B₄, B₇, και B₈ παραλαμβάνονται από τους φλοιούς. Γίγαρτα από ερυθρά και λευκά σταφύλια έχουν παρόμοιες διακυμάνσεις στις προκυανιδίνες. Από την

άλλη μεριά, το διμερές B₂ βρίσκεται κυρίως στα ερυθρά σταφύλια, αλλά πρακτικά ελλείπει από τα λεύκα σταφύλια, όπου αντικαθίσταται από το B₁. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι διμερείς και οι τριμερείς προκυανιδίνες, που βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, δεν είναι τα πιο σημαντικά φαινολικά συστατικά των σταφυλιών.

B) Ανάπτυξη των μοριακών δομών.

Το 1970 ο Ribereau-Gayon ταυτοποίησε τους διαφορετικούς τύπους τανινών των φλοιών, γιγάρτων και βοστρύχων.

Οι τανίνες των γιγάρτων είναι προκυανιδίνες, με μικρό βαθμό πολυμερισμού κατά την αλλαγή του χρώματος ο οποίος αυξάνεται κατά την ωρίμανση. Τα ελεύθερα αυτά, μη κολλοειδή μόρια αντιδρούν έντονα με τις πρωτεΐνες. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνουν τις ιδιαίτερες ιδιότητες στις τανίνες (στυφότητα).

Τα διάφορα μέρη της σταφυλής περιλαμβάνουν φαινολικά συστατικά τα οποία μπορούν να διαιρεθούν σε τέσσερις ομάδες. Οι φλοιοί έχουν ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις συμπλόκων τανινών-πολυσακχαριτών και τανινών-πρωτεϊνών τα οποία προσδίδουν μια όμορφη, ισορροπημένη εντύπωση. Από την άλλη μεριά, οι βίστριχοι και τα γίγαρτα έχουν υψηλές συγκεντρώσεις πολυμερισμένων προκυανιδινών και συμπυκνωμένων τανινών οι οποίες δημιουργούν μια πιο δεικτική τανική επιθετικότητα. Υπάρχει μια παρόμοια ποσότητα κατεχινών και παράλληλα μια ποσότητα ολιγο-πολυμερισμένων προκυανιδινών σε όλα τα μέρη της σταφυλής.

Συνοψίζοντας, είναι δυνατό να διαχωριστεί η φαινολική σύσταση των σταφυλών ανάλογα με το στάδιο ωριμότητας, λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών και τις ιδιότητες των τανινών, ιδιαίτερα την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες. Στο στάδιο ωρίμανσης η σταφυλή αποτελείται από φλοιούς πλούσιους σε ανθοκυανίνες και σύμπλοκα,

ιδιαίτερα ανενεργές τανίνες, και από γίγαρτα με χαμηλή συγκέντρωση πολυμερισμένων τανινών οι οποίες αντιδρούν ισχυρά με πρωτεΐνες. Τα ανώριμα σταφύλια, από την άλλη μεριά, έχουν φλοιούς με χαμηλές συγκεντρώσεις ανθοκυανών και αντίστοιχα απλές τανίνες οι οποίες έχουν χάσει την ικανότητα αντίδρασής τους, και γίγαρτα με υψηλή συγκέντρωση ολιγο-πολυμερισμένων και άρα ιδιαίτερα αντιδραστικών τανινών.

1.3.7. Αντιδράσεις Τανινών και οι Επιδράσεις τους στη Γεύση των Οίνων.

Εάν παρακολουθήσουμε τη σύνθεση του οίνου από το τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης, τα αποτελέσματα των μετρήσεων των τανινών δείχνουν ότι η ποσότητά τους μειώνεται ή αλλάζει λίγο κατά την ωρίμανση στο βαρέλι και μετά αυξάνονται συνήθως μετά τη εμφιάλωση.

Τα μόρια των προκυανιδινών των σταφυλών τείνουν να πολυμερίζονται, ενώνονται με ανθοκυανίνες και συνδυάζονται με φυτικά πολυμερή, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Οι αντιδράσεις που εμπλέκονται είναι οι εξής:

Οι αντιδράσεις πολυμερισμού που παράγουν ομογενή πολυμερή είναι πιθανό να συμβούν στο κρασί γιατί είναι ένα όξινο μέσο. Οι αντιδράσεις αυτές ευνοούνται από υψηλές θερμοκρασίες, αλλά είναι ανεξάρτητες από τα επίπεδα οξείδωσης.

Παρουσία οξυγόνου είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν πολλές αντιδράσεις. Περιλαμβάνονται δεσμοί μεταξύ διαφόρων προκυανιδινών που συνδυάζονται με αιθανάλη και πιθανότατα δεσμοί μεταξύ ποσοτήτων κινόνης. Τα μόρια που σχηματίζονται έχουν ποικίλες δομές, όπως επίσης διαφορετικές ιδιότητες από αυτές των προκυανιδινών, ιδιαίτερα η σταθερότητά τους και την ικανότητα να αντιδρούν με πρωτεΐνες.

Ο πολυμερισμός περιορίζεται από την καταβύθιση συστατικών τα οποία είναι υδρόφοβα, βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα και είναι αδιάλυτα. Η ωρίμανση

του οίνου θα πρέπει να προσαρμόζεται ώστε να ευνοεί συγκεκριμένες αντιδράσεις και τη σταθεροποίηση του οίνου, ενώ να περιορίζει ή να επιβραδύνει την εξέλιξη αντίθετων αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις αυτές έχουν μέγιστη επίδραση στη γεύση του οίνου.

Στις αντιδράσεις συμπύκνωσης εμπλέκονται άλλα συστατικά όπως οι ανθοκυάνες, οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες. Οι αντιδράσεις των ανθοκυανών αυξάνουν και σταθεροποιούν το χρώμα. Ακόμη, οι αντιδράσεις πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών δεν έχουν μελετηθεί ακόμη καλά. Εξαρτώνται από τον τύπο των πολυμερών και επηρεάζονται από τη θερμοκρασία. Διάφοροι τύποι πολυσακχαριτών από τα σταφύλια, τις ζύμες και τους μύκητες, είναι πιθανό να βρίσκονται στον οίνο, περιλαμβάνουν ουδέτερους πολυσακχαρίτες (γλυκάνη, δεξτράνη, μαννάνη, κυτταρίνη κλπ.), όξινους πολυσακχαρίτες (πηκτίνες κλπ.) και γλυκοπρωτεΐνες (μαννοπρωτεΐνες). Οι ερυθροί οίνοι μπορεί επίσης να περιέχουν πρωτεΐνες από στοιχεία που χρησιμοποιούνται στο κολλάρισμα και προστίθενται κατά την ωρίμανση στο βαρέλι.

Οι πιο πάνω αντιδράσεις έχουν μεγάλη επίδραση στη γεύση. Ο οργανωμένος πολυμερισμός δίνει πολυμερισμένες προκυανιδίνες οι οποίες αντιδρούν έντονα με πρωτεΐνες και γι' αυτό έχουν ιδιαίτερα αντιληπτό τανικό χαρακτήρα. Η αύξηση αυτή συνεχίζεται μέχρι 8 έως 10 μονάδες φλαβανολών. Αντίθετα, ο πολυμερισμός που πραγματοποιείται από την αιθανάλη βελτιώνει τη γεύση. Όμως και οι δύο περιπτώσεις έχουν την ίδια ποσότητα φλαβανολών, μόρια αυτού του τύπου είναι λιγότερο ενεργά σε σχέση με τις προκυανιδίνες. Συνδυασμοί με άλλα συστατικά όπως οι ανθοκυανίνες, οι ουδέτεροι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες μειώνουν τη δραστηριότητά τους. Το αντίστροφο ισχύει στη περίπτωση των όξινων πολυσακχαριτών (Riberaeu-Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu).

1.4. Η Ποικιλία Cabernet Sauvignon.

Η πλέον γνωστή γαλλική ερυθρά ποικιλία αμπέλου. Θεωρείται «ο βασιλιάς των ποικιλιών» (King Cab). Κατά μια άποψη προέρχεται από πληθυσμό πρέμνων που ο Πλίνιος ο πρεσβύτερος ονόμασε Biturica. Κατά μια άλλη άποψη πρόκειται για την ποικιλία Petit vidure που καλλιεργούνταν στην ευρύτερη αμπελουργική του Μπορντό από τον 17ο αιώνα. Πρόσφατα δεδομένα από τη χρήση των μοριακών μεθόδων (Bowers και Meredith 1997) έδειξαν ότι η ποικιλία Cabernet Sauvignon είναι κατά πάσα πιθανότητα προϊόν φυσικής διασταύρωσης των Sauvignon blanc και Cabernet franc.

Καλλιεργείται συστηματικά και σε μεγάλες εκτάσεις στη Γαλλία (450.000 στρ.) την Καλιφόρνια (250.000 στρ.), την Αυστραλία (210.000 στρ.), τη Χιλή (210.000 στρ.), τη Βουλγαρία (160.000 στρ.), τη Ρουμανία (120.000 στρ.), την Αργεντινή (70.000 στρ.), τη Νότια Αφρική (70.000 στρ.) αλλά και στις υπόλοιπες αμπελουργικές χώρες. Στην Ελλάδα (6.000 στρ. περίπου) συνιστάται για τα αμπελουργικά διαμερίσματα της Κρήτης, της Πελοποννήσου, της Δωδεκανήσου, της Στερεάς Ελλάδας, της Θεσσαλίας, της Μακεδονίας, της Θράκης, για το νομό Ιωαννίνων και επιτρέπεται στο νομό Ζακύνθου. Είναι γνωστή ως Petit Cabernet, Bouchet, Vidure, Petit vidure και με άλλες ονομασίες.

Έχει Κορυφή νεαρής βλάστησης μετρίως ανοιχτή έως ανοιχτή, χνοώδης έως βαμβακώδης, πρασινοχαλκόχροη. *Νεαρά φύλλα*, ελαφρώς πομφολυγώδη, πρασινέρυθρα με ορειχάλκινες αποχρώσεις και ερυθρωπή περιφέρεια, βαμβακώδη με χνοώδεις νευρώσεις στην κάτω επιφάνεια του ελάσματος. *Πωώδης βλαστός* λεπτός, ημιόρθιος, αραχνοϋφής, πράσινος με ερυθρές γραμμώσεις στη νωτιαία πλευρά· πράσινος στην κοιλιακή πλευρά. Κόμβοι πρασινέρυθροι στη νωτιαία, πράσινοι στην κοιλιακή πλευρά. Οφθαλμοί έντονα ερυθροί. *Έλικες* μικρού μήκους, λεπτές, διαλείπουσες, δισχιδείς ή τρισχιδείς, πρασινοκίτρινες ή πράσινες-ορειχάλκινες, λείες.

Ανεπτυγμένο φύλλο μέτριο, κυκλικό, πεντάκολπο, βαθύκολπο (136-3-58). Ανώτεροι κόλποι μεγάλου βάθους, κλειστοί, σχήματος U, με επικαλυπτόμενα χείλη με τρόπο ώστε να σχηματίζουν οπή. Κατώτεροι κόλποι βαθείς, ροπαλοειδείς, σχήματος U ή λύρας, με επικαλυπτόμενα χείλη. Συχνά στους ανώτερους λοβούς σχηματίζονται αποφύσεις που δημιουργούν την εντύπωση φύλλου με επτά κόλπους. Μισχικός κόλπος κλειστός, σχήματος U ή λύρας, με επικαλυπτόμενα χείλη, γυμνός, σχηματίζεται από τις νευρώσεις, χωρίς την ύπαρξη ελάσματος στη βάση του. Έλασμα βαθυπράσινο, πομφολυγώδες, μελικηρώδες, ελαφρώς αναδιπλούμενο, λείο στην άνω επιφάνεια· με αραχνοϋφή χνοασμό στην κάτω επιφάνεια. Νευρώσεις

ανοιχτοπράσινες, λείες ή με μεταξώδη χνοασμό στην κάτω επιφάνεια. Μίσχος βραχύς, λεπτός, πράσινος με ερυθροϊώδεις ραβδώσεις, λείος. Οδόντες μικροί έως μέτριοι, ακανόνιστοι, αμβλείς, με κυρτές πλευρές.

Σταφυλή μικρή έως μέτρια, συνήθως κυλινδροκωνική ή κωνική, ενίοτε πτερυγική, κανονικής πυκνότητας, με ανισομεγέθεις ράγες. Ποδίσκος μέτριου μήκους, παχύς, μέτριας ξυλοποίησης.

