

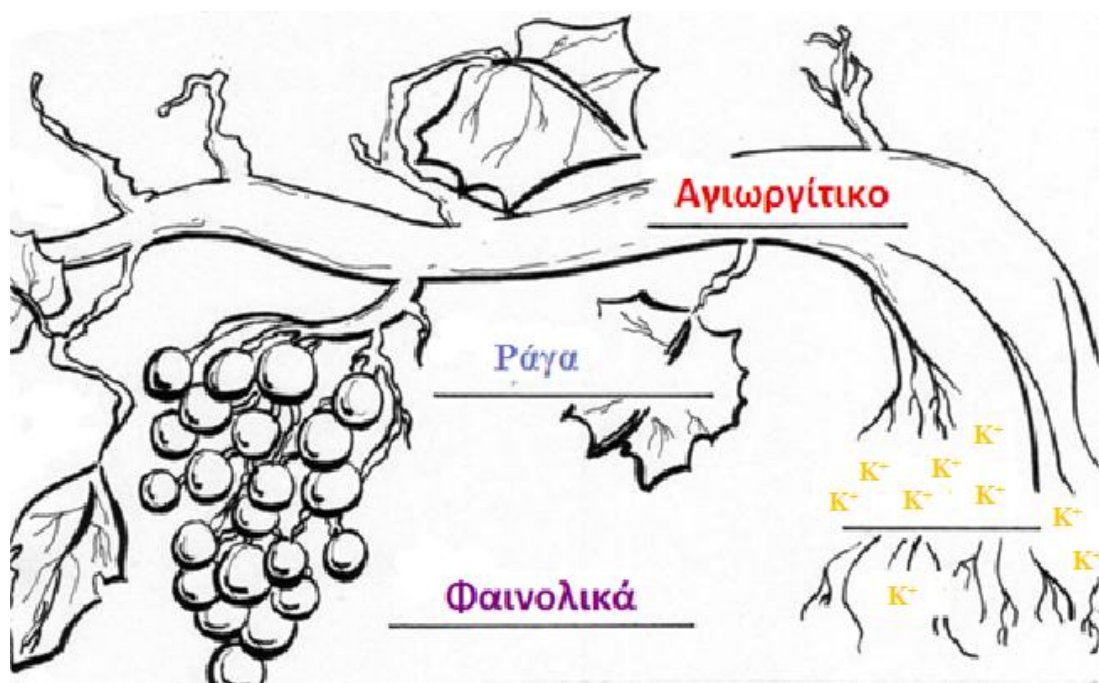


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ **AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS**

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων - Τμήμα
Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Δ.Π.Μ.Σ. «Αμπελουργία – Οινολογία»
Εργαστήριο Οινολογίας

“Μελέτη της επίδρασης της λίπανσης καλίου στα φαινολικά
συστατικά των ραγών της ποικιλίας Αγιωργίτικο για το έτος 2010”



Μεταπτυχιακή διατριβή

Τσαπάρας Δ. Ιωάννης

Επιβλέπουσα: Επίκουρος Καθηγήτρια Σ. Καλλίθρακα

Αθήνα 2013

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων - Τμήμα
Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Δ.Π.Μ.Σ. «Αμπελουργία – Οινολογία»
Εργαστήριο Οινολογίας**

**“Μελέτη της επίδρασης της λίπανσης καλίου στα φαινολικά
συστατικά των ραγών της ποικιλίας Αγιωργίτικο για το έτος 2010”**

Μεταπτυχιακή διατριβή

Τσαπάρας Δ. Ιωάννης

Επιβλέπουσα: Επίκουρος Καθηγήτρια Σ. Καλλίθρακα

Αθήνα 2013

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων - Τμήμα
Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Δ.Π.Μ.Σ. «Αμπελουργία – Οινολογία»
Εργαστήριο Οινολογίας**

**“Μελέτη της επίδρασης της λίπανσης καλίου στα φαινολικά
συστατικά των ραγών της ποικιλίας Αγιωργίτικο για το έτος 2010”**

Μεταπτυχιακή διατριβή

Τσαπάρας Δ. Ιωάννης

Επιβλέπουσα: Επίκουρος Καθηγήτρια Σ. Καλλίθρακα

Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής:

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

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

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

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση λίπανσης καλίου στα φαινολικά συστατικά των ραγών της ποικιλίας *Vitis vinifera* Αγιωργίτικο. Ο αμπελώνας που διενεργήθηκε το πείραμα βρίσκεται εντός της αμπελουργικής ζώνης ΠΟΠ Νεμέα, στο Δ.Δ. «Ασπροκάμπου». Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε ράγες και σε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων των ραγών του τρύγου 2010. Οι επεμβάσεις του πειράματος ήταν: Α (88g N - 25g P / πρέμνο, μάρτυρας), Β (88g N - 25g P - 46g K / πρέμνο, χλωριούχο κάλιο), Γ (88g N - 25g P - 92g K / πρέμνο, χλωριούχο κάλιο), Δ (88g N - 25g P - 38g K / πρέμνο, θειϊκό κάλιο), Ε (88g N - 25g P - 76g K / πρέμνο, θειϊκό κάλιο), Ζ (88g N - 25g P - 76g K+Mg / πρέμνο) και Η (88g N - 25g P - 152g K+Mg / πρέμνο). Για κάθε επέμβαση εφαρμόστηκε τριπλή επανάληψη. Έγιναν μετρήσεις στα βάρη των ραγών, στα βάρη των φλοιών και των γιγάρτων και οι ακόλουθες αναλύσεις: α) αναλύσεις σε ράγες (Illand, Glories, methyl cellulose) και β) αναλύσεις σε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων (ταννίνες με βρασμό, methyl cellulose, DPPH, DMAC, ανάλυση ανθοκυανών των φλοιών με HPLC, ανάλυση φαινολικών των φλοιών και των γιγάρτων με HPLC), καθώς και εκτίμηση του Δείκτη Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού και υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης Pearson. Από την έρευνα προέκυψε ότι η λίπανση με 88g N, 25g P, 46g K επηρεάζει θετικά την παραγωγή ολικών ταννινών των φλοιών αλλά η μεγάλη συγκέντρωση των ανθοκυανών στους φλοιούς δεν είναι εκχυλίσιμη. Επίσης, η λίπανση με 88g N, 25g P, 76g K+Mg ανά πρέμνο προωμίζει τα φαινολικά των φλοιών των ραγών. Ακόμη, η λίπανση με 88g N, 25g P, 152g K+Mg ανά πρέμνο επιβραδύνει την φαινολική ωρίμανση, αλλά δημιουργεί μεγάλο φαινολικό δυναμικό.

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

Abstract

In the current study it was investigated the possible effect of potassium fertilization on the phenolic composition of *Vitis vinifera* var. "Agiorgitiko". The experimental vineyard is located in the region of "Asprokampos" in Nemea. During the experiment analytical methods were applied to berries and to skin and seed extracts of the 2010 vintage. The treatments applied were the following: A (control), B (46g K / vine), B (92g K / vine), Γ (38g K /vine), E (76g K /vine), Z (76g K+Mg /vine), H (152g K+Mg /vine). The different fertilization treatments were applied in triplicate. Color parameters, anthocyanin and phenolic content, antioxidant activity, mean polymerization degree index, tannin concentration were applied. Also, individual anthocyanins and oligomeric phenolic compounds were determined by HPLC and Pearson's correlation coefficient between two methods was defined. The study found that treatment B (88g N, 25g P, 46g K / vine) effects positive the total tannin content of skin, but the big skin anthocyanin content is not extractible. Also, the treatment Z (88g N, 25g P, 76g K+Mg / vine) matures earlier the berries skin phenolics. In addition, the treatment H (88g N, 25g P, 152g K+Mg / vine) slows down the phenolic maturity, but created big phenolic content.

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

Ευχαριστίες

Για την παρούσα διπλωματική εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ανάθεση του θέματος τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γ. Κοτσερίδη και την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Α. Μπινιάρη. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Γ. Κοτσερίδη, ο οποίος, πέραν των πανεπιστημιακών γνώσεων, συνέβαλλε στην διαμόρφωση του οινολογικού μου χαρακτήρα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Σ. Καλλίθρακα για την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου εργασίας, την πολύτιμη καθοδήγησή της για την εκπόνησή της, καθώς και τη γενικότερη στήριξή της. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Μ. Κυραλέου υποψήφια διδάκτωρ του τμήματος Οινολογίας και την κα. Ν. Προξενιά μέλος Ε.Ε.ΔΙ.Π. για την ουσιαστική βοήθεια στην εκπόνηση του πειραματικού μέρους της εργασίας μου. Τέλος, για την ολοκλήρωση της εργασίας, ευχαριστώ θερμά την κα. Α. Κομματά για την αδιάλειπτη συνεργασία και βοήθειά της.

Τσαπάρας Ιωάννης

Αθήνα 2013

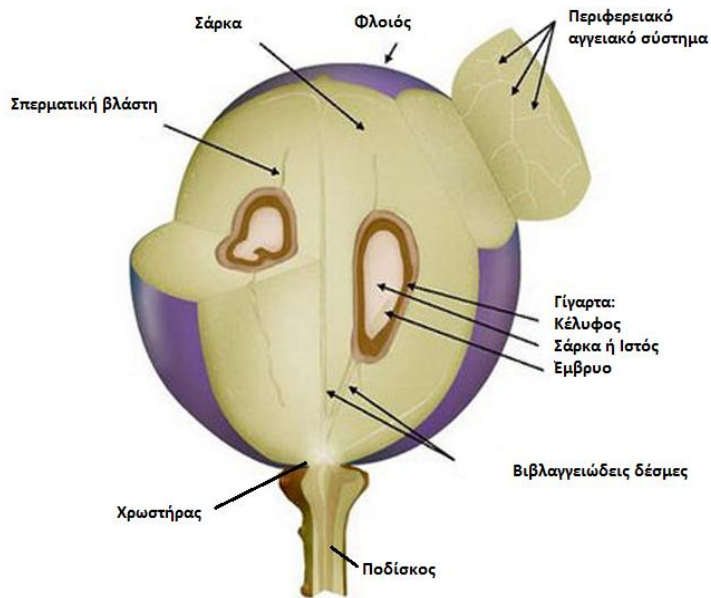
*Στην Ελεάνα και τον Παναγιώτη,
που χωρίς αυτούς θα ήταν αδύνατη
η έναρξη και ολοκλήρωση του ΠΜΣ*

Πίνακας περιεχομένων

| | |
|--|----|
| Περίληψη..... | 1 |
| Abstract | 2 |
| Ευχαριστίες..... | 3 |
| 1. Τα μέρη της ράγας και η ανάπτυξή της..... | 7 |
| 1.1 Μορφολογία της ράγας..... | 7 |
| 1.2 Φάσεις ανάπτυξης της ράγας..... | 9 |
| 2. Τα Πολυφαινολικά Συστατικά | 11 |
| 2.1 Μη Φλαβονοειδείς Φαινόλες | 12 |
| 2.2 Φλαβονοειδείς Φαινόλες..... | 14 |
| 2.2.1 Φλαβονόλες | 14 |
| 2.2.2 Φλαβανόνες | 14 |
| 2.2.3 Φλαβανονόλες | 15 |
| 2.2.4 Κατεχίνες | 15 |
| 2.2.5 Προκυανιδίνες..... | 16 |
| 2.2.6 Ανθοκυάνες | 17 |
| 2.2.7 Ταννίνες..... | 19 |
| 2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των ανθοκυανών | 21 |
| 3. Το κάλιο | 24 |
| 3.1 Το κάλιο στο έδαφος..... | 25 |
| 3.2 Το κάλιο στην άμπελο | 27 |
| 3.3 Το κάλιο στη ράγα | 27 |
| 3.4 Έλλειψη ή περίσσεια καλίου στην άμπελο | 29 |
| 4. Αγωγιμότητα..... | 31 |
| 4.1 Αμπελογραφικοί χαρακτήρες και φαινολογικά στάδια..... | 31 |
| 4.2 Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά | 32 |
| 5. Υλικά και Μέθοδοι | 34 |
| 5.1 Το πείραμα | 34 |
| 5.2 Αναλύσεις σε ράγες..... | 36 |
| 5.2.1 Προσδιορισμός ολικών ανθοκυανών και φαινολικών με την μέθοδο Iland <i>et. al.</i> 1996, 2000 | 36 |
| 5.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού της εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών και ταννινών και του φαινολικού δυναμικού των ραγών (Glories <i>et. al.</i> , 1990)..... | 38 |
| 5.2.3 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose (Sarneckis <i>et. al.</i> , 2005, Smith 2005, Mercurio and Smith 2006): | 40 |

| | |
|--|----|
| 5.3 Αναλύσεις σε φλοιούς και γιγάρτα ραγών | 41 |
| 5.3.1 Εκχυλίσεις ανθοκυανών των φλοιών για HPLC..... | 42 |
| 5.3.2 Εκχυλίσεις φαινολικών των φλοιών και των γιγάρτων..... | 43 |
| 5.3.3 Φωτομετρικές Μέθοδοι..... | 44 |
| 5.3.3.1 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose | 44 |
| 5.3.3.2 Ολικές ταννίνες (μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες) με τη μέθοδο του βρασμού | 44 |
| 5.3.3.3 DPPH (αντιοξειδωτική ικανότητα) | 45 |
| 5.3.3.4 DMAC..... | 46 |
| 5.3.3.4.1 Δείκτης βαθμού πολυμερισμού (mDP)..... | 47 |
| 5.3.4 Προσδιορισμός των φαινολικών σε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων στην HPLC (μονομερών και ολιγομερών φλαβαν – 3 –ολων και φλαβονολών) | 47 |
| 5.4 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων | 50 |
| 6. Μετρήσεις – Αναλύσεις στις Ράγες..... | 51 |
| 6.1 Μέθοδος Glories | 55 |
| 6.1.1 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (Δ.Φ.Ο.) | 61 |
| 6.2 Προσδιορισμός ολικών ανθοκυανών και φαινολικών (Ilанд <i>et. al.</i> , 1996, 2000) | 62 |
| 6.3 Methyl cellulose | 65 |
| 6.4 DMAC – Προσδιορισμός Φλαβονολών και Προανθοκυανιδίνων..... | 67 |
| 6.5 DPPH - μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας..... | 69 |
| 6.6 Ολικές Ταννίνες με Βρασμό - μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες φλοιών και γιγάρτων .. | 71 |
| 6.6.1 Δείκτης Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού Ταννινών | 72 |
| 6.7 Ταννίνες φλοιών και γιγάρτων (Methyl cellulose)..... | 75 |
| 6.8 Ανθοκυάνες φλοιών με HPLC..... | 76 |
| 6.9 Φαινολικά γιγάρτων HPLC..... | 81 |
| 6.10 HPLC Φαινολικά Φλοιών..... | 85 |
| 6.11 Συντελεστής Pearson..... | 88 |
| 6.12 Συγκριτική Βιβλιογραφία | 90 |
| 7. Συμπεράσματα | 93 |
| 8. Βιβλιογραφία..... | 96 |
| 8.1 Ελληνική Βιβλιογραφία | 96 |
| 8.2 Αγγλική Βιβλιογραφία..... | 97 |

1. Τα μέρη της ράγας και η ανάπτυξή της



1.1 Μορφολογία της ράγας

Η ράγα αποτελείται από το φλοιό (10-20%), το σαρκώδες μέρος ή ράγα (74-87%) και τα γίγαρτα (3-6%). Τα ποσοστά του εκάστοτε μέρους κυμαίνονται ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλιού, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες και το βαθμό ωρίμανσης (Κοτσερίδης, 2005^α).

Εικόνα 1: Σχηματική παράσταση της ράγας της σταφυλής

(Πηγή: James A. Kennedy. (2008). *Grape and wine phenolics: Observations and recent findings*. *Cien. Inv. Agr.* 35(2): 107-120. Εικονογράφιση Ιορδάνη Κουτρομανίδη, Winetitles) *Η εικόνα επεξεργάστηκε ηλεκτρονικά και μεταφράστηκε στα ελληνικά

Ο φλοιός απαρτίζεται από τρία στρώματα: την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδερμα, καθένα από τα οποία αποτελείται από μία ή περισσότερες στοιβάδες κυττάρων. Η εφυμενίδα βρίσκεται στο εξωτερικό μέρος του φλοιού και καλύπτεται από κηρώδεις ουσίες. Οι ουσίες αυτές παρεμποδίζουν την υπερβολική εξάτμιση του χυμού της ράγας, συντελούν στην ταχεία απομάκρυνση της βροχής και συγκρατούν τους διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μεταφέρονται από τον αέρα και οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις ζυμώσεις του γλεύκους και του οίνου (Κοτσερίδης, 2005^α). Η κηρώδης αυτή ουσία που ισούται περίπου με 0,1mg ανά τετραγωνικό εκατοστό φλοιού, έχει ως κύριο ρόλο τον έλεγχο της επιδερμικής διαπνοής και την παρεμπόδιση της εξάτμισης του νερού των ραγών. Παρεμποδίζει, εξάλλου, την είσοδο του νερού της βροχής και της δροσιάς μέσα στη ράγα, προφυλάσσει, μερικώς τις ράγες από τις προσβολές των εντόμων, συμβάλλει στον περιορισμό των μηχανικών ζημιών και των εγκαυμάτων των ραγών από τον ήλιο και παίζει ρόλο στην

αντίσταση του φυτού από τις μυκητολογικές ασθένειες (Κουράκου, 1998). Η επιδερμίδα αποτελείται από μία στοιβάδα κυττάρων και είναι το στρώμα του φλοιού στο οποίο περιέχονται αρωματικές και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις, χαρακτηριστικά της ποικιλίας του σταφυλιού. Το υπόδερμα αποτελείται από 6-10 στοιβάδες κυττάρων, από τις οποίες οι 2-3 πρώτες περιέχουν τις ανθοκυάνες ή τις φλαβόνες, χρωστικές ουσίες στις οποίες οφείλεται το χρώμα των ερυθρών ή των λευκών σταφυλιών αντιστοίχως (Κοτσερίδης, 2005^α). Ο φλοιός 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).

Η σάρκα διακρίνεται σε τρεις ζώνες κυττάρων χωρίς σαφή διαχωριστικά όρια: το μεσοκάρπιο (εξωτερική και μεσαία ζώνη) και το ενδοκάρπιο (εσωτερική ζώνη). Η ράγα τροφοδοτείται από το φυτό χάρη σε ένα δίκτυο από βιβλαγγειώδεις δέσμες. Το αγγειακό αυτό σύστημα βρίσκεται σε επικοινωνία με τα φύλλα και τις ρίζες μέσω ανάλογων αγγειακών δεσμίδων, με τις οποίες η ράγα προσλαμβάνει ειδικότερα τα σάκχαρα από τα φύλλα και τις ανόργανες ουσίες από τις ρίζες (Κουράκου, 1998). Η χημική σύσταση της σάρκας, η οποία αποτελεί συστατικό του γλεύκους, είναι κατά ένα μεγάλο μέρος ίδια με τη σύστασή του: 65-80% H₂O, 10-30% ζάχαρα και 5-6% άλλες ουσίες. Αυτές οι ουσίες είναι οργανικά οξέα (ελεύθερα και δεσμευμένα), ανόργανα συστατικά, αζωτούχες ουσίες, πηκτινικές ύλες, αρωματικές ουσίες, χρωστικές ουσίες και ταννίνες (Κοτσερίδης, 2005^α).

Το γίγαρτο είναι ο σπόρος της αμπέλου. Η ωθήκη του άνθους σχηματίζεται από την ένωση δύο καρπόφυλλων, το κάθε ένα από τα οποία περιέχει δύο σπερματικές βλάστες. Κάθε ράγα πρέπει να περικλείει θεωρητικά 4 γίγαρτα. Συνήθως απαντώνται 1-3, ενώ υπάρχουν και ράγες που δεν περικλείουν γίγαρτα. Ο αριθμός των γιγάρτων ανά ράγα επηρεάζεται από την ποικιλία και τις κλιματικές συνθήκες κατά την ανθοφορία. Το γίγαρτο αποτελείται από τη σάρκα, που προστατεύεται εξωτερικά από το κέλυφος ή επισπέρμιο και εμπεριέχει το έμβρυο (Κουράκου, 1998).

1.2 Φάσεις ανάπτυξης της ράγας

Κατά την ανάπτυξή της η ράγα ακολουθεί μια εξέλιξη η οποία διακρίνεται σε τρεις φάσεις, ανάλογα με την διάμετρο, το βάρος και τον όγκο της. Αρχικά λαμβάνει χώρα η φάση της ταχείας ανάπτυξης (ή αλλιώς το στάδιο του πράσινου σταφυλιού ή της πράσινης ράγας), η οποία αρχίζει από την καρπόδεση (Κοτσερίδης, 2005^α). Διαρκεί από 45 έως 65 ημέρες, ανάλογα με την ποικιλία και τις κλιματολογικές συνθήκες οξέων (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume1, 2006). Σε όλο αυτό το διάστημα, οι ράγες είναι πράσινες λόγω της άφθονης χλωροφύλλης που υπάρχει στο φλοιό τους, έχουν σκληρή υφή και αναπτύσσονται με βραδύ ρυθμό (Κοτσερίδης, 2005^α). Οι αυξητικές ορμόνες (κυτοκινίνες και γιβερριλίνες) 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 (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume1, 2006).

Στη συνέχεια ακολουθεί η δεύτερη φάση της ανάπτυξης, που ονομάζεται περκασμός. Ο περκασμός σηματοδοτείται από την εμφάνιση του χρώματος στη ράγα (στις ερυθρές ποικιλίες) και τον διάφανο φλοιό στις λευκές ποικιλίες (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume 1, 2006). Το πράσινο χρώμα των ραγών στις μεν λευκές ποικιλίες περνάει στο κίτρινο, στις δε ερυθρές περνάει πρώτα στο ερυθρό ανοικτό και στη συνέχεια στο βαθύ ερυθρό. Αυτή η αλλαγή του χρώματος είναι πολύ απότομη, έτσι ώστε μια συγκεκριμένη ράγα να αλλάζει χρωματισμό σε διάστημα μίας μέρας (Κοτσερίδης, 2005^α). Για το σύνολο των ραγών, όμως, 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 αμπισικού οξέος (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume1, 2006).

Η τρίτη φάση αφορά στην ωρίμανση του σταφυλιού. 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 (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume1, 2006) θεαματικά, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των σακχάρων στο χυμό της σάρκας των ραγών (Κουράκου, 1998). 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 (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume1, 2006). Στο σταφύλι διακρίνουμε τα ακόλουθα είδη ωριμότητας: Φυσιολογική ή βιολογική ωριμότητα – που χαρακτηρίζεται από την ικανότητα των γιγάρτων να βλαστήσουν. Βιομηχανική ωριμότητα – που αντιστοιχεί στο ανώτατο απόλυτο ποσό σακχάρων των ώριμων σταφυλιών. Τεχνολογική ωριμότητα – που αντιστοιχεί στη στιγμή κατά την οποία το σταφύλι μιας ποικιλίας δίνει γλεύκος. Πολυφαινολική ωριμότητα – που περιλαμβάνει όχι μόνο την ολική συγκέντρωση των συστατικών της οικογένειας των πολυφαινολών, αλλά και τη δομή τους και την ικανότητά τους να εκχυλίζονται από τα σταφύλια κατά την αλκοολική ζύμωση (Κοτσερίδης, 2005^α).

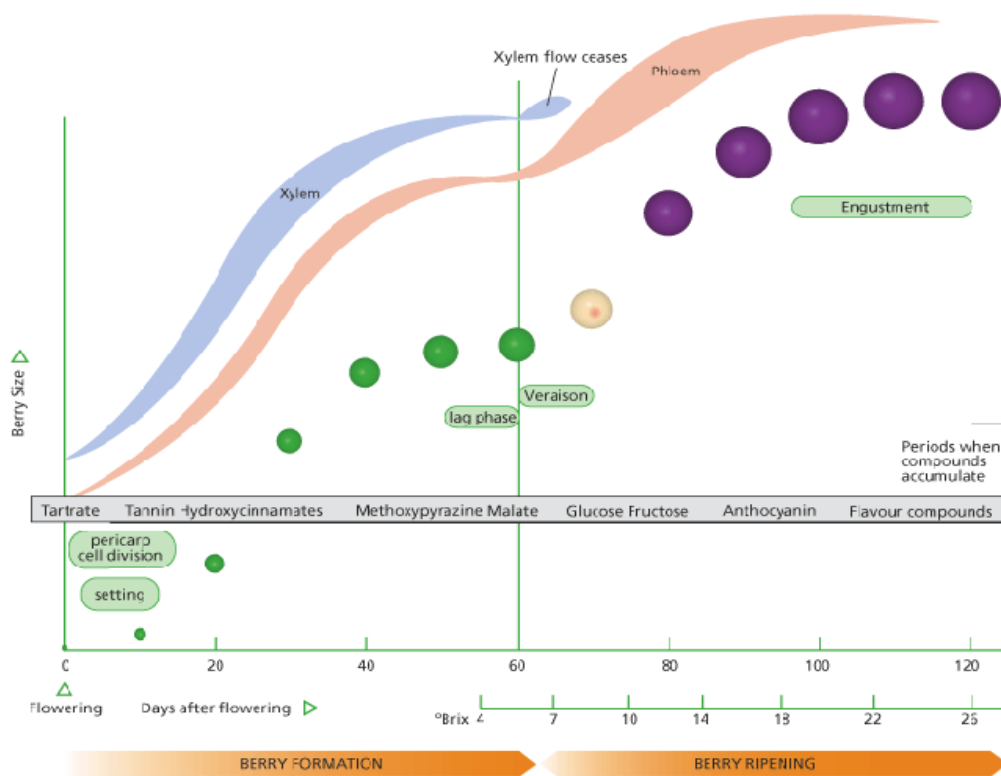


Figure 2: Diagram showing relative size and color of berries at 10-day intervals after flowering, passing through major developmental events (rounded boxes). Also shown are the periods when compounds accumulate, the levels of juice brix, and an indication of the rate of inflow of xylem and phloem vascular saps into the berry. Illustration by Jordan Koutroumanidis, Winetitles.

Διάγραμμα 1: Φάσεις ανάπτυξης της ράγας

(Πηγή: Coombe, B.G., 1995)

“Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening.”

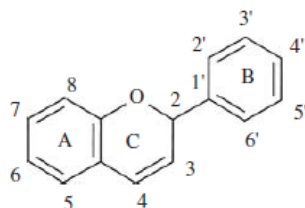
2. Τα Πολυφαινολικά Συστατικά

Τα πολυφαινολικά συστατικά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην οινολογία. Θεωρούνται υπεύθυνα για όλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αποδίδουν στις ερυθρές και λευκές ποικιλίες. Έχουν ενδιαφέρουσες και ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες, και ευθύνονται για το «Γαλλικό παράδοξο». Έχουν βακτηριοκτόνα, αντιοξειδωτική, βιταμινούχα και καρδιοπροστατευτική δράση (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume 2, 2006). Οι φαινόλες αποτελούν μία μεγάλη και σύνθετη ομάδα ενώσεων, εξίσου σημαντικές στους λευκούς και ερυθρούς οίνους, αλλά εμφανίζονται στους λευκούς οίνους σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις (Ronald S. Jackson, 2008). Η σημαντικότητα αυτών των ενώσεων καθορίζει τόσο τα σταφύλια όσο και τους οίνους ποιότητας. Αυτά τα μόρια εκχυλίζονται από διάφορα μέρη της ράγας και η δομή τους τροποποιείται κατά την παλαίωση και τη συντήρηση σε βαρέλι, σε δεξαμενή ή σε φιάλη, ανάλογα με τις συνθήκες (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume 2, 2006).

Σύμφωνα με την Κουράκου (1998) φαινόλες ονομάζονται τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων, τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια σε αντικατάσταση ισάριθμων υδρογόνων, συνδεδεμένων με τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου (βενζολικός). Διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: στις μη φλαβανοειδείς φαινόλες και στις φλαβανοειδείς φαινόλες.

- ✓ Οι μη φλαβανοειδείς φαινόλες (μονομοριακές φαινόλες) απαντούν ευρύτατα τους φυτικούς ιστούς και σε διάφορα φυτικά προϊόντα. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα είναι το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ από τις βασικές ενώσεις του βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος αντίστοιχα με επιπρόσθετες ομάδες –OH.
- ✓ Οι φλαβανοειδείς φαινόλες (πολυμοριακές φαινόλες) έχουν σκελετό C6-C3-C6 και αποτελούνται από δύο βενζολικούς δακτυλίους (Α και Β) συνδεδεμένα με ένα ετεροκυκλικό δακτύλιο πυρυλίου, που περιέχει οξυγόνο. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι πολυμοριακές φαινόλες που προέρχονται από την ίδια μητρική ένωση που είναι η φλαβόνη και διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες: στα παράγωγα της φλαβόνης (κυρίως φλαβονοειδή) και στα παράγωγα του κατιόντος φλαβυλίου (ανθοκυάνες ή ανθοκυανίνες). Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ένα βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα του τύπου της φλαβόνης. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανονόλες, οι κατεχίνες, οι

προκυανιδίνες, οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες, που είναι τα πολυμερισμένα τους παράγωγα (Κοτσερίδης, 2005^b).



Εικόνα 2: Βασικός φλαβονοειδής σκελετός

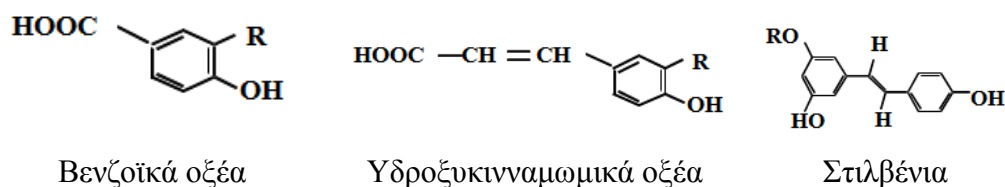
Με τον όρο πολυφαινόλες προσδιορίζονται επίσης και τα παράγωγα των φαινολικών συστατικών που προκύπτουν με υποκατάσταση της βασικής τους δομής (π.χ. εστέρες, μεθυλεστέρες, γλυκοζίτες).

2.1 Μη Φλαβονοειδείς Φαινόλες

Στις μη φλαβονοειδείς φαινόλες υπάγονται τα φαινολικά οξέα η φαινολοξέα που είναι μονομοριακά φαινολικά παράγωγα και διακρίνονται στα ακόλουθα:

1. Τα βενζοϊκά οξέα (απλή μονοκυκλική φαινόλη) δε βρίσκονται ελεύθερα στη σταφυλή, αλλά με μορφή σύνθετων χημικών ενώσεων στις οποίες συμμετέχουν και ανθοκυάνες. Συμμετέχουν επίσης στη δομή των ταννινών, αποτελώντας ένα από τα κύρια συστατικά τους. Η σταφυλή περιέχει κυρίως το γαλλικό οξύ, το οποίο βρίσκεται συνήθως, υπό τη μορφή εστέρων των 3-φλαβανολών (κατεχίνες).
2. Κινναμωμικά οξέα (ένας αρωματικός δακτύλιος πάνω στον οποίο είναι συνδεδεμένη μια πλευρική αλυσίδα τριών ανθράκων) δε βρίσκονται επίσης ελεύθερα στη σταφυλή, αλλά απαντώνται υπό μορφή ενώσεων με τις ανθοκυάνες και με το τρυγικό οξύ.
3. Τα στυλβένια (ενώσεις με δύο βενζολικούς δακτυλίους που συνδέονται συνήθως με ένα αιθάνιο ή πιθανώς με μία αιθυλενική αλυσίδα) συναντώνται στο σταφύλι, τον οίνο και το ξύλο δρυός. Από τα στυλβένια αξίζει να αναφερθεί η ρεσβερατρόλη (3,5,4-τρι-υδροξυ-στυλβένιο) που βρίσκεται υπό τη μορφή *trans*, καθώς και το παράγωγό της με τη γλυκόζη. Θεωρείται το σπουδαιότερο στυλβένιο της σταφυλής, καθώς στην εν λόγω ουσία αποδίδονται θεραπευτικές, αντικαρκινικές και αντιθρομβωτικές ιδιότητες, αλλά φαίνεται πως παίζει ρόλο και στην αντίσταση των σταφυλών στην προσβολή τους από κρυπτογαμικές ασθένειες, όπως π.χ. ο *Botrytis cinerea*. Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται μόνο στους

φλοιούς της σταφυλής, συνεπώς μόνο σε ερυθρούς οίνους και εκχυλίζεται κυρίως κατά την αλκοολική τους ζύμωση σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1 έως 3 mg/L, ανάλογα την ποικιλία (Jeandet *et al.*, 1995).

