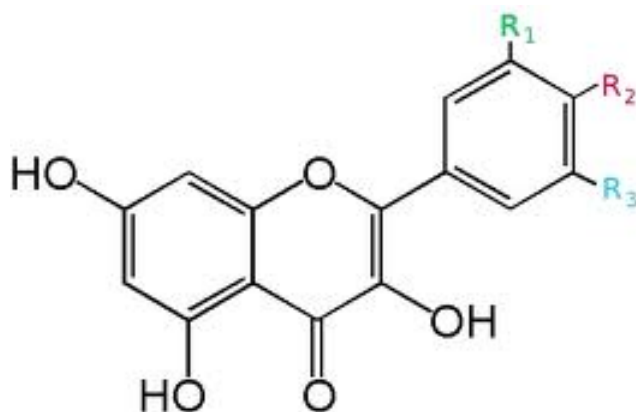




ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων - Τμήμα
Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Δ.Π.Μ.Σ. «Αμπελουργία – Οινολογία»



“Μελέτη της επίδρασης της λίπανσης καλίου στα φαινολικά
συστατικά των ραγών της ποικιλίας Αγιοργίτικο”

Μεταπτυχιακή διατριβή

Αικατερίνη Γ. Κομματά

Αθήνα 2013

Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Γ. Κοτσερίδης

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων - Τμήμα
Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής**

Εργαστήριο Οινολογίας

Δ.Π.Μ.Σ. «Αμπελουργία – Οινολογία»

**“Μελέτη της επίδρασης της λίπανσης καλίου στα φαινολικά
συστατικά των ραγών της ποικιλίας Αγιοργίτικο”**

Μεταπτυχιακή διατριβή

Αικατερίνη Γ. Κομματά

Αθήνα 2013

Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Γ. Κοτσερίδης

Μεταπτυχιακή διατριβή

**“Μελέτη της επίδρασης της λίπανσης καλίου στα φαινολικά
συστατικά των ραγών της ποικιλίας Αγιοργίτικο”**

Αικατερίνη Γ. Κομματά

Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Γ. Κοτσερίδης

Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής:

ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής Οινολογίας, Τμήματος
Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Οινολογίας, Τμήματος
Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΜΠΙΝΙΑΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ, Επίκουρη Καθηγήτρια Αμπελουργίας, Τμήματος
Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση της λίπανσης καλίου στα φαινολικά συστατικά της ποικιλίας *Vitis vinifera* Αγιωργίτικο. Η περιοχή μελέτης βρίσκεται στην περιοχή «Ασπρόκαμπος» της Νεμέας.

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε ράγες που προήλθαν από τον τρύγο της χρονίας 2011, καθώς και σε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων των ραγών. Οι επεμβάσεις της λίπανσης ανέρχονται σε έξι (διαφοροποιούμενες τόσο ως προς το είδος της λίπανσης αλλά και ως προς την ποσότητα) και μαζί με τον μάρτυρα οδηγούν σε 7 συνολικά επεμβάσεις: Α (μάρτυρας), Β (χλωριούχο κάλιο σε μικρή συγκέντρωση), Γ (χλωριούχο κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση), Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση), Ε (θειικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση), Ζ (λίπανση καλίου με υψηλή περιεκτικότητα Mg), Η (λίπανση με πολύ υψηλό ποσοστό καλίου και Mg). Για την εξασφάλιση της ακρίβειας των μετρήσεων εφαρμόστηκε τριπλή επανάληψη.

Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις προσδιορισμού του φαινολικού δυναμικού των ραγών, προσδιορισμού της συγκέντρωσης των ανθοκυανών και της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους, καθώς και εκτίμηση του Δείκτη Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού. Επίσης εφαρμόστηκε ανάλυση HPLC για τον προσδιορισμό των επιμέρους ανθοκυανών σε φλοιούς των ραγών και σε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης ανέδειξαν συγκεκριμένες επεμβάσεις οι οποίες υπερέχουν σε ένα σύνολο χαρακτηριστικών, όπως συγκέντρωση σε ανθοκυάνες, φαινολικό δυναμικό, αντιοξειδωτική ικανότητα, βαθμός πολυμερισμού, τα οποία είναι καθοριστικής σημασίας για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των και την ποιότητα των παραγόμενων οίνων. Συγκεκριμένα οι επεμβάσεις Ε, Ζ και ο μάρτυρας (Α), φαίνεται να υπερέχουν συγκριτικά με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Συγκεκριμένα η επέμβαση Ε φαίνεται να υπερέχει στην εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών, το μέγεθος της ράγας, ενώ οδηγεί σε ωριμότερες ράγες με υψηλή συγκέντρωση ταννινών γιγάρτων. Η επέμβαση Ζ φαίνεται να υπερέχει στο σύνολο των φαινολικών ανά g ράγας, τον αριθμό των γιγάρτων και τις ταννίνες του φλοιού. Τέλος φαίνεται ότι η λίπανση με κάλιο δεν επηρεάζει την περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες των ραγών, αλλά και το σύνολο των φαινολικών ανά ράγα, καθώς ο μάρτυρας (Α), παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές σε αυτά τα χαρακτηριστικά.

Βιοτεχνολογία τροφίμων – Οινολογία

Λέξεις - κλειδιά: ανθοκυάνες, φαινολικά συστατικά, ράγες, φλοιοί, γίγαρτα, κάλιο

Abstract

“Effect of potassium fertilization on the phenolic composition of Agiorgitiko wine grapes”

In the current study it was investigated the possible effect of potassium fertilization to the phenolic composition of *Vitis vinifera* var. “Agiorgitiko”. The experimental vineyard is located in the region of “Asprokampos” in Nemea.

Seven different fertilization treatments were applied, differing to the level of fertilization and the type of the fertilizer: A (control), B (46 g KCL / vine), Γ (92 g KCL / vine), Δ (38 g K₂SO₄ /vine), E (76 g K₂SO₄/vine), Z (76 g K: 76 g Mg /vine), H (152 g K: 152 g Mg /vine). The different fertilization treatments were applied in triplicate.

Anthocyanin extractability and seed maturity were determined in grapes of the 2011 vintage. In addition, various analytical methods (color parameters, anthocyanin and phenolic content, antioxidant activity, mean polymerization degree index, tannin concentration) were applied to skin and seed extracts. Individual anthocyanins and oligomeric phenolic compounds were determined by HPLC.

The results of this study varied among the applications in terms of phenolic composition, antiradical activity and mean degree of polymerization which are crucial factors for the organoleptic characteristics and the overall quality of the producing wines. Nevertheless the applications that showed the greatest positive effect on the specific characteristics were the E, Z and A. The E application showed the greatest effect on anthocyanin extractability, berry size, grape maturity and seed tannin content whereas the Z application differed in skin tannin content, seed number/ berry and phenolic composition / g berry. Finally it seems that K fertilization doesn't affect total anthocyanin content and total phenolic content per berry.

Food biotechnology - Enology

Key – words: phenolic content, anthocyanins, grape, skin, seed, potassium

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών με τίτλο «Αμπελουργία - Οινολογία» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Για την ανάθεση του θέματος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γ. Κοτσερίδη, επιβλέποντα της εργασίας αυτής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Σ. Καλλίθρακα για την καθοδήγηση κατά την εφαρμογή μεθόδων στο εργαστήριο Οινολογίας και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Α. Μπινιάρη για τις συμβουλές στην δειγματοληψία του πειραματικού αμπελώνα.

Επίσης όλους τους καθηγητές που συμμετείχαν στο πρόγραμμα, για την αδιάκοπη προσπάθεια μετάδοσης της γνώσης, που είναι τόσο σημαντική για την ολοκλήρωση της επιστημονικής σκέψης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα του εργαστηρίου Οινολογίας του τμήματος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων και ιδιαίτερα την κα. Μ. Κυραλέου υποψήφια διδάκτωρ του τμήματος Οινολογίας και κα. Ν. Προξενιά μέλος Ε.Ε.ΔΙ.Π. για την ουσιαστική βοήθεια στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής, καθώς και όλους τους συμφοιτητές μου για τη συνεργασία μας.

Τέλος η εργασία αυτή αφιερώνεται στα αγαπημένα μου πρόσωπα, για την συνεχή υποστήριξη, βοήθεια και κατανόησή τους καθόλη τη διάρκεια του προγράμματος.

Κομματά Κατερίνα

Αθήνα 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
ΜΕΡΟΣ Ι: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΤΑ ΜΕΡΗ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ & ΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ.....	6
i) Τα μέρη της ράγας και οι φάσεις ανάπτυξης.....	6
ii) Τα φαινολικά συστατικά στη ράγα: η σύνθεση και η σημασία τους.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ: ΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ & Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ.....	15
i) Τα φαινολικά οξέα και τα παράγωγά τους.....	16
ii) Τα φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ: ΤΟ ΚΑΛΙΟ & Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ.....	28
i) Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα & σύνθεση των ραγών & παραγόμενων οίνων....	28
ii) Η σημασία του καλίου.....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙV: ΤΟ ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ & Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	39
i) Η ποικιλία Αγιωργίτικο.....	39
ii) Η περιοχή μελέτης.....	40
ΜΕΡΟΣ ΙΙ: ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ: ΟΙ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	43
i) Αναλύσεις σε ράγες.....	43
ii) Αναλύσεις σε φλοιούς ραγών – προσδιορισμός των ανθοκυανών με HPLC.....	49
iii) Αναλύσεις σε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων.....	50
iv) Προσδιορισμός των φαινολικών (μονομερών και ολιγομερών φλαβαν – 3 – ολών και φλαβονολών) σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων με ανάλυση HPLC.....	55
v) Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
i) Αναλύσεις σε ράγες.....	59
ii) Αναλύσεις σε φλοιούς.....	71
iii) Αναλύσεις σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων.....	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙV: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97

Μέρος Ι: Εισαγωγή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι: Τα μέρη της ράγας & τα συστατικά της

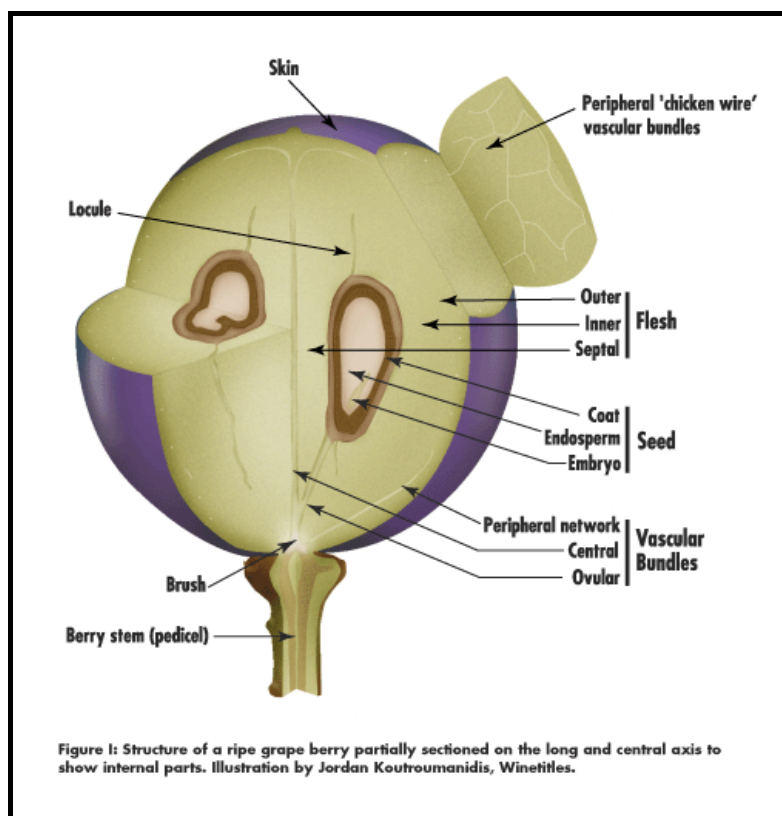
ι) Τα μέρη της ράγας και οι φάσεις ανάπτυξης

Η ράγα αποτελείται από τον φλοιό, τη σάρκα και τα γίγαρτα. Τα διάφορα συστατικά που εμπεριέχονται στη ράγα μεταβάλλονται ποσοτικά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης:

- Η σάρκα αποτελεί το 78% του συνολικού βάρους της ράγας και αποτελείται από σάκχαρα (κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη), οργανικά οξέα (αρχικά τρυγικό και μηλικό), κατιόντα μετάλλων (ιδιαίτερα κάλιο), αζωτούχα συστατικά (διαλυτές πρωτεΐνες, αμμωνία και αμινοξέα), πηκτινικές ουσίες (δομικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων από πολυμερή των πολυγαλακτουρονικών οξέων) και μη φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά (παράγωγα του βενζοϊκού και κινναμωνικού οξέος). Τα φαινολικά συστατικά της σάρκας αποτελούν το 10% του συνόλου των φαινολικών συστατικών των ραγών (Watson, B., 2003).
- Ο φλοιός αποτελεί το 15% του συνολικού βάρους της ράγας και αποτελεί την κύρια πηγή αρωματικών ουσιών και πρόδρομων της γεύσης συστατικών. Στον φλοιό εμπεριέχονται φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά (ανθοκυάνες, φλοβονόλες και ταννίνες). Τα φαινολικά συστατικά του φλοιού αποτελούν το 30% του συνόλου των φαινολικών συστατικών των ραγών (Watson B. , 2003).
- Τα γίγαρτα που αποτελούν το 4% του βάρους της ράγας, εμπεριέχουν μη φλαβονοειδή καθώς και φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά και σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση ευρίσκονται οι ταννίνες. Αποτελούν το 60% του συνόλου των φαινολικών συστατικών των ραγών (Watson B. , 2003) και συμπεριλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες ταννινών, αζωτούχων συστατικών και στερεών.

Οι δύο μεγάλες κατηγορίες των φλαβονοειδών, οι φλαφαν – 3 – όλες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες) και οι ανθοκυάνες, αποτελούν τα φυσικά αντιοξειδωτικά που

βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις ερυθρές ποικιλίες και τους οίνους (Boonterm, V., 2010). Στη ράγα οι ανθοκύανες εντοπίζονται στον φλοιό, όπως και άλλες κατηγορίες φαινολικών η ρεσβερατρόλη και οι φλαβονόλες, ενώ οι φλαβαν – 3 – όλες εντοπίζονται τόσο στον φλοιό όσο και στα γίγαρτα (Boonterm, V., 2010). Κατά την οινοποίηση τα φλαβονοειδή που εκχυλίζονται εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία *Vitis vinifera* (Mattivi *et al.*, 2002).



Εικόνα 1: Τα μέρη της ράγας

Πηγή: James A. Kennedy. (2008). *Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. Cien. Inv. Agr.* 35(2): 107-120.

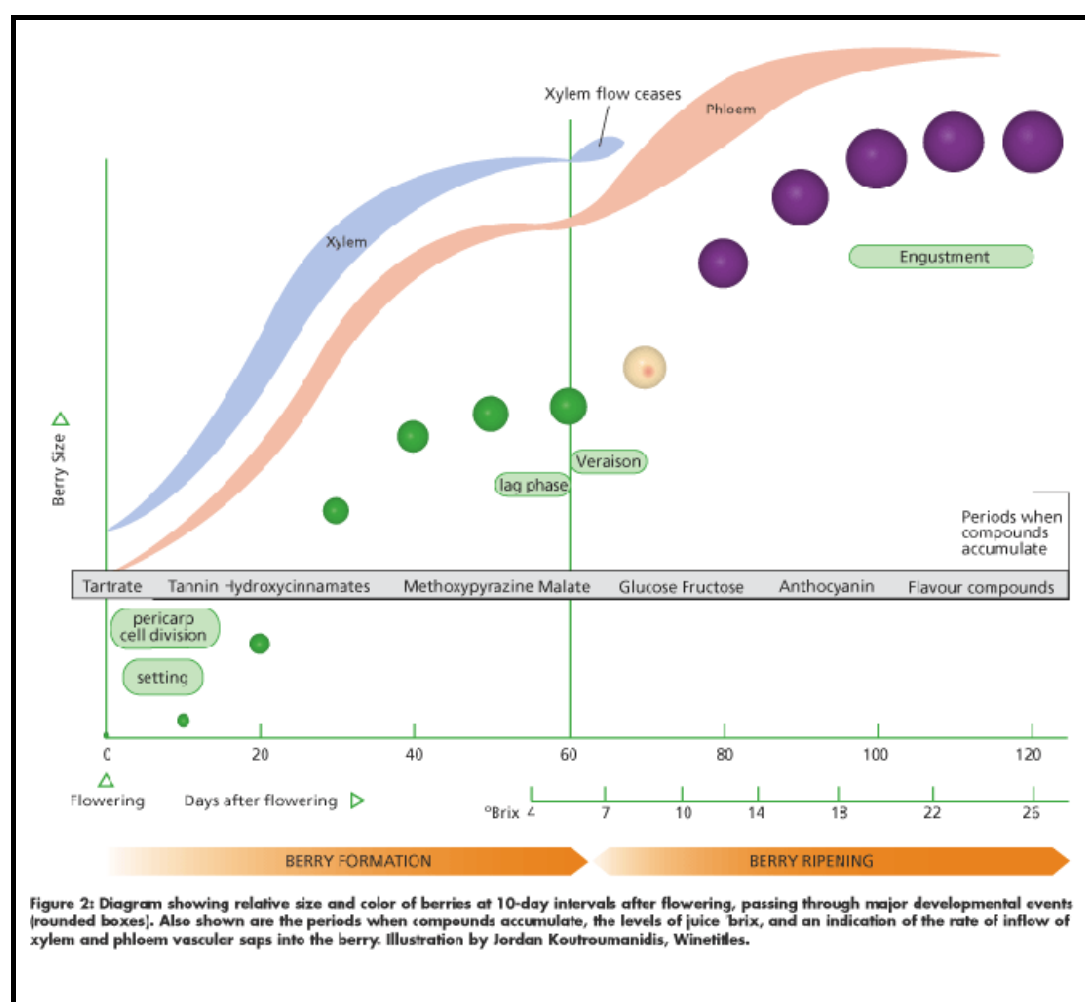
Το σταφύλι αποτελεί την πρώτη ύλη από την οποία παράγεται ο οίνος. Ο βαθμός ωρίμανσης αποτελεί τον πρώτο και καθοριστικό παράγοντα της ποιότητας του παραγόμενου οίνου. Η ωρίμανση είναι το αποτέλεσμα μιας σύνθετης διαδικασίας, στην οποία λαμβάνουν χώρα πολύπλοκα φυσικά και βιοχημικά φαινόμενα, των οποίων η εξέλιξη καθορίζεται από πλήθος παραγόντων όπως το μικροκλίμα, η ποικιλία και το έδαφος (Peynaud and Ribereau-Gayon, 1971, Ribereau-Gayon *et al.*, 1975, Champagnol, 1984 Huglin, 1986, Kanellis and Roubelakis-Angelakis, 1993, Flanzy, 2000, -Angelakis, 2001).

Η αύξηση της ράγας είναι το εμφανές αποτέλεσμα ενός μεγάλου και πολύπλοκου αναπαραγωγικού κύκλου. Η ανάπτυξη της ωοθήκης και στην συνέχεια των γιγάρτων, διεγείρεται από τις ορμόνες οι οποίες συντίθενται κυρίως στα φύλλα. Η έναρξη της περιόδου ωρίμανσης πραγματοποιείται με την πτώση του επιπέδου των αυξητικών ορμονών και την εμφάνιση μιας άλλης ορμόνης, του αμψισικού οξέος. Φαίνεται ότι μεταξύ των παραγόντων που ελέγχουν την ωρίμανση των ραγών βασικό ρόλο διαδραματίζουν οι φωτορρυθμιστικές ουσίες. Οι συγκεντρώσεις των αυξινών και γιββεριλίνων είναι μεγάλες κατά την περίοδο της έντονης κυτταροδιαίρεσης και μειώνονται κατά την περίοδο επίσχεσης της αύξησης της ράγας, ενώ αυξάνονται εκ νέου κατά την περίοδο της ωρίμανσης. Οι γιββεριλίνες θεωρούνται οι πιο σημαντικές ορμόνες στον έλεγχο της διόγκωσης των κυττάρων και η συγκέντρωσή τους συνδέεται άμεσα με τον αριθμό των γιγάρτων. Το αμψισικό οξύ ως παρεμποδιστής της αύξησης βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα αρχικά και αυξάνεται στην συνέχεια κατά την περίοδο της ωρίμανσης, στη φάση της συσσώρευσης των σακχάρων. Οι αυξίνες και το αμψισικό οξύ φαίνεται πως επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην διαδικασία της ωρίμανσης.

Κατά την ανάπτυξή της η ράγα ακολουθεί μια εξέλιξη η οποία διακρίνεται σε τρεις φάσεις, ανάλογα με την διάμετρο της, το βάρος και τον όγκο:

1. Αρχικά λαμβάνει χώρα η φάση της ταχείας ανάπτυξης η οποία διαρκεί από 45 έως 65 ημέρες, ανάλογα με την ποικιλία και τις κλιματολογικές συνθήκες. Οι αυξητικές ορμόνες (κυτοκινίνες και γιββεριλίνες) επιδρούν άμεσα στον αριθμό των γιγάρτων. Η κυτταρική αύξηση ξεκινά 2 εβδομάδες μετά την γονιμοποίηση και συνεχίζεται μέχρι το τέλος της πρώτης φάσης. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής η χλωροφύλλη είναι η επικρατούσα χρωστική. Στις ράγες εκδηλώνεται έντονη μεταβολική δραστηριότητα, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη αναπνευστική δραστηριότητα και συσσώρευση οξέων.
2. Η δεύτερη φάση της ανάπτυξης ονομάζεται περκασμός. Ο περκασμός σηματοδοτείται από την εμφάνιση του χρώματος στη ράγα (στις ερυθρές ποικιλίες) και τον διάφανο φλοιό στις λευκές ποικιλίες. Είναι ένα έντονο φαινόμενο που μπορεί να διαρκέσει από 8 έως 15 μέρες ή και περισσότερο ανάλογα με το αν η άνθηση είναι αργή. Κατά τη διάρκειά της είναι χαρακτηριστική η εξάντληση των ουσιών που συντίθενται κατά την ωρίμανση και η αύξηση της συγκέντρωσης του αμψισικού οξέος.

3. Η επόμενη φάση αντιστοιχεί στην ωρίμανση. Η κυτταρική αύξηση συνεχίζεται και συνοδεύεται από ποικίλες φυσιολογικές μεταβολές. Η αναπνευστική ένταση μειώνεται, ενώ συγκεκριμένες ενζυματικές δράσεις αυξάνονται με ταχύ ρυθμό. Η περίοδος αυτή διαρκεί από 35 έως 55 ημέρες κατά τη διάρκεια των οποίων συντίθενται τα σάκχαρα, συσσωρεύονται κατιόντα όπως το κάλιο, συντίθενται αμινοξέα και φαινολικά συστατικά, ενώ η συγκέντρωση του μηλικού οξέος μειώνεται. Το μέγεθος της ράγας εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό κατά τις διαδικασίες αυτές. Επίσης υπάρχει σημαντικός συσχετισμός ανάμεσα στις διαστάσεις μιας ώριμης ράγας και του αριθμού των γιγάρτων που περιέχει.



Εικόνα 2: Οι φάσεις ανάπτυξης της ράγας

Πηγή: Coombe, B.G., McCarthy, M.G. (2000) "Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening,"

ii) Τα φαινολικά συστατικά στη ράγα: η σύνθεση και η σημασία τους

Στις ερυθρές ποικιλίες τα φλαβονοειδή αποτελούν την τρίτη πιο σημαντική ομάδα οργανικών συστατικών. Τα συστατικά αυτά ευθύνονται κυρίως για τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Οι λευκές ποικιλίες περιέχουν φαινολικά σε μικρότερες συγκέντρωσεις και σύμφωνα με την βιβλιογραφία δεν μπορούν να συνθέσουν ανθοκυάνες. Τα φαινολικά συστατικά εντοπίζονται στον φλοιό των ραγών και υπάρχουν στα γίγαρτα επίσης. Κατά την εκχύλιση τα φαινολικά που εκχυλίζονται πρώτα προέρχονται από τους φλοιούς, καθώς τα φαινολικά των γιγάρτων εκχυλίζονται πιο αργά. Οι υδροξυκινναμωμικοί εστέρες του τρυγικού οξέος αποτελούν την πρωταρχική μορφή φαινολικών συστατικών της σάρκας.

Τα χρωμοφόρα μόρια στις περισσότερες ερυθρές ποικιλίες βρίσκονται στην επιδερμίδα και τα ανώτερα στρώματα του υποδόριου των φλοιών (Walker *et al.*, 2006). Στις λευκές ποικιλίες το χρώμα οφείλεται στα καροτενοειδή, τις ξανθοφύλλες και τις φλαβονόλες όπως η κερσετίνη. Τα καροτενοειδή συντίθενται στα πλαστίδια και τα φλαβονοειδή βρίσκονται στα χυμοτόπια των κυττάρων. Τα συστατικά αυτά βρίσκονται και στις ερυθρές ποικιλίες αλλά το πρόδρομο χρώμα της ράγας οφείλεται στην σύνθεση των ανθοκυανών.

Η δραστηριοποίηση της σύνθεσης των ανθοκυανών ελέγχεται από συγκεκριμένα γονίδια (*VnMYBA1* και *VnMYBA2*) ενώ στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των ανθοκυανών έχει προσδιορισθεί η έκφραση 7 ενζύμων (Boonterm V., 2010): της αμμωνιακής λυάσης της φαινυλανίνης (PAL), της συνθάσης της χαλκόνης (CHS), της ισομεράσης της χαλκόνης (CHI), της φλαβαν – 3 – υδροξυλάσης (F3H), της 4 – ρεδουκτάσης της διυδροξυφλαβονόλης (DFR), της διοξυγενάσης της λευκοανθοκυανιδίνης (LDOX), και της τρανσφεράσης της 3 -0- γλυκόζης (UFGT). Στις ράγες η έκφραση όλων των ενζύμων εκτός του UFGT, λαμβάνει χώρα 4 εβδομάδες μετά την άνθηση. Στη σάρκα των ραγών ωστόσο δεν έχει διαπιστωθεί η έκφραση των γονιδίων που οδηγούν στη σύνθεση των ενζύμων PAL και UFGT. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στην υπόθεση πως η σύνθεση των ανθοκυανών στη ράγα, λαμβάνει χώρα με την έντονη έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που οδηγούν στη σύνθεση ενζύμων τα οποία συμμετέχουν στο βιοσυνθετικό τους μονοπάτι, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα πως εμπλέκονται στο φαινόμενο της σύνθεσης των ανθοκυανών ρυθμιστικά γονίδια (Boonterm V., 2010). Από τα γονίδια που σχετίζονται με τη σύνθεση των ανθοκυανών το *Ufgt* είναι σημαντικό καθώς ελέγχει την γλυκοζυλίωση των ανθοκυανών. Τα υπόλοιπα έξι

γονίδια που αφορούν τα ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση των ανθοκυανών εκφράζονται σε όλους τους ιστούς, ενώ το γονίδιο *Ufgt* εκφράζεται στα κύτταρα του φλοιού. Το μεταβολικό μονοπάτι της σύνθεσης των ανθοκυανών παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.

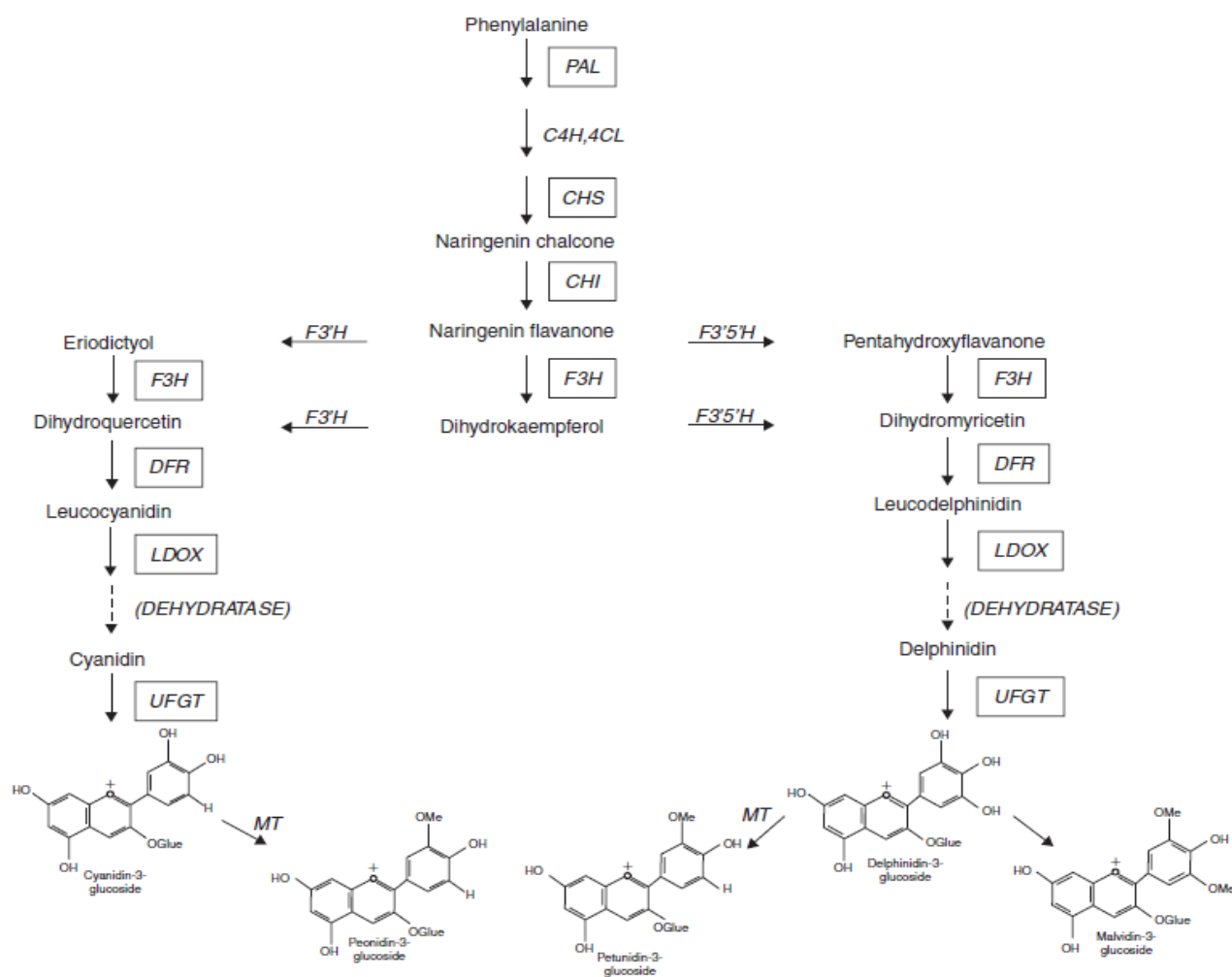


Figure 3.36 Simplified schematic representation of the anthocyanin biosynthetic pathway in grapes: PAL, phenylalanine ammonia lyase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone-3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3'5'-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase; UFGT, UDP glucose-flavonoid 3-O-glucosyl transferase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate CoA ligase; MT, methyltransferase. (From Boss *et al.*, 1996b, reproduced by permission)

Εικόνα 3: Το μεταβολικό μονοπάτι της σύνθεσης των ανθοκυανών

Πηγή: Jackson, R.S. (2008). *Wine Science: Principles and Applications*, 3rd edition. Elsevier

Οι ανθοκυανίνες μεταφέρονται και αποθηκεύονται στα χυμοτόπια των κυττάρων μετά τη σύνθεσή τους, όπου και υφίστανται γλυκοζυλίωση. Οι ανθοκυανίνες που βρίσκονται στο ανώτερο στρώμα της υποερμίδας φθάνουν σε σημείο κορεσμού, ενώ λαμβάνουν χώρα φαινόμενα συγχρωματισμού και δημιουργίας συμπλόκων μεταξύ τους. Η μείωση της συγκέντρωσης των ανθοκυανών σε κάποιες ποικιλίες κοντά ή μετά την

ωρίμανση, πιθανών οφείλεται στη δράση της β- γλυκοζιδάσης και υπεροξειδάσης. Αυτό συμβαίνει και στα χυμοτόπια των κυττάρων (Calderón *et al.*, 1992).

Οι ερυθρές ποικιλίες εκτός των ανθοκυανών και ταννινών συμπεριλαμβάνουν φλαβονόλες, παράγωγα των βενζοϊκών και κινναμωμικών οξέων, αλδεύδες και εστέρες του τρυγικού οξέος με τα υδροξυ κινναμωμικά οξέα. Υπάρχουν σε μικρό ποσοστό στον φλοιό των ραγών και σε πολύ μικρότερο στη σάρκα. Η πρόδρομη μορφή των φλαβονών στα σταφύλια *Vitis vinifera* είναι η καμπερόλη. Τα περισσότερα φλαβονοειδή συνδέονται μέσω γλυκοζυτικών δεσμών με τη γλυκόζη, τη ραμνόζη ή το γλυκουρονικό οξύ. Οι πρόδρομες μορφές των εστέρων των υδροξυκινναμωμικών οξέων είναι το καφεϊκό και σε μικρότερο ποσοστό το κουμαρικό και φερουλικό με το τρυγικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών αυτών διαφοροποιούνται ανάλογα με τη χρονιά και την ποικιλία.

Τα φαινολικά συστατικά προέρχονται από μια απλή μονάδα με βενζοϊκό δακτύλιο και σχηματίζονται από την 4-φωσφορική ερυθρόζη (ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών) μετά την ένωση με την φωσφοενολική μορφή του πυρουβικού οξέος. Το μεταβολικό μονοπάτι, γνωστό και ως μονοπάτι του σικιμικού οξέος, οδηγεί στην παραγωγή του βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος, αλλά και στην δημιουργία αρωματικών αμινοξέων (PHE, TYR). Η ενοποίηση τριών ακέτυλο συνενζύμων A, που προέρχονται από τον κύκλο του Krebs, οδηγούν επίσης στον σχηματισμό του βενζοϊκού δακτυλίου. Η προσθήκη του δεύτερου δακτυλίου με το κινναμωμικό οξύ οδηγεί σε μια ομάδα ενώσεων γνωστή ως φλαβονοειδή.

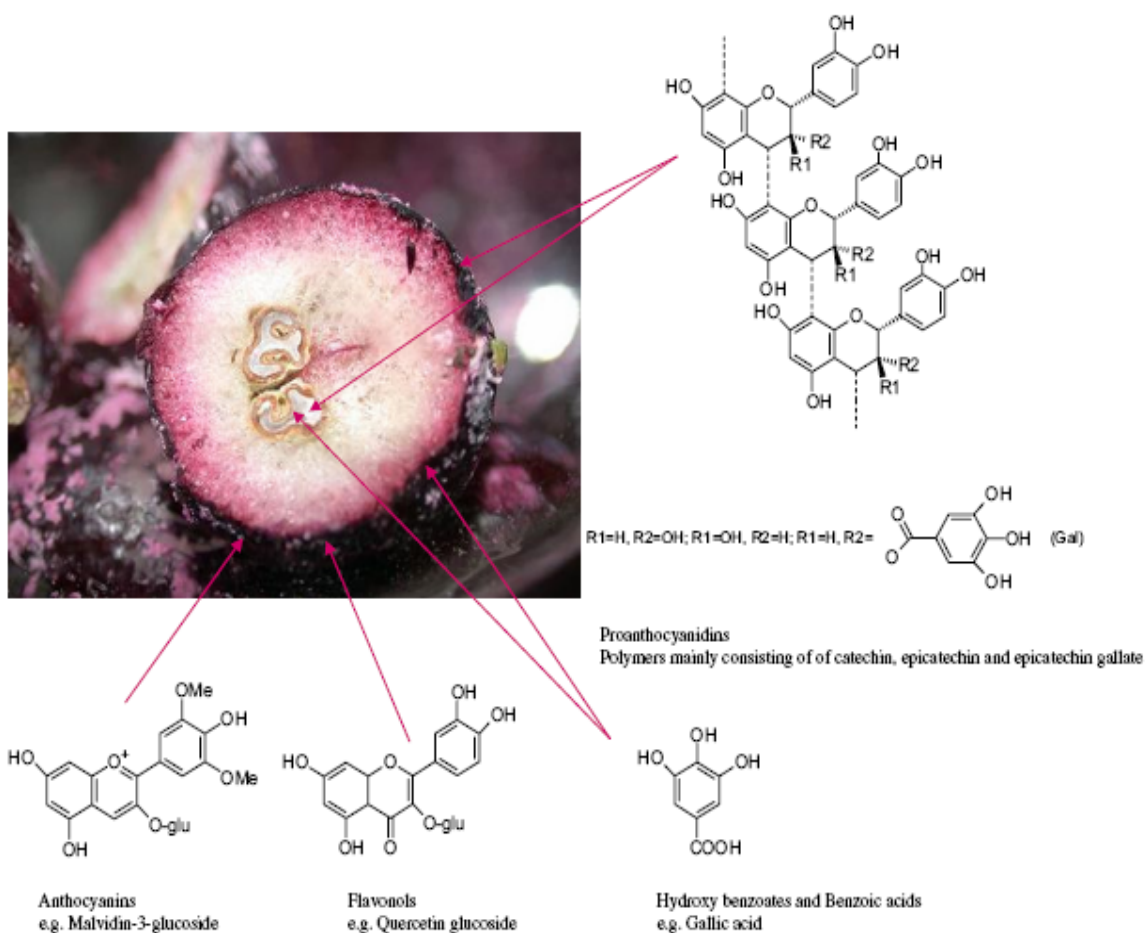
Τα μεταβολικά μονοπάτια, τα οποία είναι ενεργά από την έναρξη της αύξησης της ράγας, έχουν ως αποτέλεσμα η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών να αυξάνει καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου αύξησης. Οι ανθοκυάνες συντίθενται σχετικά νωρίς σε σχέση με τα φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή φαινολικά. Η σύνθεση των ανθοκυανών είναι εντονότερη μετά τον περκασμό. Ο ακριβής χρόνος και ο βαθμός με τον οποίο συντίθενται οι ανθοκυάνες εξαρτάται από γενετικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας, τη θερμοκρασία, την έκθεση στο φως, την διαθεσιμότητα νερού και τη συγκέντρωση των σακχάρων. Η σύνθεση των ανθοκυανών αφού φθάσει σε ένα μέγιστο κοντά στην ωρίμανση, τείνει να επιβραδύνεται μετά. Οι ακριβείς συνθήκες υπο τις οποίες λαμβάνει χώρα η έναρξη της σύνθεσης των ανθοκυανών δεν είναι γνωστές. Μία υπόθεση υποστηρίζει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων παρέχει το υπόστρωμα που είναι απαραίτητο για την έναρξη της σύνθεσης. Η συγκέντρωση των σακχάρων εκτός της

κάλυψης των ενεργειακών αναγκών των διαφόρων ιστών της ράγας, χρησιμεύει και στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών όπως οι ανθοκυάνες και διάφορες πρόδρομες αρωματικές ουσίες. Η συγκέντρωση των σακχάρων επιδρά και έμμεσα στην σύνθεση των ανθοκυανών, μέσω του οσμωτικού δυναμικού που διαμορφώνει στους ιστούς της ράγας. Θεωρείται ότι το υψηλό οσμωτικό δυναμικό εντείνει τη σύνθεση των ανθοκυανών καθώς και τη μεθυλίωση τους στα κύτταρα της ράγας (Do and Cormier, 1991). Το αμπισικό οξύ που σχετίζεται με τη συσσώρευση των σακχάρων, ίσως να αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για την έναρξη της σύνθεσης των ανθοκυανών (Ban *et al.*, 2003). Η σύνθεση των ανθοκυανών θεωρείται ότι μπορεί να ενεργοποιείται με την αλλαγή στα επίπεδα του καλίου και ασβεστίου στον φλοιό των ραγών. Το κάλιο συσσωρεύεται στον φλοιό μετά τον περκασμό, και η διασπορά του στα κύτταρα δεν είναι ομοιόμορφη. Αντιθέτως η μείωση της συγκέντρωσης του ασβεστίου είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη σύνθεση των ανθοκυανών.