Ράγα μικρή, σφαιρική. Φλοιός παχύς, τραχύς, μελανός, ανθεκτικός, καλυμμένος με κέρινη ανθηρότητα σε κυανή απόχρωση. Σάρκα ανθεκτική, μετρίως χυμώδης, γλυκιά, με χαρακτηριστικό άρωμα. *Γίγαρτα* 1-2 ανά ράγα, απιόμορφα, μέτρια. Ποδίσκος βραχύς, χαλαρής πρόσφυσης.

Ποικιλία ζωνηρή, μετρίως παραγωγική έως παραγωγική, μέσης πρωιμότητας, ορθόκλαδης βλάστησης. Ο καρποφόρος βλαστός φέρει 2-3, συνήθως δύο, σταφυλές στον 2ο και στον 3ο κόμβο. Η βλάστηση των οφθαλμών είναι όψιμη και έτσι προφυλάσσεται από τους παγετούς της άνοιξης. Κατά τη φυλλόπτωση οι παρυφές των φύλλων και οι οδόντες παίρνουν χρώμα ερυθρό. Μορφώνεται σε γραμμικά σχήματα ή κυπελλοειδή και δέχεται κλάδεμα μακρύ (αμολυτή με 4-6 οφθαλμούς) ή βραχύ (κεφαλή με δύο οφθαλμούς). Στη Γαλλία μορφώνεται σε τυπικό σχήμα *Giugot* (απλό ή διπλό) και δέχεται κλάδεμα καρποφορίας μικτό (κεφαλή με δύο οφθαλμούς και αμολυτή με 4-6 οφθαλμούς, η οποία αποτελεί τον προσωρινό οριζόντιο κορμό και προσδέεται στο πρώτο σύρμα υποστύλωσης). Στην Ελλάδα μορφώνεται σε αμφίπλευρο *Rogat* (ύψος κορμού 50 εκ.) και δέχεται κλάδεμα καρποφορίας βραχύ (μία κεφαλή με 2-3 οφθαλμούς ανά βραχίονα). Παρουσιάζει εξαιρετική ικανότητα προσαρμογής σε διάφορα εδαφοκλιματικά περιβάλλοντα, στην οποία άλλωστε οφείλει και τη μεγάλη της διάδοση σε όλες τις αμπελουργικές χώρες. Όμως, για την πλήρη και ομαλή ωρίμανση των σταφυλών απαιτείται προσεκτική επιλογή της τοποθεσίας, ώστε να εξασφαλίζονται ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας, γιατί στις ψυχρότερες περιοχές παρατηρείται ανομοιόμορφη ωρίμανση με την παρουσία άγουρων ραγών και σε πολύ θερμές περιοχές επέρχεται ταχύτερη αποδόμηση των χρωστικών και αρωματικών ουσιών (σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες η συγκέντρωση των πιραζινών μειώνεται από 30 ng/L κατά την έναρξη ωρίμανσης σε 1 ng/L κατά τον τρυγητό). Και στις δύο περιπτώσεις οι επιπτώσεις στους χαρακτήρες ποιότητας χρώματος και αρώματος είναι αρνητικές.

Ευδοκιμεί και παράγει οινικά προϊόντα υψηλής ποιότητας σε εδάφη χαλικώδη, αμμοχαλικώδη, ελαφρώς ασβεστώδη, μέτριας γονιμότητας, σε λοφώδεις ή ημιορεινές περιοχές. Άλλωστε η φήμη των γαλλικών *Cabernet* οφείλεται κυρίως στα χαλικώδη εδάφη των περιοχών *Bordeaux*, *Medoc*, *Graves*. Θα πρέπει να αποφεύγονται τα αργιλοασβεστώδη, ψυχρά εδάφη. Αν και η ποικιλία είναι

ευαίσθητη στην ξηρασία, εντούτοις αποδίδει πολύ καλά και σε θερμές, ημίξηρες ή ξηρές περιοχές, εφόσον εξασφαλίζεται η αναγκαία ποσότητα νερού στα κρίσιμα στάδια βλάστησης.

Κατά την τεχνολογική ωρίμανση των σταφυλών (η διάρκεια της είναι πολύ μικρή γι' αυτό ο τρυγητός πρέπει να ολοκληρωθεί γρήγορα) το γλεύκος χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (220-240 g/L), υψηλή ολική οξύτητα (7,3-8,2 g/L σε τρυγικό οξύ) και άριστο pH (3,30—3,40). Υψηλή είναι και η περιεκτικότητα των φλοιών σε ολικές ανθοκυάνες (1.800-2.000 mg/Kg ραγών). Οι παραγόμενοι οίνοι διακρίνονται από το έντονο ερυθρό χρώμα, το πλούσιο (γεμάτο) σώμα, την υψηλή περιεκτικότητα σε τανίνες, την καλή ισορροπία μεταξύ αλκοολικού βαθμού και οξύτητας και το χαρακτηριστικό υψηλό αρωματικό δυναμικό που αποκτά μετά την παλαίωση.

1.5. Χαρακτηριστικά των υποκειμένων SO4 και 1103 Paulsen.

1.5.1. SO4.

Το SO4 είναι διασταύρωση του Riparia με το Berlandieri . Η επιλογή του από τον κλώνο Teleki, αριθμός 4, πραγματοποιήθηκε υπό τον καθηγητή Rodrian στην αμπελουργική του Oppenheim.

Είναι αρσενικό φυτό στείρο. Έχει μετρίως ανοιχτή έως ανοιχτή, χνοώδη νεαρή βλάστηση, με ερυθρορόδινη παρυφή. Τα νεαρά φυλλάρια έχουν ορειχάλκινες αποχρώσεις, με αραχνοϋφή χνοασμό και μισχικό κόλπο σε σχήμα U. Το ανεπτυγμένο φύλλο είναι μεγάλο, σφηνοειδές, πλήρες (136-3-24). Ο μισχικός κόλπος είναι σχήματος U ανοιχτού. Το μισχικό σημείο είναι ρόδινο. Το έλασμα είναι κυματώδες (ενίοτε ελαφρώς πομφολυγώδες) με την παρυφή γυρισμένη προς τα πάνω, κιτρινοπράσινο, λείο στην άνω επιφάνεια, αραχνοϋφές στην κάτω. Έχει νευρώσεις κιτρινοπράσινες, βελουδοειδείς. Ο ποώδης βλαστός είναι ερυθρωπός έως ιώδης στη νωτιαία πλευρά, πράσινος με ερυθρά στίγματα στην κοιλιακή πλευρά, πλευρώδης, βελουδοειδής.. Τέλος, έχει δισχιδείς κατά κανόνα έλικες, μικρού έως μετρίου μήκους, ερυθροϊώδεις, λείοι ή μεταξώδεις (Σταυρακάκης, 2009).

Το υποκείμενο SO4 εμφανίζει πολύ υψηλή αντοχή στη ριζόβια μορφή της φυλλοξήρας, ικανοποιητική αντοχή στους νηματώδεις του γένους *Meloidogyne* αλλά είναι ευαίσθητο στη φυτόφθορα και τη θήλωση. Υποκείμενο μέτριας έως κανονικής ζωηρότητας, ευνοεί την πρώιμη καρπόδεση και ωρίμανση των σταφυλών και συμβάλλει στην παραγωγικότητα των ποικιλιών που εμβολιάζονται σε αυτό.

Συνιστάται για εδάφη δροσερά, ελαφρά, λίγο συνεκτικά, μέτριας γονιμότητας, καλά αποστραγγιζόμενα νε περιεκτικότητα έως 18% σε ενεργό ανθρακικό ασβέστιο (ΔΧΙ 30). Σε πολύ γόνιμα εδάφη προκαλεί οψίμιση της παραγωγής. Ευαίσθητο στα άλατα του εδάφους (έως 0,4 g ανά κιλό εδάφους) και τη ξηρασία αλλά συμπεριφέρεται πολύ καλά στα όξινα εδάφη (Σταυρακάκης 2009).

1.5.2. 1103 Paulsen.

Το 1103 Paulsen δημιουργήθηκε από τον F. Paulsen την τελευταία δεκαετία του 19^{ου} αιώνα στη Σικελία. Είναι διασταύρωση του *Berlandieri Ressequiser* με το *Rupestris du Lot* και είναι το νούμερο 2 της επιλογής Oppenheim.

Είναι αρσενικό φυτό. Ο ποώδης βλαστός έχει λείο ή αραχνοϋφή χνοασμό, είναι ερυθρωπός ή ερυθροϊώδης με ανοιχτοπράσινες ραβδώσεις. Τα νεαρά φύλλα είναι στυλπνά, λεία, αναδιπλούμενα, πρασινέρυθρα έως ορειχαλκόχροα.

Το φύλλο είναι μετρίου μεγέθους, νεφροειδές και σχεδόν πλήρες (025-2-23). Ο μισχικός κόλπος είναι πολύ ανοιχτός, σχήματος U, με γυμνή βάση. Το έλασμα είναι ελαφρώς κυματώδες, βαθυπράσινο λείο στην άνω επιφάνεια και ανοιχτοπράσινο στην κάτω, με νευρώσεις ρόδινες, ανάγλυφες, με ερυθρωπή βάση, μεταξώδεις.

Παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στη ριζόβια μορφή της φυλλοξήρας, με φύλλωμα ευαίσθητο στη φυλλόβια μορφή της. Ανθεκτικό στον περονόσπορο και το ωίδιο, αλλά ευαίσθητο στη φυτόφθορα, Ανθεκτικό στους νηματώδεις του γένους *Meloidogyne*, μετρίως ανθεκτικό στον *Xiphinema index*. Υποκείμενο μετρίως ζωηρό έως ζωηρό, μεγάλου βλαστικού κύκλου, πρώιμης εκβλάστησης και ταχείας

ανάπτυξης, μεταδίδει ευχερώς τη ζωηρότητα στις εμβολιαζόμενες ποικιλίες, με αποτέλεσμα την οψίμιση της παραγωγής. Από τα πλέον ανθεκτικά στην ξηρασία υποκείμενο αμπέλου, με πλούσιο ριζικό σύστημα που αναπτύσσεται σε βάθος, ευαίσθητο στις χαμηλές θερμοκρασίες και τον ανοιξιάτικο παγετό. Προσαρμόζεται με αξιοσημείωτη ευχέρεια σε μεγάλη ποικιλία εδαφών, όπως σε συνεκτικά, αργιλώδη, αβαθή, ξηρά, φτωχά. Δεν συνιστάται για γόνιμα, βαθιά εδάφη. Ανέχεται ικανοποιητικά την υπερβολική υγρασία του εδάφους. Είναι ανθεκτικό στα όξινα εδάφη, στο ανθρακικό ασβέστιο του εδάφους (έως 40% σε ολικό, 20% σε ενεργό, ΔΧΙ έως 30), μετρίως ανθεκτικό στην αλατότητα (0,6 γρ. NaCl ανά κιλό εδάφους, ενώ έχουν αναφερθεί περιπτώσεις αντοχής μέχρι 1,2 γρ. NaCl ανά κιλό εδάφους) (Σταυρακάκης, 2009).

1.6. Περιγραφή Μεθόδων Ανάλυσης

1.6.1. Δείκτης Folin-Ciocalteu.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξειδωση των φαινολών σε αλκαλικό περιβάλλον με μίγμα φωσφοροβόλφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέος. Πρέπει να σημειωθεί ότι την ίδια αντίδραση δίνουν και άλλα συστατικά, όπως ανάγοντα σάκχαρα, νουκλεϊνικά οξέα κλπ. Για το διαχωρισμό των φαινολών από τα συστατικά αυτά, χρησιμοποιούνται στήλες χρωματογραφίας με polyclar AT, sephadex κ.ά. Όμως η συγκράτηση των φαινολών δεν είναι ποσοτική. Γι' αυτό η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται απ' ευθείας επί του δείγματος, εφ' όσον η περιεκτικότητά του σε σάκχαρα είναι μικρότερη των 20 g/L.