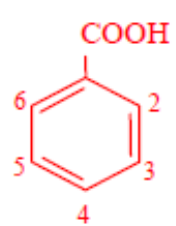
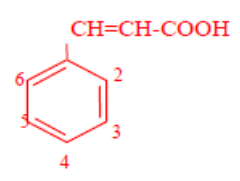


Εικόνα 3: Μη Φλαβονοειδείς Φαινόλες

(Πηγή: Καλλίθρακα, Παραδόσεις)

Πίνακας 1: Τα κυριότερα φαινολοξέα των σταφυλών

(Πηγή: Κουράκου-Δραγώνα, 1998)

| Βασικό οξύ | Βασικός τύπος | Ονομασία φαινολοξέων | Θέση πρόσθετων ομάδων | |
|-------------|---|----------------------|-----------------------|-------------------|
| | | | -OH | -OCH ₃ |
| Βενζοϊκό |  | Σαλικυλικό οξύ | 2 | |
| | | π-υδροξυβενζοϊκό οξύ | 4 | |
| | | Γαλλικό οξύ | 3, 4, 5 | |
| | | Πρωτοκατεχινικό οξύ | 3, 4 | |
| | | Βανιλλικό οξύ | 4 | 3 |
| | | Συριγγικό οξύ | 4 | 3, 5 |
| Κινναμωμικό |  | π-κουμαρικό οξύ | 4 | |
| | | Καφεϊκό οξύ | 3, 4 | |
| | | Χλωρογενικό οξύ | 3, 4 | |
| | | Φερουλικό οξύ | 4 | 3 |

2.2 Φλαβονοειδείς Φαινόλες

2.2.1 Φλαβονόλες

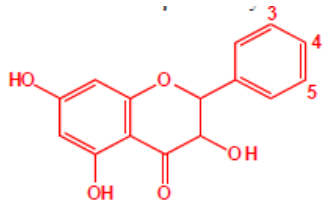
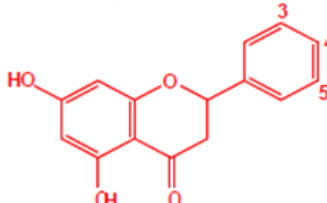
Οι φλαβονόλες αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές των φυτών και βρίσκονται στους φλοιούς των σταφυλών τόσο ερυθρών όσο και των λευκών. Επίσης, περιέχονται στην ίδια συγκέντρωση σε λευκές και ερυθρές ποικιλίες (Κοτσερίδης, 2005^β). Η περιεκτικότητα των φλαβονολών στις σταφυλές ποικίλει από 10–100 mg/Kg ραγών. Στους λευκούς οίνους, λόγω της απουσίας φλοιών κατά την οινοποίηση, απαντούν στην ποσότητα των 1-3 mg/L ανάλογα με την ποικιλία της σταφυλής (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume 2, 2006). Σχηματίζονται με την προσκόλληση στη θέση -3 του κεντρικού δακτυλίου (βενζοπυρόνη) ενός μορίου μονοζαχαρίτη (κυρίως γλυκόζης) ή ενός μορίου γλυκουρονικού οξέος. Στον πίνακα παρουσιάζεται ο χημικός τύπος της άγλυκης μορφής των τεσσάρων βασικών φλαβονολών της σταφυλής.

2.2.2 Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες διαφέρουν από τις φλαβονόλες ως προς τη δομή: στη θέση -3 του μορίου της φλαβονόλης υπάρχει ένα δραστικό -OH. Αυτή η διαφορά είναι υπεύθυνη για τη σημασία της κάθε ομάδας στη φύση. Οι φλαβανόνες είναι ελάχιστα διαδεδομένες στη φύση και τα παράγωγά τους δεν είναι συστατικά των σταφυλιών. Ανήκουν στα φαινολικά συστατικά του ξύλου της δρυός και, ως εκ τούτου, η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί μόνο σε οίνους που παλαίωσαν σε βαρέλια (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Στον πίνακα παρουσιάζονται οι δύο σημαντικότερες φλαβανόνες.

Πίνακας 2: Οι συνηθέστερες φλαβονόλες και φλαβανόνες σε οίνους

(Πηγή: Κουράκου-Δραγώνα, 1998)

| Βασική ένωση | Βασικός τύπος | Άγλυκο φαινολικό παράγωγο | Θέση πρόσθετων ομάδων | |
|--------------|--|---------------------------------|--------------------------|-------------------|
| | | | -OH | -OCH ₃ |
| Φλαβονόλες |  | Καιμπερόλη | 4 | |
| | | Κερκετίνη | 3, 4 | |
| | | Μυρικετίνη | 3, 4, 5 | |
| Φλαβανόνες |  | Ναριγγενίνη | 4 | |
| | | Εσπεριτίνη | 3 | 4 |
| | | Εριδιοκτυόλη | 3, 4 | |

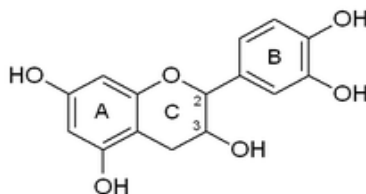
2.2.3 Φλαβανονόλες

Οι ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβανονολών είναι γλυκοζίτες και ταυτοποιήθηκαν σε φλοιούς λευκών ποικιλιών. Πρόκειται για τη διυδροκερκετίνη και τη διυδροκαμπερόλη και έχουν πολύ ανοιχτό κίτρινο χρώμα. Οι φλαβανονόλες απαντούν επίσης και στους βοστρύχους (Κοτσερίδης, 2005^β).

2.2.4 Κατεχίνες

Το παράγωγο της φλαβονόλης που έχει τον κεντρικό ετεροκυκλικό δακτύλιο υδρογονομένο λέγεται φλαβαν-3-όλη. Το πιο γνωστό παράγωγό της είναι η κατεχίνη, που έχει δύο ασύμμετρα άτομα άνθρακα (C₂ και C₃), με αποτέλεσμα να δίνει 2 ισομερή *trans*, τις επονομαζόμενες κατεχίνες, και 2 ισομερή *cis*, τις λεγόμενες επικατεχίνες. Οι πιο σταθερές μορφές που απαντούν στις σταφυλές και τους οίνους είναι η (+) -κατεχίνη και η (-) επικατεχίνη (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume2, 2006). Τα μόρια κατεχίνης δε συγκαταλέγονται στις ταννίνες, καθώς το μοριακό τους βάρος είναι πολύ μικρό (292), με αποτέλεσμα να έχουν περιορισμένες ιδιότητες σύνδεσης με πρωτεΐνες. Το μοριακό βάρος της κατεχίνης, όμως, είναι αρκετά μεγάλο ώστε να κάνει σταθερούς δεσμούς με τις πρωτεΐνες. Εξαιτίας των δύο -OH στον

πλευρικό βενζολικό δακτύλιο, όταν θερμανθεί σε όξινο περιβάλλον πολυμερίζεται προς ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους (π.χ. φλοιοβαφένια). Αρχικά προκύπτει ένα κίτρινο διάλυμα, που στη συνέχεια σκουραίνει σιγά-σιγά ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού και μπορεί να φτάσει μέχρι καστανόμαυρο. Σε τέτοιου φύσεως οξειδώσεις και συνενώσεις οφείλεται το «καφέτιασμα» των οίνων. Κατά συνέπεια η παρουσία κατεχινών στους λευκούς οίνους δεν είναι επιθυμητή (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).



Εικόνα 4: Χημικός τύπος κατεχίνης

(Πηγή: Παραδόσεις Χημείας Οίνου, Καλλίθρακα)

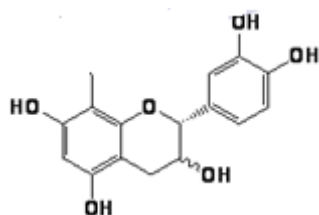
Οι κατεχίνες απαντούν κυρίως στους φλοιούς και στα γίγαρτα των ραγών. Στους λευκούς οίνους η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 10-50 mg/L, ενώ στους ερυθρούς μπορεί να φθάσει 200 mg/L (Zoecklein et al., 1995).

2.2.5 Προκυανιδίνες

Οι φυσικές προκυανιδίνες είναι αφυδρογονωμένες κατεχίνες. Όσο οι αφυδρογονώσεις συνεχίζονται τόσο πιο συμπυκνωμένες προκυανιδίνες σχηματίζονται. Στις ράγες έχουν ανιχνευτεί μέχρι και τετραμερείς προκυανιδίνες. Στους νέους οίνους το μοριακό βάρος τους είναι γύρω στο 600 (σπάνια 900), ενώ κατά την ωρίμανση και παλαίωση του οίνου οι προκυανιδίνες ενώνονται μεταξύ τους αλλά και με άλλα μόρια, ώστε να σχηματίζονται πολυμερή μεγαλύτερου μοριακού βάρους (2000-3000). Κατά συνέπεια οι προκυανιδίνες αποτελούν τον πρόδρομο των συμπυκνωμένων ταννινών (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982).

Όπως αναφέρει η Κουράκου (1998) σε έρευνες για την παρουσία κατεχινών και προκυανιδινών σε σταφύλια οχτώ ποικιλιών *vitis vinifera* διαπιστώθηκε πως από όλα τα μέρη της σταφυλής, το μεγαλύτερο ποσοστό κατεχινών (Μ.Ο. 65%) και προκυανιδινών (Μ.Ο. 56%) βρίσκεται στα γίγαρτα. Οπότε, από την εν λόγω έρευνα συμπεραίνεται πως ο χυμός των σταφυλών δεν περιέχει ευοξειδωτά υποστρώματα και κατά συνέπεια το γλεύκος τα αποκτά κατά την επεξεργασία του (θλιπτήρια,

πιεστήρια). Όσον αφορά στους ερυθρούς οίνους συμπεραίνεται πως οι πρόδρομοι των συμπτυκνωμένων ταννινών που καθορίζουν τη δομή και το «σώμα», αλλά και την αντοχή τους στο χρόνο, βρίσκονται στα γίγαρτα.



Εικόνα 5: Χημικός Τύπος Προανθοκυανιδίνης
(Πηγή: Παραδόσεις Χημείας Οίνου, Καλλίθρακα)

2.2.6 Ανθοκυάνες

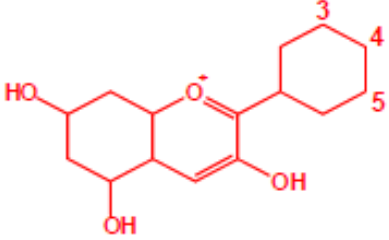
Οι ανθοκυάνες είναι τα χρωμοφόρα μόρια που προσδίδουν στις ερυθρές ποικιλίες και στους παραγόμενους από αυτές οίνους χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα. Στα κύτταρα συνυπάρχουν με άλλα φαινολικά συστατικά, όπως φαινολικά οξέα και φλαβονόλες, τα οποία επιδρούν στο χρώμα τους, μέσω αντιδράσεων που λαμβάνουν 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). Είναι επίσης παρούσες σε μεγάλες ποσότητες στα φύλλα, κυρίως κατά το τέλος της περιόδου ανάπτυξης (Κοτσερίδης, 2005^b). Στις περισσότερες λευκές ποικιλίες, οι ανθοκυάνες απουσιάζουν τελείως (π.χ. Sauvignon blanc, Chardonnay), ενώ σε ορισμένες απαντούν σε ίχνη (π.χ. Pinot blanc, Ugni blanc) (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, 2006). Από τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών ανθοκυανών στους φλοιούς των πιο διαδεδομένων ελληνικών ερυθρών ποικιλιών προέκυψε ότι αυτές κυμαίνονται από 100 mg μέχρι 1.500 mg/Kg ραγών (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Οι ανθοκυάνες είναι γλυκοζίτες των οποίων το άγλυκο μέρος έχει τη δομή του φλαβυλίου. Στα σταφύλια και στους οίνους απαντούν, ανάλογα με την υποκατάσταση του πλευρικού δακτυλίου, πέντε είδη ανθοκυανών (κυανιδίνη, παιονιδίνη, δελφινιδίνη, πετουνιδίνη, μαλβιδίνη). Αυτά τα μόρια είναι πολύ πιο σταθερά υπό μορφή γλυκοζιτών (ανθοκυάνες) από ότι υπό μορφή άγλυκου (ανθοκυανιδίνες). Στις σταφυλές του *Vitis vinifera*, και συνεπώς στους αντίστοιχους οίνους, βρίσκονται

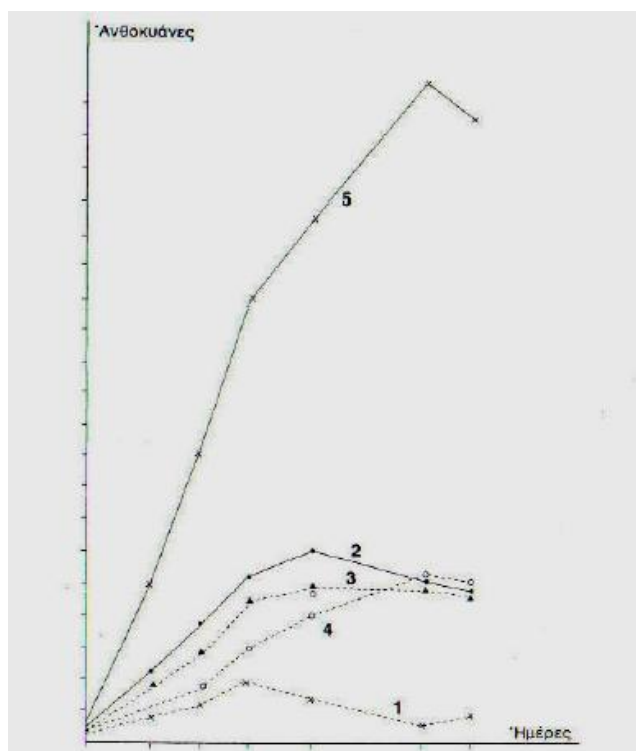
μόνο μονογλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών καθώς και οι ακυλιωμένες τους μορφές, με τα οξέα π-κουμαρικό, καφεϊκό και οξικό (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982).

Πίνακας 3: Οι ανθοκυανιδίνες της σταφυλής

(Πηγή: Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982)

| Βασική ένωση | Βασικός τύπος | Άγλυκο φαινολικό παράγωγο | Θέση πρόσθετων ομάδων | |
|---|---------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|
| | | | -OH | -OCH ₃ |
|  | | Κυανιδίνη | 3 | |
| | | Δελφινιδίνη | 3, 5 | |
| | | Μαλβιδίνη | | 3, 5 |
| | | Πετουνιδίνη | 5 | 3 |
| | | Παιονιδίνη | | 3 |

Το χρώμα των ανθοκυανιδινών εξαρτάται από το pH, το SO₂, τη μοριακή τους δομή, την υποκατάσταση του πλευρικού δακτυλίου, την ένωση με τη γλυκόζη και την ακυλίωσή της. Πράγματι, αφ' ενός η υποκατάσταση του πλευρικού δακτυλίου μετατοπίζει το μέγιστο της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (φαινόμενο βαθυχρωμίας) αφ' ετέρου η ένωση με τη γλυκόζη και η ακυλίωσή της μετατοπίζουν το μέγιστο της απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος (φαινόμενα υψιχρωμίας). Ο σχηματισμός των παραπάνω ενώσεων είναι ένας βασικός παράγοντας διαφοροποίησης του χρώματος των ερυθρών σταφυλιών, αν και όλες οι ποικιλίες περιέχουν βασικά τις ίδιες ανθοκυάνες με μικρές διαφορές στα ποσοστά τους. Πράγματι, μεταξύ των πέντε ανθοκυανών που απαντούν σε όλες τις ποικιλίες, κυριαρχεί ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, σε ποσοστό μόλις 50% (Sangiovese) μέχρι και 90% (Grenache). Μπορούμε, λοιπόν, να θεωρήσουμε ότι ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης αποτελεί τη βάση του χρώματος των ερυθρών σταφυλιών και οίνων. Αντίθετα η ακυλιωμένη μορφή του διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία (Κοτσερίδης, 2005^β).



Διάγραμμα 2: Ενδεικτικό σχήμα των καμπυλών μεταβολής των ανθοκυανών κατά την πορεία ωρίμανσης των σταφυλών από τον περκασμό μέχρι την ωριμότητα. Μονογλυκοζίτες-3 της κυανιδίνης(1), δελφινιδίνης(2), πετουιδίνης(3), παιονιδίνης(4) και μαλβιδίνης(5). (Πηγή: Κουράκου-Δραγώνα, 1998)

2.2.7 Ταννίνες

Οι ταννίνες απαντούν στους φλοιούς (12%), στα γίγαρτα (65%), στους βόστρυχους (22%) και στη σάρκα (μόλις 1%) της σταφυλής. Είναι, εξ' ορισμού, ουσίες που δημιουργούν σταθερούς δεσμούς με πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή, όπως οι πολυσακχαρίτες. Από χημικής άποψης, οι ταννίνες είναι σχετικά ογκώδη μακρομόρια με φαινολικό δακτύλιο, που παράγονται από τον πολυμερισμό στοιχειωδών μακρομορίων με φαινολική ομάδα. Ο μετασχηματισμός τους επηρεάζει την αντίδρασή τους. Μπορούν να παράξουν σταθερούς δεσμούς με πρωτεΐνες όταν είναι αρκετά ογκώδη, αλλά όχι όταν είναι υπερβολικά ογκώδη. Το ενεργό βάρος των ενεργών ταννινών κυμαίνεται από 600 έως 3500 (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume 2, 2006). Σε αυτή τους την ιδιότητα οφείλεται και η στυφή γεύση των οίνων – σχηματισμός ένωσης των ταννινών του οίνου και των πρωτεϊνών της σιέλου. Επίσης, αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων αυτού του εκκρίματος λόγω δέσμευσης της πρωτεϊνικής ομάδας τους, με συνέπεια να φράσσουν οι βλεννογόνοι και να παρεμποδίζεται η εκροή του σάλιου. Έτσι προκαλείται μία αίσθηση ξηρότητας και

τραχύτητας στη γλώσσα και σε όλη τη στοματική κοιλότητα – όπως κατά την κατεργασία των δερμάτων στη βυρσοδεψία (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Ανάλογα με τη φύση της βασικής μονάδας οι ταννίνες διακρίνονται στις συμπυκνωμένες ταννίνες (ταννίνες της κατεχίνης με δομική μονάδα τη φλαβανόλη-3) και στις υδρολυόμενες ταννίνες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες των σταφυλιών και των οίνων είναι πολυμερή, περισσότερο ή λιγότερο πολύπλοκα, των φλαβονολών- ή κατεχινών, και συγκεκριμένα της (+) –κατεχίνης και της (-) –επικατεχίνης (Κοτσερίδης, 2005^b). Οι υδρολυόμενες ταννίνες αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου, κυρίως γλυκόζης, ή ένα μόριο πολυσακχαρίτη, του οποίου πολλά –OH είναι εστεροποιημένα με διάφορα φαινολικά οξέα, από τα οποία τα σημαντικότερα είναι το γαλλικό, το διγαλλικό και το ελλαγικό, γνωστά και ως δεψικά οξέα. Τέτοιες ταννίνες αφθονούν στο ξύλο ορισμένων δένδρων (π.χ. δρυς, καστανιά), στα φύλλα και στους καρπούς τους (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Στα είδη της ευρωπαϊκής βελανιδιάς υπάρχουν τέσσερα μονομερή και τέσσερα διμερή ελλαγικών ταννινών, ενώ στο αμερικάνικο είδος δεν ανιχνεύονται διμερή (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume 2, 2006). Η περιεκτικότητα ενός ερυθρού οίνου σε ταννίνες εξαρτάται από την ποικιλία και τις συνθήκες οινοποίησης και κυμαίνεται μεταξύ των 1-4 g/L. Στην περίπτωση των λευκών οίνων επηρεάζεται από την ένταση της απολάσπωσης και είναι της τάξης των 100 mg/L ή 200-300 mg/L σε μη απολασπωμένα γλεύκη (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume 2, 2006, Κοτσερίδης, 2005).

Θερμαίνοντας τις συμπυκνωμένες ταννίνες σε όξινο περιβάλλον, αυτά τα πολυμερή μετασχηματίζονται κυρίως σε ερυθρή κυανιδίνη. Αυτό εξηγεί το λόγο για τον οποίο αυτά τα συμπλέγματα είναι γνωστά και ως προκυανιδίνες, αντικαθιστώντας τον όρο «λευκοκυανιδίνες». Η ανάλυση αυτών των μακρομορίων είναι ιδιαίτερα περίπλοκη εξαιτίας της μεγάλης διαφοροποίησης στη δομή των ενώσεων, που οφείλεται στο πλήθος των υδροξυλικών ομάδων, στη θέση τους στην νουκλεϊκή ομάδα, στη στερεοχημεία των ασύμμετρων ατόμων άνθρακα στην πυρυλική αλυσίδα και στον αριθμό και τον τύπο των δεσμών μεταξύ των στοιχειωδών μονομερών. Παρά την πρόοδο στην HPLC (liquid chromatography), στη φασματοφωτομετρία μάζας και στο NMR, δεν έχει αναλυθεί η δομή όλων των ταννινών: μόνο οι διμερείς και μερικές τριμερείς προκυανιδίνες έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume 2, 2006).

2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των ανθοκυανών

Κάθε ποικιλία μπορεί να αποδώσει μία μέγιστη συγκέντρωση φαινολικών (φαινολικό δυναμικό), η οποία όμως καθορίζεται και από ένα εύρος παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί είναι οι ακόλουθοι:

1. Έδαφος: Στη συγκέντρωση των φλαβονοειδών επιδρούν φυσικά χαρακτηριστικά του εδάφους όπως η δομή, η σύστασή του αλλά και η ηλικία του. Η κύρια όμως επίδραση του τύπου του εδάφους είναι η ικανότητά του να συγκρατεί νερό επιτρέποντας παράλληλα την καλή στράγγιστη της υγρασίας που περισσεύει (Σταυρακάκης, 2004^b, Downey *et. al.*, 2006). Ακόμα και χημικές ιδιότητες του εδάφους όπως το pH και η γονιμότητα παίζουν ρόλο στη συσσώρευση των ανθοκυανών.
2. Υψόμετρο: Από το υψόμετρο προσδιορίζονται οι θερμικές δυνατότητες του κλίματος μιας περιοχής. Η επίδραση του υψόμετρου είναι ευνοϊκή στις μεσημβρινές περιοχές, αλλά δυσμενής για τις περιοχές που βρίσκονται κοντά στο βόρειο όριο καλλιέργειας της αμπέλου. Σε ερευνητική μελέτη σε δύο ισπανικές ερυθρές ποικιλίας *V. Vinifera*, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των ανθοκυανών, όταν αυξήθηκε το υψόμετρο από τα 150 στα 250 μέτρα πάνω από το επίπεδο της θάλασσας (Downey *et. al.*, 2006).
3. Θερμοκρασία: Είναι δύσκολο να προσδιοριστούν οι επιδράσεις της θερμοκρασίας στη συσσώρευση των ανθοκυανών. Συμπεράσματα όμως μελετών καταγράφουν πως η θερμοκρασία ίσως παίζει το σημαντικότερο ρόλο στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών. Το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας για τη σύνθεση των ανθοκυανών κυμαίνεται από 17°C έως 26°C. Γενικά έως σήμερα, από ερευνητικά δεδομένα προκύπτει ότι πολύ υψηλές και πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, αναστέλλουν την παραγωγή χρωστικών ουσιών (Jackson and Lombard, 1993). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι χαμηλές νυκτερινές θερμοκρασίες (15-20°C) συμβάλλουν περισσότερο στο χρωματισμό των σταφυλιών. Οι Yamame *et. al.*, 2006 αναφέρουν ότι οι ράγες που θερμάνθηκαν στους 20°C για 2 εβδομάδες – από την πρώτη μέχρι την τρίτη εβδομάδα μετά την έναρξη του χρωματισμού των φλοιών τους- παρουσίασαν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ανθοκυανές.

4. Ηλιακή ακτινοβολία: Η επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας πολλών ερευνητικών εργασιών. Οι Cortell and Kennedy (2006) παρατήρησαν ότι στους βότρυνες με σκίαση η συγκέντρωση των ανθοκυανών ήταν περίπου 30% λιγότερη από αυτή των μη σκιαζόμενων. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση στην ίδια εργασία είναι ότι ο μονογλυκοζίτης-3 της παιονιδίνης είχε αντίθετη συμπεριφορά από τις υπόλοιπες ανθοκυάνες και στις σκιαζόμενες ράγες η συγκέντρωσή του ήταν διπλάσια. Επίσης, από την ερευνητική μελέτη των Dokoozlian and Kliewer (1996) για τις ποικιλίες Cabernet Sauvignon και Pinot noir, φαίνεται ότι η έκθεση των ραγών σε ηλιακή ακτινοβολία στα στάδια I και II της ανάπτυξής τους είναι απαραίτητη για τη μέγιστη παραγωγή χρωστικών. Αν και η βιοσύνθεσή τους ξεκινά στο στάδιο III της ανάπτυξης των ραγών, όταν οι ράγες εκτίθενται από το πρώτο στάδιο μέχρι και το τελευταίο παρατηρείται η μέγιστη συσσώρευση ανθοκυανών. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση ή η δραστηριότητα ενός ή μερικών ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των ανθοκυανών.

5. Κλάδεμα: ξεκινώντας από το σύστημα μόρφωσης, το σχήμα που δίνεται στα πρέμνα, αξιοποιεί κατά το καλύτερο δυνατό τρόπο κάποια φυσικά χαρακτηριστικά του φυλλώματος (γεωμετρικό σχήμα, ύψος και κατεύθυνση), τα οποία επηρεάζουν σημαντικά τη δημιουργία επιθυμητού μικροκλίματος εντός του φυλλώματος και στο επίπεδο των ραγών (Σταυρακάκης, 2004^α). Τα νεότερα σχήματα μόρφωσης όπου το φυλλικό τοίχος είναι διαιρούμενο (π.χ. Geneva Double Curtain, Lyre) σχεδιάστηκαν για τη βελτίωση του μικροκλίματος και σε περιπτώσεις ερυθρών ποικιλιών παρατηρήθηκε αύξηση των ανθοκυανών (Jackson, 2008). Επίσης, με το κατάλληλο χειμερινό κλάδεμα καρποφορίας επιτυγχάνεται η ισορροπία βλάστησης προς καρποφορίας με αποτέλεσμα την παραγωγή αμπελουργικού προϊόντος ποιότητας. Για παράδειγμα, σε περιπτώσεις πολύ ζωηρών ποικιλιών – ανάλογα και το υποκείμενο – με τη σωστή επιλογή χειμερινού κλαδέματος (μόρφωσης και καρποφορίας) μειώνεται έως ένα όριο η ζωηρότητα των πρέμων, ώστε να μην αποβαίνει σε βάρος της ποιότητας του φορτίου και γενικά στην ευρωστία του. Γενικά με τα χλωρά κλαδέματα (κορφολόγημα, βλαστολόγημα, ξεφύλλισμα και αραιώμα φορτίου, χαραγή) επιδιώκεται η βελτιστοποίηση της παραγωγής ποιοτικά. Πιο συγκεκριμένα, το ξεφύλλισμα αποσκοπεί κυρίως στη βελτίωση των χαρακτήρων ποιότητας των

ραγών και ιδιαιτέρως του χρώματός τους, αφού η εφαρμογή του συμβάλλει στην καλύτερη έκθεση των ραγών στο φως.

6. Εφαρμογή φυτορρυθμιστικών ουσιών: Η επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών όπως το αμπισικό οξύ, το αιθυλένιο, οι κυτοκινίνες, οι γιββερελλίνες και οι αυξίνες θεωρείται ένας ακόμη παράγοντας επιρροής της βιοσύνθεσης των φαινολικών συστατικών. Σε πρέμνα της ποικιλίας Cabernet Sauvignon το αμπισικό οξύ αύξησε τη συγκέντρωση των ανθοκυανών, ενώ η εφαρμογή γιββερελλινών (GA₃) σε ράγες φαίνεται να μειώνει την περιεκτικότητά τους. Επίσης, οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες έχουν θετική επίδραση στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών και η εξωγενής εφαρμογή αιθυλενίου ενίσχυσε το χρώμα τους φλοιούς ραγών (Downey *et. al.*, 2006).
7. Λίπανση: Με τη λίπανση εμπλουτίζουμε το έδαφος με θρεπτικά στοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξη και παραγωγή των πρέμνων. Η υπερβολική λίπανση με άζωτο (N) και κάλιο (K) θα οδηγήσει σε μειωμένη συγκέντρωση ανθοκυανών, επειδή θα αυξηθεί η ζοηρότητα του πρέμνου και κατά συνέπεια θα επηρεαστεί η ισορροπία βλάστησης προς καρποφορίας και έμμεσα το μικροκλίμα εξαιτίας των ζοηρών (μεγάλου μήκους) βλαστών (Jackson and Lombard, 1993).
8. Άρδευση: Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το υδατικό έλλειμμα αυξάνει στις ράγες την περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες (Downey *et. al.*, 2006). Η επίδραση της έλλειψης νερού έχει αντίκτυπο στο μέγεθος των ραγών (μείωση) και έτσι αλλάζει η αναλογία βάρους φλοιού της ράγας προς ολικό βάρος ράγας με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα των ανθοκυανών και ταννινών στις ράγες. Το πολύπλοκο με τις επεμβάσεις υδατικού στρες είναι ότι κύριες λειτουργίες του πρέμνου όπως και κάθε φυτού είναι αδύνατες χωρίς την απαραίτητη ποσότητα νερού. Έτσι το πρέμνο αντιδρώντας στην έλλειψη νερού μειώνει τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα κλείνοντας τα στομάτια, με συνέπεια πιθανόν τη μείωση της συσσώρευσης των μεταβολιτών (υδατάνθρακες) και τέλος τη μειωμένη ανάπτυξη των βλαστών και του ριζικού συστήματος.

3. Το κάλιο

Η ικανότητα του εδάφους να παρέχει θρεπτικά στοιχεία στα φυτά συνεχώς και επαρκώς με όλα τα απαραίτητα στοιχεία και τις χημικές ενώσεις, προκειμένου να εξασφαλίζεται ικανοποιητική γεωργική απόδοση, ποσοτική και ποιοτική, ονομάζεται γονιμότητα του εδάφους. Η έννοια της γονιμότητας του εδάφους έχει περισσότερο συνδεθεί με την παροχή στοιχείων, ενώ ο όρος παραγωγική ικανότητα χρησιμοποιείται για να αντιπροσωπεύσει τη δυναμικότητα ενός τόπου συμπεριλαμβάνοντας και τα μέσα παραγωγής. Η γονιμότητα διακρίνεται στην πραγματική και τη δυνητική γονιμότητα. Η πραγματική (ή φυσική) γονιμότητα περιλαμβάνει την υπάρχουσα παραγωγική ικανότητα ενός εδάφους, ενώ η δυνητική γονιμότητα αναφέρεται στην παραγωγικότητα ενός εδάφους, η οποία μπορεί να επιτευχθεί όταν όλοι οι συντελεστές παραγωγής επιδρούν κατά τον καλύτερο δυνατό τρόπο (Καλύβας, 2009).

Η σύσταση των φυτών είναι κατά μέσο όρο 80% νερό και 20% ξηρή ουσία (dry matter). Η ξηρή ύλη αποτελείται από 78% υδατάνθρακες, 12% πρωτεΐνες, 4% λίπη και 6% τέφρα. Η τέφρα αποτελείται από 1% ιχνοστοιχεία (Fe, B, Zn, Mn, Cu, Mo, Cl), 1% νάτριο, 4% θείο, 4% μαγνήσιο, 5% ασβέστιο, 5% φώσφορο, 7% πυρίτιο, 7% χλώριο, 24% οξυγόνο και 42% κάλιο. Από τα στοιχεία του εδάφους, εκείνα που χρησιμοποιούνται από τα φυτά σε σημαντικά ποσά και παρουσιάζουν ιδιαίτερη σημασία (μακροστοιχεία) είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P), το κάλιο (K), το ασβέστιο (Ca), το μαγνήσιο (Mg) και το θείο (S). Εξ' αυτών το κάλιο, το ασβέστιο και το μαγνήσιο προσλαμβάνονται ως κατιόντα (K^+ , Ca^{++} , Mg^{++}), ο φώσφορος και το θείο ως ανιόντα (HPO_4^{--} ή H_2PO_4 και SO_3^{--} ή SO_4^{--}) και το άζωτο προσλαμβάνεται τόσο ως νιτρικό ανιόν (NO_3^-) όσο και ως αμμωνιακό κατιόν (NH_4^+), σε μικρά ποσά ως νιτρώδες (NO_2^-) (Τσιτσίας, 2002).