Κατά την φάση αύξησης της ράγας οι μεταβολές στην συγκέντρωση των ταννινών του φλοιού είναι σημαντικές (Downey *et al.*, 2003). Ο βαθμός πολυμερισμού αυξάνεται, όπως και το ποσοστό των υπομονάδων επιγαλλοκατεχίνης και η ένταξη των μονομερών ανθοκυανών σε προκυανιδίνες (Kennedy *et al.*, 2001). Οι ανώτερες υπομονάδες περιλαμβάνουν την επικατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη, ενώ οι τελικές μονάδες περιλαμβάνουν την κατεχίνη.

Τα κυρίαρχα φαινορικά στα γίγαρτα είναι οι φλαβαν-3-ολες (κατεχίνη, επικατεχίνη, και τα πολυμερή τους οι προκυανιδίνες). Αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά στρώματα των γιγάρτων έχουν μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού και περιέχουν σε μεγαλύτερη αναλογία γαλλική επικατεχίνη (ECG) από εκείνα στα εσωτερικά μέρη του γιγάρτου (Geny *et al.*, 2003). Οι υπομονάδες επέκτασης είναι κυρίως η επικατεχίνη και η γαλλική επικατεχίνη (ECG) ενώ οι τερματικές υπομονάδες είναι στο ίδιο ποσοστό η επικατεχίνη, η γαλλική επικατεχίνη (ECG) και η κατεχίνη (Downey *et al.*, 2003). Κατά την έντονη αύξηση της ράγας, οι μονομερείς φλαβανόλες πολυμερίζονται σε προκυανιδίνες και συμπυκνωμένες ταννίνες. Επειδή το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο σε πρέμνα με μικρή ζωηρότητα (Peña-Neira *et al.*, 2004), μπορεί εν μέρει αυτό να εξηγεί γιατί οι οίνοι που παράγονται από τέτοια πρέμνα έχουν την τάση να είναι λιγότερο πικροί και στυφοί από τους αντίστοιχους που παράγονται από πρέμνα με έντονη ζωηρότητα. Η μειωμένη στυπτικότητα μπορεί

επίσης να οφείλεται στην ένωση των πηκτινών με προκυανιδίνες (Kennedy *et al.*, 2001).

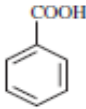
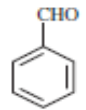
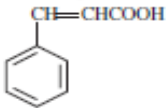
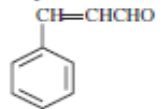
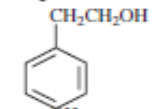
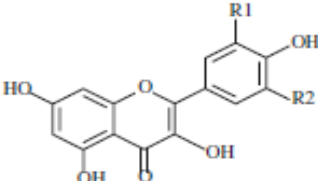
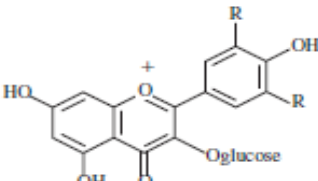
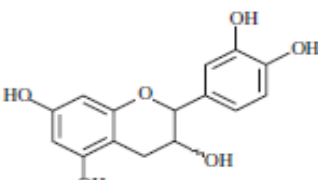


Εικόνα 4: Τα φαινολικά συστατικά και η διασπορά τους στη ράγα του σταφυλιού

Πηγή: Manuel Pinelo, Anis Arnous and Anne S. Meyer. (2006). *Upgrading of grapeskins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release*. Trends in Food Science & Technology 17 (2006) 579 - 590

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ: Τα φαινολικά συστατικά & η σημασία τους

Ο ρόλος των φαινολικών συστατικών στην επιστήμη της οινολογίας θεωρείται πολύ σημαντικός, καθώς είναι υπεύθυνα για τα διαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τις ερυθρές και λευκές ποικιλίες. Ο ρόλος τους επεκτείνεται σε θέματα που αφορούν την υγεία, καθώς έχει διασαφηνιστεί η θετική τους αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική επίδραση. Τα συστατικά αυτά προέρχονται από διάφορα μέρη του σταφυλιού και εκχυλίζονται στο γλένκος κατά την οινοποίηση.

General type	General structure	Examples	Major source ^a
Nonflavonoids			
Benzoic acid		Benzoic acid Vanillic acid Gallic acid Protocatechuic acid Hydrolyzable tannins	G, O O G, O G, O G
Benzaldehyde		Benzaldehyde Vanillin Syringaldehyde	G, O, Y O O
Cinnamic acid		<i>p</i> -Coumaric acid Ferulic acid Chlorogenic acid Caffeic acid	G, O G, O G G
Cinnamaldehyde		Coniferaldehyde Sinapaldehyde	O O
Tyrosol		Tyrosol	Y
Flavonoids			
Flavonols		Quercetin Kaempferol Myricetin	G G G
Anthocyanins		Cyanin Delphinin Petunin Peonin Malvin	G G G G G
Flavan-3-ols		Catechin Epicatechin Gallocatechin Procyanidins Condensed tannins	G G G G G

^a G = grape; O = oak; Y = yeast.

Εικόνα 5: Κατηγορίες φαινολικών συστατικών σε ράγες και οίνους

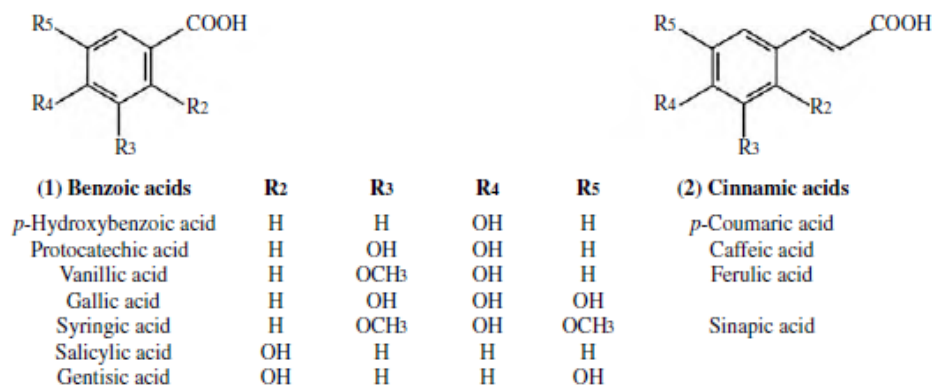
Πηγή: Jackson R.S. (2008). *Wine science principles and applications* (3rd ed.) Elsevier

ι) Τα φαινολικά οξέα και τα παράγωγά τους

Οι ράγες και οι οίνοι εμπεριέχουν βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα. Οι συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων συστατικών ποικίλουν από 100 – 200 mg / L στους ερυθρούς οίνους και 10 – 20 mg / L στους λευκούς (Ribereau – Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu, 2006).

Επτά είναι τα βενζοϊκά οξέα που έχουν ταυτοποιηθεί, ενώ δύο από αυτά, το σαλικυλικό (ορθο – υδροξύ – βενζοϊκό οξύ) και γεντισικό (2,5 – διυδροξύ – βενζοϊκό οξύ), βρίσκονται σε ίχνη. Τα οξέα της κατηγορίας αυτής διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την υποκατάσταση του βενζοϊκού δακτυλίου. Στα σταφύλια βρίσκονται με την μορφή γλυκοζιτών και απελευθερώνονται με υδρόλυση σε όξινο περιβάλλον, καθώς και με την μορφή των εστέρων από όπου απελευθερώνονται με υδρόλυση σε αλκαλικό περιβάλλον (Ribereau – Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu, 2006). Οι ελεύθερες μορφές των συστατικών αυτών είναι πιο διαδεδομένες, ιδιαίτερα στους ερυθρούς οίνους, εξαιτίας αντιδράσεων υδρόλυσης και θερμικής αποδιοργάνωσης πιο σύνθετων μορίων, ιδιαίτερα των ανθοκυανών (Galvin, 1993).

Κάποια από τα κινναμωμικά οξέα βρίσκονται τόσο στις ράγες όσο και στους οίνους. Βρίσκονται σε μικρές ποσότητες σε ελεύθερη μορφή, κυρίως όμως συναντώνται εστεροποιημένα με το τρυγικό οξύ (Ribereau – Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu, 2006). Ωστόσο μπορεί να βρίσκονται με την μορφή των απλών γλυκοζιτών. Οι εστέρες που σχηματίζουν με το τρυγικό οξύ, ιδιαίτερα το καφεϊκό και το π-κουμαρικό, είναι ευοξειδωτά συστατικά του γλεύκους και προκαλούν καφέτιασμα στα γλεύκη λευκών ποικιλιών (Cheynier *et al.*, 1989a, 1989b). Τα κινναμωμικά οξέα ενώνονται με τις ανθοκυάνες και οδηγούν στον σχηματισμό των ακυλιωμένων ανθοκυανών, μέσω της εστεροποίησης του καφεϊκού ή π – κουμαρικού οξέος με τον γλυκοζίτη της ανθοκυάνης (Ribereau – Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu, 2006). Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα σε αλκοολικό διάλυμα, αλλά με την οξειδωσή τους προσδίδουν ένα κίτρινο χρώμα. Δεν προσδίδουν χαρακτηριστική γεύση ή άρωμα, αλλά αποτελούν πρόδρομη μορφή για πολλές πτητικές αρωματικές ουσίες μετά την δράση συγκεκριμένων μικροοργανισμών (ζύμες του γένους *Brettanomyces* και βακτήρια).



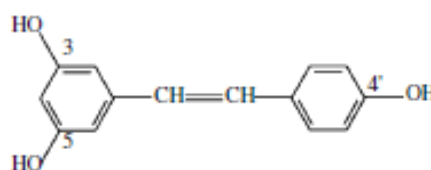
Εικόνα 6: Τα φαινολικά οξέα

Πηγή: Ribereau – Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006). *Handbook of enology, Vol. 2, The chemistry of wine, stabilization and treatments* (2nd Ed.). Wiley and sons, England

Τα στιλβένια αποτελούν μια κατηγορία φαινολικών οξέων τα οποία συναντώνται στο σταφύλι, τον οίνο και το ξύλο δρυός. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη δύο βενζοϊκών δακτυλίων, οι οποίοι συνδέονται με αλυσίδα αιθανίου ή αιθυλενίου. Στην ομάδα αυτή ανήκει και η ρεσβερατρόλη, η οποία παράγεται στον φυτό της αμπέλου μετά την προσβολή από μύκητα (Langcake, 1981). Η ρεσβερατρόλη εντοπίζεται στον φλοιό των ραγών και εκχυλίζεται κατά την οινοποίηση των ερυθρών ποικιλιών, ενώ θεωρείται ότι έχει σημαντικά θετική επίδραση στην υγεία (Ribereau – Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu, 2006). Οι συγκέντρωσεις στις οποίες βρίσκεται κυμαίνονται από 1–3 mg/l, ενώ μελέτες έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό πολλών oligομερών της ρεσβερατρόλης στις ποικιλίες *Vitis vinifera*. (Jeandet *et al.*, 1995; Bourhis *et al.*, 1996)

Εικόνα 7: Ρεσβερατρόλη

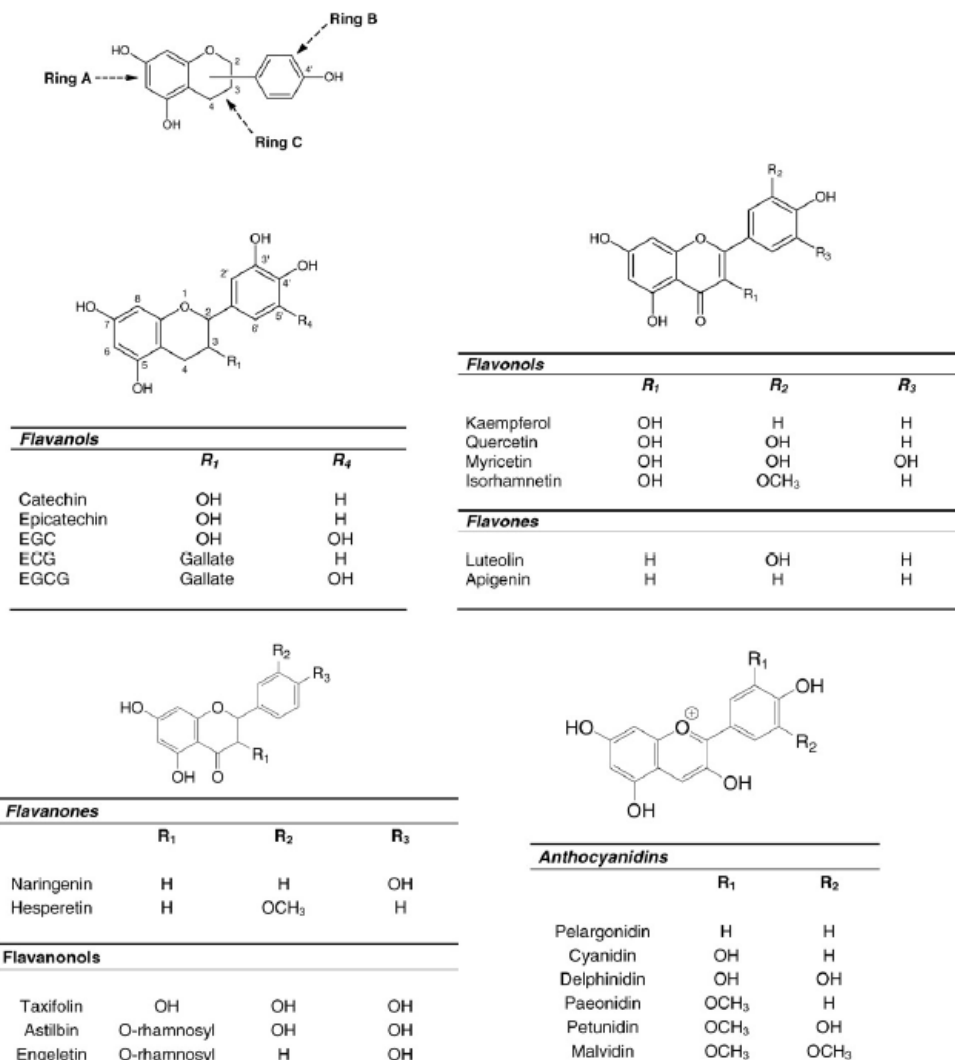
Πηγή: Ribereau – Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006). *Handbook of enology, Vol. 2, The chemistry of wine, stabilization and treatments* (2nd Ed.). Wiley and sons, England



ii) Τα φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά

Οι ράγες περιέχουν μεγάλη ποικιλία φαινολικών συστατικών. Οι φαινόλες αποτελούν την τρίτη μεγαλύτερη ομάδα συστατικών στις ράγες και τους οίνους, μετά τους υδρογονάνθρακες και τα οξέα (Singleton, 1980). Τα φλαβονοειδή φαινολικά

συστατικά διακρίνονται στις ανθοκυάνες, τις φλαβάνες, τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες και τις φλαβονόλες (Peterson and Dwyer, 1998).

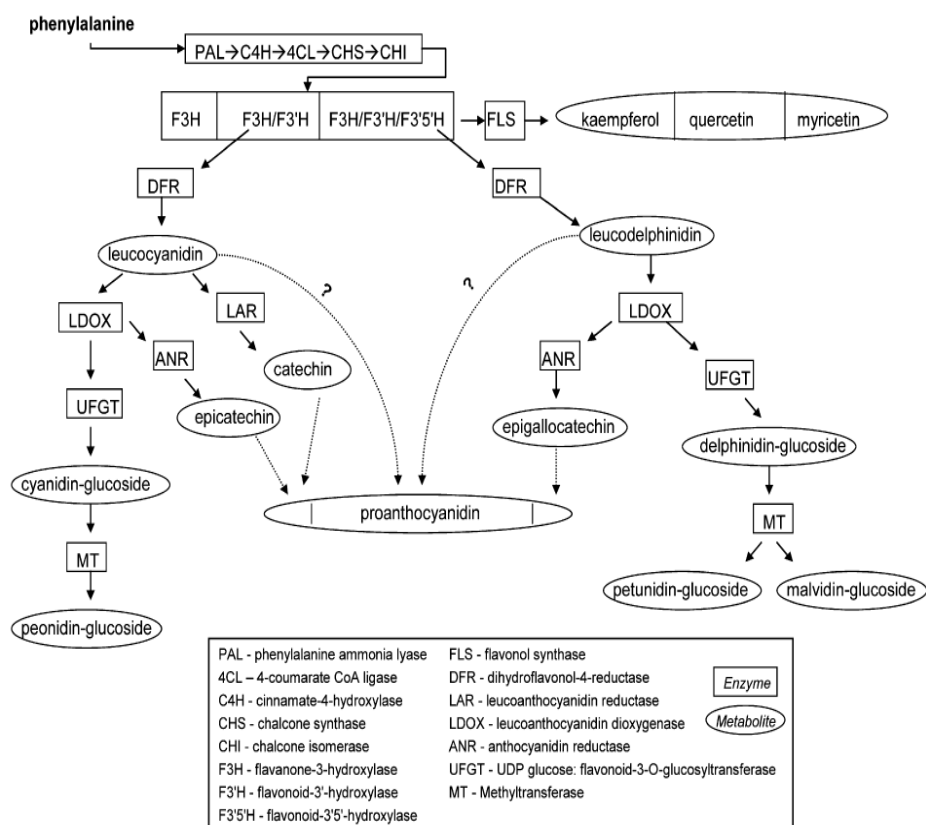


Εικόνα 8: Τα φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά και οι κύριες δομές τους

Πηγή: Boonterm, V. (2010). *Effects of nitrogen and potassium fertilizing and cluster thinning on quality and anthocyanin contents of cabernet sauvignon grape and wine*. Suranaree University of Technology

Οι τρεις κύριες ομάδες φαινολικών συστατικών που βρίσκονται στις ράγες και τους οίνους, συμπεριλαμβάνουν τις ανθοκυάνες, τις φλαβονόλες και τις προανθοκυανιδίνες (συμπυκνωμένες ταννίνες) (Cortell, J. M., 2006). Στις ράγες οι προανθοκυανιδίνες βρίσκονται σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση και ακολουθούν οι ανθοκυάνες και οι φλαβονόλες (Souquet *et al.*, 1996). Οι τρεις αυτές κατηγορίες συστατικών διαφέρουν σε σχέση με την οξείδωση του C δακτυλίου. Τα φαινολικά

συστατικά αποτελούν σημαντικά στοιχεία των φυτικών κυττάρων και συνδέονται με την φυσική άμυνα ενάντια στα βακτήρια και τους ιούς (Boonterm, V., 2010). Επιπρόσθετα τα φαινολικά των ραγών και οίνων συμβάλλουν στην διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που αφορούν το χρώμα, την στυπτικότητα και την πικρότητα, επηρεάζουν τις αντιδράσεις οξείδωσης, αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες και συμβάλλουν στην εξέλιξη της παλαίωσης του οίνου (Carando *et al.*, 1999).



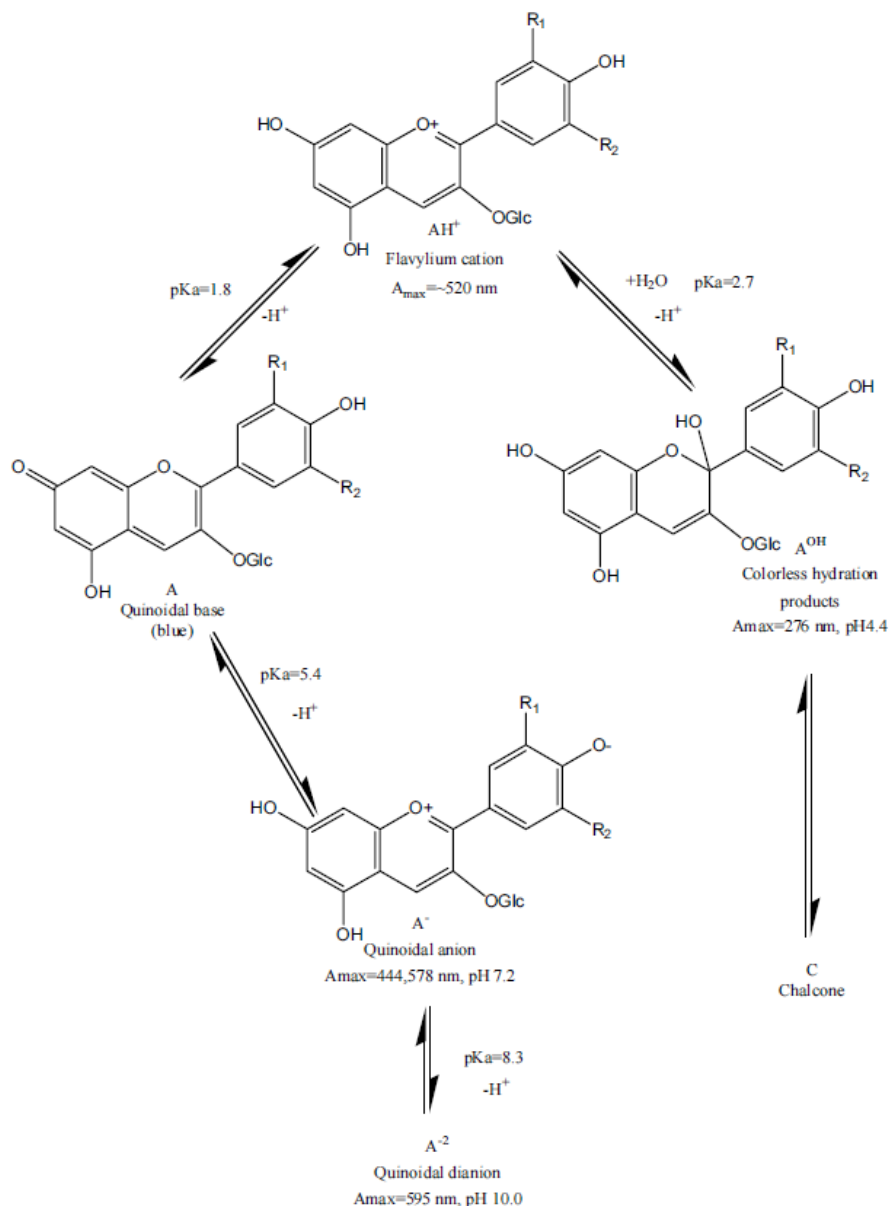
Εικόνα 9: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών φαινολικών συστατικών

Πηγή: Cohena S. D., Tararab J. M., Kennedy J. A. (2008). *Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism*. *Analytica chimica acta*, v. 621, p. 57–67

- **Ανθοκυάνες:** οι ανθοκυάνες είναι τα χρωμοφόρα μόρια που προσδίδουν στις ερυθρές ποικιλίες και στους παραγόμενους από αυτές οίνους χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα. Στα κύτταρα συνυπάρχουν με άλλα φαινολικά συστατικά, όπως φαινολικά οξέα και φλαβονόλες, τα οποία επιδρούν στο χρώμα τους, μέσω αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα. Στις περισσότερες ποικιλίες οι ανθοκυάνες βρίσκονται μόνο στον φλοιό και όχι στη σάρκα της ράγας. Η συγκέντρωσή τους διαφοροποιείται από το κατώτερο προς το ανώτερο στρώμα φλοιού της ράγας (Amrani-Joutei, 1993). Οι ανθοκυάνες

χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη στο μόριο τους ενός δακτυλίου πυριλίου με ένα θετικά φορτισμένο οξόνιο οξυγόνου (Cortell, J. M., 2006). Η βασική τους δομή, το κατιόν φλαβυλίου, απαρτίζεται από δύο βενζοϊκούς δακτυλίους που ενώνονται με έναν ακόρεστο κατιοντικό ετεροκυκλικό δακτύλιο (δακτύλιο πυριλίου) και προέρχεται από το 2 – φαινυλ – βενζοπυρύλιο. Το φλαβύλιο είναι ένα σταθερό κατιόν, το οποίο ανάλογα με το pH του διαλύματος μπορεί να βρίσκεται σε τέσσερις μορφές με διαφορετικό χρώμα : το κατιόν φλαβυλίου έχει χρώμα κόκκινο, η βάση της κινόνης μπλέ, η άνυδρη βάση είναι άχρωμη και η χαλκόνη έχει χρώμα κίτρινο (Ribéreau *et al.*, 2000). Οι ανθοκυάνες είναι οι κόκκινες χρωστικές των σταφυλών, που βρίσκονται κυρίως στον φλοιό των ραγών, ενώ συναντώνται σε μεγάλες ποσότητες στα φύλλα της αμπέλου, στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου (Ribereau – Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu, 2006). Πέντε είναι οι ανθοκυάνες που έχουν εντοπισθεί στις ράγες και τους οίνους. Διακρίνονται μεταξύ τους από την υποκατάσταση (με OH και OCH₃) του B δακτυλίου. Όλες οι ποικιλίες *Vitis vinifera* έχουν τις ίδιες βασικές δομές ανθοκυανών, ωστόσο εντοπίζονται μικρές διαφορές σε σχέση με την σύνθεσή τους. Ανάμεσα στις 5 βασικές δομές των ανθοκυανών, η μαλβιδίνη είναι η επικρατούσα σε όλες τις ποικιλίες, αλλά η συγκέντρωση της κυμαίνεται σημαντικά στις διάφορες ποικιλίες και χαρακτηριστικά από 90% (Grenache) έως 50% (Sangiovese). Ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης προσδίδει το χαρακτηριστικό χρώμα στις ερυθρές ποικιλίες και στους παραγόμενους οίνους, ενώ η συγκέντρωση των ακυλιωμένων ανθοκυανών εξαρτάται από την ποικιλία (Ribereau – Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu, 2006). Το χρώμα των ανθοκυανών εξαρτάται από την τιμή του pH, το SO₂, αλλά και την δομή του μορίου τους και το περιβάλλον. Η υποκατάσταση του B δακτυλίου οδηγεί σε βαθυχρωμία στη μέγιστη απορρόφηση του φάσματος (αποχρώσεις μωβ), ενώ η γλυκοζυλίωση και ακυλίωση οδηγεί σε αποχρώσεις του πορτοκαλί (Ribereau – Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu, 2006). Στις ράγες των ερυθρών ποικιλιών οι ανθοκυάνες βρίσκονται με την μορφή μικρών συμπλόκων, είτε μεταξύ τους, είτε με άλλα συστατικά. Τα σύμπλοκα των ανθοκυανών δημιουργούνται με την εκδήλωση φαινομένων συγχρωματισμού και ενώσεων μεταξύ τους (Somers and Vétette, 1988; Mistry *et al.*, 1991). Τα δύο φαινόμενα οδηγούν στη δημιουργία μεγάλων συμπλόκων τα οποία συγκρατούνται με

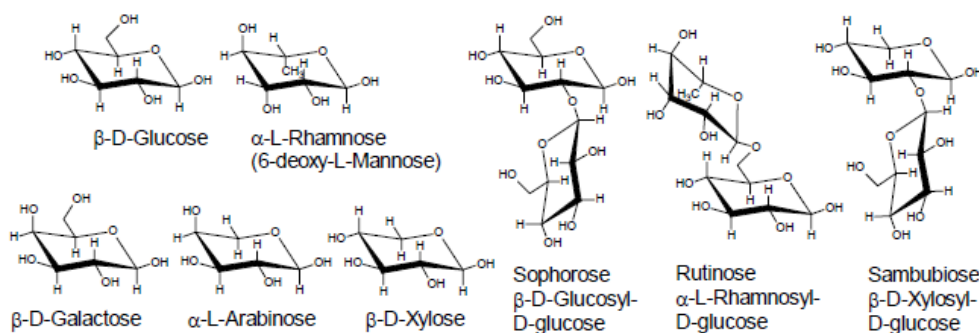
υδροφοβικούς δεσμούς είτε μεταξύ των ανθοκυανών ή μεταξύ των ανθοκυανών και άλλων οργανικών συστατικών (Jackson, 2008). Ο συγχρωματισμός οδηγεί σε αποχρώσεις βιολετί. Οι παράγοντες αυτοί ευθύνονται για τις διάφορες αποχρώσεις των ερυθρών ποικιλιών (Ribereau – Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu, 2006).



Εικόνα 10: Οι τέσσερις μορφές των ανθοκυανών ανάλογα του pH σε υδατικό διάλυμα

Πηγή: Maarit Rein. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. University of Helsinki Department of Applied Chemistry and Microbiology Food Chemistry Division

Η θέση C – 3 στο μόριο των ανθοκυανών καθώς και το σάκχαρο στη θέση αυτή μπορεί να είναι εξίσου ακυλιωμένα (Haslam 1977). Τα σάκχαρα με τα οποία σχηματίζει δεσμούς συμπεριλαμβάνουν τη γλυκόζη, τη γαλακτόζη, τη ξυλόζη, τη ραμνόζη και την αραβινόζη (Francis 1989). Τα οξέα με τα οποία συνήθως εστεροποιούνται οι ανθοκυάνες περιλαμβάνουν το π – κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και τα π-υδρόξυ βενζοϊκά οξέα (Cortell, J. M., 2006). Ο βαθμός υδροξυλίωσης του Β δακτυλίου είναι καθοριστικός για την απόχρωση, τη σταθερότητα και την αντιοξειδωτική ικανότητα του μορίου (Cortell, J. M., 2006). Το κύριο μέρος των ανθοκυανών συμπεριλαμβάνει το άγλυκο (κατιόν φλαβυλίου), το οποίο έχει συζευγμένους διπλούς δεσμούς υπεύθυνους για την απορρόφηση του φάσματος στα 500 nm , που γίνεται αντιληπτό ως κόκκινο χρώμα (Rein M., 2005). Το άγλυκο μέρος ονομάζεται ανθοκυανιδίνη. Οι ανθοκυάνες είναι πιο σταθερές και ευδιάλυτες συγκριτικά με τις ανθοκυανιδίνες, κάτι που οφείλεται στην γλυκοζυλίωση τους (Robinson and Leon, 1931; Timberlake and Bridle, 1966a). Τα παράγωγα του άγλυκου μέρους που οι ποικιλίες *Vitis vinifera* περιλαμβάνουν είναι οι 3 – μονογλυκοζίτες, οι 3 – ακετυλογλυκοζίτες και οι 3 – π κουμαρικό γλυκοζίτες (Cortell, J. M., 2006).



Εικόνα 11: Σάκχαρα με τα οποία το άγλυκο μέρος των ανθοκυανών σχηματίζει δεσμούς

Πηγή: Maarit Rein. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. University of Helsinki Department of Applied Chemistry and Microbiology Food Chemistry Division

Οι αντιοξειδωτική ικανότητα των ανθοκυανών έχει αποδοθεί στο άγλυκο μέρος του μορίου, κι αυτό έχει διαπιστωθεί για την κυανιδίνη και κάποιους γλυκοζίτες της (Wang *et al.*, 1999). Ωστόσο ο αριθμός των υποκατάστατων στην θέση 3 του μορίου (Wang *et al.*, 1999), ο βαθμός οξείδωσης του C δακτυλίου (Lapidot *et al.*, 1999), ο βαθμός υδροξυλίωσης (Espin *et al.*, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997) και η ακυλίωση με φαινολικά οξέα (Degenhardt *et al.*, 2000), θεωρούνται καθοριστικοί παράγοντες της εκδήλωσης αντιοξειδωτικής ικανότητας των ανθοκυανών (Boonterm, V., 2010).

- Προανθοκυανιδίνες (συμπυκνωμένες ταννίνες): ονομάζονται έτσι γιατί με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον απελευθερώνουν ανθοκυανιδίνες. Οι ταννίνες είναι οι ουσίες που μπορούν να δημιουργούν σταθερούς δεσμούς με τις πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή όπως οι πολυσακχαρίτες (Ribereau – Gayon, Glories, Maujean, Dubourdieu, 2006). Αποτελούνται από μονάδες φλαβονολών οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς C4-C8 ή C4-C6 (B τύπος) ή συνδέονται με διπλούς δεσμούς με επιπλέον δεσμό C-2-O--C-7 (A τύπου) που στη συνέχεια υποκαθίσταται μέσω της γλυκοζυλίωσης και εστεροποίησης (Cheynier *et al.*, 2001). Οι διμερείς προκυανιδίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής (Weinges *et al.*, 1968; Thompson *et al.*, 1972): οι τύπου B προκυανιδίνες με μοριακό τύπο ($C_{30}H_{26}O_{12}$), οι οποίες προκύπτουν από την συμπύκνωση δυο μονάδων φλαβαν – 3 –ολων οι οποίες συνδέονται με δεσμούς C4–C8 (B1 to B4) ή C4–C6 (B5 to B8) (Jackson, 2008). Οι τύπου A προκυανιδίνες με μοριακό τύπο ($C_{30}H_{24}O_{12}$) οι οποίες εκτός των δεσμών C4–C8 ή C4–C6, έχουν έναν αιθερικό δεσμό ανάμεσα στα άτομα άνθρακα C5 ή C7 του κατώτερου σκέλους και του ατόμου άνθρακα C2 του ανώτερου σκέλους του μορίου. Η μορφή B μπορεί να μετατραπεί στην A μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας (Jackson, 2008).

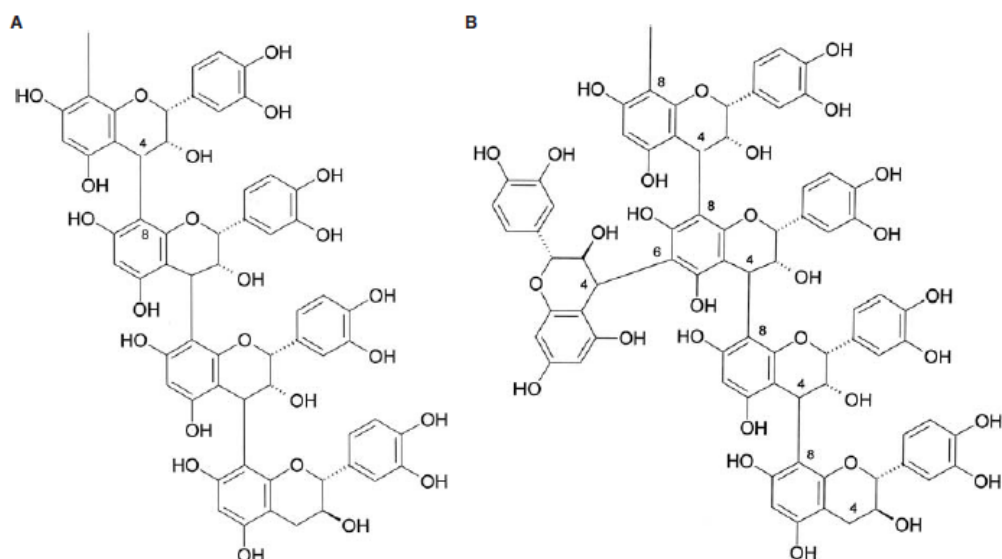


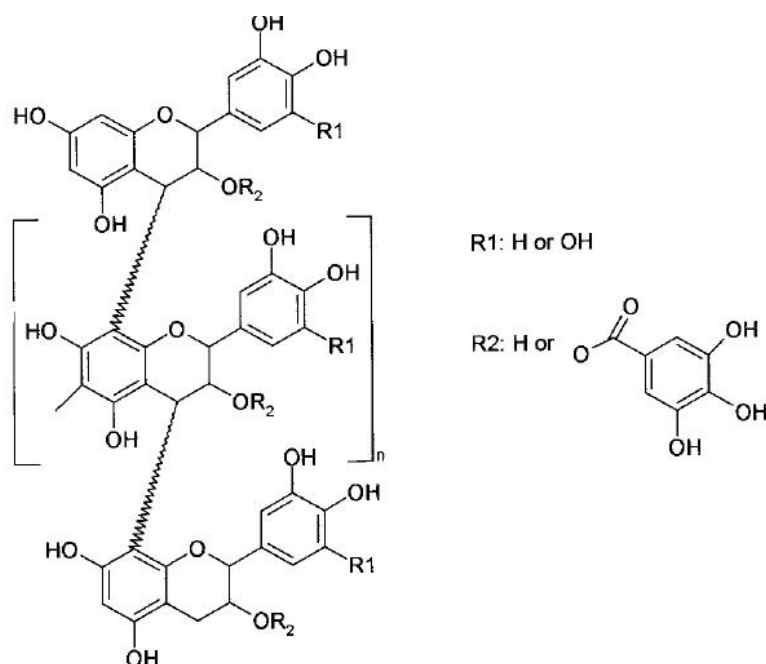
Figure 6.3 Examples of B-type condensed tannins in grapes: A, unbranched flavan-3-ol procyanidin; B, branched flavan-3-ol procyanidin.