Η τεχνική της μεθόδου αυτής έχει γίνει αποδεκτή ως επίσημη μέθοδος τόσο από τον Α.Ο.Α.Σ. όσο και από τον Ο.Ι.Ν. και έχει ως εξής:

Διαλύματα και αντιδραστήρια:

-Αντιδραστήριο *FOLIN-CIOCALTEU*: σε σφαιρική φιάλη των 2 L διαλύονται σε 100 g βολφραμικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) και 25 g μολυβδαινικού νατρίου

($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) σε 700 mL αποσταγμένου νερού. Προστίθενται επίσης 50 mL φωσφορικού οξέος 85% και 100 mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Το διάλυμα αφήνεται σε βρασμό υπό κάθετο ψυκτήρα επί 10 ώρες. Ο βρασμός διακόπτεται για να προστεθούν 150 g θειικού λιθίου και μερικές σταγόνες βρωμίου, και μετά συνεχίζεται ο βρασμός για άλλα 15 λεπτά. Αφού το διάλυμα ψυχθεί μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη του 1L και ο όγκος συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό. Το αντιδραστήριο αυτό διατίθεται στο εμπόριο έτοιμο.

-Διάλυμα ανθρακικού νατρίου: 75 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου διαλύονται σε 1 L αποσταγμένο νερό.

Συσκευή: φασματοφωτόμετρο.

Μέτρηση στην περίπτωση λευκών οίνων ή εκχυλίσματος γιγάρτων: σε 0,2 mL οίνου/εκχυλίσματος προστίθενται 1,8 mL αποσταγμένου νερού, 8 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου και 10 mL αντιδραστηρίου *FOLIN-CIOCALTEU* πρόσφατα αραιωμένου σε 10%. Κατά τον ίδιο τρόπο ετοιμάζεται το τυφλό με αποσταγμένο νερό αντί οίνου/εκχυλίσματος. Μετά από παραμονή δύο ωρών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μετριέται η απορρόφηση του διαλύματος στα 750 nm σε κυψελίδες πάχους 10 mm.

Μέτρηση στην περίπτωση ερυθρών οίνων: ακολουθείται η ίδια ως άνω τεχνική αλλά επί του δείγματος αραιωμένου στο 1/10. Υπάρχει η πιθανότητα το εκχύλισμα γιγάρτων να χρειάζεται κι αυτό αραιώση.

Έκφραση των αποτελεσμάτων:

-είτε ως δείκτης *FOLIN-CIOCALTEU* (F-C) δια πολλαπλασιασμού της απορρόφησης επί 20 και επί την αραιώση.

-είτε ως mg/L γαλλικού οξέος που προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς, η χάραξη της οποίας γίνεται με διαλύματα γαλλικού οξέος γνωστών συγκεντρώσεων (0 – 50 – 100 – 250 – 500 mg/L γαλλικού οξέος).

1.6.2. Μέτρηση Φαινολικών Ουσιών με τη Μέθοδο της HPLC (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιείται συχνά στη βιοχημεία και στην αναλυτική χημεία με σκοπό το διαχωρισμό των ουσιών ενός μείγματος με τη χρήση μίας κινητής φάσης (διαλύτης ή μείγμα διαλυτών) και μίας στατικής φάσης (στήλη).

Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα μεγάλων μορίων ή ιονισμένων σωματιδίων με χαμηλή τάση ατμών και για θερμικά ασταθείς ενώσεις που δεν μπορούν να αναλυθούν απευθείας με την αέρια χρωματογραφία. Συνεπώς η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός πολικών, φωτοευαίσθητων, μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ουσιών.

Η μεγαλύτερη απόδοση στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης επιτυγχάνεται με χαμηλές ταχύτητες ροής (και συνεπώς μεγάλη διάρκεια διαχωρισμού) με την εφαρμογή υψηλής πίεσης και τη χρήση μικρών σωματιδίων ως υλικό πλήρωσης της στήλης.

Η έκλουση γίνεται είτε *ισοκρατικά* είτε *βαθμωτά*. Στην *ισοκρατική* έκλουση, η σύσταση της κινητής φάσης δε μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της ανάλυσης. Ο χρόνος κατακράτησης του δείγματος υπό ανάλυση εξαρτάται από το τύπο του δείγματος και τη σύσταση της στατικής και της κινητής φάσης. Έτσι, όταν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά είναι δύσκολο να διαχωριστεί ενώ συγχρόνως τα συστατικά του δείγματος, που συγκρατούνται ισχυρά από τη στήλη, εκκλούνται πάρα πολύ αργά με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών τους.

Στη *βαθμωτή* έκλουση, η ισχύς της κινητής φάσης μεταβάλλεται, επιτυγχάνοντας με αυτόν τον τρόπο καλύτερο διαχωρισμό. Έτσι, διαχωρίζονται στην αρχή οι ουσίες που έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης στη στήλη και με την αύξηση της ισχύος εκκλούνται καλύτερα και όσες συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο.

Η χρωματογραφία αποτελείται από τον *εισαγωγέα* που χρησιμοποιείται για τη χειροκίνητη εισαγωγή του δείγματος με ένεση, τον *απαγωγέα* που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των φυσαλίδων, τη *στήλη*, την *κινητή φάση* και τους *ανιχνευτές*.

Η στήλη κατασκευάζεται από ανοξείδωτο χάλυβα και είναι πληρωμένες με μικρά σωματίδια στατικής φάσης. Τα χαρακτηριστικά της στήλης είναι το μήκος της στήλης, η εσωτερική διάμετρος της στήλης και το μέγεθος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού. Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος της στήλης τόσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός. Επίσης, όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού τόσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός. Ο χρόνος κατακράτησης των σωματιδίων του δείγματος από τα σωματίδια του πληρωτικού υλικού εξαρτάται από την πολικότητα των σωματιδίων και την προσρόφηση αυτών. Υπάρχουν δυο τύποι στηλών, οι στήλες κανονικής φάσης, όπου εκλούνται πρώτα τα πιο άπολα συστατικά και τέλος τα πιο πολικά και οι στήλες ανεστραμμένης φάσης, όπου συμβαίνει το αντίθετο.

Η κινητή φάση είναι μίγμα δυο ή περισσότερων διαλυτών με ή χωρίς προσθήκη άλλων ουσιών. Τα κριτήρια επιλογής των καταλλήλων διαλυτών είναι η πολικότητα τους και η εκλεκτικότητα τους. Για να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, θα πρέπει η πολικότητα της κινητής φάσης να διαφέρει από την πολικότητα της στατικής φάσης.

Οι ανιχνευτές χωρίζονται σε:

- Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης οι οποίοι υπολογίζουν τη διαφορά του δείκτη διάθλασης μεταξύ ενός αγνώστου δείγματος και ενός γνωστού.
- Ανιχνευτές υπεριώδους- ορατού οι οποίοι υπολογίζουν το φάσμα μιας ουσίας στο υπεριώδες και στο ορατό φάσμα
- Ανιχνευτές φθορισμού οι οποίοι χρησιμοποιούνται μόνο για φθορίζουσες ουσίες. Έχουν μεγάλη ευαισθησία.
- Ανιχνευτές φασματογράφου μάζας οι οποίοι υπολογίζουν το MB μιας ουσίας.

- Ανιχνευτές σειράς φωτοδιοδίων οι οποίοι επιτρέπουν την ανίχνευση σε ένα ή περισσότερα μήκη κύματος ταυτόχρονα ενώ η καθαρότητα μια χρωματογραφικής κορυφής μπορεί να υπολογιστεί από τους λόγους των απορροφήσεων σε επιλεγμένα μήκη.

- Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές οι οποίοι υπολογίζουν είτε την αγωγιμότητα της κινητής φάσης (ανιχνευτές αγωγιμότητας) είτε το ρεύμα που συσχετίζεται με την οξειδωση ή την αναγωγή του δείγματος (αμπερομετρικοί ή κουλομετρικοί ανιχνευτές).

1.6.3. Μέτρηση της Συγκέντρωσης των Τανινών με τη Μέθοδο Habertson.

Η μέθοδος των Habertson *et al.* (2002) βασίζεται στην μέθοδο των Hagerman και Butler (1978). Αναλυτικότερα, η μεθοδολογία της ανάλυσης των τανινών των ραγών και του οίνου στηρίζεται στην ταυτόχρονη καθίζηση (**coprecipitation**) του BSA και του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση. Η αλκαλική φωσφατάση είναι το ένζυμο που συμμετέχει στην υδρόλυση των φωσφορικών εστέρων. Ο βαθμός της δράσης της αλκαλικής φωσφατάσης που συμμετέχει στην αντίδραση φαίνεται να είναι ανάλογος του ποσοστού των τανινών που εμπεριέχει το εκάστοτε δείγμα. Συνεπώς, ο προσδιορισμός της συγκεντρώσεως των τανινών σε ένα άγνωστο δείγμα μπορεί να προσδιοριστεί έμμεσα μέσω του προσδιορισμού της δράσης της αλκαλικής φωσφατάσης.

Αντιδραστήρια:

- Bovine serum albumin (BSA, Fraction V powder, αλβουμίνη βόδινου ορού σε σκόνη, βόδινη λευκωματίνη σε σκόνη),

- sodium dodecyl sulfat (SDS, lauryl sulfat, sodium salt, δωδεκυλοθειικό νάτριο, λαυρυλοθειικό νάτριο, άλας νατρίου). Χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών (με "ξεδίπλωμα" της πολυπεπτιδικής αλυσίδας) δράση οφειλόμενη στην εξουδετέρωση των λιποφιλικών και ιοντικών έλξεων. Συνδυάζεται με αναγωγικά αντιδραστήρια διάνοιξης και των δεσμών –SS–. Το λιπόφιλο ανιόν του SDS αντισταθμίζει τα εντοπισμένα θετικά φορτία της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και επαυξάνει τα εντοπισμένα αρνητικά φορτία. Με τον τρόπο αυτό εμποδίζεται η

αναδίπλωση της αλυσίδας και το "ξεδιπλωμένο" μόριο της πρωτεΐνης αποκτά αρνητικό φορτίο ανάλογο του M.B. της.

- triethanolamine (TEA, τριαιθανολαμίνη). Είναι ασθενώς βασικός διαλύτης, συστατικό των ρυθμιστικών διαλυμάτων.

- ferric chloride hexahydrate (FeCl_3 , 6-ενυδρο άλας του χλωριούχου σιδήρου). Είναι ήπιο οξειδωτικό μέσο.

- (+)-κατεχίνη. Χρησιμοποιείται για την χάραξη της πρότυπης καμπύλης.

2. Υλικά και Μέθοδοι.

2.1. Περιγραφή του Πειράματος.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στη διάρκεια δύο συναπτών ετών (2005 και 2006) σε εμπορικό αμπελώνα 10 ετών στη Λάρισα, κεντρική Ελλάδα ($39^\circ 48' \text{N}$, $22^\circ 27' \text{E}$, 190 m), φυτεμένος με ποικιλία Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*) με 3200 πρέμνα ανά εκτάριο (1.3 m * 2.4 m). Το έδαφος του αμπελώνα είναι βαθύ αργιλώδες (44% άμμος, 31% ιλύς και 25% άργιλος). Τα πρέμνα είναι διαμορφωμένα με κατακόρυφη υποστήλωση με 3 σύρματα και κλαδεμένα με βραχύ κλάδεμα σε αμφίπλευρο σύστημα με 12-14 κόμβους ανά πρέμνο.

Η περιοχή έχει ημίξηρο κλίμα με λιγότερο από 60 mm βροχής το καλοκαίρι. Η μέση ημερήσια θερμοκρασία και η ατμοσφαιρική υγρασία κατά τους καλοκαιρινούς μήνες ήταν $32,2^\circ \text{C}$ και 35% αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τα 2 έτη της μελέτης, το 2005 η μέση θερμοκρασία κατά τη περίοδο ανάπτυξης (Απρίλιο μέχρι Σεπτέμβρη) ήταν $21,8^\circ \text{C}$ ενώ το 2006 ήταν 21°C .