Η απορρόφηση των στοιχείων από τα φυτά εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ιόντων στο εδαφικό διάλυμα, το είδος του φυτού, την επιφάνεια των ριζών (όγκος και έκταση ριζικού συστήματος) και την ηλικία των ιστών, δεδομένου ότι νεότεροι ιστοί είναι περισσότερο ενεργοί. Όταν οι ποσότητες ενός συγκεκριμένου στοιχείου μειωθούν σημαντικά, τότε το στοιχείο αυτό βρίσκεται σε έλλειψη και δρα ως περιοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των φυτών. Προς αντιμετώπιση του φαινομένου απαιτείται ο τεχνητός εμπλουτισμός του εδάφους με αυτό το στοιχείο

μέσω της προσθήκης λιπασμάτων (Καλύβας, 2009), καθώς τα λιπάσματα, εξ' ορισμού είναι προϊόντα που βελτιώνουν τα επίπεδα των διαθέσιμων θρεπτικών στοιχείων του φυτού και/ή των χημικών και φυσικών ικανοτήτων του εδάφους, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο άμεσα ή έμμεσα την ανάπτυξη, την παραγωγή και την ποιότητα του φυτού (Ullmann's Agrochemicals, 2007).

Μερικά από τα σημαντικότερα καλιούχα λιπάσματα, καθώς και η περιεκτικότητα του καθενός σε κάλιο είναι τα ακόλουθα (Καλύβας, 2009):

- Χλωριούχο κάλιο, KCl (47% - 48% κάλιο)
- Νιτρικό κάλιο, KNO₃ (44% κάλιο)
- Θεικό κάλιο, K₂SO₄ – Θεικό μαγνήσιο, MgSO₄ (18% κάλιο – 11% μαγνήσιο)
- Μεταφωσφορικό κάλιο, KPO₃ (33% κάλιο)
- Ανθρακικό κάλιο, K₂CO₃ (52% - 63% κάλιο)
- Καϊνίτης (42% - 44% κάλιο)

3.1 Το κάλιο στο έδαφος

Η ποσότητα του ολικού καλίου στο έδαφος δεν μας παρέχει καμία ένδειξη για το διαθέσιμο κάλιο στα φυτά. Αν εξαιρέσουμε το κάλιο που προστίθεται με τα λιπάσματα, ο εφοδιασμός του εδάφους σε κάλιο γίνεται από την αποσάθρωση των καλιούχων ορυκτών. Το κάλιο υφίσταται είτε σε μορφές άμεσα αφομοιώσιμες από τα φυτά (άλατα καλίου στο εδαφικό διάλυμα, ανταλλάξιμο K⁺) και σε μορφές μη αφομοιώσιμες από τα φυτά (πρωτογενή και δευτερογενή ορυκτά) (Τσιτσιάς, 2002).

Η δέσμευση ή απελευθέρωση του καλίου από τα ορυκτά της αργίλου επηρεάζεται από τις παρακάτω εδαφικές συνθήκες:

1. Τύπος του ορυκτού της αργίλου

Τα ορυκτά της αργίλου δεσμεύουν K⁺ στις εσωτερικές επιφάνειες που βρίσκονται ανάμεσα στις συνεχόμενες κρυσταλλικές στοιβάδες. Η οργανική ουσία του εδάφους έχει ικανότητα συγκράτησης ιόντων K⁺ σε ανταλλάξιμη μορφή και όχι υπό μορφή δεσμευμένου καλίου.

2. Εναλλαγή με ύγρανση και ξήρανση

Ένα υγρό έδαφος στις φυσικές συνθήκες (που περιέχει άργιλο και λίγο ή μέτρια λίγο ανταλλάξιμο K⁺), όταν ξηραίνεται εμφανίζει ότι περιέχει περισσότερο

ανταλλάξιμο K^+ από ότι πριν την ξήρανση. Αν όμως αρχικά περιείχε πολύ ανταλλάξιμο K^+ , με την ξήρανση, μέρος αυτού δεσμεύεται από τα ορυκτά της αργίλου.

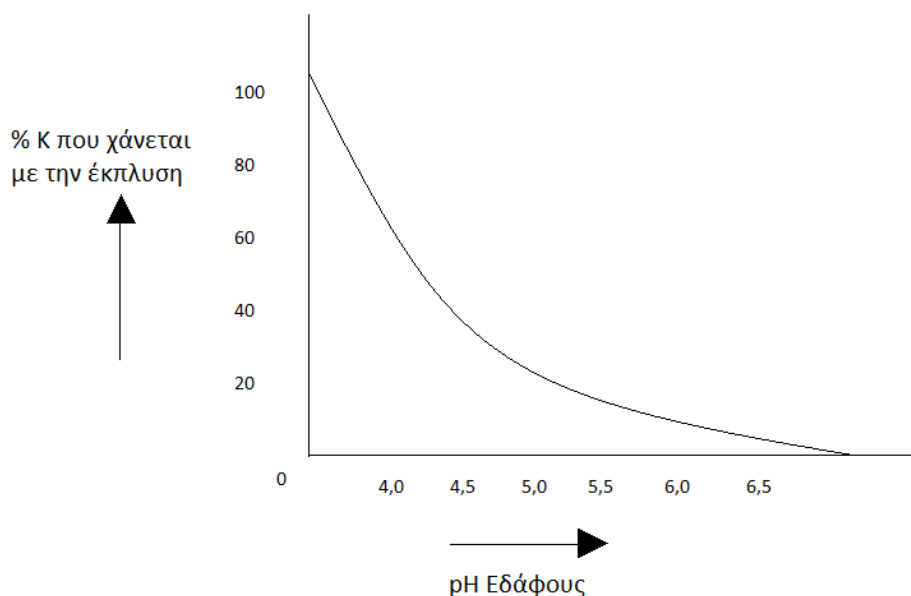
3. Αύξηση της θερμοκρασίας

Η αύξηση της θερμοκρασίας φαίνεται να προκαλεί απελευθέρωση δεσμευμένου καλίου, χωρίς όμως να έχει εξακριβωθεί εάν το φαινόμενο αυτό έχει πρακτική σημασία. Η πήξη και στη συνέχεια η τήξη του εδαφικού νερού που επαναλαμβάνεται πολλές φορές, τείνει να κομματιάζει τα ορυκτά της αργίλου σε ορισμένα εδάφη και επομένως συντελεί στην απελευθέρωση του δεσμευμένου καλίου.

4. Αντίδραση του εδάφους

Όταν αυξάνεται το pH του εδάφους αυξάνεται και η δέσμευση του καλίου. Επομένως, εδάφη που έχουν υψηλό pH, χάνουν με την έκπλυση λιγότερο K^+ , σε σύγκριση με τα ίδια εδάφη με χαμηλό pH. Αντίθετα, σε όξινα εδάφη το K^+ δεν αντικαθιστά με ευχέρεια τα προσροφημένα H^+ και έτσι έχουμε έκπλυση καλίου.

(Τσιτσιάς, 2002)



Διάγραμμα 3: Απώλειες εδαφικού K σε συνάρτηση με το pH του εδάφους

(Πηγή: Τσιτσιάς, 1998)

3.2 Το κάλιο στην άμπελο

Το κάλιο αποτελεί περίπου το 3% του ξηρού βάρους των κληματίδων, ενώ αποτελεί σημαντικό συστατικό του χυμού του σταφυλιού. Σε κάθε τόνο σταφυλιού υπάρχουν περίπου 5kg καλίου. Είναι το μόνο μακροστοιχείο που δεν είναι δομικό συστατικό, δηλαδή δεν διεισδύει στα δομικά μόρια των κυττάρων των φυτικών ιστών. Συγκεκριμένα:

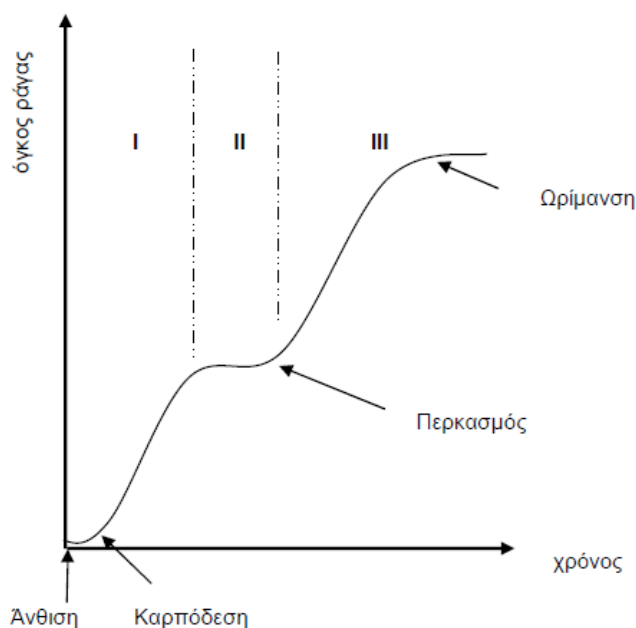
- Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως ρυθμιστικός παράγοντας στην ιοντική ισορροπία των κυττάρων - στο άνοιγμα και στο κλείσιμο των στοματίων,
- Ενεργοποιεί πολλά ένζυμα του μεταβολισμού των υδατανθράκων (αυξάνοντας τα αποθέματα κορμού και κληματίδων σε υδατάνθρακες),
- Επιδρά στη σύνθεση των πρωτεϊνών και στη σύνθεση και μετακίνηση των σακχάρων,
- Βελτιώνει τη γονιμότητα των οφθαλμών της αμπέλου που εκφράζεται με τον αριθμό των ανθικών καταβολών ανά οφθαλμό,
- Αυξάνει την καρπόδεση των ανθοταξιών
- Ευνοεί την αύξηση του μεγέθους των ραγών και επιταχύνει την έναρξη της ωρίμανσης,
- Αυξάνει την περιεκτικότητα των σταφυλιών σε διάφορες φαινολικές ουσίες που βελτιώνουν το χρώμα των παραγόμενων οίνων,
- Εξουδετερώνει τα οργανικά οξέα
- Παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της οξύτητας και του pH του γλεύκους και του οίνου (Καλύβας, 2009).

Οι απαιτήσεις σε κάλιο ανέρχονται ετησίως σε 13-18 kg K₂O ανά στρέμμα για την παραγωγή 1500 kg/στρέμμα σταφυλιού. Το μεγαλύτερο ποσό απορροφάται 2-3 εβδομάδες αμέσως μετά την άνθηση και από την έναρξη της ωρίμανσης μέχρι το τέλος της (Καλύβας, 2009).

3.3 Το κάλιο στη ράγα

Η κατεύθυνση της κίνησης του καλίου εντός του πρέμνου, όπως και σε όλα τα φυτά, είναι πιο έντονη προς τους αναπτυσσόμενους ιστούς και συχνά γίνεται μεταφορά του μέσω του ηθμού από τα γηραιότερα όργανα προς τα νεότερα όπως είναι οι καρποί (ράγες) και τα νεαρά φύλλα (Mpelasoka *et. al.*, 2003).

Η ανάπτυξη των ραγών ακολουθεί μία διπλή σιγμοειδή καμπύλη, όπου διακρίνονται δύο φάσεις γρήγορης αύξησης της ράγας (Φάσεις I και III) που διακόπτονται από μία φάση όπου σχεδόν δεν υπάρχει αύξηση του μεγέθους της ράγας (Φάση II). Η πρώτη φάση γρήγορης αύξησης της ράγας οφείλεται κυρίως στην έντονη κυτταροδιαίρεση και δευτερευόντως σε αύξηση του μεγέθους των κυττάρων της. Κατά τη δεύτερη φάση γρήγορης αύξησης, η αύξηση του μεγέθους των ραγών οφείλεται σε συσσώρευση διαλυτών και κυρίως σακχάρων. Η εκκίνηση της φάσης αυτής συμπίπτει με την έναρξη της ωρίμανσης των ραγών (περκασμός) και χαρακτηρίζεται από μαλάκωμα των ραγών, αλλαγές στο χρώμα, αλλά και σημαντικές αλλαγές στη σύνθεσή τους (συσσώρευση σακχάρων και μείωση των οξέων). Παρατηρείται επίσης μία μεγάλη αύξηση στη συγκέντρωση του καλίου κυρίως στο φλοιό της ράγας (P. Ribéreau-Gayon *et. al.*, Volume 1, 2006). 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).



Διάγραμμα 4: Στάδια ανάπτυξης της ράγας κατά τη διάρκεια των σταδίων ανάπτυξής της

(Πηγή: Handbook of Enology, Volume 1, 2006, σελ.244)

Η συγκέντρωση του καλίου στα γίγαρτα εμφανίζεται ελαφρώς μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του καλίου στο μεσοκάρπιο, ενώ πολλαπλάσια συγκέντρωση καλίου παρουσιάζεται στο φλοιό της ράγας. Επίσης, η συγκέντρωση του καλίου στους

διάφορους ιστούς της ράγας διαφέρει ανά ποικιλία και ανά συνδυασμό ποικιλίας-υποκειμένου. Οι διαφορές αυτές ενδεχομένως να οφείλονται στη διαφορετική δομή των κυττάρων ή στο διαφορετικό ρόλο του καλίου σε κάθε έναν από τους ιστούς (Mpelasoka *et. al.*, 2003).

3.4 Έλλειψη ή περίσσεια καλίου στην άμπελο

Ένας γενικός κανόνας ισχύει για το κάλιο: σωστή ποσότητα καλίου στο αμπέλι θεωρείται απαραίτητη για σωστή παραγωγή τόσο ως προς την ποσότητα όσο και ως προς την ποιότητα (Καλύβας, 2009). Ιδιαίτερα όμως σε θερμά και ξηρά κλίματα πρέπει να αποφεύγεται αυστηρά η υπερβολική και πέραν της απαιτούμενης ποσότητας καλίου στο έδαφος, επειδή προκαλεί μείωση του χρώματος των ραγών (Moris *et. al.*, 1987), συνοδευόμενη από αύξηση της τιμής του pH και κατά συνέπεια υποβάθμιση της ποιότητας του παραγόμενου οίνου (Freeman *et. al.*, 1983). Αναλυτικά η έλλειψη ή η περίσσεια καλίου συνδέονται με τα εξής αποτελέσματα:

- Έλλειψη καλίου προκαλεί κιτρίνισμα των φύλλων, το οποίο επεκτείνεται προς το εσωτερικό, ενώ στις ερυθρές ποικιλίες τα φύλλα εμφανίζουν στις άκρες αρχικά κόκκινο αντί για κίτρινο χρώμα. Επίσης, εμφανίζονται μικρά τσαμπιά χωρίς χυμούς και ανομοιόμορφη ωρίμανση των ραγών. Σταφύλια από κλήματα με έλλειψη καλίου στερούνται χρώματος, ενώ έχουν μειωμένα σάκχαρα. Φτωχά χρώματα παρατηρούνται και σε υψηλά επίπεδα καλίου στο γλεύκος (λόγω της μετατόπισης της χημικής ισορροπίας των χρωστικών συστατικών, επειδή εμφανίζονται υψηλά pH) (Καλύβας, 2009).
- Ανεπάρκεια καλίου θεωρείται ότι προκαλεί αυξημένες συγκεντρώσεις συστατικών κυττάρων μικρού μοριακού βάρους και μείωση σε συστατικά μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι πρωτεΐνες και η κυτταρίνη, τα οποία όμως είναι υπεύθυνα για την οργάνωση και τη δομική ακεραιότητα των κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία του αμπελιού απέναντι σε μύκητες και βακτήρια, ενώ τέτοιες ασθενείς ή τρύπιες κυτταρικές μεμβράνες στις ράγες λόγω έλλειψης καλίου είναι πιθανόν να επιτρέπουν τη γρήγορη δίοδο και την εξάτμιση συστατικών των αρωμάτων (Καλύβας, 2009).
- Πολύ αυξημένες ποσότητες καλίου, ιδίως κατά την ωρίμανση των σταφυλιών, μπορεί να προκαλέσουν αύξηση του pH στο γλεύκος, όπως και στον οίνο, λόγω δέσμευσης των οργανικών οξέων από το κάλιο για παραγωγή τρυγικού καλίου (Καλύβας, 2009). 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 (Hale, 1977). Επίσης, μπορεί να προκαλέσουν αύξηση του μηλικού οξέος, αν και κατά την παραγωγή οίνου το μηλικό μπορεί να ελαττωθεί σε αντίθεση με το pH που μπορεί να αυξηθεί ακόμη περισσότερο (Καλύβας, 2009).

- Υψηλά ποσοστά καλίου σε λευκές ποικιλίες θεωρούνται ανεπιθύμητα, επειδή υπερωριμάζουν και χάνουν απότομα τα οξέα και τη φρουτώδη γεύση τους. Αντίθετα, στις ερυθρές ποικιλίες η ύπαρξη αρκετών ποσοτήτων διαθέσιμου καλίου στο έδαφος βελτιώνει σημαντικά την πρώτη ύλη, ενώ η ωφέλιμη ενέργεια του καλίου φαίνεται ότι υπάρχει και στο στάδιο της ωρίμανσης κόκκινων οίνων στο βαρέλι (Καλύβας, 2009). Επομένως, τα επίπεδα καλίου ενδιαφέρουν περισσότερο στις ερυθρές ποικιλίες σε σχέση με τις λευκές, καθώς κατά την ερυθρή οινοποίηση 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).
- Υψηλές ποσότητες καλίου στο έδαφος θεωρούνται ιδιαίτερα ανεπιθύμητες σε ζεστές και ξηρές κλιματικές συνθήκες εξαιτίας των επιδράσεων που είναι δυνατόν να υπάρξουν στο pH του οίνου. Αυτό συμβαίνει επειδή οι ποσότητες του καλίου που συγκεντρώνονται στο αμπέλι ανά μονάδα φωτοσυνθετικώς παραγόμενων σακχάρων τείνουν να αυξάνονται όσο αυξάνεται το έλλειμμα εδαφικής υγρασίας. Αφού, μάλιστα και το κάλιο και τα σάκχαρα μετακινούνται γρήγορα στις ράγες που ωριμάζουν, το αποτέλεσμα είναι η αύξηση του καλίου στο μούστο και στον οίνο (Καλύβας, 2009).
- Τέλος, μεγάλες ποσότητες καλίου στις ράγες σε ζεστά κλίματα, όπου τα επίπεδα των οξέων στην πλήρη ωρίμανση είναι ήδη χαμηλά, προκαλούν και κινδύνους οξειδωσης του οίνου και μικροβιακής αλλοίωσης (Καλύβας, 2009).

4. Αγιωργίτικο



Οι αναλύσεις έγιναν σε ράγες και σε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων των ραγών του τρύγου 2010 της ποικιλίας Αγιωργίτικο. Το Αγιωργίτικο είναι από τις ευγενέστερες ερυθρές ελληνικές ποικιλίες και καλλιεργείται εδώ και πολλά χρόνια στην περιοχή της Νεμέας, αν και η καλλιέργειά της συνιστάται και για το αμπελουργικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου, για της Ν.Α. Αττικής, Πειραιώς, τους νομούς Αιτωλοακαρνανίας, Βοιωτίας και Εύβοιας και επιτρέπεται στους νομούς Δράμας, Πέλλας, Πιερίας και Φλώρινας (Σταυρακάκης. 2010).

Εικόνα 6: Η ποικιλία *Vitis vinifera* «Αγιωργίτικο»

(Πηγή: <http://www.antemisaridis.gr/product.aspx?iid=11515>)

4.1 Αμπελογραφικοί χαρακτήρες και φαινολογικά στάδια

Όπως αναφέρει ο κ. Σταυρακάκης (2010), το Αγιωργίτικο έχει κορυφή νεαρής βλάστησης μετρίως ανοιχτή έως ανοιχτή, κιτρινοπράσινη, χνοώδης, κατά τόπους βαμβακώδης, με ρόδινη παρυφή. Τα νεαρά φύλλα είναι πράσινα, χνοώδη-βαμβακώδη στην κάτω επιφάνεια, στιλπνά, με μικρές ροδόχρωες και ορειχάλκινες περιοχές, μεταξωτή στην άνω επιφάνεια του ελάσματος, ενώ τα ανεπτυγμένα φύλλα είναι μέτρια έως μεγάλα, σφηνοειδή και πεντάκολπα.

Ο ποδίσκος είναι βραχύς έως μέτριος που κατά κανόνα ξυλοποιείται πλήρως και αποκόπτεται δυσχερώς. Ο πώδης βλαστός είναι οριζόντιος, αραχνοϋφής, πράσινος έως κιτρινοπράσινος στην κοιλιακή πλευρά, πράσινος με ερυθρές ραβδώσεις στη νωτιαία πλευρά. Οι κόμβοι είναι αραχνοϋφείς και ερυθροί με πράσινα στίγματα. Οι

οφθαλμοί είναι πράσινοι με ερυθρές περιοχές. Η κληματίδα είναι ερυθροκαστανή έως ερυθροϊώδης με φακίδια, κυκλικής έως ελλειψοειδούς τομής, γωνιώδης και λεία. Το έλασμα είναι κυματώδες, ελαφρώς πομφολυγώδες, παχύ, με αναδιπλώσεις κατά μήκος των κύριων νευρώσεων, βαθυπράσινο και λείο στην άνω επιφάνεια, φαιοπράσινο και χνοώδες στην κάτω επιφάνεια. Ο μισχικός κόλπος είναι κλειστός, σχήματος V και έχει επικαλυπτόμενους λοβούς. Οι κατώτεροι κόλποι είναι βαθείς, με συγκλίνοντα χείλη, σχήματος U ή V. Οι νευρώσεις είναι κιτρινοπράσινες και χνοώδεις στην κάτω επιφάνεια του ελάσματος, ενώ οι οδόντες θεωρούνται μέτριοι έως μεγάλοι, με τις πλευρές σχεδόν ευθείες. Ο μίσχος είναι μέτριου μήκους και πάχους, πράσινος με ερυθροϊώδεις ραβδώσεις, χνοώδης και διαθέτει αραιά όρθια τριχίδια. Οι έλικες είναι διαλείπουσες, λείες, πράσινες, δισχιδείς και πολυσχιδείς, μέτριου έως μεγάλου μήκους (Σταυρακάκης, 2010).

Η σταφυλή είναι μέτρια, κωνική ή κυλινδροκωνική, συχνά διπλή, πυκνή έως πολύ πυκνή. Η ράγα θεωρείται μικρή έως μέτρια, σφαιρική και ενίοτε ωοειδής. Ο φλοιός είναι μετρίως παχύς έως παχύς, μετρίως ανθεκτικός, κυανομέλας, πλούσιος σε ανθοκυάνες και καλυμμένος με άφθονη ανθηρότητα. Η σάρκα είναι χυμώδης, γλυκιά έως ελαφρώς υπόξινη και μετρίως μαλακή. Τα γίγαρτα είναι συνήθως δύο ανά ράγα (2-3), μέτρια, απιοειδή και με παχύ ράμφος (Σταυρακάκης, 2010).

Η έναρξη βλάστησης συντελείται στα του 3^{ου} δεκαήμερου του Μαρτίου και η πλήρης βλάστηση στις αρχές του 3^{ου} δεκαήμερου του Απριλίου. Η έναρξη της άνθησης μέχρι την πλήρη άνθηση λαμβάνει χώρα το 2^ο δεκαήμερο του Μαΐου, η έναρξη ωρίμανσης στα τέλη του 3^{ου} δεκαήμερου του Ιουλίου και η πλήρης ωρίμανση το 3^ο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου (μερικές φορές και νωρίτερα) (Σταυρακάκης, 2010).

4.2 Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά

Πρόκειται για μία ποικιλία μετρίως ζωνρή έως ζωνρή, εύρωστη, όψιμης ωρίμανσης και πολύ παραγωγική. Στο Αγιωργίτικο ο τυφλός οφθαλμός είναι γόνιμος και ο καρποφόρος βλαστός φέρει δύο σταφυλές-συνήθως στον 4^ο και 5^ο κόμβο, συχνά όμως εμφανίζονται 3-4 σταφυλές από τον 2^ο έως τον 6^ο κόμβο (Σταυρακάκης, 2010).

Στους παλαιούς αμπελώνες η ποικιλία μορφώνεται σε κύπελλο, με 3-5 βραχίονες και δέχεται κλάδεμα βραχύ (παραγωγική μονάδα με δύο οφθαλμούς), ενώ στους νέους αμπελώνες τα πρέμνα μορφώνονται σε γραμμικά σχήματα (συνήθως σε αμφίπλευρο Royat με 6-8 βραχίονες) και το κλάδεμα καρποφορίας είναι βραχύ (μία κεφαλή με 1-2 οφθαλμούς ανά βραχίονα) (Σταυρακάκης, 2010).

Η ποικιλία Αγιωργίτικο καλλιεργείται σε διαφόρων ειδών εδάφη, αργιλώδη, αργιλοπηλώδη, αμμοαργιλώδη, μαργώδη, σχιστολιθικά, όπως είναι τα περισσότερα εδάφη της αμπελοοικονομικής ζώνης της Νεμέας. Υψηλής ποιότητας αμπελοοικονομικά προϊόντα δίνει σε λοφώδεις περιοχές (υψόμετρο άνω των 300μ.), σε χαλκώδη, μέσης σύστασης, γόνιμα εδάφη, στις οποίες η ευρωστία των πρέμνων είναι κανονική και η πορεία της θερμοκρασίας συμβάλλει στην ωρίμανση του φορτίου με βραδύ ρυθμό, συνθήκες που ευνοούν την απόκτηση βαθμού τεχνολογικής ωριμότητας ανάλογα με τον τύπο του οίνου (Σταυρακάκης, 2010).

Παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στο οίδιο και τις ιώσεις, κυρίως στον μολυσματικό εκφυλισμό και μέτρια ευαισθησία στον περονόσπορο. Είναι επίσης ευαίσθητη στην ξηρασία και στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα και τον ανοιξιάτικο παγετό. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στην άρδευση, ώστε να αποφευχθεί η έντονη υδατική καταπόνηση αλλά να διατηρηθούν τα πρέμνα σε κατάσταση πολύ ήπιας καταπόνησης, η οποία συμβάλλει στη βελτίωση των φυσιολογικών λειτουργιών. Ανάλογη προσοχή απαιτείται σε αμπελώνες με βαριά, αργιλώδη, συνεκτικά εδάφη, ώστε με τους κατάλληλους χειρισμούς να αμβλυνθούν οι αρνητικές επιπτώσεις από την υπερβολική υγρασία. Την άνοιξη, σε πρέμνα υψηλής ζωηρότητας, παρατηρούνται προβλήματα στην άνθηση, τη γονιμοποίηση και την καρπόδεση, με αποτέλεσμα τη μικρορραγία και την παρουσία μικρών, πράσινων, αγίγαρτων ραγών. Τα προβλήματα αυτά εντείνονται όταν παρατηρείται σημαντική αυξομείωση της θερμοκρασίας, αλλά πιθανόν να συνδέονται με την τροφοπενία μολυβδαίνιου (Σταυρακάκης, 2010).

5. Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Το πείραμα

Ο σκοπός του πειράματος ήταν να συμπληρώσει τη βιβλιογραφία όσον αφορά στην επίδραση του καλίου στα φαινολικά συστατικά, καθώς το εν λόγω απαιτεί ενδελεχή έρευνα και ανάλυση. Επίσης, η ελληνική ποικιλία Αγιωργίτικο δεν είχε διερευνηθεί μέχρι στιγμής ως προς την επίδραση της λίπανσης καλίου στα φαινολικά του συστατικά. Τα αποτελέσματα της έρευνας είχαν ως σκοπό να επαληθεύσουν την αρχική υπόθεση ότι η λίπανση καλίου που λειτουργεί θετικά στα φαινολικά συστατικά του Αγιωργίτικου θα αποδεικνυόταν μία ενδιάμεση συγκέντρωση. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκαν 6 επεμβάσεις λίπανσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις καλίου, αλλά και τύπους λιπάσματος καλίου. Επίσης, σκοπός ήταν να διερευνηθεί και η συνδυαστική δράση μαγνησίου-καλίου.

Ο αμπελώνας που εξελέχθηκε το πείραμα βρίσκεται στον Ασπρόκαμπο 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 τρεις 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 (νιτροθεϊκή 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 θεϊκό κάλιο (50% K₂O , 18% S) και ένα λίπασμα με υψηλή περιεκτικότητα σε K, Mg και S (30% K₂O, 10% MgO, 17% S).

Πίνακας 4: Οι επεμβάσεις της καλιούχου λίπανσης σε Kg / ha

| Επεμβάσεις | ΛΙΠΑΣΜΑ | N | P ₂ O ₅ | K ₂ O | MgO |
|------------|--------------------------------|----------|-------------------------------|------------------|----------|
| A | N:P (Μάρτυρας) | 80 Kg/ha | 40 Kg/ha | - | - |
| B | N:P:K (Χλωριούχο Κάλιο) | 80 Kg/ha | 40 Kg/ha | 80 Kg/ha | - |
| Γ | N:P:K(Χλωριούχο Κάλιο) | 80 Kg/ha | 40 Kg/ha | 160 Kg/ha | - |
| Δ | N:P:K (Θεϊκό Κάλιο) | 80 Kg/ha | 40 Kg/ha | 80 Kg/ha | - |
| E | N:P:K (Θεϊκό Κάλιο) | 80 Kg/ha | 40 Kg/ha | 160 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 5: Οι επεμβάσεις της καλιούχου λίπανσης σε g ανά πρέμνο

| Επεμβάσεις | ΛΙΠΑΣΜΑ | N | P ₂ O ₅ | K ₂ O | MgO |
|------------|--------------------------------|------|-------------------------------|------------------|-----|
| A | N:P (Μάρτυρας) | 88 g | 25 g | - | - |
| B | N:P:K (Χλωριούχο Κάλιο) | 88 g | 25 g | 46 g | - |

| | | | | | |
|----------|-------------------------------|------|------|-------|---|
| Γ | N:P:K(Χλωριούχο Κάλιο) | 88 g | 25 g | 92 g | - |
| Δ | N:P:K (Θειικό Κάλιο) | 88 g | 25 g | 38 g | - |
| Ε | N:P:K (Θειικό Κάλιο) | 88 g | 25 g | 76 g | - |
| Ζ | N:P:K +Mg | 88 g | 25 g | 76 g | |
| Η | N:P:K +Mg | 88 g | 25 g | 152 g | |

5.2 Αναλύσεις σε ράγες

Οι ράγες των επεμβάσεων συντηρούνται στην βαθιά κατάψυξη. Για τις αναλύσεις σε ολόκληρες ράγες μετρώνται 50 ράγες και τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια ζυγίζονται και τοποθετούνται σε πλαστικό περιέκτη για να ομογενοποιηθούν. Η ομογενοποίηση γίνεται με το Ultra Turrax T25 και ακολουθήθηκε πρόγραμμα ομογενοποίησης 2 min. Τα πρώτα 30 s οι στροφές του ομογενοποιητή είναι χαμηλές (6500 rpm) για να πολτοποιηθούν οι ράγες, το διάστημα 30 – 60 s οι στροφές ανεβαίνουν χειροκίνητα στις 9500 rpm και οι ράγες υφίσταται πολτοποίηση σε μεγαλύτερο βαθμό και τέλος το διάστημα από 60 – 120 s οι στροφές ρυθμίζονται στις 17000 – 20000 rpm για το τελικό στάδιο της ομογενοποίησης. Όλα τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Τα δείγματα παραμένουν στους πλαστικούς περιέκτες που ομογενοποιήθηκαν.

5.2.1 Προσδιορισμός ολικών ανθοκυανών και φαινολικών με την μέθοδο *Pand et al. 1996, 2000*

Η μέθοδος του «Pand» χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των ολικών ανθοκυανών και φαινολικών στις ερυθρές ποικιλίες. Η μέθοδος στηρίζεται στην παραδοχή ότι σε διάλυμα pH 1 παρατηρείται πλήρης αποδιοργάνωση των μεμβρανών και ολική εκχύλιση των ανθοκυανών και των ολικών φαινολικών από τα χυμοτόπια των κυττάρων. Στη συνέχεια τα συστατικά που έχουν εκχυλιστεί είναι εμφανή στις οπτικές πυκνότητες 700, 520 και 280nm του φασματοφωτόμετρου.