Εικόνα 12: Τύπου Α και Β προκυανιδίνες

Πηγή: Jackson R.S. (2008). *Wine science principles and applications* (3rd ed.) Elsevier

Οι τριμερείς προκυανιδίνες διακρίνονται επίσης σε δύο κατηγορίες: τύπου C όπου οι δεσμοί αντιστοιχούν σε αυτούς με τις προκυανιδίνες τύπου B και τύπου D όπου οι δεσμοί είναι τύπου A και B. Οι προανθοκυανιδίνες (ή συμπυκνωμένες ταννίνες), είναι ολιγομερές και πολυμερές φλαβαν – 3 – όλες, ενωμένες μεταξύ τους. Οι δομές των προανθοκυανιδινών διαφέρουν ως προς το βαθμό πολυμερισμού, τη θέση της σύνδεσης και τη φύση των επιμέρους μονάδων (Lorrain *et al.*, 2011). Οι προανθοκυανιδίνες έχουν μοριακά βάρη που ποικίλουν από 500 έως 3000 και έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν καθίζηση των πρωτεϊνών. Η δυνατότητα αυτή είναι πολύ σημαντική καθώς καθορίζει την αντίληψη της στυπτικότητας στους οίνους (Robichaud & Noble 1990). Οι προανθοκυανιδίνες έχουν αντιοξειδωτική δράση και άλλες θετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (Santos-Buelga & Scalbert 2000; Dixon *et al.*, 2004). Οι προανθοκυανιδίνες των γιγάρτων αποτελούνται από προκυανιδίνες, ενώ οι υπομονάδες αποτελούνται από (+)-κατεχίνη (C), (-)-επικατεχίνη (EC) και γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης (Prieur *et al.*, 1994; Romeyer *et al.*, 1986; Czochanska *et al.*, 1979), ενώ οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών συμπεριλαμβάνουν τόσο προκυανιδίνη αλλά και προδελφινιδίνη και οι υπομονάδες συμπεριλαμβάνουν επιπρόσθετα (-)-επιγαλλοκατεχίνη (EGC) (Prieur, Rigaud, Cheynier, & Moutounet, 1994; Souquet, Cheynier, Brossaud, & Moutounet, 1996). Οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού, έχουν μονομερείς φλαβαν – 3 – όλες σε μικρότερη συγκέντρωση και σε μικρότερο

βαθμό λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις εστεροποίησης των υπομονάδων σε σχέση με τα γίγαρτα (Lorrain *et al.*, 2011). Στη ράγα οι κύριες μονάδες που βρίσκονται είναι η (+) – κατεχίνη, η (-) – επικατεχίνη, η (-)- γαλλική επικατεχίνη και η (-) – επιγαλλοκατεχίνη (Labarbe *et al.*, 1999). Εκτός της θετικής επίδρασής τους στην ανθρώπινη υγεία (Masquelier, 1988; Ricardo da Silva *et al.*, 1991a), η συμβολή τους είναι εξίσου σημαντική στον οίνο και γενικότερα στις φυτικές τροφές (Labarbe *et al.*, 1999). Θεωρείται ότι στα γίγαρτα τα συγκεκριμένα συστατικά προσφέρουν προστασία από παθογόνους μύκητες (Mercier 1987; Dixon *et al.*, 2004) και την κατανάλωσή τους από πτηνά. Στους φλοιούς των ραγών θεωρείται ότι προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία. Είναι σημαντική η συμβολή τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων όπως η σταθεροποίηση του χρώματος έπειτα από ενώσεις με ανθοκυάνες μέσω φαινομένων συγχρωματισμού και συμπύκνωσης (Somers 1971, Haslam 1980, Vivar-Quintana, Santos-Buelga, Francia-Aricha, & Rivas-Gonzalo, 1999). Στους οίνους οι προανθοκυανιδίνες προσδίδουν στυπτικότητα και σώμα (Noble 1990; Gacon *et al.*, 1996; Gawel 1998; Kallithraka *et al.*, 1997). Το μέγεθος του μορίου της προκυανιδίνης (mDP) είναι καθοριστικής σημασίας για την πικρότητα και την στυπτικότητα που αυτές προσδίδουν (Cheynier *et al.*, 2006; Gawel, 1998; Peleg *et al.*, 1999; Robichaud & Noble, 1990; Vidal *et al.*, 2003). Τα μονομερή διακρίνονται για την πικρή τους γεύση, ενώ τα μεγάλα μοριακού βάρους συστατικά διακρίνονται για την στυπτικότητά τους. Η περιεκτικότητα των ραγών σε φαινολικά συστατικά εξαρτάται από ένα πλήθος παραγόντων που αφορούν κλιματικά και γεωγραφικά χαρακτηριστικά, καλλιεργητικές τεχνικές, βαθμό ωρίμανσης κ.α. Η κάθε ποικιλία *Vitis vinifera* θεωρείται επίσης καθοριστική για το φαινολικό δυναμικό και σε κάποιες περιπτώσεις η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της προέλευσης και αυθεντικότητας των ποικιλιών αμπέλου (Arvanitoyannis, Katsota, Psarra, Soufleros, & Kallithraka, 1999; Forina, Armanino, Castino, & Ubigli, 1986). Θεωρούνται μόρια ιδιαίτερα δραστικά και σε αντίθεση με τις ανθοκυάνες και τις φλαβονόλες δεν συναντώνται σε μορφή γκυκοζιτών (Jackson, 2008). Ωστόσο βρίσκονται συνδεδεμένες με πολυσακχαρίτες στις ράγες και εκχυλίζονται ως σύμπλοκα κατά την οινοποίηση. Στην περίπτωση των λευκών οίνων η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται από την ένταση της απολάσπωσης και είναι της τάξης των 100 mg/L ή 200-300 mg/L σε μη απολασπωμένα γλεύκη (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000, Κοτσερίδης, 2005/β).

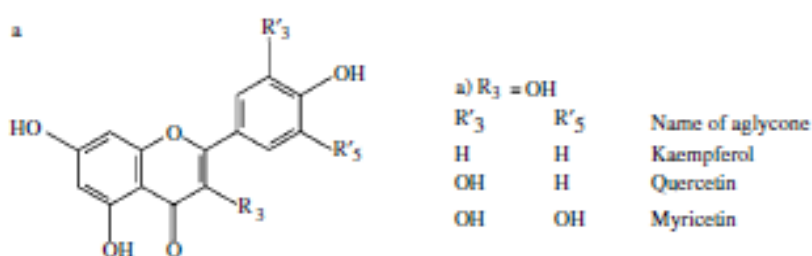


Εικόνα 13: Γενική δομή των προανθοκυανιδινών στη ράγα των *Vitis vinifera* ποικιλιών

Πηγή: Saucier C., Mirabel M., Daviaud F., Longieras A., and Glories Y. (2001). Rapid Fractionation of Grape Seed Proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5732 – 5735

- **Φλαβονόλες:** είναι συστατικά που προσδίδουν αποχρώσεις κίτρινες και βρίσκονται στον φλοιό ερυθρών και λευκών ποικιλιών. Οι φλαβονόλες έχουν πολλές φυσικές δράσεις, μια εκ των οποίων είναι η προστασία που παρέχουν ως προς την υπεριώδη ακτινοβολία (Flint *et al.*, 1985; Price *et al.*, 1995; Smith & Markham 1998, Cortell, J. M., 2006). Άλλες λειτουργίες συμπεριλαμβάνουν την αντιοξειδωτική τους δράση (Markham *et al.*, 1998) και την δημιουργία συμπλόκων με τις ανθοκυάνες μέσω του φαινομένου του συγχρωματισμού (Asen *et al.*, 1972; Scheffeldt & Hrazdina 1978, Cortell, J. M., 2006). Οι φλαβονόλες δρουν επίσης ως συγχρωματικοί παράγοντες στους οίνους (Scheffeldt and Hrazdina, 1978, Cortell, J. M., 2006). Οι φλαβονόλες αποτελούν μια μεγάλη υποκατηγορία των φαινολικών συστατικών, που χαρακτηρίζεται για την ύπαρξη διπλού δεσμού στη θέση 2 – 3 του C δακτυλίου. Τα συστατικά αυτά βρίσκονται στον φλοιό των ραγών και ανάλογα με την χαρακτηριστική ομάδα στον B δακτύλιο διακρίνονται στις: καμπερόλη, κερσετίνη, μυρισετίνη και ρουτίνη. Τόσο οι λευκές όσο και οι ερυθρές ποικιλίες αμπέλου περιέχουν τις ίδιες ποσότητες φλαβονολών, διαφέρουν όμως στην ποιοτική τους σύσταση (Κοτσερίδης, 2005/β). Μόνο η καμπερόλη και η κερσετίνη βρίσκονται στις λευκές ποικιλίες, ενώ όλες οι

μορφές των φλαβονολών βρίσκονται στις ερυθρές (Ribereau-Gayon, 1964). Οι φλαβονόλες των ραγών είναι συνήθως συζευγμένες. Στους φλοιούς και στις ερυθρές ποικιλίες βρίσκονται οι γλυκοζίτες της μυρισετίνης, κερσετίνης, καμπερόλης και ρουτίνης, καθώς και γλυκουρονίτες της μυρισετίνης, κερσετίνης και καμπερόλης, καθώς και ενωμένες με άλλα παράγωγα των σακχάρων (Makris *et al.*, 2005). Στις ράγες οι φλαβονόλες που συνήθως απαντούν είναι ο γλυκοζίτης της κερσετίνης και ο γλυκουρονίτης της κερσετίνης (Cheynier & Rigaud 1986; Price *et al.*, 1995).



Εικόνα 14: Κατηγορίες φλαβονολών

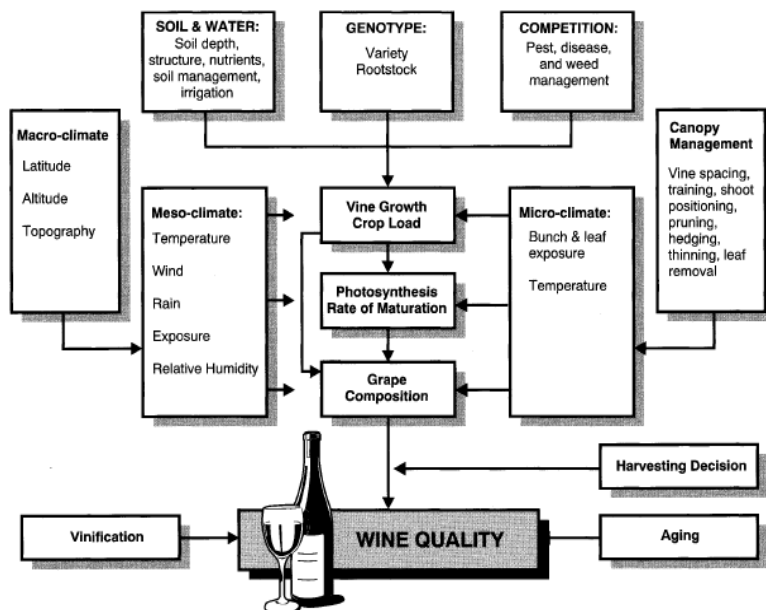
Πηγή: Ribereau – Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006). *Handbook of enology, Vol. 2, The chemistry of wine, stabilization and treatments* (2nd Ed.). Wiley and sons, England

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ: Το Κάλιο & ο ρόλος του

ι) Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα & σύνθεση των ραγών & παραγόμενων οίνων

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την σύνθεση των ραγών και κατά συνέπεια την ποιότητα των παραγόμενων οίνων, ποικίλουν, καθώς αφορούν περιβαλλοντικές συνθήκες, γενετικούς παράγοντες και αμπελοκομικές τεχνικές.

Η κατάσταση σε θρεπτικά στοιχεία, του εδάφους, επηρεάζει όλα τα μέρη της αμπέλου, την ανάπτυξη των ριζών και την διακίνηση των ουσιών, την ανάπτυξη των βλαστών και τη σύνθεση των ραγών. Σε γενικές γραμμές, η διαθεσιμότητα κάθε θρεπτικού στοιχείου εξαρτάται από το pH του εδάφους. Μελέτες σχετικά με την επίδραση της θρέψης στην απόδοση της αμπέλου, ιδιαίτερα στην ανάπτυξη του φυτού και την ποιότητα των ραγών, έχουν επιβεβαιωθεί ως προς τη σημασία των μακροστοιχείων (Conradie, 1986, Goldspink και Howes, 2001, Retallack, 2002, Robinson, 1992, Treeby *et al.*, 1995). Το αμπέλι είναι ένα πολυετές φυτό που συσσωρεύει και αποθηκεύει θρεπτικές ουσίες στα ξυλώδη μέρη, όπως ο κορμός και οι ρίζες. Τα αποθηκευμένα θρεπτικά δρουν ως ρυθμιστικοί παράγοντες, οι οποίοι προμηθεύουν τα αναπτυσσόμενα τμήματα της αμπέλου με θρεπτικά συστατικά, όπως απαιτείται (Coombe, 1992). Το φυτό απαιτεί 14 εδαφικά στοιχεία. Έξι από αυτά είναι τα μακροστοιχεία που απαιτούνται σε μεγάλες ποσότητες: Άζωτο (N), Φόσφορος (P), Κάλιο (K), Θείο (S), Ασβέστιο (Ca) και Μαγνήσιο (Mg) και οκτώ ιχνοστοιχεία που είναι απαραίτητα σε μικρές ποσότητες (Dalton *et al.*, 1988).



Εικόνα: Εικόνα 15: Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των ραγών & παραγόμενων οίνων

Πηγή: Jackson D.I. *et al.* (1993). *Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality: A review*. American society for enology and viticulture

ii) Η σημασία του καλίου

Το κάλιο θεωρείται ο παράγοντας που επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τις ράγες και κατά συνέπεια τους παραγόμενους οίνους, ως προς το pH, το χρώμα, την εξέλιξη της ζύμωσης και τελικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου όπως η γεύση και η διαύγειά του (Herper and Bravdo, 1985 AltIndisli, 1999). Η πρόσληψη του καλίου κατά την ωρίμανση επηρεάζει τόσο την σύνθεση των οξέων αλλά και τον ιονισμό. Οι παράγοντες που ρυθμίζουν την συσσώρευση του καλίου στους ιστούς του φυτού, είναι πολύπλοκοι και η δράση τους δεν έχει διασαφηνισθεί πλήρως. Το κάλιο μεταφέρεται από το κλάσμα του εδάφους στο ξύλωμα και το φλοιώμα και μπορεί να μετακινηθεί από τους παλαιότερους προς τους νεότερους ιστούς (Jackson, 2008). Το κάλιο θεωρείται πολύ σημαντικό για τη θρέψη της αμπέλου ενώ είναι γνωστή η ιδιότητά του να επηρεάζει την μεριστωματική αύξηση, το ισοζύγιο νερού του φυτού, τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και την μεταφορά των μεταβολιτών του φυτού (Mengel and Kirkby, 1987). Λόγω της μεγάλης δραστηριοποίησής του στο φλοιώμα (Mengel and Pflüger, 1972), το κάλιο συσσωρεύεται αρχικά στους ιστούς του φλοιού των ραγών εφόσον κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης μετακινείται από τα πιο ώριμα

φύλλα (Coombe, 1992). Εφόσον η μεταφορά του λαμβάνει χώρα προς τα νεότερα και αναπτυσσόμενα όργανα του φυτού (Greenway and Pitman, 1965), τα συμπτώματα έλλειψής του γίνονται εμφανή αρχικά στη βάση των παλαιότερων φύλλων. Στο φυτό της αμπέλου το καφέτιασμα των φύλλων που προκαλείται λόγω της έλλειψης καλίου εκδηλώνεται πρωτίστως σε μεγάλης παραγωγικότητας φυτά, μετά τον περκασμό, όταν η ράγα αποτελεί το κύριο μέρος πρόσληψης καλίου, φαινόμενο το οποίο εντείνεται σε συνθήκες υδατικού στρες (Gärtel, 1988). Ενώ η έλλειψη καλίου επιδρά δυσμενώς τόσο στην παραγωγή, όσο και στη συγκέντρωση των διαλυτών στερεών της ράγας (Kliewer *et al.*, 1983; Morris and Cawthon, 1982), η υψηλή συγκέντρωσή του στο γλεύκος ισοδυναμεί με αυξημένη καθίζηση του όξινου τρυγικού καλίου κατά την ζύμωση και σταθεροποίηση, που οδηγεί σε αύξηση του pH του παραγόμενου οίνου, επηρεάζοντας έτσι την σταθερότητά του (Goldspink and Frayne, 1997; Hale, 1977). Η μεγάλη κινητικότητα του καλίου οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο μηχανισμός μεταφοράς και συσσώρευσής του επηρεάζεται από τις καλλιεργητικές τεχνικές που εφαρμόζονται στον αμπελώνα. Σε διάφορες μελέτες έχει διερευνηθεί η επίδραση του βλαστού (Boulay, 1988; Klein *et al.*, 2000), του υποκειμένου (Brancadoro *et al.*, 1994; Rühl and Walker, 1990), του ισοζυγίου του νερού (Dundon and Smart, 1984; Herper and Bravdo, 1985) στην θρέψη με κάλιο, όπως και η επίδραση της λίπανσης με κάλιο στην φυσιολογία της αμπέλου (Kliewer *et al.*, 1983; Morris and Cawthon, 1982) (Stefano Poni, 2003).

Η συγκέντρωση του καλίου στη ράγα αυξάνει δραματικά μετά τον περκασμό, ιδιαίτερα στον φλοιό, ο οποίος ενδέχεται να περιέχει 30 – 40% του συνολικού ποσοστού του (Jackson, 2008). Ωστόσο το γεγονός της ανομοιομορφής συγκέντρωσής του στα κύτταρα του φλοιού δεν έχει διασαφηνισθεί (Storey, 1987). Η συσχέτιση που έχει διαπιστωθεί ανάμεσα στο κάλιο και την συγκέντρωση των σακχάρων στον φλοιό και τη σάρκα των ραγών, οδηγεί στο συμπέρασμα πως το κάλιο επηρεάζει το ωσμωτικό δυναμικό στα κύτταρα του φλοιού, όπως αντίστοιχα τα σάκχαρα στα κύτταρα της σάρκας. Η εξαγωγή από το κύτταρο των κατιόντων H⁺ αντισταθμίζεται με την εισαγωγή ιόντων καλίου. Εφόσον η συγκέντρωση καλίου στο μεσοκυττάριο χώρο επηρεάζει την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, η αύξησή της μπορεί να επηρεάσει την απελευθέρωση του μηλικού οξέος και να προωθήσει τον μεταβολισμό του στο κυτόπλασμα (Jackson, 2008). Το κάλιο δρά επίσης ως ενεργοποιητής διαφόρων ενζύμων.

Σύμφωνα με τον Mohammed *et al.*, (2008), η επαρκής θρέψη του φυτού με κάλιο επιδρά θετικά στην συγκέντρωση των πολυφαινολών και το χρώμα των ραγών. Επίσης οι Cook and Carlson (1961), Morris and Cawthon (1982) και Shaulis (1961), αναφέρουν ότι η ισορροπημένη λίπανση με κάλιο βελτιώνει τις συνθήκες ωρίμανσης των ραγών, ενδυναμώνεται η σύνθεση των ανθοκυανών και κατά συνέπεια βελτιώνεται η ποιότητα των ραγών. Ωστόσο οι πολύ μεγάλες ποσότητες θρέψης με κάλιο προκαλούν μείωση του χρώματος των ραγών (Morris *et al.*, 1983, Jackson and Lombard 1993), αύξηση της τιμής του pH και κατά συνέπεια υποβάθμιση της ποιότητας του παραγόμενου οίνου (Dundon *et al.*, 1984, Freeman and Kliewer 1983, Somers, 1977). Ο μηχανισμός που δρά αρνητικά σε σχέση με το χρώμα των ραγών σε περιπτώσεις υψηλών τιμών θρέψης με κάλιο ή άζωτο αφορά την έντονη ζοηρότητα των πρέμων (Downey *et al.*, 2006). Το κάλιο ενδυναμώνει την φωτοσυνθετική δραστηριότητα και ευνοεί την μεταφορά των σακχάρων στη ράγα. Το γεγονός αυτό έχει έμμεση θετική επίδραση στη σύνθεση των φαινολικών συστατικών κατά την ωρίμανση (Pirie *et al.*, 1977). Το pH του γλεύκους επηρεάζει τις συνθήκες ισορροπίας των ανθοκυανών στο διάλυμα και την πυκνότητα του χρώματός του. Ο Morris *et al.*, (1983), αναφέρει ότι υψηλή τιμή pH στο γλεύκος, λόγω υψηλής περιεκτικότητας καλίου, δεν επηρέασε τις ολικές ανθοκυάνες στον φλοιό, αλλά μείωσε τους συγχρωματικούς παράγοντες αυτού. Οι Balo *et al.*, (1988) και Fregoni *et al.*, (1980), αναφέρουν ότι η ισορροπημένη περιεκτικότητα καλίου αντισταθμίζει τις δυσμενείς επιδράσεις των υψηλών συγκεντρώσεων αζώτου στην αμπελοοινική παραγωγή και των σακχάρων στο γλεύκος (Delgado *et al.*, 2004).

Η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών του εδάφους έχει σημαντική επίδραση στην παραγωγικότητα και ποιότητα των σταφυλών (Jackson and Lombard, 1993; Nair, 1998). Διαφορετικές πηγές αναφέρουν ότι η σύνθεση σε συστατικά των ραγών διαμορφώνεται ανάλογα με τις διαφορετικές συνθήκες θρέψης και διαθεσιμότητας σε νερό του περιβάλλοντος και οι διαφορές αυτές είναι αντιληπτές και στους παραγόμενους οίνους (Brancadoro *et al.*, 1994). Σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και στα διαφορετικά στάδια του αναπαραγωγικού κύκλου της αμπέλου, τα συμπτώματα έλλειψης ή περίσσειας σε κάλιο μπορούν να γίνουν αντιληπτά. Η περίσσεια καλίου εκδηλώνεται με την αύξηση της τιμής του pH του γλεύκους, λόγω της δημιουργίας αλάτων του τρυγικού και μηλικού οξέος (Brancadoro *et al.*, 1994). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να επιδράσει αρνητικά στην ποιότητα του παραγόμενου οίνου, ιδιαίτερα σε περιοχές με θερμό κλίμα (Ruhl, 1989) και σε ποικιλίες όπου η

υψηλή περιεκτικότητα καλίου συνδέεται με την ανεπάρκεια στοιχείων όπως το μαγνήσιο και το ασβέστιο, εκδηλώνεται ως νέκρωση διαφόρων στελεχών του φυτού, καθώς και σε ποικιλίες που παράγουν οίνους με χαμηλή οξύτητα. Η ανεπάρκεια καλίου εκδηλώνεται με την μειωμένη περιεκτικότητα των ραγών σε διαλυτά στερεά και την μειωμένη σύνθεση πολυφαινόλων και αμινοξέων (Brancadoro *et al.*, 1994). Επιπρόσθετα το φυτό είναι πιο επιρρεπές σε συνθήκες πάγου και ξηρασίας (Morris *et al.*, 1983; Champagnol, 1988; Ruhl *et al.*, 1988).

Στις ράγες το κάλιο είναι το πιο άφθονο κατιόν (Hradzina *et al.*, 1984) το οποίο συμβάλλει στην μεταφορά των σακχάρων και την μείωση της οξύτητας, ενώ αλληλεπιδρά με το τρυγικό οξύ και σχηματίζει το όξινο τρυγικό κάλιο, προϊόν ιδιαίτερα δυσδιάλυτο (Sommers 1977).

Το κάλιο ανήκει στην κατηγορία των μετάλλων που είναι απαραίτητα για τη θρέψη των φύτων και μάλιστα σε μεγαλύτερη αναλογία σε σχέση με τα άλλα. Αποτελεί το πιο σημαντικό ανόργανο στοιχείο των διαλυτών συστατικών του φυτού. Ο ρόλος του έγκειται στην διατήρηση ωσμωτικού δυναμικού στα φυτικά κύτταρα καθώς και η διατήρηση της ηλεκτροχημικής ισορροπίας στα κύτταρα και η ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας (Hsiao and Läuchli, 1986). Ο ρόλος του αφορά επίσης το ενεργειακό ισοζύγιο του φυτού, την μεταφορά και συσσώρευση των μεταβολιτών και τη διατήρηση του υδατικού δυναμικού των ιστών (Marschner 1995). Η δράση του καλίου αφορά επίσης το μέγεθος και την ποιότητα της παραγωγής. Συμβάλλει θετικά στο μέγεθος των ραγών και ενδυναμώνει την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, καθώς και στην μεταφορά των σακχάρων (Lang 1983) και τον σχηματισμό των υδρογονανθράκων. Δρά σημαντικά κατά των ασθενειών που μπορεί να προσβάλλουν το φυτό και επιδρά θετικά σε συνθήκες ξηρασίας και παγετού (Imas and Bansal 1999). Υψηλές συγκεντρώσεις καλίου αυξάνουν τα ολικά διαλυτά στερεά και μειώνουν την ολική οξύτητα των ραγών (Martin *et al.*, 2004).

Σε περιπτώσεις υψηλού pH των παραγόμενων οίνων, λόγω περίσσειας καλίου, η τεχνική οινοποίησης που ακολουθείται μπορεί να μετριάσει τις αρνητικές επιπτώσεις, μέσω της ρύθμισης του pH, ωστόσο αυτό αποτελεί επιπρόσθετο κόστος για την παραγωγή. Η συγκέντρωση του καλίου στο γλεύκος και το pH ενδέχεται να αντανακλούν τις συνθήκες του περιβάλλοντος όπως το είδος του εδάφους και τη συγκέντρωση του καλίου στο έδαφος, αν και ο τύπος του υποκειμένου (Rühl, 1991), η ποικιλία αμπέλου (Schaller *et al.*, 1992) και οι καλλιεργητικές τεχνικές που μεταβάλλουν τις συνθήκες σκίασης και έκθεσης στον ήλιο (Jackson and Lombard

1993), αλληλεπιδρούν με τις εδαφικές συνθήκες επηρεάζοντας το αποτέλεσμα. Η λίπανση του εδάφους είναι μια σημαντική καλλιεργητική τεχνική με σημαντικές επιδράσεις στην παραγωγικότητα του αμπελώνα και την ποιότητα των σταφυλών. Οι Amiri και Fallahi αναφέρουν ότι το κάλιο μόνο του ή σε συνδυασμό με το N και Mg αυξάνουν την περιεκτικότητα σε διαλυτά στερεά σε επιτραπέζιες ποικιλίες, καθώς και την παραγωγικότητα του αμπελώνα. Ο Delgado *et al.*, (2004), επισημαίνει ότι η λίπανση με κάλιο δεν επηρεάζει την περιεκτικότητα σε διαλυτά στερεά, αλλά ο συνδυασμός λίπανσης N – K μπορεί να επιφέρει θετικά αποτελέσματα στην συγκέντρωση φαινολικών συστατικών των ραγών (Topalovic, 2011).

Στις ράγες υψηλές περιεκτικότητες σε κάλιο ισοδυναμούν με την επιβράδυνση της αποδιοργάνωσης του μηλικού οξέος, λόγω της παρεμπόδισης της μεταφοράς του μηλικού από τους μεσοκυττάρους χώρους στο κυτόπλασμα, όπου λαμβάνει χώρα η υποβάθμισή του (Hale 1977). Κατά την οينوποίηση υψηλές ποσότητες καλίου οδηγούν στη δημιουργία αλάτων του τρυγικού οξέος, κι έτσι μειώνεται η ποσότητα του ελεύθερου τρυγικού. Έτσι μειώνεται ο λόγος τρυγικό: μηλικό οξύ, γεγονός ανεπιθύμητο για παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας (Mpelasoka *et al.*, 2003). Γλεύκος με υψηλό pH έχει ως συνέπεια την παραγωγή οίνων χωρίς σταθερότητα που είναι πιο επιρρεπείς σε οξειδωτικές και μικροβιακές αλλοιώσεις, χαμηλή οξύτητα και χωρίς «σώμα» (Somers, 1977). Το υψηλό pH γλεύκους και οίνου, υποβαθμίζει την ποιότητα του χρώματος των ερυθρών οίνων. Ο βαθμός ιονισμού των ανθοκυανών που αποτελεί το ποσοστό των ανθοκυανών που βρίσκεται στην ερυθρή μορφή, μειώνεται όσο το pH αυξάνεται (Somers, 1975). Οι ανθοκυάνες βρίσκονται στον φλοιό των ραγών (Somers and Pocock, 1986), όπου η συγκέντρωση του καλίου είναι υψηλότερη από αυτή στην σάρκα (Pland and Coombe 1988, Walker *et al.*, 1998). Επομένως τα επίπεδα καλίου ενδιαφέρουν περισσότερο στις ερυθρές ποικιλίες σε σχέση με τις λευκές, καθώς κατά την ερυθρή οينوποίηση λαμβάνει χώρα η εκχύλιση, κατά την διάρκεια της οποίας μεγαλύτερες ποσότητες καλίου μπορεί να περιέλθουν στο γλεύκος και μετέπειτα στον οίνο (Mpelasoka *et al.*, 2003).

Ο ρόλος του καλίου στα φυτά ως φυσιολογικού – βιοχημικού παράγοντα μπορεί να διακριθεί σε τέσσερις κατηγορίες: δραστηριοποίηση ενζύμων (Leigh and Wyn Jones 1984, Walker *et al.*, 1998), συμμετοχή στον μηχανισμό μεταφοράς και συσσώρευσης στοιχείων δια μέσου των κυτταρικών μεμβρανών (Salisbury and Ross 1992, p. 157, Patrick *et al.*, 2001), ουδετεροποίηση των ανιόντων για την διατήρηση του δυναμικού των μεμβρανών (Maathuis and Sanders 1996, Leigh 2001) και ρύθμιση του

ωσμωτικού δυναμικού των κυττάρων (Davies and Zhang 1991), άρα ρύθμιση της σπαργής και ανάπτυξης.

Μια απότομη αύξηση στο ποσοστό του καλίου που εμπεριέχεται στις ράγες παρατηρείται στην έναρξη της ωρίμανσης (Ollat and Gaudillère 1996). Το κάλιο επηρεάζει την μετακίνηση των διαλυμένων ουσιών προς την ράγα, μέσω της μετακίνησης του στο φλοίωμα (Lang 1983). Μετά τον περκασμό αυξάνονται σημαντικά οι ποσότητες του καλίου και των διαλυτών στερεών. Η σχέση αναμεσά τους κατά την ωρίμανση αλλάζει (Freeman and Kliewer 1983). Ο θετικός συσχετισμός της περιεκτικότητας της ράγας σε κάλιο και σε σάκχαρα, είναι αναμενόμενος όταν το κάλιο συμμετέχει στην μεταφορά των διαλυμένων ουσιών. Σε περιπτώσεις μικρής περιεκτικότητας των ραγών σε σάκχαρα, προκαλείται μεγαλύτερη συσσώρευση του καλίου, καθώς αποτελεί έναν ισχυρό παράγοντα ώσμωσης, γεγονός που μεταβάλλει επίσης τη σχέση καλίου και σακχάρων της ράγας (Mpelasoka *et al.*, 2003).

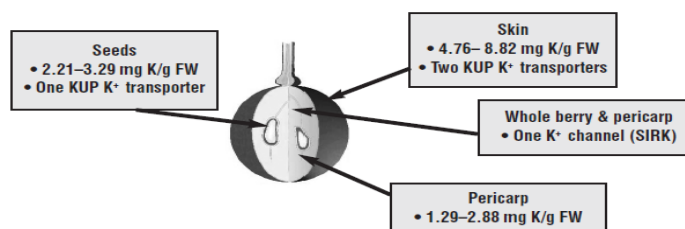
Θεωρείται ότι η συγκέντρωση του καλίου στο έδαφος καθορίζει τον μηχανισμό εισόδου του στο φυτό. Έτσι σε περιπτώσεις υψηλής συγκέντρωσής του στο έδαφος ο μηχανισμός εισόδου του μέσω διόδων είναι αυτός που λαμβάνει χώρα, ενώ σε περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης είναι απαραίτητη η δράση μεταφορέων για την πρόσληψή του (Maathuis and Sanders 1996). Ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι η πρόσληψη του καλίου σε περιπτώσεις μικρής συγκέντρωσης του, μπορεί να γίνει μέσω των διόδων μεταφοράς αυτού, όταν επικρατούν συνθήκες αρνητικού δυναμικού στις κυτταρικές μεμβράνες (Hirsch *et al.*, 1998). Η αναγνώριση και ταυτοποίηση των διαδρομών του καλίου και των μεταφορέων αυτού έχει αναφερθεί σε μελέτες των Czempinski *et al.*, (1999), Rodriguez-Navarro (2000), και Schachtman (2000), ο μηχανισμός δράσης των μεταφορέων καλίου από τον Blatt (1999) και οι κυτταρικοί μηχανισμοί δράσης των μεταφορέων καλίου από τους Véry and Sentenac (2003).

Το κάλιο είναι το κατιόν που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία στο φυτό της αμπέλου και η συγκέντρωσή του αυξάνει κατά την καλλιεργητική περίοδο (Conradie 1981, Possner and Kliewer 1985, Doneche and Chardonnet 1992, Boselli *et al.*, 1995, Rogiers *et al.*, 2001) με έντονο ρυθμό στην έναρξη της ωρίμανσης (Ollat and Gaudillère 1996). Η συγκέντρωση του καλίου / μονάδα νωπού βάρους ίσως να αυξηθεί (Hale 1977) ή να παραμείνει σταθερή (Boselli *et al.*, 1995). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο ότι η συγκέντρωση καλίου είναι το αποτέλεσμα του ρυθμού αύξησης της ράγας και του ρυθμού αφομοίωσής του σε αυτήν. Παράγοντες

όπως η ποικιλία αμπέλου, το μέγεθος της παραγωγής, το κλίμα και οι καλλιεργητικές τεχνικές που επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης της ράγας και συσσώρευσης του καλίου σε αυτήν, επηρεάζουν αντίστοιχα την συγκέντρωση του καλίου σε αυτήν. Στους ιστούς της ράγας το κάλιο βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στον φλοιό σε σχέση με τη σάρκα (Coombe 1987, Pland and Coombe 1988, Walker *et al.*, 1998). Η συγκέντρωση του καλίου στα γίγαρτα είναι μικρότερη σε σχέση με τον φλοιό, αλλά μεγαλύτερη σε σχέση με την σάρκα (Walker *et al.*, 1998). Ωστόσο η συγκέντρωση του καλίου στους διάφορους ιστούς διαφέρει σημαντικά ανάλογα με την ποικιλία και το υποκείμενο (Mpelasoka *et al.*, 2003).

Το ποσοστό του Κ που εισέρχεται στη ράγα είναι πιθανό να εξαρτάται από τον όγκο των εισροών στο ξύλωμα και φλοιώμα και την συγκέντρωση του Κ στο φυτό. Απώλεια του Κ από τη ράγα μπορεί να προκύψει μέσω του ξυλώματος με επιστροφή από τη ράγα προς το υπόλοιπο τμήμα της αμπέλου (Lang και Thorpe 1989) κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της ανάπτυξης της. Η συσσώρευση του Κ σε μόνιμες δομές της αμπέλου (ρίζες, κορμό) λαμβάνει χώρα καθόλη την καλλιεργητική περίοδο, συμπεριλαμβανομένης της περιόδου μετά τη συγκομιδή. Το κάλιο που βρίσκεται σε αυτές τις δομές, μπορεί να κινητοποιηθεί για να υποστηρίξει τις νέες ρίζες, βλαστούς, φύλλα, καθώς και σταφύλια, όταν η πρόσληψη από το έδαφος είναι ανεπαρκής για να καλύψει την τρέχουσα ζήτηση. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, οι ράγες φαίνεται να είναι ο ισχυρότερος παράγοντας απορρόφησης του καλίου, ειδικά κατά τον περκασμό και μέχρι την συγκομιδή. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην υψηλή ζήτηση της ράγας για Κ κατά τη διάρκεια της ταχείας ανάπτυξης των κυττάρων. Κατά τη συγκομιδή, το ποσοστό καλίου στα σταφύλια ανέρχεται σε 60% ή περισσότερο της συνολικής περιεκτικότητας σε Κ των υπέργειων οργάνων (Conradie 1981, Smart *et al.*, 1985a, Williams *et al.*, 1987).

Figure 4. This model shows type and location of a K⁺ channel and two K⁺ transporters localised in grape berry tissues. A SIRC K⁺ channel was found in whole berry and berry pericarp (Pratelli *et al.* 2002). A KUP K⁺ transporter was found in seed and two KUP K⁺ transporters were found in berry skin (Schachtman, Davies, Liu and Thomas unpublished). SIRC encodes an inward rectifying K⁺ channel in the Shaker family. KUP encodes a specific type of K⁺ transporter. Potassium concentrations in different berry tissues are based on data from Walker *et al.* 1998. The berry image was redrawn from Coombe (2001).



Εικόνα 16: Η διασπορά του καλίου στη ράγα

Πηγή: Mpelasoka B.S., Schachtman D. P., Treeby M. T. Thomas M. R. (2003). *A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation.* Australian Journal of Grape and Wine Research, vol. 9, p. 154–168

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την συσσώρευση του καλίου είναι οι εξής:

- Εδαφικοί παράγοντες: Η πρόσληψη του Κ από τις ρίζες των φυτών προσδιορίζεται από τα επίπεδα του Κ στο έδαφος που είναι διαθέσιμα για τα φυτά, καθώς και από την ανάπτυξη, το μέγεθος και φυσιολογική ενεργότητα των φυτικών ριζών. Οι παράγοντες αυτοί επηρεάζονται από φυσικές (υφή, υγρασία, διαπερατότητα, βάθος) και χημικές (αντίδραση του εδάφους, pH και σύνθεση του εδάφους) ιδιότητες του εδάφους.
- Ποικιλία, υποκείμενο και συνδυασμός υποκειμένου – μοσχεύματος: τα φυτά διαφέρουν στην απόδοση του Κ, η οποία ορίζεται ως η ικανότητα τους να αποκτούν υψηλές σχετικές αποδόσεις σε χαμηλή διαθεσιμότητα Κ. Στα φυτά αμπέλου, οι διαφορές στην συγκέντρωση του Κ στις ράγες και το γλεύκος εντοπίζονται σε σχέση με: διαφορετικές ποικιλίες και διαφορετικό ριζικό σύστημα (Christensen 1984, Robinson και McCarthy 1985, Walker *et al.*, 1998), ίδιες ποικιλίες για όμοια υποκείμενα (Rühl *et al.*, 1988, Walker *et al.*, 1998, Gawel *et al.*, 2000), διαφορετικές ποικιλίες με το ίδιο υποκείμενο (Boselli *et al.*, 1995, Arroyo *et al.*, 1997, Walker *et al.*, 1998) διαφορετικά υποκείμενα που δεν έχουν εμβολιασθεί (Rühl 1989b, 2000).
- Ανάπτυξη ράγας, αριθμός γιγάρτων και φυτικές ορμόνες: Σε αμπέλια, ο αυξημένος αριθμός γιγάρτων ανά ράγα οδηγεί σε μεγαλύτερο τελικό μέγεθος ράγας (Cawthon και Morris, 1982, Boselli *et al.*, 1995), αλλά έχει μικρή επίδραση στην συγκέντρωση Κ στη ράγα (Boselli *et al.*, 1995). Φαίνεται πιθανό ότι ο αριθμός γιγάρτων ανά ράγα να επηρεάζει το τελικό μέγεθος της ράγας και ως εκ τούτου την διασπορά του καλίου σε αυτήν. Μικρές διαφορές στο μέγεθος της ράγας μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντικές διαφορές στο λόγο σάρκα: φλοιός (Somers και Pocock 1986). Η συγκέντρωση του Κ στον φλοιό επίσης φέρεται να είναι υψηλότερο για τις μικρότερες σε σύγκριση με μεγαλύτερες ράγες (Storey 1987) και αυτή η παράμετρος μπορεί να έχει επιπτώσεις στην ποιότητα του οίνου. Η ορμόνη ABA μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κίνησης του Κ από τις ρίζες στους βλαστούς ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες στρες, κάτι που μπορεί να επηρεάσει τη συνολική περιεκτικότητα σε Κ του φυτού και τελικά το περιεχόμενο Κ στη ράγα.