Το πείραμα ήταν ρυθμισμένο σε ένα 2*3 πειραματικό σχέδιο με 2 υποκείμενα [1103 Paulsen (*V. rupestris* * *V. berlandieri*) και SO4 (*V. riparia* * *V. berlandieri*)] και 3 επεμβάσεις άρδευσης [πλήρης άρδευση: 100% της εξατμισοδιαπνοής της καλλιέργειας (ET_c), μειωμένη άρδευση: 50% της εξατμισοδιαπνοής και καθόλου άρδευση]. Η ET_c υπολογίστηκε από την εν δυνάμει εξατμισοδιαπνοή

(υπολογίστηκε από τη μέθοδο Penmann – Monteith) και οι συντελεστές της καλλιέργειας προσαρμόστηκαν από τους Williams et al. (2003). Η άρδευση εφαρμόστηκε σε εβδομαδιαία βάση ξεκινώντας από την καρπόδεση μέχρι τη συγκομιδή, με βάση τα κλιματικά δεδομένα τα οποία καταγράφονταν σε αυτόματο μετεωρολογικό σταθμό ο οποίος βρισκόταν στον αμπελώνα. Το νερό εφαρμόστηκε με σύστημα στάγδην άρδευσης με 4 L ανά ώρα για κάθε πρέμνο σε κάθε πλευρά του κορμού, οι σταλάκτες ήταν τοποθετημένοι σε κανονικές αποστάσεις κατά μήκος του σωλήνα. Η συνολική ποσότητα του νερού που χρησιμοποιήθηκε για την κάθε περίοδο ήταν περίπου 300 mm για την πλήρη άρδευση και 150 mm για την μειωμένη άρδευση. Οι 6 επεμβάσεις επαναλήφθηκαν 3 φορές σε τυχαιοποιημένα τετράγωνα, με 3 σειρές σε κάθε επανάληψη. Σε κάθε πειραματικό τεμάχιο, μόνο τα 4 κεντρικά πρέμνα στη μέση της γραμμής χρησιμοποιήθηκαν για μετρήσεις, ενώ οι υπόλοιπες γραμμές χρησιμοποιήθηκαν ως όρια.

3. Περιγραφή των Μεθόδων Ανάλυσης του Πειράματος.

3.1. Εκχυλισματικότητα Χρωστικών και Μέτρηση Δείκτη Φαινολικών Ουσιών.

Τοποθετούμε σε ένα blender 200 ράγες. Από τον χυμό που παίρνουμε ξεχωρίζουμε 50 ml στα οποία προσθέτουμε ένα 50 ml διάλυμα με pH 3,2 το οποίο περιέχει νερό και τρυγικό οξύ. Σε ένα δεύτερο μέρος 50 ml από το χυμό των ραγών προσθέτουμε επίσης 50 ml διαλύματος νερού με υδροχλωρίο το οποίο έχει pH 1,0.

Στη συνέχεια αφήνουμε τα πιο πάνω διαλύματα για 4 ώρες στους 25°C. Ακολουθεί φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Στο τέλος γίνεται ο προσδιορισμός των ολικών ανθοκυανών.

Από το χυμό των ραγών ξεχωρίζουμε 20 ml και τα φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 15 λεπτά. Από το φυγοκεντρωμένο δείγμα παίρνουμε 1ml και το διαλύουμε σε 50 ml

απεσταγμένο νερό, από το διάλυμα αυτό μετράμε στο φασματοφωτόμετρο την απορρόφησή του στα 320 nm με κυψελίδα πάχους 10 mm.

3.2. Μέθοδος Ανάλυσης των Φαινολικών Ουσιών με HPLC.

Ζυγίζουμε 2 g γιγάρτων, τα οποία τα σπάμε ελαφρώς με τη βοήθεια ενός μαρμάρινου αντικειμένου. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα γιγάρτα σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο έχουμε προσθέσει 8 ml οξικού αιθυλεστέρα. Ο δοκιμαστικός σωλήνας θα πρέπει να είναι εσφυρισμένος. Για να γίνει η εκχύλιση θα πρέπει να δουλέψουμε τα δείγματα στο vortex για 3 min, οπότε κατά διαστήματα ξεβιδώνουμε τον σωλήνα για να εκτονωθεί το αέριο που παράγεται. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 5 min στους -4°C . Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Το καθαρό εκχύλισμα που λαμβάνεται με αυτή τη διαδικασία οδηγείται στον evaporator όπου εξατμίζεται ο οξικός αιθυλεστέρας εντελώς (εξάτμιση μέχρι ξηρού). Η εξάτμιση πρέπει να πραγματοποιηθεί στους 35°C . Το υπόλειμμα που λαμβάνεται μετά από αυτή τη διαδικασία διαλύεται σε 8 ml διάλυμα μεθανόλης που περιέχει 5% (v/v) υπερχλωρικό οξύ. Το διάλυμα αυτό πριν την ανάλυση φιλτράρεται με φίλτρο τύπου Gelman GHP Acrodisk 13 με διάμετρο 0.45 μm . Στη συνέχεια με τη μέθοδο της HPLC γίνεται ο προσδιορισμός των ουσιών. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε συσκευή HPLC τύπου HP 1090, σειρά II, σε συνδυασμό με έναν HP 1090 ανιχνευτή διόδου. Ο διαλύτης A ήταν 0.6 % υγροποιημένο περχλωρικό οξύ και ο B διαλύτης ήταν η μεθανόλη (MeOH), ενώ ο ρυθμός ροής διατηρήθηκε σταθερός κατά την ανάλυση στο 1 ml/λεπτό. Οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν με μια σπείρα διαμέτρου 20 μl . Το πρόγραμμα έκλουσης που ακολουθήθηκε ήταν ως εξής: από 100% της A ως 78% σε 55 λεπτά, 78% A ως 0% σε 10 λεπτά και μετά ισοκρατικά για ακόμη 10 λεπτά. Τα χρωματογραφήματα πραγματοποιήθηκαν στα 280 nm, ενώ η ταυτοποίηση έγινε βάση των χρόνων κατακράτησης και βάση φασματικών δεδομένων σε σχέση με πρότυπα διαλύματα. Ο προσδιορισμός των ποσοτήτων πραγματοποιήθηκε μέσω εγκατεστημένων καμπυλών για κάθε ουσία ξεχωριστά, με χρήση προτύπων.

3.3. Μέτρηση της Συγκέντρωσης των Τανινών με τη Μέθοδο Habertson.

Τα γιγάρτα από 20 ράγες τα τοποθετούμε σε κωνική φιάλη με 20 ml διαλύματος ακετόνης σε νερό 70 % (v/v). Οι φιάλες τοποθετούνται για μία νύχτα σε αναδευτήρα με 100 rpm.

Στη συνέχεια διαλύουμε BSA σε διάλυμα το οποίο περιέχει 200mM οξικό οξύ και 170 mM NaCl και στο οποίο έχει ρυθμιστεί το pH στο 4.9 με NaOH, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση σε πρωτεΐνη να είναι 1mg/mL. Το εκχύλισμα των γιγάρτων αραιώνεται με διάλυμα αιθανόλης 12% το οποίο περιέχει 5g/L τρυγικό κάλιο και του οποίου το pH έχει ρυθμιστεί στο 3.3 με HCl, η αραιώση είναι 1:11. Σε σωλήνα 1.5 mL βάζουμε 1 mL από το διάλυμα της πρωτεΐνης και στη συνέχεια 500 μ L από το διάλυμα του εκχυλίσματος. Το μίγμα αυτό αφήνεται να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά με αργή ανακίνηση. Μετά τον επωασμό το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 13.500 g ώστε να καταβυθιστεί το συσσωμάτωμα της πρωτεΐνης με τη τανίνη το οποίο βρίσκεται σε διάλυση. Το ίζημα αυτό ξεπλένεται με 250 μ L από το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για να διαλυθεί το BSA (δηλαδή 200 mM οξικό οξύ και 170 mM NaCl και ρύθμιση του pH στο 4.9 με NaOH, χωρίς τη προσθήκη BSA) και το δείγμα φυγοκεντρείται ξανά για 1 λεπτό στις 13,500 g ώστε να ιζηματοποιηθεί ξανά το διάλυμα τανίνης και πρωτεΐνης. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε απομακρύνεται και προστίθενται 875 μ L διαλύματος το οποίο περιέχει 5% TEA (v/v) και 10% SDS (w/v). Το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια διαλύουμε το ίζημα με τη βοήθεια του vortex. Αμέσως μετά προσθέτουμε 125 μ L διαλύματος το οποίο έχει 10 mM FeCl₃ σε 0.01 N HCl. Μετά από 10 λεπτά μετράται η απορρόφηση στα 510 nm σε UV-160 spectrophotometer, χρησιμοποιώντας TEA ως τυφλό.

Για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιούμε (+)-κατεχίνη με διάφορες συγκεντρώσεις από 50 έως 300 μ g λαμβάνοντας διάφορα κλάσματα από ένα

διάλυμα 1mg/mL κατεχίνης σε 10% αιθανόλη με TEA/SDS ώστε ο τελικός του όγκος να είναι 875 μ L.

Οι τιμές των τανινών από τον οίνο ή τα εκχυλίσματα των φλοιών και των γιγάρτων λαμβάνονται από την καμπύλη αναφοράς και συνεπώς εκφράζονται σε mg κατεχίνης.

3.4. Folin Ciocalteu.

Σε 0,2 mL οίνου/εκχυλίσματος προστίθενται 1,8 mL αποσταγμένου νερού, 8 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου και 10 mL αντιδραστηρίου *FOLIN-CIOCALTEU* πρόσφατα αραιωμένου σε 10%. Κατά τον ίδιο τρόπο ετοιμάζεται το τυφλό με αποσταγμένο νερό αντί οίνου/εκχυλίσματος. Μετά από παραμονή δύο ωρών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μετριέται η απορρόφηση του διαλύματος στα 750 nm σε κυψελίδες πάχους 10 mm.

4. Αποτελέσματα.

4.1. Προσδιορισμός Πολυφαινολικής Ωριμότητας.

Η πολυφαινολική ωριμότητα προσδιορίζεται από τον Δείκτη Φαινολικών Ουσιών.

Πίνακας 1. Διακυμάνσεις του Δ.Φ.Ο. με την επίδραση των παραγόντων 'χρονιά', 'υποκείμενο' και 'άρδευση' εκφρασμένα σε mg/100 γίγαρτα.

Δείκτης φαινολικών Ουσιών				
	2005		2006	
	Τιμή	Std. Dev.	Τιμή	Std. Dev.
ST0	63	12	72	3
ST50	56	7	66	15
ST100	48	10	67	5
PT0	68	14	77	6
PT50	58	18	66	5
PT100	48	5	66	7

Στο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του δείκτη φαινολικών ουσιών των γιγάρτων τα οποία εκφράζονται σε mg/100 γίγαρτα. Από τα πιο πάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η ποσότητα του ποτίσματος η τιμή του δείκτη φαινολικών ουσιών μειώνεται. Συγκεκριμένα, το έτος 2005 η μεταβολή αυτή είναι πιο έντονη. Το έτος 2006 οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποτισμένων με τα απόπιστα πρέμνα ήταν επίσης έντονες, όμως μεταξύ των δύο επεμβάσεων ποτίσματος οι μεταβολές ήταν αμελητέες και ιδιαίτερα σε σχέση με τις μεταβολές

που παρατηρούνται κατά το 2005. Μεταξύ των δύο υποκειμένων παρατηρείται ότι οι διαφοροποιήσεις ως προς την άρδευση είναι περίπου οι ίδιες. Βέβαια, όπως φαίνεται από τον πίνακα οι μεταβολές που προαναφέρθηκαν δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

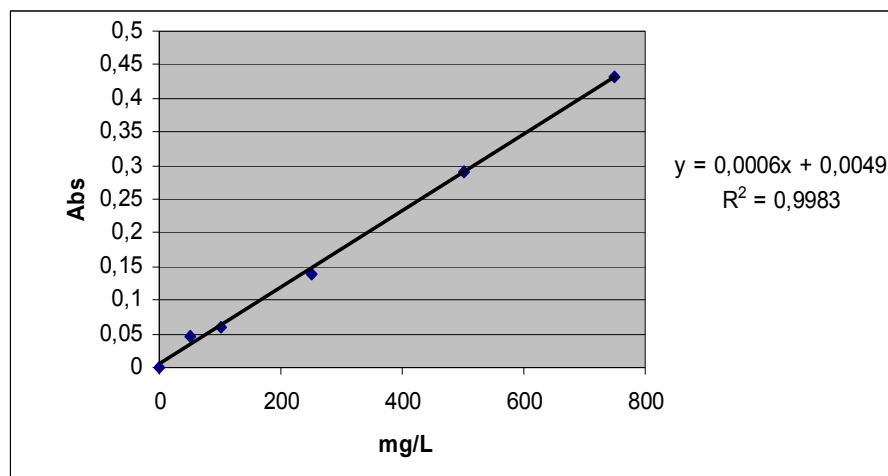
Πίνακας 2. Διακυμάνσεις του Δ.Φ.Ο. με την επίδραση των παραγόντων 'χρονιά', 'υποκείμενο' και 'άρδευση' εκφρασμένα σε mg/g νωπού βάρους γιγάρτων.

Δείκτης φαινολικών Ουσιών				
	2005		2006	
	Τιμή	Std. Dev.	Τιμή	Std. Dev.
ST0	45.1b	4	62	2
ST50	51.1ab	3	60	7
ST100	56.7a	6	63	5
PT0	48	4	63	5
PT50	52	6	63	9
PT100	54	2	60	3

Στο πιο πάνω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του δείκτη φαινολικής ωριμότητας εκφρασμένα σε mg/g νωπού βάρους γιγάρτων. Από ότι φαίνεται στο πίνακα οι φαινολικές ουσίες για το έτος 2005, και για τα δύο υποκείμενα, έχουν τη τάση να αυξάνονται όσο αυξάνεται η ποσότητα της άρδευσης, αντίθετα από ότι παρουσιάζεται στο προηγούμενο πίνακα, και μάλιστα η διαφοροποίηση για το υποκείμενο SO4 με 100% άρδευση είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τους δύο άλλους τρόπους άρδευσης. Το 2006 οι μεταβολές τόσο μεταξύ των υποκειμένων όσο και μεταξύ των τρόπων άρδευσης είναι αμελητέες. Αντίθετα, στο προηγούμενο πίνακα οι τιμές των φαινολικών ουσιών φαίνεται πως μειώνονται καθώς αυξάνεται η ποσότητα της άρδευσης.

4.2. Αποτελέσματα Folin-Ciocalteu.

Σχήμα 10: Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού των ολικών φαινολών σε mg/L γαλλικού οξέος με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.



Η μέθοδος Folin-Ciocalteu χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών που υπάρχουν στα γίγαρτα των ραγών της ποικιλίας Cabernet sauvignon. Ο υπολογισμός τους έγινε με την χάραξη πρότυπης καμπύλης της μορφής $y = 0,0006x + 0,0049$, με $R^2=0,9983$. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με δύο τρόπους:

- Ως mg/100 γίγαρτα και
- ως mg/g νωπού βάρους γιγάρτου.

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών σε mg γαλλικού οξέος/100 γίγαρτα στα δύο υποκείμενα με τους τρεις τρόπους άρδευσης για τις δύο χρονιές.

Folin-Ciocalteu				
	2005		2006	
	Τιμή	Std. Dev.	Τιμή	Std. Dev.
ST0	22	9	25.6b	6
ST50	31	3	43.8a	9
ST100	36	12	32a	3
PT0	29	2	29.4b	1
PT50	36	12	40.7a	6
PT100	41	4	43.9a	1

Στο πίνακα 3 παρουσιάζονται οι τιμές του δείκτη Folin – Ciocalteu εκφρασμένες σε mg γαλλικού οξέος/100 γίγαρτα. Από το πίνακα φαίνεται ότι η άρδευση έχει θετικό αντίκτυπο, αφού και στα δύο υποκείμενα και τις δύο χρονιές όταν αυξάνεται η άρδευση αυξάνεται και η τιμή του δείκτη Folin. Ιδιαίτερα το 2006 οι μεταβολές μεταξύ αρδευόμενων και μη αρδευόμενων πρέμνων είναι και στατιστικά σημαντικές .

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών σε mg γαλλικού οξέος/g νωπού βάρους γιγάρτων στα δύο υποκείμενα με τους τρεις τρόπους άρδευσης για τις δύο χρονιές.

Folin-Ciocalteu				
	2005		2006	
	Τιμή	Std. Dev.	Τιμή	Std. Dev.
ST0	6.2	2.1	6.6b	1.8
ST50	7.5	1.1	10.3a	1.9
ST100	8.2	3.6	8.8ab	0.7
PT0	8.3	1.3	8.5	0.4
PT50	9.5	3.2	10.2	2.2
PT100	9.6	2.0	11.0	0.5

Όταν τα αποτελέσματα του δείκτη Folin – Ciocalteu εκφράστηκαν σε mg γαλλικού οξέος/ g νωπού βάρους γιγάρτων έδειξαν περίπου τις ίδιες μεταβολές μεταξύ των αρδευόμενων και μη πρέμνων, με τη διαφορά ότι το έτος 2006 στο υποκείμενο SO4 τα πρέμνα που δέχτηκαν 50% άρδευση έδωσαν στατιστικά σημαντική αύξηση και ως προς τα μη αρδευόμενα και ως προς τα 100% αρδευόμενα πρέμνα.

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών σε mg γαλλικού οξέος/100 γίγαρτα στα δύο υποκείμενα με τους τρεις τρόπους άρδευσης.

Folin-Ciocalteu		
	Τιμή	Std. Dev
ST0	23.8	7.5
ST50	37.4	6.0
ST100	34	7.5
PT0	58.4	1.5
PT50	38.4	9.0
PT100	42.5	2.5

Ο πίνακας 5 παρουσιάζει τις μεταβολές του δείκτη Folin – Ciocalteu όταν αλλάζει το υποκείμενο και ο τρόπος άρδευσης. Έτσι, παρατηρούμε ότι για το SO4 η άρδευση επιδρά θετικά στη τιμή του δείκτη αυτού, όμως η 50 % κάλυψη των αναγκών του πρέμνου δηλαδή ελλιπής άρδευση δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη πλήρη άρδευση. Αντίθετα, στο 1103 Paulsen η παντελής έλλειψη άρδευσης δίνει τις υψηλότερες τιμές για το δείκτη που μελετάμε, ενώ η ελλιπής άρδευση δίνει τις μικρότερες τιμές.

Πίνακας 6. Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών σε mg γαλλικού οξέος/g νωπού βάρους γιγάρτων στα δύο υποκείμενα με τους τρεις τρόπους άρδευσης.

Folin-Ciocalteu		
	Τιμή	Std. Dev
ST0	6.4	2.0
ST50	8.9	1.5
ST100	8.5	2.2
PT0	8.4	0.9
PT50	9.9	2.7
PT100	10.3	1.3

Από τον πίνακα 6 όπου τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg γαλλικού οξέος / g νωπού βάρους γιγάρτων, παρατηρούμε ότι οι μεταβολές στο SO4 είναι οι ίδιες όπως και στο προηγούμενο πίνακα. Αντίθετα, στο 1103 Paulsen φαίνεται ότι η άρδευση έχει θετική επίδραση ως προς το δείκτη Folin – Ciocalteu και ιδιαίτερα όταν αυτή είναι πλήρης και όχι ελλιπής.

Πίνακας 7. Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών σε mg γαλλικού οξέος/100 γίγαρτα σε σχέση με τον τρόπο άρδευσης.

Folin-Ciocalteu		
	Τιμή	Std. Dev
0 %	26.5	4.5
50 %	37.9	7.5
100 %	38.2	5.0

Αν εξετάσουμε τον παράγοντα άρδευση ξεχωριστά βλέπουμε ότι, ανεξάρτητα από τη χρονιά και το υποκείμενο που χρησιμοποιείται, η άρδευση παίζει θετικό ρόλο στο δείκτη Folin – Ciocalteu.

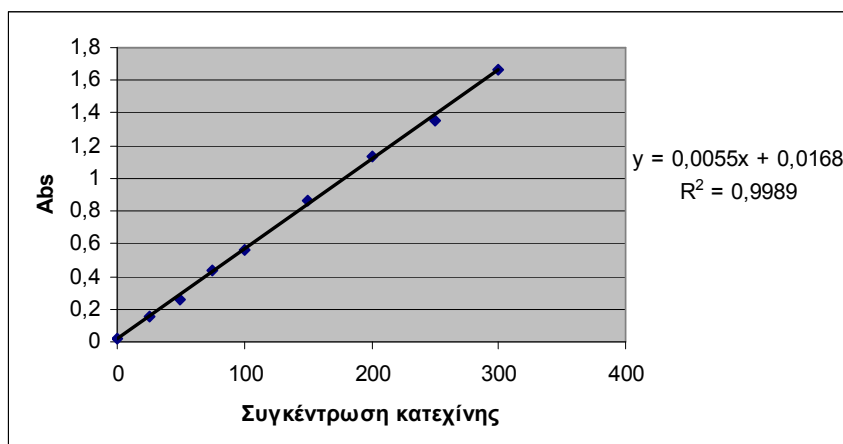
Πίνακας 8. Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών σε mg γαλλικού οξέος/g νωπού βάρους γιγάρτων σε σχέση με τον τρόπο άρδευσης.

Folin-Ciocalteu		
	Τιμή	Std. Dev
0 %	7.4	1.4
50 %	9.4	2.1
100 %	9.4	1.7

Τέλος, όταν τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/g γιγάρτων η τιμή του Folin – Ciocalteu αυξάνεται όταν εφαρμόζεται άρδευση ανεξάρτητα από τη ποσότητα νερού που εφαρμόζεται.

4.3. Αποτελέσματα Τανινών.

Σχήμα 11: Καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού των τανινών του φλοιού με την μέθοδο του Habertson *et al.*(2002).



Η μέθοδος περιγράφεται από τους Habertson *et al.*(2002) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των τανινών που υπάρχουν στα γίγαρτα των ραγών της ποικιλίας Cabernet sauvignon. Ο υπολογισμός τους έγινε με την χάραξη πρότυπης καμπύλης της μορφής $y = 0,0055x + 0,0168$, με $R^2=0,9989$. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με δύο τρόπους:

- Ως mg/100 γίγαρτα και
- ως mg/g νωπού βάρους γιγάρτων.

Πίνακας 9. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τανινών των γιγάρτων εκφρασμένες σε mg/ 100 γίγαρτα για τα έτη 2005 και 2006 υπό την επίδραση διαφορετικού υποκειμένου και ποτίσματος.

Τανίνες				
	2005		2006	
	Τιμή	Std. Dev.	Τιμή	Std. Dev.
ST0	64.0b	10.6	87.1	7.9
ST50	72.5b	3.1	87.0	5.3
ST100	97.1a	12.5	95.9	2.3
PT0	58.9b	3.5	83.9	11.7
PT50	79.6a	9.5	81.2	13.2
PT100	76.3a	5.7	81.4	15.4

Από το παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση των τανινών δέχεται θετική επίδραση από το πότισμα και για τα δύο υποκείμενα, ιδιαίτερα το έτος 2005. Αντίθετα, το 2006 στο SO4 διαφορά παρατηρείται μεταξύ των πρέμνων που δέχτηκαν 100% άρδευση σε σχέση με αυτά που δε δέχτηκαν καθόλου άρδευση και αυτά που δέχτηκαν μειωμένη άρδευση. Στο 1103 Paulsen παρατηρούνται αντίθετα αποτελέσματα, συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η άρδευση (μειωμένη ή κανονική) έχει αρνητική επίδραση στη συγκέντρωση των τανινών.

Πίνακας 10. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τανινών των γιγάρτων εκφρασμένες σε mg/g νωπού βάρους γιγάρτων για τα έτη 2005 και 2006 υπό την επίδραση διαφορετικού υποκειμένου και ποτίσματος.

Τανίνες				
	2005		2006	
	Τιμή	Std. Dev.	Τιμή	Std. Dev.
ST0	23.2	7.5	24.6	1.9
ST50	20.0	0.2	23.5	1.3
ST100	26.0	4.5	26.2	2.6
PT0	18.3	1.2	23.9	3.1
PT50	22.6	2.1	21.8	5.5
PT100	21.0	3.0	20.3	3.8

Όταν η συγκέντρωση των τανινών που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Harbertson εκφράστηκε σε mg/g νωπού βάρους γιγάρτων τα αποτελέσματα ήταν αυτά του πίνακα 10. Πιο αναλυτικά, από το πίνακα φαίνεται ότι για το υποκείμενο SO4 τα πρέμνα που δέχονται κανονική άρδευση δίνουν υψηλότερες συγκεντρώσεις τανινών, σε σχέση με αυτά που δέχονται ελλιπή ή καθόλου άρδευση. Αντίθετα, τα πρέμνα με υποκείμενο 1103 Paulsen δίνουν αντιφατικά αποτελέσματα στις δύο επαναλήψεις.

Πίνακας 11. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τανινών των γιγάρτων εκφρασμένες σε mg/100 γίγαρτα υπό την επίδραση διαφορετικού υποκειμένου και ποτίσματος.