Για την εκχύλιση των ανθοκυανών και των ολικών φαινολικών σε δοκιμαστικό σωλήνα χρησιμοποιείται 1g δείγματος (πολτοποιημένες ράγες) και 10mL υδατικού διαλύματος αιθανόλης (50% υδατικό διάλυμα αιθανόλης διορθωμένο σε pH 2 με HCl). Το διάλυμα μένει για 1h υπό ανάδευση προκειμένου να εκχυλιστεί το 94% των ανθοκυανών του δείγματος. Ακολουθείται φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min και λαμβάνονται άμεσα από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης 0,5mL, τα οποία τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστίθενται 10mL υδατικού διαλύματος HCl (1M). Τα δείγματα τοποθετούνται σε σκοτεινό μέρος για 3 ώρες και στη συνέχεια λαμβάνονται οι οπτικές πυκνότητες στα 700, 520 και 280nm. Η απορρόφηση στα 700nm δείχνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων στα 520 και 280nm. Όταν στα 700nm η τιμή είναι μεγαλύτερη του 0,01 (700nm>0,01), τότε το αποτέλεσμα δεν είναι έγκυρο. Οι τιμές των απορροφήσεων στα 520 και 280nm χρησιμοποιούνται στους τύπους:

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

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

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

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

$$= A_{280} \times \text{αραίωση} \times \frac{\text{τελικός όγκος εκχύλισης (ml)}}{100} \times \frac{\text{βάρος 50 ραγών}}{\text{βάρος δείγματος που εκχυλίστηκε (g)}} \times \frac{1}{50}$$

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

Ολικά φαινολικά συστατικά ανά ράγα (μμονάδε απορρόφησης (au))
μέσο βάρος 50 ραγών (g)

5.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού της εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών και ταννινών και του φαινολικού δυναμικού των ραγών (Glories *et. al.*, 1990)

Η «Glories» θεωρείται η πιο ακριβής μέθοδος εκτίμησης της φαινολικής ωρίμανσης των ραγών των ερυθρών ποικιλιών. Δίνει αποτελέσματα σχετικά με το ολικό δυναμικό σε ανθοκυάνες και ταννίνες, την εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών και το βαθμό ωρίμανσης των γιγάρτων. Στην πράξη η μέθοδος αποτελεί ένα μέσο διάκρισης του φαινολικού δυναμικού μιας ποικιλίας και της δυνατότητας εκχύλισης των ανθοκυανών που εμπεριέχει. Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιείται ένα διάλυμα pH 1 και ένα διάλυμα pH 3,6. Στο pH 1 γίνεται εκχύλιση όλων των ανθοκυανών του δείγματος και στο pH 3,6 προσομοιώνονται οι πραγματικές συνθήκες εκχύλισης και η απελευθέρωση των ανθοκυανών από το φλοιό των ραγών εξαρτάται από το πορώδες των κυτταρικών μεμβρανών.

Σε μια κωνική φιάλη προστίθενται 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. Εν συνεχεία τα διαλύματα μεταφέρονται σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου (10mL) και φυγοκεντρώνται για 10 min στις 4000rpm προκειμένου. Για τον προσδιορισμό του Δ.Φ.Ο. (Flanzy και Roux, 1958, Ribéreau- Gayon, 1966) λαμβάνονται 50 μ L του υπερκείμενου της φυγοκέντρωσης του διαλύματος pH 3,6. Προστίθενται 4,95 ml H₂O και το νέο διάλυμα αναδεύεται στο vortex. Έπειτα γίνεται φωτομέτρηση στα 280nm με λάμπα δευτερίου και κυψελίδες χαλαζία. Για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών δημιουργούνται δύο κύρια διαλύματα σε ποτηράκια ζέσεως. Στο πρώτο διάλυμα τοποθετείται 1 mL εκχυλίσματος pH 1, 1 mL αλκοολικού διαλύματος HCl 0,1% και 20 mL υδατικού διαλύματος HCl 2%. Στο δεύτερο διάλυμα τοποθετούνται 1 mL εκχυλίσματος pH 3,6, 1 mL αλκοολικού διαλύματος HCl 0,1% και 20 mL υδατικού διαλύματος HCl 2%. Για κάθε κύριο διάλυμα δημιουργούνται δύο δευτερεύοντα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, στα οποία γίνεται διπλή επανάληψη:

- για pH 1 – 5 mL κύριου διαλύματος εκχυλίσματος pH 1 και 2 mL H₂O

- για pH 1 - 5 mL κύριου διαλύματος εκχυλίσματος pH 1 και 2 mL διαλύματος Na_2SO_3 15%
- για pH 3,6 - 5 mL κύριου διαλύματος εκχυλίσματος pH 3,6 και 2 mL H_2O
- για pH 3,6 - 5 mL κύριου διαλύματος εκχυλίσματος pH 3,6 και 2 mL διαλύματος Na_2SO_3 15%

Οι δοκιμαστικοί σωλήνες κλείνονται με parafilm, όπου αφήνονται για 20 min. Κατόπιν μετρώνται οι απορροφήσεις όλων των δειγμάτων στα 520 nm με πλαστικές κυψελίδες και λάμπα αλογόνου (Ribéreau-Gayon, P. *et. al.*, 2006).

Για τη μέτρηση του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:
 $\Delta.\Phi.Ο. = OD_{280} * 100$

Η ποσότητα των ανθοκυανών δίνεται από τη σχέση:

$$A_{pH\ 1} \text{ (mg/L)} = (OD_2 - OD_1) * 885,3$$

$$A_{pH\ 3,6} \text{ (mg/L)} = (OD_2 - OD_1) * 885,3$$

όπου για κάθε εκχύλιση pH 1 και pH 3,6 αντίστοιχα

OD_1 = η απορρόφηση του δείγματος στο οποίο προστέθηκε το διάλυμα Na_2SO_3 15%

OD_2 = η απορρόφηση του δείγματος στο οποίο προστέθηκε το H_2O

Οι τιμές που προκύπτουν από τις εν λόγω εξισώσεις χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των παρακάτω αποτελεσμάτων:

1. Ολικές ανθοκυάνες

$$TA = A_{pH\ 1}$$

2. Εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών AE%

$$\frac{A_{pH1} - A_{pH\ 3,6}}{A_{pH1}} \times 100$$

Όσο μικρότερη είναι η τιμή AE%, τόσο πιο εύκολα εκχυλίζονται οι ανθοκυάνες.

3. Συνεισφορά των ταννινών των γιγάρτων στα ολικά φαινολικά MP% (Βαθμός ωριμότητας των γιγάρτων, βαθμός συμμετοχής των ταννινών των γιγάρτων στο σύνολο των φαινολικών)

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

Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή MP%, τόσο μεγαλύτερη αρνητική επίδραση έχει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ραγών.

4. Συγκέντρωση ταννινών που προέρχονται από τους φλοιούς

$$dpell = \frac{A\ pH\ 3,6 * 40/1000}{OD280}$$

5. Συνεισφορά των ταννινών των φλοιών

$$dpell\ \% = \frac{dpell}{A280} * 100$$

6. Συγκέντρωση ταννινών που προέρχονται από τα γίγαρτα

$$dTrep = A280 - dpell$$

7. Συνεισφορά των ταννινών των γιγάρτων $dTrep\ \% = \frac{dTrep}{A280} * 100$

5.2.3 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose (Sarneckis *et. al.*, 2005, Smith 2005, Mercurio and Smith 2006):

Η συγκεκριμένη μέθοδος μετράει το σύνολο των ταννινών του δείγματος οίνου ή ράγας. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με άλλα μόρια, όπως η methyl cellulose (μεθυλοκυτταρίνη) και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν.

Για την εφαρμογή της μεθόδου λαμβάνεται 1 g ομογενοποιημένου πολτού του δείγματος, το οποίο τοποθετείται σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου. Σε αυτό προστίθενται 10ml υδατικού διαλύματος αιθανόλης (50%) και αφήνεται για ανάδευση 1 h. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση των εκχυλισμάτων για 10 min στις 4000rpm. Για τη μέθοδο απαιτείται η δημιουργία 2 διαλυμάτων: το πρώτο αποκαλείται μάρτυρας, στο οποίο δεν προστίθεται ο πολυσακχαρίτης, και το δεύτερο δείγμα, όπου προστίθεται ο πολυσακχαρίτης. Στον μάρτυρα προστίθενται 1ml εκχυλίσματος, 2 ml θεικού αμμωνίου και H₂O μέχρι συμπλήρωσης του τελικού όγκου των 10ml. Στο δείγμα προστίθενται 1ml εκχυλίσματος, 2 ml θεικού αμμωνίου, 3 ml methyl cellulose και H₂O μέχρι συμπλήρωσης του τελικού όγκου των 10ml. Εφόσον τα δύο διαλύματα παραμείνουν σε θερμοκρασία δωματίου για 10min, φυγοκεντρώνται 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. Η διαφορά των δύο απορροφήσεων υπολογίζει τη 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:

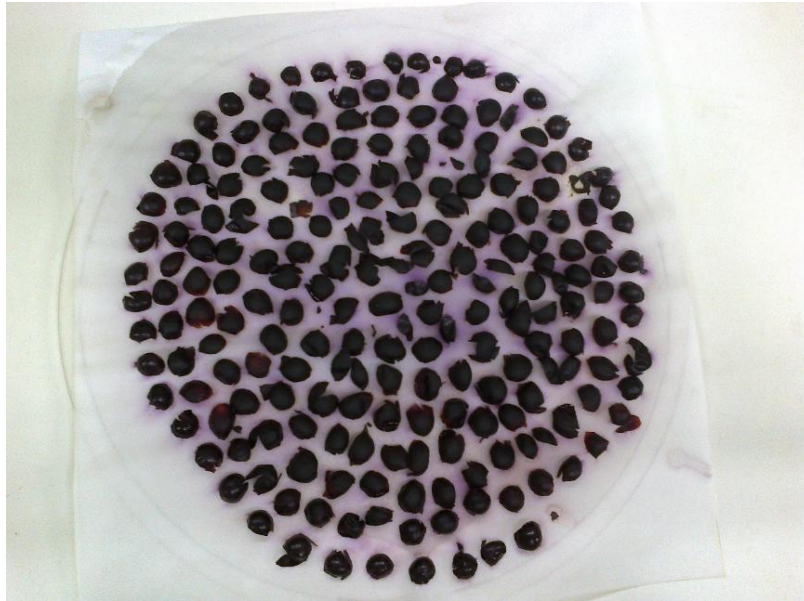
$$C_{TAN} (mg / g) = \frac{C_{TAN}^{280} * \text{Αραίωση (η οποία αντιστοιχεί στον συνολικό τελικό όγκο =10,5 g)}}{\text{Βάρος δείγματος που εκχυλίστηκε (g)}}$$

Συγκέντρωση ταννινών mg/ ράγα:

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

5.3 Αναλύσεις σε φλοιούς και γίγαρτα ραγών

Αρχικά, για κάθε ένα από τα δείγματα των επεμβάσεων λαμβάνονται 100 αντιπροσωπευτικές ράγες, των οποίων καταγράφεται το βάρος τους. Στη συνέχεια γίνεται αποχωρισμός της σάρκας της ράγας από του φλοιούς και τα γίγαρτα, και τόσο οι φλοιοί όσο και τα γίγαρτα καθαρίζονται σε απεσταγμένο H₂O. Αφήνονται να στεγνώσουν και κατόπιν ζυγίζονται και πάλι ως φλοιοί και γίγαρτα ξεχωριστά. Όσον αφορά στα γίγαρτα μετράται ο ακριβής τους αριθμός και εφόσον τοποθετηθούν σε διηθητικό μέσο, ακολουθείται ελαφρύς θρυμματισμός τους. Ομοίως, τοποθετούνται και οι φλοιοί σε διηθητικό μέσο και όλα αποθηκεύονται στην κατάψυξη. Το επόμενο στάδιο της διαδικασίας περιλαμβάνει λυοφιλίωση των φλοιών και των γιγάρτων επί 24h στη συσκευή λυοφιλίωσης (freeze-dryer). Τα λυοφιλιωμένα δείγματα φλοιών και γιγάρτων αλέθονται και η σκόνη που προκύπτει αποθηκεύεται σε σκοτεινό και ξηρό μέρος.



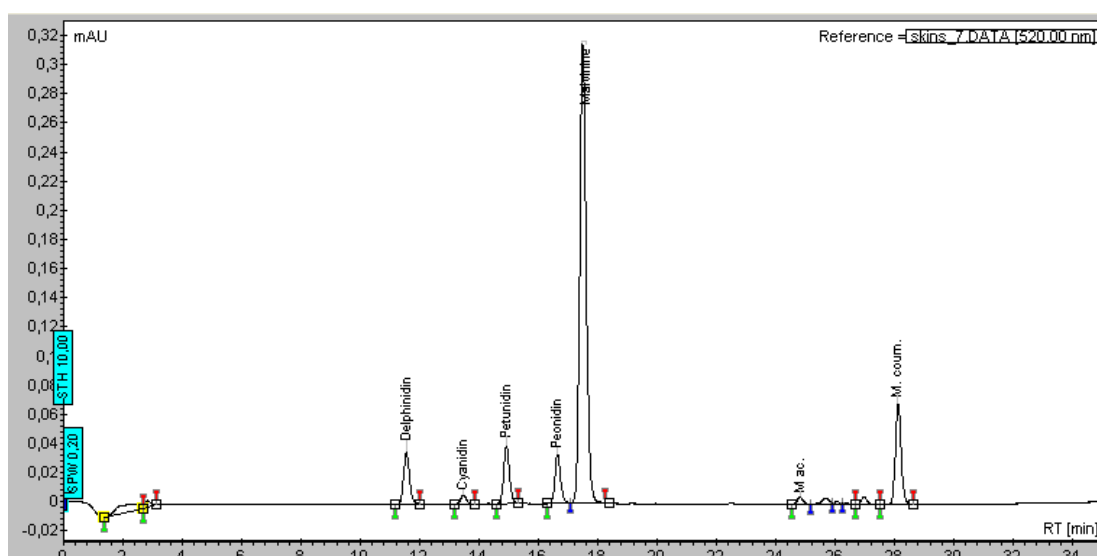
Εικόνα 7: Φλοιοί ραγών του πειράματος

5.3.1 Εκχυλίσεις ανθοκυανών των φλοιών για HPLC

Για την εκχύλιση ανθοκυανών των φλοιών σε 0,5g της σκόνης των λυοφιλιωμένων δειγμάτων, προστίθενται 20ml διαλύματος οξινισμένης μεθανόλης 0,1% HCl και το διάλυμα τοποθετείται σε falcon. Στη συνέχεια τα falcon τοποθετούνται σε shaker στους 20°C και 60rpm και σε συνθήκες πλήρους σκότους για 4h. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 9000rpm στους 20°C και για 15min, με το πέρας της οποίας λαμβάνεται άμεσα το υπερκείμενο και τοποθετείται σε vial και καταψύχεται. Στο ίζημα που υπολείπεται προστίθενται 10ml μεθανόλης 0,1% HCl. Η ίδια διαδικασία εφαρμόζεται διαδοχικά σε πρόγραμμα εκχυλίσεων και φυγοκεντρήσεων πρώτα για 18h και στη συνέχεια για 24h. Όλα τα εκχυλίσματα που προκύπτουν τοποθετούνται στο αρχικό vial και καταψύχονται.

Από το εκχύλισμα λαμβάνονται 5μL, φιλτράρονται από φίλτρο 0,2μm και χρησιμοποιούνται για ανάλυση στην HPLC με το πρόγραμμα προσδιορισμού ανθοκυανών. Ο εξοπλισμός της HPLC αποτελείται από μια αντλία Jasco PU-2089 Plus, στήλη Nova-Pack C18, 4μm, διαστάσεων 47,6x250mm και έναν ανιχνευτή Jasco MD-910 Multiwavelength. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Jasco ChromPass Chromatography v.1.7.403.1. Η ανάλυση προγραμματίστηκε με ρυθμό ροής 1 ml/min, με όγκο δείγματος 5μL, στα 520nm 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 ωπού βάρους φλοιών.



Εικόνα 8: Χρωματογράφημα ανθοκυανών

5.3.2 Εκχυλίσεις φαινολικών των φλοιών και των γιγάρτων

Προκειμένου να εκχυλιστούν τα φαινολικά των φλοιών και των γιγάρτων, σε 3 g της σκόνης προστίθενται 25ml διαλύματος ακετόνης και H₂O (αναλογία 80:20) και γίνεται εκχύλιση υπό συνεχή ανάδευση στους 25°C επί 4 h. Έπειτα το εκχύλισμα τοποθετείται σε σωλίνες για φυγοκέντρωση στις 9000rpm, για 15min. Λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα και στο στερεό υπόλειμμα προστίθενται 25ml διαλύματος μεθανόλης και H₂O (αναλογία 60:40) για 2,5h. Το εκχύλισμα που προκύπτει φυγοκεντράται και πάλι στις ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο διάλυμα τοποθετείται στο ίδιο vial με το πρώτο εκχύλισμα και φυλάσσεται στην κατάψυξη.

Μετάπειτα, στον εξατμιστή κενού (Rotary Evaporator) υπό κενό στους 35°C γίνεται διαχωρισμός του δείγματος από την ακετόνη και τη μεθανόλη με αποτέλεσμα να μείνει το δείγμα συμπυκνωμένο, το οποίο απουσία διαλυτών οδηγείται εκ νέου για λυοφιλίωση.

5.3.3 Φωτομετρικές Μέθοδοι

Χρησιμοποιούνται 0,025g της σκόνης φλοιών και 0,01g της σκόνης γιγάρτων για τη δημιουργία πρότυπου διαλύματος οίνου σε αναλογίες 5g/L φλοιών και 2g/L γιγάρτων. Το πρότυπο διάλυμα που προκύπτει για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση των φωτομετρικών μεθόδων methyl cellulose, ταννίνες με βρασμό, DPPH και DMAC.

5.3.3.1 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose

Η μέθοδος methyl cellulose για γίγαρτα και φλοιούς είναι ταυτόσημη με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.3. Δεδομένου ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση έχουμε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων, 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. Ομοίως, τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/L κατεχίνης μέσω της καμπύλης αναφοράς σε κατεχίνη (C_{TAN}²⁸⁰). Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg catechin / g νωπού βάρους φλοιών και γιγάρτων.

Η εξίσωση που χρησιμοποιείται είναι η εξής:

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

5.3.3.2 Ολικές ταννίνες (μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες) με τη μέθοδο του βρασμού

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα των προανθοκυανιδινών να μετατρέπονται σε ανθοκυανιδίνες σε όξινο μέσο στους 100°C (Ribeareau-Gayon & Stonestreet, 1966). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο το σύνολο των ταννινών που μετατρέπεται σε ανθοκυανιδίνες συμπεριλαμβάνει και αυτές 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 τη μέτρηση της απορρόφησης στα 550nm. Στη διάρκεια του βρασμού οι ταννίνες μετατρέπονται σε ανθοκυανιδίνες και, επομένως, το δείγμα που έχει θερμανθεί περιέχει τις αρχικές ανθοκυάνες και τις ανθοκυάνες που σχηματίστηκαν από την υδρόλυση των ταννινών. 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 υλοποίηση της μεθόδου το εκχύλισμα φυγοκεντράται και αραιώνεται 1/50 με H₂O. Σε έναν απλό δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 2ml αραιωμένου εκχυλίσματος, 1ml H₂O και 3ml πυκνού HCl 37%. Σε δοκιμαστικό σωλήνα υδρόλυσης τοποθετούνται 2ml αραιωμένου εκχυλίσματος, 1ml H₂O και 3ml πυκνού HCl 37% και παραμένει σε βρασμό για 45min. Μετά την ψύξη προστίθενται και στους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες 500μL αιθανόλης 95% για σταθεροποίηση του χρώματος. Εν συνεχεία και τα δύο περιεχόμενα ανακινούνται στο vortex. Κατόπιν είναι έτοιμα να μετρηθούν οι οπτικές πυκνότητες στα 550nm.

Η σχέση που δίνει την ποσότητα των ταννινών του δείγματος είναι η ακόλουθη:

$$\text{ταννίνες (g / L)} = (d_2 - d_1) * 3,87$$

όπου d_1 = απορρόφηση στα 550 nm χωρίς θέρμανση

και d_2 = απορρόφηση στα 550 nm με θέρμανση

5.3.3.3 DPPH (αντιοξειδωτική ικανότητα)

Η εν λόγω μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως στα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στους οίνους ή τα εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων. Χρησιμοποιεί την 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ελεύθερη ρίζα (DPPH), η οποία έχει χαρακτηριστικό φάσμα UV-vis με μέγιστη απορρόφηση στα 515nm σε μεθανόλη. Η προσθήκη συστατικού που δρα ως αντιοξειδωτικό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση στην απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση και την αντιοξειδωτική ικανότητα της αντιοξειδωτικής ουσίας που προστίθεται (Villano *et al.*, 2007).

Για την εφαρμογή της μεθόδου παρασκευάζεται διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης DPPH σε μεθανόλη (25 mg/L). Σε 25μL του δείγματος προστίθενται 975μL DPPH και μετράται η απορρόφηση στα 515nm (t=0). Τα διαλύματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και μετράται η απορρόφηση στα 515nm 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.

5.3.3.4 DMAC

Πρόκειται για μέθοδο εκτίμησης των φλαβονολών και προανθοκυανιδινών με τη χρήση του αντιδραστήριου DMAC (4-Dimethylaminocinnamaldehyde Assay). 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 (Taylor *et. al.*, 2009).

Γίνεται έναρξη της μεθόδου προετοιμάζοντας το αντιδραστήριο DMAC (2%) με προσθήκη 2g DMAC σε 100 ml διαλύματος 1/1 μεθανόλης και H₂SO₄ 6N. Το αντιδραστήριο διατηρείται μόνο για 1 ημέρα σε θερμοκρασία δωματίου. Λαμβάνεται το model wine των φλοιών και των γιγάρτων, το οποίο αραιώνεται 1:20 με μεθανόλη. Σε 40μL αραιωμένου διαλύματος σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 4,7ml μεθανόλης και 200μL αντιδραστήριου 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 κάθε δείγμα θα πρέπει να ετοιμάζεται και ένα διάλυμα ως δείγμα αναφοράς (blanc) για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου, το οποίο υπόκειται στην ίδια διαδικασία χωρίς να προστεθεί το αντιδραστήριο DMAC (δοκιμαστικό σωλήνα με 40μL αραιωμένου διαλύματος του δείγματος, 4,7 ml μεθανόλης, vortex, αναμονή 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.

5.3.3.4.1 Δείκτης βαθμού πολυμερισμού (mDP)

Προκύπτει από τον λόγο έκφρασης των αποτελεσμάτων των μεθόδων προσδιορισμού ολικών ταννινών με μετατροπή σε προανθοκυανιδίνες (ταννίνες με βρασμό) με τη μέθοδο DMAC (Vivas *et al.*, 1994).

5.3.4 Προσδιορισμός των φαινολικών σε εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων στην HPLC (μονομερών και ολιγομερών φλαβαν - 3 -ολων και φλαβονολών)

Όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.2.2, από την πούδρα που προκύπτει μετά τη λυοφιλίωση λαμβάνονται για τα γιγάρτα 400mg και για τους φλοιούς 500mg σε γυάλινο περιέκτη. Στη συνέχεια προστίθενται 10 ml υδατικού διαλύματος αιθανόλης 5% και το δείγμα αναδεύεται σε vortex για 30sec. Ακολουθεί προσθήκη 10ml χλωροφορμίου. Το διάλυμα φυγοκεντράται στις 4000rpm για 5min, αναδεύεται και λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα (η πρώτη από 2 διακριτές φάσεις του διαλύματος) σε νέο περιέκτη και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία στο υπόλοιπο διάλυμα άλλες 2 φορές. Η προσθήκη του χλωροφόρμιου πραγματοποιείται για την απομάκρυνση του λιπόφιλου μέρους του δείγματος. Στο νέο διάλυμα που προκύπτει μετά τις 3 επαναλήψεις με προσθήκη χλωροφόρμιου, προστίθενται 10ml οξικού αιθυλεστέρα, 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 στο υπόλοιπο διάλυμα επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία 2 φορές. Η χρήση του οξικού αιθυλεστέρα γίνεται για την λήψη μικρού μοριακού βάρους προανθοκυανιδινών (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 εξατμιστή κενού με την απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη και λυοφιλιώνεται επί 2 ημέρες. Στη σκόνη που προκύπτει από τη 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 στη συνέχεια 20μL δείγματος διηθούνται με φίλτρο 0,2μm και αναλύονται με HPLC. Τα δείγματα φλοιών δεν αραιώνονται, ενώ ο όγκος δείγματος που χρησιμοποιείται για ανάλυση HPLC είναι 50μL. Το πρόγραμμα έκλυσης που ακολουθείται καθώς και οι διαλύτες είναι διαφορετικά για τους φλοιούς και τα γίγαρτα.

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, Jasco LC-Net II / ADC, Software Jasco ChromPass Chromatography Data System Version 1.7.403.1 και στήλη Nova-Pak, C-18, διαστάσεων 3,9x150mm, 4μm. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στο πρόγραμμα έκλυσης της HPLC για τα γίγαρτα είναι διαλύτης A: 1ml/L perchloric acid (υπερχλωρικό οξύ) σε HPLC H₂O και διαλύτης B: μεθανόλη για HPLC. Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάσθηκαν με την χρήση πρότυπων ουσιών (κατεχίνης, επικατεχίνης, γαλλικής επικατεχίνης, γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης, επιγαλλοκατεχίνης, προκυανιδίνης B1, B2, C1 και γαλλικού οξέος), σε γνωστές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ουσίας / g νωπού βάρους γιγάρτων. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 280nm και με το ακόλουθο πρόγραμμα έκλυσης (Kallithraka *et al.*, 2005):

Πίνακας 6: Πρόγραμμα έκλουσης για HPLC φαινολικών των γιγάρτων

| <u>Χρόνος</u> | <u>Διαλύτης A</u> | <u>Διαλύτης B</u> |
|---------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 5 | 90 | 0 |
| 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 |

Η ταυτοποίηση των φαινολικών ουσιών βασίζεται στη σύγκριση των τιμών κατακράτησης των κορυφών που προσδιορίστηκαν με τις κορυγές των πρότυπων ουσιών στα 280nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε μέσω των πρότυπων καμπυλών αναφοράς.

Φλοιοί: Ο εξοπλισμός της HPLC αποτελείται από μια αντλία Jasco PU-980, στήλη Lichrospher, RP-18, διαστάσεων 250x4,5μm και έναν ανιχνευτή UV. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στο πρόγραμμα έκλουσης της HPLC για τους φλοιούς είναι διαλύτης A: 1ml/L ορθοφωσφορικό οξύ σε H₂O και διαλύτης B: διαλύτης A / ακετονιτρίλιο σε αναλογία 6:4 (v/v). Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν με την χρήση πρότυπων ουσιών (κατεχίνης, επικατεχίνης, γαλλικής επικατεχίνης, γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης, επιγαλλοκατεχίνης, προκυανιδίνης B1, B2, C1, γαλλικού οξέος, ρουτίνης, καμπερόλης, μυρισετίνης, κερσετίνης), σε γνωστές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ουσίας / g νεπού βάρους φλοιών. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 280nm και 360nm και με το ακόλουθο πρόγραμμα έκλουσης (Kallithraka *et al.*, 2005):

Πίνακας 7: Πρόγραμμα έκλουσης για HPLC φαινολικών ουσιών των φλοιών

| <u>Χρόνος</u> | <u>Διαλύτης Α</u> | <u>Διαλύτης Β</u> |
|---------------|-------------------|-------------------|
| 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 στη 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.

5.4 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) και του Microsoft Office Excel 2007. 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.

6. Μετρήσεις – Αναλύσεις στις Ράγες

Οι μετρήσεις για το μέσο βάρος ράγας, μέσο βάρος γιγάρτου, το βάρος φλοιών 100 ραγών, τον αριθμό γιγάρτων 100 ραγών και τον λόγο στεμφύλων προς γλεύκος παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

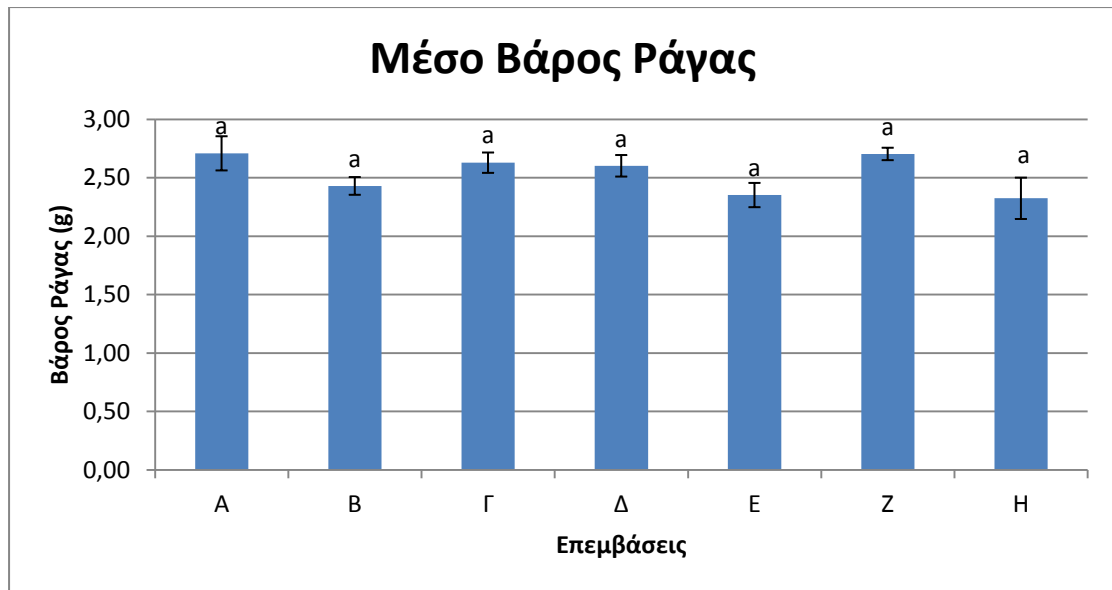
Πίνακας 8: Βάρη Ραγών και των επιμέρους συστατικών της.

| Επεμβάσεις | Μέσο Βάρος Ράγας (g) | Μέσο βάρος γιγάρτου (g) | Βάρος Φλοιών 100 ραγών (g) | Αριθμός Γιγάρτων 100 ραγών | Λόγος Στεμφύλων / Γλεύκους | N |
|------------|----------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---|
| A | 2,709±0,146 a | 0,0502±0,0017 a,b | 6,759±0,255 a | 208±13,051 a | 6,805±0,387 a | 3 |
| B | 2,430±0,075 a | 0,0523±0,0010 a,b | 4,903±0,303 a | 154,3±3,929 a | 5,647±0,226 a | 3 |
| Γ | 2,628±0,087 a | 0,0491±0,0019 a,b | 5,491±0,286 a | 213,3±18,657 a | 6,458±0,305 a | 3 |
| Δ | 2,602±0,092 a | 0,0557±0,0024 b | 6,141±0,948 a | 175±11,239 a | 6,475±0,317 a | 3 |
| E | 2,351±0,103 a | 0,0480±0,0020 a,b | 7,111±1,339 a | 163,6±4,055 a | 6,888±0,855 a | 3 |
| Z | 2,703±0,053 a | 0,0510±0,0015 a,b | 6,108±1,262 a | 204±13,012 a | 6,497±0,231 a | 3 |
| H | 2,323±0,177 a | 0,0453±0,0019 a | 5,144±0,702 a | 206±16,502 a | 6,665±0,565 a | 3 |

Για την σύγκριση των μετρήσεων εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), το ± αναφέρεται στο τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός δειγμάτων (3.) Τα αποτελέσματα αποτελούν τους μέσους όρους τριπλής επανάληψης.

Το μεγαλύτερο μέσο βάρος ράγας παρατηρήθηκε στην επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας), ενώ το μικρότερο στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο), αλλά χωρίς να διαφέρουν σημαντικά στατιστικά (Γράφημα 1).

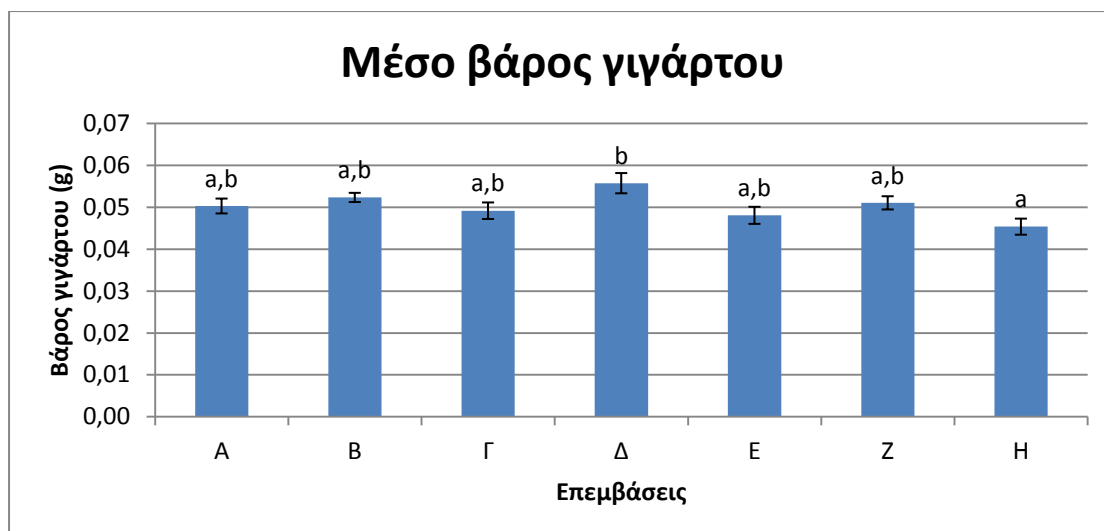
Την επόμενη χρονιά του πειράματος (2011) μεγαλύτερο μέσο βάρος ράγας παρατηρήθηκε στην επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) με 2,127 g και το μικρότερο στην επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) με 1,783 g αλλά με στατιστικώς σημαντική διάφορα (Κομματά Α., 2013). Σε όλες τις επεμβάσεις το 2011 παρατηρήθηκε μείωση του βάρους των ραγών συγκριτικά με την χρονιά 2010 του ίδιου πειράματος.