- Μικροκλίμα αμπελώνα: Ο βαθμός έκθεσης στο φως, η σκίαση και πιθανώς οι συνθήκες αναπνοής φαίνεται να είναι σημαντικοί για τη συσσώρευση Κ στις ράγες. Αυξημένη συσσώρευση Κ στον αμπελώνα, τις ράγες και το γλεύκος έχει παρατηρηθεί ως αποτέλεσμα της σκίασης με εφαρμογή τεχνητής σκιάς (Rojas-Lara και Morison 1989) ή από την φυλλική επιφάνεια (Smart *et al.*, 1985a, Archer and Strauss 1989, Dokoozlian and Kliewer 1995, Dokoozlian and Kliewer 1996).
- Καλλιεργητικές τεχνικές: αφορούν την διαχείριση του αμπελώνα, την ρύθμιση της παραγωγής, την προσθήκη θρεπτικών στοιχείων και την άρδευση (Mpelasoka *et al.*, 2003). Σε σχέση με την προσθήκη θρεπτικών συστατικών: Οι επιπτώσεις της προσθήκης καλίου στην συγκέντρωσή του στις ράγες είναι ποικίλες. Αποτελέσματα από μερικές μελέτες υποδεικνύουν ότι το κάλιο σε ράγες, γλεύκος ή οίνο αυξάνει όταν στο φυτό παρέχεται Κ (Downton 1977, Morris *et al.*, 1980, Rühl 1989a), ενώ άλλοι δεν αναφέρουν σημαντική επίδραση της λίπανσης με κάλιο στην συγκέντρωση του στην ράγα ή το γλεύκος (Rankine κ.ά. 1971, ο Freeman και Kliewer 1983). Οι διαφορές αυτές μπορούν να αποδοθούν σε περίπλοκες χημικές αντιδράσεις που εμπλέκεται το κάλιο στο έδαφος. Δεν είναι όλες οι μορφές καλίου που υπάρχουν στο έδαφος διαθέσιμες για τα φυτά και είναι μάλλον απίθανο ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του διαθέσιμου Κ στο έδαφος είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό του καλιούχου λιπάσματος που προστίθενται. Η επίδραση της καλιούχου λίπανσης στο ποσοστό του εδαφικού καλίου που είναι διαθέσιμο καθώς και στη συσσώρευση του καλίου στις ράγες, επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως το ποσό και ο τύπος του λιπάσματος που εφαρμόζεται, ο χρόνος και η συχνότητα εφαρμογής, χαρακτηριστικά γνωρίσματα του εδάφους, η διαχείριση του αμπελώνα, το ποσοστό και η συχνότητας άρδευσης, η δραστηριότητα του ριζικού συστήματος και η αρχική θρεπτική κατάσταση της αμπέλου. Διαφορετική ποικιλία *Vitis vinifera*, ζωνρότητα και απόδοση της καλλιέργειας, μπορεί να ανταποκρίνονται διαφορετικά σε συγκεκριμένα επίπεδα διαθεσιμότητας εδαφικού καλίου (Mpelasoka *et al.*, 2003).

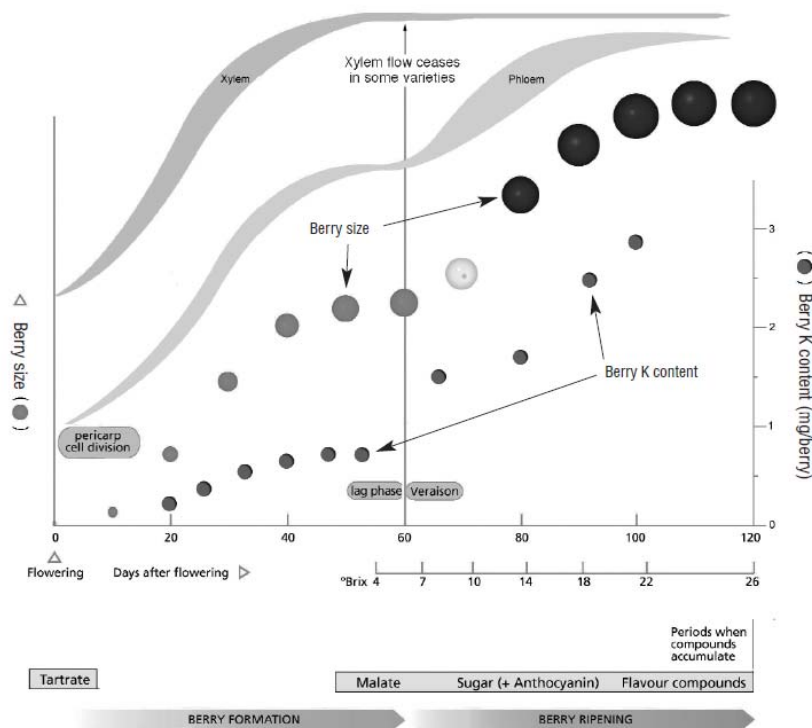


Figure 1. This model shows the pattern of K accumulation by grape berries in relation to the pattern of grape berry growth and development. Also shown are the proposed relative proportions of the inflow of xylem and phloem saps into the berry. The relative proportions before veraison is not clearly known, but here illustrated to be higher for xylem than phloem. After veraison, the inflow of xylem sap decreases or ceases, which may depend on varieties, while the inflow of phloem sap increases until near harvest when it decreases. Diagram of grape berry growth and development was taken from Coombe (2001) with slight modification. Data on berry K accumulation were taken from Ollat and Gaudillère (1996).

Εικόνα 17: Η εξέλιξη της συγκέντρωσης του καλίου κατά την ωρίμανση των ραγών

Πηγή: Mpelasoka B.S., Schachtman D. P., Treeby M. T. Thomas M. R. (2003). *A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation*. Australian Journal of Grape and Wine Research, vol. 9, p. 154–168

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: Το Αγιωργίτικο & η περιοχή μελέτης

ι) Η ποικιλία Αγιωργίτικο

Η ποικιλία Αγιωργίτικο αποτελεί μια από τις ευγενέστερες ελληνικές ερυθρές ποικιλίες, ενώ καλλιεργείται στην περιοχή της Νεμέας (Σταυρακάκης, 2010). Είναι μια ποικιλία μέτρια ζωηρή, εύρωστη, με όψιμη ωρίμανση και πολύ παραγωγική (Σταυρακάκης, 2010). Η ποικιλία είναι πολύ ευαίσθητη στον περονόσπορο, το ωίδιο και τον βοτρυτή (Σταύρακας, 2011). Η διαμόρφωσή του γινόνταν παλαιότερα σε χαμηλό κυπελλοειδές, ωστόσο σήμερα εφαρμόζεται το σύστημα Royat, διπλό, με μεταβλητό ύψος από την επιφάνεια του εδάφους (Σταύρακας, 2011). Θεωρείται ποικιλία πολυδυναμική, η οποία οδηγεί στην παραγωγή οίνων πλούσιων σε ανθοκυάνες (Σταύρακας, 2011). Κατά την Χαρβαλιά πρόκειται για μια από τις τέσσερις πιο πλούσιες σε ανθοκυάνες ελληνικές ποικιλίες (Σταύρακας, 2011). Η ποικιλία παρουσιάζει μεγάλο δυναμικό παραγωγής, ενώ το γλεύκος της χαρακτηρίζεται για την υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, τη χαμηλή οξύτητα, και pH που κυμαίνεται από 3,4 – 3,8 (Σταυρακάκης, 2010).



Εικόνα 18: Η ποικιλία *Vitis vinifera* «Αγιωργίτικο»

Πηγή: http://portal.kathimerini.gr/4dcgi/w_articles_oiko1_1_08/12/2009_312231

ii) Η περιοχή μελέτης

Ο πειραματικός αμπελώνας βρίσκεται στην περιοχή της Νεμέας. Η αμπελουργική ζώνη παραγωγής ερυθρών οίνων «Νεμέα», είναι η μεγαλύτερη στην Ελλάδα και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια εδαφικών και κλιματικών συνθηκών (Σταυρακάκης, 2010).

Ο πειραματικός αμπελώνας βρίσκεται στην περιοχή του Ασπρόκαμπου – Ψαρίου, με μέγιστο υψόμετρο τα 1.175 μ. Το κλίμα της ευρύτερης περιοχής χαρακτηρίζεται ως μεσογειακό, με ήπιους, βροχερούς χειμώνες και με καλοκαίρια ξηρά και μεγάλης διάρκειας. Οι τιμές των μέσων ετήσιων βροχοπτώσεων παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση. Ο πειραματικός αμπελώνας ανήκει στην αμπελουργική ζώνη ΠΟΠ Νεμέα, έχει γεωγραφικό πλάτος 37° , γεωγραφικό μήκος 023° και το υψόμετρο κυμαίνεται από 670 – 760 μ.



Εικόνα 19: Ο πειραματικός αμπελώνας στην περιοχή της Νεμέας

Μέρος II: Μέθοδοι & Υλικά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: Το πείραμα

Ο πειραματικός αμπελώνας βρίσκεται στην περιοχή Ασπρόκαμπος της Νεμέας. Τα πρέμνα είναι ηλικίας 10 ετών και είναι εμβολιασμένα στο υποκείμενο Richter (R)110 (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*). Τα πρέμνα είναι διαμορφωμένα με γραμμικό σύστημα υποστύλωσης (αμφίπλευρο Royat). Ο αριθμός των βραχιόνων κυμαίνεται από 6 – 8 σε κάθε πρέμνο και εφαρμόζεται βραχύ κλάδεμα καρποφορίας. Οι αποστάσεις φύτευσης είναι 1,1 X 2,3. Ο αμπελώνας παρουσιάζει κλίση και έχει την ίδια κατεύθυνση σειρών (ΒΔ – ΝΑ). Το έδαφος του πειραματικού αμπελώνα είναι αργιλοπηλώδες, βαρύ, μέτρια αλκαλικό με pH 7,36 με μικρή περιεκτικότητα σε ενεργό CaCO₃, κανονική ηλεκτρική αγωγιμότητα, ενώ η περιεκτικότητα σε οργανική ουσία κυμαίνεται στο 1%. Η περιεκτικότητα του εδάφους σε κάλιο ήταν μικρή έως μέτρια, πριν τις επεμβάσεις με κάλιο.

Στο πείραμα λίπανσης που εφαρμόστηκε κατά τα έτη 2009, 2010 και 2011, ακολουθήθηκε το τυχαίοποιημένο σχέδιο με τέσσερις επαναλήψεις των 10 πρέμνων, ανά επέμβαση. Ο αριθμός των επεμβάσεων είναι επτά (7), μαζί με τον μάρτυρα και οι επεμβάσεις διαχωρίζονται με σειρά μάρτυρα για την κάθε επέμβαση.

Οι λιπάνσεις που πραγματοποιήθηκαν για το κάθε στοιχείο είναι οι εξής:

- Άζωτο (N) : οι επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν τον Μάρτιο (2009, 2010, 2011) και η ποσότητα του αζωτούχου λιπάσματος (νιτροθευική αμμωνία με περιεκτικότητα 26% σε N), ήταν σταθερή για όλες τις επεμβάσεις και τον μάρτυρα (80 Kg/ha).
- Φώσφορος (P) : η λίπανση με φώσφορο έγινε κατά τους μήνες Δεκέμβριο – Ιανουάριο και η ποσότητα φωσφορούχου λιπάσματος (χρησιμοποιήθηκε το τριπλό υπερφωσφορικό TSP, με 46% σε P₂O₅) ήταν επίσης σταθερή για όλες τις επεμβάσεις (40 Kg/ha).
- Κάλιο (K): η επέμβαση με κάλιο έγινε τον Ιανουάριο των ετών 2009, 2010, 2011. Χρησιμοποιήθηκε το χλωριούχο κάλιο (KCL με περιεκτικότητα 60% σε K₂O), το θεικό κάλιο (50% K₂O , 18% S) και ένα λίπασμα με υψηλή περιεκτικότητα σε K, Mg και S (30% K₂O, 10% MgO, 17% S).

Πίνακας 1: Οι επεμβάσεις της καλιούχου λίπανσης σε Kg / ha

Επεμβάσεις καλιούχου λίπανσης σε Kg / ha					
ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΛΙΠΑΣΜΑ	N	P₂O₅	K₂O	MgO
A	N:P (ΜΑΡΤΥΡΑΣ)	80 Kg/ha	40 Kg/ha	0 Kg/ha	0 Kg/ha
B	N:P:K (ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΚΑΛΙΟ)	80 Kg/ha	40 Kg/ha	80 Kg/ha	0 Kg/ha
Γ	N:P:K (ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΚΑΛΙΟ)	80 Kg/ha	40 Kg/ha	160 Kg/ha	0 Kg/ha
Δ	N:P:K (ΘΕΠΙΚΟ ΚΑΛΙΟ)	80 Kg/ha	40 Kg/ha	80 Kg/ha	0 Kg/ha
E	N:P:K (ΘΕΠΙΚΟ ΚΑΛΙΟ)	80 Kg/ha	40 Kg/ha	160 Kg/ha	0 Kg/ha
Z	N:P:K :Mg	80 Kg/ha	40 Kg/ha	80 Kg/ha	27 Kg/ha
H	N:P:K :Mg	80 Kg/ha	40 Kg/ha	160 Kg/ha	54 Kg/ha

Πίνακας 2: Οι επεμβάσεις της καλιούχου λίπανσης σε g ανά πρέμνο

Επεμβάσεις καλιούχου λίπανσης σε g / πρέμνο					
ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΛΙΠΑΣΜΑ	N	P₂O₅	K₂O	MgO
A	N:P (ΜΑΡΤΥΡΑΣ)	88 g	25 g	0 g	0 g
B	N:P:K (ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΚΑΛΙΟ)	88 g	25 g	46 g	0 g
Γ	N:P:K (ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΚΑΛΙΟ)	88 g	25 g	92 g	0 g
Δ	N:P:K (ΘΕΠΙΚΟ ΚΑΛΙΟ)	88 g	25 g	38 g	0 g
E	N:P:K (ΘΕΠΙΚΟ ΚΑΛΙΟ)	88 g	25 g	76 g	0 g
Z	N:P:K :Mg	88 g	25 g	76 g	76 g
H	N:P:K :Mg	88 g	25 g	152 g	152 g

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: Οι αναλύσεις

i) Αναλύσεις σε ράγες

Για την πραγματοποίηση των αναλύσεων σε ολόκληρες ράγες, λαμβάνεται αντιπροσωπευτικό δείγμα από 50 ράγες, οι οποίες αφού ζυγισθούν, ομογενοποιούνται με τη χρήση Ultra Turrax T25. Η ομογενοποίηση πραγματοποιείται στις 24.000rpm έως ότου επιτευχθεί ο επιθυμητός βαθμός πολτοποίησης. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα. Ο χρόνος πολτοποίησης επίσης παραμένει ο ίδιος για όλα τα δείγματα. Στην συνέχεια το ομογενοποιημένο δείγμα φυλάσσεται σε πλαστικούς περιέκτες.



Εικόνα 20: Ultra Turrax T25

Πραγματοποιήθηκαν οι εξής αναλύσεις:

- 1) Προσδιορισμός ολικών ανθοκυανών και φαινολικών με την μέθοδο που περιγράφεται από τον Pand *et al* (1996, 2000): η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται για τον προσδιορισμό των ολικών ανθοκυανών και φαινολικών σε ερυθρές ποικιλίες. Η μέθοδος βασίζεται στην εξαγωγή των συστατικών αυτών σε ομογενοποιημένο δείγμα, έκφραση του χρώματός τους σε χαμηλό pH και ποσοτικοποίηση του ποσοστού τους μέσω της απορρόφησης τους στην ορατή περιοχή του φάσματος του φωτός. Για την εξαγωγή των ανθοκυανών χρησιμοποιείται 50 % υδατικό διάλυμα αιθανόλης με pH 2 έτσι ώστε με εκχύλιση που διαρκεί 1 ώρα να εξάγεται το 94% των ανθοκυανών του δείγματος. Ο γλυκοζίτης της μαλβιδίνης θεωρείται η ανθοκυάνη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία στις ράγες των *Vitis vinifera* ποικιλιών. Αν και δεν είναι η μοναδική

ανθοκυάνη τα αποτελέσματα της μεθόδου εκφράζονται σε ισοδύναμο μαλβιδίνης για συγκριτικούς σκοπούς. Όταν η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιείται και στα 280 nm τότε υπάρχει μέτρηση και των ολικών φαινολικών του δείγματος. 1g πολτοποιημένου δείγματος μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται 10mL υδατικού διαλύματος αιθανόλης (50% v/v, pH 2.0 με HCl) και αφήνεται 1h για εκχύλιση, υπό ανάδευση. Μετά από φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 min, λαβάνεται 0,5mL και αραιώνεται με 10mL υδατικού διαλύματος 1M HCl και μετά το πέρας 3 ωρών λαμβάνονται οι οπτικές πυκνότητες στα 700, 520, 280 nm. Η πρώτη απορρόφηση λαμβάνεται προκειμένου για την εξασφάλιση αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων (όταν 700nm>0,01 τότε το αποτέλεσμα δεν είναι έγκυρο).

Οι τιμές των απορροφήσεων στα 520nm και στα 280 nm χρησιμοποιούνται στους τύπους:

$$\text{Ανθοκυάνες mg/ράγα} = \frac{A_{520}}{500} * \text{αραιώση} * \frac{\text{τελικός όγκος εκχύλισης (mg)}}{100} *$$

$$\frac{\text{Βάρος 50 ραγών (g)}}{\text{Βάρος δείγματος που εκχυλίστηκε (g)}} * 1000$$

$$\frac{\text{Βάρος 50 ραγών (g)}}{\text{Βάρος δείγματος που εκχυλίστηκε (g)}} = 50$$

$$\text{Ανθοκυάνες / g ράγας} = \frac{\text{ανθοκυάνες mg / ράγα}}{\text{βάρος 50 ραγών / 50}}$$

Ολικά φαινολικά συστατικά ανά ράγα (μονάδες απορρόφησης (au)/ράγα) :

$$= A_{280} \times \text{αραιώση} \times \frac{\text{τελικός όγκος εκχύλισης (ml)}}{100} \times$$

$$\frac{\text{βάρος 50 ραγών}}{\text{βάρος δείγματος που εκχυλίστηκε (g)}} \times \frac{1}{50}$$

Ολικά φαινολικά συστατικά ανά γραμμάριο ράγας (μονάδες απορρόφησης (au)/g ράγας) :

$$= \frac{\text{Ολικά φαινολικά συστατικά ανά ράγα (μονάδες απορρόφησης (au))}}{\text{μέσο βάρος 50 ραγών (g)}}$$

2) Μέθοδος προσδιορισμού της εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών και ταννινών και του φαινολικού δυναμικού των ραγών: Η “Glories” μέθοδος εκτιμά την φαινολική ωρίμανση των ραγών. Παρέχει πληροφορίες τόσο ποσοτικές (ολικό δυναμικό σε ανθοκυάνες και ταννίνες), όσο και ποιοτικές (εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών, βαθμός ωρίμανσης των γιγάρτων) των πολυφαινολών. Ουσιαστικά η μέθοδος αποτελεί ένα μέσο διάκρισης του φαινολικού δυναμικού μιας ποικιλίας και της δυνατότητας εκχύλισης των ανθοκυανών που εμπεριέχει. Η μέθοδος βασίζεται στην χρήση δύο διαλυμάτων με διαφορετικό pH. Σε pH = 1 πραγματοποιείται εκχύλιση όλων των ανθοκυανών του δείγματος, ενώ σε pH = 3,6 αναπαριστά τις πραγματικές συνθήκες εκχύλισης και η απελευθέρωση των ανθοκυανών από τον φλοιό των ραγών εξαρτάται από το πορώδες των κυτταρικών μεμβρανών. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο τιμές pH δίνει μια ένδειξη της εκχυλισματικότητας των χρωστικών ουσιών (AE%), που είναι συνάρτηση τόσο της ωριμότητας των ραγών αλλά και της περατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτές οι παράμετροι έχουν πολύ μεγάλη πρακτική σημασία, δεδομένου ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της διαδικασίας εκχύλισης των ανθοκυανών και την προσαρμογή των τεχνικών οινοποίησης στις πραγματικές συνθήκες υπό τις οποίες υφίσταται η εκχύλιση.

- **A pH 1:** Συνολικό δυναμικό σε ανθοκυάνες
- **A pH 3.6:** Συνολικό δυναμικό σε εκχυλίσιμες ανθοκυάνες στο pH του οίνου
- **AE%:** Εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών $AE\% = \frac{A_{pH1} - A_{pH3,6}}{A_{pH1}} \times 100$
 - Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή AE% τόσο πιο εύκολα εκχυλίζονται οι ανθοκυάνες
- **dpell:** Η συγκέντρωση των ταννινών που προέρχονται από τους φλοιούς:
 $A_{pH3,6} * 40$
- **dTrep:** Η συγκέντρωση των ταννινών που προέρχονται από τα γιγάρτα:
 $A_{280} - dpell$

- **MP%:** Βαθμός ωριμότητας των γιγάρτων, βαθμός συμμετοχής των ταννινών των γιγάρτων στο σύνολο των φαινολικών:

$$\frac{OD\ 280 - (A\ pH\ 3,6\ 40)}{OD\ 280} \times 100$$

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι υδατικά, pH 1 (HCL N/10) και pH 3,6. Σε μια κωνική φιάλη προστίθεται 20 g ομογενοποιημένου πολτού ραγών και 20 ml διαλύματος pH 1 ενώ σε μια άλλη 20 g ομογενοποιημένου πολτού και 20 ml διαλύματος pH 3,6. Οι δυο φιάλες παραμένουν σε σκοτεινό μέρος για 4 ώρες. Μετά από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4000rpm γίνεται προσδιορισμός των ολικών ανθοκυανών στα υπερκείμενα διαλύματα με τη μέθοδο του αποχρωματισμού με SO₂: η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα των ανθοκυανών να διαμορφώνουν το χρώμα τους ανάλογα με το pH του διαλύματος και να αποχρωματίζονται παρουσία SO₂ (Ribereau-Gayon and Stonestreet, 1965). Η μέθοδος αποχρωματισμού παρουσία SO₂ πραγματοποιείται με την δημιουργία δύο διαλυμάτων, το καθένα από τα οποία εμπεριέχει 1ml εκχυλίσματος, 1 ml διαλύματος οξιμισμένης αιθανόλης (0,1% HCL) και 20ml υδατικού διαλύματος HCL 2%. Προστίθεται 4ml αποσταγμένου H₂O σε 10ml του πρώτου δείγματος (A1), 4ml διαλύματος NaHSO₃ στο άλλο (A2). Μετά από χρόνο 20 min μετρώνται οι απορροφήσεις σε μήκος κύματος 520nm και το αποτέλεσμα δίνεται από τη σχέση (A1 – A2)*875 και εκφράζεται σε mg/L (Ribereau-Gayon, P. *et al.*, 2006).

Η συγκέντρωση των ανθοκυανών A pH1 και A pH 3,6 εκφράζεται σε mg/l πολτού. Η συνολική περιεκτικότητα φαινολικών προσδιορίζεται στο δεύτερο διάλυμα χρησιμοποιώντας την OD280

- 3) Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose: η μέθοδος αυτή είναι μια απλή μέθοδος που μετράει το σύνολο των ταννινών του δείγματος (οίνου ή ράγας), (Sarneckis *et al.*, 2005, Smith 2005, Mercurio and Smith 2006). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με άλλα μόρια, όπως η methyl cellulose και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Η methyl cellulose (μεθυλοκυτταρίνη) είναι μια μορφή πολυσακχαρίτη που σχηματίζει πολυμερή με τις ταννίνες. Η μέθοδος εκτιμά τα πολυμερή πολυσακχαρίτη – ταννίνης που καθιζάνουν. Η μέθοδος βασίζεται στην

απορρόφηση στα 280nm (A^{280}) διαλυμάτων με την προσθήκη και μη της methyl cellulose, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Η methyl cellulose δεν επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης στα 280nm εφόσον δεν απορροφά στο μήκος αυτό. 1 g ομογενοποιημένου δείγματος φέρεται σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου με την προσθήκη 10ml υδατικού διαλύματος αιθανόλης (50%) και αφήνεται για ανάδευση 1 h. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των εκχυλισμάτων για 10 min στις 4000rpm. Για την μέθοδο απαιτείται η δημιουργία 2 διαλυμάτων που ονομάζονται αντίστοιχα μάρτυρας, όπου δεν προστίθεται ο πολυσακχαρίτης και δείγμα, όπου προστίθεται ο πολυσακχαρίτης. Στον μάρτυρα προστίθενται 1ml εκχυλίσματος, 2 ml ammonium sulfate και H_2O μέχρι τελικό όγκο 10ml. Στο δείγμα προστίθεται 1ml εκχυλίσματος, 2 ml ammonium sulfate, 3 ml methyl cellulose και H_2O μέχρι τελικό όγκο 10ml. Αφού τα δύο διαλύματα παραμείνουν σε θερμοκρασία δωματίου για 10min, φυγοκεντρώνονται και μετρώνται οι απορροφήσεις τους στα 280 nm. Η απορρόφηση του μάρτυρα ισοδυναμεί με την συγκέντρωση του συνόλου των φαινολικών συστατικών του δείγματος (ολικά φαινολικά), ενώ η απορρόφηση του δείγματος στα 280nm, υποδεικνύει την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών που παραμένουν στο διάλυμα, μετά την καθίζηση των πολυμερών που έχουν σχηματιστεί, με την προσθήκη του πολυσακχαρίτη. Με την αφαίρεση των δύο απορροφήσεων μπορεί να υπολογισθεί η συγκέντρωση των ταννινών που έχουν σχηματίσει πολυμερή. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg / L κατεχίνης μέσω της καμπύλης αναφοράς σε κατεχίνη (C_{TAN}^{280}).

Συγκέντρωση ταννινών mg/ g:

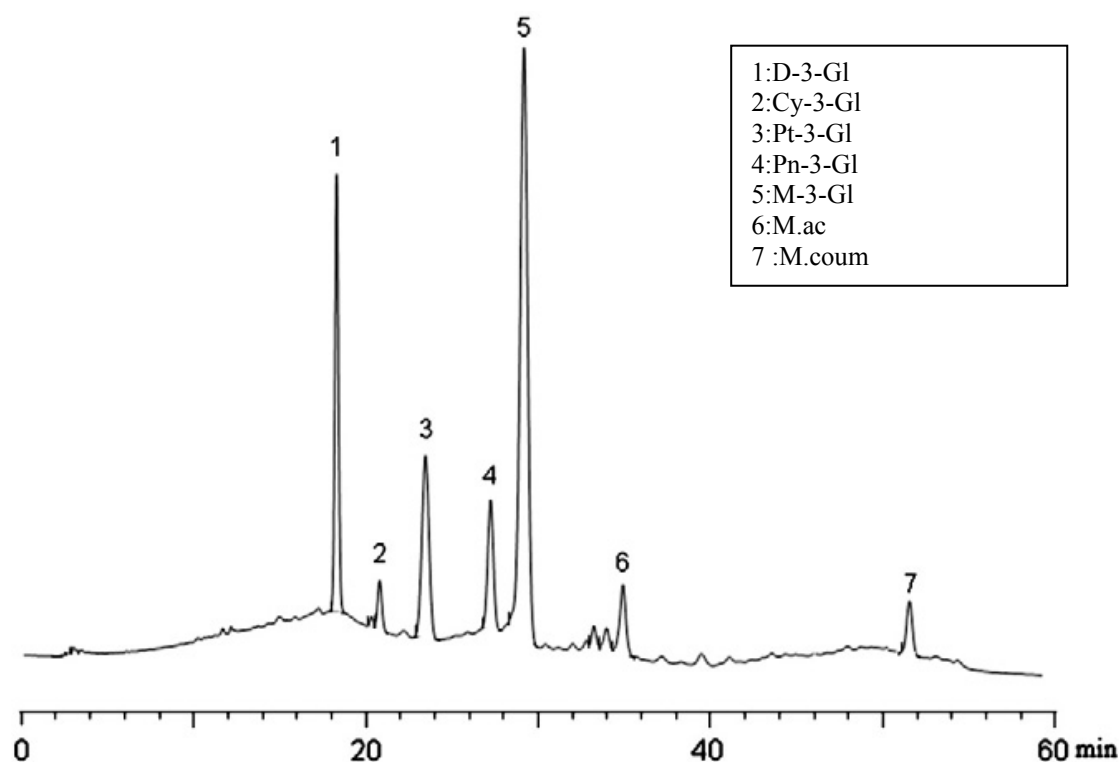
$$C_{TAN} \text{ (mg/g)} = \frac{C_{TAN}^{280} * \text{Αραίωση (η οποία αντιστοιχεί στον συνολικό τελικό όγκο =10,5 g)}}{\text{Βάρος δείγματος που εκχυλίστηκε (g)}}$$

Συγκέντρωση ταννινών mg/ ράγα:

$$C_{TAN} \text{ (mg/ ραγα)} = C_{TAN} \text{ (mg/ g)} * \frac{\text{Βάρος 50 ραγών που ομογενοποιήθηκαν (g)}}{50}$$

- 4) Υπολογισμός του Δείκτη Ολικών Φαινολών (Δ.Φ.Ο.): Ο Δείκτης Ολικών Φαινολών αποτελεί μια γρήγορη και εύκολη ένδειξη των ολικών φαινολικών συστατικών που βρίσκονται στο ομογενοποιημένο δείγμα των ραγών. Γίνεται εφαρμογή της μεθόδου ΔΦΟ όπως περιγράφεται από τους Flanzky και Roux (1958) και Ribéreau- Gayon (1966), βάσει της οποίας μετράται η απορρόφηση δείγματος αραιωμένου 100 φορές με αποσταγμένο νερό, σε μήκος κύματος 280nm του υπεριώδους φωτός. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως «δείκτης ολικών φαινολικών» πολλαπλασιάζοντας την απορρόφηση επί 100. Η τιμή του δείκτη ολικών φαινολών κυμαίνεται από 6 έως 120 (Ribéreau-Gayon, P. *et al.*, 2006). Τα δείγματα κατά την εφαρμογή της μεθόδου «Glories», μετά την εκχύλιση και αφού φυγοκεντριθούν για 10 min στις 4000rpm, αραιώνονται 1/100 με νερό και στη μετράται η απορρόφηση στα 280 nm χρησιμοποιώντας κυψελίδα χαλαζία.

$$\mathbf{\Delta.Φ.Ο = od280*100}$$

ii) Αναλύσεις σε φλοιούς ραγών – προσδιορισμός των ανθοκυανών με HPLC

Εικόνα 21: Χρωματογράφημα ανθοκυανών

Αντιπροσωπευτικό δείγμα 100 ραγών διαχωρίζεται σε φλοιούς και γίγαρτα. Οι φλοιοί αφού εκπλυθούν με αποσταγμένο H_2O , ζυγίζονται και αποθηκεύονται σε κατάψυξη. Στη συνέχεια υπόκεινται σε λυοφιλίωση επί 1 ημέρα. Τα λυοφιλωμένα δείγματα φλοιών αλέθονται και σε 0,5 g της σκόνης που προκύπτει, προστίθεται 20ml διαλύματος οξιμισμένης μεθανόλης 0,1% HCL. Η εκχύλιση πραγματοποιείται για 2 ημέρες σε shaker, στους $20^{\circ}C$ και το εκχύλισμα λαμβάνεται σταδιακά μετά από φυγοκεντρίσεις στις 9000rpm, στους $20^{\circ}C$ για 15 min, στις 4, 18 και 24 h, αφού προστίθεται κάθε φορά στο στερεό υπόλειμμα 10ml μεθανόλης 0,1% HCL. Από το εκχύλισμα που συλλέγεται λαμβάνονται 5μL, φιλτράρονται από φίλτρο 0,2μm και χρησιμοποιούνται για HPLC ανάλυση με το πρόγραμμα προσδιορισμού ανθοκυανών.



Εικόνα 22: Mixer για άλεση φλοιών & γιγάρτων

Ο εξοπλισμός της HPLC αποτελείται από μια αντλία Jasco PU-980, στήλη Nova-Pack C18, 4 μm, διαστάσεων 47,6x250mm και έναν ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού. Η ανάλυση εκτελέστηκε με ρυθμό ροής 1 ml/min, με όγκο δείγματος 5 μL, στα 520 nm και με το ακόλουθο πρόγραμμα έκλυσης (Kallithraka *et al.*, 2005):

95% διαλύτης A για 1 min, μετά από 95% σε 50% μέσα σε 26 min, από 50% σε 5% σε 29 min, όπου και διατηρήθηκε ισοκρατικά για επιπλέον 3 min και τέλος σε 95% στα 38 min όπου και παρέμεινε μέχρι το τέλος της διαδικασίας. Ο διαλύτης A ήταν 10% (v/v) μυρμηγκικό οξύ και ο διαλύτης B ήταν μεθανόλη. Η ταυτοποίηση της μαλβιδίνης βασίζεται στην σύγκριση των τιμών κατακράτησης των κορυφών που προσδιορίστηκαν με τις κορυφές των πρότυπης ουσίας σε (UV) Vis on-line spectral data. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η χάραξη της οποίας γίνεται με διαλύματα μαλβιδίνης γνωστών συγκεντρώσεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα μαλβιδίνης σε mg malvidin / g νοπού βάρους φλοιών.



Εικόνα 23: Εξοπλισμός για ανάλυση HPLC

iii) Αναλύσεις σε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων

Αντιπροσωπευτικό δείγμα 100 ραγών διαχωρίζεται σε φλοιούς και γιγάρτα. Οι φλοιοί και τα γιγάρτα αφού εκπλυθούν με αποσταγμένο H₂O, ζυγίζονται και αποθηκεύονται σε κατάψυξη. Στη συνέχεια υπόκεινται σε λυοφιλίωση επί 1 ημέρα. Τα λυοφιλιωμένα δείγματα φλοιών και γιγάρτων αλέθονται. 3 g της σκόνης εκχυλίζονται με 25ml διαλύματος ακετόνης – H₂O (80 / 20), σε shaker, στους 25° C επί 4 h. Στη συνέχεια και μετά τη φυγοκέντριση στις 9000rpm, για 15 min, λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα και το στερεό υπόλειμμα, αφού προστεθούν 25ml διαλύματος μεθανόλης - H₂O (60 / 40), εκχυλίζεται για 2,5 h. Αφού φυγοκεντρηθεί το νέο εκχύλισμα στις ίδιες συνθήκες, συλλέγεται το υπερκείμενο διάλυμα στο ίδιο μέσο με το πρώτο εκχύλισμα και φυλάσσεται σε κατάψυξη. Τα εκχυλίσματα αυτά στη συνέχεια συμπυκνώνονται υπό κενό στους 35 °C σε Rotary Evaporator και στη συνέχεια λυοφιλιώνονται. Από την τελική σκόνη δημιουργούνται διαλύματα φλοιών με συγκέντρωση 5 g/L και

γυγάρτων με συγκέντρωση 2g/L, σε model wine. Τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των εξής μεθόδων:



Εικόνα 24: Rotary evaporator

1) Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose: για την πραγματοποίηση της μεθόδου ακολουθείται η ίδια διαδικασία, όπως αναφέρεται στην παράγραφο i3. Επειδή στην συγκεκριμένη περίπτωση έχουμε εκχυλίσματα φλοιών και γυγάρτων, η ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιείται για ανάλυση είναι 250μL, ενώ οι ποσότητες των αντιδραστηρίων παραμένουν οι ίδιες, με αλλαγή της ποσότητας H₂O που προστίθεται έτσι ώστε να προκύψει τελικός όγκος 10ml. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg / L κατεχίνης μέσω της καμπύλης αναφοράς σε κατεχίνη (C_{TAN}²⁸⁰). Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg catechin / g νοπού βάρους φλοιών και γυγάρτων. Η εξίσωση που χρησιμοποιείται είναι :

$$C_{TAN} \text{ (mg / L)} = C_{TAN}^{280} * 40$$

2) Ολικές τανίνες με τη μέθοδο του βρασμού (μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες): η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα των προανθοκυανιδινών να μετατρέπονται σε ανθοκυανιδίνες σε όξινο μέσο στους 100° C ((Ribeareau-Gayon & Stone-street, 1966). Το σύνολο των ταννινών μετατρέπεται κατά την μέθοδο αυτή, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που είναι συνδεδεμένες με άλλα φαινολικά συστατικά. Τα αποτελέσματα διορθώνονται με βάση κάποιους συντελεστές (Glories, 1988), ώστε να λαμβάνονται υπόψη τυχόν λάθη που συμβαίνουν σε

κάποιο στάδιο της διαδικασίας. Η μέθοδος ποσοτικοποιεί τα αποτελέσματα με την μέτρηση της απορρόφησης στα 550 nm του δείγματος που υφίσταται την υδρόλυση στους 100° σε όξινο μέσο και του δείγματος που χρησιμοποιείται για σύγκριση και το οποίο δεν υπόκειται σε θέρμανση. Στη διάρκεια του βρασμού, οι τανίνες μετατρέπονται σε ανθοκυανιδίνες και, επομένως, το δείγμα που έχει θερμανθεί περιέχει τις αρχικές ανθοκυάνες και τις ανθοκυάνες που σχηματίστηκαν από την υδρόλυση των τανινών. Το δείγμα που δεν θερμάνθηκε περιέχει μόνο τις αρχικές ανθοκυάνες. Η διαφορά τους δίνει τις ανθοκυάνες που σχηματίστηκαν. Η διαφορά των απορροφήσεων είναι ανάλογη με το ποσοστό των ταννινών. Για την πραγματοποίηση της μεθόδου το εκχύλισμα φυγοκεντρείται και αραιώνεται 1/10 με H₂O. Σε απλό δοκιμαστικό σωλήνα φέρονται 2ml αραιωμένου εκχυλίσματος, 1ml H₂O και 3ml πυκνού HCL 37%. Σε πλαστικό σωλήνα εφοδιασμένο με πάμα φέρονται 2ml αραιωμένου εκχυλίσματος, 1ml H₂O και 3ml πυκνού HCL 37%. Ο πλαστικός σωλήνας παραμένει σε βρασμό για 45min. Αφού ψυχθεί προστίθεται και στους δύο 500μL αιθανόλης 95% για σταθεροποίηση του χρώματος. Αφού μετρηθούν οι οπτικές πυκνότητες και των δύο στα 550 nm η σχέση που δίνει την ποσότητα των ταννινών του δείγματος είναι: **ταννίνες (g / L) = (d₂ – d₁) * 3,87**

Όπου d₁ = απορρόφηση στα 550 nm χωρίς θέρμανση

d₂= απορρόφηση στα 550 nm με θέρμανση

- 3) Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH: η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κυρίως στα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στους οίνους ή τα εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων. Η φωτομετρική μέθοδος χρησιμοποιεί την 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ελεύθερη ρίζα (DPPH.), η οποία έχει χαρακτηριστικό φάσμα UV–vis με μέγιστη απορρόφηση στα 515 nm σε μεθανόλη. Η προσθήκη συστατικού που δρά ως αντιοξειδωτικό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση στην απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη με την συγκέντρωση και την αντιοξειδωτική ικανότητα της αντιοξειδωτικής ουσίας που προστίθεται (Brand-Williams *et al.*, 1995, Villano *et al.*, 2007). Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα της χρήσης μιας ελεύθερης ρίζας, που είναι σταθερή και εμπορικά διαθέσιμη, ευρέως χρησιμοποιούμενη για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας στον ευρύτερο τομέα των τροφίμων. Για την εφαρμογή της μεθόδου παρασκευάζεται διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης DPPH, σε μεθανόλη (25 mg/L). Σε 25 μL του δείγματος

προστίθενται 975 μL DPPH και μετράται η απορρόφηση στα 515nm ($t=0$). Τα διαλύματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min., και μετράται η απορρόφηση στα 515 nm με λάμπα αλογόνου. Από τις δυο απορροφήσεις υπολογίζεται η % διάφορα από τον τύπο:

$$\% \Delta A(515) = \frac{(A0) - (A30)}{A0} \times 100$$

Μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς που δημιουργήθηκε με trolox εκφράζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα σε mg/ L trolox. Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε mmol Trolox / g νωπού βάρους φλοιών και γιγάρτων

- 4) Μέθοδος εκτίμησης των φλαβονολών και προανθοκυανιδινών με τη χρήση του αντιδραστήριου DMAC: οι φλαβανόλες και τα πολυμερή παράγωγά τους, οι προανθοκυανιδίνες (συμπυκνωμένες ταννίνες) αποτελούν μια ομάδα πολυφαινολών που προσδίδουν πικρότητα και στυπτικότητα σε οίνους και άλλες κατηγορίες τροφών (Peleg and others, 1999). Εξαιτίας της ευρείας διαφορετικότητας και πολυπλοκότητας της στερεοχημίας τους και λόγω του πολυμερισμού των προανθοκυανιδιών, η απομόνωση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους είναι ιδιαίτερα δύσκολη και πολλές φορές ανακριβής. Η μέθοδος DMAC (4-Dimethylaminocinnamaldehyde Assay) θεωρείται μια νέα και ακριβής μέθοδος προσδιορισμού του ποσοστού των προανθοκυανιδιών που βρίσκονται σε οίνους και άλλες φυτικές τροφές. Η μέθοδος DMAC η οποία προσδιορίζει κατεχίνες και ολιγομερή, είναι παρόμοια με την μέθοδο της βανιλίνης που εφαρμόζεται για τον ίδιο σκοπό, ωστόσο θεωρείται ότι είναι 5 φορές πιο ευαίσθητη συγκριτικά με αυτή (Hummer and Schreier, 2008). Το αντιδραστήριο DMAC επιλέγει την θέση C8 του δακτυλίου A και αντιδρά μόνο με την τερματική μονάδα της προανθοκυανιδίνης (Ozmanski and Bourzeix, 1996). Επιπρόσθετα το αντιδραστήριο DMAC παρουσιάζει ένα μέγιστο απορρόφησης στα 640 nm που βρίσκεται εκτός του φάσματος απορρόφησης των ανθοκυανών, ελαχιστοποιώντας έτσι την πιθανότητα λανθασμένων εκτιμήσεων. Οι Treutter and others (1994) και Pascual – Teresa and others (1998) αναφέρουν ότι η DMAC UV – Vis φωτομετρική μέθοδος είναι πιο ακριβής και επιλεκτική σε σχέση με άλλες φωτομετρικές μεθόδους.