Τανίνες		
	Τιμή	Std. Dev.
ST0	75.6	9.3
ST50	79.8	4.2
ST100	96.5	7.4
PT0	71.4	7.6
PT50	80.4	11.4
PT100	78.9	10.6

Στον πίνακα 11 μελετάται η πορεία της συγκέντρωσης των τανινών ως προς το υποκείμενο και την άρδευση. Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι στο SO4 εφαρμογή άρδευσης και όπως και η αύξηση αυτής επιδρούν θετικά στη συγκέντρωση των τανινών των γιγάρτων. Αντίθετα, στο δεύτερο υποκείμενο η εφαρμογή ελλιπούς άρδευσης είναι αυτή που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα, ενώ και η 100% άρδευση δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη μη εφαρμογή άρδευσης.

Πίνακας 12. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τανινών των γιγάρτων εκφρασμένες σε mg/g νωπού βάρους γιγάρτων υπό την επίδραση διαφορετικού υποκειμένου και ποτίσματος.

Τανίνες		
	Τιμή	Std. Dev.
ST0	23.9	4.7
ST50	21.8	0.8
ST100	26.1	3.6
PT0	21.1	2.2
PT50	22.2	3.8
PT100	20.7	3.4

Όταν τα πιο πάνω αποτελέσματα ανάγονται σε mg/g γιγάρτου βλέπουμε ότι στο SO4 η 50 % άρδευση δίνει τη μικρότερη συγκέντρωση, ενώ στο 1103 P δίνει τη μεγαλύτερη σε σχέση με τις άλλες επεμβάσεις.

Πίνακας 13. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τανινών των γιγάρτων εκφρασμένες σε mg/100 γίγαρτα υπό την επίδραση διαφορετικού τρόπου ποτίσματος.

Τανίνες		
	Τιμή	Std. Dev.
0 %	73.5	8.4
50 %	80.1	7.8
100 %	87.7	9.0

Από τον πίνακα 13, όπου εξετάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των τανινών ως προς το πότισμα, συμπεραίνουμε ότι η εφαρμογή ποτίσματος στα πρέμνα αυξάνει τη συγκέντρωση των τανινών στα γίγαρτα των σταφυλών τους.

Πίνακας 14. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τανινών των γιγάρτων εκφρασμένες σε mg/g νωπού βάρους γιγάρτων υπό την επίδραση διαφορετικού τρόπου ποτίσματος.

Τανίνες		
	Τιμή	Std. Dev.
0 %	22.5	3.4
50 %	22.0	2.3
100 %	23.4	3.5

Τέλος, όταν τα ίδια αποτελέσματα εκφραστούν σε mg / g γιγάρτου βλέπουμε ότι η μεταβολή της συγκέντρωσης των τανινών λόγω άρδευσης δεν είναι τόσο έκδηλη. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή πλήρους άρδευσης πολύ λίγο ευνοεί τη συγκέντρωση των τανινών, ενώ η 50% άρδευση δε φαίνεται να την επηρεάζει.

4.4. Αποτελέσματα HPLC.

Οι φαινολικές ουσίες οι οποίες απαντώνται στα γίγαρτα είναι οι εξής, κατά τη σειρά με την οποία εκλούνται στην HPLC:

- Γαλλικό οξύ χρόνος έκλουσης: 13,887
- Προκυανιδίνη B1 χρόνος έκλουσης: 30,973
- Κατεχίνη χρόνος έκλουσης: 34,517
- Επιγαλοκατεχίνη χρόνος έκλουσης: 36,557
- Προκυανιδίνη B2 χρόνος έκλουσης: 39,419
- Προκυανιδίνη C1 χρόνος έκλουσης: 43,131
- Επικατεχίνη χρόνος έκλουσης: 45,186
- Epigallocatechin gallate χρόνος έκλουσης: 46,180
- Epicatechin gallate χρόνος έκλουσης: 53,171.

Ο πίνακας 15 δείχνει τις συγκεντρώσεις των φαινολικών ουσιών για το έτος 2005 εκφρασμένες σε mg/ 100 γίγαρτα. Οι συγκεντρώσεις για το Γαλλικό οξύ δείχνουν ότι η συγκεκριμένη ουσία στο υποκείμενο SO4 δέχεται θετική επίδραση όταν εφαρμόζεται πλήρης άρδευση. Αντίθετα, δεν παρατηρείται μεταβολή μεταξύ των μη αρδευόμενων και των μειωμένα αρδευόμενων πρέμνων. Αντίθετα, στο 1103 Paulsen φαίνεται ότι η άρδευση έχει αρνητική επίδραση στη συγκέντρωση της συγκεκριμένης ουσίας. Η προκυανιδίνη B1 στο SO4 φαίνεται ότι παρουσιάζει υψηλότερες συγκεντρώσεις σε πρέμνα τα οποία δέχονται πλήρη άρδευση και μάλιστα η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική. Για το υποκείμενο 1103 Paulsen η άρδευση, μειωμένη ή πλήρης, δίνει στατιστικά σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με την έλλειψη άρδευσης. Η συγκέντρωση της κατεχίνης και στα δύο υποκείμενα φαίνεται ότι αυξάνεται όταν το πρέμνο δέχεται άρδευση και μάλιστα είναι μεγαλύτερη στα πρέμνα που δέχονται πλήρη άρδευση. Επιπλέον, στο 1103 Paulsen η διαφορά των συγκεντρώσεων της κατεχίνης μεταξύ των αρδευόμενων και μη πρέμνων είναι και στατιστικά σημαντική. Η ουσία Epigallocatechin επηρεάζεται θετικά από την άρδευση. Παρόμοια, αποτελέσματα παρουσιάζουν και οι προκυανιδίνες B2 και C1, μάλιστα στην ουσία C1 στο υποκείμενο 1103 Paulsen οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των αρδευόμενων και μη είναι στατιστικά σημαντικές. Επίσης, οι συγκεντρώσεις των ουσιών epicatechin, epigallocatechin gallate και epicatechin gallate αυξάνονται στα πρέμνα που δέχονται άρδευση και ιδιαίτερα αυτά που δέχονται πλήρη άρδευση.

Ο πίνακας 16 παρουσιάζει τις συγκεντρώσεις των φαινολικών ουσιών για το έτος 2006 εκφρασμένες σε mg /100 γίγαρτα. Γενικά παρουσιάζονται οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις εξαιτίας των μεταβολών του τρόπου άρδευσης στα δύο υποκείμενα. Πιο αναλυτικά, το γαλλικό οξύ δέχεται αρνητική επίδραση από τον αύξηση της δόσης του ποτίσματος και στα δύο υποκείμενα. Αντίθετα, η ουσία B1 δέχεται θετική επίδραση από την αύξηση του ποτίσματος και μάλιστα οι μεταβολές μεταξύ των αρδευόμενων και μη πρέμνων είναι και στατιστικά σημαντικές. Το ίδιο συμβαίνει και στη περίπτωση της ουσίας catechin για το υποκείμενο 1103 Paulsen, όμοια κατάσταση και για το SO4 με τη διαφορά ότι οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Στην epigallocatechin οι μεταβολές στο 1103 Paulsen έχουν την ίδια πορεία όπως στη catechin, όμως στο SO4 οι μεταβολές δεν τόσο έκδηλες. Στις B2 και C1 προκυανιδίνες, στην epicatechin και την epigallocatechin gallate, όπως τις προηγούμενες περιπτώσεις, όταν αυξάνεται η δόση του ποτίσματος αυξάνονται και οι συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών, χωρίς όμως οι διαφορές που σημειώνονται να είναι και στατιστικά σημαντικές. Οι ίδιες μεταβολές παρατηρούνται και στην ουσία epicatechin gallate με τη διαφορά ότι στο 1103 Paulsen οι μεταβολές τόσο μεταξύ των αρδευόμενων και μη πρέμνων, όσο και μεταξύ των δύο τύπων ποτίσματος, είναι στατιστικά σημαντικές.

Στον πίνακα 17, όπου παρουσιάζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των φαινολικών ουσιών ως προς τους παράγοντες του υποκειμένου και του ποτίσματος, παρατηρείται ότι η εικόνα είναι παρόμοια με αυτή των προηγούμενων πινάκων. Συγκεκριμένα, οι ουσίες B1, κατεχίνη, epigallocatechin, B2, C1, epicatechin, epigallocatechin gallate και epicatechin gallate δέχονται θετική επίδραση από την αύξηση της ποσότητας του ποτίσματος. Αντίθετα, το γαλλικό οξύ δεν επηρεάζεται από τη ποσότητα της άρδευσης που δέχονται τα πρέμνα.

Στο πίνακα 18 παρουσιάζεται η επίδραση του ποτίσματος. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στις περισσότερες ουσίες το πότισμα έχει θετική επίδραση στη συγκέντρωσή τους. Εξαιρέση, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, αποτελεί το γαλλικό οξύ, όπου δεν φαίνεται το πότισμα να ασκεί σαφή επίδραση στη συγκέντρωσή του.

Ο πίνακας 19 παρουσιάζει τις συγκεντρώσεις των φαινολικών ουσιών για το 2005 εκφρασμένες σε mg / g νωπού βάρους γιγάρτων. Από τις τιμές που φαίνονται στο πίνακα το γαλλικό οξύ στο SO4 δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα μεγάλες μεταβολές καθώς διαφοροποιούνται οι συνθήκες ποτίσματος των πρέμνων. Στο 1103 Paulsen η άρδευση (μειωμένη ή πλήρης) μειώνει τη συγκέντρωση του γαλλικού οξέος και μάλιστα η διαφορά μεταξύ της ύπαρξης άρδευσης και την απουσία αυτής είναι στατιστικά σημαντική. Η προκυανιδίνη B1 στο SO4 αυξάνεται μόνο όταν εφαρμόζεται πλήρης άρδευση, ενώ στο 1103 Paulsen η ύπαρξη άρδευσης και ιδιαίτερα η μειωμένη άρδευση ευνοεί την αύξηση της στηκέντρωσης της ουσίας αυτής. Στη περίπτωση της κατεχίνης η ύπαρξη άρδευσης και περισσότερο η πλήρης άρδευση αυξάνει τη συγκέντρωσή της. Αντίθετα, η συγκέντρωση της επιγαλλοκατεχίνης δε μεταβάλλεται από την ύπαρξη ή όχι άρδευσης και στα δύο υποκείμενα που χρησιμοποιήθηκαν. Οι προκυανιδίνες B2 και C1 στο SO4 δέχονται θετική επίδραση από την ύπαρξη άρδευσης ανεξάρτητα της ποσότητας νερού που εφαρμόζεται. Στο 1103 Paulsen, αντίθετα, τα πρέμνα που δέχτηκαν 50% άρδευση έδωσαν υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτής της ουσίας. Επιπλέον, με 100% άρδευση η συγκέντρωση των ουσιών αυτών ήταν υψηλότερη σε σχέση με τη περίπτωση απουσίας άρδευσης. Στη C1 ουσία η διαφορά των συγκεντρώσεων μεταξύ πρέμνων αρδευόμενων και μη βρέθηκε στατιστικά σημαντική. Στις υπόλοιπες ουσίες που παρουσιάζονται στο πίνακα, για τα δύο υποκείμενα που χρησιμοποιήθηκαν, βρέθηκε ότι η μειωμένη άρδευση έδωσε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τις δύο άλλες επεμβάσεις ποτίσματος. Παρόλα αυτά, η πλήρης άρδευση έδωσε υψηλότερες συγκεντρώσεις για τις ουσίες αυτές σε σχέση με την απουσία αυτής.

Το έτος 2006 το γαλλικό οξύ επηρεάζεται αρνητικά από την ύπαρξη άρδευσης για αμφότερα τα υποκείμενα. Αντίθετα, η ουσία B1 επηρεάζεται θετικά από την ύπαρξη άρδευσης και ιδιαίτερα της πλήρους άρδευσης τόσο που η διαφορά των συγκεντρώσεων μεταξύ πλήρους άρδευσης και των υπολοίπων επεμβάσεων είναι στατιστικά σημαντική. Όμοια αποτελέσματα έχουμε και για τη συγκέντρωση της κατεχίνης με τη διαφορά ότι και στις τρεις περιπτώσεις ποτίσματος οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικές. Η συγκέντρωση της epigallocatechin δεν επηρεάζεται από το διαφορετικό πότισμα που εφαρμόζεται στα πρέμνα. Αντίθετα, σε όλες τις υπόλοιπες ουσίες που μελετήθηκαν διαπιστώθηκε ότι η άρδευση όσο περισσότερη είναι τόσο οι συγκεντρώσεις τους αυξάνονται.

Από τον πίνακα 21 φαίνεται ότι σε όλες τις ουσίες η άρδευση και περισσότερο η πλήρης άρδευση αυξάνουν τη συγκέντρωσή τους. Αντίθετα, η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος δεν επηρεάζεται τόσο έντονα από την άρδευση και μάλιστα στο 1103 Paulsen όταν αυξάνεται η άρδευση η συγκέντρωσή του μειώνεται.

Τέλος, ο πίνακας 22, δείχνει ότι και όταν οι συγκεντρώσεις των φαινολικών ουσιών εκφράζονται σε mg/g νωπού βάρους γιγάρτων η αύξηση του ποτίσματος λειτουργεί θετικά για όλες τις ουσίες, με εξαίρεση το γαλλικό οξύ.

4.5. Εκχυλισματικότητα Τανινών Γιγάρτων.

Ο πίνακας 23 παρουσιάζει τα αποτελέσματα του δείκτη εκχυλισματικότητας ταννινών των γιγάρτων για το έτος 2005 και 2006.

ΔΕΙΚΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΑΝΙΝΩΝ ΓΙΓΑΡΤΩΝ (Τ.Γ. %)				
	2005		2006	
	ΤΙΜΕΣ	St. Dev.	ΤΙΜΕΣ	St. Dev.
ST0	49,1	3,5	22,5	4,0
ST50	51,1	2,5	19,9	13,5
ST100	55,4	4,9	24,8	9,4
PT0	47,7	4,1	25,0	10,7
PT50	52,1	5,9	25,3	17,8
PT100	54,5	2,4	19,4	5,4

Παρατηρούμε ότι το έτος 2005 ο δείκτης εκχυλισματικότητας τανινών των γιγάρτων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με το 2006. Ακόμη, το έτος 2005 και στα δύο υποκείμενα όταν αυξάνεται η δόση της άρδευσης αυξάνεται και ο πιο πάνω δείκτης. Αντίθετα, το έτος 2006 για το SO4 τα κανονικά αρδευόμενα πρέμνα έδωσαν την υψηλότερη τιμή και τα ημι-αρδευόμενα τη μικρότερη. Το 1103 Paulsen δίνει μεγαλύτερες τιμές για αυτό το δείκτη στα ημι-αρδευόμενα και μη αρδευόμενα πρέμνα, ενώ τα κανονικά αρδευόμενα έδωσαν τη μικρότερη τιμή.

4.6. Βάρη και Αριθμός Γιγάρτων 100 Ραγών.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα βάρη των γιγάρτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

ΒΑΡΗ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΣ ΓΙΓΑΡΤΩΝ 100 ΡΑΓΩΝ				
	2005		2006	
	g	Αρ. Γιγάρτων	g	Αρ. Γιγάρτων
1 ST0	6,701	188	7,207	151
2 ST0	7,258	191	5,280	144
3 ST0	5,694	169	5,715	164
1 ST50	7,866	203	6,688	162
2 ST50	7,144	188	6,368	146
3 ST50	7,507	158	6,873	160
1 ST100	7,774	195	5,080	147
2 ST100	8,064	174	5,380	152
3 ST100	7,563	151	5,928	146
1 PT0	6,964	176	5,468	168
2 PT0	7,485	219	6,550	173
3 PT0	7,146	208	5,628	163
1 PT50	7,654	202	6,224	159
2 PT50	6,891	181	7,260	188
3 PT50	6,300	163	6,885	157
1 PT100	8,260	218	6,791	164
2 PT100	9,248	198	6,954	166
3 PT100	9,522	200	5,921	160

4.7. Βάρη 100 Ραγών.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα βάρη των ραγών οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα και από τις οποίες λήφθηκαν τα γίγαρτα για τις πιο πάνω μετρήσεις.

ΒΑΡΗ 100 ΡΑΓΩΝ		
	2005	2006
ST0	98,4	79,9
ST50	105,9	89,3
ST100	122,7	96,2
PT0	90,6	76,5
PT50	107,8	100,73
PT100	120,6	109,3

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα τα βάρη των ραγών αυξάνονται όταν τα πρέμνα αρδεύονται και περισσότερο όταν αυξάνεται η δόση της άρδευσης.

5. Συμπεράσματα.

Στη παρούσα μελέτη εξετάζεται η επίδραση του ποτίσματος και του υποκειμένου στα φαινολικά συστατικά (τανίνες και φλαβονόλες) των γιγάρτων της σταφυλής στη ποικιλία Cabernet sauvignon. Από μελέτες άλλων ερευνητών (Harbertson et al., 2002, Glories et al., 2000) έχει διαπιστωθεί ότι η ποικιλία Cabernet sauvignon έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες και τανίνες σε σχέση με άλλες ποικιλίες (Merlot, Syrah, Pinot noir). Αυτό διαπιστώνεται και από τις υψηλές συγκεντρώσεις των συστατικών αυτών στη παρούσα μελέτη, ανεξάρτητα από τις επεμβάσεις.

Η συγκέντρωση των τανινών των γιγάρτων αυξάνεται όταν αυξάνεται το μέγεθος της ράγας, ο αριθμός των γιγάρτων ανά ράγα και η συνολική μάζα των γιγάρτων ανά ράγα (Roby et al., 2004). Μάλιστα οι Roby και Matthews το 2004 διατύπωσαν την υπόθεση ότι η συγκέντρωση των τανινών των γιγάρτων συνδέεται περισσότερο με το μέγεθος της συνολικής μάζας των γιγάρτων σε σχέση με τον αριθμό τους, αυτό ήταν πιο έντονο στις ράγες με ένα γίγαρτο. Ακόμη, η πιο πάνω μελέτη έδειξε ότι η συγκέντρωση των τανινών των γιγάρτων αυξάνεται με το μέγεθος της ράγας, κάτι το οποίο καταδεικνύεται και από τη παρούσα μελέτη.

Η συγκέντρωση των τανινών εκφρασμένη σε mg/100 γίγαρτα στο υποκείμενο SO4 αυξάνεται όταν εφαρμόζεται πότισμα και όταν αυξάνεται η δόση του ποτίσματος. Μάλιστα η διαφορά των πλήρως αρδευόμενων πρέμνων σε σχέση με τα υπόλοιπα ήταν στατιστικά σημαντική το έτος 2005. Τη δεύτερη χρονιά του πειράματος τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στο υποκείμενο 1103 Paulsen η άρδευση γενικά, μειωμένη ή πλήρης, δίνει υψηλότερες συγκεντρώσεις τανινών σε σχέση με την έλλειψη ποτίσματος.

Όταν τα παραπάνω αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg/g νωπού βάρους γιγάρτων, οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν ήταν σχεδόν ίδιες με παραπάνω. Στο SO₄ τα πρέμνα τα οποία δέχτηκαν 100% άρδευση, και στις δύο επαναλήψεις του πειράματος, είχαν στα γίγαρτά τους υψηλότερες συγκεντρώσεις τανινών σε σχέση με τα γίγαρτα των πρέμνων τα οποία δέχτηκαν 50% ή καθόλου άρδευση. Όμοια στο 1103 Paulsen το 2005 τα αρδευόμενα πρέμνα έδωσαν υψηλότερες συγκεντρώσεις τανινών ως προς τα μη αρδευόμενα. Το 2006 όμως τα μη αρδευόμενα πρέμνα έδωσαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με τα άλλα.

Γενικά, φαίνεται ότι οι τανίνες των γιγάρτων αυξάνονται με το πότισμα. Σε παρόμοια συμπεράσματα οδηγήθηκαν και οι Roby G. et al. το 2004, οι οποίοι βρήκαν ότι η συγκέντρωση των τανινών των γιγάρτων αυξάνεται όταν αυξάνεται το μέγεθος της ράγας και η δόση ποτίσματος, κάτι το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Ακόμη, από την ίδια μελέτη βρέθηκε ότι η έλλειψη νερού δεν δείχνει να επηρεάζει τη συγκέντρωση των τανινών των γιγάρτων.

Οι τανίνες των γιγάρτων φτάνουν σε μια μέγιστη συγκέντρωση στη φάση της αλλαγής του χρώματος της ράγας και στη συνέχεια μειώνονται, αυτό έχει παρατηρηθεί εκτός από τη Cabernet sauvignon και σε άλλες ποικιλίες όπως η Shiraz στην Αυστραλία (Harbertson et al. 2002, , Kennedy et al. 2001, Downey M. 2003). Από παρόμοιες μελέτες (Kennedy et al. 2000) έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση των τανινών μπορεί να μειωθεί κατά 57 με 65 % μέσα σε έναν μήνα μετά την αλλαγή του χρώματος της ράγας. Έτσι η έλλειψη νερού που σημειώθηκε στη παρούσα μελέτη πιθανότατα ευνοεί την αφομοίωση των τανινών μετά την αλλαγή του χρώματος της ράγας κατά την ωρίμανση ή παρεμποδίζει τη συγκέντρωσή τους πριν τη φάση αυτή. Ακόμη, από άλλες μελέτες έχει βρεθεί ότι ο ρυθμός της ωρίμανσης και άρα ο ρυθμός μείωσης των τανινών εξαρτάται και από τις κλιματικές συνθήκες οι οποίες επηρεάζουν το ρυθμό αυτό (Kennedy et al. 2000).

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του υποκειμένου και του ποτίσματος στις φαινολικές ουσίες των γιγάρτων. Όταν οι συγκεντρώσεις τους εκφράζονται σε mg/100 γίγαρτα φαίνεται ότι για το SO₄ το 2005 όλες οι φαινολικές ουσίες

δέχονται θετική επίδραση από το πότισμα, μάλιστα στην προκυανιδίνη B1 τα κανονικά αρδευόμενα πρέμνα είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα γίγαρτά τους σε σχέση με τα υπόλοιπα. Το έτος 2006 τα αποτελέσματα για το συγκεκριμένο υποκείμενο ήταν τα ίδια, με τη διαφορά ότι η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος μειώθηκε όταν εφαρμόστηκε άρδευση στα πρέμνα. Τέλος, η προκυανιδίνη B1 παρουσίασε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις όταν στα πρέμνα εφαρμόστηκε άρδευση (κανονική ή ελλιπής).

Στο υποκείμενο 1103 Paulsen όπως και στο SO4 σε όλες τις ουσίες που μελετήθηκαν αυξήθηκε η συγκέντρωσή τους όταν εφαρμόστηκε πότισμα και όταν αυξήθηκε η δόση αυτού. Ακόμη, οι ουσίες κατεχίνη και προκυανιδίνες B1 και C1, και στα δύο έτη του πειράματος, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αρδευόμενων και μη πρέμνων.

Όταν τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg/g νωπού βάρους γιγάρτων η επίδραση που δέχονται οι ουσίες ήταν η ίδια. Μόνη διαφορά στη περίπτωση αυτή είναι το γαλλικό οξύ, το οποίο και στα δύο υποκείμενα και έτη δέχεται μειώνεται από το πότισμα. Επίσης, στο SO4 το 2005 η επιγαλλοκατεχίνη δε φαίνεται να επηρεάζεται καθόλου από το πότισμα.

Άλλοι ερευνητές οι οποίοι ασχολήθηκαν με τις φαινολικές ουσίες ανακάλυψαν ότι όταν τα πρέμνα τα οποία δέχονται ελαφρύ υδατικό στρες οι συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών μειώνονται (Salon J.L., 2005). Αντίθετα, οι Kennedy et al. το 2002 βρήκαν ότι η αυξημένη έλλειψη νερού προκαλεί μείωση των φλαβονολών των οίνων.