Γράφημα 1: Μέσο βάρος ράγας (g) / επέμβαση

Επίσης, στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο), διαπιστώνεται το μικρότερο μέσο βάρος γιγάρτου. Η επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) είναι η επέμβαση με το μεγαλύτερο μέσο βάρος γιγάρτου, έχοντας στατιστικώς σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις οι οποίες στατιστικώς ανήκουν και στις δύο ομάδες (Γράφημα 2).

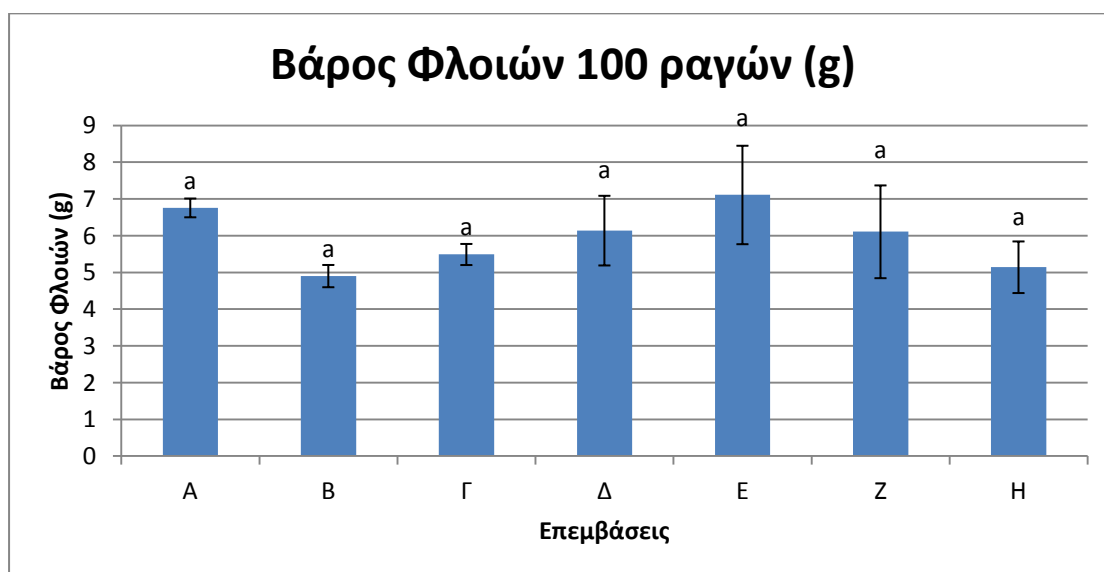
Το 2011 συνεχίζει το μέσο βάρος του γιγάρτου να είναι μεγαλύτερο για την επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) με μέσο βάρος 0,047g αλλά το μικρότερο παρουσιάζει η επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) με μέσο βάρος 0,041g. Τα αποτελέσματα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Κομματά Α., 2013). Τα βάρη των γιγάρτων είναι σαφώς μεγαλύτερα το 2010 σε σχέση με την επόμενη χρονιά.



Γράφημα 2: Μέσο βάρος γιγάρτου / Επέμβαση

Το βάρος των φλοιών 100 ραγών δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά, αλλά η επέμβαση Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) χαρακτηρίζεται από το μεγαλύτερο βάρος φλοιών ανά 100 ράγες, ενώ η επέμβαση Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) από το μικρότερο (Γράφημα 3).

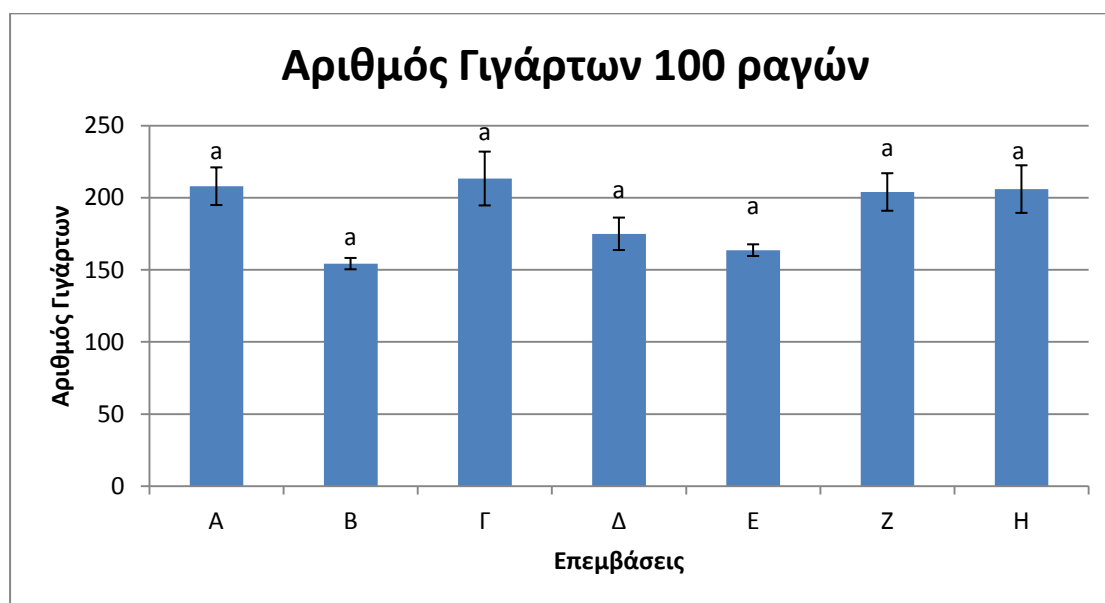
Η μέτρηση το 2011 πραγματοποιήθηκε από την Κομματά Α. και το μεγαλύτερο βάρος φλοιών 100 ραγών (8,559g) έδωσε η επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) ενώ η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) το μικρότερο (6,071g) αλλά χωρίς να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά. Το μέσο βάρος των φλοιών για όλες τις επεμβάσεις και των δυο ετών είναι μεγαλύτερο το 2011.



Γράφημα 3: Βάρος φλοιών 100 ραγών (g) / Επέμβαση

Η επέμβαση Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) έδωσε τον μικρότερο μέσο αριθμό γιγάρτων (154,3 γίγαρτα/100 ράγες), ενώ η επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) τα περισσότερα γίγαρτα (213,3 γίγαρτα/100 ράγες) συγκριτικά με τις υπόλοιπες επεμβάσεις, χωρίς όμως να παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων (Γράφημα 4).

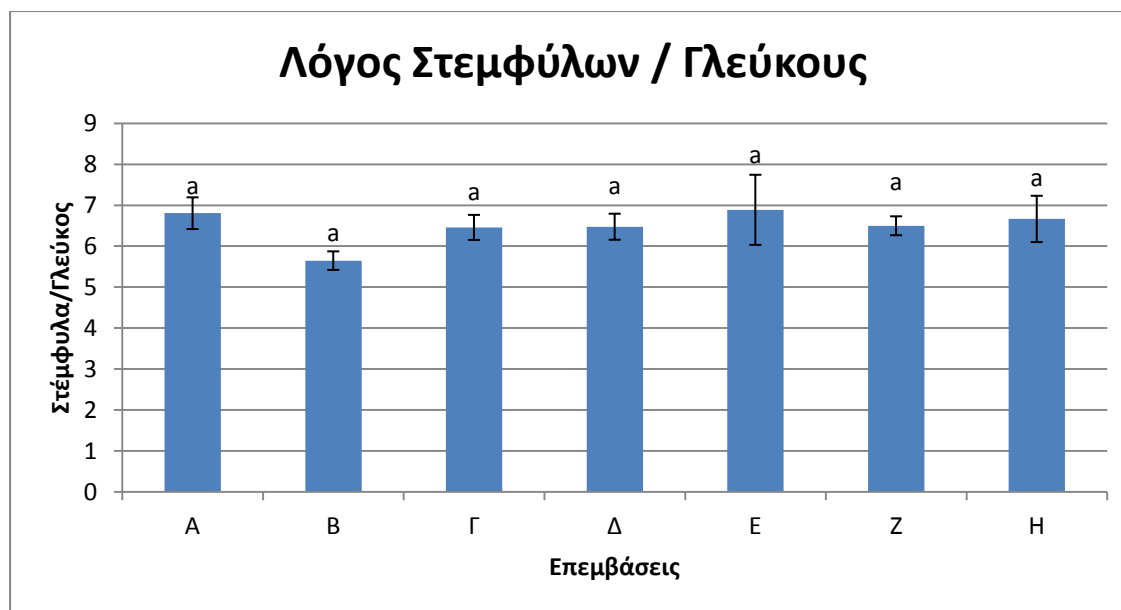
Το 2011 η επέμβαση Ζ (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό γιγάρτων (190 γίγαρτα/100 ράγες). Ο μικρότερος αριθμός γιγάρτων βρέθηκε στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) με 157,33 γίγαρτα/100 ράγες. Οι επεμβάσεις μεταξύ τους είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Κομματά Α., 2013).



Γράφημα 4: Αριθμός γιγάρτων 100 ραγών / Επέμβαση

Επίσης, ο λόγος στεμφύλων προς γλεύκος δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά, αλλά μεγαλύτερη τιμή ανάμεσα στις επεμβάσεις παρουσιάζει η Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) και μικρότερη η επέμβαση Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) (Γράφημα 5).

Στην συνέχεια του πειράματος το 2011 μεγαλύτερο λόγο στεμφύλων / γλεύκος παρουσιάζει η επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) και μικρότερο η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Οι επεμβάσεις μεταξύ τους δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Κομματά Α, 2013).



Γράφημα 5: Λόγος Στεμφύλων προς Γλεύκος / Επέμβαση

6.1 Μέθοδος Glories

Η μέθοδος Glories μετρά τη φαινολική ωριμότητα στις ράγες των σταφυλιών, την εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών και ταννινών και το φαινολικό δυναμικό των ραγών.

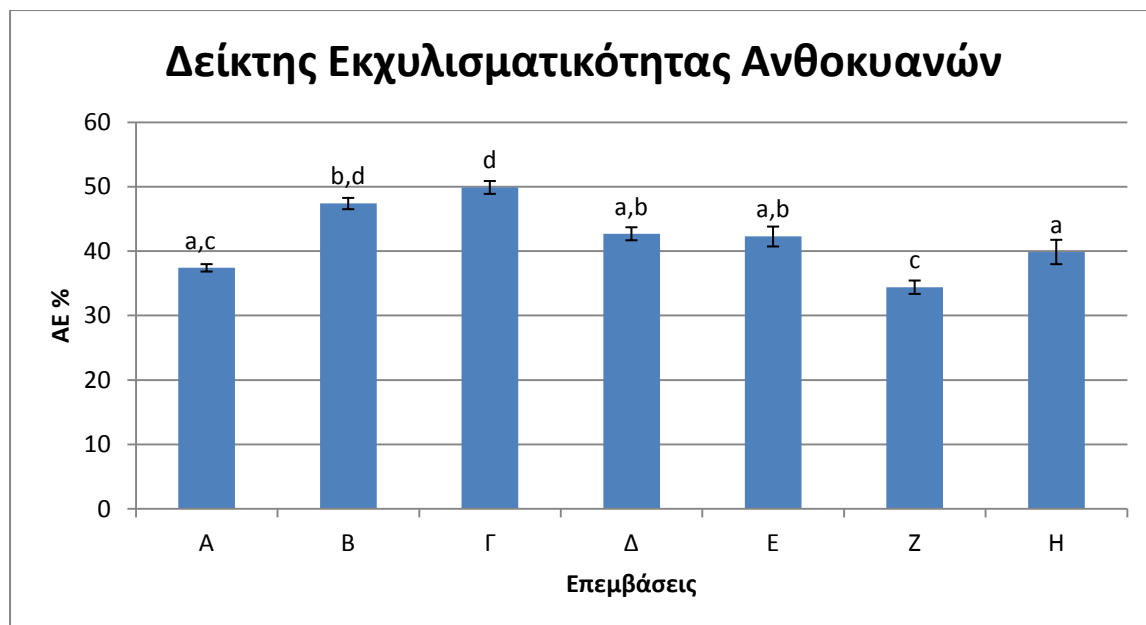
Πίνακας 9: Τα αποτελέσματα της μεθόδου Glories εκφράζονται μέσω των δεικτών του πίνακα.

| | AE% | MP% | dpell | dpell% | dTrep | dTrep% | N |
|----------|------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|---|
| A | 37,418±0,572 a,c | 78,251±0,569 c | 21,748±0,569 c | 64,744±1,937 a | 11,873±0,735 a | 35,255±1,937 a | 6 |
| B | 47,393±0,877 b,d | 72,124±1,313 a | 27,875±1,313 b | 75,545±3,689 a | 9,060±1,381 a | 24,454±3,689 a | 6 |
| Γ | 49,895±0,998 d | 74,753±0,961 a,b,c | 25,246±0,961 a,b,c | 69,931±3,857 a | 11,230±1,858 a | 30,068±3,857 a | 6 |
| Δ | 42,703±1,011 a,b | 73,744±1,284 a,b | 26,255±1,284 a,b | 65,904±5,662 a | 14,476±3,206 a | 34,095±5,662 a | 6 |
| E | 42,275±1,543 a,b | 77,527±0,608 b,c | 22,472±0,608 a,c | 61,578±4,977 a | 14,956±2,801 a | 38,421±4,977 a | 6 |
| Z | 34,408±1,039 c | 73,686±1,356 a,b | 26,313±1,356 a,b | 72,517±3,749 a | 9,996±1,410 a | 27,482±3,749 a | 6 |
| Η | 39,875±1,890 a | 88,154±0,578 d | 11,845±0,578 d | 30,062±2,169 b | 27,884±1,485 b | 69,937±2,169 b | 6 |

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου GLORIE εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA, οι τιμές που έχουν διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), με ± το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός δειγμάτων (3)*επανάληψεις (2)) Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι τριπλής επανάληψης.

Ο Δείκτης Εκχυλισματικότητας Ανθοκυανών (AE%) εκφράζει την εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών, όπου όσο μικρότερη είναι η τιμή AE% τόσο πιο

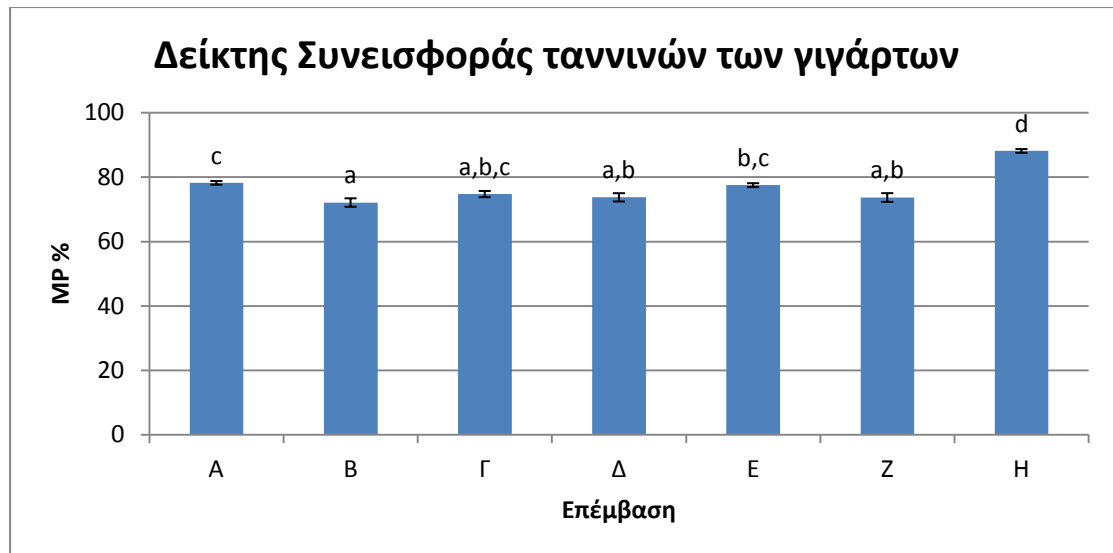
εύκολα εκχυλίζονται οι ανθοκυάνες. Η τιμή AE% μειώνεται όσο πιο πολύ ωριμάζει το σταφύλι (P.Ribereau-Gayon et.al., 2006).



Γράφημα 6: Δείκτης εκχυλισματικότητας ανθοκυανών / Επέμβαση

Τη χαμηλότερη τιμή του Δείκτη AE% παρουσιάζει η επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) δείχνοντας ότι είναι στατιστικώς σημαντικά πιο ώριμη από τις άλλες επεμβάσεις. Την ακολουθεί σε ωριμότητα η επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας), όπου ανήκουν και στην ίδια στατιστική ομάδα. Πιο ανώριμες είναι οι ράγες της επέμβασης Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) (Γράφημα 6).

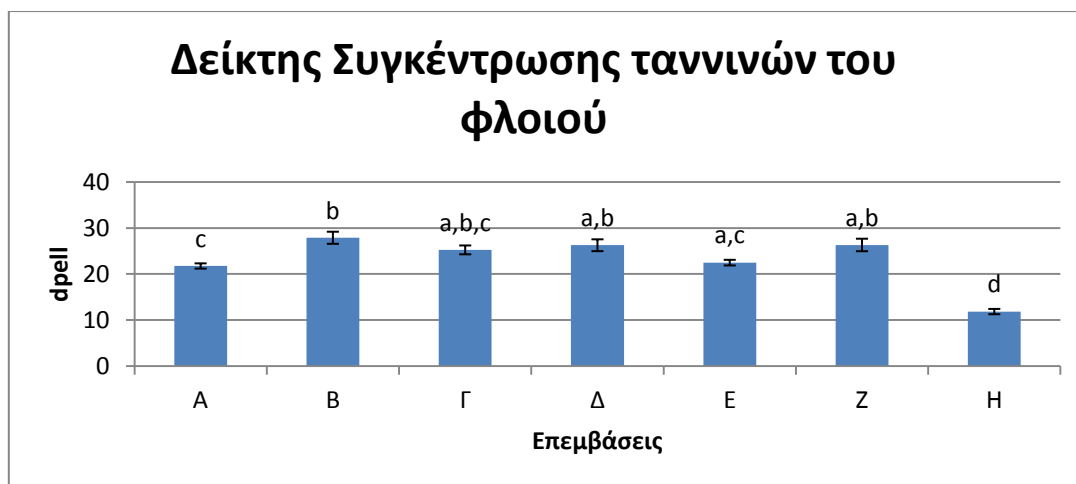
Το 2011 οι τιμές του δείκτη AE% δείχνουν ότι η επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) χαρακτηρίζεται από τη μεγαλύτερη εκχυλισματικότητα ανθοκυανών (42,510) ενώ στην επέμβαση B (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) οι ανθοκυάνες εκχυλίζονται δυσκολότερα συγκριτικά με τις υπόλοιπες επεμβάσεις με δείκτη 53,498. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Κομματά Α., 2013). Γενικά η εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών ήταν καλύτερη το 2010.



Γράφημα 7: Δείκτης ωριμότητας - συνεισφοράς των ταννινών των γιγάρτων / Επέμβαση.

Η συνεισφορά των ταννινών των γιγάρτων στα ολικά φαινολικά που περιέχονται στο εκχύλισμα εκφράζονται από τον δείκτη MP%. Όσο υψηλότερη τιμή λαμβάνει ο δείκτης τόσο μεγαλύτερος ο κίνδυνος να υπάρξει αρνητική επίδραση στη γεύση του οίνου. Η τιμή MP% μειώνεται καθώς προχωράει η ωρίμανση των σταφυλιών. Η τιμή που θα λάβει ο δείκτης σε ένα δείγμα εξαρτάται από την ποικιλία, τον αριθμό των γιγάρτων στις ράγες και την ωριμότητά τους. Μεγαλύτερη τιμή άρα και πιο «ανώριμα» γίγαρτα παρουσιάζει η επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Τα πιο ώριμα γίγαρτα παρουσιάζει η επέμβαση B (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο). Οι μετρήσεις μεταξύ των ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές (Γράφημα 7).

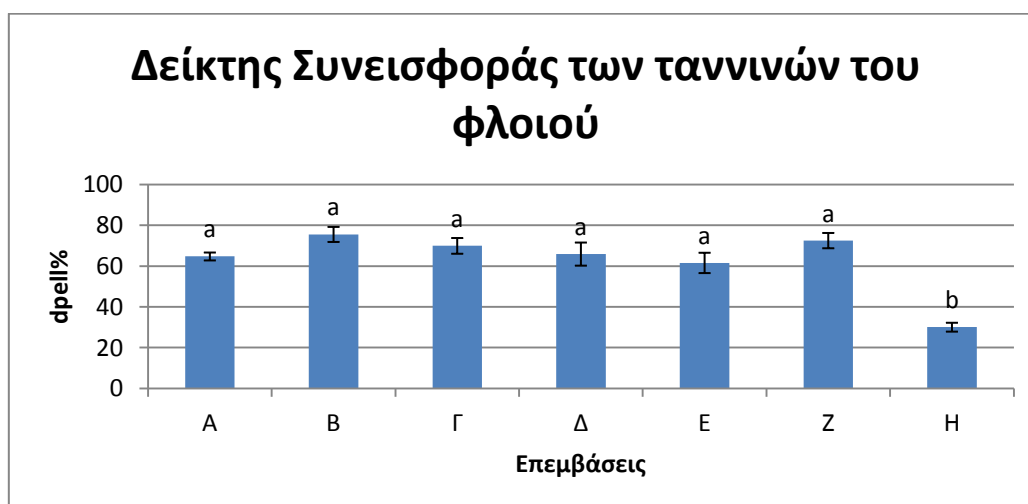
Το 2011 η επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) παρουσίασε τα πιο ώριμα γίγαρτα με δείκτη MP% 63,722 ενώ η επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θεικό κάλιο) τα πιο ανώριμα γίγαρτα με δείκτη MP% 77,202. Οι επεμβάσεις μεταξύ τους έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Κομματά Α., 2013). Το 2010 ο δείκτης συνεισφοράς των ταννινών των γιγάρτων ήταν μεγαλύτερος στις περισσότερες επεμβάσεις.



Γράφημα 8: Δείκτης συγκέντρωσης ταννινών του φλοιού/επέμβαση.

Η συγκέντρωση των ταννινών που προέρχονται από τους φλοιούς εκφράζεται από τον δείκτη drell. Μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ταννίνες φλοιών παρατηρείται στην επέμβαση B (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) και μικρότερη συγκέντρωση ταννινών στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) (Γράφημα 8).

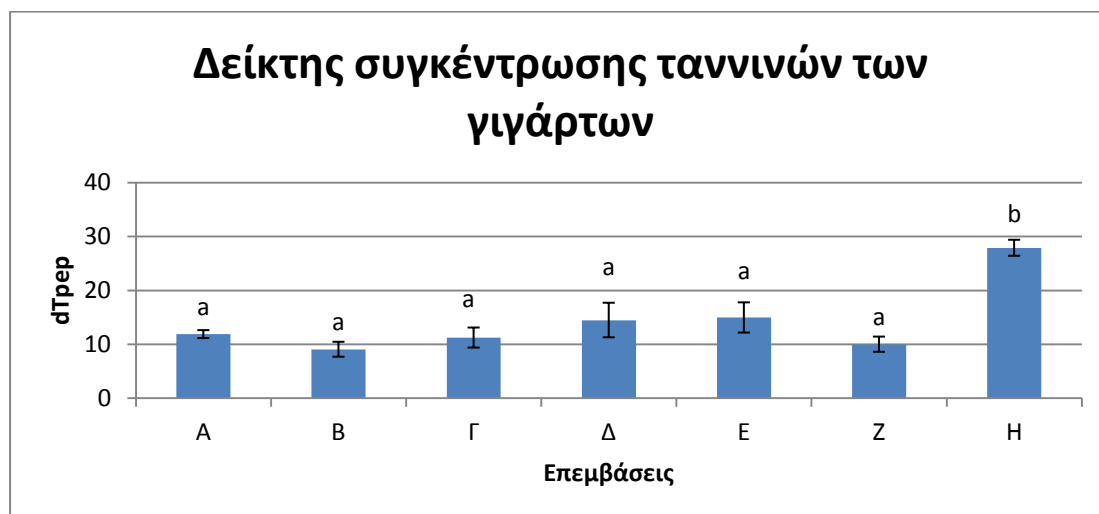
Η Κομματά Α. (2013) για το έτος 2011 μέτρησε στην επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) την μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών των φλοιών (11,040) ενώ στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) την μικρότερη (6.525). Ανάμεσα στις δύο χρονιές του πειράματος υπάρχει μεγάλη διαφορά στις συγκεντρώσεις των ταννινών του φλοιού με το έτος 2010 να έχει σαφώς μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.



Γράφημα 9: Δείκτης συνεισφοράς των ταννινών του φλοιού/επέμβαση

Η μεγαλύτερη τιμή της συνεισφοράς των ταννινών των φλοιών εκφρασμένη σε ποσοστό% παρατηρείται στην επέμβαση Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) σε αντίθεση με την επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) που παρουσιάζει την μικρότερη με τα αποτελέσματα να διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Γράφημα 9).

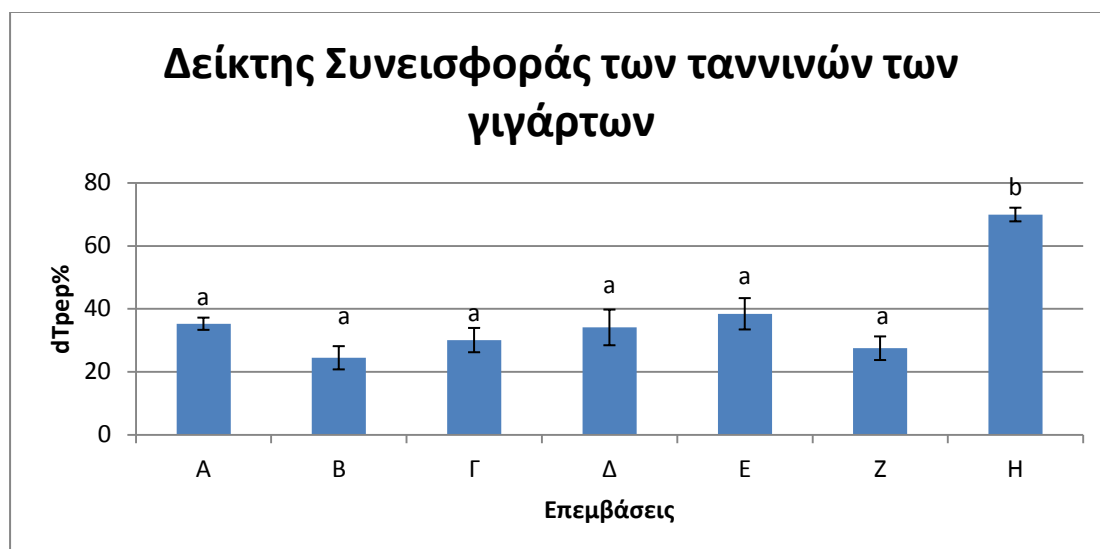
Το 2011 η συνεισφορά των ταννινών των φλοιών ήταν μεγαλύτερη για την επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) (36,278) και μικρότερη για την επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) (23,437). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Κομματά Α., 2013). Η συνεισφορά των ταννινών των φλοιών είναι μεγαλύτερη σε όλες τις επεμβάσεις για το έτος 2010.



Γράφημα 10: Δείκτης συγκέντρωσης ταννινών των γιγάρτων.

Η συγκέντρωση των ταννινών που προέρχεται από τα γιγάρτα είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις (Γράφημα 10).

Για το έτος 2011 του πειράματος οι επεμβάσεις Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) (dTrep=25,052) και Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) (dTrep=25,084) έδωσαν την μεγαλύτερη συγκέντρωση των ταννινών των γιγάρτων. Στον αντίποδα η επέμβαση με την μικρότερη συγκέντρωση των ταννινών των γιγάρτων ήταν η επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) (dTrep=18,513). Οι επεμβάσεις μεταξύ τους παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Κομματά Α., 2013).



Γράφημα 11: Δείκτης συνεισφοράς ταννινών των γιγάρτων/επέμβαση.

Τη μικρότερη επί τοις εκατό συνεισφορά ταννινών των γιγάρτων παρουσιάζει η επέμβαση Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) και ακολουθείται από την επέμβαση Ζ (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο). Τη μεγαλύτερη στατιστικώς σημαντική συνεισφορά συγκριτικά με τις άλλες επεμβάσεις παρουσιάζει η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) (Γράφημα 11).

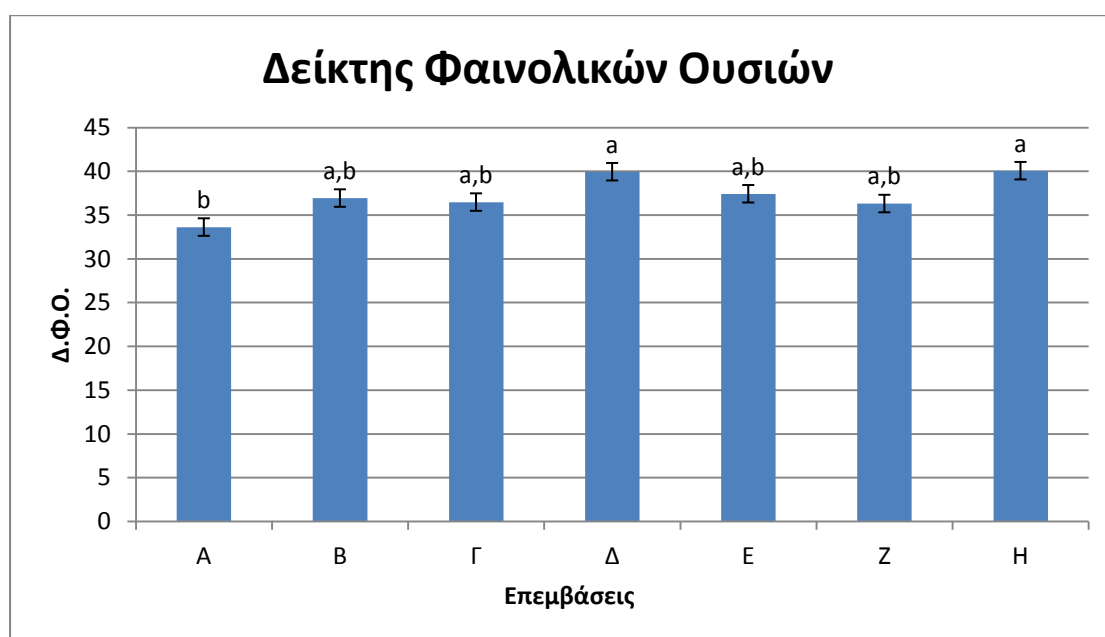
Το 2011 η επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) παρουσίασε την μικρότερη συνεισφορά των ταννινών των γιγάρτων ($dTrep\%=60,836$) και σε συμφωνία με αποτελέσματα της επόμενης χρονιάς η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) παρουσίασε τη μεγαλύτερη ($dTrep\%=76.653$). Οι επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά (Κομματά Α., 2013).

6.1.1 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (Δ.Φ.Ο.)

Πίνακας 10: Δείκτης Φαινολικών Ουσιών

| Επεμβάσεις | Δ.Φ.Ο. | N |
|------------|------------------|---|
| A | 33,621±0,433 b | 6 |
| B | 36,936±0,706 a,b | 6 |
| Γ | 36,476±1,716 a,b | 6 |
| Δ | 39,946±1,710 a | 6 |
| E | 37,428±2,538 a,b | 6 |
| Z | 36,310±0,554 a,b | 6 |
| H | 40,063±0,726 b | 6 |

Για τη σύγκριση των ΔΦΟ, εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), το ± αφορά το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός δειγμάτων (3)*επανάληψεις (2)). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.



Γράφημα 12: Δείκτης Φαινολικών Ουσιών / Επέμβαση

Μεγαλύτερο Δείκτη Φαινολικών Ουσιών παρουσιάζει η επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) και ακολουθεί με μικρή διαφορά η επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο). Μικρότερο Δείκτη Φαινολικών Ουσιών παρουσιάζει η επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας). Τα αποτελέσματα μεταξύ τους παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 12).