Το αντιδραστήριο DMAC (2%) προετοιμάζεται με προσθήκη 2 g DMAC σε 100 ml διαλύματος 1/1 μεθανόλης και 6N H_2SO_4 . Το αντιδραστήριο διατηρείται μόνο

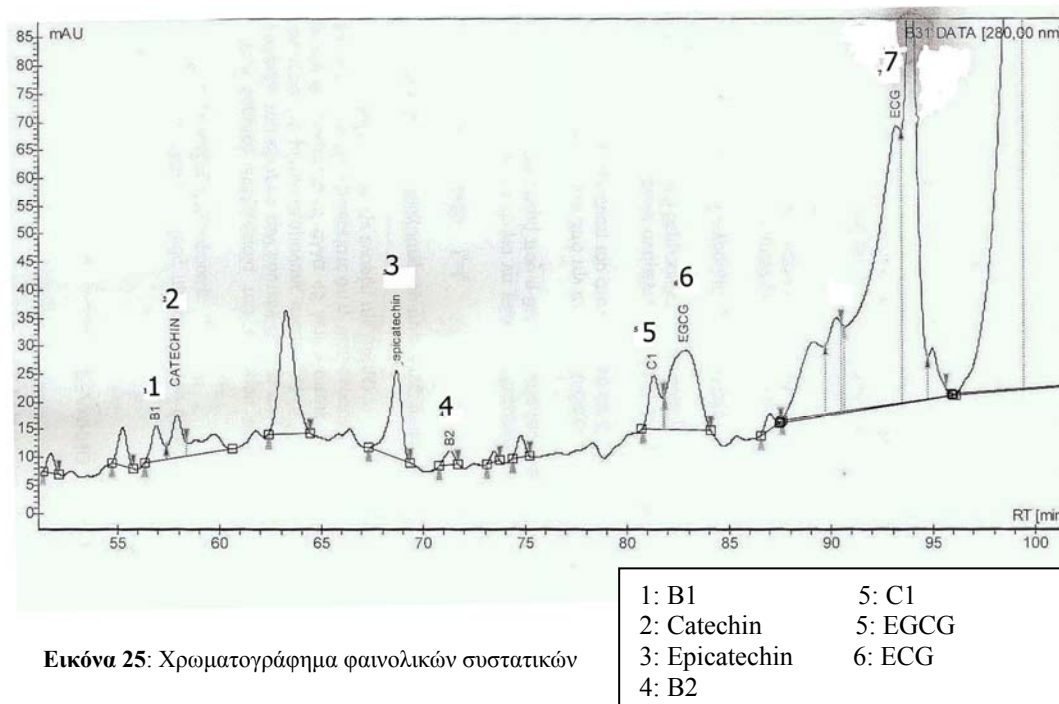
για 1 ημέρα σε θερμοκρασία δωματίου. Για την εφαρμογή της μεθόδου λαμβάνεται δείγμα εκχυλίσματος φλοιών ή γιγάρτων και αραιώνεται 1/20 με μεθανόλη. Λαμβάνονται 40μL αραιωμένου διαλύματος σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται 4,7ml μεθανόλης και 200 μL αντιδραστηρίου DMAC, πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και το διάλυμα παραμένει σε ηρεμία, σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 640nm, με λάμπα αλογόνου και πλαστικές κυψελίδες. Για το κάθε δείγμα θα πρέπει να ετοιμάζεται και ένα διάλυμα ως δείγμα αναφοράς για τον μηδενισμό του φωτόμετρου, για το οποίο λαμβάνεται σε δοκιμαστικό σωλήνα 40μL αραιωμένου διαλύματος του δείγματος στο οποίο προστίθενται 4,9 ml μεθανόλης, πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και το διάλυμα παραμένει σε ηρεμία, σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Στη συνέχεια μηδενίζεται η ένδειξη του φωτόμετρου 640nm, πριν την μέτρηση του δείγματος. Μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς που δημιουργήθηκε με κατεχίνη εκφράζεται η συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών σε mg / L κατεχίνης. Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg catechin / g νωπού βάρους φλοιών ή γιγάρτων.

- 5) Δείκτης βαθμού πολυμερισμού (mDP): προκύπτει από τον λόγο της έκφρασης των αποτελεσμάτων των μεθόδων προσδιορισμού ολικών ταννινών με μετατροπή σε προανθοκυανιδίνες και εκτίμηση της συγκέντρωσης των προανθοκυανιδινών με την μέθοδο DMAC (Vivas *et al.*, 1994).

iv) Προσδιορισμός των φαινολικών (μονομερών και ολιγομερών φλαβαν – 3 – ολών και φλαβονολών) σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων με ανάλυση HPLC

Αντιπροσωπευτικό δείγμα 100 ραγών διαχωρίζεται σε φλοιούς και γιγάρτα. Οι φλοιοί και τα γιγάρτα αφού εκπλυθούν με αποσταγμένο H₂O, ζυγίζονται και αποθηκεύονται σε κατάψυξη. Στη συνέχεια υπόκεινται σε λυοφιλίωση επί 1 ημέρα. Τα λυοφιλιωμένα δείγματα φλοιών και γιγάρτων αλέθονται. 3 g της σκόνης εκχυλίζονται με 25ml διαλύματος ακετόνης – H₂O (80 / 20), σε shaker, στους 25° C επί 4 h. Στη συνέχεια και μετά τη φυγοκέντριση στις 9000rpm, για 15 min, λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα σε vial και στο στερεό υπόλειμμα, αφού προστεθούν 25ml διαλύματος μεθανόλης - H₂O (60 / 40), εκχυλίζεται για 2,5 h. Αφού φυγοκεντρηθεί το νέο εκχύλισμα στις ίδιες συνθήκες, συλλέγεται το υπερκείμενο διάλυμα στο ίδιο vial με το πρώτο εκχύλισμα και φυλάσσεται σε κατάψυξη. Τα εκχυλίσματα αυτά στη συνέχεια συμπυκνώνονται υπό κενό στους 35 °C σε Rotary Evaporator και στη συνέχεια λυοφιλιώνονται. Από τη σκόνη που προκύπτει μετά την λυοφιλίωση λαμβάνονται αντίστοιχα για τα γιγάρτα 400mg και για τους φλοιούς 500mg σε vial και ακολουθείται η ίδια διαδικασία: Στο vial προστίθενται 10 ml υδατικού διαλύματος αιθανόλης 5%. Το δείγμα αναδεύεται σε vortex για 30sec και στη συνέχεια προστίθενται 10ml χλωροφόρμιο. Μετά την προσθήκη το διάλυμα φυγοκεντρείται, στις 4000rpm για 5min, αφού αναδευθεί σε vortex για 30sec. Μετά την φυγοκέντριση λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα (η πρώτη από 2 διακριτές φάσεις του διαλύματος) σε νέο vial και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία στο εναπομείναν διάλυμα άλλες 2 φορές. Η προσθήκη του χλωροφορμίου πραγματοποιείται για την απομάκρυνση του λιπόφιλου μέρους του δείγματος. Στο νέο διάλυμα που προκύπτει μετά τις τρεις επαναλήψεις με προσθήκη χλωροφορμίου, προστίθενται 10ml ethyl acetate, ακολουθεί ανάδευση σε vortex για 30sec και στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία, έως ότου διαχωρισθούν οι δύο φάσεις (οργανική φάση και υδατική φάση), από όπου λαμβάνεται η υπερκείμενη οργανική φάση σε νέο vial και στην εναπομείναν επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία 2 φορές. Η χρήση του ethyl acetate γίνεται για την λήψη μικρού μοριακού βάρους προανθοκυανιδών (ολιγομερών ταννινών) στην οργανική φάση. Η οργανική φάση περιέχει κυρίως ολιγομερή ενώ η υδατική φάση περιέχει πολυμερή. Στην συνέχεια το εκχύλισμα ολιγομερών ταννινών συμπυκνώνεται σε Rotary evaporator με την

απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη και λυοφιλιώνεται επί 2 ημέρες. Στη σκόνη που προκύπτει από την λυοφιλίωση αφού προστεθεί μεθανόλη δημιουργείται για το κάθε δείγμα γιγάρτων διάλυμα με συγκέντρωση 5 g/L και για κάθε δείγμα φλοιών διάλυμα με συγκέντρωση 10 g/L. Τα δείγματα γιγάρτων αραιώνονται 1/10 με μεθανόλη και στην συνέχεια αναλύονται με HPLC με όγκο δείγματος 20μL, αφού φιλτραριστούν με φίλτρο 0,2μm. Τα δείγματα φλοιών δεν αραιώνονται, ενώ ο όγκος δείγματος που χρησιμοποιείται για ανάλυση HPLC είναι 50μL αφού φιλτραριστούν με φίλτρο 0,2μm. Το πρόγραμμα έκλουσης που ακολουθείται καθώς και οι διαλύτες είναι διαφορετικοί για τους φλοιούς και τα γίγάρτα.



Εικόνα 25: Χρωματογράφημα φαινολικών συστατικών

- 1) Φλοιοί: Ο εξοπλισμός της HPLC αποτελείται από μια αντλία Jasco PU-980, στήλη Lichrospher, RP-18, διαστάσεων 250 X 4,5μm και έναν ανιχνευτή υπεριώδους- ορατού.
 - a) Διαλύτης A: 1ml/L orthophosphoric acid (ορθοφωσφορικό οξύ) σε HPLC H₂O
 - b) Διαλύτης B: διαλύτης A / ακετονιτρίλιο σε αναλογία 6/4
 - c) Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν με την χρήση πρότυπων ουσιών (κατεχίνης, επικατεχίνης, γαλλικής επικατεχίνης, γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης, επιγαλλοκατεχίνης, B1, B2, C1, γαλλικού οξέος, ρουτίνης,

καμπερόλης, μυρισετίνης, κερσετίνης), σε γνωστές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ουσίας / g νωπού βάρους φλοιών.

- d) Η ανάλυση εκτελέστηκε με όγκο δείγματος 50 μ L, στα 280 nm και 360nm και με το ακόλουθο πρόγραμμα έκλουσης:

Time	A	B
0	100	0
20	100	0
100	60	40
110	60	40
130	30	70
140	30	70
145	0	100
153	0	100
156	100	0

Η ταυτοποίηση των φαινολικών βασίζεται στην σύγκριση των τιμών κατακράτησης των κορυφών που προσδιορίστηκαν με τις κορυφές των πρότυπων ουσιών στα 280nm για το γαλλικό οξύ, κατεχίνη, επικατεχίνη, B1, B2, C1 και γαλλικούς εστέρες και στα 360nm για τις φλαβονόλες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε μέσω των πρότυπων καμπυλών αναφοράς.

- 2) Γίγαρτα: Ο εξοπλισμός της HPLC αποτελείται από έναν αυτόματο δειγματολήπτη Jasco AS-1555 Intelligent Sampler, αντλία Jasco PU 2089 Plus Quaternary Gradient Pump, ανιχνευτή Jasco MD-910 Multiwavelength Detector, αντάπτορα Jasco LC-Net II / ADC, το Software του υπολογιστή Jasco ChromPass Chromatography Data System Version 1.7.403.1 και στήλη Nova - Pak, C-18, διαστάσεων 3,9 X 150mm, 4 μ m.
- a) Διαλύτης A: 1ml/L perchloric acid (υπερχλωρικό οξύ) σε HPLC H₂O
- b) Διαλύτης B: μεθανόλη για HPLC
- c) Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν με την χρήση πρότυπων ουσιών (κατεχίνης, επικατεχίνης, γαλλικής επικατεχίνης, γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης, επιγαλλοκατεχίνης, B1, B2, C1, γαλλικού οξέος), σε γνωστές

συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ουσίας / g νωπού βάρους γιγάρτων.

- d) Η ανάλυση εκτελέστηκε με όγκο δείγματος 20 μ L, στα 280 nm και με το ακόλουθο πρόγραμμα έκλουσης:

Time	A	B
0	100	0
5	90	10
15	87,5	12,5
25	82,5	17,5
45	75	25
60	40	60
70	0	100
80	0	100
85	100	0

- e) Η ταυτοποίηση των φαινολικών βασίζεται στην σύγκριση των τιμών κατακράτησης των κορυφών που προσδιορίστηκαν με τις κορυφές των πρότυπων ουσιών στα 280nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε μέσω των πρότυπων καμπυλών αναφοράς.

v) Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με την ανάλυση της διακύμανσης (analysis of variance-ANOVA) του προγράμματος Statistica V.7 (Statsoft Inc., Tulsa,OK). Το Tukey's HSD (honest significant difference) test χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των δειγμάτων, όταν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μετά τη εφαρμογή ANOVA ($p < 0.05$) στα αποτελέσματα των αναλύσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: Αποτελέσματα & Συζήτηση

ι) Αναλύσεις σε ράγες

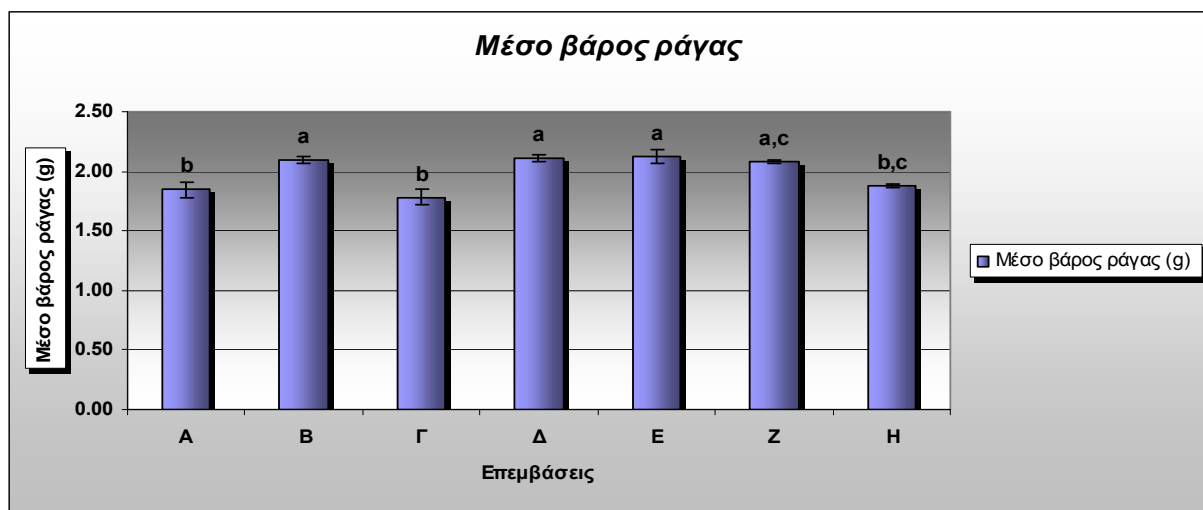
1) Μεταβολές στα βάρη των ραγών: παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τα αποτελέσματα της μεταβολής του βάρους των ραγών και άλλων χαρακτηριστικών. Τα διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διάφορα ανάμεσα στα αποτελέσματα. Παρατηρούμε ότι το μικρότερο βάρος ράγας παρουσιάζει η επέμβαση Γ (χλωριούχο κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση), καθώς και το μικρότερο μέσο βάρος γιγάρτου. Το μεγαλύτερο μέσο βάρος ράγας παρουσιάζει η επέμβαση Ε (θειικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση) και το μεγαλύτερο μέσο βάρος γιγάρτου η επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση). Τον μεγαλύτερο αριθμό γιγάρτων παρουσιάζει η επέμβαση Ζ (λίπασμα καλίου με υψηλή περιεκτικότητα Mg). Δεν παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις για τον λόγο στέμφυλα/χυμός και για το βάρος των φλοιών. Ωστόσο τον υψηλότερο λόγο στεμφύλων / χυμό παρουσιάζει η επέμβαση Α (μάρτυρας) και τον μικρότερο η επέμβαση Η (λίπανση με πολύ υψηλό ποσοστό καλίου και Mg). Το μεγαλύτερο βάρος φλοιών παρουσιάζει η επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση) και το μικρότερο η επέμβαση Η (λίπανση με πολύ υψηλό ποσοστό καλίου και Mg). Στις υπόλοιπες μετρήσεις υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Από τα αποτελέσματα οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η διαφοροποίηση στα μορφολογικά χαρακτηριστικά της ράγας, οφείλεται στο είδος της λίπανσης, καθώς το θειικό κάλιο στις δυο συγκεντρώσεις αποδίδει ράγες μεγαλύτερες και με μεγαλύτερα γιγάρτα.

Πίνακας 3: Τα αποτελέσματα σε μετρήσεις του βάρους (g) και άλλων χαρακτηριστικών των ραγών

	Μεσο βάρος ραγας (g)	Μεσο βάρος γιγάρτου (g)	Βάρος φλοιών 100 ραγών(g)	Αριθμός γιγάρτων 100 ραγών	Λόγος στεμφύλων / γλεύκος	N
A	1,843±0,059 b	0,042369±0,000036 a,b	8,156±0,405 a	157,333±8,089 a	4,806±0,120 a	3
B	2,100±0,026 a	0,046±0,0003 c,d	8,186±1,274 a	170,666±2,333 a,b	4,228±0,676 a	3
Γ	1,783±0,066 b	0,041±0,0005 b	7,753±0,243 a	177,333±2,185 a,b	4,773±0,320 a	3
Δ	2,108±0,029 a	0,047±0,0007 d	8,559±1,499 a	174±4,358 a,b	4,402±0,745 a	3
E	2,127±0,056 a	0,044±0,0009 a,c	7,469±0,460 a	179,333±8,373 a,b	3,790±0,252 a	3
Z	2,082±0,019 a,c	0,044±0,0007 a,c	8,160±1,335 a	190±5 b	4,251±0,677 a	3
H	1,876±0,015 b,c	0,043±0,0002 a,b	6,071±0,341 a	157,666±0,333 a	3,478±0,228 a	3

*Η ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για την σύγκριση των αρχικών μετρήσεων, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, p < 0,05), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3)
Τα αποτελέσματα αποτελούν τους μέσους όρους σε τριπλή επανάληψη*

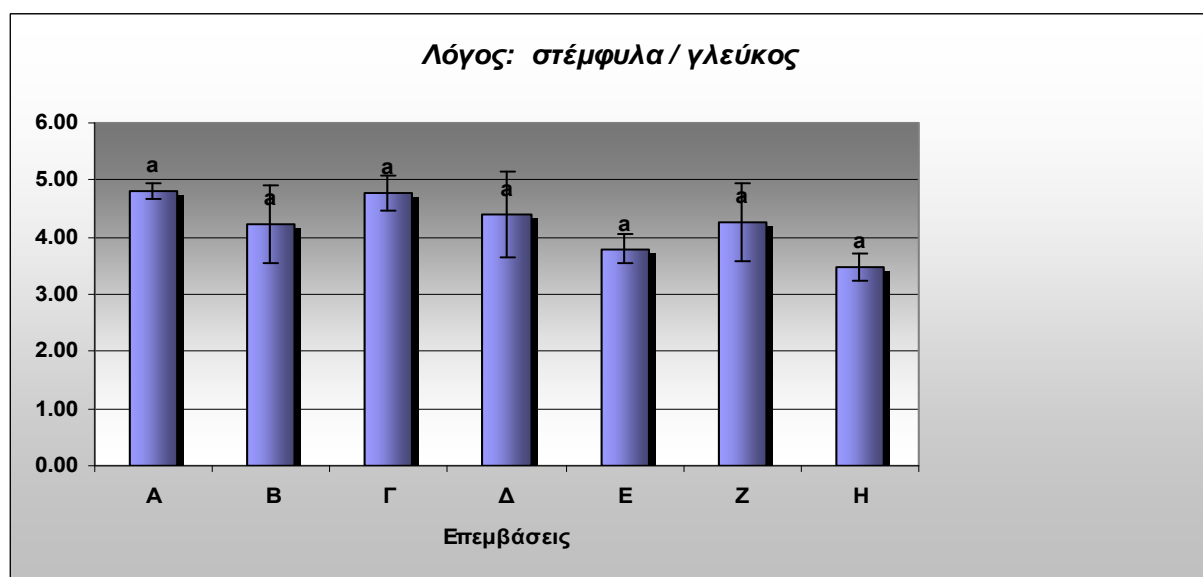
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα για την κάθε μέτρηση.



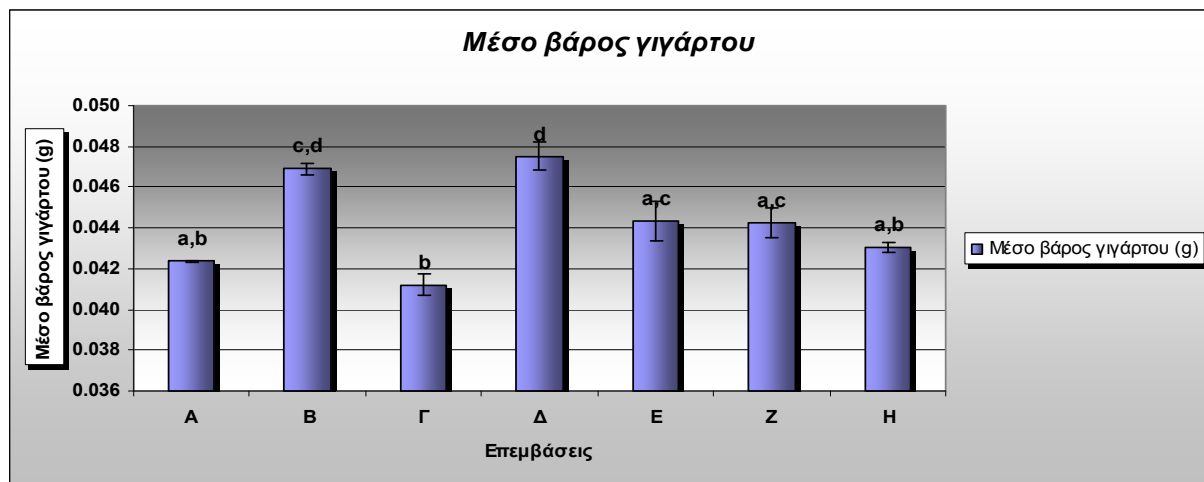
Γράφημα 1: Μέσο βάρος ράγας / επέμβαση



Γράφημα 2: Βάρος φλοιών 100 ραγών / επέμβαση



Γράφημα 3: Λόγος στέμφυλα: γλεύκος / επέμβαση



Γράφημα 4: Μέσο βάρος γιγάρτου / επέμβαση



Γράφημα 5: Αριθμός γιγάρτων 100 ραγών / επέμβαση

Στην βιβλιογραφία αναφέρεται η θετική επίδραση της λίπανσης με κάλιο τόσο στην παραγωγή αλλά και στο βάρος και το μέγεθος της ράγας (Balo *et al.*, (1982), Morris and Cawthon (1982), Shardakova (1983), Valenzuela and Ruiz (1984), and Morris *et al.*, (1987), El-Sese *et al.*, (1988), Conradie and Saayman (1989), Omar (1994) and Omar (2000), Dhillon *et al.*, (1999), Mpelasoka *et al.*, (2003)).

Οι Perovic *et al.*, (1984), Reynolds *et al.*, (2005 a), Conradie and Saayman (1989), αναφέρουν ότι μικρές ποσότητες καλίου είχαν επίδραση στο μέγεθος και το βάρος των ραγών.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω δεδομένα οι Kliewer *et al.*, (1983) Terra *et al.*, (2000) Srivastava and Soni (1988), αναφέρουν ότι η λίπανση με κάλιο δεν είχε επίδραση στην παραγωγή, αλλά και το μέγεθος ή βάρος της ράγας.

Συγκεκριμένα ο Altindisi *et al.*(1999) αναφέρει ότι με την εφαρμογή τριών διαφορετικών ποσοτήτων λίπανσης καλίου σε πρέμνα των ποικιλιών Carignane και Colombard με τη μορφή του KNO_3 (1 % , 2% και 3 % KNO_3), αυξήθηκε η παραγωγικότητα του φυτού, που οφείλεται στην αύξηση του βάρους της ράγας. Επίσης σε ράγες της ποικιλίας Σουλτανίνα στην περιοχή του Αιγαίου, αύξηση της ποσότητας λίπανσης με κάλιο, προκάλεσε αύξηση του βάρους τους που κυμάνθηκε στα 175g (βάρος 100 ραγών) για την μικρότερη ποσότητα καλίου έως 211 g (βάρος 100 ραγών) για την μεγαλύτερη (Qokuysal, 1990).

Ο Delgado *et al.*(2004), αναφέρει ότι η λίπανση με κάλιο (0, 60 και 120 g K_2O / πρέμνο σε K_2SO_4) σε πρέμνα της ποικιλίας Tempranillo, δεν επηρέασε την παραγωγικότητα των πρέμνων, το μέγεθος ή το βάρος των ραγών. Ο Boonterm *et al.* (2010), αναφέρει ότι σε ράγες της ποικιλίας Cabernet Sauvignon η αύξηση της λίπανσης με κάλιο δεν είχε καμία επίδραση στον αριθμό των ραγών ανά σταφυλή, καθώς και στο μέγεθος και βάρος τους, το οποίο κυμαίνεται από 1,22 (μέσο βάρος ράγας) έως 1,13 (μέσο βάρος ράγας) την πρώτη χρονιά του πειράματος και 0,93 (μέσο βάρος ράγας) για την μικρή ποσότητα λίπανσης έως 0,90 (μέσο βάρος ράγας) για την μεγάλη, την δεύτερη χρονιά. Αναφέρεται από τους (Smolarz and Mercik, 1997) ότι η θετική επίδραση της λίπανσης με κάλιο διαφαίνεται σε εδάφη όπου έχουμε έλλειψη καλίου. Διαφορετικά υψηλό επίπεδο λίπανσης σε εδάφη με επάρκεια καλίου μπορεί να οδηγήσει στην μείωση της παραγωγικότητας, ενώ μπορεί να εκδηλωθούν και φαινόμενα τοξικότητας στα πρέμνα (Wolf, *et al.*,1983, Ahalwat and Yamadagi, 1988) ιδιαίτερα στην περίπτωση του KCL. Ο Abd – El Razek αναφέρει ότι σε σταφύλια της ποικιλίας Crimson, εφαρμογή λίπανσης καλίου (240, 285, 330 kg/ha σε μορφή θεικού καλίου) δεν επέδρασε σημαντικά στο μέγεθος και το βάρος της ράγας, το οποίο κυμάνθηκε από 2. 4 – 7. 4 g. Αναφέρει επίσης ότι σε ράγες της ποικιλίας (*Vitis labrusca* L.) λίπανση με 450 kg/ha καλίου αύξησε σημαντικά το μέγεθος των ραγών. Ο Boonterm *et al.*(2010), αναφέρει ότι σε ράγες της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, αύξηση της λίπανσης N-K προκάλεσε μείωση του μέσου βάρους της ράγας από 1.22 σε 1.13 g/ράγα το 2005 και 0.93 σε 0.90 g/ράγα το 2006.

2) Προσδιορισμός ολικών ανθοκυανών και φαινολικών: Pland *et al* (1996, 2000):

Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τα αποτελέσματα από την μέθοδο του Pland. Σε σχέση με τις ανθοκυάνες / g ράγας, το μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίζει η επέμβαση Γ (χλωριούχο κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση), ενώ τη μικρότερη συγκέντρωση η επέμβαση Η (λίπασμα με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε Mg και κάλιο). Οι ανθοκυάνες / ράγα επίσης παρουσιάζουν τη μικρότερη συγκέντρωση στην επέμβαση Η, ενώ η μεγαλύτερη παρουσιάζεται στην επέμβαση Α (μάρτυρας, χωρίς λίπανση καλίου) και ακολουθεί η επέμβαση Γ (χλωριούχο κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές και ομαδοποιούνται για τα mg ανθοκυανών / g και / ράγα αντίστοιχα.

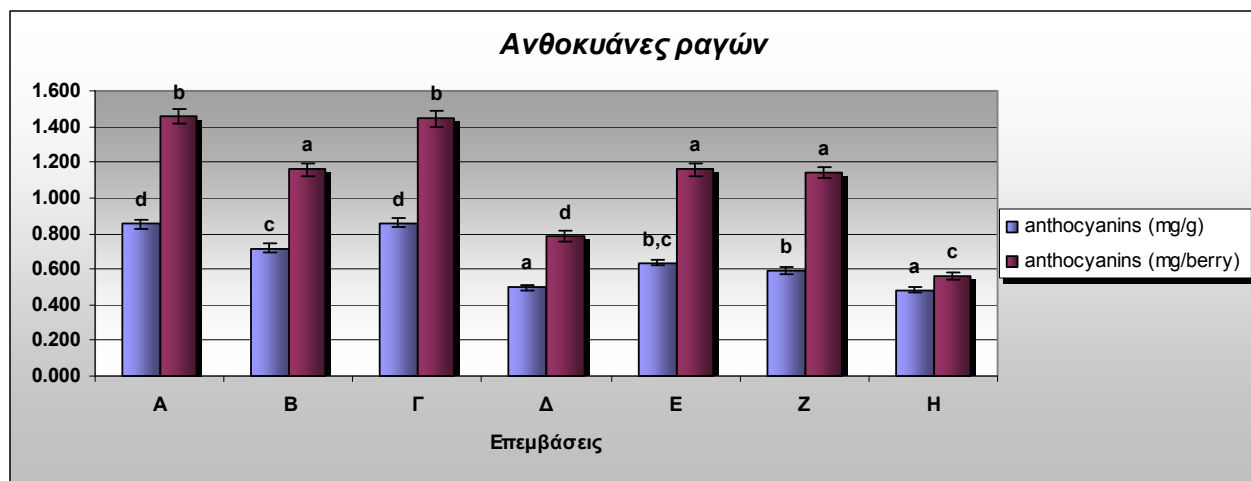
Τα ολικά φαινολικά / ράγα παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Α (μάρτυρας) και ακολουθεί η επέμβαση Γ (χλωριούχο κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση), ενώ τη μικρότερη παρουσιάζει η επέμβαση Η (λίπασμα με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε Mg και κάλιο). Τα ολικά φαινολικά / g ράγας, δεν ακολουθούν το ίδιο μοτίβο, καθώς την μεγαλύτερη συγκέντρωση έχουν στην επέμβαση Ζ (λίπασμα καλίου με υψηλή περιεκτικότητα Mg και καλίου) και την μικρότερη στην επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 4: Τα αποτελέσματα της μεθόδου Pland

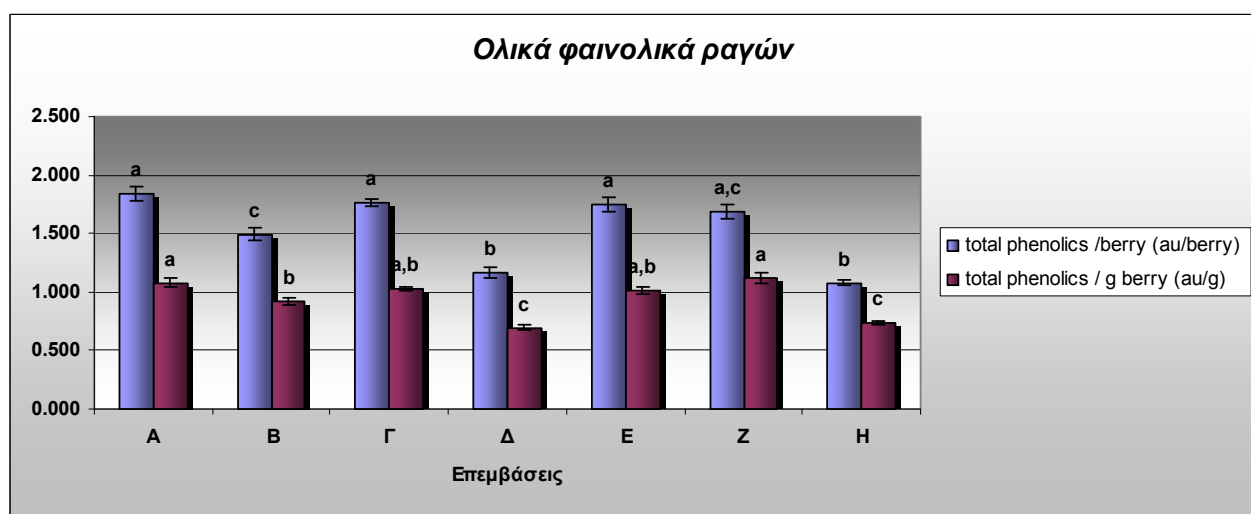
	Ανθοκυάνες (mg/g)	Ανθοκυάνες (mg/ράγα)	Ολικά φαινολικά /ράγα (au/ράγα)	Ολικά φαινολικά / g ράγας (au/g)	N
A	0,851±0,025 d	1,457±0,039 b	1,845±0,060 a	1,078±0,038 a	9
B	0,715±0,024 c	1,160±0,036 a	1,494±0,051 c	0,919±0,030 b	9
Γ	0,858±0,025 d	1,444±0,049 b	1,766±0,035 a	1,030±0,015 a,b	9
Δ	0,494±0,013 a	0,780±0,030 d	1,167±0,042 b	0,694±0,021 c	9
E	0,635±0,017 b,c	1,158±0,034 a	1,751±0,060 a	1,013±0,032 a,b	9
Z	0,590±0,021 b	1,141±0,035 a	1,689±0,066 a,c	1,121±0,040 a	9
H	0,480±0,016 a	0,561±0,024 c	1,079±0,020 b	0,730±0,016 c	9

*Η ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου Pland, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, p < 0,05), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επανάληψεις (3)*
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα με τα αποτελέσματα της μεθόδου.



Γράφημα 6: Ανθοκυάνες σε mg / g ράγας και mg/ράγα



Γράφημα 7: Ολικά φαινολικά σε au/ράγα και au / g ράγας

Η θετική επίδραση της λίπανσης με κάλιο στο σύνολο των ανθοκυανών αναφέρεται από τους Scienza *et al.*, (1981), Morris and Cawthon (1982), Chris *et al.*, (1999). Ο Boonterm *et al.* (2010), αναφέρει ότι σε ράγες της ποικιλίας Cabernet Sauvignon η αύξηση της λίπανσης με κάλιο δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στο χρώμα της ράγας. Επίσης τα αποτελέσματα της ερευνάς του καταλήγουν στο ότι την πρώτη χρονιά του πειράματος, με την εφαρμογή λίπανσης το χρώμα των ραγών σημείωσε την υψηλότερη τιμή (0,88 mg / g ράγας έως 0,889 mg / g ράγας και 0,89 - 0,90 mg / g ράγας την δεύτερη, για αυξανόμενες τιμές λίπανσης. Επίσης τα ολικά φαινολικά ραγών κυμάνθηκαν από 0,828 - 0,765 / g ράγας την πρώτη χρονιά και 1,292 - 1,387 / g ράγας την δεύτερη. Και στις δύο περιπτώσεις τα δεδομένα παρουσιάζονται για τις ποσότητες λίπανσης από την μικρότερη προς την μεγαλύτερη. Ο Boonterm *et al.*(2010), αναφέρει ότι σε ράγες της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, αύξηση της λίπανσης N-K είχε αρνητική επίδραση στο σύνολο των ανθοκυανών και φαινολικών, των οποίων οι τιμές κυμάνθηκαν 0.749 mg ανθοκυανών

/ράγα, 0.819 mg ανθοκυανών/g ράγας, ολικά φαινολικά 0.869 au/ράγα και ολικά φαινολικά 0.955 au /g ράγας. Αναφέρεται επίσης ότι η αύξηση του επιπέδου λίπανσης προκάλεσε το έτος 2005 του πειράματος, μείωση στο σύνολο των ανθοκυανών και φαινολικών από 0.947 σε 0.741 mg / ράγα και τα ολικά φαινολικά / ράγα από 0.850 σε 0.669. Ο Mohamed (2008) αναφέρει ότι σε ράγες της ποικιλίας Crimson το σύνολο των φαινολικών συστατικών κυμάνθηκε από 256 – 402 mg / Kg ράγας την πρώτη χρονιά και 353 – 417 mg / Kg ράγας τη δεύτερη χρονιά για αυξανόμενες ποσότητες καλίου. Την καλύτερη απόδοση σε ολικά φαινολικά είχε η μέτρια ποσότητα λίπανσης με κάλιο. Ο Cantos *et al.* (2002), αναφέρει σε σχέση με τα ολικά φαινολικά των ερυθρών ποικιλιών Red globe', 'Flame Seedless', 'Crimson Seedless', 'Napoleon', 'Superior Seedless', 'Dominga', 'Moscatel Italica', τις τιμές τους που κυμαίνονται: 225.4, 361.2, 131.9, 135.9, 135.7., 114.9, 145.1 mg/kg ράγας. Αναφέρει επίσης για τις συγκεντρώσεις των ολικών ανθοκυανών των ραγών των ποικιλιών που προαναφέρθηκαν, ότι κυμάνθηκαν από 151 mg/ Kg νωπού βάρους ράγας στην ποικιλία 'Flame Seedless' έως 68 mg/ Kg νωπού βάρους ράγας για την ποικιλία "Crimson Seedless'. Ο Mohamed (2008) αναφέρει ότι σε ράγες της ποικιλίας Crimson το σύνολο των ανθοκυανών σε mg ανθοκυανών / Kg ράγας κυμάνθηκε από 11.83 (για την μικρότερη ποσότητα λίπανσης) έως 19.86 (για την μεγαλύτερη ποσότητα λίπανσης).

cultivars	Total anthocyanin (mg/kg)	Total phenols (µg/ml GAE)
Md. Jean Matthias	40.3 e	1535 l
Öküzgözü	938.5 b	2429 d
Muscat Hamburg	384.6 hi	1279 m
Cabernet Sauvignon	990.8 a	2348 e
Tekidag Cekirdeksizi	173.8 j	965 n
Gewürztraminer	58.6 k	2083 f
2B/56	155.8 j	817 o
Kalecik Karasi	354.3 i	2036 g
Carigan	783.2 e	2057 fg
Kokulu Siyah	813.3 c	2038 g
Alphonse Lavallee	733.3 e	1728 h
Bogazkere	631.4 f	2649 c
Adkarasi	420.6 h	2695 b
Papazkarasi	390.6 hi	1697 i
Mourvedre	475.8 g	3062 a
Cinsaut	605.6 f	1597 k

Εικόνα 26: Περιεκτικότητα σε ολικές ανθοκυάνες και ολικά φαινολικά ποικιλιών (Mohamed, 2008).

3) Εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών και ταννινών και φαινολικό δυναμικό των ραγών: “Glories method”:

Στον παρακάτω πίνακα η τιμή AE% δίνει το ποσοστό εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών. Όσο μικρότερη είναι η τιμή AE τόσο πιο εύκολα εκχυλίζονται οι ανθοκυάνες. Την μικρότερη τιμή AE παρουσιάζει η επέμβαση E (θεικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση), ενώ την μεγαλύτερη τιμή η επέμβαση B (χλωριούχο κάλιο σε μικρή συγκέντρωση). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές, ακόμη και μεταξύ επεμβάσεων με της ίδιας μορφής λίπανση, αλλά διαφορετικής ποσότητας. Η επέμβαση με την μικρότερη τιμή στον δείκτη εκχυλισματικότητας, έχει τα πιο ώριμα σταφύλια, καθώς ο δείκτης AE δίνει πληροφορίες σχετικά με την ωρίμανση των ραγών, οι οποίες εκχυλίζονται ευκολότερα από τις πιο ώριμες ράγες.

Πίνακας 5: Τα αποτελέσματα της μεθόδου “Glories”. Τα αποτελέσματα εκφράζονται μέσω των δεικτών του πίνακα

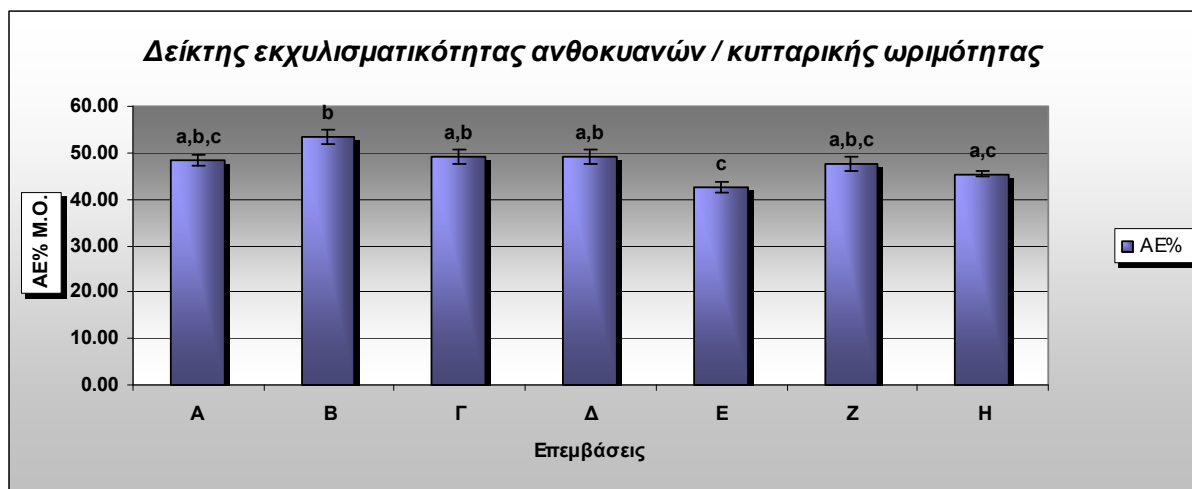
	AE%	MP%	dpell	dpell%	dTrep	dTrep%	N
A	48,322±1,176 a,b,c	63,722±0,923 c	11,040±0,231 b	36,278±0,923 c	18,513±0,637 a	60,836±2,153 e	6
B	53,498±1,455 b	74,270±1,510 a,b	8,503±0,174 a	24,194±0,849 a	25,084±1,888 b	74,270±1,510 b,c,d	6
Γ	49,179±1,695 a,b	67,759±0,921 c,d	10,601±0,428 b	32,241±0,921 b	22,264±0,631 a,b	67,759±0,921 a	6
Δ	49,120±1,444 a,b	74,269±2,220 a,b	8,209±0,272 a	29,146±1,082 b	19,997±0,575 a	70,854±1,082 a,b,c	6
E	42,510±1,127 c	77,202±1,017 a	7,925±0,331 a	24,006±0,749 a	25,052±0,535 b	75,994±0,749 c,d	6
Z	47,619±1,556 a,b,c	70,029±0,682 b,d	8,578±0,161 a	29,971±0,682 b	20,082±0,523 a	70,029±0,682 a,b	6
H	45,361±0,565 a,c	76,563±0,915 a	6,525±0,062 c	23,437±0,915 a	21,473±0,867 a,b	76,563±0,915 d	6

*Η ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου GLORIE, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, $p < 0,05$), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (2))*

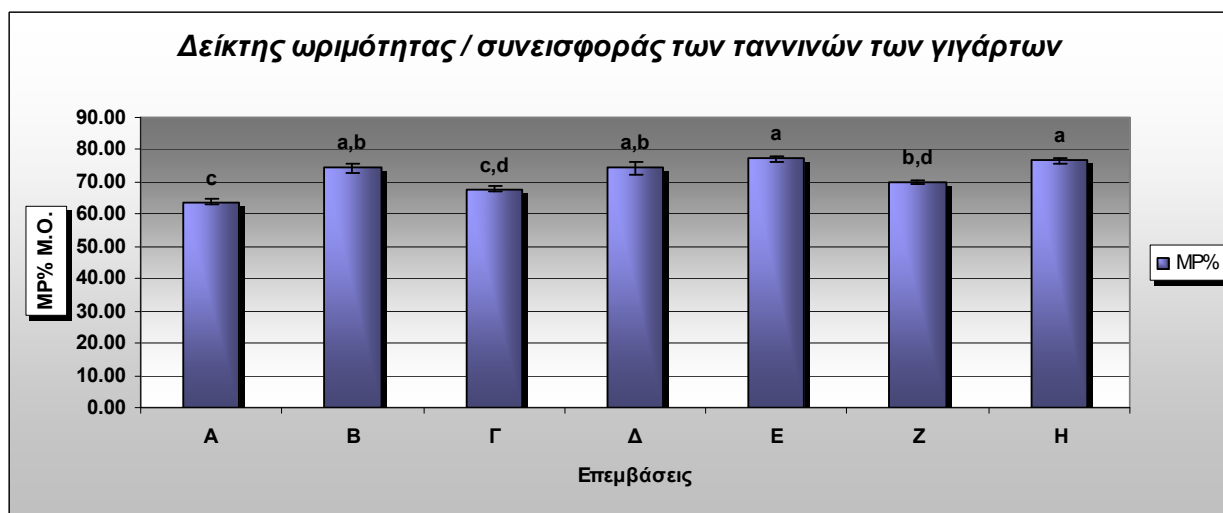
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

Ο δείκτης MP% δίνει πληροφορίες σχετικά με τον βαθμό ωριμότητας των γιγάρτων και βαθμό συμμετοχής των ταννινών των γιγάρτων στο σύνολο των φαινολικών. Από τον πίνακα φαίνεται ότι τη μεγαλύτερη συμμετοχή στα φαινολικά των ραγών έχουν οι ταννίνες των γιγάρτων της επέμβασης E (θεικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση) και την μικρότερη οι ταννίνες της επέμβασης A (μάρτυρας). Οι στατιστικές διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι επίσης σημαντικές. Ωστόσο η συγκέντρωση των ταννινών που προέρχονται από τα γίγαρτα (dTrep) είναι μεγαλύτερη στην επέμβαση B (χλωριούχο κάλιο σε μικρή συγκέντρωση), ενώ ακολουθεί η επέμβαση E και την μικρότερη συγκέντρωση παρουσιάζει η επέμβαση A (μάρτυρας). Σε σχέση με την

συγκέντρωση των ταννινών του φλοιού (drell) την μεγαλύτερη παρουσιάζει η επέμβαση Α (μάρτυρας) και την μικρότερη η επέμβαση Η (λίπανση με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και Mg). Σε όλες τις περιπτώσεις οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές. Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα με τα αποτελέσματα της μεθόδου:



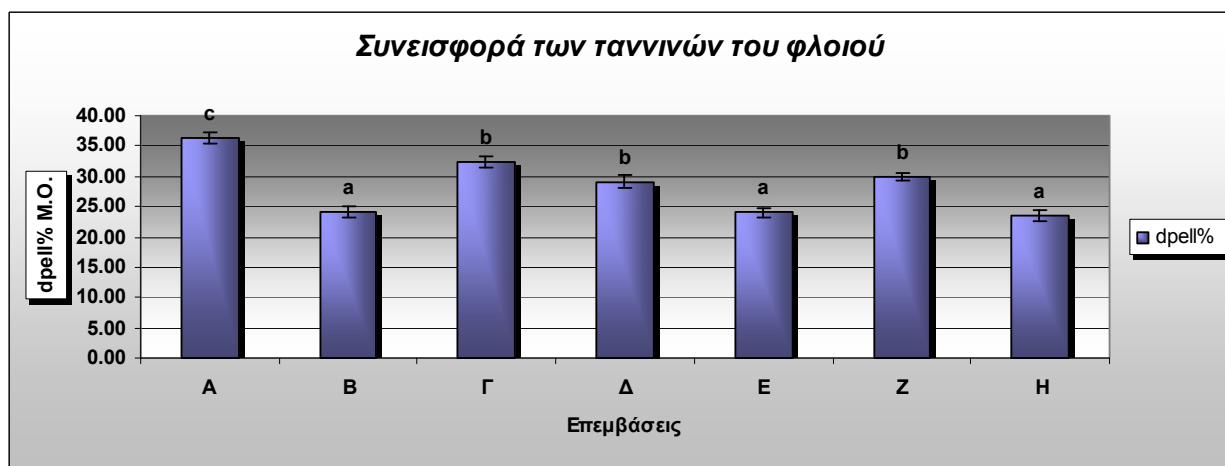
Γράφημα 8: Γράφημα δείκτη κυτταρικής ωριμότητας των ραγών



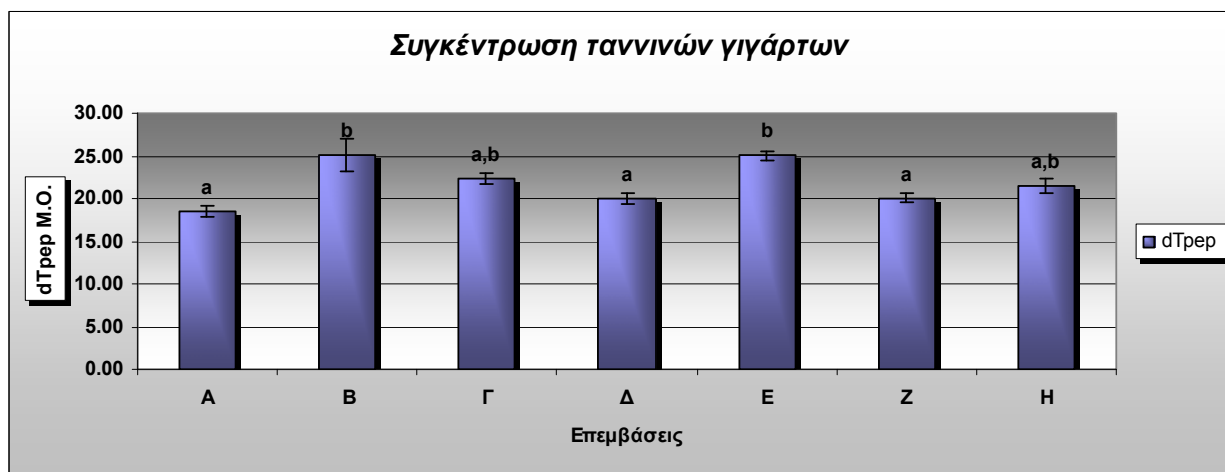
Γράφημα 9: Γράφημα δείκτη συνεισφοράς των ταννινών των γιγάρτων



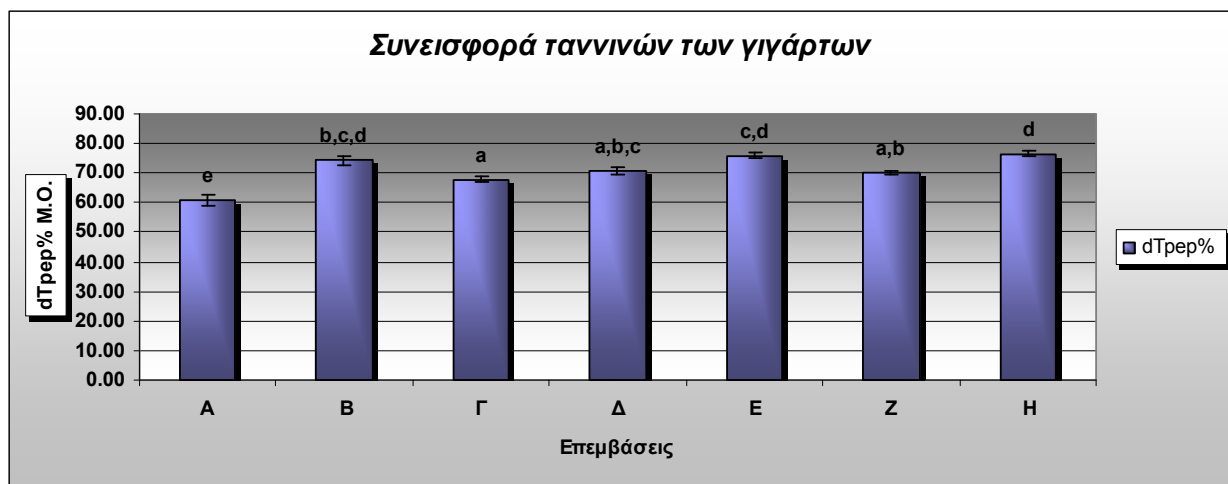
Γράφημα 10: Γράφημα συγκέντρωσης των ταννινών του φλοιού των ραγών



Γράφημα 11: Συνεισφορά των ταννινών του φλοιού



Γράφημα 12: Γράφημα συγκέντρωσης των ταννινών των γιγάρτων των ραγών



Γράφημα 13: Συνεισφορά των ταννινών των γιγάρτων

Κατά την μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε και ο Δείκτης Ολικών Φαινολών των ραγών (Δ.Φ.Ο.):

Πίνακας 6: Δείκτης Ολικών Φαινολών

	Δ.Φ.Ο.	N
A	30,5±0,011 a,b	6
B	34,9±0,013 c	6
Γ	32,8±0,008 b,c	6
Δ	28,2±0,005 a	6
E	32,9±0,007 b,c	6
Z	28,6±0,005 a	6
H	27,9±0,008 a	6

*Η ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των τιμών ΔΦΟ, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, $p < 0,05$), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (2))*

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

Την μεγαλύτερη τιμή Δ.Φ.Ο. παρουσιάζει η επέμβαση B (χλωριούχο κάλιο σε μικρή συγκέντρωση), ενώ η επέμβαση με την μικρότερη τιμή Δ.Φ.Ο. είναι η H (λίπανση με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και Mg). Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές ανάμεσα στις επεμβάσεις, με κύριο χαρακτηριστικό το είδος λίπανσης και όχι το ποσοστό καλίου, με εξαίρεση την λίπανση με θειικό κάλιο (Δ, E), όπου οι διαφορές είναι σημαντικές λόγω της ποσότητας του καλίου. Παρακάτω παρατίθεται και το γράφημα του Δ.Φ.Ο.:



Γράφημα 14: Γράφημα Δείκτη Ολικών Φαινολών

4) Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose:

Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου, κατά την οποία προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ταννινών που έχουν σχηματίσει πολυμερή (με την methyl cellulose).

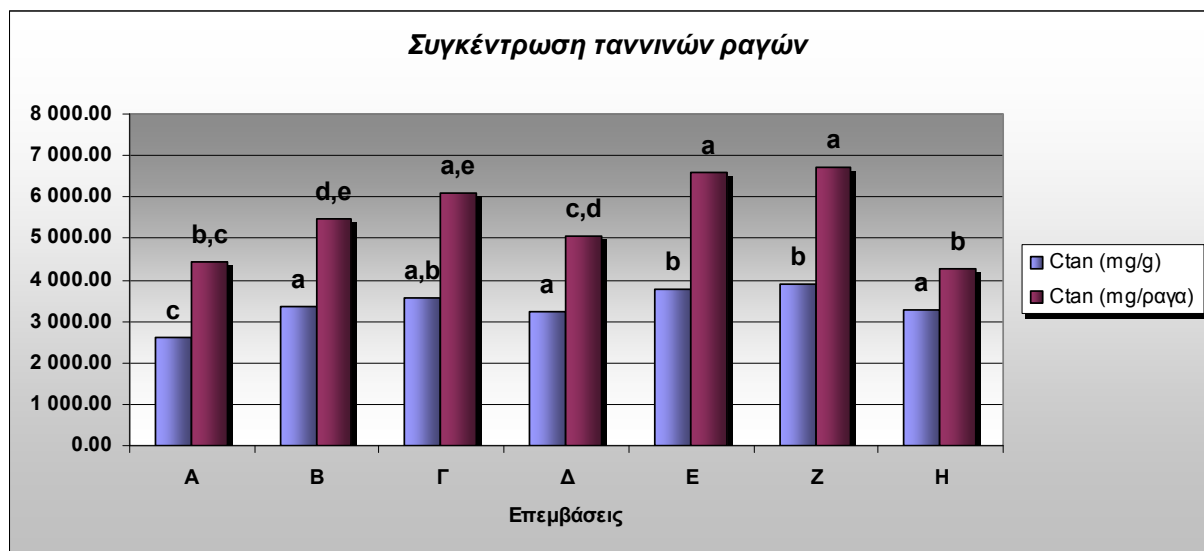
Πίνακας 7: Αποτελέσματα μεθόδου methyl cellulose

	Ctan (mg/g)	Ctan (mg/ράγα)	N
A	2.598,463±62,803 c	4.447,493±97,451 b,c	9
B	3.362,180±89,348 a	5.457,369±121,615 d,e	9
Γ	3.550,847±94,411 a,b	6.075,672±130,512 a,e	9
Δ	3.216,820±91,418 a	5.077,237±155,779 c,d	9
E	3.753,581±85,133 b	6.601,861±240,120 a	9
Z	3.911,021±57,085 b	6.725,223±204,871 a	9
H	3.255,544±103,587 a	4.287,676±151,983 b	9

H ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου *Methyl cellulose*, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (*Tukey's test*, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (3)
 Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοi όροι σε τριπλή επανάληψη

Σύμφωνα με τον πίνακα την μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυμερισμένων ταννινών παρουσιάζει η επέμβαση Z (λίπανση με υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και Mg), ενώ την χαμηλότερη η επέμβαση A (μάρτυρας), τόσο ανά g ράγας, όσο και ανά ράγα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν διαφορες στατιστικά σημαντικές μεταξύ τους και

φαίνεται να διαφοροποιούνται σε επίπεδο ποσοστό καλίου και όχι είδους λίπανσης. Παρακάτω παρατίθεται το γράφημα με τα αποτελέσματα της μεθόδου.



Γράφημα 15: Γράφημα συγκέντρωσης πολυμερών ταννίνης – πολυσακχαρίτη

ii) Αναλύσεις σε φλοιούς

1) Αποτελέσματα συγκέντρωσης ανθοκυανών των φλοιών από ανάλυση HPLC:

Με την ανάλυση HPLC έγινε ο προσδιορισμός των μονογλυκοζιτών των ανθοκυανών, δηλαδή του μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης, της δελφινιδίνης, της κυανιδίνης, της πετουνιδίνης, της παιονιδίνης και της μαλβιδίνης, καθώς και των ακυλιωμένων ανθοκυανών, του οξικού και κουμαρικού εστέρα της μαλβιδίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα μαλβιδίνης σε mg / g νωπού βάρους φλοιών. Κατά την εφαρμογή της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αρχικά εκλύεται ο πιο πολικός μονογλυκοζίτης (η δελφινιδίνη) και στο τέλος η λιγότερο πολική ακυλιωμένη ανθοκυάνη (ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των φλοιών.

Το μεγαλύτερο ποσοστό δελφινιδίνης παρουσιάζει η επέμβαση A (μάρτυρας) και την μικρότερη η επέμβαση H (λίπανση με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και Mg). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση A (μάρτυρας) και την μικρότερη στην επέμβαση H (λίπανση με πολύ υψηλό ποσοστό σε κάλιο και Mg). Τα αποτελέσματα συμβαδίζουν με αυτά της δελφινιδίνης. Οι

διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές, ενώ φαίνεται να υπάρχει διαφοροποίηση σε σχέση με το είδος της λίπανσης.

Η πετουνιδίνη παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Α και την μικρότερη στην επέμβαση Η. Τα αποτελέσματα συμβαδίζουν τόσο για την δελφινιδίνη, όσο και για την κυανιδίνη. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές ανάμεσα στις επεμβάσεις.

Πίνακας 8: Τα αποτελέσματα για τις ανθοκυάνες των φλοιών των ραγών της ανάλυσης HPLC. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ανθοκυάνης / g νεπού βάρους φλοιών

	<i>D-3-gl (mg/g)</i>	<i>Cy-3-gl (mg/g)</i>	<i>Pt-3-gl (mg/g)</i>	<i>Pn-3-gl (mg/g)</i>	<i>M-3-gl (mg/g)</i>	<i>M.ac (mg/g)</i>	<i>M.coum (mg/g)</i>
A	2,299± 0,095 c	0,470±0,026 b	2,136±0,070 d	1,747±0,038 c	13,773±0,172 b	0,656±0,026 b	2,264±0,095 a
B	1,804±0,291 b,c	0,323±0,049 b	1,784±0,247 c,d	1,252±0,142 a,b	12,665±1,212 a,b	0,629±0,074 a,b	2,360±0,234 a
Γ	1,424±0,163 a,b	0,319±0,045 a,b	1,460±0,144 a,b,c	1,352±0,140 b,c	11,860±0,626 a,b	0,538±0,033 a,b	2,439±0,085 a
Δ	1,353±0,183 a,b	0,282±0,049 a	1,342±0,164 a,b,c	1,100±0,149 a,b	10,431±1,112 a,b	0,496±0,054 a,b	1,984±0,225 a
E	0,934±0,029 a	0,197±0,005 a	1,089±0,028 a,b	0,972±0,016 a,b	10,776±0,263 a,b	0,469±0,016 a	2,286±0,080 a
Z	1,655±0,173 b,c	0,299±0,029 a	1,701±0,148 b,c,d	1,231±0,087 a,b	12,951±0,867 a,b	0,534±0,025 a,b	2,417±0,192 a
H	0,807±0,017 a	0,184±0,011 a	0,942±0,017 a	0,887±0,020 a	9,788±0,328 a	0,578±0,026 a,b	2,457±0,174 a

N = 6

*Η ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης HPLC για τις ανθοκυάνες, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, $p < 0,05$), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (2)*

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

Η παιονιδίνη παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό στην επέμβαση Α (μάρτυρας) και το μικρότερο στην επέμβαση Η (λίπανση με πολύ υψηλό ποσοστό σε κάλιο και Mg). Όπως και προηγουμένως τα αποτελέσματα ταυτίζονται με αυτά για την δελφινιδίνη, κυανιδίνη και πετουνιδίνη. Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται επίσης στατιστικά σημαντικές.

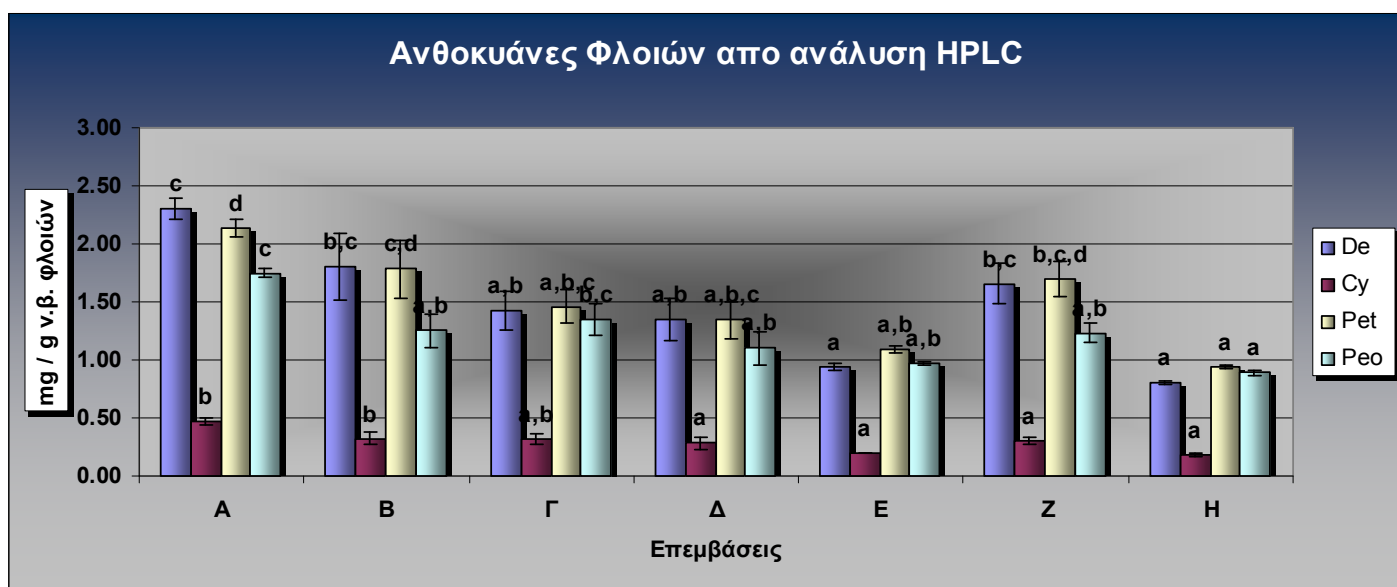
Τα αποτελέσματα για τον μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης (την πιο άφθονη ανθοκυάνη των ραγών), συμπίπτουν με αυτά των άλλων μονογλυκοζιτών. Την μεγαλύτερη συγκέντρωση έχει στην επέμβαση Α (μάρτυρας) και την μικρότερη στην επέμβαση Η (λίπανση με πολύ υψηλό ποσοστό σε κάλιο και Mg). Οι διαφορές θεωρούνται επίσης στατιστικά σημαντικές.

Τα αποτελέσματα για τον οξικό εστέρα της μαλβιδίνης διαφοροποιούνται, καθώς την μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζει στην επέμβαση Α (μάρτυρας), αλλά την μικρότερη

στην επέμβαση E (θεικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση). Οι διαφορές θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Σε σχέση με τον κουμαρικό εστέρα της μαλβιδίνης τα αποτελέσματα διαφέρουν από τα προηγούμενα, εφόσον την μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζει στην επέμβαση H (λίπανση με πολύ υψηλό ποσοστό καλίου και Mg) και την μικρότερη στην επέμβαση Δ (θεικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση). Ωστόσο οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα με τα αποτελέσματα της μεθόδου.



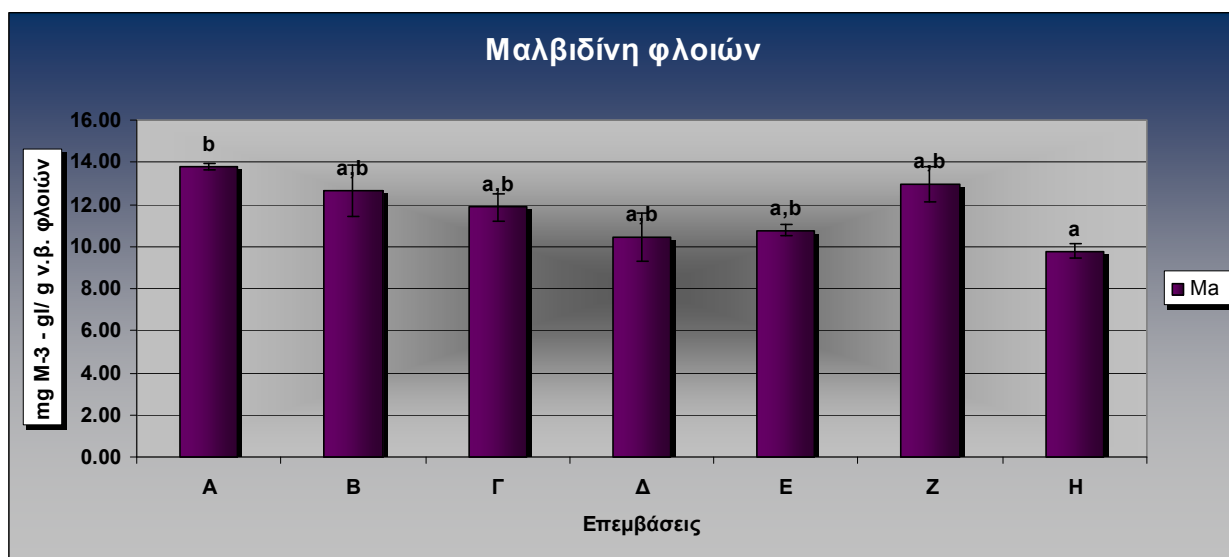
Γράφημα 16: Γράφημα της συγκέντρωσης των μονογλυκοζιτών της δελφινιδίνης, κυανιδίνης, πετουινιδίνης και παιονιδίνης

Σε διάφορα πειράματα αναδεικνύεται επίσης το γεγονός, ότι το ποσοστό των ανθοκυάνων, τόσο επιμέρους αλλά και του συνόλου αυτών, ποικίλει ανάλογα με το συνδυασμό διαφόρων παραγόντων, όπως του βαθμού ωρίμανσης και συνδυαστικών καλλιεργητικών τεχνικών (Abd El-Razek, 2011). Ο Delgado *et al.*, 2004, αναφέρει ότι υψηλές ποσότητες καλίου μπορεί να έχουν ως συνέπεια τη μείωση του χρώματος του γλεύκους κατά την συγκομιδή. Επίσης οι Dundon *et al.*, (1984), Freeman and Kliewer (1983) και Somers (1977), αναφέρουν ότι η λίπανση με κάλιο, σε εδαφικές συνθήκες με επάρκεια ή υψηλές ποσότητες καλίου, μπορεί να οδηγήσουν σε γλεύκη και οίνους με πολύ υψηλό pH, μικρότερο ποσοστό χρώματος στις ερυθρές ποικιλίες και αρνητική επίδραση στην ποιότητα του παραγόμενου οίνου. Η Sipioga *et al.*, (2005), αναφέρει ότι η σύνθεση των ραγών (Brix, περιεκτικότητα σε K, pH, TA και ανθοκυάνες φλοιού), δεν

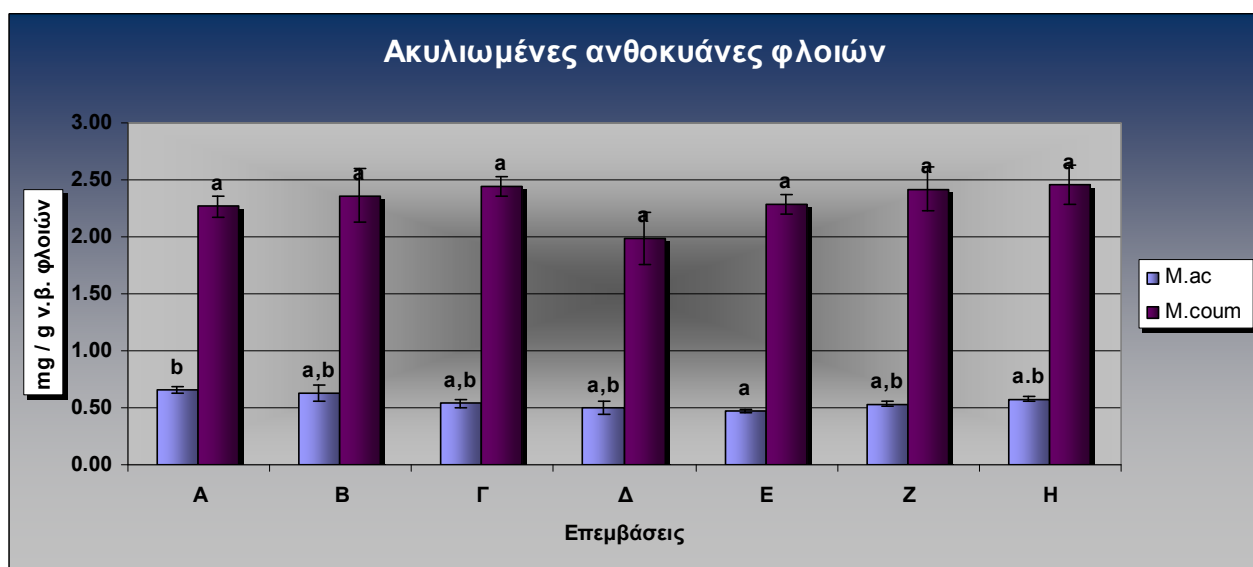
επιηρέαστηκε από την λίπανση με κάλιο, ακόμη κι όταν η περιεκτικότητα του γλεύκους σε κάλιο υπερέβαινε τα 200 mg/L σε σχέση με τον μάρτυρα. Αναφέρει επίσης ότι η πυκνότητα του χρώματος ($A_{420} + A_{520}$), η απόχρωση (A_{420}/A_{520}), οι συνολικές ανθοκυάνες, οι ιονισμένες ανθοκυάνες και ο βαθμός ιονισμού, δεν επιηρέαστηκαν σημαντικά από την λίπανση καλίου. Η λίπανση με κάλιο μπορεί να αυξήσει την περιεκτικότητα σε K του γλεύκους και παραγόμενου οίνου, καθώς και το pH, τα οποία επιδρούν στην ισορροπία των τεσσάρων μορφών των ανθοκυανών μεταξύ τους και κατά συνέπεια στο χρώμα (Sipiora *et al.*, 2005). Ο Delgado *et al.* (2004), αναφέρει ότι η συγκέντρωση των ανθοκυανών σε ράγες της ποικιλίας Tempranillo, αυξήθηκε στον περκασμό ανάλογα με την ποσότητα καλίου που εφαρμόστηκε αποδίδοντας 23 – 40% περισσότερο σε αναλογία με την ποσότητα του λιπάσματος. Ωστόσο η ποσότητα δεν επιηρέασε το χρώμα και την απόχρωση του γλεύκους την περίοδο του τρύγου. Αναφέρει ακόμη ότι υπερβολική ποσότητα καλίου μπορεί να προκαλέσει απώλεια του χρώματος την περίοδο της συγκομιδής. Ο Boontemp *et al.* (2010), αναφέρει ότι σε ράγες της ποικιλίας Cabernet Sauvignon η πιο άφθονη ανθοκυάνη ήταν η μαλβιδίνη, ενώ οι τιμές των επιμέρους ανθοκυανών και για αυξανόμενες ποσότητες λίπανσης καλίου κυμαίνονται: για την πετουνιδίνη 0,379 – 0,318 και 0,2 – 0,21 mg / g ράγας, την κυανιδίνη 0,036 – 0,032 mg / g ράγας και 0,078 – 0,089 mg / g ράγας και για τη μαλβιδίνη 0,51 – 0,56 mg / g ράγας για δύο συνεχόμενες χρονιές.

Η Sipiora *et al.* (2004), αναφέρει ότι λίπανση με κάλιο σε ράγες της ποικιλίας *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir δεν προκάλεσε αλλαγή στην περιεκτικότητα των φλοιών σε ανθοκυάνες, η συγκέντρωση των οποίων κυμάνθηκε από 0,3 – 0,31 mg / cm². Η Toralovic *et al.* (2011), αναφέρει ότι με την εφαρμογή καλιούχου λίπανσης σε σταφύλια της ποικιλίας *Vitis vinifera* L. (cv. ‘Cardinal’) για δύο συνεχόμενα έτη, το σύνολο των ανθοκυανών κυμάνθηκε από 373 – 1473 mg / Kg ράγας για τον μάρτυρα και 476 – 1477 mg / Kg ράγας για την επέμβαση, την πρώτη χρονιά, ενώ τη δεύτερη οι τιμές διαμορφώθηκαν από 811 – 1749 mg / Kg ράγας για τον μάρτυρα και 1029 - 1919 mg / Kg ράγας για τις επεμβάσεις. Η αφθονότερη ανθοκυάνη ήταν η πεονιδίνη, ακολουθούμενη από τη μαλβιδίνη. Ο Mohamed (2008), αναφέρει ότι σε ράγες της ποικιλίας “Crimson Seedless” οι συγκεντρώσεις της κυανιδίνης κυμάνθηκαν από 8.23 – 11.95 mg / Kg ράγας (η μεγαλύτερη ποσότητα αντιστοιχεί στην μέτρια λίπανση), της πεονιδίνης 56.21 – 101.46 mg / Kg ράγας (η μεγαλύτερη ποσότητα αντιστοιχεί στην μεγαλύτερη λίπανση) και της μαλβιδίνης 8 – 16.5 mg / Kg ράγας (η μεγαλύτερη ποσότητα αντιστοιχεί στην μεγαλύτερη λίπανση). Το σύνολο των ανθοκυανών

κυμάνθηκε από 99 – 134 mg / Kg φλοιού ράγας (η μεγαλύτερη ποσότητα αντιστοιχεί στην μεγαλύτερη λίπανση).