Από τη παρούσα μελέτη φαίνεται ότι η άρδευση, ανεξάρτητα από το υποκείμενο το οποίο χρησιμοποιείται, αυξάνει τη συγκέντρωση των φλαβονολών. Η άρδευση, πιθανότατα, ενεργοποιεί τους μηχανισμούς σύνθεσης των συγκεκριμένων ουσιών έτσι τα πρέμνα τα οποία ποτίζονται να έχουν σταθερά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα μη αρδευόμενα ακόμα και κατά τη περίοδο της ωρίμανσης οπότε και αρχίζουν να μειώνονται οι συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών. Βέβαια οι ουσίες Γαλλικό οξύ και Επιγαλλοκατεχίνη δεν παρουσιάζουν τόσο έντονες μεταβολές στις συγκεντρώσεις τους όπως οι άλλες ουσίες, αυτό πιθανά οφείλεται στη μειωμένη

εξάρτηση της συσσώρευσής τους με την άρδευση. Ακόμη, από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η κατεχίνη και η επικατεχίνη είναι οι κυρίαρχες ενώσεις μεταξύ των φαινολικών ουσιών των γιγάρτων, αυτό έχει διαπιστωθεί και από μελέτες των Jordao et al., 2001 και Jordao et al., 1998. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι από μελέτες που έγιναν βρέθηκε ότι η προκυανιδίνη B1 συνέχισε να αυξάνεται και κατά τη φάση της ωρίμανσης (Romeyer et al., 1986).

Οι διάφορες επεμβάσεις άρδευσης που χρησιμοποιήθηκαν προκάλεσαν τις ίδιες μεταβολές στις ουσίες που μελετήθηκαν και στα δύο υποκείμενα. Το 1103 Paulsen είχε γενικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε όλες τις ουσίες και για όλες τις επεμβάσεις, πιθανότατα εξαιτίας του ότι προσαρμόζεται καλύτερα στις εδαφικές συνθήκες του αμπελώνα όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα σε σχέση με το SO4.

Οι διαφορές οι οποίες παρατηρούνται μεταξύ των υποκειμένων πιθανότατα οφείλονται στα διαφορετικά χαρακτηριστικά τα οποία έχει το καθένα. Συγκεκριμένα, το SO4 το οποίο προσδίδει μέτρια ζωηρότητα στο πρέμνο και έχει πιο επιφανειακό ριζικό σύστημα από το 1103 Paulsen δείχνει να ευνοείται περισσότερο από την εφαρμογή άρδευσης. Αντίθετα, το 1103 Paulsen το οποίο αναπτύσσει βαθύτερες ρίζες δεν φαίνεται να επηρεάζεται τόσο έντονα. Ακόμη, το SO4 παρουσιάζει καλύτερη προσαρμοστικότητα σε εδάφη υγρά και συνεκτικά σε σχέση με το 1103 Paulsen.

Ο δείκτης Folin- Ciocalteu, ο οποίος παρουσιάζει τη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών σε mg γαλλικού οξέος, φαίνεται ότι παρουσιάζει τις ίδιες διακυμάνσεις που περιγράψαμε πιο πάνω. Συγκεκριμένα, για τα δύο υποκείμενα και τις δύο χρονιές του πειράματος, η τιμή του δείκτη Folin-Ciocalteu αυξάνεται με την αύξηση της δόσης του ποτίσματος. Σε κάποιες περιπτώσεις, όπως το έτος 2006 και στα δύο υποκείμενα, οι διαφορές μεταξύ των αρδευόμενων και μη πρέμνων ήταν στατιστικά σημαντικές. Παρόμοιες μεταβολές παρατηρούνται και στις άλλες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν. Αν στα παραπάνω προστεθεί το ότι με την άρδευση και την αύξηση της δόσης νερού που εφαρμόζεται αυξάνεται το βάρος των γιγάρτων, τότε μπορούμε να συμπεράνουμε ότι κατά τεκμήριο όταν επικρατούν στον αμπελώνα

συνθήκες οι οποίες ευνοούν την αύξηση του βάρους των γιγάρτων τότε αυτά θα είναι και πιο πλούσια σε φλαβανόλες και τανίνες.

Οι χημικές ενώσεις οι οποίες μελετήθηκαν είναι γνωστό ότι παίζουν σπουδαίο ρόλο στη γεύση, τη σταθερότητα και τη δυνατότητα παλαίωσης των οίνων. Βέβαια η μέθοδος και οι συνθήκες της οινοποίησης καθορίζουν τις ποσότητες των ουσιών αυτών οι οποίες θα εκχυλιστούν τελικά στο κρασί.

Είναι παρόλα αυτά πολύ σπουδαίο να γνωρίζουμε τη πορεία την οποία ακολουθούν οι συγκεντρώσεις τους κατά την ωρίμανση των σταφυλών και τους παράγοντες από τους οποίους επηρεάζονται και πως. Έτσι επιπλέον έρευνα είναι απαραίτητη για να αποσαφηνιστούν πλήρως οι μηχανισμοί αυτοί.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Καράταγλης Σ. Φυσιολογία Φυτών Γ' Έκδοση. 1994. Εκδόσεις Art of Text.
- Κούσουλας Κ. Ι. Αμπελουργία. 1995.
- Νταβίδης Ο. Ξ. Ελληνική Αμπελολογία τόμος Γ'. Στοιχεία Αμπελογραφίας. 1982.
- Σουφλερός Η. Ε. Οινολογία. Επιστήμη και Τεχνογνωσία. Τόμος 1. 1997.
- Σταυρακάκης Μ.Ν. Αμπελογραφία – Ποικιλίες και Υποκείμενα του Ελληνικού Αμπελώνα. Αθήνα (υπό έκδοση) 2009.
- Amrani – Joutei, K., Glories, Y. and Mercier, M. Localization of tannins in grape berry skins. *Vitis* 33, 135, 1994.
- Bate - Smith, E. C. Astringency in Foods – Haermananalysis of tannins. *Food*, 23, 124.
- Bouchis, M., Dumon, M. C., Glories, Y. and Vercauteren, J. Polyphenols Communications p 43. 1996.
- Chatonnet, P. These de Dctorat Oenologie – Ampelologie, Universite' de Bordeaux II. 1995.
- Cheynier, V., Rigaud, J., et al. Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 40:36-42, 1989.
- Coombe, B. G., 1960. Relationships of growth and developmental changes in sugar, auxins and gibberellins in fruit of seeded and seedless varieties of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology* 35 240-250.
- Czochanska, Z., Foo, L. Y., Porter, L.J., 1979. Composition changes in lower molecular weight flavans during grape maceration. *Phytochemistry* 18 (11), 1819-1822.
- Foo, L.Y., Porter, L.J. The structure of tannins of some fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32, 711-716. 1981.

- Dame, G. These de Doctorate es Sciences, University of Bordeaux I, 1991.
- Downey, O. M., Harvey, S. J., Robinson, P. S. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9, 15-27, 2003.
- Flanzy, M. and Poux, C. *Ann. Tech. Agriculture*, 1958.
- Freitas, V.A.P., Glories, Y., Monique, A. Developmental Changes of Procyanidins in Grapes of Red *Vitis vinifera* Varieties and Their Composition in Respective Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 51, No 4, 2000.
- Galvin, C. These de Doctorat Oenologie – Ampelologie, Universite de Bordeaux II. 1993.
- Glories, Y. La couleur des vins rouges. Les equilibres des anthocyanes et des tanins. *Conn. Vigne Vin* 18:195-217, 1984.
- Guillon T.M. Étude générale de la vigne: historique, les vignobles et les crus, anatomie et physiologie, sol et climat., 1905.
- Guilloux, M. These de trois eme Cycle, University of Bordeaux, 37, 1981.
- Hagerman A. E. and Butler, L. G. Determination of Protein in Tannin – Protein Precipitates. *J. Agriculture and Food Chemistry*, vol. 28, 944, 1980.
- Harbertson, F. J., Kennedy, A. J., Adams, O. D. Tannin in Skins and Seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir Berries during Ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:1 (2002).
- Harbertson, J. F., A. King, D. E. Block, and D. O. Adams. Factors that influence tannin extraction and formation of polymeric pigments during winemaking, *Am. J. Enol. Vitic.* 53:245A. 2002.
- Harbertson, J. F., Picciotto, E. A., Adams, D. O. Measuring polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching *Am. J. Enol. Vitic.* 54:301-306, 2003.
- Haslam, E. In vivo veritas: Oligomeric procyanidins and the aging of red wines. *Phytochemistry* 19:2577-2582, 1980.
- Hillel D. *Introduction to Soil Physics*, 1982. Academic Press.

- Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B. F., Meunier, P. Trollat, P. Effect of Enological practices on the Resveratrol Isomer Content of Wine. J. Agricultural Food Chemistry vol. 43 (2) pp. 316-319, 1995.
- Kennedy, J. A, Matthews, A., Waterhouse, L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. Phytochemistry 55, 77±85 (2000).
- Kennedy, A. J., Troup, J. G., Pilbrow, R. J., Hutton, R. D., Hewitt, D., Ristic, R., Hunter, R. C., Iland, G. P., Jones, P. G. Development of seed polyphenols in Berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. Australian Journal of Grape and Wine Research 6, 244-254, 2000.
- Kinsella, J. E., Fankel, E., German, B., Kanner, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. Food Technol. 47:85-89, 1993.
- Laborde, J. Etude sur les matieres tannoides du vin. Rev. Viticulture, 206, 1910.
- Lagune L. These de Doctorat Oenologie – Ampelologie, Universite de Bordeaux II. 1994.
- Langcake, C. Physiol. Plant Pathol., 18, 213, 1981.
- Lea, A.G.H. Flavour, colour and stability in fruit products: The effect of polyphenols. In: Plant Polyphenols. R.W. Hemingway and P.E. Laks 827pp. Pleniun Press, New York, 1992.
- Matthews, M. A., Anderson, M. M., Schultz, H. R. Phenologic and growth responses to early and late season water deficits in Cabernet Franc. Vitis 26:147-160, 1987.
- Matthews, M. A., Anderson, M.M. Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: Responses to seasonal water deficits. Am. J. Enol. Vitic. 39:313-320, 1988.
- Mateus, N., Marques S., Goncaives, C. A., Machado, M. J., De Freitas, V. Proanthocyanidin Composition of Red *Vitis vinifera* Varieties from the Douro Valley during Ripening : Influence of Cultivation Altitude. Am. J. Enol. Vitic. 52:2, 2001.
- Mooney H. A., Winner E. W., Pell J. E. Response of Plants to Multiple Stresses.
- Mullins G.M., Bouguet Al. and Williams E.L. Biology of grapevine. Cambridge University Press, USA (1990).

- Pratt C. Reproductive anatomy in cultivated grapes. A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **22**: 92-109. 1971.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., and Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds (*Vitis vinifera*). *Phytochemistry* 36:781-784, 1994.
- Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. Handbook of Enology, volume 2 "The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments". 2000.
- Romeyer, F. M., Macheix, J. J., Sapis, J.C. Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry* 25, 219-221, 1986.
- Salon, J. L., Chrivella, C., Castel, J. R. Response of cv. Bobal to timing of deficit irrigation in Requena, Spain: Water relations, yield, and wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture USA*, 2005, 56 (1) 1-8, 2005.
- Siebert, K. J., Carresco, A. and Lynn, P. Y. Formation of Protein – Polyphenol Haze in Beverages. *J. Agriculture Food Chemistry*, vol. 44 pp. 1997-2005, 1996.
- Spranger M. I. M. Les Acquisitions Recentes en Chromatographie du Vin. Applications a L'analyse sensorielle des Vins, 1992. Lavoisier TEC & DOC.
- Staudt, G. Schneider, W., Leidel, J. Phases of berry growth in *Vitis vinifera*. *Annals of Botany* 58, 789-800, 1986.
- Sun, B. S., Pinto, T., Leandro, M. C., Ricardo-Da-Silva, J.M., Spranger, M.I. Transfer of Catechins and Proanthocyanidins from Solid Parts of the Grape Cluster Into Wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 50, No. 2, 1999.
- Usseglio-Tomasset, L. Chimie Oenologique 2nd edition, Lavoisier TEC & DOC.
- Vivas, N. and Glories Y. Role of Oak Wood Ellagitannins in the Oxidation Process of Red Wines. *Am. J. Enology Viticulture*, 47, 103, 1996.
- Voyatzis, I. These de Doctorat Œnologie – Ampelologie, Universite' de Bordeaux II. 1984.
- Waterhouse L. A., Ebeler E. S. Chemistry of Wine Flavor. 1999.
- Waters, W. A. Mechanisms of Oxidation of Organic Compounds, Vol. 6, John Wiley and Sons Inc., New York, pp 28-138, 1964.
- Winkler A. J., Cook J. A., Kliewer W. M., Lider L. A. General Viticulture, 1997. University of California Press.

- Yokotsuka, K., Singleton, V. L. Effects of Seed Tannins on Enzymatic Decolorization of Wine Pigments in the Presence of Oxidizable Phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 52:2, 2001.