Η Κομματά Α. (2013) για το έτος 2011 του πειράματος μέτρησε τον μεγαλύτερο Δ.Φ.Ο. στην επέμβαση Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) 34,9 ενώ το μικρότερο Δ.Φ.Ο. στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) 27,9. Οι επεμβάσεις διέφεραν στατιστικώς. Το 2010 γενικά ο Δ.Φ.Ο. ήταν πιο αυξημένος.

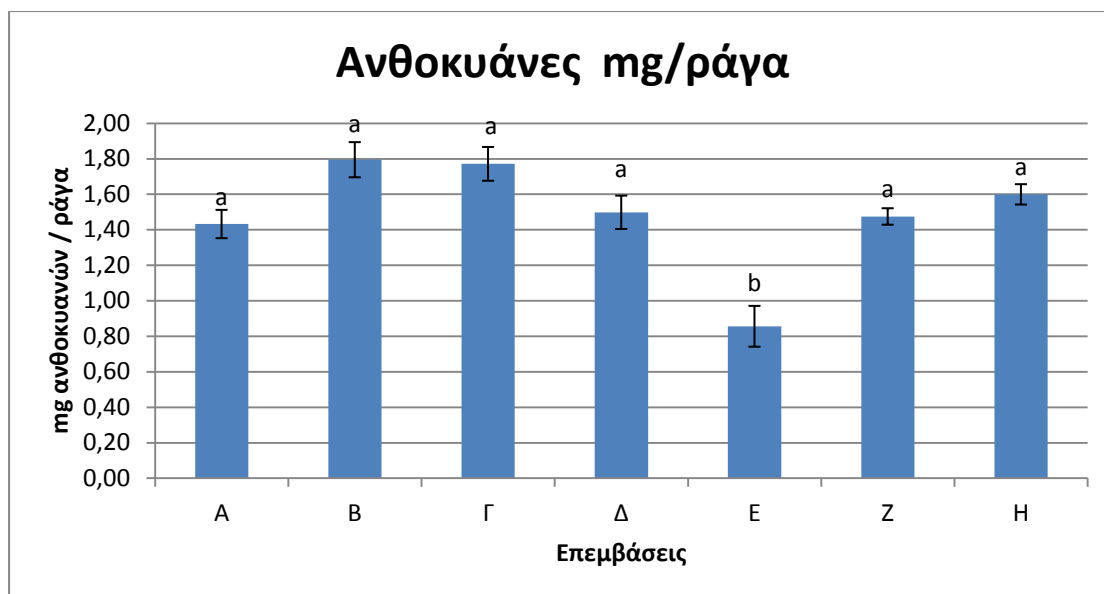
6.2 Προσδιορισμός ολικών ανθοκυανών και φαινολικών (Pand *et al.*, 1996, 2000)

Πίνακας 11: Αποτελέσματα της μεθόδου του Pand

| | Ανθοκυάνες mg/g ράγας | Ανθοκυάνες mg/ράγα | Ολικά φαινολικά /ράγα (au/ράγα) | Ολικά φαινολικά /g ράγας (au/g) | N |
|----------|--------------------------|-----------------------|--|------------------------------------|---|
| A | 0,557±0,023 a,b | 1,432±0,079 a | 2,512±0,087 a | 0,980±0,023 a,b | 9 |
| B | 0,844±0,038 d,e | 1,795±0,098 a | 2,535±0,083 a | 1,195±0,033 c,d | 9 |
| Γ | 0,687±0,038 b,c,d | 1,771±0,095 a | 2,688±0,184 a | 1,035±0,052 b,d | 9 |
| Δ | 0,612±0,036 a,b,c | 1,498±0,093 a | 2,296±0,137 a | 0,936±0,048 a,b | 9 |
| E | 0,467±0,054 a | 0,856±0,115 b | 1,491±0,143 b | 0,822±0,069 a | 9 |
| Z | 0,763±0,020 c,d | 1,475±0,046 a | 2,427±0,039 a | 1,258±0,030 c | 9 |
| H | 0,936±0,028 e | 1,599±0,057 a | 2,354±0,076 a | 1,377±0,035 c | 9 |

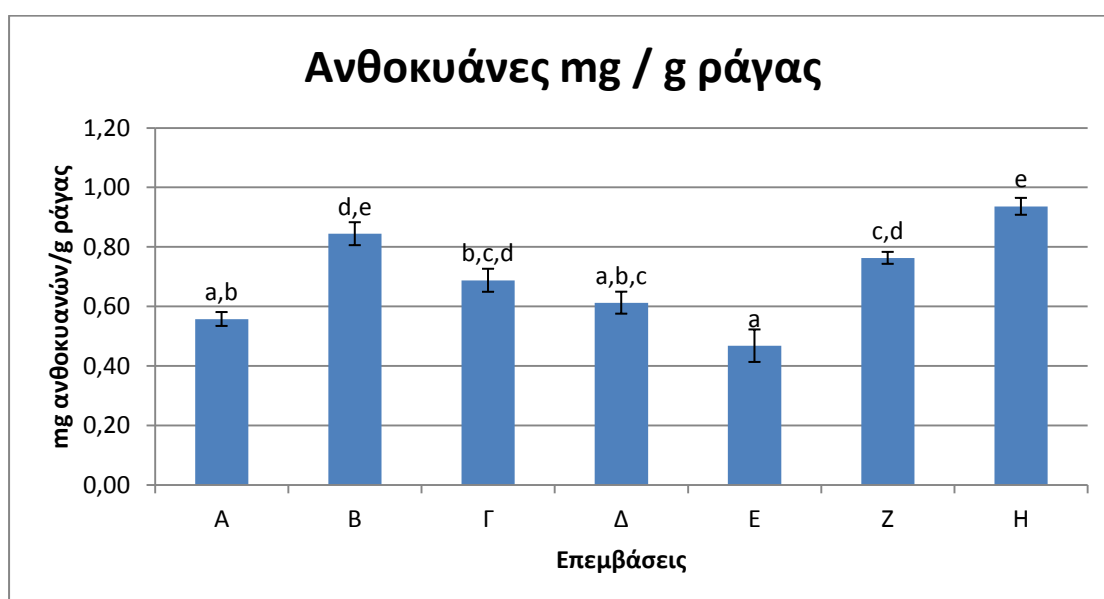
Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου Pand, εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), ± το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός των δειγμάτων (3) *επανάληψεις (3). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.

Με την μέθοδο του Pand προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ανθοκυανών εκφρασμένη ως mg / ράγα. Η επέμβαση όπου παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση ήταν η Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο). Οι υπόλοιπες επεμβάσεις δεν διαφέρουν στατιστικά ως προς την συγκέντρωση των ανθοκυανών ανά ράγα. Εξαιρέση αποτελεί η επέμβαση Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) στην οποία μετρήθηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση (Γράφημα 13).



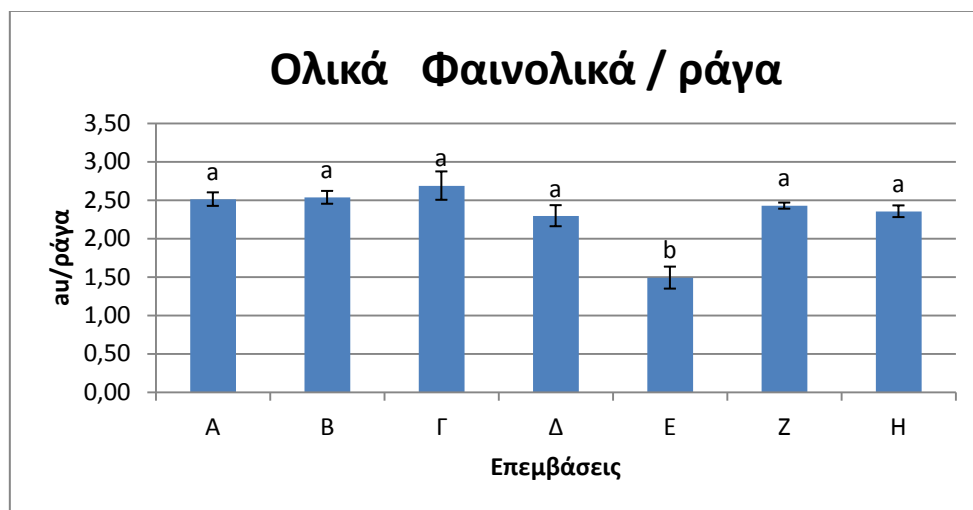
Γράφημα 13: Συγκέντρωση Ανθοκυανών εκφρασμένη σε mg/ράγα.

Στη συνέχεια η συγκέντρωση των ανθοκυανών εκφράζεται ως mg ανθοκυανών ανά g ράγας. Η επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή και ακολουθεί η B (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) που ανήκει στην ίδια στατιστική ομάδα.. Οι επεμβάσεις μεταξύ τους παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος η επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) έδωσε τη μικρότερη συγκέντρωση ανθοκυανών ανά g ράγας (Γράφημα 14).



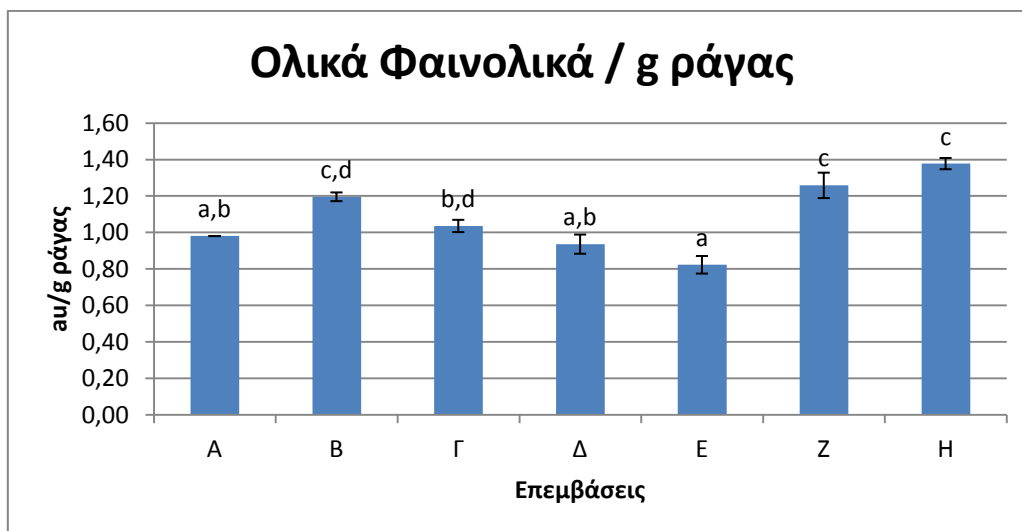
Γράφημα 14: Συγκέντρωση Ανθοκυανών εκφρασμένη σε mg / g ράγας.

Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ανά ράγα είναι μεγαλύτερη στην επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο), αλλά όλες οι υπόλοιπες επεμβάσεις εκτός της Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) ανήκουν στην ίδια στατιστική ομάδα (Γράφημα 15).



Γράφημα 15: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών au / ράγα.

Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών εκφρασμένη ως μονάδες απορρόφησης ανά g ράγας είναι μεγαλύτερη για την επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) που ανήκει στην ίδια στατιστική ομάδα με την επέμβαση Ζ (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο). Επέμβαση με την μικρότερη συγκέντρωση φαινολικών ανά g ράγας είναι η Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο). Οι επεμβάσεις μεταξύ τους παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 16).



Γράφημα 16: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών εκφρασμένη ως au ανά g ράγας.

Το επόμενο έτος του πειράματος (2011) μεγαλύτερη συγκέντρωση ανθοκυανών (mg/g ράγας και mg/ράγα) καθώς και μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών (mg/g ράγας αλλά και mg/ράγα) παρουσίασε η επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας). Μικρότερη συγκέντρωση ανθοκυανών (mg/g ράγας και mg/ράγα) αλλά και μικρότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών (mg/g ράγας και mg/ράγα) παρουσίασε η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Όλες οι επεμβάσεις μεταξύ τους και για όλες τις αναλύσεις που αναφέρθηκαν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά (Κομματά Α., 2013).

6.3 Methyl cellulose

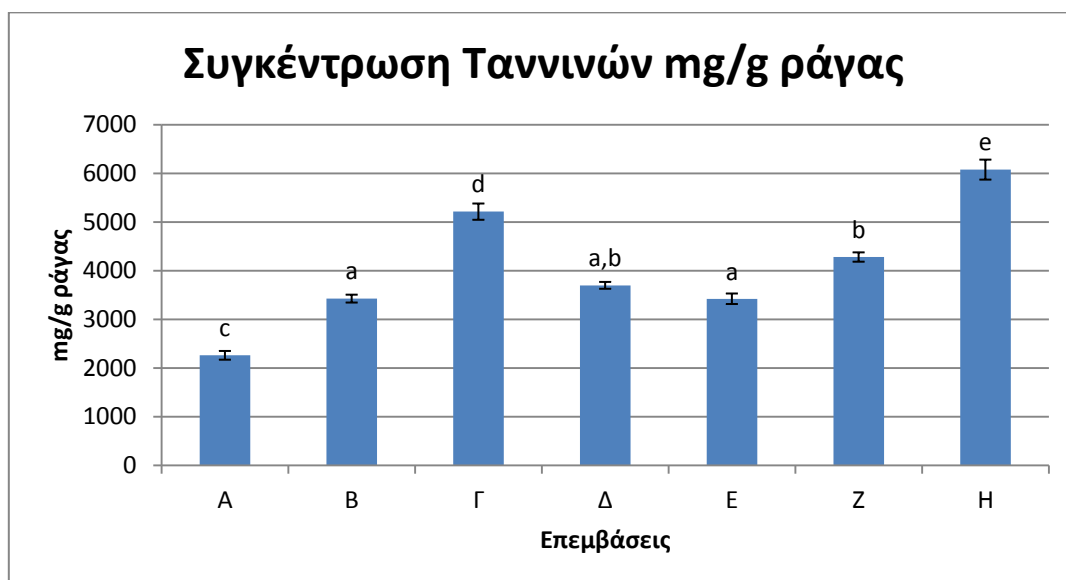
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των ταννινών των ραγών που μετρήθηκαν με τη μέθοδο «methyl cellulose». Η συγκέντρωση εκφράζεται ως mg/g ράγας και mg/ράγα.

Πίνακας 12: Συγκέντρωση ταννινών

| | Συγκέντρωση Ταννινών mg/g ράγας | Συγκέντρωση Ταννινών mg/ράγα | N |
|----------|---------------------------------|------------------------------|---|
| A | 2258,483±89,674 c | 5752,15±218,887 a | 9 |
| B | 3423,997±80,973 a | 7280,93±206,303 a,b,c | 9 |
| Γ | 5211,485±167,256 d | 13802,41±893,126 e | 9 |
| Δ | 3696,471±70,348 a,b | 8842,45±134,661 c,d | 9 |
| E | 3421,091±107,826 a | 6415,94±229,367 a,b | 9 |
| Z | 4278,539±95,968 b | 8163,57±120,252 b,c | 9 |
| H | 6075,063±205,392 e | 10153,36±310,590 d | 9 |

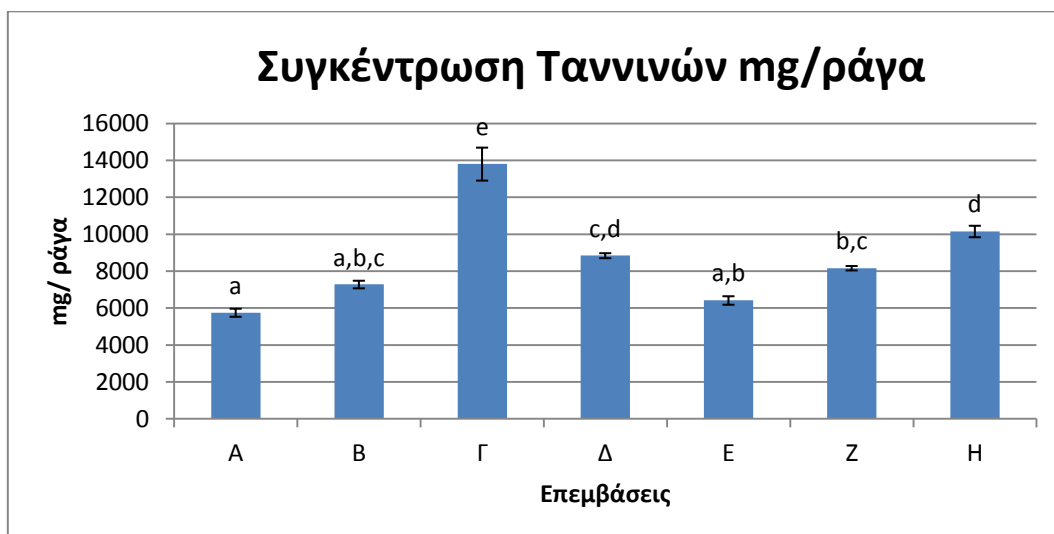
Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου Methyl cellulose εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), το ± αφορά το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός των δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (3)). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.

Οι συγκεντρώσεις των ταννινών εκφρασμένες ως mg/g ράγας παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) χαρακτηρίζεται από την μεγαλύτερη ποσότητα ολικών ταννινών. Η μικρότερη ποσότητα ταννινών παρατηρήθηκε στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) (Γράφημα 17).



Γράφημα 17: Συγκέντρωση ταννινών εκφρασμένη ως mg ανά g ράγας.

Στην επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) παρατηρείται η μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών εκφρασμένη ως mg ανά ράγα ενώ η επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) εμφανίζει την μικρότερη συγκέντρωση. Οι επεμβάσεις μεταξύ τους διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά (Γράφημα 18).



Γράφημα 18: Συγκέντρωση ταννινών εκφρασμένη σε mg ανά ράγα.

Την επόμενη χρονιά του πειράματος (2011) η μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών (mg/g ράγας και mg/ράγα) μετρήθηκε στην επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο), ενώ η μικρότερη στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Οι επεμβάσεις διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά (Κομματά Α., 2013).

6.4 DMAC - Προσδιορισμός Φλαβανολών και Προανθοκυανιδίων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των προκυανιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου «DMAC» (4-διμεθυλαμινο-κινναμωμική αλδεύδη) και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

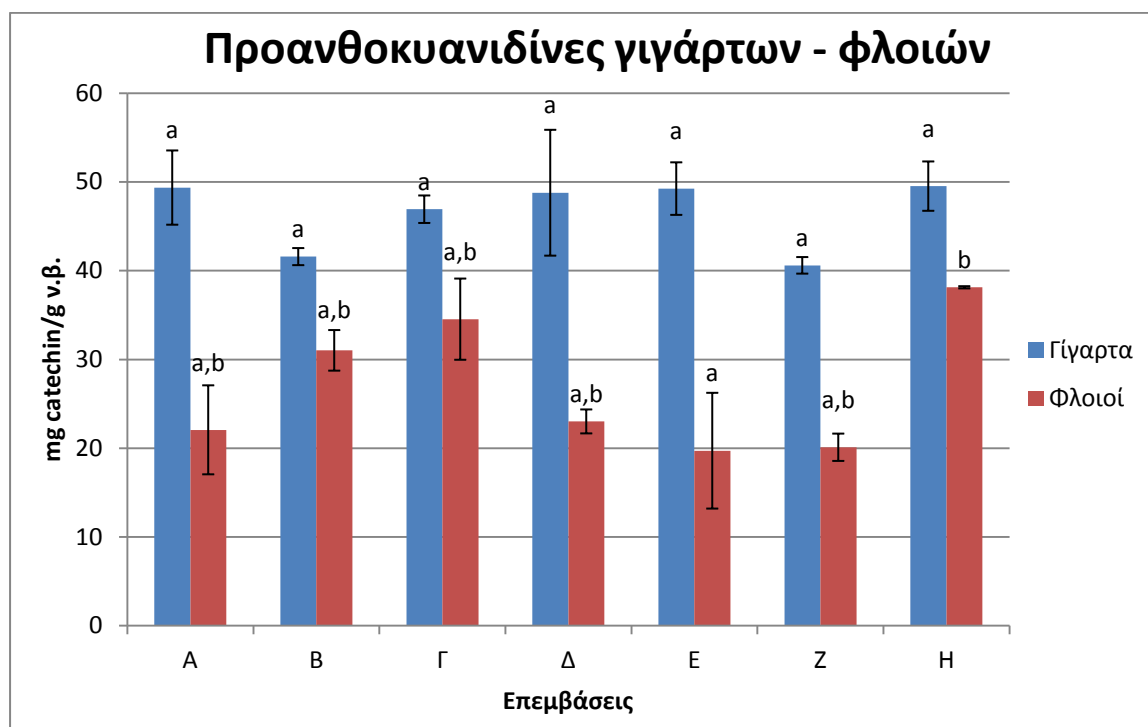
Πίνακας 13: Συγκέντρωση προανθοκυανιδίων (mg catechin/g)

| Επεμβάσεις | Προανθοκυανιδίνες γιγάρτων (mg κατεχίνης / g v.β. γιγάρτων) | Προανθοκυανιδίνες φλοιών (mg κατεχίνης / g v.β. φλοιών) | N |
|------------|---|---|---|
| A | 49,358±4,183 a | 22,061±5,015 a,b | 6 |
| B | 41,580±0,963 a | 31,015±2,286 a,b | 6 |
| Γ | 46,920±1,550 a | 34,531±4,574 a,b | 6 |
| Δ | 48,779±7,090 a | 23,008±1,350 a,b | 6 |
| E | 49,242±2,959 a | 19,708±6,522 a | 6 |
| Z | 40,596±0,933 a | 20,096±1,539 a,b | 6 |
| H | 49,523±2,780 a | 38,121±0,123 b | 6 |

*Για τη σύγκριση της συγκέντρωσης σε προανθοκυανιδίνες σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, Για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), Το ± αφορά το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός των δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (2)). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.*

Στα εκχυλίσματα γιγάρτων η συγκέντρωση των προανθοκυανιδίων εκφράζεται ως mg κατεχίνης ανά g νωπού βάρους γιγάρτων και εμφανίζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Ακολουθεί η επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) με μικρή διαφορά. Μικρότερη συγκέντρωση παρατηρείται στην επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) αν τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 19).

Στα εκχυλίσματα των φλοιών η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) επίσης παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ η επέμβαση Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) την μικρότερη. Τα αποτελέσματα για τους φλοιούς παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 19).



Γράφημα 19: Συγκέντρωση προανθοκυανιδίων γιγάρτων και φλοιών εκφρασμένη ως mg κατεχίνης ανά g νωπού βάρους.

Την επόμενη χρονιά του πειράματος (2011) η μεγαλύτερη συγκέντρωση προανθοκυανιδίων των γιγάρτων (39,488 mg κατεχίνης /g νωπού βάρους) βρέθηκε στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας). Ταυτόχρονα στην ίδια επέμβαση μετρήθηκε και η μικρότερη συγκέντρωση προανθοκυανιδίων των φλοιών (12,938 mg κατεχίνης /g νωπού βάρους). Η επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) παρουσίασε την μικρότερη συγκέντρωση προανθοκυανιδίων των γιγάρτων (26,905 mg κατεχίνης /g νωπού βάρους) και η επέμβαση Ζ (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) την μεγαλύτερη συγκέντρωση προανθοκυανιδίων των φλοιών (19,409 mg κατεχίνης /g νωπού βάρους). Οι συγκεντρώσεις των προανθοκυανιδίων των γιγάρτων διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ενώ των φλοιών όχι (Κομμάτα Α.,

2013). Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι κατά το έτος 2010 οι συγκεντρώσεις στα γίγαρτα και στους φλοιούς ήταν μεγαλύτερες.

6.5 DPPH - μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

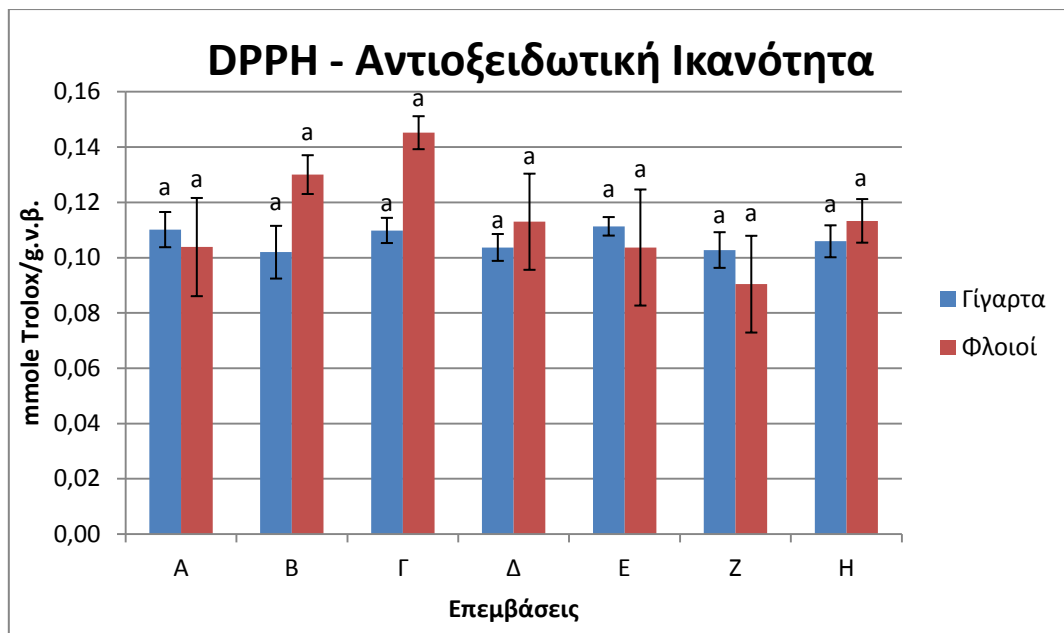
Η αντιοξειδωτική ικανότητα στα εκχυλίσματα γιγάρτων και φλοιών εκφράζεται ως mmol Trolox / g νωπού βάρους γιγάρτων και φλοιών. Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει τα αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου.

Πίνακας 14: Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων φλοιών και γιγάρτων

| Επεμβάσεις | Αντιοξειδωτική ικανότητα γιγάρτων (mmole Trolox / g v. β. γιγάρτων) | Αντιοξειδωτική ικανότητα φλοιών (mmole Trolox / g v. β. φλοιών) | N |
|------------|--|--|---|
| A | 0,110±0,006368 a | 0,103±0,017759 a | 6 |
| B | 0,101±0,009536 a | 0,130±0,007013 a | 6 |
| Γ | 0,109±0,004552 a | 0,145±0,005964 a | 6 |
| Δ | 0,103±0,004860 a | 0,112±0,017393 a | 6 |
| E | 0,111±0,003347 a | 0,103±0,020993 a | 6 |
| Z | 0,102±0,006452 a | 0,090±0,017505 a | 6 |
| H | 0,105±0,005783 a | 0,113±0,007893 a | 6 |

Για τη σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), το ± είναι το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός των δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (2)). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.

Στα γίγαρτα η επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) παρουσιάζει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ενώ η επέμβαση B (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) την μικρότερη αν και τα αποτελέσματα μεταξύ τους δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στους φλοιούς, η επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) έδωσε την μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ την μικρότερη η επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο). Και στους φλοιούς τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν σημαντικά στατιστικά (Γράφημα 20).



Γράφημα 20: Αντιοξειδωτική ικανότητα γιγάρτων και φλοιών εκφρασμένη σε mmole Trolox ανά g νωπού βάρους γιγάρτων και φλοιών αντίστοιχα.

Την επόμενη χρονιά του πειράματος (2011) η αντιοξειδωτική ικανότητα των γιγάρτων ήταν μεγαλύτερη (0,114 mmole trolox/g) στην επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας). Η μικρότερη αντιοξειδωτική δράση μετρήθηκε στην επέμβαση Δ (0,097 mmole Trolox/ g). Οι επεμβάσεις διέφεραν μεταξύ τους στατιστικά. Όσον αφορά τους φλοιούς, η επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) παρουσίασε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (0.091 mmole trolox/g) ενώ η επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) την μικρότερη (0,074 mmole Trolox/ g). Οι επεμβάσεις δεν είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Κομματά Α., 2013). Σε σχέση με τις μετρήσεις του 2010 η αντιοξειδωτική ικανότητα των γιγάρτων κυμάνθηκε στα ίδια περίπου επίπεδα για τις επεμβάσεις. Στους φλοιούς όμως το 2010 η αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν μεγαλύτερη για το σύνολο των επεμβάσεων.

6.6 Ολικές Ταννίνες με Βρασμό - μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες φλοιών και γιγάρτων

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των ολικών ταννινών εκφρασμένες ως g κατεχίνης / g νωπού βάρους γιγάρτων και φλοιών αντίστοιχα.

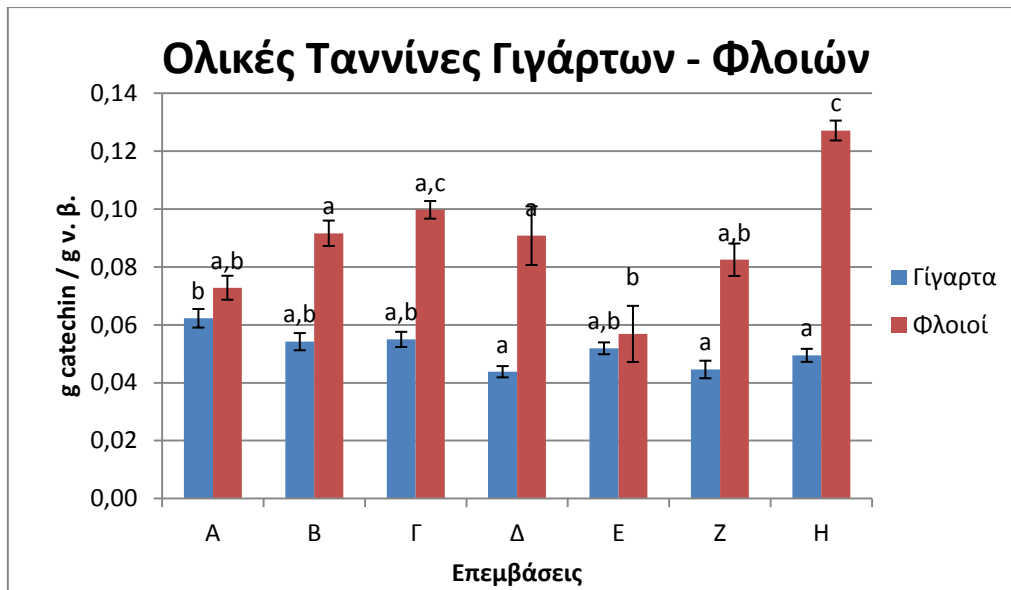
Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις ολικών ταννινών γιγάρτων και φλοιών εκφρασμένες ως g κατεχίνης ανά g νωπού βάρους γιγάρτων και φλοιών αντίστοιχα.

| Επεμβάσεις | Ολικές ταννίνες γιγάρτων (g κατεχίνης / g ν.β. γιγάρτων) | Ολικές ταννίνες φλοιών (g κατεχίνης / g ν.β. φλοιών) |
|------------|---|---|
| A | 0,062±0,003 b | 0,072±0,004 a,b |
| B | 0,054±0,002 a,b | 0,091±0,004 a |
| Γ | 0,054±0,002 a,b | 0,099±0,003 a,c |
| Δ | 0,043±0,001 a | 0,090±0,010 a |
| E | 0,051±0,002 a,b | 0,056±0,009 b |
| Z | 0,044±0,003 a | 0,082±0,005 a,b |
| H | 0,049±0,002 a | 0,127±0,003 c |

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των ολικών ταννινών σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA, οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), το ± αφορά το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός των δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (2)). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.

Στα γιγάρτα η επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία περισσότερων ταννινών. Στον αντίποδα, η επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) παρουσιάζει την μικρότερη συγκέντρωση. Τα αποτελέσματα των επεμβάσεων διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά (Γράφημα 21).

Στους φλοιούς η επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) εμφανίζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ακολουθούμενη από την επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο). Η επέμβαση με την μικρότερη συγκέντρωση είναι η E (διπλάσια δόση θειικού καλίου). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 21).



Γράφημα 21: Συγκέντρωση ολικών ταννινών εκφρασμένη σε g κατεχίνης ανά g νεπού βάρους γιγάρτων και φλοιών αντίστοιχα.

Η Κομματά Α. (2013) μέτρησε για το έτος 2011 την μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών ταννινών (0,075) g κατεχίνης / g γιγάρτων στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας). Μικρότερη συγκέντρωση ολικών ταννινών μετρήθηκε στην επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) (0,055 g κατεχίνης / g γιγάρτων και ακολουθεί η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) (0,056 g κατεχίνης / g γιγάρτων. Οι επεμβάσεις παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Στους φλοιούς η μεγαλύτερη συγκέντρωση μετρήθηκε στην επέμβαση Ζ (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) (0,075 g κατεχίνης / g φλοιών) ενώ η μικρότερη συγκέντρωση στην επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) (0,055 g κατεχίνης / g φλοιών. Για τους φλοιούς δεν βρέθηκε να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων. Οι συγκεντρώσεις ολικών ταννινών των επεμβάσεων για τα γιγάρτα ήταν αυξημένες για το έτος 2011 σε σχέση με το 2010 ενώ για τους φλοιούς ισχύει το αντίθετο (το έτος 2010 οι συγκεντρώσεις ήταν μεγαλύτερες).

6.6.1 Δείκτης Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού Ταννινών

Για τον υπολογισμό του δείκτη του μέσου βαθμού πολυμερισμού των ταννινών χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα των μεθόδων μέτρησης των «ολικών ταννινών» στα εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων και της μεθόδου «DMAC». Ο Δείκτης Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού προκύπτει από το λόγο των δυο συγκεντρώσεων που

μετρήθηκαν με τη βοήθεια των παραπάνω μεθόδων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

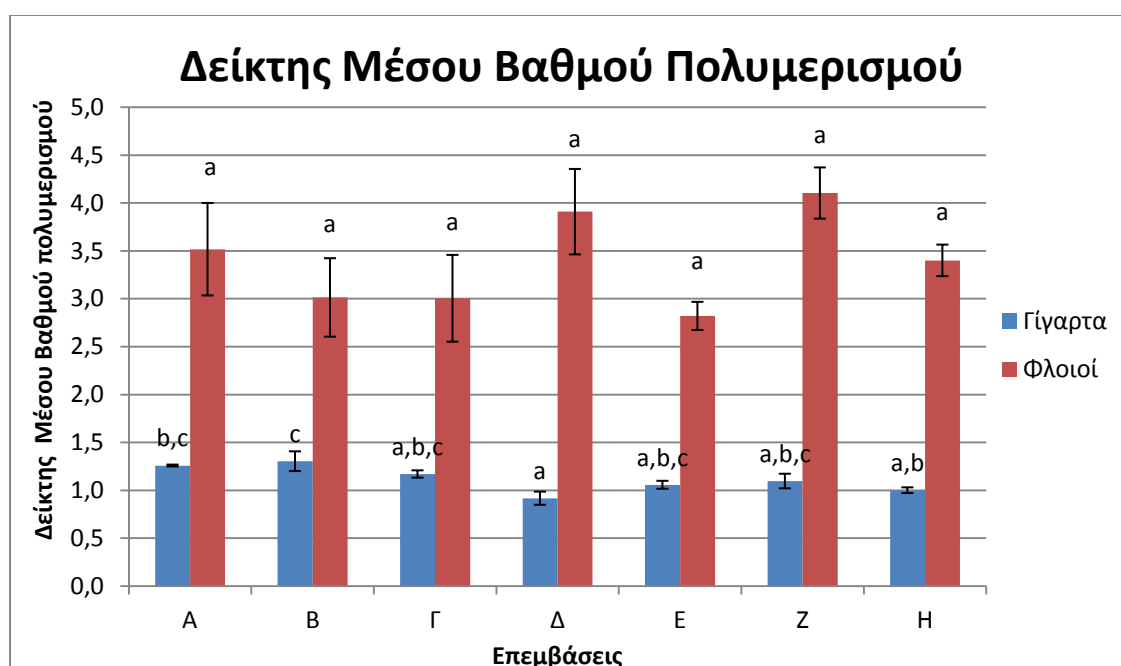
Πίνακας 16: Δείκτης Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού ταννινών.

| Επεμβάσεις | Δείκτης Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού Γίγαρτα | Δείκτης Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού Φλοιοί | N |
|------------|---|--|---|
| A | 1,258333±0,010138 b,c | 3,517333±0,482866 a | 6 |
| B | 1,303667±0,103086 c | 3,013667±0,409674 a | 6 |
| Γ | 1,170333±0,038251 a,b,c | 3,005000±0,453033 a | 6 |
| Δ | 0,917333±0,068718 a | 3,909333±0,446091 a | 6 |
| E | 1,057667±0,041378 a,b,c | 2,820667±0,146922 a | 6 |
| Z | 1,096667±0,076167 a,b,c | 4,104000±0,267381 a | 6 |
| H | 1,001000±0,029816 a,b | 3,401000±0,164502 a | 6 |

*Για τη σύγκριση του Δείκτη Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3)*επαναλήψεις (2)). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.*

Στα γίγαρτα ο δείκτης μέσου βαθμού πολυμερισμού είναι μεγαλύτερος για την επέμβαση B (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο). Τον μικρότερο λόγο στα γίγαρτα παρουσιάζει η επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) ενώ οι επεμβάσεις μεταξύ τους παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 22).

Στους φλοιούς η επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) παρουσιάζει τον μεγαλύτερο δείκτη βαθμού πολυμερισμού ενώ η επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) εμφανίζει τον μικρότερο, χωρίς να υπάρχει μεταξύ των επεμβάσεων στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 22).



Γράφημα 22: Δείκτης Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού.

Το έτος 2011 ο Δείκτης Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού στα γίγαρτα παρουσίασε μεγαλύτερη τιμή στην επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) (2,03) και μικρότερη στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) (1,56). Στους φλοιούς μεγαλύτερη τιμή εμφάνισε η επέμβαση Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) (4,78) ενώ μικρότερη η επέμβαση Ζ (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) (3,85). Οι υπολογισμοί είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά τόσο στους φλοιούς όσο και στα γίγαρτα (Κομματά Α., 2013).

6.7 Ταννίνες φλοιών και γιγάρτων (Methyl cellulose)

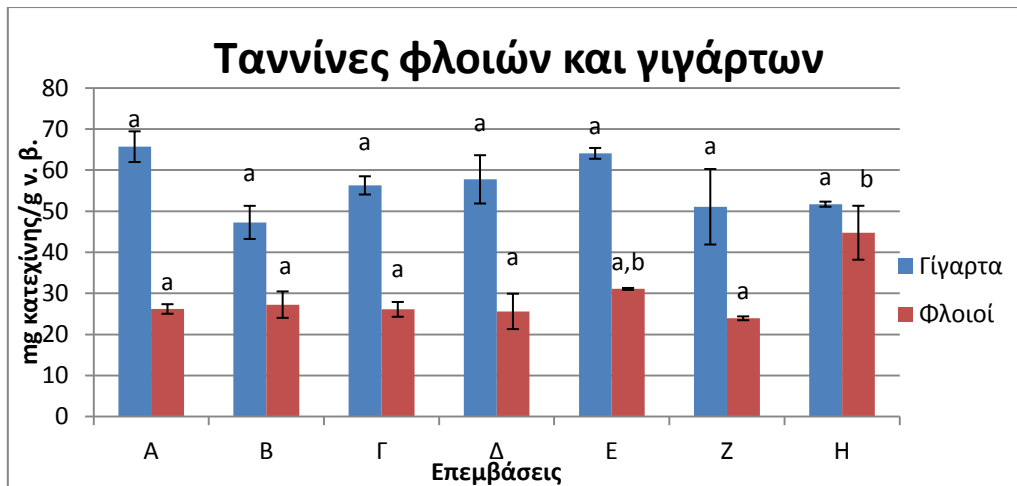
Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα της μεθόδου (μg κατεχίνη / g νωπού βάρους γιγάρτων και φλοιών).

Πίνακας 17: Συγκέντρωση ταννινών στα γίγαρτα και φλοιούς εκφρασμένη σε mg κατεχίνης / g νωπού βάρους φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα.

| Επεμβάσεις | Methyl-cellulose mg κατεχίνης / g νωπού βάρους γιγάρτων | Methyl-cellulose mg κατεχίνης / g νωπού βάρους φλοιών | N |
|------------|--|--|---|
| A | 65,721±3,737 a | 26,199±1,165 a | 6 |
| B | 47,279±4,036 a | 27,253±3,220 a | 6 |
| Γ | 56,293±2,218 a | 26,103±1,800 a | 6 |
| Δ | 57,765±5,880 a | 25,610±4,310 a,b | 6 |
| E | 64,092±1,318 a | 31,085±0,234 a | 6 |
| Z | 51,090±9,194 a | 23,925±0,469 a | 6 |
| H | 51,717±0,621 a | 44,764±6,565 b | 6 |

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της methyl cellulose σε εκχυλίσματα φλοιών & γιγάρτων εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), το ± αφορά το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός των δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (2)). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των ταννινών στα γίγαρτα η επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ η επέμβαση B (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) την μικρότερη. Οι επεμβάσεις δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στους φλοιούς η επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) εμφανίζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών, η οποία διαφέρει στατιστικώς από όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Επέμβαση με την μικρότερη συγκέντρωση ταννινών στον φλοιό είναι η Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) (Γράφημα 23).



Γράφημα 23: Συγκέντρωση ταννινών γιγάρτων και φλοιών εκφρασμένα σε mg κατεχίνης ανά g νωπού βάρους γιγάρτων και φλοιών αντίστοιχα.

Την επόμενη χρονιά του πειράματος (2011) η επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) εμφάνισε την μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών γιγάρτων (84,874 mg κατεχίνης ανά g νωπού βάρους γιγάρτων) ενώ η επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) την μικρότερη (67,543 mg κατεχίνης ανά g νωπού βάρους γιγάρτων). Στους φλοιούς η επέμβαση Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) η μεγαλύτερη συγκέντρωση (37,106 mg κατεχίνης ανά g νωπού βάρους φλοιών) παρατηρήθηκε στην επέμβαση Β ενώ η μικρότερη (21,923 mg κατεχίνης ανά g νωπού βάρους φλοιών) στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) (Κομματά Α., 2013).

6.8 Ανθοκυάνες φλοιών με HPLC

Με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) προσδιορίστηκαν οι μονογλυκοζίτες της δελφινιδίνης, κυανιδίνης, πετουνιδίνης, παιονιδίνης και μαλβιδίνης, καθώς και των ακυλιωμένων ανθοκυανών του φλοιού, του οξικού και κουμαρικού εστέρα της μαλβιδίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα mg μαλβιδίνης / g νωπού βάρους φλοιών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 18.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα των ανθοκυανών των φλοιών εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg μαλβιδίνης ανά g νωπού βάρους φλοιών.

| | Delphinidin | Cyanidin | Petunidin | Peonidin | Malvidine | M. ac. | M. coum. | N |
|----------|--------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|-----------------|----------|
| A | 1,745±0,346 a | 0,255±0,057 a | 1,993±0,299 a,b | 1,739±0,136 a | 19,686±0,433 a,b | 0,383±0,080 a | 4,236±0,070 a | 3 |
| B | 2,151±0,204 a | 0,353±0,019 a | 2,280±0,168 a,b | 1,958±0,018 a | 20,580±0,856 a | 0,320±0,007 a | 4,192±0,086 a | 3 |
| Γ | 2,356±0,729 a | 0,428±0,189 a | 2,451±0,612 a | 2,056±0,563 a | 20,378±1,548 a,b | 0,327±0,019 a | 3,947±0,460 a | 3 |
| Δ | 2,460±0,574 a | 0,418±0,124 a | 2,486±0,450 a | 1,990±0,358 a | 18,509±1,678 a,b | 0,306±0,045 a | 2,875±0,072 a | 3 |
| E | 1,007±0,147 a | 0,132±0,013 a | 1,204±0,105 b | 0,949±0,071 a | 14,005±1,569 b | 0,208±0,017 a | 3,767±1,077 a | 3 |
| Z | 1,538±0,258 a | 0,241±0,021 a | 1,837±0,240 a,b | 1,589±0,018 a | 20,127±0,178 a,b | 0,252±0,026 a | 3,867±0,295 a | 3 |
| H | 1,751±0,020 a | 0,223±0,011 a | 2,020±0,067 a,b | 1,544±0,142 a | 21,771±0,758 a | 0,337±0,034 a | 5,067±0,383 a | 3 |

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης HPLC για τις ανθοκυάνες εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), το ± αφορά το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός δειγμάτων (3)). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.

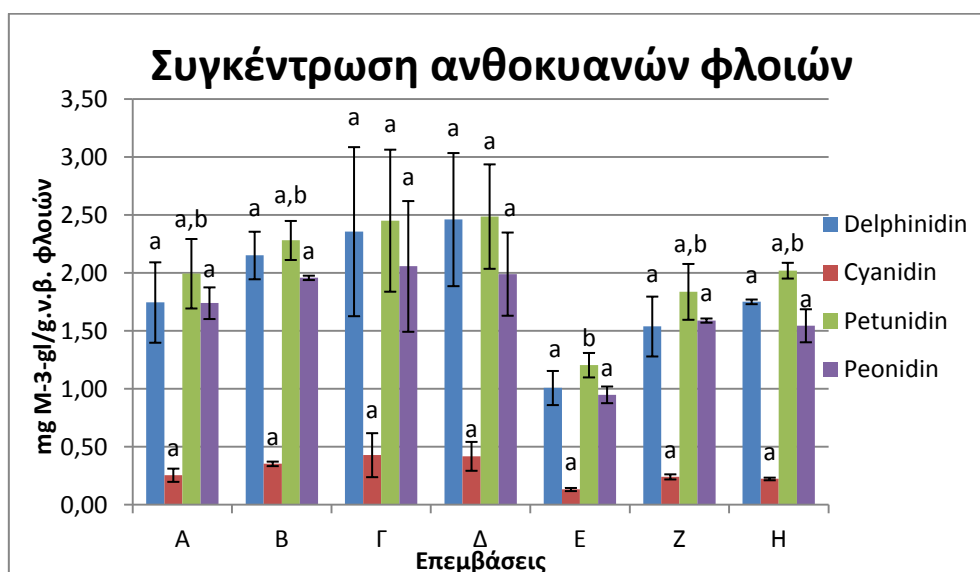
Για τον μονογλυκοζίτη της δελφινιδίνης οι επεμβάσεις Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) και Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) εμφανίζουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Μικρότερη συγκέντρωση εμφανίζει η επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο). Οι επεμβάσεις δεν διαφέρουν σημαντικά στατιστικώς (Γράφημα 24).

Ο μονογλυκοζίτης της κυανιδίνης βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο), ενώ στην επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) σε μικρότερη. Στα αποτελέσματα δε βρέθηκε καμία στατιστική διαφορά (Γράφημα 24).

Η συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της πετουινιδίνης συμβαδίζει με εκείνη της δελφινιδίνης που παρουσιάστηκε παραπάνω, δηλαδή οι επεμβάσεις Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) και Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) χαρακτηρίζονται από τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενώ η επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) από την μικρότερη. Οι επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά (Γράφημα 24).

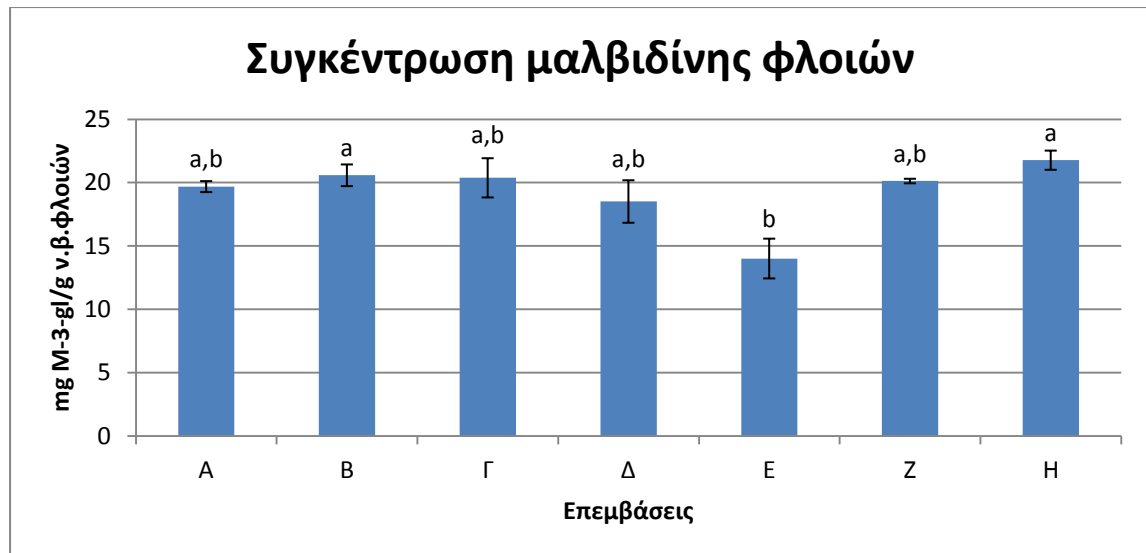
Η συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της παιονιδίνης συμβαδίζει με εκείνη της κυανιδίνης. Η επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ η επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό

κάλιο) την μικρότερη. Οι επεμβάσεις δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 24).



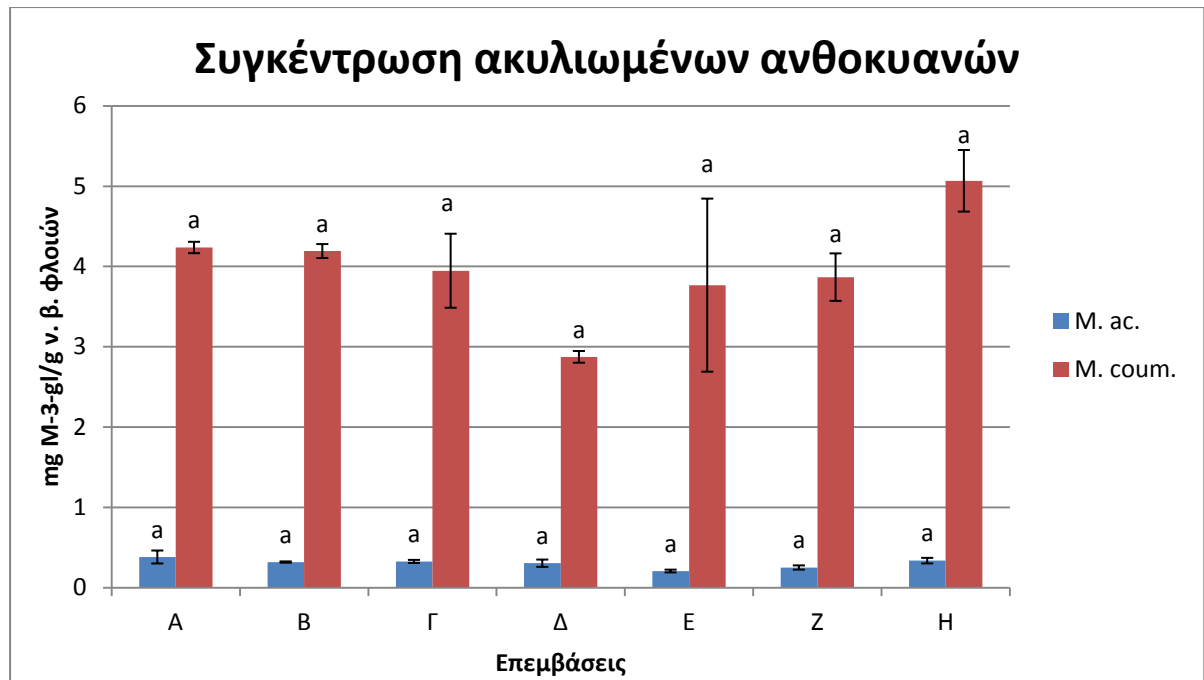
Γράφημα 24: Ανθοκυάνες φλοιών εκφρασμένες σε ισοδύναμα mg μαλβιδίνης ανά g νωπού βάρους φλοιών.

Όσον αφορά τον μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης, ήταν η ανθοκυάνη με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλες τις επεμβάσεις. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Στην ίδια στατιστική ομάδα με την επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) ανήκει και η επέμβαση Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) με εξίσου μεγάλη συγκέντρωση μαλβιδίνης. Αντίθετα η επέμβαση Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θεικό κάλιο) παρουσίασε την μικρότερη συγκέντρωση. Οι επεμβάσεις μεταξύ τους, έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 25).



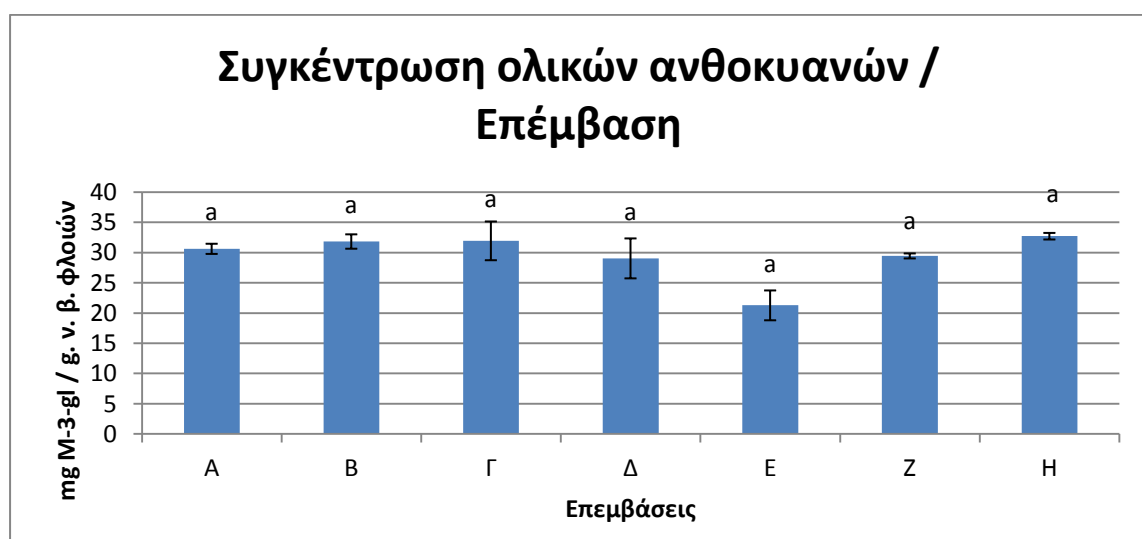
Γράφημα 25: Συγκέντρωση μαλβιδίνης φλοιών εκφρασμένη σε ισοδύναμα μαλβιδίνης (mg μαλβιδίνης ανά g νωπού βάρους φλοιών).

Στις ακυλιωμένες ανθοκυάνες των φλοιών περιέχονται, ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης (*M. ac.*) και ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (*M. coum.*). Ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) ενώ σε μικρότερη στην επέμβαση Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θεικό κάλιο). Παρόλα αυτά οι επεμβάσεις δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) και σε μικρότερη στην επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θεικό κάλιο). Τα αποτελέσματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά όπως και στην προηγούμενη περίπτωση (Γράφημα 26).



Γράφημα 26: Ακυλιωμένες ανθοκυάνες φλοιών εκφρασμένες σε ισοδύναμα mg μαλβιδίνης ανά g νωπού βάρους φλοιών.

Όσο αφορά την ολική συγκέντρωση των ανθοκυανών που προκύπτει από το άθροισμα των συγκεντρώσεων των επιμέρους ανθοκυανών δεν διαφέρει στατιστικώς σημαντικά ανάμεσα στις επεμβάσεις. Παρόλα αυτά η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η επέμβαση με την μικρότερη συγκέντρωση είναι η Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) (Γράφημα 27).



Γράφημα 27: Συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών φλοιών εκφρασμένες σε ισοδύναμα mg μαλβιδίνης ανά g νωπού βάρους φλοιών.

Την επόμενη χρονιά του πειράματος (2011) η μεγαλύτερη συγκέντρωση δελφινιδίνης υπολογίστηκε στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) και η μικρότερη στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές. Η πετουνιδίνη παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Α και την μικρότερη στην επέμβαση Η. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές ανάμεσα στις επεμβάσεις. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση της παιονιδίνης βρίσκεται στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) και η μικρότερη στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται επίσης στατιστικά σημαντικές. Την μεγαλύτερη συγκέντρωση μαλβιδίνης παρατηρείται στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) και η μικρότερη στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Οι διαφορές θεωρούνται επίσης στατιστικά σημαντικές. Ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) και σε μικρότερη στην επέμβαση Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο). Οι διαφορές θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) και την μικρότερη στην επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο). Ωστόσο οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές (Κομματά Α., 2013).

6.9 Φαινολικά γιγάρτων HPLC

Με την βοήθεια της HPLC προσδιορίστηκαν οι ολιγομερείς φαινολικές ενώσεις στα γίγαρτα και στους φλοιούς. Οι ενώσεις που μετρήθηκαν ήταν οι παρακάτω: γαλλικό οξύ, κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης (ECG), γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), διμερείς προκυανιδίνες Β1 και Β2, τριμερής προκυανιδίνη C1. Στα εκχυλίσματα των φλοιών μετρήθηκαν επιπλέον και οι φλαβανόλες κερσετίνη, μυρισετίνη, καμπεφρόλη και ρουτίνη. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των παραπάνω φαινολικών ενώσεων στα γίγαρτα.

Πίνακας 19: Συγκέντρωση ολιγομερών φαινολικών συστατικών των γιγάρτων (mg / g νωπού βάρους γιγάρτων).

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων σε εκχυλίσματα γιγάρτων εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), το ± αφορά το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός των δειγμάτων (3 *επαναλήψεις (1)). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.

Οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών των γιγάρτων παρουσιάζονται στο γράφημα 27 ομαδοποιημένες. Πιο αναλυτικά παρουσιάζεται: η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος, το άθροισμα των συγκεντρώσεων της κατεχίνης και της επικατεχίνης, το άθροισμα των συγκεντρώσεων των διμερών προκυανιδινών B1, B2 και του τριμερούς C1 και τέλος το άθροισμα των συγκεντρώσεων των ECG και EGCG.

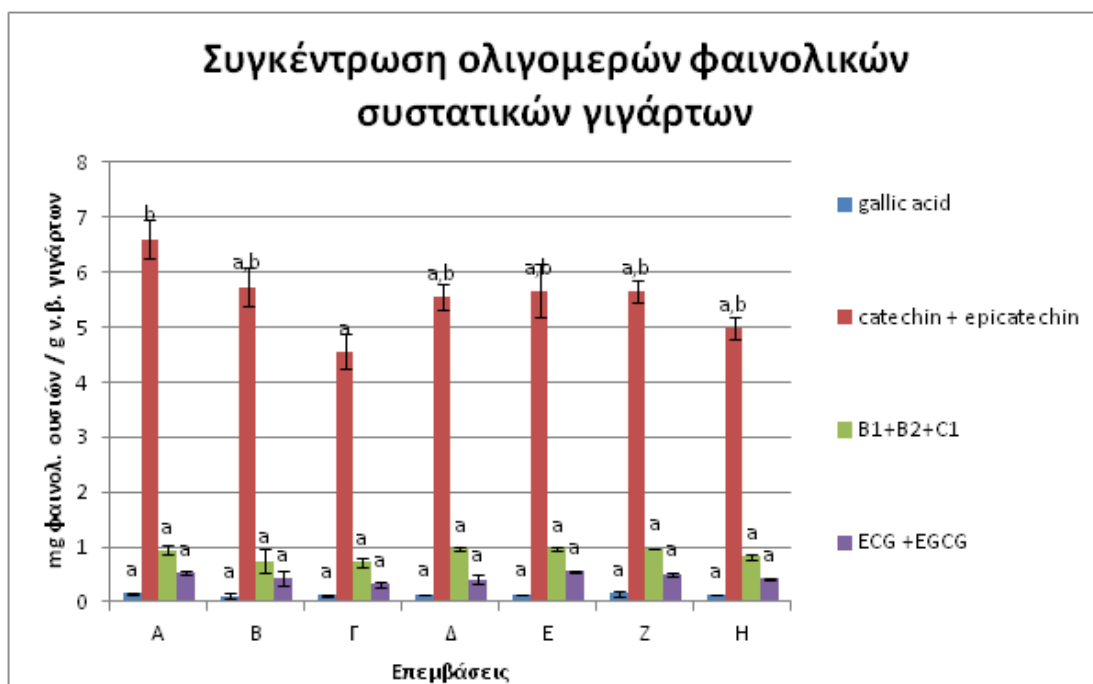
Το γαλλικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) και σε μικρότερη στην επέμβαση B (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο). Οι επεμβάσεις δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

| | gallic acid/v.β. γιγάρτων | catechin + epicatechin / v.β. γιγάρτων | B1+B2+C1 / v.β. γιγάρτων | ECG +EGCG / v.β. γιγάρτων | Total Phenolics / v.β. γιγάρτων | N |
|----------|---------------------------|--|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|---|
| A | 0,158±0,0106 a | 6,605±0,354 b | 0,941±0,085 a | 0,526±0,026 a | 8,231±0,477 b | 3 |
| B | 0,112±0,036 a | 5,729±0,358 a,b | 0,745±0,227a | 0,434±0,139 a | 7,021±0,762 a,b | 3 |
| Γ | 0,121±0,0080 a | 4,550±0,318 a | 0,722±0,072 a | 0,324±0,056 a | 5,719±0,430 a | 3 |
| Δ | 0,143±0,0017 a | 5,550±0,223 a,b | 0,955±0,029 a | 0,410±0,072 a | 7,059±0,268 a,b | 3 |
| E | 0,147±0,0003 a | 5,659±0,482 a,b | 0,974±0,043 a | 0,554±0,008 a | 7,334±0,516 a,b | 3 |
| Z | 0,149±0,0367 a | 5,642±0,204 a,b | 0,978±0,002 a | 0,508±0,031 a | 7,278±0,270 a,b | 3 |
| H | 0,130±0,0043 a | 4,979±0,189 a,b | 0,825±0,050 a | 0,428±0,019 a | 6,363±0,225 a,b | 3 |

Η κατεχίνη και η επικατεχίνη παρουσιάζουν την μέγιστη συγκέντρωση τους στην επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) και την ελάχιστη στην επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο). Οι επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά (Γράφημα 28) .

Οι διμερείς προανθοκυανιδίνες B1, B2 και το τριμερές C1 παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) και την μικρότερη στην επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο). Τα αποτελέσματα δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Γράφημα 28).

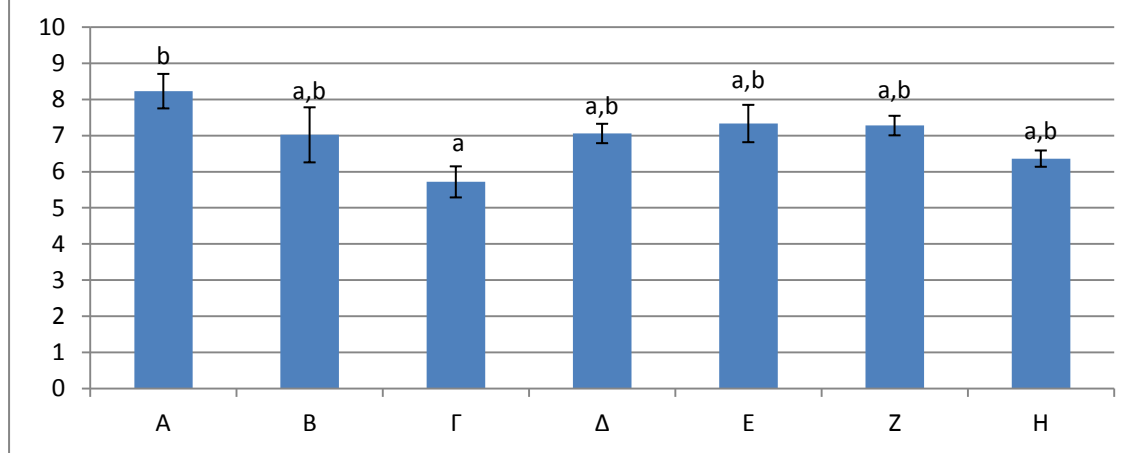
Το άθροισμα των συγκεντρώσεων της ECG και της EGCG είναι μεγαλύτερο στην επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) ενώ στην Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) την μικρότερη. Και αυτά τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά (Γράφημα 28).



Γράφημα 28: Συγκεντρώσεις ολιγομερών φαινολικών συστατικών γιγάρτων εκφρασμένα σε mg φαινολικών ουσιών ανά g νωπού βάρους γιγάρτων.

Η ολική συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών των γιγάρτων συμβαδίζει με την συγκέντρωση της κατεχίνης και επικατεχίνης καθώς οι παραπάνω ενώσεις βρίσκονται σε περίσσεια στα γιγάρτα. Η επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών ουσιών ενώ η επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) την μικρότερη. Τα αποτελέσματα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 29).

Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ουσιών στα γιγάρτα



Γράφημα 29: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών γιγάρτων εκφρασμένα σε mg φαινολικών ουσιών ανά g νωπού βάρους γιγάρτων.

Τα αποτελέσματα της επόμενης χρονιάς του πειράματος (2011) δείχνουν το γαλλικό οξύ να βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) και σε μικρότερη στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Το άθροισμα της επικατεχίνης και κατεχίνης παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) και την μικρότερη στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Το άθροισμα των συγκεντρώσεων των B1, B2 και C1, παρουσιάζει την μεγαλύτερη τιμή στην επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) και την μικρότερη στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Οι EGC και EGCG παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) και την μικρότερη στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις είναι στατιστικά σημαντικές. Το σύνολο των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των γιγάρτων παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) με την επέμβαση B (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) να ακολουθεί και τη μικρότερη στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Οι επεμβάσεις έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

6.10 HPLC Φαινολικά Φλοιών

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα των αναλύσεων των ολιγομερών φαινολικών συστατικών των φλοιών. Όπως και στην περίπτωση των φαινολικών συστατικών των γιγάρτων έτσι και στο γράφημα 29 τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως άθροισμα των επιμέρους συγκεντρώσεων. Επιπλέον μετρήθηκαν και οι συγκεντρώσεις των φλαβανολών των φλοιών και πιο συγκεκριμένα της κερσετίνης, μυρισετίνης, καμπφερόλης και ρουτίνης (Γράφημα 29).

Πίνακας 20: Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών των φλοιών εκφρασμένα σε mg φαινολικών ουσιών ως προς g νωπού βάρους των φλοιών.

| | mg gallic acid / g v.β.φλοιών | mg cat + epic / g v.β.φλοιών | B1+B2+C1 /g v.β.φλοιών | ECG+EGCG +EGC /g v.β.φλοιών | mg flavonols / g v.β.φλοιών | N |
|---|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---|
| A | 0,0066±0,0013 a | 0,0350±0,0086 a | 0,0349±0,0006 a,b | 0,0333±0,0049 a,b | 0,1103±0,0278 a | 3 |
| B | 0,0083±0,0004 a | 0,0455±0,0117 a | 0,0382±0,0044 a,b | 0,0159±0,0091 a | 0,1182±0,0218 a | 3 |
| Γ | 0,0071±0,0004 a | 0,0351±0,0073 a | 0,0274±0,0077 a | 0,0359±0,0231 a | 0,1075±0,0080 a | 3 |
| Δ | 0,0064±0,0015 a | 0,0252±0,0143 a | 0,0309±0,0031 a | 0,0642±0,0146 a,b | 0,1039±0,0309 a | 3 |
| E | 0,0088±0,0025 a | 0,0216±0,0071 a | 0,0415±0,0085 a,b | 0,0398±0,0183 a,b | 0,1673±0,0274 a | 3 |
| Z | 0,0094±0,0033 a | 0,0185±0,0026 a | 0,0234±0,0006 a | 0,0346±0,0026 a,b | 0,0895±0,0325 a | 3 |
| H | 0,0129±0,0001 a | 0,0548±0,0003 a | 0,0652±0,0010 b | 0,1193±0,0005 b | 0,1497±0,0029 a | 3 |

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων σε εκχυλίσματα φλοιών εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), το ± αφορά το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός των δειγμάτων (3) *επανάληψεις (1)). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.

Το γαλλικό οξύ παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) και ελάχιστη συγκέντρωση στην επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο). Τα αποτελέσματα δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 30).

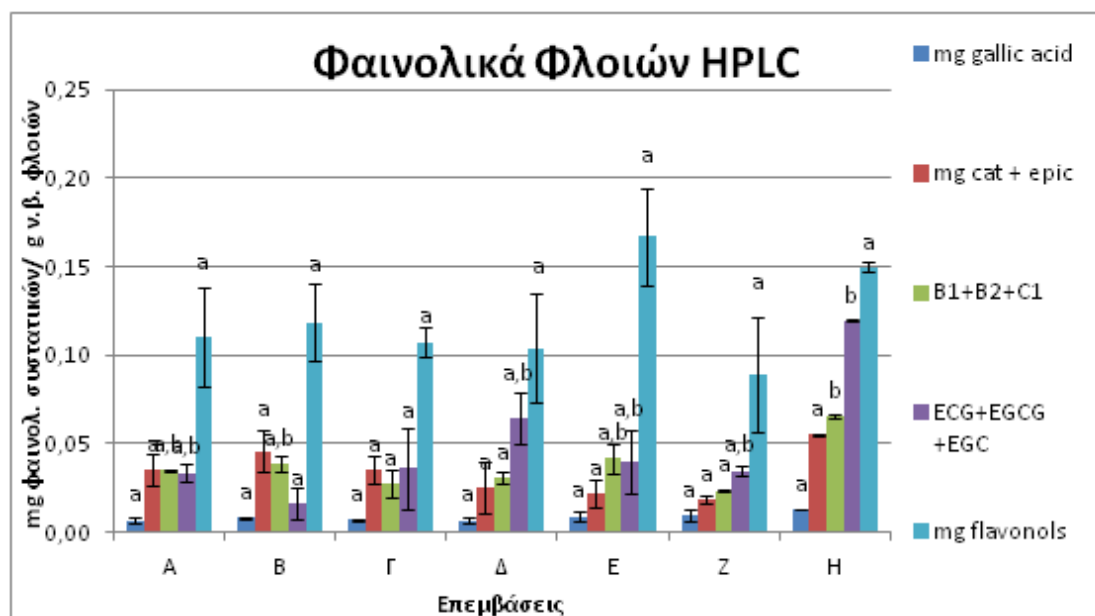
Η κατεχίνη και η επικατεχίνη παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) και την ελάχιστη στην επέμβαση Z

(88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο). Στις επεμβάσεις δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 30).

Οι διμερείς προανθοκυανιδίνες B1, B2 και το τριμερές C1 παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) και τη μικρότερη στην επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο). Τα αποτελέσματα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Γράφημα 30).

Οι ECG και EGCG προστιθέμενες παρουσιάζουν στην επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ στην B (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) με την μικρότερη συγκέντρωση. Σε παραπάνω αποτελέσματα υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 30).

Το άθροισμα των συγκεντρώσεων φλαβονολών των φλοιών (κερσετίνη, μυρισετίνη, καμπερόλη, ρουτίνη) είναι μεγαλύτερο στην επέμβαση E (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) ενώ μικρότερο στην επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο). Οι επεμβάσεις δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά (Γράφημα 30).



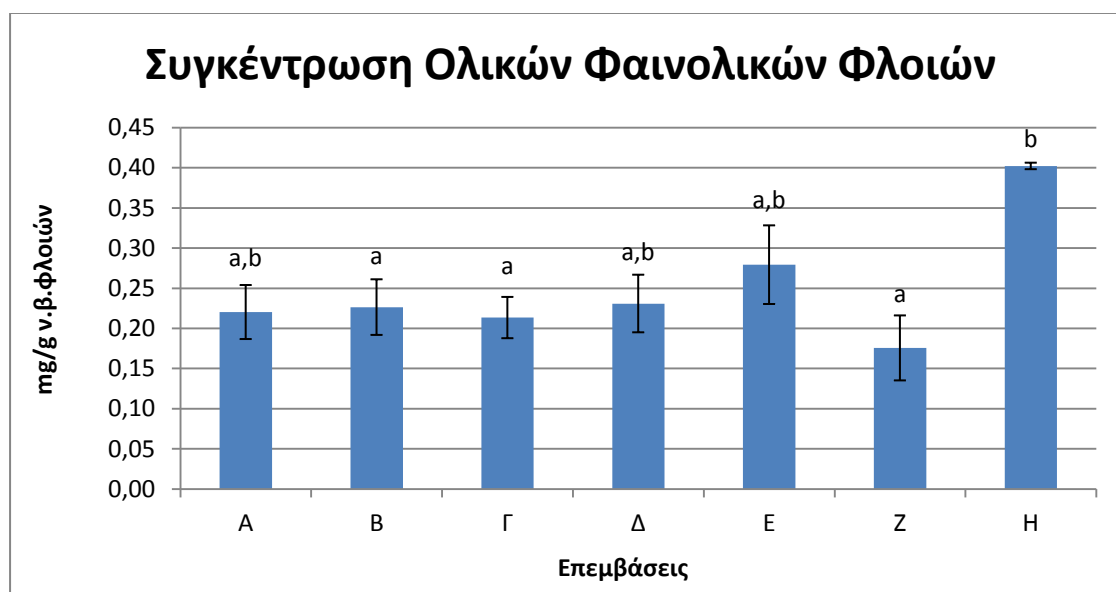
Γράφημα 30: Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών φλοιών εκφρασμένα σε mg φαινολικών ουσιών ανά g νωπού βάρους φλοιών.

Πίνακας 21: Συγκέντρωση Ολικών Φαινολικών συστατικών των φλοιών εκφρασμένα σε mg φαινολικών ουσιών ως προς το νωπό βάρος των φλοιών.

| Επεμβάσεις | Ολικά Φαινολικά φλοιών mg/ g ν.β.φλοιών | N |
|------------|--|---|
| A | 0,220±0,175 | 3 |
| B | 0,226±0,213 | 3 |
| Γ | 0,213±0,220 | 3 |
| Δ | 0,230±0,226 | 3 |
| E | 0,279±0,230 | 3 |
| Z | 0,175±0,279 | 3 |
| H | 0,402±0,402 | 3 |

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων σε εκχυλίσματα φλοιών εφαρμόστηκε η ανάλυση ANOVA. Οι τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη είναι στατιστικά σημαντικές (Tukey's test, για επίπεδο σημαντικότητας < 0,05), το ± αφορά το τυπικό σφάλμα, N είναι ο αριθμός των δειγμάτων (3) *επαναλήψεις (1)). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη.

Η συνολική συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών των φλοιών παρουσιάζεται στο γράφημα 30. Όπως φαίνεται, η επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ η επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) την μικρότερη. Τα αποτελέσματα των επεμβάσεων παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (Γράφημα 31).



Γράφημα 31: Ολική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών φλοιών εκφρασμένα σε mg φαινολικών ουσιών ανά g νωπού βάρους φλοιών.

Η Κομματά Α. (2013) μέτρησε για την επόμενη χρονιά του πειράματος το άθροισμα των συγκεντρώσεων των Β1, Β2 και C1 και βρήκε την μεγαλύτερη τιμή στην επέμβαση Δ (88gN-25gP-38gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) και την μικρότερη στην επέμβαση Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο). Οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. ΕGC και ΕGCG ήταν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) και σε μικρότερη στην επέμβαση Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο). Ωστόσο οι διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Το σύνολο των φλαβονολών παρουσιάζει την μεγαλύτερη στην επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) και την μικρότερη στην επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο). Οι διαφορές δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Όσον αφορά τη συνολική συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των φλοιών παρουσιάζει την μεγαλύτερη τιμή στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) με ακόλουθη την επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) και τη μικρότερη στην επέμβαση Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο). Οι διαφορές ωστόσο δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

6.11 Συντελεστής Pearson

Στη συγκεκριμένη μελέτη ο προσδιορισμός των ταννινών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δύο μεθόδων (ταννίνες με βρασμό και μέτρηση ύστερα από καταβύθιση με μεθυλο-κυτταρίνη). Ταυτόχρονα, τα ολιγομερή φαινολικά συστατικά στα εκχυλίσματα φλοιών προσδιορίστηκαν με HPLC. Οι ταννίνες σαν μεγαλύτερα πολυμερή δεν διαχωρίζονται περνώντας από τη στήλη με αποτέλεσμα να συνεκλούνται όλες μαζί και να εμφανίζονται στο τέλος του χρωματογραφήματος σαν μεγάλες κορυφές. Καθώς μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια αξιόπιστη μέθοδος μέτρησης ταννινών με HPLC θεωρήθηκε ενδιαφέρον να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα των φωτομετρικών μεθόδων με αυτά που προέκυψαν από την HPLC. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της στατιστικής ανάλυσης και πιο συγκεκριμένα τον συντελεστή συσχέτισης Pearson. Από την HPLC υπολογίζεται το άθροισμα των συγκεντρώσεων mg/g νωπού βάρους φλοιών των φαινολικών ουσιών

που απορροφούν στα 280nm και οι οποίες εκλούνται μετά τα ολιγομερή φαινολικά και μέχρι τα 100 min. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 22: Τιμές του συντελεστή Pearson

| Επεμβάσεις | Ταννίνες με βρασμό φλοιοί | Methyl cellulose φλοιοί | Hplc mg φαινολικών ουσιών/g ν. β. φλοιών |
|----------------|---------------------------|-------------------------|--|
| A | 0,0728 | 26,199 | 0,109 |
| B | 0,0916 | 27,253 | 0,108 |
| Γ | 0,0997 | 26,103 | 0,105 |
| Δ | 0,0908 | 25,610 | 0,126 |
| E | 0,0568 | 31,085 | 0,111 |
| Z | 0,0825 | 23,925 | 0,086 |
| H | 0,1271 | 44,764 | 0,252 |
| | | | |
| Pearson | 0,7496 | 0,9536 | Συντελεστής συσχέτισης για την κάθε μέθοδο με τα αποτελέσματα της HPLC |
| Pearson | 0,6017 | | Συντελεστής συσχέτισης για τις δύο μεθόδους μεταξύ τους |

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 τον παραπάνω πίνακα μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι ο συντελεστής Pearson μεταξύ των μεθόδων ταννίνες με βρασμό και της ανάλυσης HPLC εμφανίζει συσχέτιση 90%. Επίσης, η τιμή του συντελεστή ανάμεσα στα αποτελέσματα της μεθόδου μεθυλο-κυτταρίνης και HPLC εμφανίζει συσχέτιση 99%. Τέλος η τιμή του συντελεστή για τα αποτελέσματα των δύο φωτομετρικών των δύο μεθόδων παρουσιάζει συσχέτιση μικρότερη του 90%.

6.12 Συγκριτική Βιβλιογραφία

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το κάλιο βοηθά στον σχηματισμό των σακχάρων μέσα στην ράγα, ο οποίος είναι απαραίτητος για την βιοσύνθεση των πολυφαινολών, αλλά υπερβολική δόση καλίου μπορεί να μειώσει το τρυγικό οξύ με αποτέλεσμα την αύξηση του pH όπου κι αυτό με την σειρά του επιδρά αρνητικά στην σταθερότητα του χρώματος. Λίπανση καλίου με 60 και 129 g/πρέμνο οδήγησε στη μείωση της ολικής οξύτητας. Συνδυαστική λίπανση Αζώτου και Καλίου (N-K), δεν επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά το μέγεθος της ράγας. Πιο αναλυτικά ο συνδυασμός αζωτούχου και καλιούχου λίπανσης επηρεάζει το χρώμα άμεσα επιδρώντας στις ανθοκυάνες και την σύνθεση των φαινολικών, περισσότερο από ότι επηρεάζει την αύξηση του pH (R. Delgado *et. al.*, 2006).

Η λίπανση με κάλιο, σε εδαφικές συνθήκες με επάρκεια ή υψηλές ποσότητες καλίου, μπορεί να οδηγήσει σε γλεύκη και οίνους με πολύ υψηλό pH, μικρότερη ένταση χρώματος στις ερυθρές ποικιλίες και αρνητική επίδραση στην ποιότητα του παραγόμενου οίνου (Freeman and Kliewer, 1983; Somers, 1977).

Πείραμα σε ράγες της ποικιλίας c.v. Cabernet Sauvignon, προκάλεσε μείωση του μέσου βάρους της ράγας λόγω λίπανσης με 200gN-60gK/πρέμνο (Boonterm *et al.* 2010), όπως απεικονίζεται στο παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 23 : Μείωση του βάρους της ράγας λόγω αύξησης της λίπανσης K-N (Boonterm *et al.* 2010).

| Treatments | Yield (kg/vine) | | Berry per cluster | | Berry weight (g/berry) | |
|------------------|-----------------|-------|-------------------|---------|------------------------|--------|
| | 2005 | 2006 | 2005 | 2006 | 2005 | 2006 |
| Fertilizer (N-K) | | | | | | |
| F1 | 2.33a | 1.08b | 154.37a | 61.21b | 1.22b | 0.93b |
| F2 | 2.23a | 0.93b | 158.58a | 54.55ab | 1.81b | 0.87a |
| F3 | 2.18a | 0.83a | 152.92a | 49.84a | 1.13a | 0.90ab |
| No. of cluster | | | | | | |
| C1 | 1.24 | 0.59a | 157.49a | 64.93b | 1.19a | 0.90a |
| C2 | 2.30b | 0.97b | 154.41a | 54.45a | 1.17a | 0.89a |
| C3 | 3.20c | 1.28c | 153.67a | 46.22a | 1.16a | 0.92a |
| Mean | 2.25 | 0.95 | 155.19 | 55.20 | 1.17 | 0.90 |

In a column and each treatment means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Για το ίδιο πείραμα δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση στο χρώμα της ράγας. Την πρώτη χρονιά του πειράματος (2005), η συγκέντρωση των ανθοκυανών των ραγών κυμάνθηκε από 0,88 mg/g ράγας έως 0,889 mg/g ράγας και την δεύτερη χρονιά (2006) από 0,89 έως 0,90 mg/g ράγας. Επίσης, το 2005 η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών των ραγών κυμάνθηκε από 0,828–0,765 mg/g ράγας και το 2006 από 1,292 έως 1,387 mg/g ράγας. Αυξημένη λίπανση N-K είχε αρνητική επίδραση στο σύνολο των ανθοκυανών και φαινολικών, των οποίων οι συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν είναι οι ακόλουθες: 0.749mg ανθοκυανών/ράγα, 0.819 mg ανθοκυανών/g ράγα, ολικά φαινολικά 0.869au/ράγα και ολικά φαινολικά 0.955au/g ράγα. 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. Η μαλβιδίνη ήταν η επικρατούσα ανθοκυάνη, ενώ οι τιμές των επιμέρους ανθοκυανών και για αυξανόμενες ποσότητες λίπανσης καλίου κυμάνθηκαν: 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 (Boonterm *et al.*, 2010).

Ο Delgado *et al.* (2004), αναφέρει ότι για τη λίπανση με κάλιο (0, 60 και 120g K₂O/πρέμνο σε K₂SO₄) σε πρέμνα της ποικιλίας Tempranillo, τα ολικά φαινολικά των φλοιών (εκφρασμένα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος) κυμάνθηκαν από 778 mg/L για τη λίπανση με 0g K₂O/πρέμνο σε K₂SO₄, 992 mg/L, για λίπανση με 60g K₂O/πρέμνο σε K₂SO₄ και 582 mg/L για λίπανση με 120g K₂O/πρέμνο σε K₂SO₄. Η συγκέντρωση των ανθοκυανών 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 επηρέασε 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 (Delgado *et al.*, 2004).

Παρατηρείται θετική επίδραση λίπανσης καλίου σε εδάφη όπου υπάρχει έλλειψη καλίου, όμως, 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).

Για την ποικιλία c.v. Carignane το 1983 ο M. Freeman *et. al.* απέδειξε ότι το κάλιο δεν αυξάνει το βάρος της ράγας. Επίσης, ο J.R. Morris *et. al.* (1987) σε πείραμα εφαρμογής λίπανσης καλίου στην c.v. Cabernet Sauvignon απέδειξε ότι δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά όσον αφορά το βάρος των ραγών, αλλά στις επεμβάσεις που είχε προστεθεί κάλιο αυξήθηκε ο αριθμός ραγών / ταξικαρπία (M. Freeman *et. al.*, 1983).

Τέλος σε πείραμα που έλαβε χώρα στη Βόρεια Ακτή της Καλιφόρνια για την ποικιλία c.v. Pinot Noir για τα έτη 1989 και 1990, αναφέρεται ότι οι ανθοκυάνες των φλοιών, δεν επηρεάστηκαν από την λίπανση με κάλιο, ακόμη κι όταν η περιεκτικότητα του γλεύκους σε κάλιο υπερέβαινε τα 200 mg/L σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης, αναφέρεται ότι η πυκνότητα του χρώματος, η απόχρωση, οι συνολικές ανθοκυάνες, οι ιονισμένες ανθοκυάνες και ο βαθμός ιονισμού, δεν επηρεάστηκαν 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).

7. Συμπεράσματα

Η έρευνα που αφορά στην επίδραση της καλιούχου λίπανσης στα φαινολικά συστατικά της ποικιλίας Αγιωργίτικο για τη χρονιά 2010 οδήγησε στην εξαγωγή των ακόλουθων συμπερασμάτων:

Στην επέμβαση Α (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας), παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών στα γίγαρτα. Οι μετρήσεις επιβεβαιώνονται και από τα αποτελέσματα της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) όπου τα φαινολικά συστατικά των γιγάρτων: κατεχίνη και επικατεχίνη καθώς και το σύνολο των φαινολικών ουσιών των γιγάρτων βρίσκονται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

Η επέμβαση Β (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ανθοκυανών ανά ράγα καθώς, επίσης και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μαλβιδίνης (της πιο άφθονης ανθοκυάνης στο Αγιωργίτικο). Παράλληλα εμφανίζει την μικρότερη συγκέντρωση ταννινών που προέρχονται από τα γίγαρτα και την μεγαλύτερη συγκέντρωση και συνεισφορά ταννινών που προέρχονται από τους φλοιούς. Όμως παρά την σχετική φαινολική ωριμότητα οι ανθοκυάνες ήταν λιγότερο εκχυλίσιμες σε σχέση με τις περισσότερες επεμβάσεις.

Η επέμβαση Γ (88gN-25gP-92gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) παρουσιάζει την μικρότερη εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών. Επίσης παρατηρείται μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συνολικά (φλοιοί και γίγαρτα) αν και η τιμή δεν διαφέρει στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Τέλος παρουσιάζει την μικρότερη συγκέντρωση κατεχίνης, επικατεχίνης και ολικών φαινολικών των γιγάρτων.

Στην επέμβαση Ε (88gN-25gP-76gK/πρέμνο, θειικό κάλιο) η ανίχνευση των ανθοκυανών μέσω της HPLC έδειξε την μικρότερη συγκέντρωση μαλβιδίνης και ολικών ανθοκυανών σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Στα φαινολικά συστατικά των φλοιών οι φλαβανόλες βρίσκονται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση και πάλι σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

Στην επέμβαση Z (88gN-25gP-76gK+Mg/πρέμνο) μετρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών. Έχει την δεύτερη μικρότερη συγκέντρωση και συνεισφορά ταννινών που προέρχονται από τα γιγάρτα και την δεύτερη μεγαλύτερη συγκέντρωση και συνεισφορά ταννινών των φλοιών. Ταυτόχρονα όμως χαρακτηρίζεται από την μικρότερη ποσότητα ολιγομερών φαινολικών ουσιών των φλοιών όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της HPLC όπου η κατεχίνη και επικατεχίνη, οι φλαβανόλες καθώς και τα ολικά φαινολικά των φλοιών βρίσκονται σε μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

Η επέμβαση H (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) έχει τον μικρότερο δείκτη ωρίμανσης και συνεισφοράς των γιγάρτων δηλαδή χαρακτηρίζεται από μεγάλο ποσοστό συμμετοχής των ταννινών των γιγάρτων στο σύνολο των φαινολικών. Έχει επίσης την μικρότερη συγκέντρωση και συνεισφορά των ταννινών των φλοιών. Παρουσιάζει ακόμη τον μεγαλύτερο Δ.Φ.Ο., τις περισσότερες ανθοκυάνες / g ράγας, την μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών / g ράγας και ταννινών / g ράγας. Επίσης παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ολικές ταννίνες, προανθοκυανιδίνες φλοιών και φαινολικών των φλοιών. Τέλος παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών και το μικρότερο μέσο βάρος ράγας και γιγάρτων.

Συμπερασματικά στην επέμβαση A (88gN-25gP/πρέμνο, μάρτυρας) βρίσκεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών των γιγάρτων. Και την επόμενη χρονιά (2011) του πειράματος παρουσίασε την μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών των γιγάρτων (Κομματά A, 2013). Η απουσία καλιούχου λίπανσης αυξάνει τα ολικά φαινολικά των γιγάρτων. Η επέμβαση B (88gN-25gP-46gK/πρέμνο, χλωριούχο κάλιο) την επόμενη χρονιά (2011) του πειράματος παρουσιάζει τη μικρότερη εκχυλισματικότητα ανθοκυανών και τις περισσότερες ολικές ταννίνες των φλοιών (Κομματά A. 2013). Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνεται ότι η λίπανση με 88g N, 25g P, 46g K επηρεάζει θετικά τον σχηματισμό ολικών ταννινών των φλοιών αλλά οι ανθοκυάνες στους φλοιούς εκχυλίζονται πιο δύσκολα συγκριτικά με τις άλλες επεμβάσεις. Την επόμενη χρονιά (2011) στην επέμβαση Z (88gN-25gP-

76gK+Mg/πρέμνο) παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών των φλοιών της ράγας, περισσότερες προανθοκυανιδίνες και ολικές ταννίνες φλοιών (Κομματά Α., 2013). Δηλαδή λίπανση με 88g N, 25g P₂O₅, 76g K₂O+MgO ανά πρέμνο προωμίζει τα φαινολικά των φλοιών των ραγών. Η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) επιβραδύνει την φαινολική ωρίμανση αλλά δημιουργεί μεγάλο φαινολικό δυναμικό. Την επόμενη χρονιά του πειράματος (2011) η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) παρουσίασε ξανά την μικρότερη συγκέντρωση και συνεισφορά των ταννινών των φλοιών και τον μικρότερο δείκτη ωρίμανσης και συνεισφοράς των ταννινών των γιγάρτων δηλαδή την μεγαλύτερη συμμετοχή των ταννινών των γιγάρτων στο σύνολο των φαινολικών. Όμως ανάμεσα στις δύο χρονιές εφαρμογής της λίπανσης η επέμβαση Η (88gN-25gP-152gK+Mg/πρέμνο) παρουσίασε και τις μεγαλύτερες αντιφάσεις. Ενώ το 2010 παρατηρήθηκε ο μεγαλύτερος Δ.Φ.Ο. την επόμενη χρονιά εμφάνισε τον μικρότερο. Το 2010 παρουσίασε τις περισσότερες ανθοκυάνες/ g ράγας, τα περισσότερα ολικά φαινολικά/ g ράγας και τις περισσότερες ταννίνες/ g ράγας ενώ το 2011 συνέβει το αντίθετο. Επίσης το 2010 σημειώθηκε η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές ταννίνες και φαινολικά των φλοιών ενώ την επόμενη χρονιά (2011) παρουσιάστηκε η μικρότερη συγκέντρωση σε όλες τις παραπάνω κατηγορίες φαινολικών (Κομματά Α., 2013). Παρόλο που στην εν λόγω επέμβαση τα συμπεράσματα της μιας χρονιάς κατά μεγάλο ποσοστό είναι εντελώς αντίθετα δεν αυτοαναιρούνται. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η προσθήκη μεγάλης ποσότητας λίπανσης καλίου σε περιπτώσεις όπου η περιεκτικότητα του στο έδαφος είναι επαρκής, έχει αρνητική επίδραση στο χρώμα και στα φαινολικά συστατικά της ράγας (Somers 1977, Freeman and Kliewer 1983, Dundon *et al.* 1984, Mpelasoka *et al.*,2003, Sipiorea *et al.*,2005, Κομματά Α., 2013). Έτσι ενώ το 2010 η λίπανση παρόλο μεγάλη, επέδρασε στα φαινολικά συστατικά οψημίζοντας την ωρίμανση, το 2011 είχε αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των φαινολικών. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που μπορεί να επηρέασε την πορεία των φαινολικών είναι οι καιρικές συνθήκες που επικράτησαν στις δύο χρονιές του πειράματος. Ο τρύγος του 2010 έγινε πρώιμα (02/10/2010) για τα δεδομένα της περιοχής, λόγω πολλών βροχοπτώσεων και κίνδυνου προσβολής των σταφυλιών από τον μύκητα του βοτρώτη (*Botritis cinera*). Ο τρύγος του 2011 έγινε αργότερα πιο κοντά στη συνήθη για την περιοχή ημερομηνία τρυγητού (22/10/2011). Περαιτέρω πειραματισμός είναι απαραίτητος για την εξακρίβωση της επαναληψιμότητας και της ορθότητας των αποτελεσμάτων.

8. Βιβλιογραφία

8.1 Ελληνική Βιβλιογραφία

Καλλίθρακα Σ. (2011). Παραδόσεις ΔΠΜΣ Χημείας Οίνου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Καλύβας Δ. (2009). Εδαφολογία – Αξιολόγηση εδαφών – Τοποκλιματικές Συνθήκες και κρασί, Εκδόσεις ΙΩΝ, Αθήνα

Κομματά Α., (2013). *Μεταπτυχιακή Διατριβή: Μελέτη της επίδρασης της λίπανσης καλίου στα φαινολικά συστατικά των ραγών της ποικιλίας Αγιωργίτικο*, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

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

Κοτσερίδης, Γ. (2005^β). Σημειώσεις Οινολογίας ΙΙ, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων, Αθήνα

Κουράκου–Δραγώνα, Σ. (1998). Θέματα Οινολογίας, Επιστήμη και Τεχνολογία στον τομέα της οινοποιητικής τεχνικής, Εκδόσεις Τροχαλία, Αθήνα

Σταυρακάκης, Μ., Ν. (2010). Αμπελογραφία, Εκδόσεις Τροπή, Αθήνα

Σταυρακάκης, Μ., Ν. (2004^α). Γενική Αμπελουργία, πανεπιστημιακές παραδόσεις. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Σταυρακάκης, Μ., Ν. (2004^β). Ειδική Αμπελουργία. Τόμος ΙΙ: Φυσιολογία και οικολογία της αμπέλου, πανεπιστημιακές παραδόσεις. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Τσιτσίας Κ. (1998). Εδαφολογία, Σχολή Τεχνολόγων Γεωπονίας, ΟΕΔΒ, Αθήνα

Τσιτσίας Κ. (2002). Σημειώσεις Λιπασματολογίας, Σχολή Τεχνολόγων Γεωπονίας Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Λάρισα

Χαρβαλιά, Α. και Μπενά – Τζούρου, Ε. (1981). *Το χρώμα των ερυθρών οίνων από διάφορες ποικιλίες και περιοχές της Ελλάδας*, Ελληνικά Οινολογικά Χρονικά, Τόμος1, pp. 2-25, Ινστιτούτο Οίνου, Αθήνα

Χαρβαλιά, Α. και Μπενά – Τζούρου, Ε. (1982). *Τα φαινολικά συστατικά και το χρώμα των ελληνικών οίνων*, Ελληνικά Οινολογικά Χρονικά, Τόμος2, pp. 1-77, Ινστιτούτο Οίνου, Αθήνα

8.2 Αγγλική Βιβλιογραφία

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

Cortell, J., M. and J. A. Kennedy, (2006). Effect of Shading on Accumulation of Flavonoid Compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot Noir Fruit and Extraction in a Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8510-8520

Delgado R., Martin 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

Dokoozlian, N., K. and W. M. Kliewer, (1996). Influence of Light on Grape Berry Growth and Composition Varies during Fruit Development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121 (5): 869-874.

Downey, M., O., Dokoozlian, N., K. and M. P. Krstic, (2006). Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. ASEV 2005 Phenolics Symposium. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 3: 257-268.

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

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

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.

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

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

Jeandet P., Bessis R., Maume B. F., Meunier P., Peyron D. and Trollat P. (1995) *J. Agric. Food Chem.*

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

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

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

Ribéreau – Gayon, P., Dubourdiou, D., Donéche B. and Lonvaud A. (2006), Handbook of Enology, Vol. 1, The Microbiology of Wine and Vinifications

Ribéreau – Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdiou, D. (2006), Handbook of Enology, Vol. 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments

Ribéreau – Gayon, P. and Stonestreet, E. (1966). *Chimie Anal.*, Vol. 48, Issue 4, pp. 188-192

Ribéreau – Gayon, P. and Glories Y. (1986). *Phenolics in grapes and wine, in Proceedings of the Sixth Australian Wine Industry Technical Conference*, Austr. Ind. Publ., South Aystralia, pp. 247-256

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

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.

Taylor C., Wallace and Giusti M. (2009). *Optimization of the 4-Dimethylaminocinnamaldehyde Assay for Flavanols*. Department of Foodscience and Technology, The Ohio State University.

Ullmann's Agrochemicals (2007). Vol. 1, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

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 pdimethylaminocinnamaldehyde*. J. Int. Sci. Vigne Vin 28, 319-336.

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

Yamane, T., Jeong, S., T., Goto-Yamamoto N., Koshita, Y. and S. Kobayashi, (2006). Effects of Temperature on Anthocyanin Biosynthesis in Grape Berry Skins. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 1: 54-59

Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S. (1995), *Wine analysis and production*, The Chapman and Hall Enology Library, New York