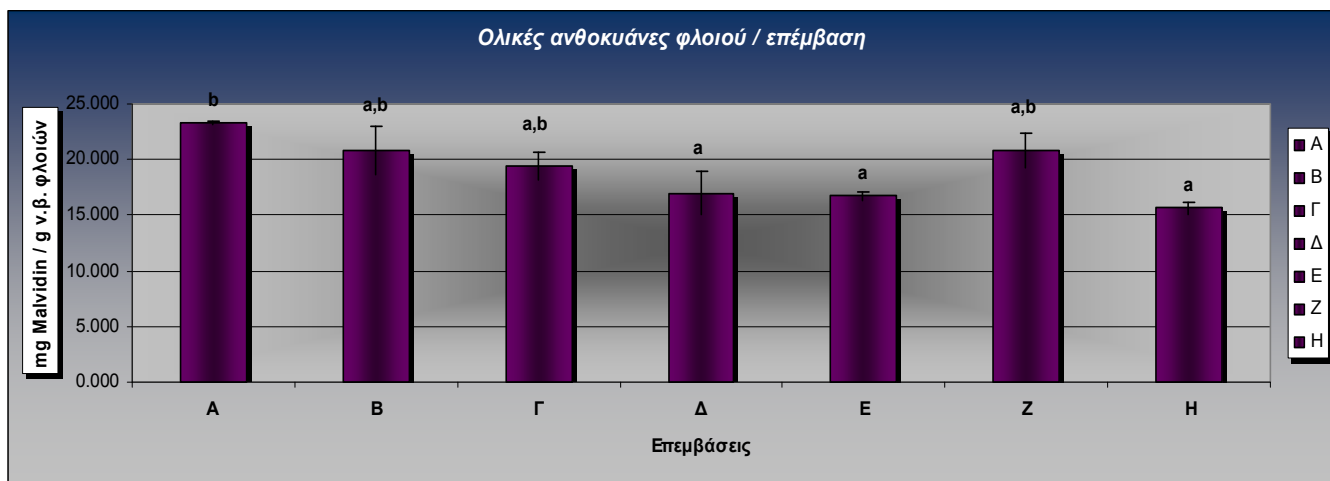


Γράφημα 17: Γράφημα της συγκέντρωσης του μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης



Γράφημα 18: Γράφημα της συγκέντρωσης του οξικού και κουμαρικού εστέρα της μαλβιδίνης

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών ανθοκυανών με την μέθοδο της ανάλυσης HPLC εμφανίζει η επέμβαση A (μάρτυρας) και την μικρότερη η επέμβαση H (λίπανση με πολύ υψηλό ποσοστό καλίου και Mg). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω γράφημα.



Γράφημα 19: Γράφημα της συγκέντρωσης των ολικών ανθοκυανών

iii) Αναλύσεις σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων

1) Αποτελέσματα ολικών φαινολικών φλοιών & γιγάρτων με ανάλυση HPLC:

Εφαρμόστηκε η μέθοδος ανάλυσης HPLC σε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων για τον προσδιορισμό των μονομερών φλαβαν – 3 – ολών κατεχίνης, επικατεχίνης, επιγαλλοκατεχίνης, επικατεχίνης του γαλλικού εστέρα, επιγαλλοκατεχίνης του γαλλικού εστέρα, των διμερών B1 και B2, του τριμερούς C1, του γαλλικού οξέος και των φλαβονολών (κερσετίνης, μυρισετίνης, καμπφερόλης και ρουτίνης) στα εκχυλίσματα των φλοιών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg / g νωπού βάρους φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα.

Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τα αποτελέσματα από την ανάλυση στα εκχυλίσματα των φλοιών.

Το γαλλικό οξύ παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση H (λίπανση με πολύ υψηλό ποσοστό σε κάλιο και Mg) και την μικρότερη στην επέμβαση Z (λίπανση με κάλιο και Mg). Ωστόσο οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Το σύνολο της κατεχίνης και επικατεχίνης παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση B (χλωριούχο κάλιο σε μικρή συγκέντρωση) και την μικρότερη στην επέμβαση E (θειικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση). Οι διαφορές δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 9: Τα αποτελέσματα για τα φαινολικά συστατικά των φλοιών των ραγών της ανάλυσης HPLC.

Εκφράζονται σε mg φαινολικών συστατικών / g νεπού βάρους φλοιών

*Η EGC δεν ανιχνεύθηκε στις επεμβάσεις Β, Γ σε καμία επανάληψη

	<i>mg gallic acid / g</i> <i>v.β. φλοιών</i>	<i>mg cat.+epic. / g</i> <i>v.β. φλοιών</i>	<i>mg B1+B2+C1 / g</i> <i>v.β. φλοιών</i>	<i>mg ECG+ EGCG</i> <i>+EGC / g v.β.</i> <i>φλοιών</i>	<i>mg flavonols / g</i> <i>v.β. φλοιών</i>	<i>Total phenolics(mg) /</i> <i>g v.β. φλοιών</i>	N
A	0,0022±0,0001 a	0,0346±0,0055 a	0,0405±0,0062 a	0,0903±0,0113 a	0,0522±0,0067 a	0,2197±0,0290 a	3
B	0,0024±0,0004 a	0,0366±0,0065 a	0,0353±0,0049 a,b	0,0384±0,0087 a	0,0761±0,0090 a	0,1887±0,0282 a	3
Γ	0,0021±0,0004 a	0,0249±0,0018 a	0,0320±0,0072 a,b	0,0652±0,0114 a	0,0852±0,0297 a	0,2094±0,0464 a	3
Δ	0,0022±0,0004 a	0,0275±0,0055 a	0,0422±0,0084 a	0,0791±0,0157 a	0,0441±0,0088 a	0,1950±0,0388 a	3
E	0,0020±0,0004 a	0,0246±0,0033 a	0,0116±0,0015 b	0,0631±0,0147 a	0,0558±0,0019 a	0,1571±0,0174 a	3
Z	0,0016±0,0004 a	0,0283±0,0066 a	0,0244±0,0064 a,b	0,0654±0,0161 a	0,0758±0,0219 a	0,1955±0,0500 a	3
H	0,0036±0,0007 a	0,0341±0,0040 a	0,0168±0,0009 a,b	0,0828±0,0134 a	0,0380±0,0065 a	0,1753±0,0255 a	3

*Η ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων σε εκχυλίσματα φλοιών, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, $p < 0,05$), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (1))*

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

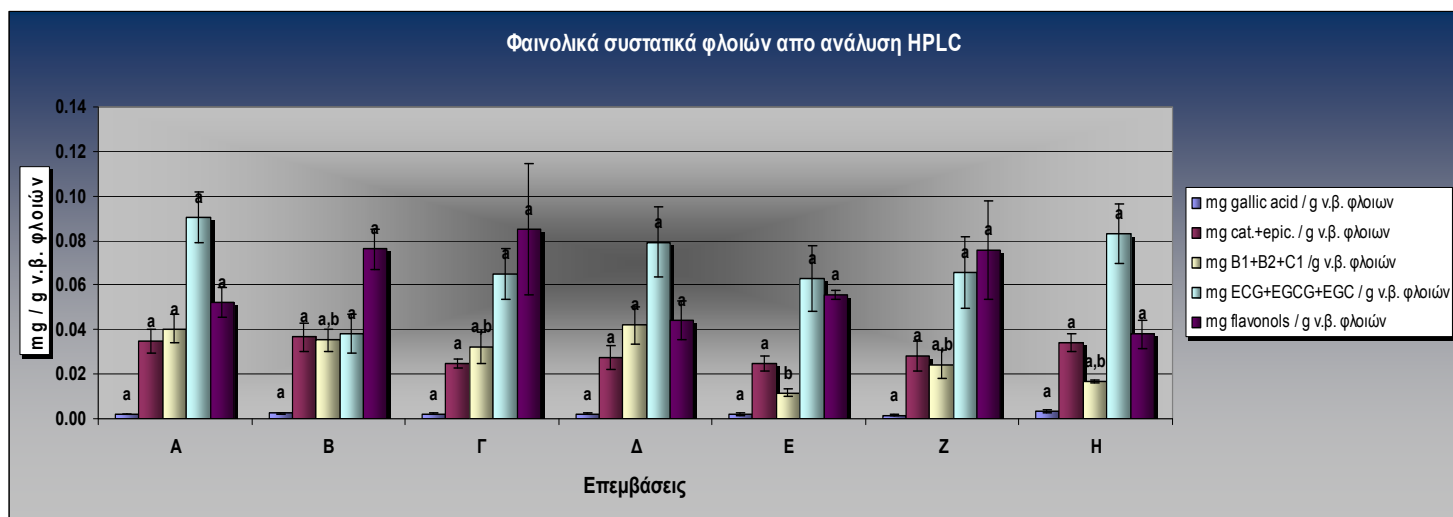
Το σύνολο των B1, B2 και C1 παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση) και την μικρότερη στην επέμβαση E (θειικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση). Οι διαφορές στην περίπτωση αυτή θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Οι επιγαλλοκατεχίνη, επικατεχίνη του γαλλικού εστέρα και επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού εστέρα, παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό στην επέμβαση A (μάρτυρας) και την μικρότερη στην επέμβαση B (χλωριούχο κάλιο σε μικρή συγκέντρωση). Ωστόσο οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

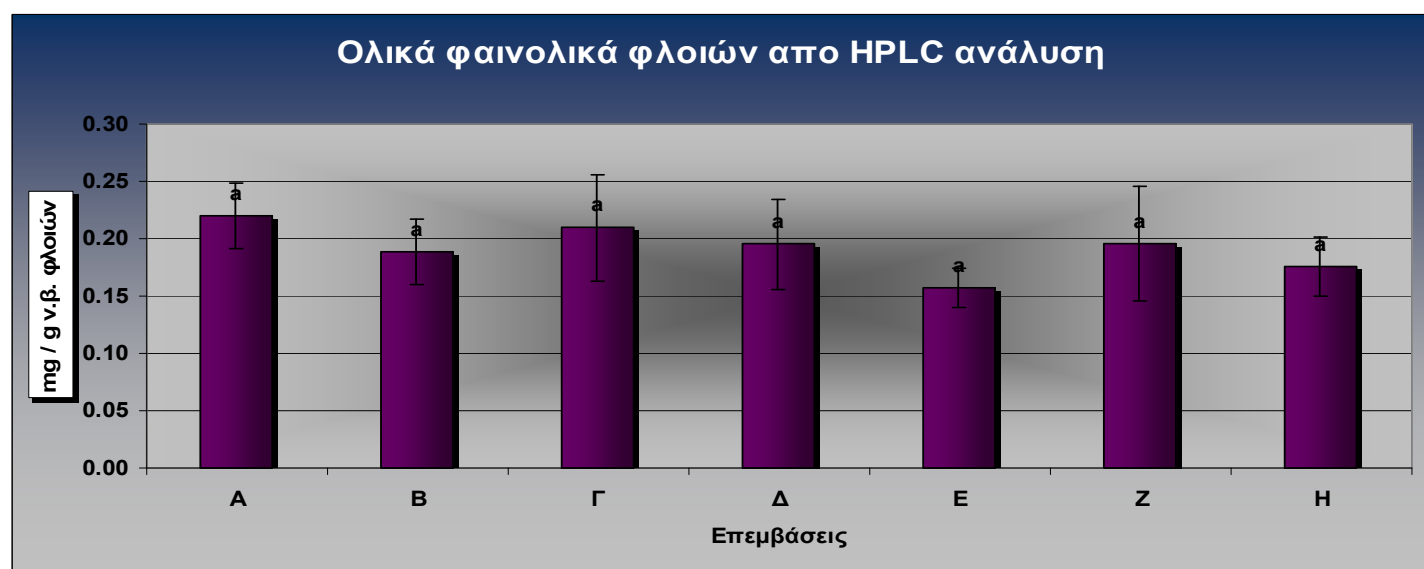
Το σύνολο των φλαβονολών παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό στην επέμβαση Γ (χλωριούχο κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση) και την μικρότερη στην επέμβαση Η (λίπανση με πολύ υψηλό ποσοστό καλίου και Mg). Οι διαφορές δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Το σύνολο των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των φλοιών παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση A (μάρτυρας) με ακόλουθη την επέμβαση Γ (χλωριούχο κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση) και τη μικρότερη στην επέμβαση E (θειικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση). Οι διαφορές ωστόσο δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα με τα αποτελέσματα της μεθόδου.



Γράφημα 20: Γράφημα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των φλοιών



Γράφημα 21: Γράφημα της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των φλοιών

Ο Abd El-Razek (2011), αναφέρει ότι η λίπανση με κάλιο είχε θετική επίδραση στο σύνολο των φλαβονολών των φλοιών της ποικιλίας 'Crimson Seedless'. Συγκεκριμένα αναφέρει ότι η λίπανση με μέτριο ποσοστό καλίου (285 kg K₂O/ha) είχε τη μεγαλύτερη θετική επίδραση σε σχέση με την λίπανση με μικρό ποσοστό καλίου. Ωστόσο αναφέρει ότι οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Σε σχέση με το σύνολο των προανθοκυανιδών των φλοιών, ο Abd El-Razek (2011), αναφέρει ότι το ποσοστό τους αυξήθηκε με την αύξηση της λίπανσης με κάλιο (από 240 σε 285 kg K₂O/ha), ωστόσο με αύξηση της λίπανσης πάνω από κάποιο όριο (330 kg K₂O/ha), δεν παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των προανθοκυανιδών.

Επίσης αναφέρει ότι το σύνολο των φλαβονολών των φλοιών, δεν επηρεάστηκε από τη λίπανση του καλίου. Ο Delgado *et al.*(2004), αναφέρει για τη λίπανση με κάλιο (0, 60 και 120 gK₂O/ πρέμνο σε K₂SO₄) σε πρέμνα της ποικιλίας Tempranillo ότι τα ολικά φαινολικά των φλοιών (εκφρασμένα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος) κυμάνθηκαν από 778 mg/L για την μικρότερη ποσότητα λίπανσης, 992 mg/L για την μέτρια ποσότητα λίπανσης και 582 mg/L για την μεγαλύτερη. Η Toralovic *et al.*(2011), αναφέρει ότι με την εφαρμογή καλιούχου λίπανσης σε σταφύλια της ποικιλίας *Vitis vinifera* L. (cv. 'Cardinal') για δύο συνεχόμενα έτη, το σύνολο των φλαβονολών της ράγας κυμάνθηκε από 795 – 2354 mg /Kg ράγας για τον μάρτυρα και από 707 – 2312 mg /Kg ράγας για τις επεμβάσεις. Επίσης το σύνολο των φλαβαν - 3 –ολων κυμάνθηκε από 623 – 785 mg /Kg ράγας για τον μάρτυρα και από 651 – 980 mg /Kg ράγας για τις επεμβάσεις. Την δεύτερη χρονιά του πειράματος οι τιμές κυμάνθηκαν από 1172 - 1489 mg /Kg ράγας για τον μάρτυρα και 1152 - 1300 mg /Kg ράγας για τις επεμβάσεις. Αναφέρεται επίσης ότι η αφθονότερη φλαβονόλη ήταν η κερσετίνη και σε μικρότερο ποσοστό βρισκόταν η μυρισετίνη. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρει και ο Cantos *et al.*(2002), για διάφορες ερυθρές ποικιλίες. Ο Pena-Neira *et al.*(2007), αναφέρει ότι η συγκέντρωση της κερσετίνης ήταν 675.34 mg/1000 g σε φλοιούς της ποικιλίας Syrah. Επίσης άφθονος σε φλαβονόλες ήταν και ο φλοιός ραγών της ποικιλίας Cardinal. Αναφέρεται από την Toralovic *et al.*(2011), ότι η (-) επικατεχίνη ήταν η φλαβαν 3 όλη με την μεγαλύτερη συγκέντρωση στους φλοιούς της ποικιλίας Cardinal. Ο Mohamed (2008), αναφέρει ότι σε ράγες της ποικιλίας Crimson το σύνολο των φλαβονολών αυξήθηκε με την αύξηση της λίπανσης καλίου από 240 σε 285 kg K₂O/ha. Ωστόσο στα δύο έτη του πειράματος η μέτρια λίπανση καλίου (285 kg K₂O/ha), απέδωσε την μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονολών ίση με 269.26 mg/kg, σε σχέση με την μικρότερη λίπανση (240 kg K₂O/ha) που απέδωσε 118.16 mg/kg. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρει και ο Cantos *et al.* (2002) που προσδιόρισε το σύνολο των φλαβονολών σε επτά επιτραπέζιες ποικιλίες (4 ερυθρές ποικιλίες: 'Red Globe', 'Flame Seedless', 'Crimson Seedless' και 'Napoleon' and 3 λευκές: 'Superior Seedless', 'Dominga' και 'Moscatel Italica'). Το σύνολο επίσης των φλαβαν – 3 – ολών δεν επηρεάστηκε από τη λίπανση καλίου η οποία κυμάνθηκε από 16 – 20 mg/kg (η μεγαλύτερη τιμή αφορά την μέτρια ποσότητα καλίου). Ο Cadot *et al.* (2006) προσδιόρισε τις φλαβαν – 3 – ολες στις ράγες της ποικιλίας 'Cabernet Franc' πριν τον περκασμό και κυμαινόταν από 1040 έως 1470 mg/ kg φλοιού. Ο Caillet *et al.* (2006) εκτίμησε σε εκχυλίσματα γιγάρτων και φλοιών τα ολικά φαινολικά, τα οποία ήταν 80.7 και 79.2 g /100g αντίστοιχα.

Πίνακας 10: Φαινολικά συστατικά εκφρασμένα σε mg / Kg νεπού βάρους φλοιών ραγών λευκών ποικιλιών σύμφωνα με τον Montealegre *et al.* (2006)

	Cencible	Cabernet Sauvignon	Merlot	Shiraz
Catechin	22	17	25	8,5
Epicatechin	8.4	6.2	13	6.9
B1	22	12	21	8.4
B2	1.5	0.99	2.2	0.75
Myricetin glucoside	26	22	13	21
Quercetin glucoside	32	48	31	55
Kaempferol	14	13	8	13
Total monomers flavan 3 – ol	30	23	38	15
Total dimers flavan -3 –ol	63	40	58	25
Total flavan -3 ol	92.83	63.03	92.28	40.77
Total flavonols	130	190	130	200

Πίνακας 11: Φαινολικά συστατικά εκφρασμένα σε mg / Kg νεπού βάρους φλοιών ραγών λευκών ποικιλιών σύμφωνα με τον Montealegre *et al.* (2006)

	Chardonnay	Sauvignon	Moscatel	Gewurztraminer	Riesling	Viogner
Catechin	23	9.5	16	19	14	Ιχνη
Epicatechin	5.8	3.4	2.6	8.3	Ιχνη	Ιχνη
B1	23	16	21	48	12	Ιχνη
Quercetin glucoside	17	8.9	20	24	22	66
Kaempferol	8.4	2	17	6.7	2.9	26
Total monomers flavan 3 – ol	28	12	19	28	14	9.7
Total dimers flavan -3 –ol	60	41	44	69	41	Ιχνη
Total flavan -3 ol	89	54	63	97	55	9.7
Total flavonols	53	25	98	50	56	170

Πίνακας 12: Φλαβονόλες σε ράγες και γλεύκος σύμφωνα με τον Makris *et al.* (2006)

cultivars	Compound (s)	Average	References
Red grapes	Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	34.95 (mg/kg)	Oszmianski and Lee (1990)
Red grapes	-----	12.89 (mg/l)	Meyer <i>et al.</i> (1997)
Red grapes	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	21.16 (mg/kg)	Cantos <i>et al.</i> (2000)
Red grapes	Quercetin, Myricetin Kaempferol , Isorhamnetin Glycosides thereof	162.43 (nmol/g)	Burns <i>et al.</i> (2001)
Red grapes	Quercetin, Myricetin, Kaempferol	24 (mg/kg)	Pastrana-Bonilla <i>et al.</i> (2003)
White grape	-----	8.2 (mg/l)	Meyer <i>et al.</i> (1997)
White grape	Quercetin, Myricetin, Kaempferol	65 (mg/kg)	Pastrana-Bonilla <i>et al.</i> (2003)
White grape juice	Quercetin glycosides	7.2 – 9 (µg/l)	Spanson and Wrolstad (1992)
White grape juice	-----	7.15 (mg/kg)	Frankel <i>et al.</i> (1998)
White grape juice	Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	0.5 (mg/kg)	Betes-Saura <i>et al.</i> (1996)
White grape juice	Quercetin, Myricetin, Kaempfero	9.9 (mg/kg)	Talcott and Lee (2002)
Red grape juice	-----	22.85 (mg/kg)	Frankel <i>et al.</i> (1998)
Red grape juice	Quercetin, Myricetin, Kaempfero	57.15 (mg/kg)	Talcott and Lee (2002)

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της μεθόδου ανάλυσης με HPLC των εκχυλισμάτων των γιγάρτων.

Το γαλλικό οξύ παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση A (μάρτυρας) και την μικρότερη στην επέμβαση H (λίπανση με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και Mg). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Το σύνολο της επικατεχίνης και κατεχίνης παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση A (μάρτυρας) και την μικρότερη στην επέμβαση H (λίπανση με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και Mg). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Το σύνολο της B1, B2, C1, παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό στην επέμβαση A (μάρτυρας) και την μικρότερη στην επέμβαση H (λίπανση με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και Mg). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Οι επιγαλλοκατεχίνη, επικατεχίνη του γαλλικού εστέρα και επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού εστέρα, παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό στην επέμβαση A (μάρτυρας)

και την μικρότερη στην επέμβαση Η (λίπανση με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και Mg). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 13: Τα αποτελέσματα για τα φαινολικά συστατικά των γιγάρτων των ραγών της ανάλυσης HPLC. Εκφράζονται σε mg φαινολικών συστατικών / g νωπού βάρους γιγάρτων

	mg gallic acid / g v.β. γιγάρτων	mg cat.+epic. / g v.β. γιγάρτων	mg B1+B2+C1 /g v.β. γιγάρτων	mg ECG+EGCG / g v.β. γιγάρτων	Total phenolics (mg) / g v.β. γιγάρτων	N
A	0,217±0,031 b	7,836±0,507 c	1,038±0,081 c	0,418±0,029 a	9,510±0,605 c	3
B	0,179±0,013 a,b	6,004±0,330 a,c	0,770±0,031 a,b,c	0,350±0,019 a	7,303±0,382 a,c	3
Γ	0,171±0,028 a,b	5,699±1,060 a,c	0,770±0,132 a,b,c	0,365±0,061 a	7,005±1,275 a,c	3
Δ	0,172±0,019 a,b	4,900±0,479 a,b	0,885±0,097 b,c	0,295±0,006 a,b	6,253±0,480 a,b	3
E	0,143±0,008 a,b	3,972±0,265 a,b	0,642±0,043 a,b	0,278±0,022 a,b	5,034±0,330 a,b	3
Z	0,175±0,004 a,b	4,956±0,057 a,b	0,765±0,019 a,b,c	0,314±0,016 a,b	6,210±0,066 a,b	3
H	0,123±0,014 a	2,766±0,389 b	0,489±0,060 a	0,194±0,025 b	3,572±0,485 b	3

Η ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων σε εκχυλίσματα γιγάρτων, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (1))

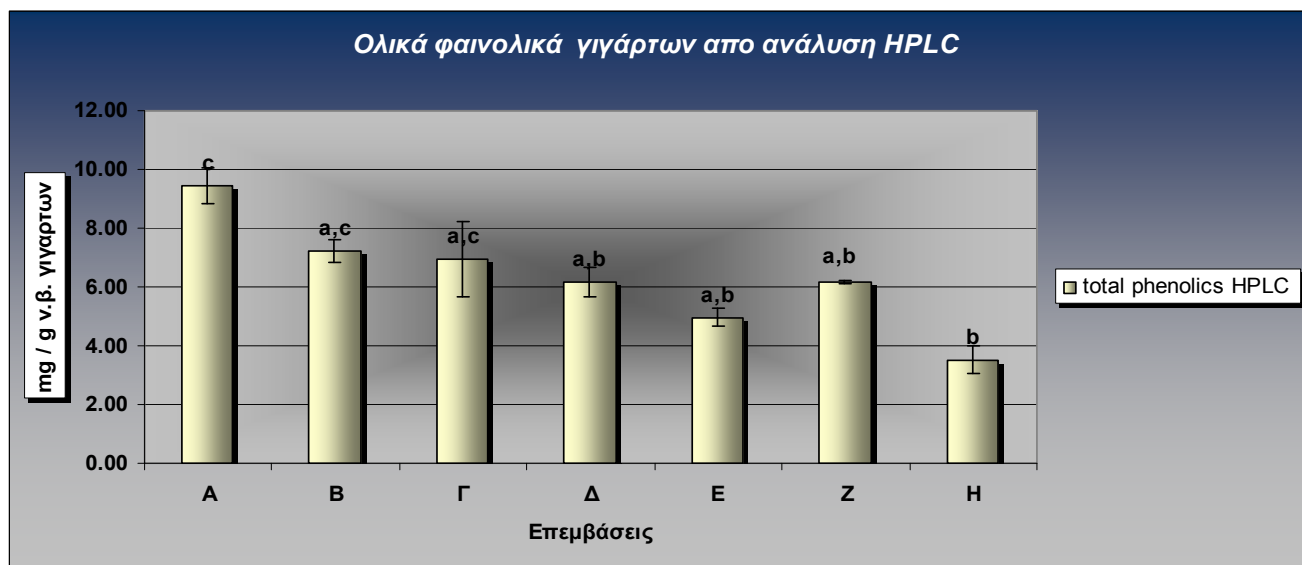
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

Το σύνολο των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των γιγάρτων παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Α (μάρτυρας) με ακόλουθη την επέμβαση Β (χλωριούχο κάλιο σε χαμηλή συγκέντρωση) και τη μικρότερη στην επέμβαση Η (λίπανση με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και Mg). Οι διαφορές θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα των αποτελεσμάτων της μεθόδου.



Γράφημα 22: Γράφημα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των γιγάρτων



Γράφημα 23: Γράφημα της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των γιγάρτων

Συγκριτικά με τα αποτελέσματα των φλοιών, οι επιγαλλοκατεχίνη, επικατεχίνη του γαλλικού εστέρα και επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού εστέρα, παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό στην επέμβαση A (μάρτυρας), σε αντιστοιχία με τα γίγαρτα. Επίσης το σύνολο των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των φλοιών παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση A (μάρτυρας), όπως και το σύνολο των φαινολικών των γιγάρτων.

2) Αποτελέσματα της μεθόδου «ολικές ταννίνες με βρασμό» (μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες), σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων:

Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί. Είναι οι μέσες τιμές και εκφράζονται σε g κατεχίνης / g νωπού βάρους γιγάρτων και φλοιών. Σύμφωνα με τον πίνακα οι ολικές ταννίνες των γιγάρτων παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση A (μάρτυρας), ακολουθούμενη από την επέμβαση B (χλωριούχο κάλιο σε χαμηλή συγκέντρωση) και την μικρότερη στην επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση). Οι διαφορές ανάμεσα στα αποτελέσματα των επεμβάσεων θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Στα εκχυλίσματα των φλοιών το μεγαλύτερο ποσοστό των ταννινών παρουσιάζεται στην επέμβαση Z (λίπανση με κάλιο και Mg), ακολουθούμενο από την επέμβαση E (θειικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση) και το μικρότερο στην επέμβαση Γ (χλωριούχο κάλιο σε

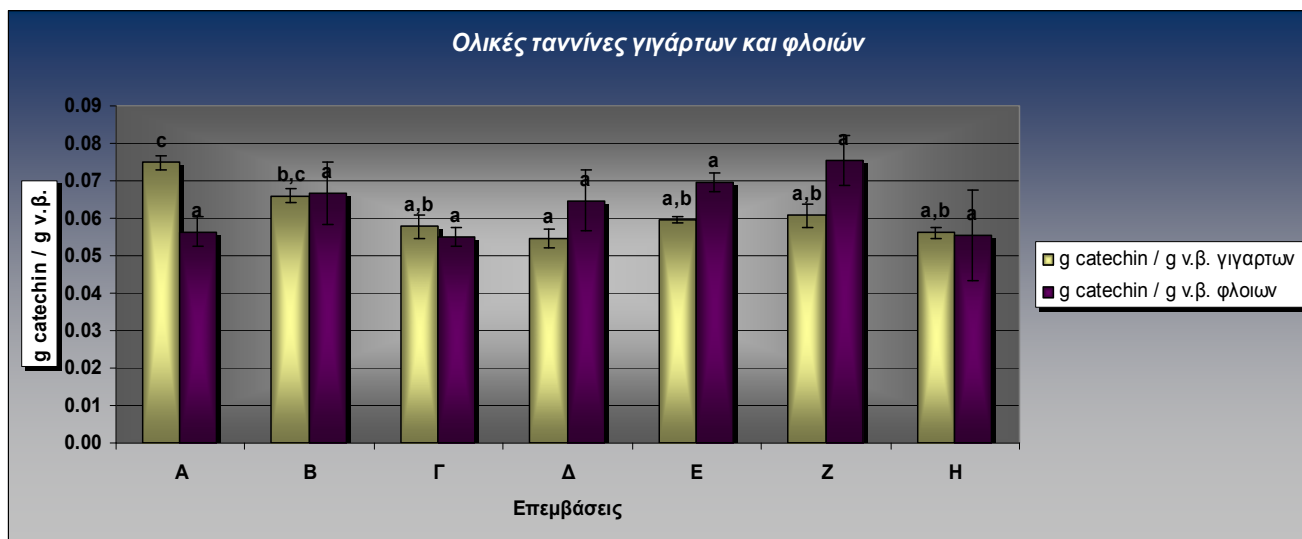
μεγάλη συγκέντρωση). Ωστόσο οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 14: Τα αποτελέσματα της μεθόδου «ταννίνες με βρασμό» στα εκχυλίσματα γιγάρτων & φλοιών. Εκφράζονται σε g κατεχίνης / g νωπού βάρους φλοιών ή γιγάρτων

	Ολικές ταννίνες γιγάρτων (g κατεχίνης / g ν.β. γιγάρτων)	Ολικές ταννίνες φλοιών (g κατεχίνης / g ν.β. φλοιών)	N
A	0,075±0,002 c	0,056±0,004 a	6
B	0,066±0,002 b,c	0,067±0,008 a	6
Γ	0,058±0,003 a,b	0,055±0,002 a	6
Δ	0,055±0,002 a	0,065±0,008 a	6
E	0,060±0,001 a,b	0,070±0,003 a	6
Z	0,061±0,003 a,b	0,075±0,007 a	6
H	0,056±0,001 a,b	0,056±0,012 a	6

H ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των ολικών ταννινών σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (2)
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

Στο γράφημα που ακολουθεί απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου



Γράφημα 24: Γράφημα των ολικών ταννινών στα εκχυλίσματα γιγάρτων & φλοιών

3) Αποτελέσματα της μεθόδου “methyl cellulose”:

Η μέθοδος εκτιμά το σύνολο των ταννινών του δείγματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg κατεχίνης / g νωπού βάρους γιγάρτων και φλοιών. Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τα αποτελέσματα.

Πίνακας 15: Τα αποτελέσματα της μεθόδου «methyl cellulose» στα εκχυλίσματα γιγάρτων & φλοιών σε mg κατεχίνης / g νωπού βάρους φλοιών & γιγάρτων

	<i>Ολικές τανίνες / g. ν.β. γιγάρτων</i>	<i>Ολικές τανίνες / g. ν.β. φλοιών</i>	N
A	84,874±2,101 c	26,063±2,150 a,b	6
B	72,938±1,698 a,b	37,106±4,391 b	6
Γ	70,985±1,592 a	24,032±1,200 a,b	6
Δ	67,543±2,498 a	31,461±4,263 a,b	6
E	79,623±1,797 b,c	31,669±1,268 a,b	6
Z	69,861±1,824 a	32,969±2,273 a,b	6
H	67,818±1,565 a	21,923±4,947 a	6

H **ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της methyl cellulose σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επανάληψεις (2)) Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη**

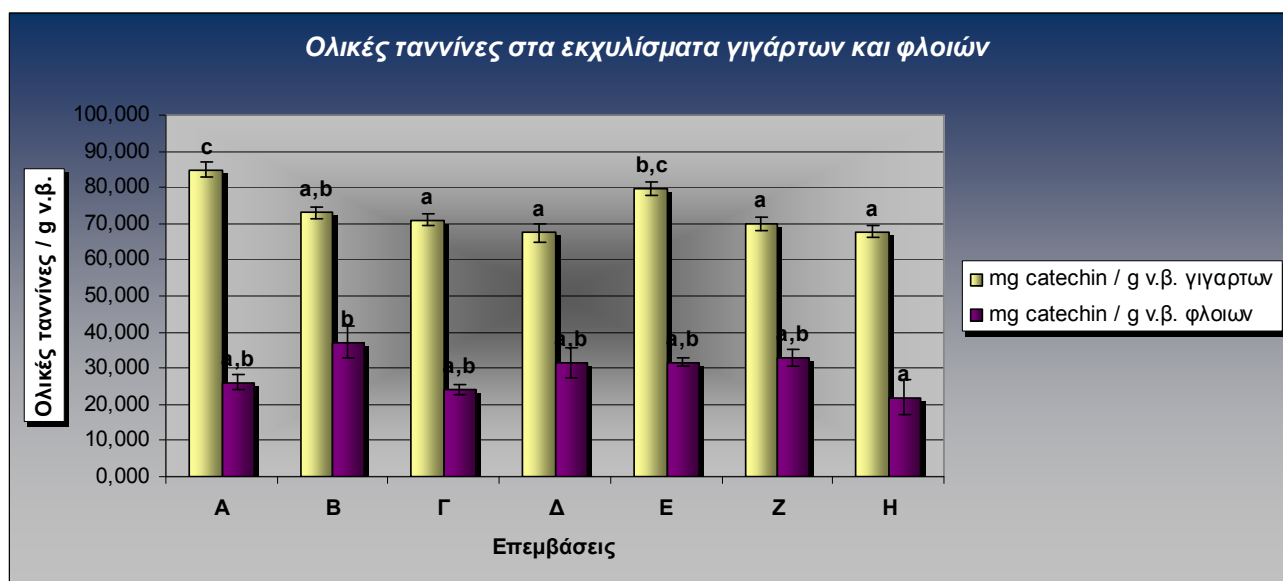
Οι ολικές ταννίνες στα εκχυλίσματα των γιγάρτων παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό στην επέμβαση A (μάρτυρας), ακολουθούμενη από την επέμβαση E (θειικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση) και το μικρότερο στην επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Στα εκχυλίσματα των φλοιών την μεγαλύτερη συγκέντρωση οι ταννίνες παρουσιάζουν στην επέμβαση B (χλωριούχο κάλιο σε χαμηλή συγκέντρωση), ακολουθούμενη από την επέμβαση Z (λίπανση με κάλιο και Mg), ενώ η μικρότερη εμφανίζεται στην επέμβαση H (λίπανση με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και Mg). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Συγκριτικά με τα αποτελέσματα της μεθόδου «ταννίνες με βρασμό», τα εκχυλίσματα γιγάρτων δίνουν τα ίδια αποτελέσματα.

Ωστόσο στα εκχυλίσματα των φλοιών υπάρχουν διαφορές τόσο στην μεγαλύτερη όσο και στην μικρότερη συγκέντρωση των ταννινών. Η μέθοδος όμως «ταννίνες με βρασμό», δίνει αποτελέσματα που δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους, ενώ στην «methyl

cellulose», τα αποτελέσματα έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Παρακάτω παρουσιάζεται το γράφημα με τα αποτελέσματα της μεθόδου.



Γράφημα 25: Γράφημα των ολικών ταννινών στα εκχυλίσματα γιγάρτων & φλοιών

4) Σύγκριση αποτελεσμάτων μεθόδων «methyl cellulose», «ταννίνες με βρασμό» και ανάλυσης HPLC στα εκχυλίσματα των φλοιών:

Με τον συντελεστή συσχέτισης Pearson γίνεται προσπάθεια σύγκρισης των μεθόδων προσδιορισμού των ταννινών σε εκχυλίσματα φλοιών. Στην ανάλυση με τη μέθοδο HPLC λαμβάνεται υπόψη το άθροισμα των area units (mAUmin), δηλαδή της επιφάνειας που καταλαμβάνουν στο χρωματογράφημα οι πολυμερείς ταννίνες, που απορροφούν στα 280nm και οι οποίες εκκλύονται από τα 100 min και έπειτα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 16: Τα αποτελέσματα της συσχέτισης μεθόδων με τον συντελεστή Pearson

Πίνακας για συσχέτιση αποτελεσμάτων μεθόδων με τον συντελεστή Pearson			
Επεμβάσεις	Ταννίνες με βρασμό: g catechin / g v.β. φλοιών	Μέθοδος methyl cellulose: mg catechin / g v.β. φλοιών	Αποτελέσματα από HPLC ανάλυση εκφρασμένα σε area units: mAUmin
A	0,056	26,063	4661,7
B	0,067	37,106	4406,333
Γ	0,055	24,032	4421,2
Δ	0,065	31,461	3558,9
E	0,070	31,669	5231,666
Z	0,075	32,969	4892,15
H	0,056	21,923	4420,55
PEARSON	0,3173	0,0521	<i>Συντελεστής συσχέτισης για την κάθε μέθοδο με τα αποτελέσματα από HPLC</i>
PEARSON	0,8197		<i>Συντελεστής συσχέτισης για τις δύο μεθόδους μεταξύ τους</i>

Για τον συντελεστή Pearson ισχύουν τα παρακάτω δεδομένα:

- Αν $r = \pm 1$ υπάρχει τέλεια γραμμική συσχέτιση
- Αν $-0,3 \leq r < 0,3$ δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση. Αυτό, όμως, δεν σημαίνει ότι δεν υπάρχει άλλου είδους συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών
 - Αν $-0,5 < r \leq -0,3$ ή $0,3 \leq r < 0,5$ υπάρχει ασθενής γραμμική συσχέτιση
 - Αν $-0,7 < r \leq -0,5$ ή $0,5 \leq r < 0,7$ υπάρχει μέση γραμμική συσχέτιση
 - Αν $-0,8 < r \leq -0,7$ ή $0,7 \leq r < 0,8$ υπάρχει ισχυρή γραμμική συσχέτιση
 - Αν $-1 < r \leq -0,8$ ή $0,8 \leq r < 1$ υπάρχει πολύ ισχυρή γραμμική συσχέτιση

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα βλέπουμε ότι ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ της μεθόδου «ταννίνες με βρασμό» και της ανάλυσης HPLC είναι 0,3117, που σημαίνει ότι υπάρχει ασθενής γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων. Ο συντελεστής συσχέτισης ανάμεσα στην μέθοδο “methyl cellulose” και την ανάλυση HPLC είναι 0,0521, που σημαίνει ότι δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους. Ο συντελεστής για τις δύο μεθόδους “methyl cellulose” και «ταννίνες με βρασμό» είναι 0,8197, που σημαίνει ότι υπάρχει πολύ ισχυρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους.

5) Αποτελέσματα μεθόδου DPPH (μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας):

Η αντιοξειδωτική ικανότητα στα εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων εκφράζεται ως mmol Trolox / g νεπού βάρους φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

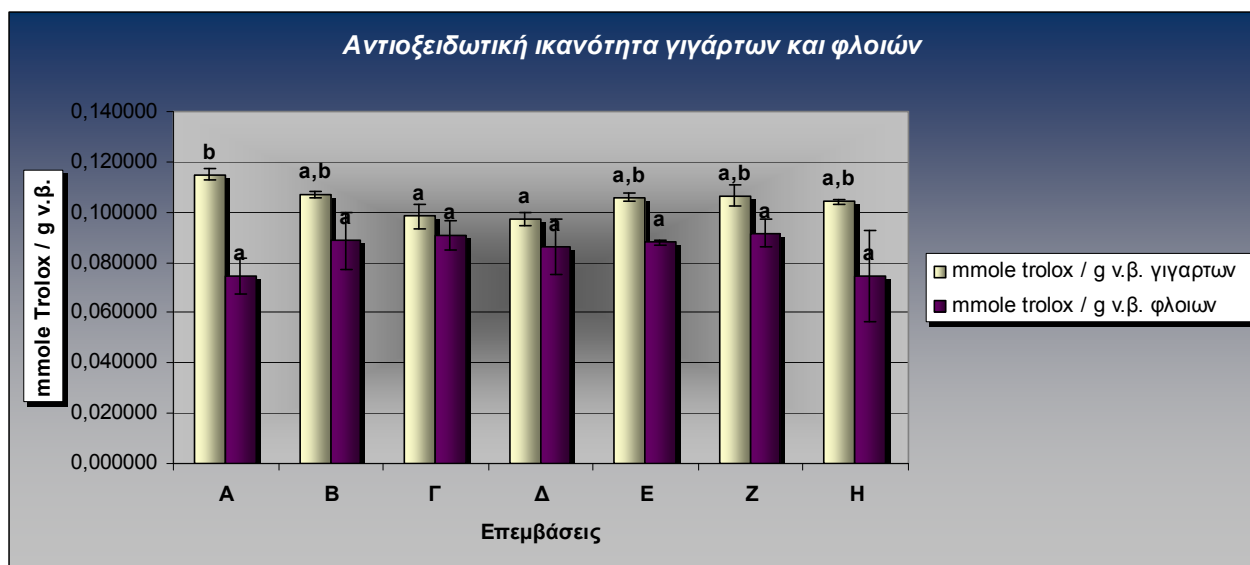
Πίνακας 17: Τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας γιγάρτων & φλοιών σε mmole Trolox / g νωπού βάρους γιγάρτων & φλοιών

	Αντιοξειδωτική ικανότητα γιγάρτων (mmole Trolox / g v. β. γιγάρτων)	Αντιοξειδωτική ικανότητα φλοιών (mmole Trolox / g v. β. φλοιών)	N
A	0,114±0,002 b	0,074±0,006 a	6
B	0,106±0,001 a,b	0,088±0,01a	6
Γ	0,098±0,004 a	0,090±0,005 a	6
Δ	0,097±0,002 a	0,086±0,011 a	6
E	0,105±0,001 a,b	0,087±0,001 a	6
Z	0,106±0,004 a,b	0,091±0,005 a	6
H	0,104±0,0007 a,b	0,074±0,017 a	6

**Η ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (2))
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη**

Σύμφωνα με τον πίνακα τα γίγαρτα παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό αντιοξειδωτικής ικανότητας στην επέμβαση A (μάρτυρας), ακολουθούμενη από την επέμβαση B (χλωριούχο κάλιο σε χαμηλή συγκέντρωση) και την επέμβαση Z (λίπανση με κάλιο και Mg), ενώ την μικρότερη παρουσιάζει στην επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές. Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας των γιγάρτων συμφωνούν με το δυναμικό σε ταννίνες, καθώς από τις μεθόδους προσδιορισμού των ταννινών, η μεγαλύτερη συγκέντρωση εκδηλώνεται πάντα στην επέμβαση A, ακολουθούμενη από την επέμβαση B ή E, καθώς και το φαινολικό δυναμικό όπως προσδιορίζεται στην ανάλυση HPLC όπου η μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζεται στην επέμβαση A, με ακόλουθη επίσης την επέμβαση B.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλοιών φαίνεται μεγαλύτερη στην επέμβαση Z (λίπανση με κάλιο και Mg), ακολουθούμενη από την επέμβαση Γ (χλωριούχο κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση) και μικρότερη στην επέμβαση A (μάρτυρας) και H (λίπανση με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο και Mg). Τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.



Γράφημα 26: Γράφημα της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα εκχυλίσματα γιγάρτων & φλοιών

6) Αποτελέσματα μεθόδου “DMAC” προσδιορισμού φλαβονολών και προανθοκυανιδών:

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου εκφράζονται σε mg κατεχίνης / g νωπού βάρους φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 18: Τα αποτελέσματα της μεθόδου DMAC, προσδιορισμού των προανθοκυανιδών των γιγάρτων & φλοιών σε mg κατεχίνης / g νωπού βάρους φλοιών & γιγάρτων

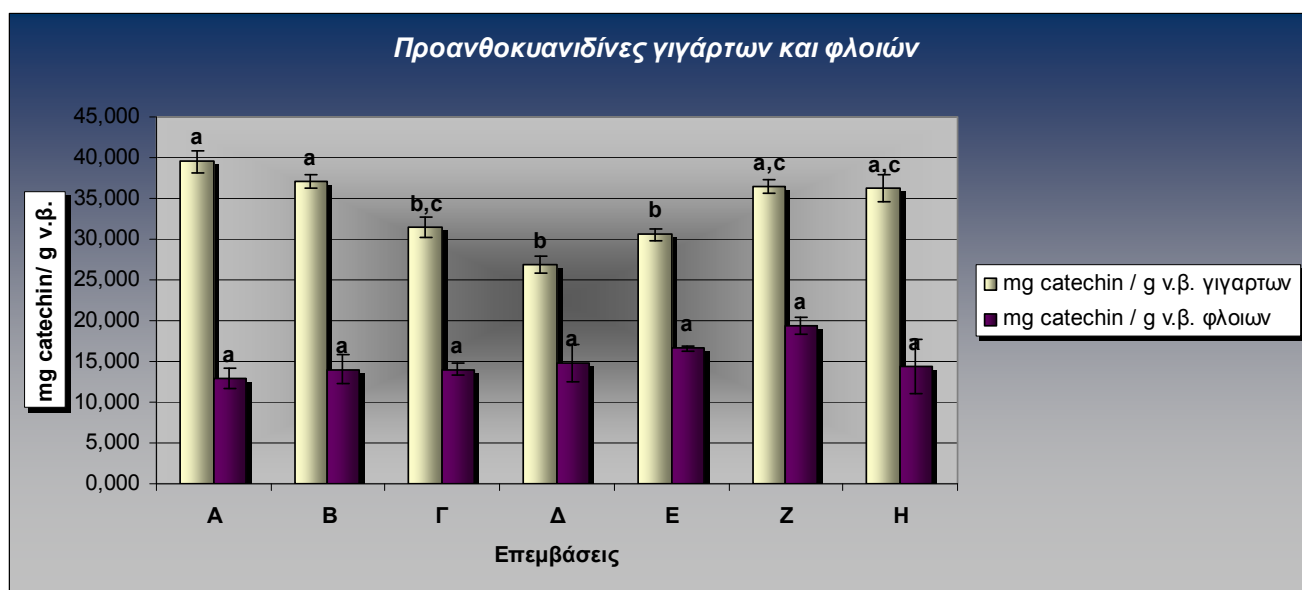
	<i>Προανθοκυανιδίνες γιγάρτων (mg κατεχίνης / g v.β. γιγάρτων)</i>	<i>Προανθοκυανιδίνες φλοιών (mg κατεχίνης / g v.β. φλοιών)</i>	N
A	39,488±1,342 a	12,938±1,242 a	6
B	37,085±0,838 a	14,022±1,814 a	6
Γ	31,519±1,256 b,c	14,058±0,759 a	6
Δ	26,905±1,062 b	14,824±2,288 a	6
E	30,573±0,686 b	16,564±0,352 a	6
Z	36,403±0,786 a,c	19,409±0,994 a	6
H	36,311±1,626 a,c	14,428±3,307 a	6

*Η ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση της συγκέντρωσης σε προανθοκυανιδίνες σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επανάληψεις (2)
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τα εκχυλίσματα γιγάρτων, οι συμπυκνωμένες ταννίνες παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση A (μάρτυρας),

ακολουθούμενη από την επέμβαση Β (χλωριούχο κάλιο σε χαμηλή συγκέντρωση), ενώ την μικρότερη συγκέντρωση παρουσιάζουν στην επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν τόσο με τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH, μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, αλλά και των μεθόδων προσδιορισμού των ταννινών “methyl cellulose” και ταννίνες με βρασμό. Συμφωνούν επίσης με τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC για το σύνολο των φαινολικών συστατικών. Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές.

Για τα εκχυλίσματα φλοιών, η μεγαλύτερη συγκέντρωση προανθοκυανιδών παρουσιάζεται στην επέμβαση Ζ (λίπανση με κάλιο και Mg), ακολουθούμενη από την επέμβαση Ε (θειικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση) και η μικρότερη στην επέμβαση Α (μάρτυρας). Τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής συμφωνούν με αυτά της μεθόδου DPPH, μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ωστόσο οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Παρακάτω παρατίθεται το γράφημα με τα αποτελέσματα της μεθόδου.



Γράφημα 27: Γράφημα των προανθοκυανιδών στα εκχυλίσματα γιγάρτων & φλοιών

7) Υπολογισμός Δείκτη Βαθμού Πολυμερισμού:

Οι προανθοκυανιδίνες βρίσκονται στα στερεά μέρη της ράγας, δηλαδή τους φλοιούς και τα γίγαρτα. Κατά την οινοποίηση εκχυλίζονται στο γλεύκος και συμβάλλουν στο χρώμα και την γεύση του παραγόμενου οίνου, προσδίδοντας στυπτικότητα, κάτι που γίνεται αντιληπτό μέσω της καθίζησης των πρωτεϊνών. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το φαινόμενο αυτό είναι ο ακριβής ή μέσος βαθμός πολυμερισμού των

πολυμερών (Saucier *et al.*, 2001). Ο βαθμός πολυμερισμού επηρεάζει εκτός από τις οργανοληπτικές, τις φαρμακευτικές ιδιότητες που τα πολυμερή αυτά προσδίδουν στους οίνους και άλλα φυτικά παράγωγα. (Haslam, 1974; Rigaud *et al.*, 1993). Επίσης η αντιοξειδωτική τους ικανότητα εξαρτάται τόσο από τη δομή όσο και το μέγεθος του μορίου τους (Labarbe *et al.*, 1999).

Για τον υπολογισμό του βαθμού πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα των μεθόδων υπολογισμού των ολικών ταννινών στα εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα της μεθόδου «ταννίνες με βρασμό» και της μεθόδου “DMAC”, διαιρέθηκαν δίνοντας τον Δείκτη Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού για τα γίγαρτα παρουσιάζεται μεγαλύτερος στην επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση), ακολουθούμενη από την Ε (θειικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση), ενώ ο μικρότερος είναι στην επέμβαση Η (λίπανση με πολύ υψηλό ποσοστό σε κάλιο και Mg). Ερμηνεύοντας τα αποτελέσματα, τα μόρια των φαινολών στις επεμβάσεις Δ και Ε είναι μεγαλύτερα, αποτελούνται από περισσότερες δομικές μονάδες. Στα γίγαρτα η διαφοροποίηση λαμβάνει χώρα σε διαφορετικούς τύπους λίπανσης. Το θειικό κάλιο και στις δύο συγκεντρώσεις έχει μεγαλύτερο δείκτη μέσου βαθμού πολυμερισμού. Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 19: Δείκτης Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού γιγάρτων & φλοιών

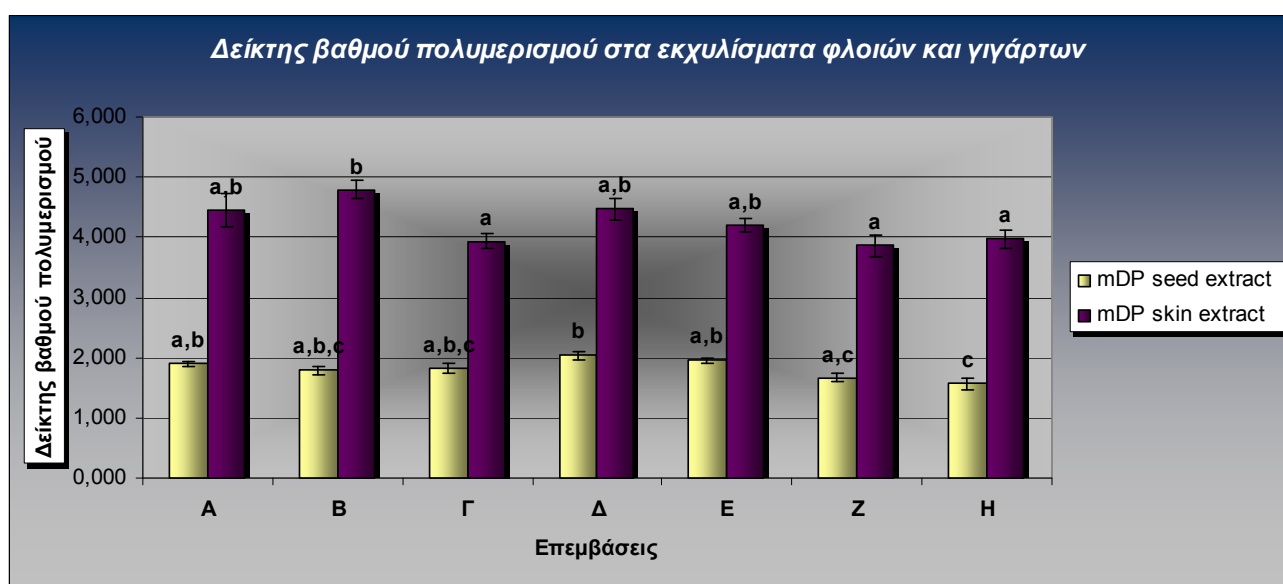
	<i>mDP</i> γιγάρτων	<i>mDP</i> φλοιών	N
A	1,899743±0,047329 a,b	4,453569±0,272694 a,b	6
B	1,785546±0,077978 a,b,c	4,786778±0,150716 b	6
Γ	1,834242±0,086449 a,b,c	3,938865±0,123448 a	6
Δ	2,032574±0,074602 b	4,472577±0,173893 a,b	6
E	1,955907±0,044160 a,b	4,199711±0,111977a,b	6
Z	1,667201±0,073613 a,c	3,857597±0,182044 a	6
H	1,564196±0,090852 c	3,972141±0,145717 a	6

Η ανάλυση ANOVA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση του Δείκτη Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων, τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, $p < 0,05$), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (2)

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

Στους φλοιούς ο μέσος βαθμός πολυμερισμού εμφανίζεται μεγαλύτερος στην επέμβαση Β (χλωριούχο κάλιο σε χαμηλή συγκέντρωση), ακολουθούμενη από την επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση), ενώ ο μικρότερος εμφανίζεται στην επέμβαση Ζ (λίπανση με κάλιο και Mg). Οι διαφορές ανάμεσα στα δείγματα είναι στατιστικά σημαντικές.

Ο Delgado *et al.* (2004), αναφέρει ότι η λίπανση με κάλιο (0, 60 και 120 gK₂O/ πρέμνο σε K₂SO₄) σε πρέμνα της ποικιλίας Tempranillo, σε σχέση με τον δείκτη μέσου βαθμού πολυμερισμού για τους φλοιούς (DMACH), που εκτιμήθηκε την περίοδο του τρύγου, κυμάνθηκε από 6,49 για τις μικρότερες δόσεις λίπανσης, έως 2,83 για την μεγαλύτερη.



Γράφημα 28: Γράφημα του Δείκτη Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού των γιγάρτων & φλοιών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση της λίπανσης με κάλιο στα φαινορικά συστατικά της ποικιλίας *Vitis vinifera* «Αγιωργίτικο». Το πείραμα διεξάχθηκε για την χρονιά 2011. Η λίπανση που εφαρμόστηκε διέφερε τόσο στην ποσότητα όσο και στον τύπο του λιπάσματος. Οι αναλύσεις διενεργήθηκαν σε ράγες καθώς και σε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων. Τα αποτελέσματα μπορούν να συνοψισθούν στα παρακάτω:

- Το μέσο βάρος ράγας, το μέσο βάρος γιγάρτου και το βάρος φλοιών 100 ραγών, είναι μεγαλύτερα για τις επεμβάσεις Δ και Ε, οι οποίες αποτελούν το θεϊκό κάλιο σε δύο διαφορετικές ποσότητες. Για το βάρος των φλοιών οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις δεν είναι στατιστικά σημαντικές.
- Φαίνεται ότι η διαφοροποίηση στα μορφολογικά χαρακτηριστικά της ράγας, οφείλεται στο είδος της λίπανσης, καθώς το θεϊκό κάλιο στις δυο συγκεντρώσεις αποδίδει ράγες μεγαλύτερες και με μεγαλύτερα γίγαρτα.
- Ο αριθμός των γιγάρτων είναι μεγαλύτερος στην επέμβαση Ζ που είναι η λίπανση με κάλιο και Mg σε μικρότερη ποσότητα, ακολουθείται όμως από την επέμβαση Ε (θεϊκό κάλιο σε μεγάλη ποσότητα). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές, άρα η λίπανση διαφοροποιεί σημαντικά τα αποτελέσματα.
- Ο λόγος στεμφύλων / γλεύκος είναι μεγαλύτερος στην επέμβαση Α (μάρτυρας) που σημαίνει ότι έχουμε μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής των φλοιών με το γλεύκος. Ωστόσο οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.
- Το σύνολο των ανθοκυανών (mg/g) είναι μεγαλύτερο στην επέμβαση Γ (χλωριούχο κάλιο σε μεγάλη ποσότητα), ακολουθούμενο από την επέμβαση Α (μάρτυρας). Το σύνολο (mg/ ράγα) είναι μεγαλύτερο στην Α και ακολουθείται από την Γ (οι διαφορές μεταξύ τους δεν διαφέρουν σημαντικά). Ωστόσο οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές.
- Το ποσοστό εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών είναι μεγαλύτερο στην επέμβαση Ε (θεϊκό κάλιο σε μεγάλη ποσότητα). Η επέμβαση αυτή έχει τα πιο ώριμα σταφύλια. Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές.
- Ο βαθμός ωριμότητας των γιγάρτων είναι μικρότερος για την επέμβαση Ε (θεϊκό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση), που σημαίνει ότι ο βαθμός συμμετοχής των

ταννινών των γιγάρτων στο σύνολο των φαινολικών, είναι μεγαλύτερος για την επέμβαση αυτή. Επίσης η επέμβαση E και η B (χλωριούχο κάλιο σε μικρή συγκέντρωση), έχουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των ταννινών που προέρχονται από τα γίγαρτα. Η συγκέντρωση των ταννινών του φλοιού είναι μεγαλύτερη στην επέμβαση A (μάρτυρας). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές.

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών των ραγών παρουσιάζεται στην επέμβαση Z (λίπανση με μικρότερη ποσότητα καλίου και Mg) και ακολουθείται από την E (θεικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση). Οι δύο αυτές επεμβάσεις έχουν και τον μεγαλύτερο αριθμό γιγάρτων.
- Ο Δ.Φ.Ο. είναι μεγαλύτερος στην επέμβαση B (χλωριούχο κάλιο σε μικρή συγκέντρωση).
- Το σύνολο των φαινολικών ανά ράγα είναι μεγαλύτερο στην επέμβαση A (μάρτυρας) και ανά g ράγας είναι μεγαλύτερο στην επέμβαση Z (λίπανση με μικρότερη ποσότητα καλίου και Mg). Η Z έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών ραγών και αριθμό γιγάρτων. Η A έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση των ταννινών του φλοιού, μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής των φλοιών με το γλεύκος και τις περισσότερες ανθοκυάνες (σε mg/ ράγα).
- Το μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών ανθοκυανών με την μέθοδο της ανάλυσης HPLC εμφανίζει η επέμβαση A (μάρτυρας). Επίσης εμφανίζει τα μεγαλύτερα ποσοστά στις επιμέρους ανθοκυάνες. Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές.
- Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα των φλοιών για τον προσδιορισμό των ταννινών των δειγμάτων, για τις ολικές ταννίνες και τις προανθοκυανιδίνες, είχαν την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Z (λίπανση με μικρότερη ποσότητα σε κάλιο και Mg). Επίσης η επέμβαση Z εμφανίζει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στα εκχυλίσματα των φλοιών. Ωστόσο οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά.
- Η ανάλυση HPLC που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φαινολικών, σε σχέση με τους φλοιούς είχε ποικίλα αποτελέσματα (δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά):
 - Το γαλλικό οξύ με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση H (λίπανση με μεγαλύτερη ποσότητα σε κάλιο και Mg)

- Η κατεχίνη και επικατεχίνη με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση B (χλωριούχο κάλιο σε μικρή ποσότητα)
 - Οι B1, B2 και C1 με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή ποσότητα)
 - Οι γαλλικοί εστέρες με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Α (μάρτυρας)
 - Οι φλαβονόλες (καμπερόλη, κερσετίνη, ρουτίνη, μυρισετίνη), με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Γ (χλωριούχο κάλιο σε μεγάλη ποσότητα)
- Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων στα εκχυλίσματα γιγάρτων, οι προανθοκυανιδίνες και ολικές ταννίνες, όπως προσδιορίστηκαν με φωτομετρικές μεθόδους και με ανάλυση HPLC παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Α (μάρτυρας), ακολουθούμενη συνήθως από την επέμβαση Ε (θειικό κάλιο σε μεγάλη συγκέντρωση) ή Β (χλωριούχο κάλιο σε χαμηλή συγκέντρωση), ενώ την μικρότερη συγκέντρωση παρουσιάζουν πάντα στην επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν επίσης με τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH, μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές.
 - Η ανάλυση HPLC που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φαινολικών (γαλλικού οξέος, κατεχίνης και επικατεχίνης, γαλλικών εστέρων και B1, B2, C1) είχε πάντα την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Α
 - Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού για τα γίγαρτα παρουσιάζεται μεγαλύτερος στην επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση), στους φλοιούς εμφανίζεται μεγαλύτερος στην επέμβαση Β (χλωριούχο κάλιο σε χαμηλή συγκέντρωση), ακολουθούμενη από την επέμβαση Δ (θειικό κάλιο σε μικρή συγκέντρωση). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές.
 - Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson για τις μεθόδους «ταννίνες με βρασμό» και ανάλυσης HPLC είναι 0,3117, που σημαίνει ότι υπάρχει ασθενής γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων, για τις μεθόδους “methyl cellulose” και την ανάλυση HPLC είναι 0,0521 που σημαίνει ότι δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους. Ο συντελεστής για τις δύο μεθόδους “methyl cellulose” και «ταννίνες με βρασμό» είναι 0,8197 που σημαίνει ότι υπάρχει πολύ ισχυρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους.

Συμπερασματικά η επέμβαση E (θειικό κάλιο σε μεγαλύτερη ποσότητα), οδηγεί σε πιο γρήγορη ωρίμανση των ραγών, μεγάλο βαθμό εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών, καθώς και σε μεγαλύτερες ράγες, με λιγότερο ώριμα γίγαρτα και υψηλότερη συγκέντρωση ταννινών γιγάρτων. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές.

Η επέμβαση Z (λίπανση με μικρή ποσότητα καλίου και Mg) υπερτερεί στις ταννίνες του φλοιού, ωστόσο οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Στο σύνολο των φαινολικών ανά g ράγας έχει την μεγαλύτερη τιμή και τον μεγαλύτερο αριθμό γιγάρτων.

Η επέμβαση A (μάρτυρας) έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση των ταννινών των γιγάρτων, μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικών ανά ράγα, παρουσιάζει μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής των φλοιών με το γλεύκος και έχει τις περισσότερες ανθοκυάνες (σε mg/ ράγα). Επίσης παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών ανθοκυανών σε mg / g νωπού βάρους φλοιών. Επίσης εμφανίζει τα μεγαλύτερα ποσοστά στις επιμέρους ανθοκυάνες. Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές.

Στην παρούσα εργασία τα ευρήματα συμφωνούν με αυτά άλλων ερευνητών σχετικά με την μεταβολή της συγκέντρωσης των ανθοκυανών σε αναλογία με το ποσοστό λίπανσης καλίου. Συγκεκριμένα υπερβολικές ποσότητες καλίου στη ράγα οδηγούν στην αύξηση του pH του γλεύκους, μέσω της μείωσης του ελεύθερου τρυγικού οξέος, με τη δημιουργία των αλάτων τα οποία είναι δυσδιάλυτα. Η μεταβολή του pH έχει άμεση σύνδεση με τον ιονισμό των ανθοκυανών, το ποσοστό δηλαδή των ανθοκυανών που βρίσκεται στην έγχρωμη μορφή. Το ποσοστό αυτό μειώνεται καθώς το pH αυξάνεται (Somers 1975). Επίσης οι ανθοκυάνες βρίσκονται στον φλοιό των ραγών (Somers and Pocock 1986), όπου η συγκέντρωση του καλίου είναι κατά κανόνα υψηλότερη σε σχέση με την σάρκα (Pland και Coombe 1988, Walker *et al.* 1998), άρα σε ερυθρές ποικιλίες όπου η οينوποίηση απαιτεί την παραμονή των στεμφύλων με το γλεύκος, αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία. Από πολλούς ερευνητές αναφέρεται ότι οι μεγάλες ποσότητες λίπανσης καλίου, σε περιπτώσεις όπου η περιεκτικότητα του στο έδαφος είναι επαρκής, μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στο χρώμα του παραγόμενου οίνου και στην ποιότητα του γενικότερα μέσω της αύξησης της τιμής του pH (Somers 1977, Freeman and Kliewer 1983, Dundon *et al.* 1984, Mpelasoka *et al.*, 2003, Sipiara *et al.*, 2005, El Razeq *et al.*, 2011). Το χρώμα στους ερυθρούς οίνους και η περιεκτικότητά τους σε φαινολικά συστατικά, αποτελούν οργανοληπτικά χαρακτηριστικά υψηλής αξίας, άρα η μελέτη της επίδρασης της λίπανσης με κάλιο σε αυτά αποκτά ιδιαίτερη σημασία. Περαιτέρω πειραματισμός είναι απαραίτητος για την εξακρίβωση της επαναληψιμότητας και ορθότητας των αποτελεσμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdel El S. (2008). *Effect of Horticultural Practices on Improving Productivity and Fruit Quality of 'Crimson Seedless' Grapes*. Die Dissertation wurde am 22.01.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung

Altindisli A., Irget M. E., Kalkan H., Kalkan S., Oktay M. (1999). Effect of foliar applied KNO₃ on yield, quality and leaf nutrients of Carignane and Colombard wine grapes. In: Dilek A., Martin-Prével P. *Improved Crop Quality by Nutrient Management*. The Netherlands: Kluwer Academic. 103-107

Altindisli A., Irget M. E., Kalkan H., Kalkan S., Oktay M. (1999). The effect of foliar fertilization with KNO₃ on quality of dry wines. In: Dilek A., Martin-Prével P. *Improved Crop Quality by Nutrient Management*. The Netherlands: Kluwer Academic. 99-103

Amiri M. E. & Fallahi E. (2007). *Influence of Mineral Nutrients on Growth, Yield, Berry Quality, and Petiole Mineral Nutrient Concentrations of Table Grape*. Journal of Plant Nutrition, 30: 463–470

Brancadoro L., Valenti L., Reina A. & A. Scienza. (1994). *Potassium content of grapevine during the vegetative period: The role of the rootstock*. Journal of plant nutrition, 17(12), 2165-2175

Boonterm, V. (2010). *Effects of nitrogen and potassium fertilizing and cluster thinning on quality and anthocyanin contents of cabernet sauvignon grape and wine*. Suranaree University of Technology

Boonterm V., Silapapun A. and Boonkerd N. (2010). *Effects of nitrogen, potassium fertilizers and clusters per vine on yield and anthocyanin content in cabernet sauvignon grape*. Suranaree J. Sci. Technol. 17(2):155-163

Bozan B., Tosun G., Ozcan D. (2008). *Study of polyphenol content in the seeds of red grape (Vitis vinifera L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity*. Food Chemistry 109 426–430

Boulton, R. (1980). *The general relationship between potassium, sodium and pH in grape juices and wines*. Am. J. Enol. Vitic. 31, 182-186.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E. and Berset C. (1995). *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*. Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 28.25-30

Cheynier V., Labarbe B., and Moutounet M. (2001). *Sources, characterization, and methods: Estimation of Procyanidin Chain Length*. Methods In Enzymology, Vol. 335 Academic Press

Cheynier V., Labarbe B., and Moutounet M. (2000). *Estimation of Procyanidin Chain Length*. Sources, characterization, and methods methods in enzymology, Vol. 335

Cohen S. D., Tararab J. M., Kennedy J. A. (2008). *Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism*. Analytica chimica acta, v. 621, p. 57–67

Conradie, W.J., Saayman, D. (1989). *Effect of long term nitrogen, phosphorus and potassium fertilization on Chenin blanc vines II. Leaf analyses and grape composition*. Am. J. Enol. Vitic. 40, 91-98.

Cortell, J. M. (2006). *Influence of Vine Vigor and Shading in Pinot noir (Vitis vinifera L.) on the Concentration and Composition of Phenolic Compounds in Grapes and Wine*. Oregon State University

Cynkar, W.V., Cozzolino, D., Damberg, R.G., Janik, L., Gishen, M. (2004). *The effects of homogenisation method and freezing on the determination of quality parameters in red grape berries of Vitis vinifera*. Australian Journal of Grape and Wine Research 10: 3: 236-242.

Delgado R., Martín P., Alamo M. and Gonzalez M. (2004). *Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates*. J Sci Food Agric 84:623–630

Dundon, C.G., Smart, R.E., McCarthy, M.G. (1984). *The effect of potassium fertilizer on must and wine potassium levels of Shiraz grapevines*. Am. J. Enol. Vitic. 35, 200–205.

El-Razek A., Treutter E. D., Saleh M.M.S. El-Shammaa, Amara M. , Fouad A. and Abdel-Hamid N. (2011). *Effect of nitrogen and potassium fertilization on productivity and fruit quality of 'crimson seedless' grape*. Agric. Biol. J. N. Am., 2011, 2(2): 330-340

Freeman, B.M., Kliewer, W.M. (1983). *Effect of irrigation, crop level and potassium fertilization on Carignane vines II. Grape and Wine Quality*. Am. J. Enol. Vitic. 34, 197-207

González-Neves G., Barreiro L., Gila G., Franco J., Ferrer M., Moutounet M., Carbonneau A. (2004). *Anthocyanic composition of Tannat grapes from the south region of Uruguay*. Analytica Chimica Acta 513 197–202

Guendez R., Kallithraka S., Makris D. P., Kefalas P. (2005). *Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (Vitis vinifera sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity*. Food Chemistry 89 1–9

Hale, C.R. (1977). *Relation between potassium and the malate and tartrate contents of grape berries*. Vitis 16, 9-19.

Jackson, D.I., Lombard, P.B. (1993). *Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality – A Review*. Am. J. Enol. Vitic. 44: 4

Iland, P.G., Cynkar, W., Francis, I.L., Williams, P.J. and Coombe, B.G. (1996). *Optimisation of methods for the determination of total and red free glycosylglucose in black grape berries of Vitis vinifera*. Australian Journal of Grape and Wine Research 2: 171-178

Iland, P., Ewart, A., Sitters, J., Markides, A. and Bruer, N. (2000). *Techniques for chemical analysis and quality monitoring during winemaking*. Patrick Iland Wine Promotions, Campbelltown, SA.

Kallithraka, S., Mohdaly, A.A., Makris, D.P. and Kefalas, P. (2005). *Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (Vitis vinifera sp.): association with antiradical activity*. Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 18, p. 375-386

Kennedy J. A. (2008). *Grape and wine phenolics: Observations and recent findings*. Cien. Inv. Agr. 35(2): 107-120

Klein I., Strime M., Fanberstein L., Mani Y. (2000). *Irrigation and fertigation effects on phosphorus and potassium nutrition of wine grapes*. Vitis 39 (2) 55 – 62

Labarbe B., Cheynier V., Brossaud F., Souquet J.M., and Moutounet M. (1999). *Quantitative Fractionation of Grape Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization*. J. Agric. Food Chem. 47, 2719-2723

Lorrain B., Chira K., Teissedre P. (2011). *Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages*. Food Chemistry, v. 126, p. 1991–1999

Maarit Rein. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. University of Helsinki Department of Applied Chemistry and Microbiology Food Chemistry Division

Martín P., Delgado R., González M.R., Gallegos. (2004). *Colour of 'tempranillo' grapes as affected by different nitrogen and potassium fertilization rates*. Acta Horticulturae 652: I International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research

Mattick L.R., Shaulis N.J., Moyer J.C. (1972). *The effect of potassium fertilization on the acid content of "Concord" grape juice*. American Journal of Enology and Viticulture. Vol. 23. No 1

Mercurio, M. and Smith, P.A. (2006). *New formats for the methyl cellulose precipitable (MCP) tannin assay allow high throughput measurement of grape and wine tannin by industry*. Technical Review 164: 1-10

Morris, J.R., Cawthon, D.L., Fleming, J.W. (1980). *Effects of high rates of potassium fertilization on raw product quality and changes in pH and acidity during storage of Concord grape juice*. Am. J. Enol. Vitic. 31, 323-328

Morris J.R., Cawthon D.L. (1982). *Effect of irrigation, fruit load and potassium fertilization on yield, quality, and petiole analysis of Concord (Vitis labrusca L.) grapes*. American Journal of Enology and Viticulture

Morris, J.R., Sims, C.A., Cawthon, D.L. (1983). *Effects of excessive potassium levels on pH, acidity and color of fresh and stored grape juice*. Am. J. En. Vitic. 34:1, 35-39

Morris J.R., Sims C.A., Striegler R.K. (1987). *Effects off cultivar, maturity, cluster thinning and excessive potassium fertilization on yield and quality of Arkansas wine grapes*. American Journal of Enology and Viticulture

Morris, E.C and Fen, K.M.K. (2002). *The Calibration of Weights and Balances*. Sydney: National Measurement Institute. Monograph 4: NMI Technology Transfer Series, 3rd Edition.

Mpelasoka B. S., Schachtman D. P., Treeby M. T. and Thomas M. R. (2003). *A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation*. Australian Journal of Grape and Wine Research 9, 154–168

Nielsen, G. H., Stevenson, D. S., Gehringer, A. (1987). *The effect of NPK fertilization on element uptake, yield and fruit composition of Foch grapes in British Columbia*. Can. J. Plant Sci. 67: 511-520

Pereira C. F. (1988). *The importance of metallic elements in wine. A literature survey.* Z Lebensm Unters Forsch 186:295-300

Philipand T., Kuykendall J. R. (1973). *Changes in titratable acidity, brix, ph, potassium content, malate and tartrate during berry development of Thompson seedless grapes.* Journal of food science Vol. 38

Poni S., Quartieri M. & Tagliavini M. (2003). *Potassium nutrition of Cabernet Sauvignon grapevines (Vitis vinifera L.) as affected by shoot trimming.* Plant and Soil 253: 341–351

Possner, D.R.E., Kliewer, W.M. (1985). *The localization of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries.* Vitis 24, 229-240

Prieur C., Rigaud J., Cheynier V. and Moutounet M. (1954). *Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds.* Phytochemistry Vol. 34. No. 3. p. 781 784

Ruhl, EH, Fuda AP and Treeby MT. (1992). *Effect of potassium, magnesium and nitrogen supply on grape juice composition of Riesling, Chardonnay and Cabernet Sauvignon vines.* Australian Journal of Experimental Agriculture 32(5) 645 - 649

Saint-Cricq de Gaulejac N., Glories Y., Vivas N. (1999). *Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines.* Food Research International 32, 327 – 333

Sarneckis, C., Damberg, R.G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M.J. and Smith, P. (2006). *Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis.* Australian Journal of Grape and Wine Research; 12(1): 39-49

Saucier C., Mirabel M., Daviaud F., Longieras A., and Glories Y. (2001). *Rapid Fractionation of Grape Seed Proanthocyanidins.* J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5732 – 5735

Sipiora M.J., Anderson M.M., and Matthews M.A. (2005). *Composition of Vitis vinifera L. cv. Pinot noir Fruit and Wines from Carneros Appellation in Response to Potassium*

Fertilization and Supplemental Irrigation Soil Environment and Vine Mineral Nutrition.
American Society for Enology and Viticulture

Smith, P.A. (2005). *Precipitation of tannin with methyl cellulose allows tannin quantification in grape and wine samples.* Technical Review 158: 3-7. The Australian Wine Research Institute, Adelaide, Australia

Somers, T.C., and Evans, M.E. (1974). *Wine quality: correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines.* J. Sci. Food Agric. 25: 1369-1379.

Souquet J.M., Cheynier V., Brossaud F. and Moutounet M. (1996). *Polymeric proanthocyanidins from grape skins.* Phytochemistry, Vol. 43, No. 2, p. 509-512

Topalovic A., Slatnar A., Stampar F., Knezevic M., and Veberic R. (2011). *Influence of Foliar Fertilization with P and K on Chemical Constituents of Grape cv. 'Cardinal'.* J. Agric. Food Chem. 59, 10303–10310

Vian M. A., Tomao, V. R., Coulomb, P. O., Lacombe J. M., and Dangles O. (2006). *Comparison of the Anthocyanin Composition during Ripening of Syrah Grapes Grown Using Organic or Conventional Agricultural Practices.* J. Agric. Food Chem., 54, 5230-5235

Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moyab M.L., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. (2007). *Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical.* Talanta 71 230–235

Vivas, N., Glories, Y., Lagune L., Saucier C. & Agustin M. (1994): Estimation of the polymerisation level of procyanidins from grapes and wines by use of p-dimethylaminocinnamaldehyde. J. Int. Sci. Vigne Vin 28, 319-336.

Walker R.R. and Blackmore D.H. (2012). *Potassium concentration and pH inter-relationships in grape juice and wine of Chardonnay and Shiraz from a range of rootstocks in different environments.* Australian Journal of Grape and Wine Research 18, 183–193

Watson B. (2003). Evaluation of winegrape maturity. In: E.W. Hellman (ed.). *Oregon viticulture*. Oregon State University Press. Corvallis, Oregon. Pp 235-245

Wolf T.K., Haesler C.W., Bergman E.L. (1983). *Growth and foliar elemental composition of Seyval blanc grapevines as affected by four nutrient solution concentrations of nitrogen, potassium and magnesium*. American Journal of Enology and Viticulture. Vol. 34, No 4

Κοτσερίδης, Γ. (2005/α), *Σημειώσεις/Εργαστηριακές Ασκήσεις Οινολογίας I*, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων, Αθήνα

Κοτσερίδης, Γ. (2005/β), *Σημειώσεις Οινολογίας II*, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων, Αθήνα

Σταυρακάκης, Μ.Ν. (2009), *Αμπελογραφία – Ποικιλίες και Υποκείμενα του ελληνικού αμπελώνα*, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Αμπελολογίας, Αθήνα

Σταυρακάκης Δ. (2011). Αμπελογραφία. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη