

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Δ.Π.Μ.Σ 'ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ'

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

Επίδραση του ξεφυλλίσματος και του προσανατολισμού των γραμμών
φύτευσης στη χημική σύσταση οίνων *Vitis vinifera* L. cv. Αγιωργίτικο

Μεταπτυχιακή Μελέτη
Άλκηστη Χ. Αναστοπούλου

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Καλλίθρακα Σταματίνα

ΑΘΗΝΑ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Δ.Π.Μ.Σ 'ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ'

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

Επίδραση του ξεφυλλίσματος και του προσανατολισμού των γραμμών
φύτευσης στη χημική σύσταση οίνων *Vitis vinifera* L. cv. Αγιωργίτικο

Μεταπτυχιακή Μελέτη
Άλκηστη Χ. Αναστοπούλου

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Καλλίθρακα Σταματίνα

ΑΘΗΝΑ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Δ.Π.Μ.Σ 'ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ'

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Επίδραση του ξεφυλλίσματος και του προσανατολισμού των γραμμών
φύτευσης στη χημική σύσταση οίνων Vitis vinifera L. cv. Αγιωργίτικο**

Μεταπτυχιακή Μελέτη
Άλκηστη Χ. Αναστοπούλου

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καλλίθρακα Σταματίνα: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κοτρεσίδης Γεώργιος: Αναπληρωτής Καθηγητής Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μπινιάρη Αικατερίνη: Επίκουρη Καθηγήτρια Αμπελουργίας, Τμήματος Επιστήμης και Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Περίληψη

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης δυο καλλιεργητικών/ αμπελουργικών τεχνικών στη χημική σύνθεση των παραγόμενων οίνων. Σε πειραματικό αμπελώνα στην περιοχή της Νεμέας, εφαρμόστηκε αφαίρεση φύλλων (Ξεφύλλισμα) σε πρέμνα της ποικιλίας Αγιωργίτικο, με διαφορετικό προσανατολισμό γραμμών φύτευσης (Νότος-Βορράς και Ανατολή- Δύση). Για κάθε σημείο του ορίζοντα (Νότος, Βορράς, Ανατολή, Δύση), τα μισά φυτά χρησιμοποιήθηκαν ως Ομάδα Ελέγχου όπου δεν πραγματοποιήθηκε ξεφύλλισμα, ενώ στα υπόλοιπα η αφαίρεση φύλλων πραγματοποιήθηκε στο στάδιο μετά την καρπόδεση. Τα σταφύλια της κάθε συνθήκης συλλέχθηκαν και οινοποιήθηκαν ξεχωριστά. Πραγματοποιήθηκαν κλασσικές αναλύσεις στους οίνους και προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών τους ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της εφαρμογής ξεφυλλίσματος και του προσανατολισμού των γραμμών.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές για την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών (Ξεφύλλισμα και Προσανατολισμός) εντοπίζονται μόνο στην περίπτωση της Πτητικής Οξύτητας των οίνων, στο μέσο βαθμό πολυμερισμού (mDP) και στο ποσοστό συμμετοχής των προδελφινιδίων (%P). Ωστόσο ο προσανατολισμός των γραμμών φύτευσης φαίνεται να παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην τιμή της ενεργούς οξύτητας (pH) και στις χρωματικές παραμέτρους των οίνων. Η δυτική έκθεση των πρέμνων ευνοεί τη βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών, όπως τανίνες και ανθοκυάνες, ενώ η εφαρμογή ξεφυλλίσματος φαίνεται να επιδρά κυρίως στη συγκέντρωση και εκχυλισσιμότητα των τανινών.

Λέξεις-Κλειδιά: Ξεφύλλισμα, Προσανατολισμός, Γραμμές Φύτευσης, Φαινολικά Συστατικά, Αγιωργίτικο, Νεμέα,

Abstract

The purpose of this study is to investigate the interaction between two common practices in the chemical composition of Agiorgitiko wines, in the wine region of Nemea. Leaf removal at berry set was applied in vines with different row orientation (South, North, East, West). Defoliation was applied only in half of the plants of each row, while the rest were used as a control team. For each case, grapes were collected and vinified separately. During the experimental phase, the wines were analyzed (classical

techniques, determination of phenolic compounds) in order to confirm an interaction between leaf removal and row orientation.

Statistically significant differences for the interaction of the two factors were identified only in the case of Volatile Acidity, mean degree of polymerization (mDP) and prodelfinidins (%P). Row orientation plays an important part in pH and in color characteristics of the wine, such as Intensity and Hue. West direction seems to increase the concentration of phenolic compounds, like anthocyanins and tannins, while leaf removal enhances extraction of tannins.

Key -Words: Leaf Removal, Row Orientation, Phenolic compounds, Agiorgitiko, Nemea

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οινολογίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Με την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οινολογίας Καλλίθρακα Σταματίνα για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση της όλο αυτό το διάστημα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Οινολογίας κ. Γ.Κοτσερίδη που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στο Εργαστήριο Οινολογίας.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην κα. Νίκη Προξενιά και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια τους κατά την διεξαγωγή των ερευνητικών πειραμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, για την στήριξη και ενίσχυση τους καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract	4
Ευχαριστίες.....	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Το σταφύλι	10
1.2 Οι Φαινολικες Ενώσεις.....	11
1.2.1 Ανθοκυάνες	16
1.2.2 Τανίνες.....	18
1.2.3 Παράγοντες που επιδρούν στη σύνθεση και συσσώρευση των φαινολικών ουσιών στο σταφύλι.....	21
1.2.4 Πολυφαινολική ωριμότητα και εκχύλιση φαινολικών ουσιών	24
1.3 Καλλιεργητικές Τεχνικές.....	25
1.4 Ξεφύλλισμα	26
1.5 Προσανατολισμός Γραμμών Φύτευσης	27
1.6 Η ποικιλία Αγιωργίτικο.....	29
1.6.1 Αμπελογραφικοί χαρακτήρες και φαινολογικά στάδια.....	30
1.6.2 Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά	30
2. Υλικά και Μέθοδοι	32
2.1 Σκοπός Πειράματος	32
2.2 Οينوποίηση.....	33
2.3 Αναλύσεις στον οίνο	33
2.3.1 Ενεργός Οξύτητα-pH	33
2.3.2 Ογκομετρούμενη ή Ολική Οξύτητα.....	34
2.3.3 Πτητική Οξύτητα (Π.Ο)	34
2.3.4 Αλκοολικός Τίτλος	35
2.3.5 Ανάγοντα Σάκχαρα	36
2.3.6 Ένταση-Απόχρωση.....	37
2.3.7 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)	37
2.3.8 Ολικά Φαινολικά με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu.....	38
2.3.9 Προσδιορισμός τανινών με τη μέθοδο Harbertson.....	39
2.3.10 Προσδιορισμός Ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	40

2.3.11 Προσδιορισμός του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) τανινών με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	41
2.4 Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων	43
3. Αποτελέσματα	44
3.1 Κλασσικές Αναλύσεις	44
3.1.1 Ενεργός Οξύτητα pH.....	45
3.1.2 Ογκομετρούμενη Οξύτητα	46
3.1.3 Πτητική Οξύτητα.....	47
3.1.4 Αλκοολικό Τίτλος	48
3.1.5 Ανάγοντα Σάκχαρα	49
3.2 Χρωματικά Χαρακτηριστικά	50
3.2.1 Ένταση	50
3.2.2 Απόχρωση.....	51
3.3 Ολικά Φαινολικά Χαρακτηριστικά	52
3.3.1 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)	52
3.3.2 Ολικά Φαινολικά (Μέθοδος Folin-Ciocalteu).....	53
3.4 Συγκέντρωση τανινών με τη μέθοδο Harbertson	54
3.5 Συγκέντρωση Ανθοκυανών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC).....	56
3.5.1 Συγκέντρωση Μαλβιδίνης.....	57
3.5.2 Συγκέντρωση Κουμαρικού και Οξικού Εστέρα της Μαλβιδίνης.....	58
3.5.3 Συγκέντρωση Δελφινιδίνης, Πετουνιδίνης και Πεονιδίνης	59
3.6 Μέσος Βαθμός Πολυμερισμού (mDP) με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	61
4. Συζήτηση	64
5. Συμπεράσματα	67
6. Βιβλιογραφία	68

Λίστα Πινάκων

Πίνακας 1: Πρόγραμμα έκλουσης για το προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC	40
Πίνακας 2: Πρόγραμμα έκλουσης για το προσδιορισμό του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) με HPLC	42
Πίνακας 3: Πρότυπες καμπύλες αναφοράς των τερματικών και επεκτατικών νομάδων.....	42

Πίνακας 4: Ενεργός οξύτητα (pH), ογκομετρούμενη οξύτητα (Ο.Ο), πτητική οξύτητα (Π.Ο). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α)	44
Πίνακας 5: Αλκοολικός τίτλος (Α.Τ), Ανάγοντα Σάκχαρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α)	44
Πίνακας 6: : Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς το pH των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	45
Πίνακας 7: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς την Ολική Οξύτητα των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	46
Πίνακας 8: : Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς την Πτητική Οξύτητα των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	47
Πίνακας 9: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τον Αλκοολικό Τίτλο των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	48
Πίνακας 10: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τα Ανάγοντα Σάκχαρα των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	49
Πίνακας 11: Ένταση και Απόχρωση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α)	50
Πίνακας 12: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς την χρωματική ένταση των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	50
Πίνακας 13: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς την χρωματική απόχρωση των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	51
Πίνακας 14: Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) και συγκέντρωση Ολικών φαινολικών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α)	52
Πίνακας 15: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς το Δείκτη Φαινολικών Ουσιών των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου ..	53
Πίνακας 16: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τα ολικά φαινολικά των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	53
Πίνακας 17: Συγκέντρωση τανινών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α)	54
Πίνακας 18: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τη συγκέντρωση τανινών των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	55
Πίνακας 19; Μν: Μαλβιδίνη, Δρ: Δελφινιδίνη, Ρτ: Πετουνιδίνη, Ρη: Πεονιδίνη, Μln-Ac: Οξικός εστέρας της μαλβιδίνης, Μln-Coum: Κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α).....	56
Πίνακας 20: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τη συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	57
Πίνακας 21; Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τη συγκέντρωση του κουμαρικού (Μν-coum) και οξικού εστέρα της μαλβιδίνης (Μν-ac) των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	58
Πίνακας 22: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τη συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της δελφινιδίνης (Δρ), της πετουνιδίνης (Ρτ) και της πεονιδίνης (Ρη) των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου	60
Πίνακας 23: Μέσος βαθμός Πολυμερισμού (mDP), ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ %G, ποσοστό προδελφινιδίων %P. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α).....	61
Πίνακας 24: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς το μέσο βαθμό πολυμερισμού (mDP) των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου ..	61

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το σταφύλι

Το σταφύλι αποτελεί την πρώτη ύλη για την παραγωγή του οίνου. Ο βαθμός ωριμότητας του τη χρονική στιγμή του τρυγητού παίζει καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Είναι απόρροια πολλών φυσιολογικών και βιοχημικών φαινομένων, τα οποία σχετίζονται άμεσα με περιβαλλοντικούς παράγοντες (κλίμα, έδαφος, καλλιεργούμενη ποικιλία). Η χημική σύσταση του γλεύκους διαμορφώνει τους οργανοληπτικού χαρακτήρες, την ποιότητα και τον τύπο του παραγόμενου οίνου.

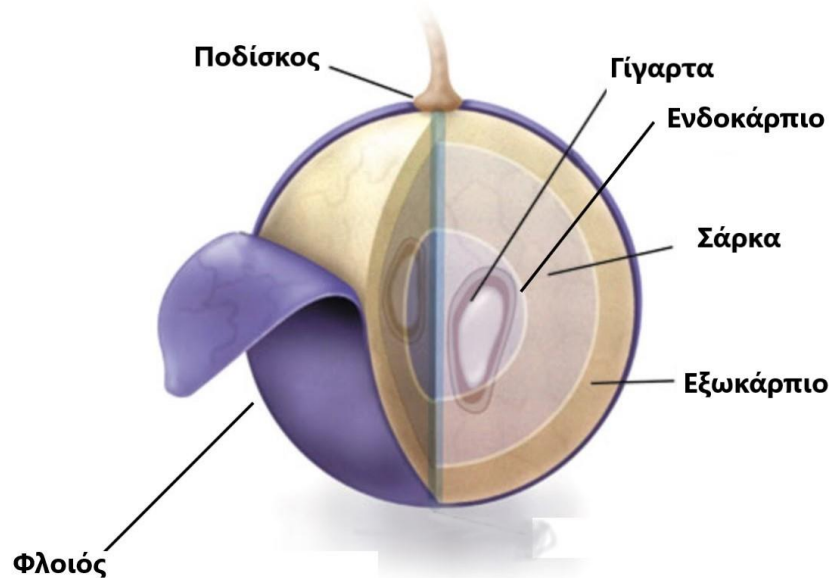
Το σταφύλι, ή αλλιώς βότρυς, απαρτίζεται από το ξυλώδες μέρος, τον βόστρυχα, και από το εδώδιμο ή οινοποιήσιμο που καλείται ράγα. Ο **βόστρυχας** στις περισσότερες των περιπτώσεων εξαιρείται από την οινοποίηση. Είναι φτωχός σε σάκχαρα, αλλά πλούσιος σε ανόργανα συστατικά 2-3%. Το μεγαλύτερο συστατικό του αποτελεί το νερό (60-70%) και άλλες ουσίες όπως τανίνες, ρητίνες και αζωτούχες ενώσεις, σε μικρότερες αναλογίες.

Η **ράγα** αποτελεί το καρπό της αμπέλου και χαρακτηρίζεται ως «*γνήσια*», καθώς στο σχηματισμό της συμμετέχουν μόνο οι ιστοί της ωοθήκης. Απαρτίζεται από το φλοιό ή εξωκάρπιο (10-20%), τη σάρκα ή μεσοκάρπιο (75-90%), το αγγειακό σύστημα και τα γίγαρτα (3-6%), αν πρόκειται για ενγίγαρτη ποικιλία.

Ο **φλοιός** της ράγας είναι πλούσιος σε πηκτίνες, κυτταρίνες, πρωτεΐνες ενώ το μεγαλύτερο μέρος των οξέων βρίσκεται υπό τη μορφή αλάτων. Χωρίζεται στην εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδερμα. Η εφυμενίδα αποτελεί ουσιαστικά το εξωτερικό τοίχωμα των κυττάρων της επιδερμίδας και καλύπτεται από ένα στρώμα κηρώδους ουσίας ή αλλιώς επιδερμικού κηρού. Η ύπαρξη κηρού είναι πολύ σημαντική καθώς προστατεύει τις ράγες από μυκητολογικές προσβολές και εγκαύματα, ελέγχει τη διαπνοή και συγκρατεί μέσα στα κηρώδη λέπια τους ζυμομύκητες που υπάρχουν φυσικά στο σταφύλι. Στην επιδερμίδα, η οποία αποτελείται από 1-2 στρώματα πολυγωνικών κυττάρων, εντοπίζονται τα αρωματώδη έλαια και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις, χαρακτηριστικά της κάθε ποικιλίας. Τέλος το υπόδερμα εντοπίζεται εσωτερικά της επιδερμίδας και αποτελείται από 6-10 στοιβάδες κυττάρων, αναλόγως την καλλιεργούμενη ποικιλία. Περιέχει τις ανθοκυάνες, τις τανίνες και άλλες χρωστικές..

Η **σάρκα** χωρίζεται στο μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο, το οποίο διαχωρίζει τη σάρκα από τα γίγαρτα. Συνιστά το χυμό του σταφυλιού και αποτελείται από 25-30 στοιβάδες κυττάρων, με μεγάλα χυμοτόπια. Η χημική της σύσταση της είναι και αυτή του γλεύκους, κυρίως σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη), νερό και οξέα αλλά και σε μικρότερες συγκεντρώσεις οργανικά οξέα, αζωτούχες και ανόργανες ενώσεις, πηκτίνες, χρωστικές ουσίες και τανίνες. Στις οινοποιήσιμες ποικιλίες τα τοιχώματα της σάρκας

είναι συνήθως λεπτά ώστε να σπάνε εύκολα και να απελευθερώνεται ο χυμός. Η μεταφορά θρεπτικών στη ράγα από το βλαστό γίνεται μέσω ηθμαγγειώδων δεσμίδων που ξεκινούν από το κέντρο του ποδίσκου και διακλαδίζονται μέσα στη σάρκα, ώστε να τροφοδοτούν και τα γίγαρτα.



Εικόνα 1: Μορφολογική δομή της ράγας (Πηγή : enoviti-hanumangirl.blogspot.com/)

Τα **γίγαρτα** αποτελούν τα όργανα αναπαραγωγής της αμπέλου, κατά τον εγγενή πολλαπλασιασμό. Προέρχονται από την γονιμοποίηση της σπερματικής βλάστης, ενώ το έμβρυο από την ανάπτυξη του εμβυόσακκου. Οι σπερματικές βλάστες μετά την γονιμοποίηση μετατρέπονται σε γίγαρτα, και κάθε ράγα φέρει συνήθως 2-3 γίγαρτα. Μορφολογικά διακρίνονται από το ράμφος και το σώμα το οποίο αποτελείται από τη χάλαζα, τη ραφή και την τροπίδα. Είναι πλούσια σε φαινολικές ουσίες που συμβάλλουν στο σχηματισμό του 5-8% των τανινών των οίνων (Σταυρακάκης, Αμπελουργία, 2013). Επιπλέον αποτελούν πηγή αυξητικών παραγόντων (γιββερελλίνες και αμπισικό οξύ) και περιέχουν ελαιώδεις ουσίες, οι οποίες όμως δεν είναι επιθυμητές κατά την οινοποίηση και γι' αυτό δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφεύγεται η έκθλιψη τους (Σουφλερός, 2015).

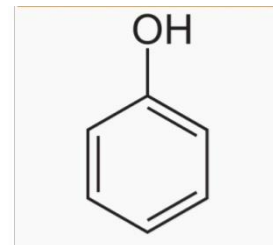
1.2 Οι Φαινολικές Ενώσεις

Μετά τα σάκχαρα και τα οξέα, οι φαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα και τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες των παραγόμενων οίνων. Προέρχονται είτε από τα στερεά μέρη της αμπέλου (βόστρυχας, ράγες), είτε από το μεταβολισμό των ζυμών και σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να εκχυλιστούν από το

ξύλο των βαρελιών (Jackson, 2000). Κατά τη διαδικασία της οινοποίησης τα φαινολικά που εκχυλίζονται πρώτα είναι αυτά των φλοιών, ενώ των γιγάρτων πολύ αργότερα και με αργό ρυθμό, συνήθως στο στάδιο της μακράς εκχύλισης μετά την αλκοολική ζύμωση.

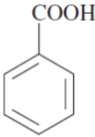
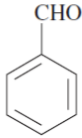
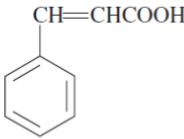
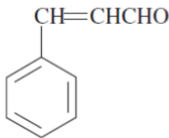
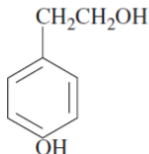
Είναι υπεύθυνες για τις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τύπων κρασιών και σχετίζονται άμεσα με το χρώμα, το σώμα και τη γεύση στα κόκκινα κρασιά. Η σπουδαιότερη όμως συνεισφορά τους είναι το κόκκινο χρώμα που προσδίδουν, το οποίο οφείλεται στις ανθοκυάνες. Τα συστατικά αυτά συμμετέχουν στη διαμόρφωση ορισμένων γευστικών χαρακτηριστικών, όπως η στυπτικότητα και η πικράδα, προσφέρουν στους οίνους αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή προστασία και παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην παλαίωση και στις διάφορες τεχνολογικές επεξεργασίες τους, όπως το κολλάρισμα (Σουφλερός, 2015). Επιπλέον χρησιμεύουν ως αποθήκες οξυγόνου και συμμετέχουν στη οξείδωση (browning) των λευκών κρασιών (Zoecklein, Fugelsang, Gump, & Nury, 1999). Από ιατρικής πλευράς, τα φαινολικά αναστέλλουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών στα ανθρώπινα κύτταρα, μειώνοντας τον κίνδυνο για καρδιοαγγειακά επεισόδια, την εμφάνιση καρκίνου και την ανάπτυξη άλλων ασθενειών (Kekelidze, Ebelashvili, Japaridze, Chankvetadze, & Chankvetadze, 2017).

Φαινόλες καλούνται τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων που περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια σε αντικατάσταση ισάριθμων υδρογόνων συνδεδεμένων με τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου (Κουράκου, 1998). Όλες οι φαινολικές ενώσεις περιέχουν στο μόριο τους την χαρακτηριστική ομάδα της φαινόλης. Χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα φλαβονοειδή και τα μη-φλαβονοειδή.



Εικόνα 2: Δομή φαινόλης

Τα **μη-φλαβονοειδή** αποτελούνται από ένα σκελετό C3-C6 και είναι δομικά απλούστερα, ωστόσο η προέλευση τους είναι πιο σύνθετη. Κατατάσσονται στα φαινολικά οξέα (βενζοϊκά και κινναμωμικά) και τα στιλβένια, για οίνους, οι οποίοι δεν έχουν ωριμάσει σε βαρέλια. Προέρχονται από τα κύτταρα του φλοιού και της σάρκας και απελευθερώνονται στο γλεύκος κατά τη διαδικασία της έκθλιψης. Συνήθως βρίσκονται σε εστεροποιημένη μορφή με σάκχαρα, οργανικά οξέα ή αλκοόλες (Jackson, 2000). Επιπλέον η παρουσία τους στον οίνο μπορεί να οφείλεται σε μετά-ζυμωτικές διεργασίες, όπως η παραμονή σε βαρέλι ή λόγω φαινομένων οξειδωτικής παλαίωσης.

General type	General structure	Examples	Major source
Nonflavonoids			
Benzoic acid		Benzoic acid Vanillic acid Gallic acid Protocatechuic acid Hydrolyzable tannins	G, O O G, O G, O G
Benzaldehyde		Benzaldehyde Vanillin Syringaldehyde	G, O, Y O O
Cinnamic acid		<i>p</i> -Coumaric acid Ferulic acid Chlorogenic acid Caffeic acid	G, O G, O G G
Cinnamaldehyde		Coniferaldehyde Sinapaldehyde	O O
Tyrosol		Tyrosol	Y

Εικόνα 3: Μη-φλαβονοειδής ενώσεις και η προέλευση τους G: σταφύλι, O: βαρέλι, Y: ζύμες (Πηγή: *Wine Science, Jackson 2008, p:282*)

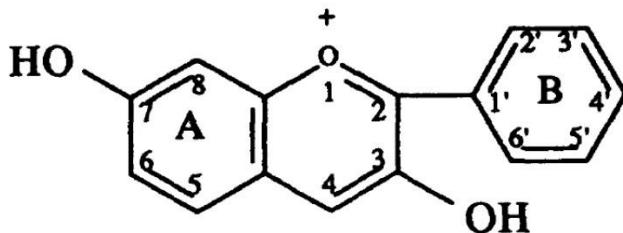
Τα υδρόξυ- βενζοϊκά οξέα, με κυριότερο τα γαλλικό οξύ, βρίσκονται σε όλα τα μέρη της ράγας ενώ τα υδρόξυ-κινναμωμικά οξέα εντοπίζονται ως επί το πλείστον στη σάρκα. Η βιοσύνθεση τους αρχίζει πριν τον περκασμό και μειώνεται σταδιακά κατά τη φάση ωρίμανσης των ραγών. Η οξείδωση των συστατικών αυτών σε κινόνες (καφεϊκό και γαλλικό οξύ) προκαλεί αμαύρωση του χρώματος στους λευκούς οίνους (καφέτιασμα), ενώ παράλληλα έχουν την ικανότητα να ενώνονται με ανθοκυάνες (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2008).

Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα σε αλκοολικό διάλυμα, αλλά μπορούν να μετατραπούν σε κίτρινες ενώσεις λόγω οξείδωσης. Οργανοληπτικά δεν προσδίδουν οσμή ή γεύση στον οίνο, αλλά αποτελούν πρόδρομα μόρια πτητικών ενώσεων με χαρακτηριστικό άρωμα (αιθυλ- και βινυλ- φαινόλες), που παράγονται κατά το μεταβολισμό μικροοργανισμών, όπως βακτήρια και ζυμομύκητες του γένους *Brettanomyces* (Glories, Ribereau, Maujean, & Dubourdieu, 2006). Προσφέρουν αντιβιοτικές και αντισηπτικές ιδιότητες στον οίνο (βενζοϊκό και σαλικυλικό οξύ) και γι' αυτό συγκαταλέγονται και στους παρεμποδιστές ανάπτυξης βακτηρίων. Άλλες μη φλαβονοειδής ενώσεις όπως η τυροσόλη σχηματίζονται κατά την αλκοολική ζύμωση

από τις ζύμες (Zoecklein, Fugelsang, Gump, & Nury, 1999). Η τυροσόλη παράγεται από την τυροσίνη και εντοπίζεται σε λευκούς και ερυθρούς οίνους σε μικρές ποσότητες (20-30 mg/L). Επίσης πολλά από τα φαινολικά οξέα και τα παράγωγα τους έχουν ευχάριστες οσμές όπως η γουαϊακόλη, η ευγενόλη και η βανιλίνη.

Μία άλλη ομάδα σύνθετων πολυφαινολών είναι τα στυλβένια, τα οποία βρίσκονται στο σταφύλι, στο κρασί αλλά και στο ξύλο των βαρελιών. Αποτελούνται από 2 βενζοϊκούς δακτυλίους συνδεδεμένους με ένα αιθάνιο ή και αιθυλένιο. Το πιο γνωστό από αυτά θεωρείται η *trans*-ρεσβερατρόλη, η οποία συντίθεται στο φυτό σε περιπτώσεις προσβολής από παθογόνα. Ωστόσο ασκεί ευεργετικές ιδιότητες και στον ανθρώπινο οργανισμό, λόγω της αντιμικροβιακής της δράσης. Εντοπίζεται στους φλοιούς των σταφυλιών και εκχυλίζεται κατά τη ζύμωση των ερυθρών οίνων σε συγκεντρώσεις 1-3 mg/L (Glories, Ribereau, Maujean, & Dubourdieu, 2006).

Τα **φλαβονοειδή** εντοπίζονται στο φλοιό, στη σάρκα και τα γίγαρτα και χαρακτηρίζονται από ένα βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα C₆-C₃-C₆. Βασική δομή τους είναι δύο βενζολικοί δακτύλιοι ενωμένοι με ένα ετεροκυκλικό δακτύλιο πυριλίου. Ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του πυρανικού δακτυλίου χωρίζονται σε ομάδες: τις φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανονόλες, φλαβανόλες και ανθοκυάνες, με τις δύο τελευταίες να βρίσκονται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον σταφύλι και στο κρασί. Τα φλαβονοειδή βρίσκονται είτε ελεύθερα, είτε πολυμερισμένα με άλλα φλαβονοειδή και μη-φλαβονοειδή ή και με σάκχαρα και ονομάζονται ακυλιωμένα ή γλυκοζιδιομένα αντίστοιχα. Συντίθενται σε μεγάλες ποσότητες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και αποθηκεύονται στα κυτταρικά κενοτόπια της επιδερμίδας και της εξωτερικής υποδερμίδας. Βασικός τους ρόλος είναι η προστασία των φυτικών οργανισμών έναντι παθογόνων (Jackson, 2000).



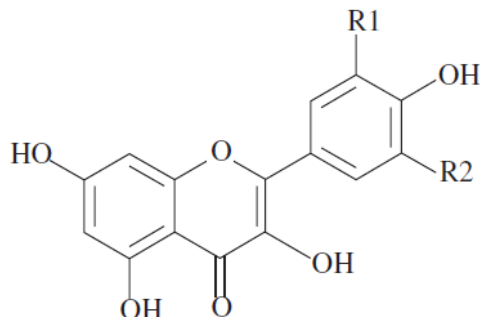
Εικόνα 4: Δομή φλαβονοειδών

Οι **φλαβονόλες** συναντώνται στο φλοιό της ράγας, στα κύτταρα της επιδερμίδας και της υποδερμίδας. Ο φυσικός τους ρόλος είναι η απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας, και η προστασία των φυτικών ιστών από μηχανικές βλάβες. Η σύνθεση τους γίνεται κατά το στάδιο ωρίμανσης των ραγών και ειδικότερα όταν

υπάρχει μεγάλη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Συνήθως απαντώνται στη γλυκοζιδιομένη μορφή τους, ενωμένες με ένα μόριο γλυκόζης (Jackson, 2000).

Αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές των φυτών σε λευκές και ερυθρές ποικιλίες. Ανάλογα με τους υποκαταστάτες του πλάγιου δακτυλίου χωρίζονται σε καιμπφερόλη, κερκετίνη και μυρισετίνη. Και οι τρεις αυτές φλαβονόλες υπάρχουν στα σταφύλια των ερυθρών οίνων, ενώ μόνο οι δύο πρώτες στα σταφύλια των λευκών.

Flavonoids
Flavonols



Quercetin
Kaempferol
Myricetin

Εικόνα 5: Χημική δομή φλαβονολών (Πηγή: *Wine Science, Jackson 2008, p:282*)

Στα ερυθρούς οίνους οι φλαβονόλες εντοπίζονται κυρίως στην άγλυκη μορφή τους, αφού ο γλυκοζιτικός δεσμός υδρολύεται κατά την αλκοολική ζύμωση. Καταλαμβάνουν το μικρότερο ποσοστό του ολικού φαινολικού φορτίου 1-10%, αναλόγως την ποικιλία και τον τρόπο καλλιέργειας. Οι σύνηθες συγκεντρώσεις για ερυθρούς οίνους είναι της τάξεως των 100 mg/L, ενώ για λευκούς 1-3 mg/L (Glories, Ribereau, Maujean, & Dubourdieu, 2006). Σε περιπτώσεις που δεν πραγματοποιείται προζυμωτική εκχύλιση, η συγκέντρωση των φλαβονολών στον οίνο είναι μηδαμινή (Zoecklein, Fugelsang, Gump, & Nury, 1999).

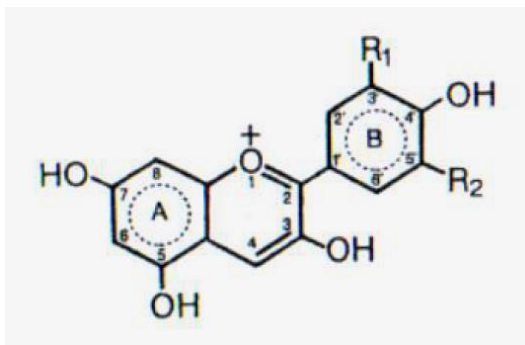
Οι **φλαβανόλες** ή φλαβαν-3-όλες αποτελούν την ομάδα φαινολικών ουσιών με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στη ράγα. Εντοπίζονται κυρίως στα γίγαρτα (60%) και στους βόστρυχες (20%), στους φλοιούς (15-20%) και σε μικρότερες συγκεντρώσεις και στη σάρκα (Jackson, 2000). Αποτελούνται από 2 βενζοϊκούς δακτυλίους συνδεδεμένους με έναν κορεσμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο. Οι κυριότερες από αυτές ενώσεις είναι η (+) κατεχίνη και η (-) επικατεχίνη, ενώ σε πιο μικρές ποσότητες απαντώνται ο γαλλικός εστέρας της (-) επικατεχίνης και η (-) επιγαλλοκατεχίνη. Σε λευκούς οίνους κυμαίνονται από 10-50 mg/L, ενώ μπορεί να φτάσουν τα 200 mg/L σε ερυθρούς (Zoecklein, Fugelsang, Gump, & Nury, 1999). Ανάλογα τη δομή τους χωρίζονται σε μονομερείς, oligομερείς και πολυμερείς. Στην πολυμερισμένη μορφή τους αναφέρονται συνήθως ως προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες τανίνες, αποτελούμενες από τερματικές και επεκτατικές ομάδες.

1.2.1 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες αποτελούν τις κύριες ερυθρές και κυανές χρωστικές στο φυτικό βασίλειο και είναι υπεύθυνες για το κόκκινο χρώμα των οίνων. Εντοπίζονται στις 2-3 πρώτες στοιβάδες του φλοιού των ευρωπαϊκών ποικιλιών, εκτός από σπάνιες περιπτώσεις στις βαφικές ποικιλίες που απαντώνται και στα κύτταρα του μεσοκαρπίου (Βάψα, Alicante Bouschet) (Σταυρακάκης, Αμπελουργία, 2013). Εντοπίζονται επίσης σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα φύλλα κατά την ολοκλήρωση της περιόδου ανάπτυξης, προσδίδοντας ερυθρούς χρωματισμούς (Glories, Ribereau, Maujean, & Dubourdieu, 2006). Στο στάδιο της υπερωρίμανσης των ραγών μπορεί να παρατηρηθεί επίσης η ύπαρξη ανθοκυανών στη σάρκα λόγω διάχυσης από τα κύτταρα του φλοιού.

Ο μηχανισμός βιοσύνθεσης των ανθοκυανών είναι ακριβώς ίδιος με εκείνον των φλαβονοειδών φαινολών. Αν και δεν είναι γνωστά όλα τα στάδια, υπάρχει μια κοινή ένωση για όλες τις φλαβονοειδείς ουσίες, η χαλκόνη, η οποία κυκλοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου ισομεράση της χαλκόνης προς μια φλαβανόνη, από την οποία σχηματίζονται μετέπειτα οι διάφορες φλαβόνες, φλαβονόνες και ανθοκυάνες (Κουράκου, 1998). Η διαδικασία λαμβάνει χώρα την περίοδο του περκασμού και η συσσώρευση τους παρουσιάζει μέγιστη τιμή κατά την συγκομιδή. Στο σχηματισμό τους εμπλέκονται φυτικές ορμόνες, όπως το αμπισικό οξύ (ABA), ενώ ανασταλτικό παράγοντα αποτελούν οι συνθετικές αυξίνες, οι υψηλές θερμοκρασίες και η έλλειψη επαρκούς ηλιακής ακτινοβολίας (Jeong, Goto-Yamamoto, Kobayashi, & Esaka, 2004). Κατά τα τελευταία στάδια ωρίμανσης των σταφυλών σχηματίζονται και οι εστεροποιημένες μορφές των ανθοκυανών, που είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες στη φύση.

Κύρια δομή των ανθοκυανών είναι το κατιόν φλαβιλίου, 2 βενζοϊκοί δακτύλιοι (A,B) που περιβάλλουν ένα δακτύλιο πυριλίου. Ο δακτύλιος A φέρει πάντοτε δύο φαινολικά -OH στις θέσεις -5' και -7', ενώ ο δακτύλιος B έχει φαινολικό -OH στη θέση -4'.



Εικόνα 6: Δομή φλαβιλίου (Πηγή: Θέματα Οινολογίας, Κουράκου 1998)

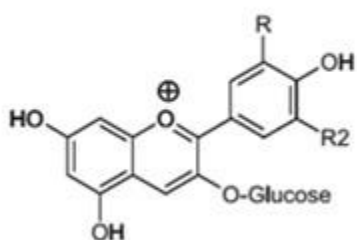
Για την σταθεροποίηση του μορίου, το άγλυκο τμήμα ενώνεται με σάκχαρο, κυρίως γλυκόζη, στη θέση -3 του φλαβυλίου, σχηματίζοντας 3-μονογλυκοζίτες. Μπορεί όμως να σχηματιστεί δεσμός και με άλλα σάκχαρα όπως γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη και αραβινόζη. Οι χρωστικές των φυτών δεν είναι συνεπώς απλές ανθοκυανιδίνες αλλά ενώσεις αυτών με ένα ή δύο μόρια κάποιου ζαχάρου και ονομάζονται ανθοκυανίνες (Σουφλερός, 2015).



Στις ευρωπαϊκές ποικιλίες *Vitis vinifera* εντοπίζονται μόνο 3-μονογλυκοζίτες, ενώ στις αμερικάνικες (*Vitis riparia* και *Vitis rupestris*) η γλυκόζη προσκολλάται ταυτόχρονα στις θέσεις -3 και -5 της ανθοκυανιδίνης, σχηματίζοντας 3,5-διγλυκοζίτες. Επιπλέον, η γλυκόζη μπορεί να συνδεθεί με κάποιο κινναμωμικό οξύ, δημιουργώντας ακυλιωμένες ανθοκυανίνες, που είναι λιγότερο σταθερές.

Τα πιο κοινά παράγωγα που συναντώνται στις ποικιλίες *Vitis vinifera* είναι οι μονογλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών και συγκεκριμένα της κυανιδίνης (Cy), της δελφινιδίνης (Dlp), της πετουνιδίνης (Pt), της παιονιδίνης (Pn) και της μαλβιδίνης (Mlv), ανάλογα τους υποκαταστάτες (-OH και -OCH₃) του Β δακτυλίου. Από τον αριθμό των -OH και των -OCH₃ που φέρει το μόριο της ανθοκυανίνης, επηρεάζεται η απόχρωση και η σταθερότητα του. Όσο αυξάνονται τα -OH επικρατεί το κυανό χρώμα, ενώ στην περίπτωση των -OCH₃ το ερυθρό. Στο είδος *Vitis vinifera*, η μαλβιδίνη παρουσιάζει τη χρωστική με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Anthocyanins



R1=OH, R2=H

Cyanidin-3-O-glucoside

R1=OH, R2=OH

Delphinidin-3-O-glucoside

R1=OCH₃, R2=H

Peonidin-3-O-glucoside

R1=OCH₃, R2=OH

Petunidin-3-O-glucoside

R1 OCH₃, R2= OCH₃

Malvidin-3-O-glucoside

Εικόνα 7: Δομή ανθοκυανών στην ποικιλία *Vitis vinifera* (Πηγή: Benmezziane et al., 2016)

Το είδος αλλά και οι συγκεντρώσεις των διάφορων ανθοκυανών στους φλοιούς καθορίζει το χρώμα και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Στις ουσίες αυτές οφείλεται άλλωστε το μπλε, κόκκινο και μωβ χρώμα που υφίσταται ριζικές αλλαγές κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των οίνων. Οι ελεύθερες ανθοκυανίνες μειώνονται

σταδιακά κατά την ωρίμανση, λόγω συνένωσης με άλλα μόρια και τη δημιουργία πιο σταθερών συμπλόκων (συγχωματισμός).

Το προφίλ των ανθοκυανών είναι χαρακτηριστικό για κάθε καλλιεργούμενη ποικιλία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την ταυτοποίηση τους (Cheynier, et al., Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins, 2006). Καθορίζεται αποκλειστικά γενετικά και εκφράζεται με σταθερό ρυθμό. Ωστόσο η τελική συγκέντρωσή τους στον οίνο επηρεάζεται από εξωτερικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η σύσταση του εδάφους, η άρδευση, η ηλιακή ακτινοβολία και το κλίμα. Γι' αυτό το λόγω άλλωστε παρατηρούνται συχνά μεγάλες διαφορές στην ίδια ποικιλία από χρονιά σε χρονιά (Benmeziiane, Cadot, Djamai, & Djermoun, 2016).

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ανθοκυανών επιδρούν άμεσα στο χρώμα τους και συνεπώς και στο χρώμα του παραγόμενου οίνου. Σε ισχυρά όξινο περιβάλλον οι ανθοκυάνες βρίσκονται ως κατιόν φλαβυλίου και επικρατεί το ερυθρό χρώμα. Όσο όμως το pH αυξάνεται, λόγω δέσμευσης ενός $-OH$ επικρατεί η άχρωμη μορφή των ανθοκυανών. Το χρώμα μπορεί να επανέλθει με μείωση του pH του μέσου αφού η ισορροπία της αντίδρασης είναι κυμαινόμενη. Στο pH του οίνου το μεγαλύτερο ποσοστό των ανθοκυανών βρίσκεται στην άχρωμη μορφή. Περαιτέρω αύξηση του pH προκαλεί την εμφάνιση κυανών αποχρώσεων, λόγω της σχηματισμού κινόνης.

Τα ιόντα των μετάλλων (Fe^{+++} , Al^{+++} , Cu^{++} , Mg^{++}) σχηματίζουν σύμπλοκα με τα $-OH$ του Β δακτυλίου που βρίσκονται σε όρθο θέση. Η αντίδραση ευνοείται σε υψηλές τιμές pH και έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία κυανού χρώματος. Η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη προκαλεί αποχρωματισμό του οίνου, γιατί τα όξινα θειώδη ιόντα (SO_3H^-) που απελευθερώνονται σχηματίζουν άχρωμες μορφές με τις ανθοκυάνες. Με την πάροδο όμως του χρόνου και τη μείωση του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη, το χρώμα επανέρχεται σταδιακά στην αρχική του μορφή. Η ανθοκυάνες χάνουν το χρώμα τους και σε αναγωγικό περιβάλλον, σε μία αμφίδρομη αντίδραση, και έτσι αιτιολογείται ο ασθενής αποχρωματισμός του οίνου αμέσως μετά την αλκοολική ζύμωση. Επίσης αντιδρούν με ενώσεις όπως το διακετύλιο, σχηματίζοντας κασταβινόλες, άχρωμες ενώσεις, οι οποίες όμως δεν απαντώνται φυσικά στο σταφύλι, αλλά μόνο στον οίνο και λειτουργούν ως 'αποθήκες' έγχρωμων ανθοκυανών (Σουφλερός, 2015).

1.2.2 Τανίνες

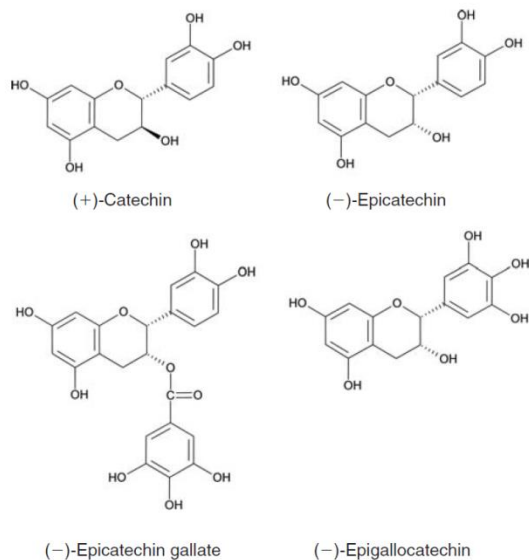
Οι τανίνες είναι πολυμερή των φλαβαν-3-ολών και βρίσκονται στους βόστρυχες, στην υποδερμίδα του φλοιού και στο μαλακό παρέγχυμα του γιγάρτου, εξωτερικά του κέλυφους (Adams, 2006). Συγκεκριμένα η αναλογία τανινών στα στερεά τμήματα της

σταφυλής είναι 65% στα γίγαρτα, 22% στους βόστρυχες, 12% στους φλοιούς και ένα πολύ μικρό ποσοστό γύρω στο 1% στη σάρκα.

Μέσα από τις διαδικασίες της εκχύλισης και της συμπίεσης, ένα μέρος τους μεταφέρεται και στο τελικό προϊόν, τον οίνο, επηρεάζοντας άμεσα τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του, αφού σχετίζονται με την αίσθηση της στυπτικότητας και της πικράδας. Χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με τη δομή των μορίων τους, τις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες.

Οι υδρολυόμενες τανίνες αποτελούνται από ένα μόριο γλυκόζης και είναι συνήθως εστεροποιημένες με φαινολικά οξέα, κυρίως γαλλικό και ελλαγικό οξύ γι' αυτό και καλούνται γαλλοτανίνες και ελλαγικές τανίνες αντίστοιχα. Είναι υδατοδιαλυτά μόρια και κατακρημνίζονται γρήγορα σε αλκοολικά διαλύματα όπως το κρασί. Παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την παλαίωση των οίνων σε βαρέλι, προστατεύοντας από οξειδώσεις και βελτιώνοντας τον οργανοληπτικό χαρακτήρα. Δεν περιέχονται φυσικά στο σταφύλι, αλλά προέρχονται είτε από τη λιγνίνη του βαρελιού, είτε από σκευάσματα που χρησιμοποιούνται για την κατεργασία του οίνου. Στο ξύλο της δρυός οι κύριες ελλαγικές τανίνες είναι η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη, ωστόσο η σύνθεση τους εξαρτάται από το βοτανικό είδος της βελανιδιάς (Glories, Ribereau, Maujean, & Dubourdieu, 2006).

Αντίθετως, οι συμπυκνωμένες τανίνες, ή διαφορετικά προανθοκυανιδίνες, προέρχονται από τον πολυμερισμό των φλαβαν-3-ολών, κυρίως της (+) κατεχίνης και της (-) επικατεχίνης. Απαντώνται στους φλοιούς και τα γίγαρτα της σταφυλής και εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες ανάλογα με την προέλευση τους. Στα γίγαρτα βρίσκονται η (+) κατεχίνη (C), η (-) επικατεχίνη (EC) και ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης (ECG), ενώ στους φλοιούς η (+) γαλλοκατεχίνη, η (-) επιγαλλοκατεχίνη (EGC) και ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης (EGCG). Συγκεκριμένα οι προανθοκυανιδίνες χωρίζονται στις προκυανιδίνες και στις προδελφινιδίνες. Θέρμανση σε όξινο περιβάλλον οδηγεί στην διάσπαση των προανθοκυανιδίων σε ανθοκυανιδίνες. Οι προκυανιδίνες αποτελούνται από (+) κατεχίνη και (-) επικατεχίνη και υδρολύονται προς κυανιδίνη, ενώ οι προδελφινιδίνες αποτελούνται από μονάδες (+) γαλλοκατεχίνης και (-) επιγαλλοκατεχίνης, και η όξινη υδρόλυση οδηγεί σε δελφινιδίνη. Γενικότερα οι των γιγάρτων είναι λιγότερο πολυμερισμένες από αυτές των φλοιών. Σε νεαρούς οίνους οι περισσότερες προανθοκυανιδίνες βρίσκονται σε διμερή ή τριμερή μορφή, ενώ κατά τη διάρκεια της παλαίωσης ενώνονται με άλλα μονομερή φλαβονοειδή σχηματίζοντας πολυμερισμένες τανίνες



Εικόνα 8: Η δομή των φλαβαν-3-ολών (Πηγή: *Wine Science, Jackson 2008, p:283*)

Η βιοσύνθεση των προανθοκυανιδινών αρχίζει μετά την άνθιση, μεγιστοποιείται κατά τον περκασμό και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά μέχρι την πλήρη ωρίμανση. Εξαρτάται από την καλλιεργούμενη ποικιλία και το βαθμό ωριμότητας της, τις συνθήκες άρδευσης, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής, το σύστημα μόρφωσης καθώς και από προσβολή από το μύκητα *Botrytis cinerea* (Petrooulos, Kanelloroulou, Paraskevopoulos, Kotseridis, & Kallithraka, 2017).

Οι ενώσεις αυτές εμπλέκονται στη διαμόρφωση του οργανοληπτικού προφίλ των οίνων. Η (+) κατεχίνη και η (-) επικατεχίνη έχουν κυρίως πικρή γεύση στη μονομερή μορφή τους. Η ένταση της συτυπικότητας στο κρασί σχετίζεται με την συνολική περιεκτικότητα σε προανθοκυανιδίνες, καθώς και το βαθμό πολυμερισμού τους. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η (-) επικατεχίνη θεωρείται περισσότερη «συφή» από την (+) κατεχίνη.

Προσθήκη θειώδους ανυδρίτη στο γλεύκος αυξάνει την εκχυλισιμότητα των φλαβανολών με αποτέλεσμα εντονότερη αίσθηση πικράδας στους οίνους. Η (+) κατεχίνη θεωρείται ιδιαίτερα ευοξειδωτή ουσία, με αποτέλεσμα όταν θερμανθεί σε όξινο περιβάλλον να πολυμερίζεται προς ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες προκαλούν το καφέτιασμα των λευκών οίνων

Οι τανίνες έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με το Fe^{+++} προκαλώντας σιδηρικό θόλωμα και ενώνονται με πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή, όπως οι πολυσακχαρίτες. Ωστόσο, επειδή προσφέρουν και αντιοξειδωτική δράση στα ερυθρά κρασιά, προστατεύοντας από τις αρνητικές επιδράσεις του οξυγόνου.

Όπως προαναφέρθηκε, η ποικιλία, οι κλιματολογικές συνθήκες και ο τρόπος οινοποίησης επηρεάζουν το σύνολο και το είδος των τανινών στο κρασί. Κατά την

παλαίωση οι τανίνες συνεχίζουν να πολυμερίζονται, δημιουργώντας μεγαλομόρια, τα οποία τελικά κατακρημνίζονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της στυφής γεύσης και τη δημιουργία χρωστικών ιζημάτων

1.2.3 Παράγοντες που επιδρούν στη σύνθεση και συσσώρευση των φαινολικών ουσιών στο σταφύλι

Πέρα από τους γενετικούς παράγοντες, μοναδικούς για κάθε ποικιλία, που εμπλέκονται στα μονοπάτια βιοσύνθεση των φαινολικών ουσιών, η τελική συγκέντρωση τους στο φυτό επηρεάζεται και από μία πληθώρα εδαφοκλιματικών και καλλιεργητικών συνθηκών.

Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, το **έδαφος** και η σύσταση του σχετίζονται άμεσα με την απόδοση των πρέμνων και την ποιότητα των παραγόμενων οίνων. Οι ποικιλίες *Vitis vinifera* αν και θεωρούνται ιδιαίτερα προσαρμοστικές σε διαφορετικούς τύπους εδαφών, έχει παρατηρηθεί ότι σε αργιλώδη και συνεκτικά εδάφη παράγονται ράγες που υστερούν ποιότητας. Συγκεκριμένα η συγκέντρωση των σακχάρων είναι χαμηλή ενώ των οργανικών οξέων και των φαινολικών συστατικών υψηλή. Το έδαφος μπορεί και επηρεάζει την ποιότητα των αμπελουργικών προϊόντων μέσω της σύστασης του, του ανάγλυφου του, της έκθεσης του και της ικανότητας του να συγκρατεί την υγρασία (Σταυρακάκης, Αμπελουργία, 2013). Επιπλέον η φυσιολογική ανάπτυξη των πρέμνων καθορίζεται από τα μητρικά πετρώματα και την ηλικία τους, αφού προσδιορίζουν τη συγκέντρωση των θρεπτικών αποθεμάτων.

Το **υψόμετρο** επηρεάζει τις κλιματικές συνθήκες, όπως υγρασία, θερμοκρασία ιδιαίτερα στο στάδιο ωρίμανσης των ραγών. Το χαμηλό υψόμετρο ευνοεί τη βιοσύνθεση των μονομερών της (+) κατεχίνης, (-) επικατεχίνης και του γαλλικού εστέρα της (-) επικατεχίνης στους φλοιούς των ραγών (Mateus, Marques, Goncalves, Machado, & De Freitas, 2001). Υπερβολική ή ανεπαρκής υγρασία έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ωρίμανση των σταφυλιών. Οι υψηλές βροχοπτώσεις δεν είναι επιθυμητές καθώς καθυστερούν την πορεία της ωρίμανσης και ευνοούν την ανάπτυξη ασθενειών.

Η **θερμοκρασία** και η ένταση του φωτός στο ύψος της ζώνης καρποφορίας των πρέμνων, επηρεάζουν ποιοτικά και ποσοτικά τη σύνθεση των φαινολικών ουσιών. Η άριστη θερμοκρασία αέρα για την δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στα μονοπάτια βιοσύνθεσης των φαινολικών είναι μεταξύ 22-25° C, εφόσον δεν δρουν περιοριστικά άλλοι παράγοντες. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται κυρίως στο φλοιό των ραγών με τα σάκχαρα να παίζουν απαραίτητο ρόλο ως δομικές μονάδες. Οι υψηλές θερμοκρασίες έχουν την ιδιότητα να διεγείρουν τις μεταβολικές αντιδράσεις, ενώ σε πολύ χαμηλές τα ένζυμα αδρανοποιούνται πλήρως ή καταστρέφονται. Ωστόσο

σε θερμοκρασίες πολύ υψηλότερες από την βέλτιστη, η φαινολική ωριμότητα δεν επιτυγχάνεται, καθώς ο υψηλός ρυθμός διαπνοής περιορίζει την διαθεσιμότητα των σακχάρων. Συνεπώς η μέγιστη τιμή του φαινολικού και αρωματικού χαρακτήρα επιτυγχάνεται σε συνθήκες με υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και μέτριας θερμοκρασίας (Σταυρακάκης, Αμπελουργία, 2013).

Η ανάπτυξη του χρώματος επηρεάζεται και αυτή αρνητικά από τις υψηλές θερμοκρασίες, καθώς οι ράγες παραμένουν πράσινες ή χρωματίζονται ελάχιστα (Mullins, Bouquet, & Williams, 1992). Η ανάπτυξη του χρώματος και η συσώρευση των ανθοκυανών ακολουθούν αντίθετη πορεία ως προς τη συγκέντρωση των αρωματικών ουσιών λόγω ανταγωνισμού στην αξιοποίηση των σακχάρων. Για το λόγω αυτό επεμβάσεις για τη βελτίωση της φαινολικής ωριμότητας θα πρέπει να γίνονται με προσοχή ώστε να μην επιδράσουν αρνητικά στον αρωματικό χαρακτήρα της ποικιλίας.

Το **ηλιακό φως** δίνει το ερέθισμα στο φυτό για την ενεργοποίηση μιας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων προς το σχηματισμό φαινολικών ουσιών. Η σύνθεση των ανθοκυανών ενεργοποιείται από το ορατό φάσμα, ενώ οι φλαβονόλες από την υπεριώδη ακτινοβολία (UVB). Άριστες συνθήκες φωτοσύνθεσης κυμαίνονται περίπου στα 700 E/m²/s σε τιμές ηλιακής ακτινοβολίας. Βέβαια, η υπερβολική έκθεση των σταφυλών στην ηλιακή ακτινοβολία επιδρά αρνητικά, προκαλώντας την οξειδωτική καταπόνηση των ανθοκυανών και την διάσπαση τους. Σε πρέμνα μεγάλης ζωηρότητας, όπου επικρατούν συνθήκες σκίασης στη σταφυλική ζώνη, ο ρυθμός σχηματισμού των ανθοκυανών είναι αργός και οι φλοιοί είναι φτωχοί σε χρωστικές. Από τις ανθοκυάνες, λιγότερη ευαίσθητη στη έλλειψη φωτός είναι η μαλβιδίνη (Σταυρακάκης, Αμπελουργία, 2013).

Έχει αποδειχθεί ότι η θερμοκρασία της σταφυλής ,πολλές φορές, έχει μεγαλύτερη επιρροή από την ηλιακή ακτινοβολία στην συγκέντρωση των ανθοκυανών και ποικίλει αναλόγως το αναπτυξιακό στάδιο. Η συχνότητα της ηλιακής ακτινοβολίας αυξάνει τη θερμοκρασία της ράγας και μπορεί να εντοπιστούν διαφορές μέχρι και 11 ° C στο ίδιο πρέμνο, μεταξύ σκιαζόμενων και μη σταφυλών (Chorti, et al., 2016). Πρέμνα μέτριας ή μικρής ζωηρότητας, με αραιή βλάστηση επιτρέπουν την καλύτερη έκθεση των σταφυλών στον ήλιο και για περισσότερο χρονικό διάστημα. Αυτό έχει ως συνέπεια οι ράγες να παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε προανθοκυανιδίνες, επιγαλοκατεχίνες και προανθοκυάνες. Επιπλέον, ο φλοιός των ραγών εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση τανινών (Pereira, et al., 2006).

Η εκάστοτε καλλιεργούμενη **ποικιλία** και ειδικότερα ο κάθε καλλιεργούμενος κλώνος χαρακτηρίζεται από ένα ξεχωριστό πολυφαινολικό δυναμικό, το οποίο αποτελεί και αμπελογραφικό χαρακτηριστικό (Arozarena, Casp, Marin, & Navarro, 2000). Οι διαφορές αυτές στο ανθοκυανικό προφίλ οφείλονται στην περιπλοκότητα και στις διάφορες παραλλαγές του μονοπατιού βιοσύνθεσης που παρατηρούνται μεταξύ

των ποικιλιών (Boss & Davies, 2001). Από τις ενδογενείς ιδιότητες της ποικιλίας, η ζωηρότητα σχετίζεται άμεσα με την παραγωγή φαινολικών ουσιών. Οι προανθοκυανιδίνες του φλοιού βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε πρέμνα χαμηλής ζωηρότητας, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση της αναλογίας των επιγαλλοκατεχινών εντός των πολυμερών των προανθοκυανιδινών αλλά και αύξηση του μεγέθους των πολυμερών (Cortell, Halbleib, Gallagher, Righetti, & Kennedy, 2005). Στα φύλλα προερχόμενα από πρέμνα μεγαλύτερης ηλικίας θεωρούνται πιο ποιοτικά με καλύτερα τεχνολογικά χαρακτηριστικά. Είναι γνωστό ότι η ηλικία του φυτού επηρεάζει τα παραγόμενα προϊόντα, αφού τα φυτά είναι πιο προσαρμοσμένα στη δεδομένη περιοχή καλλιέργειας τους, σε σύγκριση με νεότερα τα οποία αξιοποιούν όλους τους διαθέσιμους πόρους για την ανάπτυξη των οργάνων τους.

Μία εξίσου σημαντική παράμετρος είναι η επιλογή του **κατάλληλου υποκειμένου**. Η ζωηρότητα του υποκειμένου μεταδίδεται στην ποικιλία διαμορφώνοντας τις φυσιολογικές ιδιότητες του πρέμνου και την ποιότητα των σταφυλιών. Το ριζικό σύστημα και η βλάστηση εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση του γονότυπου του υποκειμένου με το έδαφος (pH, διαθεσιμότητα νερού, αλάτων και θρεπτικών, δομή). Παραδείγματος χάρη, ζωηρά υποκείμενα μπορεί να επιμηκύνουν την περίοδο βλάστησης μια ποικιλίας καθυστερώντας την ωρίμανση (Coombe & Dry, 1992).

Μέσα από τις διάφορες **καλλιεργητικές τεχνικές**, οι αμπελουργοί προσπαθούν να επιτύχουν ισορροπία μεταξύ της ζωηρότητας του φυτού και της ποιότητας των τελικών προϊόντων. Η εφαρμογή φυτορρυθμιστικών ορμονών, η πυκνότητα φύτευσης, το σύστημα μόρφωσης, η λίπανση και τα χλωρά κλαδέματα έχουν άμεσες επιπτώσεις στη σύνθεση και συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στη ράγα. Για παράδειγμα έλλειψη ή υπερβολική χρήση αζώτου προκαλεί μείωση του χρώματος των ραγών λόγω αυξημένης ζωηρότητας των φυτών (Delgado, Del Alamo, & Gonzalez, 2004). Τεχνικές για τον καλύτερο φωτισμό και αερισμό του αμπελώνα όπως το ξεφύλλισμα και το βλαστολόγημα, βελτιώνουν αισθητά το φαινολικό προφίλ της ποικιλίας.

Η **άρδευση** είναι ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει τη σύνθεση και συσσώρευση φαινολικών, και ιδιαίτερα των ανθοκυανών. Η ήπια υδατική καταπόνηση είναι επιθυμητή, αφού εμποδίζει την ανάπτυξη των κυττάρων του μεσοκαρπίου της ράγας, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο τελικός όγκος της και να αυξάνει η αναλογία φλοιού/σάρκας. Ειδικότερα, πριν το περκασμό δρα θετικά στη συγκέντρωση των ανθοκυανών και συγκεκριμένα της μαλβιδίνης (Chorti, et al., 2016), ενώ φαίνεται να μην επηρεάζει τις τανίνες των φλοιών και τις προανθοκυανιδίνες των γιγάρτων. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και για την ποικιλία Αγιωργίτικο, η οποία σε αντίστοιχες συνθήκες, επιδεικνύει βελτίωση των φαινολικών συστατικών (ένταση

χρώματος) χωρίς υποβάθμιση των παραγόμενων προϊόντων (Koundouras, Kanakis, Drossou, Kallithraka, & Kotseridis, 2012).

1.2.4 Πολυφαινολική ωριμότητα και εκχύλιση φαινολικών ουσιών

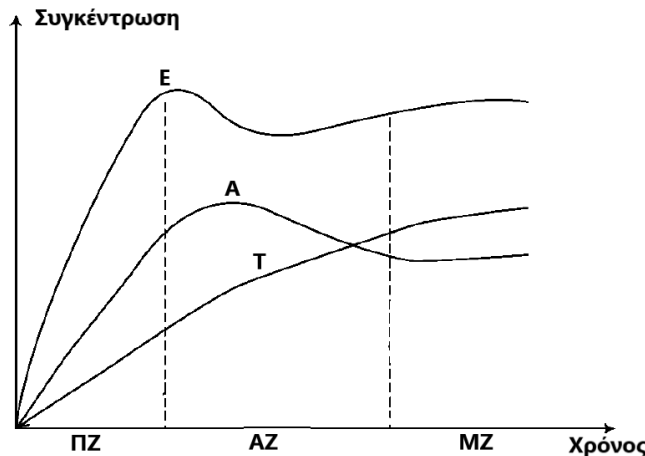
Ο βαθμός ωριμότητας είναι μία σύνθετη έννοια, αποτέλεσμα πολλών φυσιολογικών, μορφολογικών και βιοχημικών φαινομένων που βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους. Στο σταφύλι ξεχωρίζουν τέσσερις κύριες κατηγορίες ωριμότητας. *Φυσιολογική ή βιολογική* ωριμότητα χαρακτηρίζεται η ικανότητα των γιγάρτων να βλαστήσουν ενώ *βιομηχανική ωριμότητα* η χρονική στιγμή που επιτυγχάνεται η μέγιστη συγκέντρωση σακχάρων στη ράγα. Με τον όρο *τεχνολογική ωριμότητα* προσδιορίζεται η κατάσταση όπου ο λόγος σάκχαρα/οξέα είναι ο επιθυμητός για την παραγωγή του εκάστοτε οίνου. Η *φαινολική ή πολυφαινολική ωριμότητα* καλύπτει όχι μόνο τη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στο σταφύλι αλλά και την ικανότητα εκχύλισης τους από το φλοιό και τα γίγαρτα στο γλεύκος και μετέπειτα στο κρασί. Συνεπώς ο τρυγητός καθορίζεται από όλες τις παραπάνω μεταβλητές, ανάλογα με τις δυνατότητες της καλλιεργούμενης ποικιλίας και το επιθυμητό αμπελουργικό προϊόν που θέλουμε να παράγουμε.

Η συγκέντρωση των ανθοκυανών στη ράγα αγγίζει το μέγιστο κατά την ολοκλήρωση της περιόδου ωρίμανσης, όπου και το χρώμα των σταφυλιών είναι αρκετά έντονο. Ωστόσο η δυνατότητα εκχύλισης αυτών των συστατικών εξαρτάται από την ικανότητα των κυττάρων του φλοιού να διαρρηγνύονται. Εμπειρικά αυτό μπορεί να παρατηρηθεί στον αμπελώνα με σπάσιμο της ράγας με το χέρι και παρατήρηση του χρώματος του χυμού.

Η διαδικασία της εκχύλισης μπορεί να γίνει σε τρία διακριτά στάδια: προ-ζυμωτικά πριν την αλκοολική ζύμωση που διαρκεί από μερικές ώρες ή μέρες, κατά την αλκοολική ζύμωση μεταξύ 2-7 ημερών και τέλος μετα-ζυμωτικά με την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης για μερικές μέρες ή και εβδομάδες. Η μετα-ζυμωτική εκχύλιση εφαρμόζεται κυρίως σε ερυθρούς οίνους που προορίζονται για παλαίωση.

Οι ανθοκυάνες και οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών είναι οι πρώτες που εκχυλίζονται, πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης ειδικά σε χαμηλές θερμοκρασίες. Καθώς το ποσοστό της αιθανόλης αυξάνει, η εκχύλιση των ανθοκυανών έχει σχεδόν ολοκληρωθεί ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται και μείωση της συγκέντρωσης τους. Αυτό οφείλεται σε διάφορα φαινόμενα όπως απορρόφηση των ουσιών από στερεά συστατικά (ζύμες), αλλαγές στη δομή των μορίων (δημιουργία συμπλόκων τανινών-ανθοκυανών) ή αντιδράσεις διάσπασης. Αντιθέτως οι τανίνες των γιγάρτων εκχυλίζονται πολύ αργότερα κατά τη ζύμωση, αφού διαλυτοποιούνται παρουσία αιθανόλης. Η ένταση του χρώματος παρουσιάζει μέγιστο κατά τη φάση της προ-

ζυμωτικής κρυσταλλοποίησης επειδή οι ανθοκυάνες βρίσκονται συμπλοκοποιημένες με απλές φαινόλες. Κατά τη διάρκεια τη ζύμωσης όμως η αιθανόλη που παράγεται σπάει αυτούς τους δεσμούς με αποτέλεσμα μείωση του χρώματος. Κατά τη μετα-ζυμωτική εκχύλιση ωστόσο, το χρώμα επανέρχεται λόγω της δημιουργίας συμπλόκων ανθοκυανών-τανινών (συγχρωματισμός) (Glories, Ribereau, Maujean, & Dubourdiou, 2006) (Cheynier, και συν., Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins, 2006).



Εικόνα 9: Εκχύλιση των συστατικών με την πάροδο του χρόνου, Ε:Ένταση Χρώματος, Α:Ανθοκυάνες, Τ:Τανίνες, ΠΖ:Προ-ζυμωτικά, ΑΖ:Αλκοολική Ζύμωση, ΜΖ:Μετα-ζυμωτικά (Πηγή: *Handbook of Enology Vol2, p 191*)

1.3 Καλλιεργητικές Τεχνικές

Κατά την εγκατάσταση ενός παραγωγικού αμπελώνα πρέπει να ληφθεί υπόψη μία πληθώρα παραγόντων όπως το κλίμα, το έδαφος, η καλλιεργούμενη ποικιλία και το υποκείμενο, το σύστημα μόρφωσης και η τεχνική κλαδέματος που θα ακολουθηθεί. Κύριος στόχος είναι η διαμόρφωση της κατάλληλης αμπελοκομικής τεχνικής ώστε να επιτευχθεί ο ιδανικός συνδυασμός για την παραγωγή αμπελοοικονομικών προϊόντων υψηλής ποιότητας.

Το κλάδεμα της αμπέλου συνιστά μία από τις πιο σημαντικές επεμβάσεις, απαραίτητη για την παραγωγική και οικονομική αξιοποίηση της. Ο όρος αναφέρεται στην εξαίρεση ζώντων τμημάτων του πρέμνου διαφορετικής μορφής και ηλικίας, όπως βραχίονες, κληματίδες, βλαστοί, φύλλα και ταξιανθίες (Σταυρακάκης, Αμπελοοικονομία, 2013). Ανάλογα με το χρόνο που εφαρμόζεται και τον στόχο που επιδιώκει διακρίνεται στο χειμερινό κλάδεμα καρποφορίας για τον καθορισμό των παραγωγικών μονάδων της επόμενης χρονιάς και στα χλωρά κλαδέματα. Τα χλωρά κλαδέματα όπως το βλαστολόγημα, το κορυφολόγημα και το ξεφύλλισμα, εφαρμόζονται κατά την

τρέχουσα περίοδο βλάστησης στα πράσινα μέρη του φυτού και αποτελούν ένα σύστημα διαχείρισης της βλάστησης και της παραγωγής.

1.4 Ξεφύλλισμα

Το ξεφύλλισμα είναι η αφαίρεση φύλλων από το κατώτερο μέρος του βλαστού, με σκοπό την έκθεση των σταφυλών στον αέρα και το φως, για την καλύτερη ωρίμανση τους (Τσακίρης, 2014). Πιο συγκεκριμένα, η αφαίρεση γίνεται από τη ζώνη καρποφορίας του βασικού τμήματος του βλαστού, την περίοδο από την ολοκλήρωση της καρπόδεσης μέχρι και την έναρξη της ωρίμανσης. Αποσκοπεί στην προστασία των σταφυλών από μηχανικές βλάβες (ξήρανση και γήρανση τμημάτων των βασικών φύλλων) και από παθογόνα (ωίδιο, βοτρυτής, έντομα ευδεμίδας), βελτιστοποίηση των μεθόδων φυτοπροστασίας και διευκόλυνση του μηχανικού τρύγου.

Μπορεί να πραγματοποιηθεί πριν ή κατά την άνθιση (πρώιμο) ή λίγο πριν και κατά τον περκασμό (όψιμο). Όταν διατηρούνται 1-2 φύλλα κάτω από την πρώτη σταφυλή καλείται ελαφρύ, ενώ όταν αφαιρούνται όλα τα φύλλα από κάτω και 1-2 πάνω από τη σταφυλή ονομάζεται αυστηρό. Είναι από τις πιο σημαντικές καλλιεργητικές τεχνικές, με άμεση και έμμεση επίδραση στην φωτοσύνθεση, αφού μεταβάλλει τη συνολική φυλλική επιφάνεια αλλά και την αναλογία των ενεργά φωτοσυνθετικών φύλλων. Επηρεάζει ποσοτικά και ποιοτικά την φετινή αλλά και την επόμενη παραγωγή. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων εφαρμόζεται από την καρπόδεση έως την έναρξη της ωρίμανσης για καλύτερο αερισμό της σταφυλικής ζώνης και έκθεση της στο ηλιακό φως, είτε μηχανικά είτε χειρονακτικά (Σταυρακάκης, Αμπελουργία, 2013).

Οι επιπτώσεις του ξεφυλλίσματος στη σύσταση των ραγών δεν είναι σταθερές πάντα και εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως η εποχή και ο τρόπος εφαρμογής του (όψιμο, πρώιμο, ελαφρύ, αυστηρό), τις ενδογενείς ιδιότητες της ποικιλίας, το υποκείμενο, το σύστημα μόρφωσης και τον τρόπο άρδευσης. Όταν εφαρμόζεται πριν την άνθηση, οδηγεί στη δημιουργία ραγών μικρού μεγέθους αλλά με παχύτερους φλοιούς και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών, αυξάνοντας έτσι την αναλογία φλοιού/σάρκας που είναι ιδιαίτερα επιθυμητό στις οινοποιήσιμες ποικιλίες (Pallioti, Gatti, & Roni, 2011). Συχνά όμως προκαλεί προβλήματα στην καρπόδεση λόγω της μειωμένης ποσότητας υδατανθράκων προς τις ταξιανθίες με αποτέλεσμα την κακή θρέψη και την ανθόρροια. Μπορεί ωστόσο να αξιοποιηθεί ως τρόπος για τον έλεγχο της παραγωγής (αραίωμα φορτίου, μείωση ζηηρότητας) και την βελτίωση της ποιότητας του οίνου (Chorti, και συν., 2016). Αν και η συγκέντρωση των φαινολικών αυξάνει σε σταφύλια που έχουν υποστεί πρώιμο ξεφύλλισμα, τα

οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου παρουσιάζουν ανεπαίσθητες διαφορές (Verdenal, et al., 2018).

Αντιθέτως όψιμο ξεφύλλισμα κατά τον περκασμό δρα θετικά στη βιοσύνθεση πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών, ενισχύοντας το φαινολικό και αρωματικό χαρακτήρα της ποικιλίας. Η απευθείας έκθεση των σταφυλών στον ήλιο αυξάνει την περιεκτικότητα των ραγών σε σάκχαρα ενώ παράλληλα μειώνεται η συγκέντρωση των οξέων, λόγω αποικοδόμησης του μηλικού.

Το ξεφύλλισμα περιορίζει τη φωτοσυνθετική επιφάνεια του φυτού με συνέπεια τη μείωση της ταχύτητα φωτοσύνθεσης και των φωτοσυνθετικών προϊόντων. Το πρέμνο όμως χρησιμοποιεί μηχανισμούς όπως την έκπτυξη νέων φύλλων ή τη μεταφορά θρεπτικών από άλλα μέρη του βλαστού για να αντισταθμίσει αυτές τις απώλειες. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τα φύλλα του βασικού τμήματος του βλαστού συνεισφέρουν περισσότερο στη φωτοσύνθεση από ότι τα φύλλα του ανώτερου μέρους (Petrie, Trought, Howell, & Buchan, 2003). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί αύξηση του ρυθμού φωτοσύνθεσης στα εναπομείναντα φύλλα μετά την εφαρμογή ξεφυλλίσματος (Hunter & Visser, 1988).

Η πρακτική του ξεφυλλίσματος συνίσταται ιδιαιτέρως σε ψυχρές περιοχές, αφού επιτρέπει την έκθεση των σταφυλών στο φως, ενισχύοντας το φαινολικό και ανθοκυανικό προφίλ της ποικιλίας (Ristic, et al., 2007). Ωστόσο, για θερμά κλίματα και για τον ελληνικό αμπελώνα, δεν ισχύει πάντοτε, καθώς παρατεταμένη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας στη ράγα, μειώνοντας τη βιοσύνθεση των ανθοκυανών και τη δημιουργία εγκαυμάτων στη σταφυλή (Petroopoulos, Kallithraka, & Paraskevopoulos, 2011).

Για το Αγιωργίτικο, το ξεφύλλισμα είναι μια τεχνική που θεωρείται επιθυμητή για την βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών τόσο της σταφυλής, όσο και των παραγόμενων οίνων. Τα επιστημονικά δεδομένα δείχνουν ότι οδηγεί σε ράγες μικρού μεγέθους, με υψηλότερη συγκέντρωση ανθοκυανών και φαινολικών, και σε οίνους με εντονότερο χρώμα και υψηλή συγκέντρωση τανινών (Chorti, et al., 2016).

1.5 Προσανατολισμός Γραμμών Φύτευσης

Η κατεύθυνση των γραμμών φύτευσης σε έναν παραγωγικό αμπελώνα και ο προσανατολισμός τους, το σύστημα μόρφωσης και υποστύλωσης, αποτελεί σημαντικό κομμάτι που επηρεάζει άμεσα την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων καθώς και το μέσο- και μικρο-κλίμα. Η διάταξη των πρέμων στο χώρο καθορίζει τη ποσότητα της ηλιακής ακτινοβολίας που δέχονται, και συνεπώς ασκεί επίδραση στην ταχύτητα της φωτοσύνθεσης και στην πορεία της θερμοκρασίας. Κατά την εγκατάσταση του

αμπελώννα, ο σχεδιασμός και ο προσανατολισμός των γραμμών θα πρέπει να γίνεται λαμβάνοντας υπόψη την κλίση και ομοιογένεια του εδάφους, την ένταση και κατεύθυνση των ανέμων και το σύστημα άρδευσης.

Στις ψυχρές περιοχές είναι αποδεκτό να εφαρμόζεται η κατεύθυνση Βορρά-Νότου(B-N), αφού μεγιστοποιεί την πρόσληψη της ηλιακής ακτινοβολίας τις πρωινές και απογευματινές ώρες, ειδικά όταν η πυκνότητα φύτευσης είναι μεγάλη. Αντίθετα, σε αμπελουργικές ζώνες με θερμό και ξηρό κλίμα, όπως αυτές του ελληνικού αμπελώνα προτιμάται ο προσανατολισμός Δύσης- Ανατολής (Δ-A), ώστε τα πρέμνα να προστατεύονται από τις υψηλές θερμοκρασίες του καλοκαιριού. Ωστόσο η ένταση της συνολικής ακτινοβολίας που δέχονται στη σταφυλική ζώνη είναι μεγαλύτερη λόγω αντανάκλασης από το έδαφος. Τα φύλλα στην κατεύθυνση αυτή επιδεικνύουν υψηλότερους ρυθμούς φωτοσύνθεσης λόγω διαπνοής (Hunter, Volschenk, & Zorer, 2016).

Η κατανομή της ηλιακής ακτινοβολίας φαίνεται να είναι πιο ομοιόμορφη στην κατεύθυνση B-N από ότι στην Δ-A. Η επίπτωση αυτή στη σύσταση του χυμού γίνεται αντιληπτή από τις μεγάλες διαφορές που υπήρχαν σε δείγματα μεταξύ του ίδιου προσανατολισμού Δ-A. Συγκεκριμένα ο βαθμός ωριμότητας, οι βαθμοί Brix, ο αλκοολικός τίτλος και η συγκέντρωση του μηλικού οξέος παρουσίασαν μεγάλο εύρος διακυμάνσεων στην περίπτωση Δ-A, από ότι B-N. Η έκθεση των ραγών στον ήλιο επηρεάζει άμεσα και τη σύνθεση πρόδρομων αρωματικών ενώσεων καθώς αυξάνει τη θερμοκρασία της σταφυλής, τροποποιώντας τη φυσιολογία του πρέμνου (Marais, Hunter, Haasbroek, & Augustyn, 1996). Η σωστή διαχείριση της φυλλικής επιφάνειας με καλλιεργητικές επεμβάσεις για την ομοιόμορφη κατανομή του φωτός μπορεί να μειώσει αυτές τις διαφορές (Naylon, Creasy, Trought, & Van Hanen, 2000). Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι η κατεύθυνση των γραμμών φύτευσης επηρεάζει όχι μόνο τη μέση θερμοκρασία και την ποσότητα ακτινοβολίας που δέχεται ο αμπελώνας, αλλά και τις μέγιστες τιμές τους μέσα στην ημέρα (Guidoni, Cavalletto, Bartolomei, Mania, & Gangemi, 2013).

Όπως προαναφέρθηκε η κλίση και η ένταση των ανέμων θα πρέπει να συνυπολογίζονται: σε εδάφη με μικρή κλίση, η φύτευση των γραμμών γίνεται παράλληλα με την κλίση, ενώ σε περιοχές με ισχυρούς ανέμους η κατεύθυνση των γραμμών είναι παράλληλη προς εκείνη του ανέμου, ώστε να ελαχιστοποιούνται οι ζημιές (Σταυρακάκης, Αμπελουργία, 2013).

Η αρχιτεκτονική φύτευσης ενός αμπελώνα και ο προσανατολισμός των γραμμών μπορεί να επηρεάσει την ποσότητα της ηλιακής ακτινοβολίας που διεισδύει μέσα από το φυλλικό τοίχωμα. Κατά συνέπεια το διαθέσιμο φως επιδρά στην φυσιολογία και ανάπτυξη των ζιζανίων που εκφύονται μεταξύ των γραμμών, όπως το *Solanum nigrum*. Τα ζιζάνια αυτά δρουν ανταγωνιστικά προς την άμπελο εμποδίζοντας

την παραγωγικότητα της, και η επιλογή του κατάλληλου προσανατολισμού αποτελεί τρόπο αντιμετώπισης τους με φυσικά μέσα (Shrestha & Fidelibus, 2005).

1.6 Η ποικιλία Αγιωργίτικο

Το Αγιωργίτικο είναι μία από τις πιο εκλεκτές και πλούσιες σε χρώμα ελληνικές ερυθρές ποικιλίες σταφυλιών. Γνωστή και ως Μάυρο Νεμέας ή Μαυρούδι, αν και μέσα από βιοχημικές μεθόδους (Σταυρακάκης 1990), αποδείχτηκε ότι τα αναφερόμενα συνώνυμα Μαυρούδι, Μαυράκι και Μαυροστάφυλο αποτελούν διαφορετικές ποικιλίες.

Καλλιεργείται στην ευρύτερη περιοχή της Νεμέας (27,000 στρ. περίπου), όπου αποτελεί και την αμπελουργική ζώνη παραγωγής ΠΟΠ (Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης) οίνων. Η περιοχή οριοθετήθηκε ως ζώνη ΠΟΠ το 1971 και περιλαμβάνει τη Νεμέα και 16 ακόμη χωριά, που απλώνονται σε υψόμετρο 250-800 μ (Μπακασιέτας). Την ονομασία προέλευσης 'Νεμέα' δικαιούνται οι οίνοι ερυθρός ξηρός και ερυθρός γλυκός (Σουφλερός, 2015). Ο λόγος που διακρίνουμε δύο διαφορετικούς τύπους οίνου είναι η μεγάλη ετερογένεια εδαφικών και κλιματικών συνθηκών που παρουσιάζει η ζώνη της Νεμέας.

Εκτός από το αμπελουργικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου, η καλλιέργεια της ποικιλίας συνίσταται και για τα διαμερίσματα Θράκης, Μακεδονίας, Ηπείρου, Θεσσαλίας και Κρήτης (Κοινή Υπουργική Απόφαση Αριθμ. 2919/95506/2017 ΦΕΚ 3276/Β/18-9-2017).



Εικόνα 10: Χαρακτηριστική σταφυλή της ποικιλίας Αγιωργίτικο (Πηγή: antimisaris.gr)

1.6.1 Αμπελογραφικοί χαρακτήρες και φαινολογικά στάδια

- Η κορυφή νεαρής βλάστησης είναι μετρίως ανοιχτή-ανοιχτή, κιτρινοπράσινη, χνοώδης και κατά τόπους βαμβακώδης με ρόδινη παρυφή.
- Τα νεαρά φύλλα είναι πράσινα, στυλινά και χνοώδη-βαμβακώδη στην κάτω επιφάνεια, ενώ στην άνω επιφάνεια του ελάσματος μεταξώδη.
- Ο ποώδης βλαστός είναι οριζόντιος, αραχνοϋφής, πράσινος-κιτρινοπράσινος στην κοιλιακή πλευρά και πράσινος με ερυθρές ραβδώσεις στη νωτιαία πλευρά. Οι οφθαλμοί είναι πράσινοι με ερυθρές περιοχές.
- Το αναπτυγμένο φύλλο είναι μέτριο- μεγάλο, σφηνοειδές και πεντάκολπο. Έχει έλασμα κυματώδες, ελαφρώς πομφολυγώδες, παχύ με αναδιπλώσεις κατά μήκος των κύριων νευρώσεων. Ο μισχικός κόλπος είναι κλειστός σχήματος V, με επικαλυπτόμενους λοβούς. Οι νευρώσεις κιτρινοπράσινες και οι όδοντες μέτριοι-μεγάλοι.
- Οι έλικες είναι διαλείπουσες, λείες, πράσινες, δισχιδείς και πολυσχιδείς, μέτριου έως μεγάλου μήκους.
- Η σταφυλή είναι μέτρια, κωνική, συχνά διπλή, πυκνή έως πολύ πυκνή. Ο ποδίσκος είναι βραχύς- μέτριος και συνήθως ξυλοποιείται πλήρως.
- Η ράγα είναι μικρή- μέτρια και σφαιρική. Έχει φλοιό μετρίως παχύ-παχύ, μέτριας ανθεκτικότητας, πλούσιο σε ανθοκυάνες με άφθονη ανθηρότητα. Η σάρκα είναι χυμώδης, γλυκιά, μετρίως μαλακή.
- Τα γίγαρτα είναι συνήθως 2-3 ανά ράγα.
- Η κληματίδα είναι ερυθροκαστανή- ερυθροειδής με φακίδια, κυκλική- ελλειψοειδούς τομής, γωνιώδης και λεία.

Η έναρξη της βλάστησης ξεκινά στα τέλη του 3ου δεκαήμερου του Μαρτίου και ολοκληρώνεται στις αρχές του 3ου δεκαήμερου του Απριλίου. Η έναρξη της άνθησης μέχρι την πλήρη άνθηση πραγματοποιείται κατά το 2ο δεκαήμερο του Μαΐου. Η ωρίμανση ξεκινά τέλη Ιουλίου και ολοκληρώνεται στα μέσα με τέλη Σεπτεμβρίου.

1.6.2 Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά

Πρόκειται για ποικιλία μετρίως ζωνρή έως ζωνρή, εύρωστη, όψιμης ωρίμανσης, πολύ παραγωγική. Ο τυφλός οφθαλμός είναι γόνιμος. Ο καρποφόρος βλαστός φέρει συνήθως 3-4 σταφυλές (4ο και 5ο κόμβο).

Στους παλαιούς αμπελώνες μορφώνεται σε κύπελλο, ενώ στους νέους τα πρέμνα μορφώνονται σε γραμμικά σχήματα (αμφίπλευρο Royal με 6-8 βραχίονες), με βραχύ κλάδεμα καρποφορίας. Η ποικιλία Αγιωργίτικο παρουσιάζει μεγάλο δυναμισμό

παραγωγής, αφού είναι δυνατή η αύξηση των αποδόσεων ανά πρέμνο και στρέμμα χωρίς την υποβάθμιση της ποιότητας των παραγόμενων οίνων.

Η καλλιέργεια της μπορεί να γίνει σε διαφόρων ειδών εδάφη, όπως είναι άλλωστε και τα περισσότερα στην ζώνη της Νεμέας. Σε υψόμετρο άνω των 300 μ. υπάρχει η δυνατότητα παραγωγής υψηλής ποιότητας αμπελοοινικών προϊόντων.

Το Αγιωργίτικο είναι ευαίσθητο στο ωίδιο και στις ιώσεις καθώς και στις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα, στην ξηρασία και στον ανοιξιάτικο παγετό. Η ήπια υδατική καταπόνηση συμβάλει στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των πρέμνων. Προβλήματα στην άνθηση, την γονιμοποίηση και την καρπόδεση παρουσιάζονται την άνοιξη σε πολύ ζωηρά πρέμνα, με αποτέλεσμα την μικροραγία και το σχηματισμό αγίγαρτων ραγών.

Η συμπεριφορά της ποικιλίας στους επιτραπέζιους και τους επιτόπιους εμβολιασμούς είναι ικανοποιητική και δεν παρουσιάζει προβλήματα μη αρμονικής συμβίωσης με τα αντιφυλλοξηρικά υποκείμενα 110R, 41B, 1103P και 140Ru.

Το γλεύκος της ποικιλίας χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (220-240 g/L), χαμηλή οξύτητα (4,4-6,4 g/L τρυγικού οξέος) και έχει pH 3.4-3.8. Θεωρείται από τις πλουσιότερες ελληνικές ποικιλίες σε ανθοκυάνες (900-1000 mg/Kg ραγών) και ολικές φαινόλες (2400-2500 mg/Kg ραγών). Οι τιμές αυτές σχετίζονται έντονα και από τον κλώνο, τις καλλιεργητικές τεχνικές και τις εδαφοκλιματικές συνθήκες.

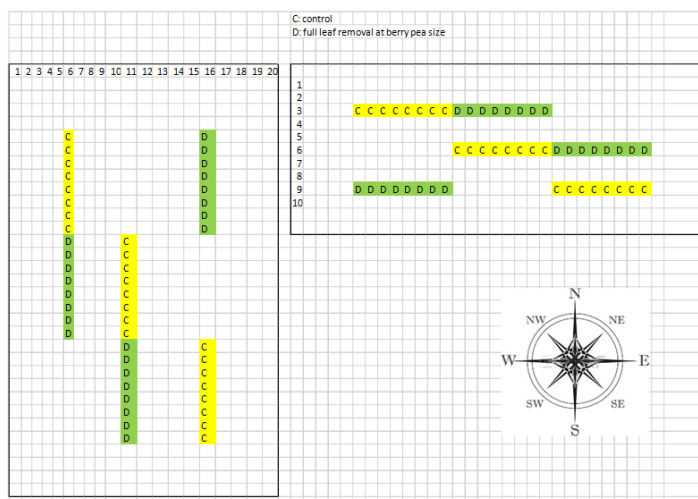
Οι παραγόμενοι οίνοι χαρακτηρίζονται από πλούσιο, βαθύ ερυθρό χρώμα με αποχρώσεις του ιώδους και μεγάλη ικανότητα παλαίωσης. Με την παλαίωση οι οίνοι αποκτούν πιο πλούσιο σώμα και σώμα. (Σταυρακάκης, 2010)

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Σκοπός Πειράματος

Κύριος σκοπός της παρούσας έρευνας είναι να εξετάσει την αλληλεπίδραση του ξεφυλλίσματος και του προσανατολισμού των γραμμών φύτευσης στη χημική σύσταση οίνων, της ποικιλίας Αγιωργίτικο. Και οι δύο αυτές καλλιεργητικές τεχνικές επιδρούν άμεσα στην πορεία ωρίμανσης των σταφυλών, και κατ' επέκταση στη χημική σύσταση του γλεύκους και του παραγόμενου οίνου.

Σε πειραματικό αμπελώνα στην περιοχή Τσαγκάρι της Νεμέας, πραγματοποιήθηκε ξεφύλλισμα (defoliation) στα μισά πρέμνα κάθε σειράς, ενώ τα υπόλοιπα χρησιμοποιήθηκαν ως Ομάδα Ελέγχου (control). Ο αμπελώνας αποτελείται από δύο κομμάτια, με διαφορετική κατεύθυνση σειρών, το πρώτο από Νότο προς Βορρά και το δεύτερο από Ανατολή προς Δύση.



Εικόνα 11: Σχέδιο αμπελώνα D: defoliation, C: control

Η καλλιεργητική τεχνική του ξεφυλλίσματος πραγματοποιήθηκε στο στάδιο μετά την καρπόδεση, έως και 6-7 κόμβους από τη βάση του βλαστού (ένα κόμβο ανώτερα από την τελευταία σταφυλή). Σε κάθε κομμάτι του αμπελώνα (Νότος-Βορράς και Ανατολή-Δύση) πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις.

Ο τρυγητός και η οινοποίηση της κάθε μεταχείρισης έγιναν ξεχωριστά για κάθε κομμάτι (Νότος, Βορράς, Ανατολή, Δύση).

2.2 Οινοποίηση

Τα προς μελέτη δείγματα οίνου προήλθαν από οινοποίηση, η οποία πραγματοποιήθηκε στον Οινοποιητικό Συνεταιρισμό Νεμέας (ΑΟΣ Νεμέας) τον Σεπτέμβριο του 2017. Για κάθε μεταχείριση (συνθήκη) η συγκομιδή των σταφυλιών έγινε ξεχωριστά για κάθε πλευρά της σειράς (Ανατολή – Δύση στο πρώτο κομμάτι και Βορράς – Νότος στο δεύτερο) και οινοποιήθηκαν εξίσου ξεχωριστά, σε πλαστικούς περιέκτες των 20L. Ο απορραγισμός και η έκθλιψη των σταφυλιών έγιναν χειρωνακτικά. Προστέθηκαν 40 mg/Kg SO₂ υπό τη μορφή metabisulfite και 40 mg/Kg ενζύμου ULTRasi TM Redberry (DALCIN). Μετά από 6 ώρες έγινε η προσθήκη εμπορικού στελέχους ζυμομύκητα (200 mg/Kg Mycoferm IT FruityFlavor–Everintec) και 24 ώρες αργότερα από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη αμμωνιακών θρεπτικών (200 g/Kg D.A.P. Activ –EnologicaVasonS.p.A.). Η ομογενοποίηση του γλεύκους λάμβανε χώρα μία φορά την ημέρα, χειρωνακτικά.

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης γινόταν καθημερινά καταγραφή της θερμοκρασίας και της σχετικής πυκνότητας. Η ζύμωση ολοκληρώθηκε σε 4-6 μέρες και όταν τα δείγματα έφτασαν στο κατάλληλο ειδικό βάρος, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός από τα στέμφυλα και μετάγγιση σε πλαστικούς περιέκτες των 3 και 5L. Μετά από 6 μέρες έγινε συμπληρωματική θείωση με 60 mg/Kg SO₂ υπό τη μορφή metabisulfite.

2.3 Αναλύσεις στον οίνο

2.3.1 Ενεργός Οξύτητα-pH

Η Ενεργός Οξύτητα ή pH εκφράζει το σύνολο των καρβοξυλομάδων των οξέων που βρίσκονται σε διάσταση και δίνουν ιόντα H⁺. Εξαρτάται από το είδος αλλά και τη συγκέντρωση των οργανικών οξέων που περιέχονται στον οίνο και διαμορφώνεται από την ισορροπία τρυγικού οξέος-όξινου τρυγικού καλίου. Το pH των οίνων εξαρτάται από την αμπελουργική περιοχή, την ποικιλία και τον τρόπο οινοποίησης. Κυμαίνεται από 2,8-4,2.

Υπολογισμός

Ο προσδιορισμός της ενεργούς οξύτητας των δειγμάτων έγινε με τη χρήση pH-μέτρου στο Εργαστήριο Οινολογίας (HANNA HI 112), αφού πρώτα έγινε η βαθμονόμηση του οργάνου με ρυθμιστικά διαλύματα γνωστού pH, 4 και 7.

2.3.2 Ογκομετρούμενη ή Ολική Οξύτητα

Η Ογκομετρούμενη ή Ολική Οξύτητα εκφράζει το σύνολο των όξινων ομάδων που τιτλοδοτούνται όταν το pH του οίνου φέρεται στην τιμή 7 με προσθήκη πρότυπου διαλύματος αλκάλειως. Το CO₂ δεν λαμβάνεται υπόψη στον υπολογισμό. Εξαρτάται από την περιεκτικότητα του οίνου σε ελεύθερα οργανικά οξέα, ανεξάρτητα από το είδος τους. Για τον καθορισμό του τέλους της αντίδρασης χρησιμοποιείται σαν δείκτης το κυανό της βρωμοθυμόλης. Εκφράζεται σε g/L τρυγικού οξέος.

Υπολογισμός

- Απομάκρυνση CO₂ από το δείγμα.
- Σε κωνική φιάλη των 250 mL προστίθενται 10 mL οίνου, 30 mL απεσταγμένου νερού και μερικές σταγόνες δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης, που έχει περιοχή αλλαγής χρώματος το pH 7.
- Τιτλοδότηση του διαλύματος με πρότυπο διάλυμα NaOH 0.1 M, μέχρι την αλλαγή του χρώματος (κυανοπράσινη χροιά).

Η ολική οξύτητα εκφρασμένη σε g/L τρυγικού οξέος δίνεται από τον τύπο

$$A=0,75*n$$

όπου **n** τα mL NaOH 0.1 M που καταναλώθηκαν κατά την τιτλοδότηση.

2.3.3 Πτητική Οξύτητα (Π.Ο)

Η Πτητική Οξύτητα αποτελείται από τα οξέα της σειράς του οξικού οξέος που απαντούν στους οίνους είτε ελεύθερα, είτε με την μορφή αλάτων. Οφείλεται κυρίως στα οξέα της αλειφατικής σειράς με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα, όπως μυρμηκικό, οξικό, προπιονικό και βουτυρικό. Επειδή από αυτά επικρατέστερο είναι το οξικό, συνήθως η πτητική οξύτητα εκφράζεται σε g/L οξικού οξέος.

Επηρεάζει αρνητικά τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου προσδίδοντας έντονη και άσχημη οσμή. Σε υγιή οίνο, μετά την αλκοολική ζύμωση η συγκέντρωση του οξικού οξέος κυμαίνεται από 0,3-0,4, ενώ μετά την μηλογαλακτική ζύμωση στους ερυθρούς από 0,5-0,6 g/L οξικού οξέος. Αυξημένη πτητική οξύτητα δηλώνει βακτηριακή προσβολή του οίνου.

Υπολογισμός

Ο προσδιορισμός της Π.Ο γίνεται με τιτλοδότηση των πτητικών οξέων που διαχωρίζονται από τον οίνο με απόσταξη με υδρατμούς και συμπύκνωση των ατμών.

- Απομάκρυνση CO₂ από το δείγμα, με αντλία σε φιάλη κενού.

- Απόσταξη με υδρατμούς, όπου 20mL οίνου μεταφέρονται σε φιάλη απόσταξης, με ταυτόχρονη προσθήκη 0,5 g τρυγικού οξέος.
- Συλλέγονται 250 mL αποστάγματος.
- Το απόσταγμα ογκομετρείται με διάλυμα NaOH 0.1 M παρουσία δείκτη φαινολοφθαλεΐνης.
- Προσθήκη 4 σταγονών αραιωμένου HCl $\frac{1}{4}$, 2 mL δείκτη αμύλου και μερικών κρυστάλλων KI.
- Τιτλοδότηση του ελεύθερου SO₂ με διάλυμα I₂ 0.005M.

Η Π.Ο εκφρασμένη σε g/L οξικού οξέος δίνεται από τον τύπο

$$A=0,3(n-0.1n')$$

όπου **n** τα mL NaOH 0.1 M που καταναλώθηκαν κατά την πρώτη τιτλοδότηση και **n'** τα mL I₂ 0.005M που καταναλώθηκαν κατά την δεύτερη.

2.3.4 Αλκοολικός Τίτλος

Ο αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο ενός οινικού προϊόντος ονομάζεται ο αριθμός των λίτρων άνυδρης αιθανόλης που περιέχεται σε 100 λίτρα του προϊόντος αυτού, όταν οι δύο όγκοι μετριοούνται σε θερμοκρασία 20° C. Η αιθυλική αλκοόλη που βρίσκεται στον οίνο παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση, αποτελώντας το δεύτερο κυριότερο συστατικό, μετά το νερό αφού αντιπροσωπεύει το 9-15% του όγκου του.

Υπολογισμός

Ο προσδιορισμός του Α.Τ γίνεται με απόσταξη της αλκοόλης του οίνου και στη συνέχεια μέτρηση με αραιομετρία.

- Προσθήκη 200 mL δείγματος σε ογκομετρική φιάλη και μέτρηση της θερμοκρασίας.
- Μετάγγιση του δείγματος στη σφαιρική φιάλη της αποστακτικής συσκευής και ξέπλυμα 4 φορές με 5 mL νερού κάθε φορά.
- Προσθήκη 10 mL εναιωρήματος CaOH και 2 τεμαχίων πορώδους ανενεργού υλικού (ελαφρόπετρα).
- Η σφαιρική φιάλη συνδέεται στην αποστακτική συσκευή και ξεκινάει η θέρμανση και η απόσταξη.
- Συλλογή των $\frac{3}{4}$ του αρχικού όγκου δείγματος στην φιάλη των 200 mL που χρησιμοποιήθηκε στην αρχή.
- Ο όγκος συμπληρώνεται στα 200 mL με απιονισμένο νερό και λαμβάνεται ένδειξη της θερμοκρασίας
- Διόρθωση του αλκοολικού βαθμού με τη βοήθεια πίνακα.

2.3.5 Ανάγοντα Σάκχαρα

Τα σάκχαρα του γλεύκους και του οίνου διακρίνονται στα ανάγοντα και στα μη-ανάγοντα. Ανάγοντα είναι αυτά που διαθέτουν ελεύθερη αλδεϋδική ή κετονική ομάδα και έχουν την ιδιότητα να ανάγουν το φελίγγειο υγρό σε αλκαλικό περιβάλλον, καθιστώντας έτσι δυνατό το προσδιορισμό τους με χημικές μεθόδους. Στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, η συγκέντρωση τους δεν είναι ποτέ μηδενική και ανάλογα με την περιεκτικότητά τους ο οίνος χαρακτηρίζεται:

Ξηρός (*sec*): < 2 g/L ανάγοντα σάκχαρα (4 για την ελληνική νομοθεσία)

Ημίξηρος (*demi-sec*): 2-18 g/L

Ημίγλυκος (*demi-doux*): 18-40 g/L

Γλυκός (*doux*): > 40 g/L

Υπολογισμός

Ο προσδιορισμός των αναγόντων ζαχάρων έγινε με την μέθοδο Luff.

- Αρχικά γίνεται διαύγαση του δείγματος για την απομάκρυνση συστατικών που παρεμβαίνουν στην μέτρηση (κυρίως φαινολικά). Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL προστίθενται 50 mL οίνου, 2,5 mL οξικού μολύβδου, 0,5 g ανθρακικού ασβεστίου και $\frac{1}{2}(n-0,5)$ mL NaOH 1M (όπου n τα mL διαλύματος NaOH 0,1M που καταναλώθηκαν κατά τον προσδιορισμό της ολικής οξύτητας 10 mL οίνου).
- Ανάδευση και αναμονή για 15 λεπτά.
- Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 mL με απιονισμένο νερό και το διάλυμα διηθείται.
- Σε κωνική των 300 mL με εσμύρισμα προστίθενται 25 mL από το διήθημα , 25 mL θεικού χαλκού και μερικά τεμάχια ελαφρόπετρας. Η κωνική εφαρμόζεται σε κάθετο ψυκτήρα και το δείγμα υφίσταται βρασμό για 10 λεπτά.
- Ακολουθεί άμεση και ταχεία ψύξη με τρεχούμενο νερό και η προσθήκη 10 mL KI 30%, 25 mL H₂SO₄ 25% και 2 mL δείκτη αμύλου.
- Γίνεται τιτλοδότηση με θειοθειικό νάτριο 0,1 N. Το τελικό σημείο της τιτλοδότησης προσδιορίζεται με την αλλαγή του χρώματος σε λευκό.

Έστω x τα mL θειοθειικού νατρίου που καταναλώθηκαν κατά την τιτλοδότηση του δείγματος και x' τα mL που καταναλώθηκαν στο μάρτυρα (τυφλό). Η διαφορά x-x' αντιστοιχίζεται σε mg σακχάρου, με την βοήθεια πίνακα, και το αποτέλεσμα διαιρείται με το συντελεστή διαίρεσης 25 (25 mL διηθήματος που χρησιμοποιήθηκαν). Το αποτέλεσμα διπλασιάζεται και με αυτό τον τρόπο υπολογίζεται η συγκέντρωση αναγόντων σακχάρων σε g/L δείγματος.

2.3.6 Ένταση-Απόχρωση

Το χρώμα των οίνων οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις και είναι απόρροια της εκλεκτικής απορρόφησης ορισμένων ακτινοβολιών του ηλιακού φάσματος. Στους ερυθρούς οίνους το φάσμα απορρόφησης παρουσιάζει μέγιστο στα 520 nm (ερυθρό), και στην περίπτωση νεαρών ερυθρών οίνων οφείλεται στις ελεύθερες ανθοκυάνες, που επικρατούν με τη μορφή φλαβυλίου. Με την πάροδο του χρόνου όμως, και κατά την παλαίωση, η απορρόφηση στα 520 nm μειώνεται, αυξάνοντας την απορρόφηση στα 420 nm (κίτρινο), λόγω των αλλαγών στις μορφές τανινών που επικρατούν στους παλαιωμένους οίνους και απορροφούν στην περιοχή του κίτρινου. Επιπλέον για την αξιολόγηση νέων οίνων με βαθιά χρώματα λαμβάνεται υπόψη η απορρόφηση στα 620 nm (κυανό), που οφείλεται στις μορφές της βάσης κινόνης των ελεύθερων και των ενωμένων ανθοκυανών.

Η ένταση του χρώματος στον οίνο αντικατοπτρίζεται από την αναλογία των απορροφήσεων A_{420} , A_{520} , A_{620} και το άθροισμα τους. Η απόχρωση υπολογίζεται από την αναλογία των απορροφήσεων A_{420} και A_{520} .

Υπολογισμός

Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 4000 στροφές. Λαμβάνονται οι απορροφήσεις στα μήκη κύματος 620, 520 και 420 nm με λάμπα αλογόνου, χρησιμοποιώντας κυψελίδες 1mm. Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό.

$$\text{Ένταση} = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$\text{Απόχρωση} = A_{420} / A_{520}$$

2.3.7 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)

Ο Δείκτης Φαινολικών Ουσιών αποτελεί μία γρήγορη και εύκολη ένδειξη των ολικών φαινολικών συστατικών που βρίσκονται στον οίνο, δίνοντας επαναλήψιμα αποτελέσματα. Ο προσδιορισμός βασίζεται στην απορρόφηση που εμφανίζουν οι βενζολικοί δακτύλιοι των φαινολικών ενώσεων στο υπεριώδες φως με μέγιστο στα 280 nm. Μετρά την περιεκτικότητα των φλαβανοειδών, των μη-φλαβανοειδών και κάποιων φαινολικών ουσιών που απορροφούν στα 280 nm. Για την μέτρηση χρησιμοποιείται κυψελίδα χαλαζία, ώστε να μην απορροφά στο υπεριώδες φάσμα προκαλώντας παρεμβολή στη μέτρηση.

Υπολογισμός

Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 4000 στροφές. Κάθε δείγμα αραιώνεται 1/100 με απιονισμένο νερό. Λαμβάνεται η απορρόφηση στα 280 nm. Ο ΔΦΟ προκύπτει από τη σχέση:

$$\Delta\Phi O = A_{280} \times 100$$

όπου A_{280} η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm και 100 η αραιώση του δείγματος (1/100).

2.3.8 Ολικά Φαινολικά με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu

Πρόκειται για μία φωτομετρική μέθοδο που μετρά το σύνολο των φαινολικών ουσιών του δείγματος. Βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων του οίνου από το αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu. Υπολογίζεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu, ως διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων, ανάγεται σε μείγμα κυανών οξειδίων, κατά την οξείδωση των φαινολών. Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 765 nm και είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na_2CO_3 .

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος με την χρήση πρότυπης καμπύλης.

Υπολογισμός

- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 4000 στροφές.
- Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL προστίθενται 5 mL απιονισμένο νερό, 100 μL δείγματος (αραιωμένο αν κριθεί αναγκαίο), 0,5 mL αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu και 1,5 mL Na_2CO_3 20%. Συμπληρώνεται ο τελικός όγκος στα 10 mL.
- Μετά από παραμονή 30 λεπτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μετريέται η απορρόφηση στα 765 nm, με πλαστική κυψελίδα πάχους 10mm και τη χρήση λάμπας αλογόνου. Για το μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό.
- Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών του δείγματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) γίνεται από την ευθεία που περιγράφει την πρότυπη καμπύλη λαμβάνοντας υπόψη και την αραιώση που τυχόν προηγήθηκε (1/5 στην συγκεκριμένη περίπτωση).

Από την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος προκύπτει η εξίσωση $y = 0.001x$ με $R^2 = 0.998$. Λύνοντας ως προς x και πολλαπλασιάζοντας επί την αραίωση προκύπτει η συγκέντρωση των δειγμάτων σε mg/L γαλλικού οξέος.

2.3.9 Προσδιορισμός τανινών με τη μέθοδο Harbertson

Η μέθοδος μετράει το σύνολο των τανινών ενός δείγματος (οίνου ή ράγας). Η αρχή της μεθόδου (Hagerman, Butler 1978) βασίζεται στην ιδιότητα των τανινών να σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα με πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία στη συνέχεια κατακρημνίζονται. Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται είναι η αλβουμίνη βόειου ορού (BSA). Τα σύμπλοκα που δημιουργούνται, αντιδρούν με το χλωριούχο σίδηρο, και σε αλκαλικό διάλυμα έχουν ιώδες χρώμα, καθιστώντας δυνατό το προσδιορισμό τους με απορρόφηση στα 510 nm. Η συγκέντρωση των τανινών στα σύμπλοκα τανίνης-πρωτεΐνης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα. Για την ποσοτική παραλαβή των τανινών του δείγματος είναι απαραίτητο το διάλυμα BSA να περιέχει διπλάσια ποσότητα αλβουμίνης σε σχέση με την συγκέντρωση των τανινών. Η περίσσεια πρωτεΐνης δεν επηρεάζει δυσμενώς την μέτρηση.

Υπολογισμός

- Αντιδραστήρια:
Model wine: 12% EtOH, 5 g/L τρυγικό οξύ, pH:3.3 με NaOH 1N
Διάλυμα A: 200mM acetic acid, 170 mM NaCl, pH:4.9 με NaOH 1N
Πρωτεϊνικό Διάλυμα BSA 1 g/L: 100 mg BSA-fractionV διαλυμένα σε 100 mL Διαλύματος A.
Διάλυμα TEA-SDS: 5% v/v triethanolamine(TEA), 10% w/v sodium dodecyl sulfate (SDS)
Διάλυμα FeCl₃: 10 mM FeCl₃ σε 0,01 N HCl
Πρότυπο διάλυμα κατεχίνης 1 g/L για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης
- Σε erpendorf των 2 mL τοποθετούνται 500 μL αραιωμένου δείγματος (1/2) και 1 mL πρωτεϊνικού διαλύματος BSA. Γίνεται ήπια ανάδευση για 15 λεπτά και το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 13500 στροφές. Απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- Στο ίζημα προστίθενται 250 μL διαλύματος A. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13500 στροφές. Απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- Στο ίζημα προστίθενται 875 μL διαλύματος TEA-SDS και αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αναδεύεται σε vortex για να

διαλυθεί το ίζημα και μετριέται η απορρόφηση στα 510 nm (A_1) με κυψελίδα στένωσης.

- Προσθήκη 125 μ L διαλύματος $FeCl_3$ και μετά από παραμονή 15 λεπτών μετριέται ξανά η απορρόφηση στα 510 nm (A_2).
- Για το μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιείται διάλυμα TEA-SDS.

Η συγκέντρωση των τανινών υπολογίζεται από τη διαφορά των δύο απορροφήσεων $A=A_2-A_1$. Από την καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης $y = 0.006x$ ($R^2 = 0.999$) υπολογίζεται η συγκέντρωση τανινών του αραιωμένου δείγματος σε ισοδύναμα κατεχίνης (C_1). Η τελική συγκέντρωση τανινών είναι $C=C_1 \times$ αραιώση mg/L.

2.3.10 Προσδιορισμός Ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο εξοπλισμός της HPLC αποτελείται από τη στήλη Restek Pinnacle II C18 (250 x 4.0 mm x 5 μ m), μία αντλία PU-2089 plus, μία βαλβίδα έγχυσης Rheodyne model 7725i με ενσωματωμένο loop στα 20 μ L και έναν ανιχνευτή diode array (DAD Jasco MD-910).

Τα δείγματα οίνου περνάνε από φίλτρο σύριγγας με πορότητα 0.2 μ m και τοποθετούνται σε φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη της HPLC. Η ανάλυση προγραμματίστηκε με ρυθμό ροής 1 mL/min, όγκο δείγματος 10 μ L στα 520 nm. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες A: 10% φορμικό οξύ σε H_2O και B: MeOH. Το πρόγραμμα έκλουσης παρατίθεται στον Πίνακα 1 :

Πίνακας 1: Πρόγραμμα έκλουσης για το προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC

Χρόνος (min)	Διαλύτης A % (10 % φορμικό οξύ σε dH ₂ O)	Διαλύτης B % (MeOH)
αρχικές συνθήκες	90	10
22	50	50
32	5	95
34	5	95
35	90	10

Η ταυτοποίηση της μαλβιδίνης βασίζεται στη σύγκριση των τιμών κατακράτησης των κορυφών που προσδιορίστηκαν με τις κορυφές της 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. Η εξίσωση που προέκυψε είναι η εξής: $y = 2.554x - 0.020$
 $R^2 = 1$.

Από την ανάλυση προσδιορίστηκαν 4 μονογλυκοζίτες δελφινιδίνη (Dp), πετουινιδίνη (Pt), πεονιδίνη (Pn), μαλβιδίνη (Mv) και δύο ακυλιωμένες ανθοκυάνες, κουμαρικός (Mv-ac) και οξικός εστέρας της μαλβιδίνης (Mv-coum). Σε κανένα από τα συγκεκριμένα δείγματα δεν προσδιορίστηκε η κυανιδίνη (Cy). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα μαλβιδίνης σε mg/L.

2.3.11 Προσδιορισμός του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) τανινών με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Σε δείγμα οίνου 10mL γίνεται εξάτμιση υπό κενό (rotary evaporation), στους 40°C για απομάκρυνση της αιθανόλης και συμπύκνωση του δείγματος μέχρι 6-7mL. Το υγρό υπόλειμμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 20mL και συμπληρώνεται ο όγκος με νερό.

Στη συνέχεια σε συσκευή SPE και με τη χρήση στήλης C18, γίνεται έκπλυση των δειγμάτων με 50mL μεθανόλη για την παραλαβή των επιθυμητών ουσιών (προανθοκυανιδίνες). Στο μεθανολικό εκχύλισμα που προκύπτει, προστίθενται 2mL H₂O και συμπυκνώνεται υπό κενό (rotary evaporation). Το συμπύκνωμα μεταφέρεται σε προζυγισμένο γυάλινο περιέκτη (ξηρό και με καπάκι), ψύχεται στους -30°C και ακολουθεί λυοφιλίωση.

Αφού ολοκληρωθεί η ξήρανση, ο περιέκτης ζυγίζεται ξανά μαζί με το καπάκι και από τη διαφορά υπολογίζεται η ποσότητα των φαινολικών συστατικών που εκχυλίστηκαν. Το ξηρό εκχύλισμα επαναδιαλύεται με μεθανόλη σε τελική συγκέντρωση 20 g/L και διατηρείται στην κατάψυξη.

Σε γυάλινα φιαλίδια τοποθετούνται 100μL δείγματος και 1000μL διαλύματος phloroglucinol. Μετά από ανάδευση, τα δείγματα παραμένουν στους 50°C για 30 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 1mL διαλύματος οξικού νατρίου (CH₃COONa 40mM). Τα δείγματα περνάνε από φίλτρο σύριγγας με πορότητα 0.2 μm και τοποθετούνται σε φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη της HPLC.

Ο εξοπλισμός της HPLC αποτελείται από τη στήλη XTerra RP18 Waters (3.5 μm, 4.6 x 100 mm), μία αντλία PU-2089 plus, μία βαλβίδα έγχυσης Rheodyne model 7725i με ενσωματωμένο loop στα 20μL και έναν ανιχνευτή diode array (DAD Jasco MD-910). Η ανάλυση προγραμματίστηκε με ρυθμό ροής 1 mL/min, όγκο δείγματος 20 μL στα 280

nm. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες A: 0.1 % οξικό οξύ σε dH₂O και B: MeOH. Το πρόγραμμα παρατίθεται στον Πίνακα 2:

Πίνακας 2: Πρόγραμμα έκλουσης για το προσδιορισμό του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) με HPLC

Χρόνος (min)	Διαλύτης A % (0.1 % οξικό οξύ σε dH ₂ O)	Διαλύτης B % (MeOH)
αρχικές συνθήκες	95	5
1	84	16
7	78	22
8	65	35
15	58	42
16	0	100
23	100	0

Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της φλωρογλουκινολής και των τερματικών μονάδων που απελευθερώνονται, γίνεται με την HPLC βασιζόμενοι στο χρόνο συγκράτησης των κορυφών που ανιχνεύτηκαν σε σχέση με αυτές των αρχικών ενώσεων. Οι φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύονται είναι :

Τερματικές μονάδες: (+)-κατεχίνη (Ct), (-)-επικατεχίνη (ECt), (-)-επιγαλλοκατεχίνη (EGCt), γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης (ECGt)

Επεκτατικές μονάδες: (+)-κατεχίνη-φλωρογλουκινόλη (C-p), (-)-επικατεχίνη-φλωρογλουκινόλη (EC-p), (-)-επιγαλλοκατεχίνη-φλωρογλουκινόλη (EGC-p), γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης-φλωρογλουκινόλη (ECG-p)

Πίνακας 3: Πρότυπες καμπύλες αναφοράς των τερματικών και επεκτατικών νομάδων

Φαινολική Ουσία	Καμπύλη Αναφοράς
Ct	$y=0.0026x$
ECt	$y=0.0045x$
EGCt	$y=0.0235x$
ECGt	$y=0.0017x$

Επεκτατικές μονάδες	C-p	$\gamma=0.00273x$
	EC-p	$\gamma=0.0047x$
	EGC-p	$\gamma=0.0239x$
	ECG-p	$\gamma=0.00017x$

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μολι από την καμπύλη αναφοράς της κάθε ένωσης (Πίνακας 3), χρησιμοποιώντας τα μοριακά βάρη των τερματικών και επεκτατικών μονάδων. Στη συνέχεια υπολογίζονται:

- *Βαθμός Πολυμερισμού $mDP = \Sigma$ (επεκτατικές + τερματικές μονάδες) / Σ (τερματικές υπομονάδες) μολι*
- *Ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ $\%G = 100 \times (ECG-p + ECGt) / \Sigma$ (επεκτατικές + τερματικές μονάδες)*
- *Ποσοστό Προδελφινιδών $\%P = 100 \times (EGC-p + EGCt) / \Sigma$ (επεκτατικές + τερματικές μονάδες)*

2.4 Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής έγινε με ανάλυση διασποράς κατά δύο παράγοντες (Two-way Anova), του προγράμματος IBM SPSS Statistics 24. Σκοπό αποτελεί η διερεύνηση της ύπαρξης αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο συνθηκών, Ξεφύλλισμα και Ομάδα Ελέγχου (Ξ/Ο.Ε) και Προσανατολισμού (Π) στη χημική σύσταση του οίνου. Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίζεται το 5% ($p \text{ value} < 0,05$). Το Tukey's HSD (honest significant difference) χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των δειγμάτων όταν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, (επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας το 5%).

3. Αποτελέσματα

3.1 Κλασσικές Αναλύσεις

Στο Πίνακα 4 και 5 παρουσιάζονται τα περιγραφικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων όσο αφορά τις τιμές της ενεργού οξύτητας (pH), την ολική οξύτητα (Ο.Ο) εκφρασμένη σε g/L τρυγικού οξέος, την πτητική οξύτητα (Π.Ο) σε g/L οξικού οξέος, τον αλκοολικό τίτλο (Α.Τ) και τα g/L αναγόντων σακχάρων. Η ομάδα ελέγχου (Control) αποτελείται από τα δείγματα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε ξεφύλλισμα. Για τις ποσοτικές μεταβλητές ως περιγραφικά στατιστικά μέτρα, χρησιμοποιήθηκαν η μέση τιμή (Μ.Τ) και η τυπική απόκλιση (Τ.Α)

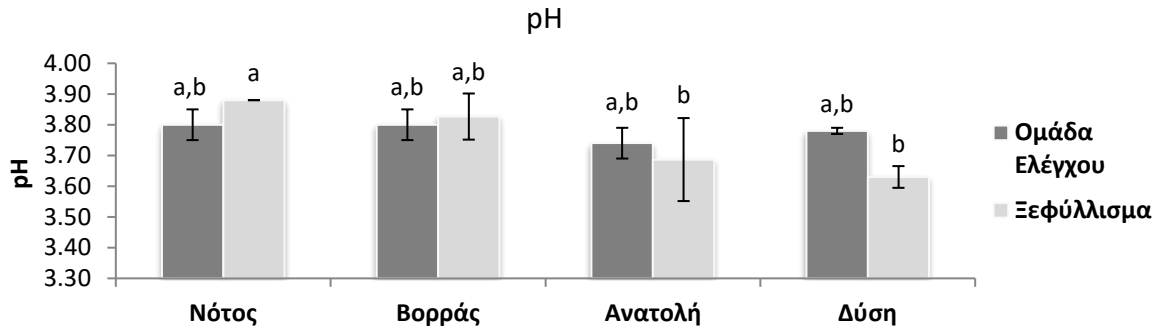
Πίνακας 4: Ενεργός οξύτητα (pH), ογκομετρούμενη οξύτητα (Ο.Ο), πτητική οξύτητα (Π.Ο). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α)

Συνθήκη		pH Μ.Τ±Τ.Α	Ο.Ο (g/L τρυγικού οξέος) Μ.Τ±Τ.Α	Π.Ο (g/L οξικού οξέος) Μ.Τ±Τ.Α
Ομάδα Ελέγχου (Control)	Νότος	3.80±0.05	6.30±0.30	0.50±0.00
	Βορράς	3.80±0.05	6.33±0.13	0.35±0.05
	Ανατολή	3.74±0.05	6.30±0.15	0.40±0.00
	Δύση	3.78±0.01	6.11±0.04	0.50±0.10
Ξεφύλλισμα (Defoliation)	Νότος	3.88±0.00	6.15±0.15	0.30±0.10
	Βορράς	3.83±0.08	6.56±0.12	0.40±0.00
	Ανατολή	3.69±0.14	6.19±0.41	0.40±0.00
	Δύση	3.63±0.04	6.30±0.21	0.36±0.06

Πίνακας 5: Αλκοολικός τίτλος (Α.Τ), Ανάγοντα Σάκχαρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α)

Συνθήκη		Α.Τ % Μ.Τ±Τ.Α	Ανάγοντα Σάκχαρα g/L Μ.Τ±Τ.Α
Ομάδα Ελέγχου (Control)	Νότος	13.04±1.56	2.98±0.60
	Βορράς	12.80±1.60	2.97±0.82
	Ανατολή	12.90±0.50	2.50±0.14
	Δύση	12.90±0.20	2.45±0.11
Ξεφύλλισμα (Defoliation)	Νότος	13.85±0.15	2.66±0.35
	Βορράς	13.85±0.55	2.68±0.22
	Ανατολή	12.75±0.45	1.66±1.60
	Δύση	12.35±0.49	2.06±0.09

3.1.1 Ενεργός Οξύτητα pH



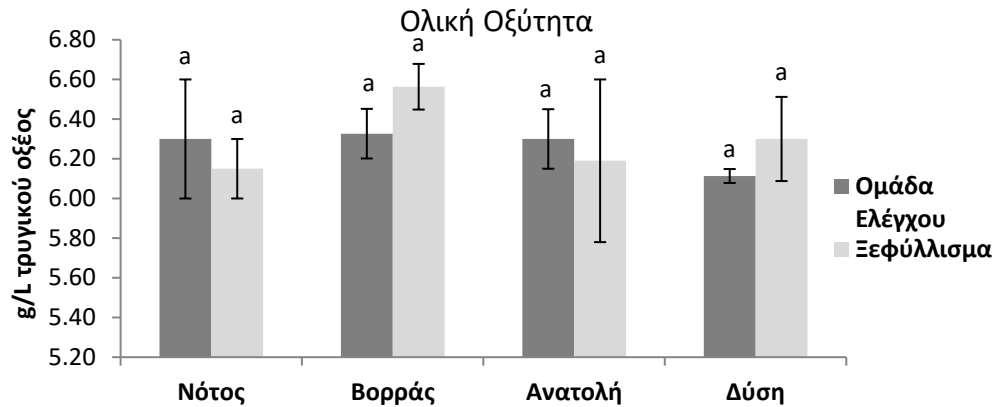
Γράφημα 1: Το pH των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value < 0,05)

Πίνακας 6: : Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς το pH των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	p value
Π	0,0072
Ξ/Ο.Ε	0,4743
Ξ/Ο.Ε*Π	0,0815

Οι τιμές του pH κυμαίνονται σε σχετικά μέτριες και αναμενόμενες τιμές για την ποικιλία και τον τρόπο οινοποίησης. Η υψηλότερη τιμή ($3,88 \pm 0,00$) σημειώνεται στη περίπτωση ξεφυλλίσματος με κατεύθυνση Νότου, η οποία παρουσιάζει και στατιστικά σημαντική διαφορά (a) μεταξύ Ανατολής και Δύσης (b) για την ίδια περίπτωση (Γράφημα 1). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης Two-Way Anova (Πίνακας 6) δείχνουν ότι στη συνθήκη Προσανατολισμός υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων (p value=0.072), ενώ όσον αφορά την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p value=0.0815).

3.1.2 Ογκομετρούμενη Οξύτητα



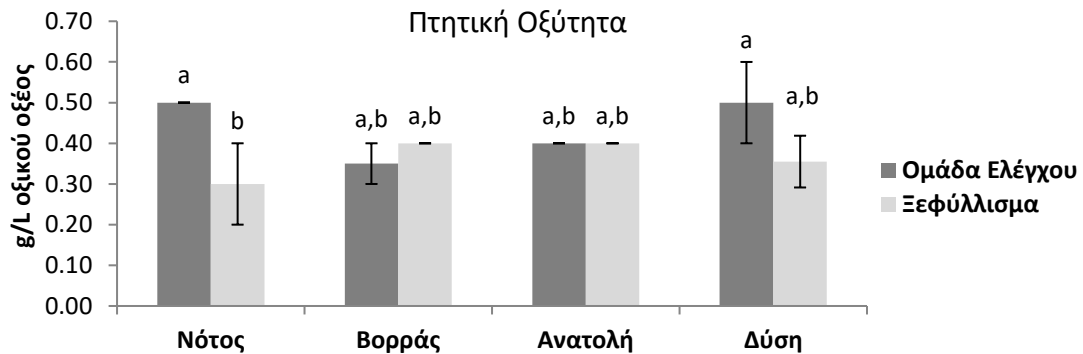
Γράφημα 2: Η Ολική Οξύτητα των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value < 0,05)

Πίνακας 7: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς την Ολική Οξύτητα των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	p value
Π	0,1350
Ξ/Ο.Ε	0,9724
Ξ/Ο.Ε*Π	0,4042

Η Ογκομετρούμενη Οξύτητα των δειγμάτων εμφανίζεται μέτρια με τιμές 6,11-6,56 g/L τρυγικού οξέος, χαρακτηριστικές για την ποικιλία. Η υψηλότερη σημειώνεται στη συνθήκη Ξεφύλλισμα για τον προσανατολισμό Βορρά (6,56 ± 0,12) χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, όπως φαίνεται και από το Γράφημα 2. Σχετικά με την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου και Προσανατολισμού δεν υπάρχει πουθενά στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 7).

3.1.3 Πτητική Οξύτητα



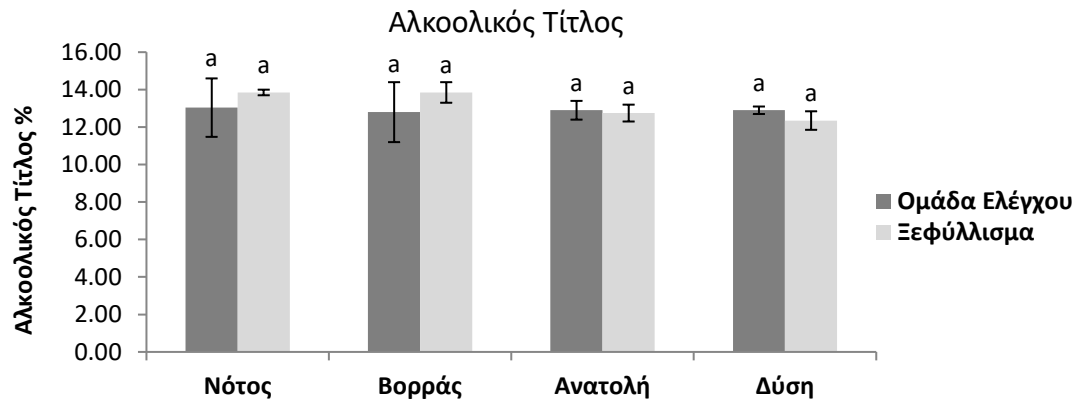
Γράφημα 3: Η Ολική Οξύτητα των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value < 0,05)

Πίνακας 8: : Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς την Πτητική Οξύτητα των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	p value
Π	0,2076
Ξ/Ο.Ε	0,0161
Ξ/Ο.Ε*Π	0,0064

Η Πτητική Οξύτητα λαμβάνει τιμές μεταξύ 0,3-0,5 g/L οξικού οξέος, με στατιστικά σημαντικές διαφορές στο Προσανατολισμό Νότο μεταξύ των δειγμάτων όπου πραγματοποιήθηκε ξεφύλλισμα και της Ομάδας Ελέγχου (Γράφημα 3). Από την ανάλυση Two-Way Anova (Πίνακας 8) υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για την συνθήκη Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου (p value=0.0161) αλλά και για την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών (p value=0.0064).

3.1.4 Αλκοολικό Τίτλος



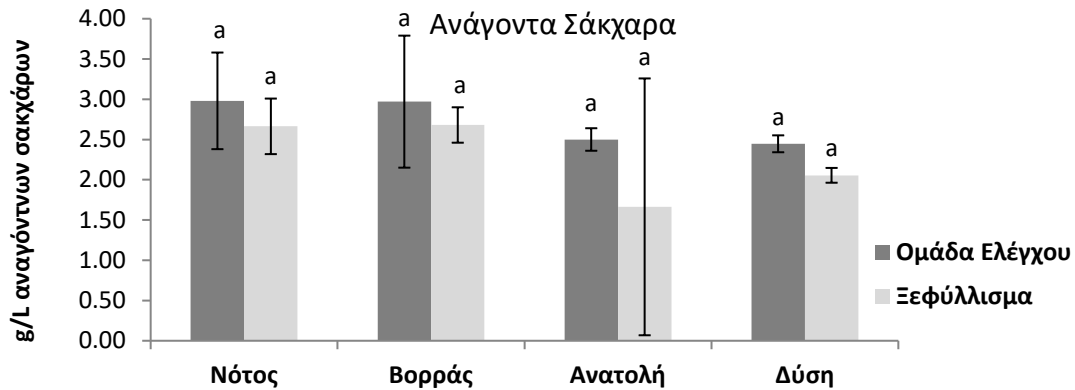
Γράφημα 4: Ο Αλκοολικός Τίτλος των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test $p < 0,05$)

Πίνακας 9: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τον Αλκοολικό Τίτλο των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	p value
Π	0,5044
Ξ/Ο.Ε	0,3243
Ξ/Ο.Ε*Π	0,5327

Ο Αλκοολικό τίτλος κυμαίνεται μεταξύ 12,35-13,85%, με τις υψηλότερες τιμές να σημειώνονται στα δείγματα Νότος και Βορράς στην περίπτωση της αφαίρεσης φύλλων (Γράφημα 4). Ωστόσο δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων όπως φαίνεται στο Γράφημα 4. Όσον αφορά την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου και Προσανατολισμού δεν υπάρχει πουθενά στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 9).

3.1.5 Ανάγοντα Σάκχαρα



Γράφημα 5: Τα ανάγοντα σάκχαρα των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test $p < 0,05$)

Πίνακας 10: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τα Ανάγοντα Σάκχαρα των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	p value
Π	0,2159
Ξ/Ο.Ε	0,1617
Ξ/Ο.Ε*Π	0,8912

Η χαμηλότερη τιμή σε g/L αναγόντων σακχάρων παρατηρείται στο δείγμα με προσανατολισμό Ανατολής και εφαρμογή ξεφυλλίσματος ($1,66 \pm 1,60$). Όλοι οι οίνοι χαρακτηρίζονται ξηροί ως προς την περιεκτικότητά τους σε ανάγοντα σάκχαρα χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των δειγμάτων (Γράφημα 5) όσο και μεταξύ της αλληλεπίδρασης των δύο συνθηκών (Πίνακας 10).

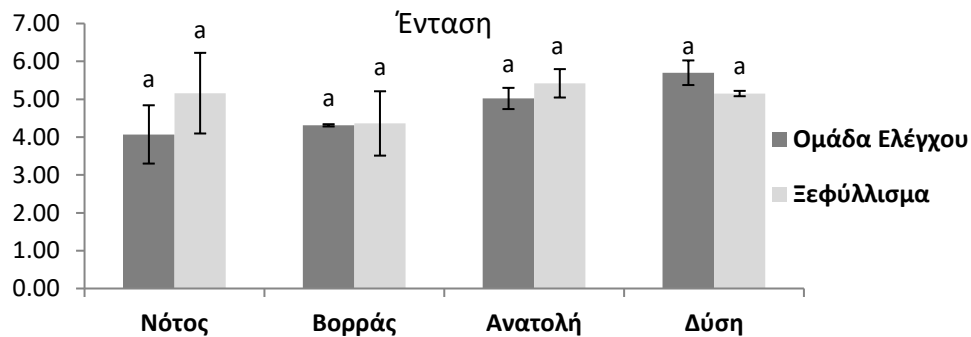
3.2 Χρωματικά Χαρακτηριστικά

Στο Πίνακα 11 παρουσιάζονται οι χρωματικοί παράμετροι των δειγμάτων όσον αφορά την Ένταση και Απόχρωση.

Πίνακας 11: Ένταση και Απόχρωση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α)

Συνθήκη		Ένταση Μ.Τ±Τ.Α	Απόχρωση Μ.Τ±Τ.Α
Ομάδα Ελέγχου (Control)	Νότος	4.07±0.77	0.77 ±0.06
	Βορράς	4.31±0.03	0.83±0.05
	Ανατολή	5.02±0.28	0.73±0.04
	Δύση	5.70±0.33	0.74±0.06
Ξεφύλλισμα (Defoliation)	Νότος	5.16±1.07	0.83±0.04
	Βορράς	4.36±0.85	0.81±0.07
	Ανατολή	5.42±0.38	0.74±0.11
	Δύση	5.15±0.07	0.66±0.02

3.2.1 Ένταση



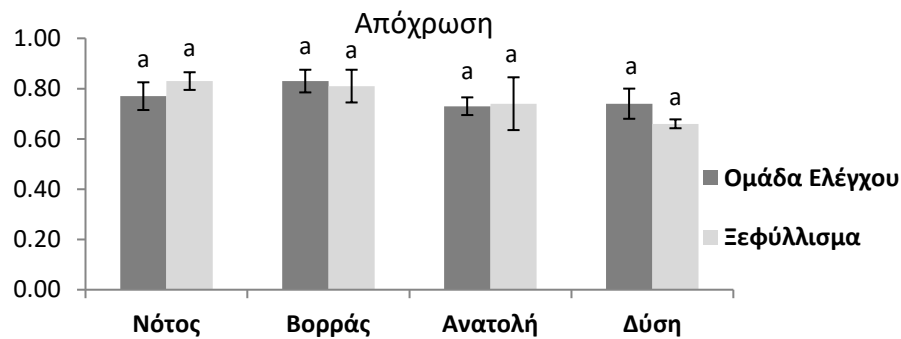
Γράφημα 6: Η χρωματική ένταση των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value<0,05)

Πίνακας 12: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς την χρωματική ένταση των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	p value
Π	0,0341
Ξ/Ο.Ε	0,3699
Ξ/Ο.Ε*Π	0,8912

Οι τιμές της χρωματικής έντασης των δειγμάτων κυμαίνονται από 4,07-5,70, με την μέγιστη και ελάχιστη τιμή να σημειώνονται στην Ομάδα Ελέγχου (Πίνακας 11) χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Γράφημα 6). Από τα παραπάνω αποτελέσματα όλα τα δείγματα μπορούν να χαρακτηριστούν ως μέτριοι ερυθροί οίνοι, με μικρή έως ελάχιστη δυνατότητα παλαίωσης, αφού η ένταση δεν ξεπερνάει το 10. Για την συνθήκη Προσανατολισμός υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων (p value=0.0341), ενώ όσον αφορά την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p value=0.1889), όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 12.

3.2.2 Απόχρωση



Γράφημα 7: Η χρωματική απόχρωση των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value<0,05)

Πίνακας 13: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς την χρωματική απόχρωση των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	p value
Π	0,0162
Ξ/Ο.Ε	0,8774
Ξ/Ο.Ε*Π	0,3044

Η απόχρωση λαμβάνει τιμές 0,66-0,83, σχετικά υψηλές για φρέσκους οίνους, πιθανώς λόγω των ελεύθερων μορφών ανθοκυανών που επικρατούν στα δείγματα ή οξειδώσεων (Πίνακας 11). Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν παρατηρούνται μεταξύ των τιμών (Γράφημα 7), ενώ στην συνθήκη Προσανατολισμός υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p value=0.0162) κατά την ανάλυση Two-Way Anova (Πίνακας 13).

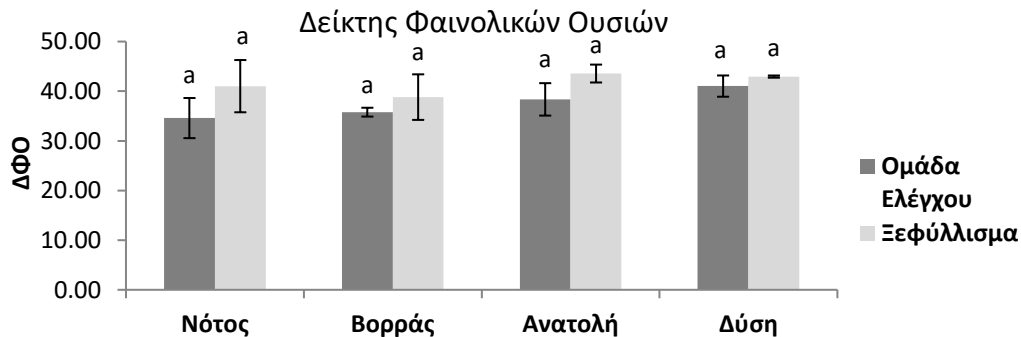
3.3 Ολικά Φαινολικά Χαρακτηριστικά

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται ο Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) και η συγκέντρωση των Ολικών Φαινολικών υπολογισμένη με την μέθοδο Folin-Ciocalteu, εκφρασμένη σε mg/L γαλλικού οξέος.

Πίνακας 14: Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) και συγκέντρωση Ολικών φαινολικών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α)

Συνθήκη		ΔΦΟ Μ.Τ±Τ.Α	Ολικά Φαινολικά mg/L γαλλικού οξέος Μ.Τ ±Τ.Α
Ομάδα Ελέγχου (Control)	Νότος	34.59±4.04	1325.75±264.5
	Βορράς	35.78±0.89	1405.38 ±43.13
	Ανατολή	38.36±3.27	1521.00±91.75
	Δύση	41.03±2.14	1744.88±35.38
Ξεφύλλισμα (Defoliation)	Νότος	41.02±5.26	1572.63±135.13
	Βορράς	38.81±4.59	1454.88±209.63
	Ανατολή	43.56±1.80	1571.38±112.38
	Δύση	42.95±0.22	1625.05±6.29

3.3.1 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)



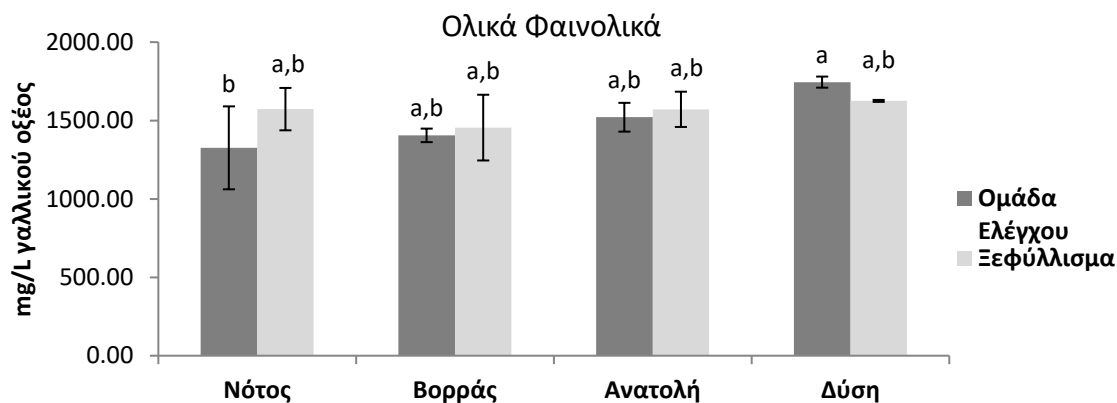
Γράφημα 8: Ο Δείκτης Φαινολικών Ουσιών των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value<0,05)

Πίνακας 15: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς το Δείκτη Φαινολικών Ουσιών των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	p value
Π	0,0932
Ξ/Ο.Ε	0,0108
Ξ/Ο.Ε*Π	0,6631

Ο Δείκτης Φαινολικών Ουσιών λαμβάνει τιμές από 34,59-43,56 με τις υψηλότερες να παρατηρούνται κυρίως στους οίνους που προέρχονται από πρέμνα τα οποία υπέστησαν ξεφύλλισμα (Πίνακας 14). Ωστόσο μεταξύ των τιμών δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές (Γράφημα 8). Κατά την ανάλυση Two-Way Anova εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στη συνθήκη Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου (p value=0.0108), ενώ όσον αφορά την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p value=0.6631) (Πίνακας 15)

3.3.2 Ολικά Φαινολικά (Μέθοδος Folin-Ciocalteu)



Γράφημα 9: Τα ολικά φαινολικά σε mg/L γαλλικού οξέος των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value<0,05)

Πίνακας 16: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τα ολικά φαινολικά των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	p value
:Π	0,0431
Ξ/Ο.Ε	0,3561
Ξ/Ο.Ε*Π	0,2737

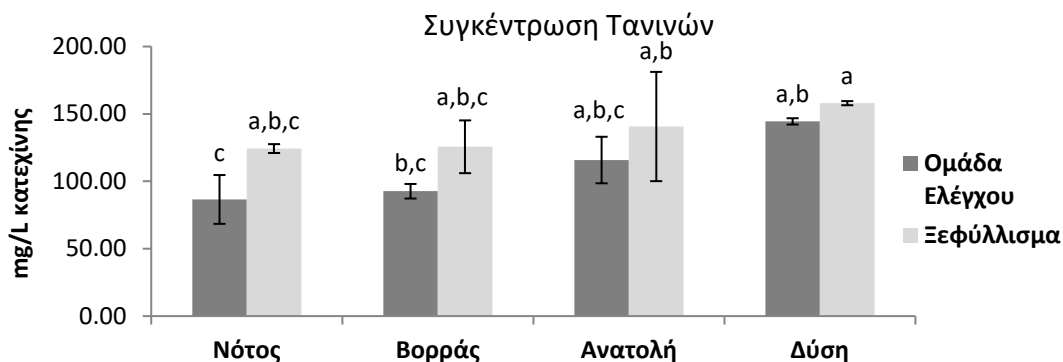
Η έκφραση των αποτελεσμάτων σε mg/L γαλλικού οξέος έγινε βάση πρότυπης ευθείας γαλλικού οξέος γνωστών συγκεντρώσεων της μορφής $y = 0.001x$ ($R^2 = 0.998$). Οι τιμές είναι σχετικά υψηλές, με τη μέγιστη να σημειώνεται στο προσανατολισμό Δύση της Ομάδας Ελέγχου (Πίνακας 14). Στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίζονται μεταξύ διαφορετικών προσανατολισμών (Νότος και Δύση) για την Ομάδα Ελέγχου, όπως απεικονίζεται στο Γράφημα 9. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από την ανάλυση Two-Way Anova (Πίνακας 16) όπου υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για την συνθήκη Προσανατολισμός (p value=0.0431). Για την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p value=0.2737).

3.4 Συγκέντρωση τανινών με τη μέθοδο Harbertson

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των δειγμάτων σε τανίνες, εκφρασμένη σε mg/L κατεχίνης σύμφωνα με την μέθοδο Harbertson (BSA).

Πίνακας 17: Συγκέντρωση τανινών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (M.T) ± τυπική απόκλιση (T.A)

Συνθήκη		Συγκέντρωση Τανινών mg/L κατεχίνης M.T±T.A
Ομάδα Ελέγχου (Control)	Νότος	86.54±18.12
	Βορράς	92.63±5.41
	Ανατολή	115.79±17.27
	Δύση	144.47±2.34
Ξεφύλλισμα (Defoliation)	Νότος	124.29±3.29
	Βορράς	125.61±19.58
	Ανατολή	140.65±40.53
	Δύση	157.98±1.52



Γράφημα 10: Η συγκέντρωση τανινών σε mg/L κατεχίνης των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value < 0,05)

Πίνακας 18: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τη συγκέντρωση τανινών των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	p value
Π	0,0046
Ξ/Ο.Ε	0,0036
Ξ/Ο.Ε*Π	0,7686

Η έκφραση των αποτελεσμάτων σε mg/L κατεχίνης έγινε βάση πρότυπης ευθείας γνωστών συγκεντρώσεων κατεχίνης της μορφής $y = 0.006x$ ($R^2 = 0.999$). Τα αποτελέσματα κυμαίνονται από 86,54-157,98 (Πίνακας 17). Παρατηρείται ότι για την ίδια συνθήκη Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου η συγκέντρωση των τανινών επηρεάζεται από την κατεύθυνση των γραμμών φύτευσης, εμφανίζοντας ελάχιστες τιμές στο νότιο προσανατολισμό και μέγιστες στον δυτικό. Αυτό απεικονίζεται και στο Γράφημα 10, με τα δείγματα Νότος να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με αυτά της Ανατολής και Δύσης. Κατά την ανάλυση Two-way Anova (Πίνακας 18) υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο για την συνθήκη Προσανατολισμός (p value=0.0046) όσο και για την συνθήκη Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου (p value=0.0046), ενώ για την αλληλεπίδραση τους όχι (p value=0.7686).

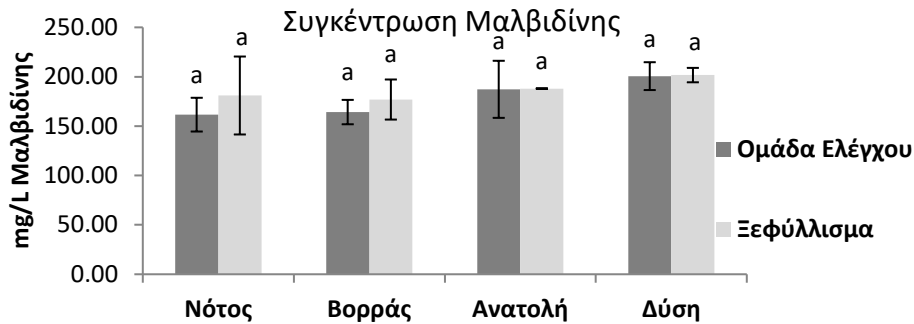
3.5 Συγκέντρωση Ανθοκυανών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Πίνακας 19; Mv: Μαλβιδίνη, Dp: Δελφινιδίνη, Pt: Πετουνιδίνη, Pn: Πεονιδίνη, Mv-Ac: Οξικός εστέρας της μαλβιδίνης, Mv-Coum: Κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (M.T) ± τυπική απόκλιση (T.A)

Συνθήκη		Συγκέντρωση Ανθοκυανών mg/L μαλβιδίνης					
		Mv M.T±T.A	Dp M.T±T.A	Pt M.T±T.A	Pn M.T±T.A	Mv-ac M.T±T.A	Mv-coum M.T±T.A
Ομάδα Ελέγχου (Control)	Νότος	161.60±17.08	3.07±0.83	6.20±1.55	4.36±1.05	13.74±1.03	27.32±2.95
	Βορράς	164.21±12.33	3.03±0.11	6.38±0.22	4.98±0.60	11.96±0.82	26.01±0.07
	Ανατολή	187.25±28.89	2.96±0.68	6.60±1.65	3.67±0.77	15.79±2.73	30.11±6.80
	Δύση	200.60±14.09	3.50±0.43	7.8±1.03	4.09±0.88	17.16±3.27	35.40±1.73
Ξεφύλλισμα (Defoliation)	Νότος	181.00±39.46	3.54±0.98	7.4±2.27	5.04±1.20	15.99±3.39	28.56±5.54
	Βορράς	176.92±20.29	3.60±0.71	7.4±1.53	6.92±0.67	11.81±0.09	23.58±4.33
	Ανατολή	188.02±0.06	3.90±0.81	8.00±1.16	7.23±0.64	16.64±1.31	31.39±0.58
	Δύση	201.68±7.29	4.33±0.30	9.22±0.66	5.93±1.23	21.21±1.26	35.89±0.01

Στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών στα δείγματα, εκφρασμένες σε ισοδύναμα μαλβιδίνης (mg/L). Ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης (Mv) εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλους τους οίνους, όπως ήταν αναμενόμενο από το φαινολικό προφίλ της ποικιλίας. Ακολουθούν ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (Mv-coum) και ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης (Mv-ac). Χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν οι υπόλοιπες ανθοκυάνες δελφινιδίνη (Dp), πετουνιδίνη (Pt) και πεονιδίνη (Pn), ενώ από όλα τα δείγματα απουσιάζει εντελώς ο μονογλυκοζίτης της κυανιδίνης, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενα ευρήματα για την ποικιλία Αγιωργίτικο (Petropoulos, Kallithraka, & Paraskevopoulos, 2011).

3.5.1 Συγκέντρωση Μαλβιδίνης



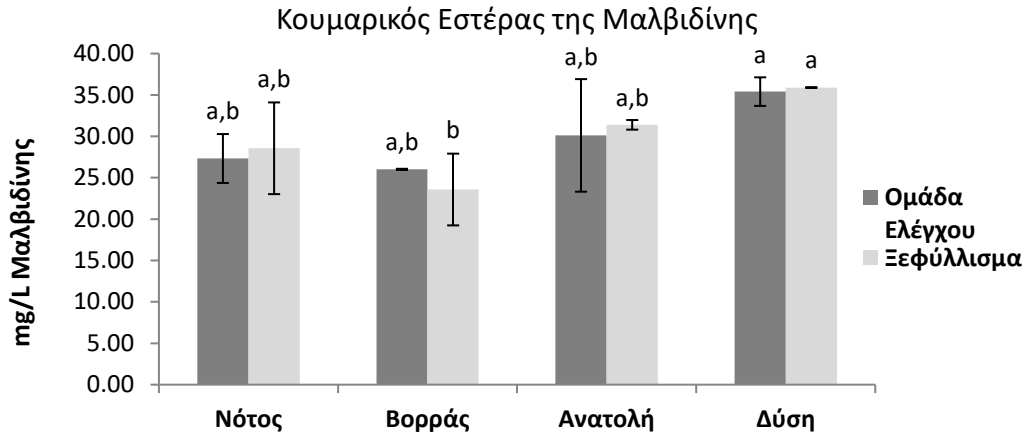
Γράφημα 11: Η συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης στα δείγματα ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value < 0,05)

Πίνακας 20: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τη συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης των δειγμάτων Π: Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε: Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

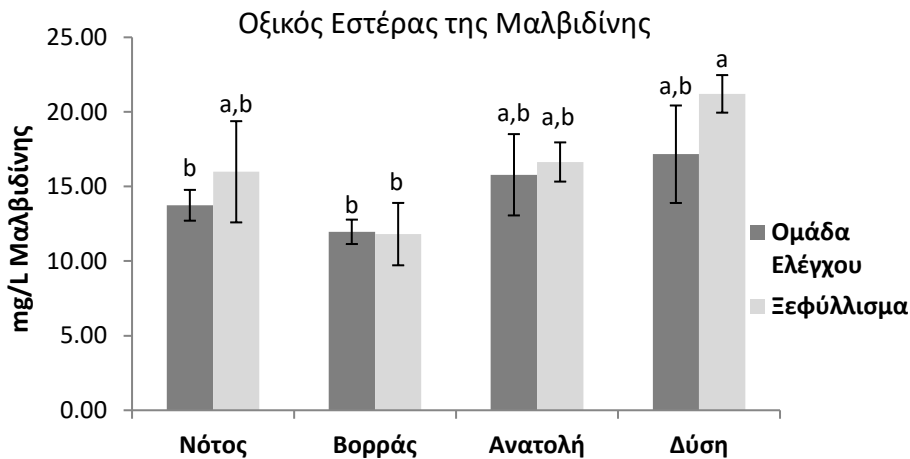
Συνθήκη	p value
Π	0,1028
Ξ/Ο.Ε	0,3635
Ξ/Ο.Ε*Π	0,8537

Η έκφραση των αποτελεσμάτων σε ισοδύναμα μαλβιδίνης (mg/L) έγινε βάση πρότυπης ευθείας γνωστών συγκεντρώσεων μαλβιδίνης της μορφής $y = 2.554x - 0.020$ ($R^2 = 1$) για όλες τις ανθοκυάνες. Οι τιμές μεταξύ των δειγμάτων δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Γράφημα 11) κάτι που παρατηρείται και για την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών (Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου και Προσανατολισμός) κατά την ανάλυση Two-Way Anova (p value=0.8537) (Πίνακας 20). Ωστόσο η υψηλότερη τιμή σημειώνεται στο δυτικό προσανατολισμό ανεξάρτητα από την εφαρμογή ξεφυλλίσματος ή όχι.

3.5.2 Συγκέντρωση Κουμαρικού και Οξικού Εστέρα της Μαλβιδίνης



Γράφημα 12: Η συγκέντρωση του κουμαρικού εστέρα της μαλβιδίνης στα δείγματα ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value < 0,05)



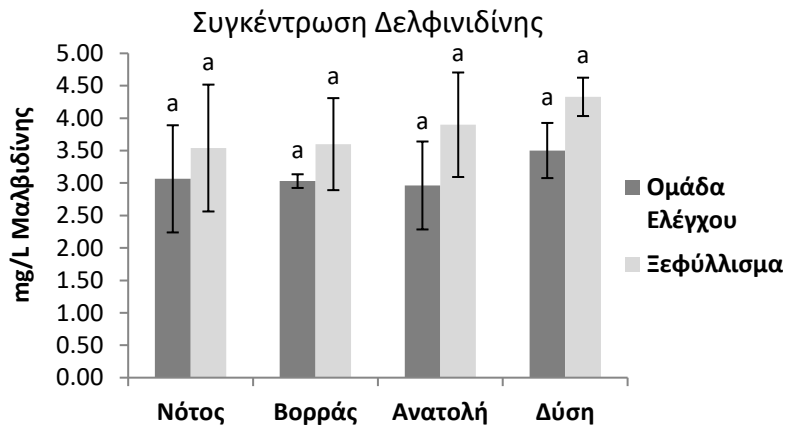
Γράφημα 13: Η συγκέντρωση του οξικού εστέρα της μαλβιδίνης στα δείγματα ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value < 0,05)

Πίνακας 21; Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τη συγκέντρωση του κουμαρικού (Mv-coum) και οξικού εστέρα της μαλβιδίνης (Mv-ac) των δειγμάτων Π:Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε:Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

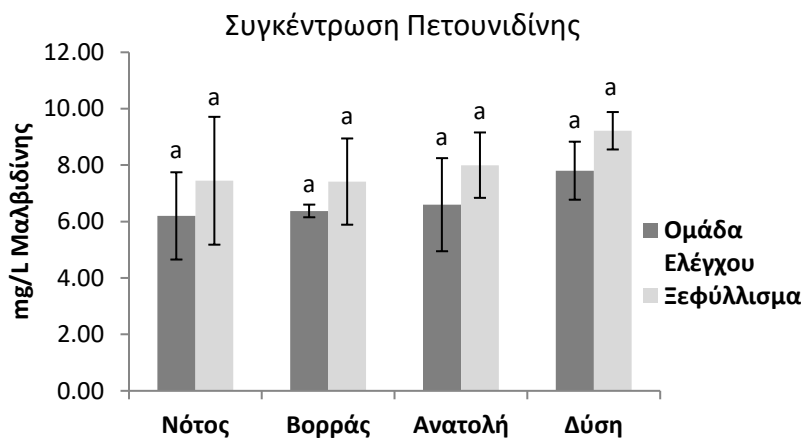
Συνθήκη	Mv-coum	Mv-ac
	p value	
Π	0.0022	0.0008
Ξ/Ο.Ε	0.9292	0.0855
Ξ/Ο.Ε*Π	0,8105	0.4801

Οι συγκεντρώσεις του κουμαρικού και οξικού εστέρα της μαλβιδίνης παρουσιάζουν παρόμοιο μοτίβο (Πίνακας 19) και στις δύο περιπτώσεις, Ξεφύλλισμα και Ομάδα Ελέγχου. Η υψηλότερη τιμή παρουσιάζεται στο δυτικό προσανατολισμό και η χαμηλότερη στο βόρειο (Γράφημα 12,13) με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών. Από την ανάλυση Two-Way Ανονα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο για την συνθήκη Προσανατολισμός και για τους δύο εστέρες, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 21 (p value= 0.0022, p value=0.0008 αντίστοιχα).

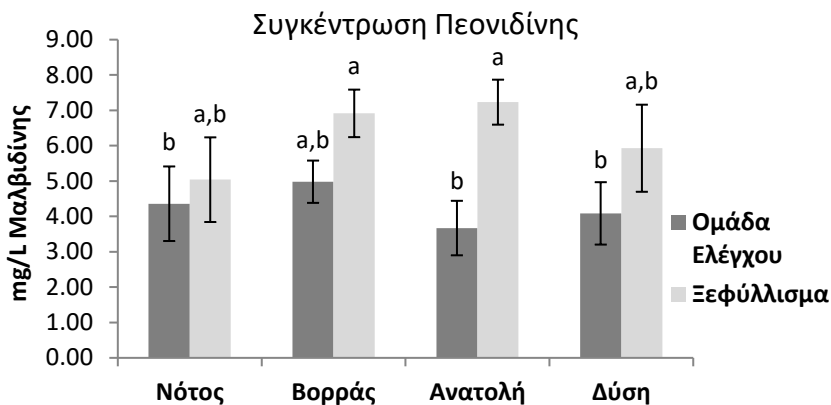
3.5.3 Συγκέντρωση Δελφινιδίνης, Πετουινιδίνης και Πεονιδίνης



Γράφημα 14: Η συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της δελφινιδίνης στα δείγματα ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value<0,05)



Γράφημα 15: Η συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της πετουινιδίνης στα δείγματα ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value<0,05)



Γράφημα 16: Η συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της πεονιδίνης στα δείγματα ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value < 0,05)

Πίνακας 22: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς τη συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της δελφινιδίνης (Dp), της πετουινιδίνης (Pt) και της πεονιδίνης (Pn) των δειγμάτων Π:Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε:Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

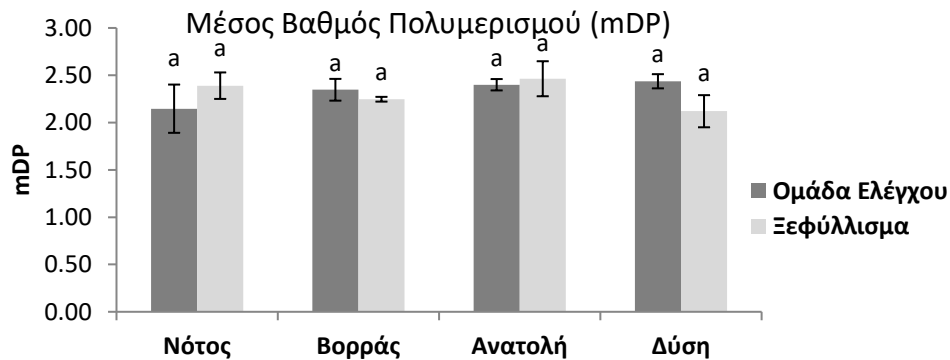
Συνθήκη	Dp	Pt p value	Pn
Π	0.4576	0.2477	0.1284
Ξ/Ο.Ε	0.0274	0.0504	<.0001
Ξ/Ο.Ε*Π	0.9304	0.9956	0.0845

Η συγκέντρωση της δελφινιδίνης (Dp) παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή στο δυτικό προσανατολισμό και την ελάχιστη στο νότιο, τόσο για την περίπτωση των φυτών που υπέστησαν ξεφύλλισμα όσο και για την Ομάδα Ελέγχου (Πίνακας 19). Μέγιστες τιμές στην κατεύθυνση Δύση εμφανίζει και η συγκέντρωση της πετουινιδίνης (Pt), χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών και για τις δύο ανθοκυάνες (Γράφημα 14 και 15). Στην περίπτωση της συγκέντρωσης της πεονιδίνης (Pn) οι τιμές εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 16. Από την ανάλυση Two-Way Anova υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τη συνθήκη Ξεφύλλισμα/Ομάδα Έλεγχου για τις ανθοκυάνες δελφινιδίνη (Dp) και πεονιδίνη (Pn) (p value=0.0274, p value=<0.001 αντίστοιχα), ενώ δεν σημειώνεται καμία διαφορά για την πετουινιδίνη (Pt) (Πίνακας 22).

3.6 Μέσος Βαθμός Πολυμερισμού (mDP) με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Πίνακας 23: Μέσος βαθμός Πολυμερισμού (mDP), ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ %G, ποσοστό προδελφινιδίων %P. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή (Μ.Τ) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α)

Συνθήκη		mDP	%G	%P
Ομάδα Ελέγχου (Control)	Νότος	2.15±0.26	2.14±0.11	21.60±0.38
	Βορράς	2.35±0.12	1.80±0.26	21.39±1.24
	Ανατολή	2.40±0.06	1.82±0.17	23.75±0.29
	Δύση	2.44±0.08	1.73±0.07	23.65±0.01
Ξεφύλλισμα (Defoliation)	Νότος	2.39±0.14	1.80±0.28	23.74±0.64
	Βορράς	2.25±0.03	2.02±0.22	21.18±1.23
	Ανατολή	2.46±0.19	1.96±0.32	22.32±0.69
	Δύση	2.12±0.17	2.02±0.03	18.96±0.06

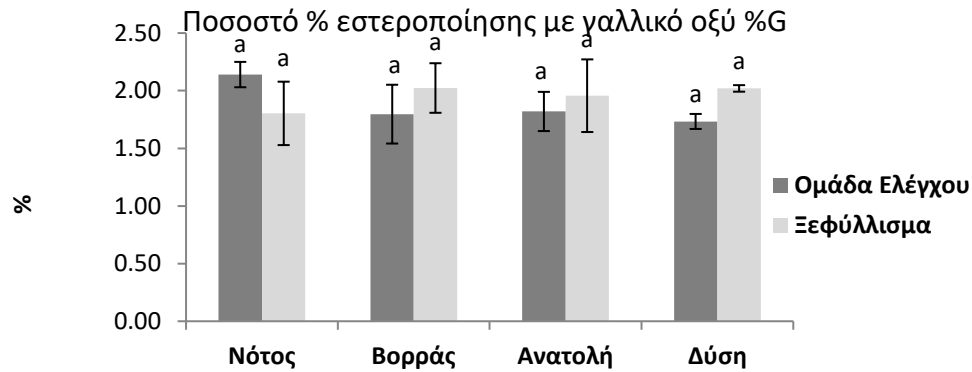


Γράφημα 17: Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value<0,05)

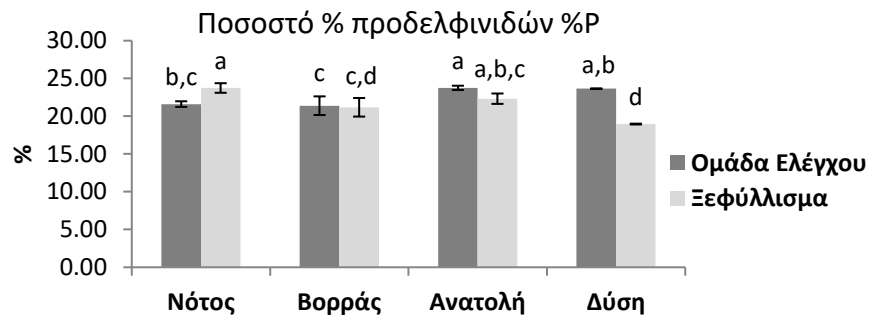
Πίνακας 24: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς το μέσο βαθμό πολυμερισμού (mDP) των δειγμάτων Π:Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε:Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	p value
Π	0,223
Ξ/Ο.Ε	0,657
Ξ/Ο.Ε*Π	0,037

Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού των οίνων κυμαίνεται από 2,12-2,46 (Πίνακας 23) χωρίς όμως να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών όπως φαίνεται και από το Γράφημα 17. Ωστόσο κατά την ανάλυση Two-Way ANOVA σημειώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά για την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου και Προσανατολισμός (p value=0,037) (Πίνακας 24).



Γράφημα 18: Το ποσοστό εστεροποίησης των δειγμάτων με γαλλικό οξύ ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value<0,05)



Γράφημα 19: Το ποσοστό προδελφινιδίων των δειγμάτων ανά συνθήκη. Διαφορετικά γράμματα (a,b) υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's test p value<0,05)

Πίνακας 25: Αποτελέσματα Ανάλυσης διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way ANOVA) ως προς το το ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G) και το ποσοστό των προδελφινιδίων (%P) των δειγμάτων Π:Προσανατολισμός, Ξ/Ο.Ε:Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου

Συνθήκη	%G	%P
	p value	
Π	0,873	0,001
Ξ/Ο.Ε	0,390	0,004
Ξ/Ο.Ε*Π	0,089	<0,000

Το ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G) λαμβάνει τιμές από 1,73-2,14% (Πίνακας 23) χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών (Γράφημα 18) και κατά την ανάλυση Two-Way Anova (Πίνακας 25). Στην περίπτωση του ποσοστού συμμετοχής των προδελφινιδών εμφανίζεται μεγάλη ετερογένεια με στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές (Γράφημα 19). Αυτό παρατηρείται και στην ανάλυση Two-Way Anova όπου στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίζονται και για την κάθε συνθήκη ξεχωριστά (Προσανατολισμος p value=0,001, Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου p value= 0,004) αλλά και για την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών (p value<0,000) (Πίνακας 25).

4.Συζήτηση

Οι τιμές της ενεργούς οξύτητας (pH) εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά το προσανατολισμό των γραμμών φύτευσης (Πίνακας 6). Στη περίπτωση των φυτών που πραγματοποιήθηκε αφαίρεση φύλλων, εντοπίζονται διαφορές μεταξύ του νότιου προσανατολισμού ($3,88 \pm 0,00$) σε σύγκριση με τον ανατολικό ($3,69 \pm 0,14$) και δυτικό ($3,63 \pm 0,04$) (Γράφημα 1). Γενικότερα η κατεύθυνση Νότος και Βορράς και στις δύο περιπτώσεις (Ξεφύλλισμα και Ομάδα Ελέγχου) παρουσιάζει υψηλότερες τιμές pH σε σχέση με τα φυτά Ανατολής-Δύσης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο προσανατολισμός των γραμμών έχει άμεση επίδραση τόσο στη θερμοκρασία της ράγας όσο και στην ποσότητα ηλιακής ακτινοβολίας που δέχεται, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η συγκέντρωση των οξέων και κατ' επέκταση και η τιμή του pH (Douglas, et al., 2017). Ωστόσο οι τιμές της Ογκομετρούμενης Οξύτητας, εκφρασμένη σε g/L τρυγικού οξέος δεν φαίνεται να επηρεάζονται από τις καλλιεργητικές επεμβάσεις που εφαρμόστηκαν στον αμπελώνα, καθώς δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Πίνακας 7). Σύμφωνα και με άλλες έρευνες, τα οργανικά οξέα δεν επηρεάζονται από την αφαίρεση φύλλων αφού η τελική τους συγκέντρωση στον οίνο εξαρτάται από τη σύσταση του γλεύκους και την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης (Sukje, et al., 2014). Αξίζει να σημειωθεί όμως, ότι σε αντίστοιχα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Νότιο Ημισφαίριο (Ν.Αφρική) σε σταφύλια της ποικιλίας Shiraz, έδειξαν ότι η Ογκομετρούμενη Οξύτητα αυξάνεται στον Ανατολικό-Δυτικό προσανατολισμό σε σύγκριση με τον Νότιο-Βόρειο, για το νότιο ημισφαίριο (Giacosa, Marengo, Guidoni, Rolee, & Hunter, 2014)

Η Πτητική Οξύτητα των δειγμάτων βρίσκεται σε ένα αποδεκτό εύρος, για οίνους που έχουν προέλθει από ερυθρή οινοποίηση ($0,3-0,5$ g/L οξικού οξέος) (Πίνακας 4). Τόσο το ξεφύλλισμα όσο και η αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών (Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου και Προσανατολισμός) εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 8). Η συγκέντρωση του οξικού οξέος στους οίνους που προέρχονται από πρέμνα στα οποία αφαιρέθηκαν φύλλα είναι αισθητά μειωμένα, κάτι που συνάδει και με προηγούμενα ευρήματα στην ποικιλία Cabernet Sauvignon (Drenjančević, et al., 2018). Συγκεκριμένα στην περίπτωση του νότιου προσανατολισμού η επίδραση του ξεφυλλίσματος είναι ιδιαίτερα αισθητή μεταξύ της Ομάδας Ελέγχου ($0,50 \pm 0,00$) και της αφαίρεσης φύλλων ($0,30 \pm 0,10$).

Ο αλκοολικός τίτλος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων (Πίνακας 9), ωστόσο οι μέγιστες τιμές σημειώνονται στα φυτά που υπέστησαν ξεφύλλισμα στο νότιο και βόρειο προσανατολισμό ($13,85\% \pm 0,15$). Η αύξηση αυτή πιθανώς να οφείλεται στην απότομη έκθεση των ραγών στο φως καθώς

και στην άνοδο της μέσης θερμοκρασίας τους όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (Vilanova, Diago, Genisheva, Oliveira, & Tardaguila, 2011). Η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων (Πίνακας 5) δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 10), με όλα τα δείγματα να κατατάσσονται στην κατηγορία των ξηρών οίνων. Ανεπαίσθητα αυξημένες τιμές παρατηρούνται στους οίνους της Ομάδας Ελέγχου (2,98-2,45 g/L), πιθανότατα γιατί η αφαίρεση φύλλων μειώνει την παραγωγή φωτοσυνθετικών προϊόντων και τη συγκέντρωση των υδατανθράκων (Iacono, Bertamini, Scienza, & Coombe, 1995).

Η ένταση και η απόχρωση των οίνων παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές για τη συνθήκη του προσανατολισμού (Πίνακας 12 και 13) και καθόλου για την αφαίρεση φύλλων, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενα ευρήματα σε ερυθρές ποικιλίες (Harris & Goolsby, 2017) (Vilanova, Diago, Genisheva, Oliveira, & Tardaguila, 2011). Οι διαφορές αυτές πιθανότατα να οφείλονται στις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στην κάθε περιοχή, σε γενετικούς παράγοντες της καλλιεργούμενης ποικιλία αλλά και στη μέθοδο προσδιορισμού. Βάση της έντασης (4,07-5,70) όλα τα δείγματα μπορούν να χαρακτηριστούν ως μέτριοι ερυθροί οίνοι, χωρίς την ικανότητα παλαίωσης, αφού δεν ξεπερνάνε την τιμή 10 (Πίνακας 11). Το υψηλό ποσοστό των ελεύθερων ανθοκυανών που επικρατούν στους φρέσκους οίνους δικαιολογεί και τις τιμές της απόχρωσης που κυμαίνονται από 0,66-0,83 (Πίνακας 11). Ιδιαίτερα αυξημένες παρουσιάζονται στο βόρειο και νότιο προσανατολισμό, ανεξαρτήτως της εφαρμογής ξεφυλλίσματος (Γράφημα 7).

Όσον αφορά τα φαινολικά συστατικά των οίνων, ο Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές για τη συνθήκη ξεφύλλισμα (Πίνακας 15). Τα δείγματα που προέρχονται από φυτά που υπέστησαν αφαίρεση φύλλων παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με την Ομάδα Ελέγχου (Πίνακας 14). Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία και με παρόμοιες μελέτες στην ποικιλία Tempranillo (Vilanova, Diago, Genisheva, Oliveira, & Tardaguila, 2011). Για τα Ολικά Φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, εκφρασμένα σε mg/L γαλλικού οξέος, στατιστικά σημαντική διαφορά εντοπίζεται στη συνθήκη Προσανατολισμός (Πίνακας 16) με πολύ έντονες διαφορές μεταξύ Νότου ($1325,75 \pm 264,5$) και Δύσης ($1744,88 \pm 35,38$) για την Ομάδα Ελέγχου (Γράφημα 9).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης τανινών σε mg/L κατεχίνης έγινε βάση της μεθόδου Harbertson (BSA). Στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά την ανάλυση Two-Way Anova εμφανίζονται για την συνθήκη Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου και για τον Προσανατολισμό, αλλά όχι για την αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών (Πίνακας 18). Όλα τα δείγματα που προέρχονται από φυτά όπου αφαιρέθηκαν φύλλα παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με την Ομάδα Ελέγχου (Πίνακας 17), επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι η αφαίρεση φύλλων αυξάνει την ηλιακή ακτινοβολία της σταφυλής,

βελτιώνοντας την εκχυλισιμότητα των τανινών στο κρασί (Risco, Perez, Yeves, Castel, & Intrigliolo, 2013). Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί και η επίδραση του προσανατολισμού, καθώς μεταξύ της Ομάδας Ελέγχου και του Ξεφύλλισματος, οι μικρότερες τιμές καταγράφονται στη νότια κατεύθυνση ($86,54 \pm 18,12$ και $124,29 \pm 3,29$ αντίστοιχα) και οι υψηλότερες στη δυτική ($144,47 \pm 2,34$ και $157,98 \pm 1,52$ αντίστοιχα), με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Γράφημα 10).

Από τις ανθοκυάνες, την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα λαμβάνει ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης (Πίνακας 19). Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν παρατηρούνται μεταξύ των συνθηκών (Πίνακας 20), ωστόσο στον δυτικό προσανατολισμό σημειώνονται οι υψηλότερες τιμές (Γράφημα 11). Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται και στις συγκεντρώσεις του κουμαρικού και οξικού εστέρα της μαλβιδίνης (mg/L μαλβιδίνης) (Γράφημα 12,13), με στατιστικά σημαντικές διαφορές για τη συνθήκη του Προσανατολισμού (Πίνακας 21). Η συγκέντρωση της δελφινιδίνης και της πεονιδίνης (mg/L μαλβιδίνης) παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συνθήκη Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου (Πίνακας 22), ενώ οι τιμές της πετουνιδίνης (mg/L μαλβιδίνης) δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Γράφημα 16). Και στην περίπτωση των λοιπών ανθοκυανών, η κατεύθυνση Δύση λαμβάνει τις μεγαλύτερες τιμές πιθανότατα γιατί η άμεση έκθεση των ραγών στην ηλιακή ακτινοβολία επιδρά στο μικρόκλιμα των πρέμνων, τροποποιώντας τις φυσιολογικές λειτουργίες τους και ενισχύοντας την βιοσύνθεση των ανθοκυανών (Silviotti, et al., 2016).

Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) των δειγμάτων και το ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G) παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με αντίστοιχα ευρήματα για την ποικιλία Αγιωργίτικο, ενώ το ποσοστό συμμετοχής των προδελφινιδίων λαμβάνει χαμηλότερες τιμές (Petropoulos, Kanellorouliou, Paraskevorouliou, Kotseridis, & Kallithraka, 2017). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι διαφορές αυτές πιθανότατα να οφείλονται στην επίδραση χρονιάς, καθώς τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικά έτη. Η αλληλεπίδραση των δύο συνθηκών Ξεφύλλισμα/Ομάδα Ελέγχου και Προσανατολισμός φαίνεται να επηρεάζει το μέσο βαθμό πολυμερισμού (Πίνακας 24) και το ποσοστό συμμετοχής των προδελφινιδίων (Πίνακας 25) ενώ δεν επιδρά καθόλου στο ποσοστό εστεροποίησης με το γαλλικό οξύ (Πίνακας 25).

5.Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η επιλογή κατάλληλου προσανατολισμού κατά την εγκατάσταση ενός παραγωγικού αμπελώνα αλλά και η εφαρμογή καλλιεργητικών τεχνικών, όπως η αφαίρεση φύλλων (ξεφύλλισμα), επιδρούν στην φυσιολογία του φυτού με άμεσο αντίκτυπο στην ποιότητα των αμπελουργικών προϊόντων.

Για την περιοχή της Νεμέας και την ποικιλία Αγιωργίτικο, ο Νότιος και Βόρειος προσανατολισμός δίνει οίνους με υψηλότερες τιμές pH σε σύγκριση με την κατεύθυνση Ανατολή/Δύση, πιθανότατα λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης των οξέων στη ράγα. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται και για τα χρωματικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων (Ένταση και Απόχρωση), με τον Νότιο/Βόρειο προσανατολισμό να υπερτερεί. Ωστόσο η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών παρουσιάζει τις μέγιστες τιμές στην δυτική κατεύθυνση και τις ελάχιστες στη νότια. Ο δυτικός προσανατολισμός φαίνεται να δρα θετικά και στην συγκέντρωση των ανθοκυανών, ειδικότερα της μαλβιδίνης και των εστέρων της μαλβιδίνης (κουμαρικός και οξικός).

Η αφαίρεση φύλλων στο στάδιο μετά την καρπόδεση, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή οίνων με χαμηλότερη Πτητική Οξύτητα, αλλά με υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών (Δείκτης Φαινολικών Ουσιών) και τανινών (mg/L κατεχίνης). Η αλληλεπίδραση και των δύο συνθηκών εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περίπτωση της Πτητικής Οξύτητας, του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) και του ποσοστού συμμετοχής των προδελφινιδών (%P).

6.Βιβλιογραφία

Adams, D. O. (2006, September). Phenolics and Ripening in Grape Berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 57 , pp. 249-256.

Arozarena, I., Casp, A., Marin, R., & Navarro, M. (2000, June 1). Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 , pp. 1909-1917.

Benmeziame, F., Cadot, Y., Djamai, R., & Djermoun, L. (2016, September 6). Determination of major anthocyanin pigments and flavonols in red grape skin of some table grape varieties (*Vitis vinifera* sp.) by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection (HPLC-DAD). *Oeno One Vol 50 No3* .

Boss, P., & Davies, C. (2001). *Molecular Biology and Technology of the Grapevine*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J., & Galán-Vidal, C. A. (2008, September 2). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113 (2009) , pp. 859-871.

Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Manchad, P., et al. (2006). Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. *American Journal of Enology and Viticulture* 57 , pp. 298-305.

Chorti, E., Kyraleou, M., Kallithraka, S., Pavlidis, M., Koundouras, S., Kanakis, I., et al. (2016, June 14). Irrigation and Leaf Removal Effects on Polyphenolic Content of Grapes. *Not Bot Horti Agrobo*, 2016, 44 , pp. 133-139.

Coombe, B., & Dry, P. (1992). *Viticulture Vol 2: Practices*. Halifax Street, Australia: Wine Publishers Pty Ltd trading as Winetitles.

Cortell, J., Halbleib, M., Gallagher, A., Righetti, T., & Kennedy, J. (2005). Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) and wine proanthocyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53 , pp. 5798-5808.

Delgado, R., Del Alamo, M., & Gonzalez, M.-R. (2004, May). Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture Vol 84 (7)* , pp. 623-630.

Douglas, A. W., Pereira de Bem, B., Allebrandt, R., Filho, J. L., Brighenti, A. F., Outemane, M., et al. (2017). Timing of leaf removal modifies chemical and phenolic composition of Sauvignon Blanc. *BIO Web Conferences* 9, 02027.

- Drenjančević, M., Rastija, V., Jukić, K., Zmaić, K., Kujundžić, T., Rebekić, A., et al. (2018, May). Effects of early leaf removal on volatile compounds concentration in Cabernet Sauvignon wines from Ilok Vineyards. *POLJOPRIVREDA 24:2018 (1)* , pp. 10-17.
- Giacosa, S., Marengo, F., Guidoni, S., Rolee, L., & Hunter, J. J. (2014, November). Anthocyanin yield and skin softening during maceration, as affected by vineyard row orientation and grape ripeness of *Vitis vinifera* L.cv. Shiraz. *Food Chemistry 147 (2015)* , pp. 8-15.
- Glories, Y., Ribereau, P., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- Guidoni, S., Cavalletto, S., Bartolomei, S., Mania, E., & Gangemi, L. (2013). *Microclimatic Aspects in Vineyards with Different Vigour and Exposure*. Torino.
- Harris, J., & Goolsby, K. (2017). The effect of leaf removal at bloom vs leaf removal at veraison on ripeness. *WRE Australia* .
- Hunter, J., & Visser, J. (1988, August). The Effect of Partial Defoliation, Leaf Position and Developmental Stage of the Vine on the Photosynthetic Activity of *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon. *S.Africa Journal of Enology and Viticulture Vol 9 (2)* , pp. 9-15.
- Hunter, J., Volschenk, C., & Zorer, R. (2016, June 20). Vineyard row orientation of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz/101-12 Mgt: Climatic profiles and vine physiological status. *Agricultural and Forest Meteorology 228* , pp. 104-119.
- Iacono, F., Bertamini, M., Scienza, A., & Coombe, B. (1995). Differential effects of canopy manipulation and shading of *Vitis vinifera* L.cv Cabernet Sauvignon. Leaf gas exchange, photosynthetic electron transport rate and sugar accumulation in berries. *Vitis 34 (4)* , pp. 201-206.
- Jackson, R. S. (2000). *Wine Science*. Ontario: Academic Press.
- Jeong, S., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S., & Esaka, M. (2004, March 27). Effects of plant hormones and shading on the accumulation of. *Plant Science 167 (2004)* , pp. 247-252.
- Kekelidze, I., Ebelashvili, N., Japaridze, M., Chankvetadze, B., & Chankvetadze, L. (2017, December 19). Phenolic antioxidants in red dessert wine produced with innovative. *Annals of Agrarian Science* , pp. 1-5.
- Koundouras, S., Kanakis, I., Drossou, E., Kallithraka, S., & Kotseridis, Y. (2012, September 26). Effects of Postveraison Water Regime on the Phenolic Composition of Grapes and Wines of cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin 2013, 47, n°1* , pp. 115-128.

Marais, J., Hunter, J., Haasbroek, P., & Augustyn, O. (1996). Effects of canopy microclimate on the composition of Sauvignon Blanc grapes. *Proceedings 9th Australian Wine Industry, Technical Conference* (pp. 72-77). Adelaide, Australia: Australian Wine Research Institute.

Mateus, N., Marques, S., Goncalves, A., Machado, J., & De Freitas, V. (2001, January). Proanthocyanidin Composition of Red *Vitis vinifera* Varieties from the Douro Valley during Ripening: Influence of Cultivation Altitude. *American Journal of Enology and Viticulture* 52 , pp. 115-121.

Mullins, M., Bouquet, A., & Williams, L. (1992). *Biology of Horticultural crops: Biology of the grapevine*. Cambridge University Press.

Naylon, A. P., Creasy, G. L., Trought, M. C., & Van Hanen, L. (2000, January). The effects of row orientation and fruit exposure on the juice composition of Sauvignon blanc (*Vitis vinifera* L.). *Conference paper* .

Palliotti, A., Gatti, M., & Poni, S. (2011, January). Early Leaf Removal to Improve Vineyard Efficiency: Gas Exchange, Source-to-Sink Balance, and Reserve Storage Responses. *American Journal of Enology and Viticulture* 62(2) , pp. 219-228.

Pereira, G., Gaudillere, J.-P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., et al. (2006, June 20). Microclimate Influence on Mineral and Metabolic Profiles of. *Journal Of Agricultural and Chemistry* 54 , pp. 6765-6775.

Petrie, P., Trought, M., Howell, S., & Buchan, G. (2003, January). The effect of leaf removal and canopy height on whole-vine gas exchange and fruit development of *Vitis vinifera* L. Sauvignon Blanc. *Functional Plant Biology* 30 , pp. 711-717.

Petropoulos, S., Kallithraka, S., & Paraskevopoulos, I. (2011, October 13). Influence of Some Viticultural Practices on the Polyphenolic Content of Wines Produced from cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 2011, 45, n°4, , pp. 235-243.

Petropoulos, S., Kanellopoulou, A., Paraskevopoulos, I., Kotseridis, Y., & Kallithraka, S. (2017, July 24). Characterization of grape and wine proanthocyanidins of Agiorgitiko (*Vitis*. *Journal of Food Composition and Analysis* 63 , pp. 98-110.

Poni, S., Casalini, L., Bernizzoni, F., Civardi, S., & Intrieri, C. (2006). Effects of early defoliation on shoot photosynthesis, yield components and grape composition. *American Journal of Enology and Viticulture* 57 , pp. 397-407.

Risco, D., Perez, D., Yeves, A., Castel, J., & Intrigliolo, D. (2013, February). Early defoliation in a temperate warm and semi-arid Tempranillo vineyard: vine performance and grape composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20 (2014) , pp. 111-122.

- Ristic, R., Downey, M., Iland, P., Bindon, K., L, F., Henderich, M., et al. (2007). Exclusion of sunlight from 'Shiraz' grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 65 , pp. 53-65.
- Shrestha, A., & Fidelibus, M. (2005, April 2). Grapevine row orientation affects light environment, growth and development of black nightshade (*Solanum nigrum*). *Weed Science* 53 , pp. 802-812.
- Silviotti, P., Herrera, J. C., Lisjak, K., Basaa, H., Sabbatini, P., Peterlunger, E., et al. (2016, May). Impact of leaf removal, applied before and after flowering on anthocyanin, tannin and methoxypyrazine concentrations in Merlot grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .
- Sukje, K., Antalick, G., Coetzee, Z., Schmidtke, L., Basa Cesnik, H., Brandt, J., et al. (2014). Effect of leaf removal and ultraviolet radiation on the composition and sensory perception of *Vitis vinifera* L.cv. Sauvignon Blanc wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20(2) , pp. 223-233.
- Verdenal, T., Zufferey, V., Dienes-Nagy, A., Belcher, S., Lorenzini, F., Rosti, J., et al. (2018, June 18). Intensity and timing of defoliation on white cultivar Chasselas under the temperate climate of Switzerland. *OENO One* 52 (2) , pp. 93-104.
- Vilanova, M., Diago, M. P., Genisheva, Z., Oliveira, J. M., & Tardaguila, J. (2011, May). Early leaf removal impact on volatile composition of Tempranillo wines. *Journal of Science, Food and Agriculture* 2012 (92) , pp. 935-942.
- Zoecklein, B., Fugelsang, K., Gump, B., & Nury, F. (1999). *Wine Analysis and Production*. Νέα Υόρκη: Aspen Publishers.
- Κουράκου, Σ. (1998). *Θέματα Οινολογίας*. Αθήνα: Εκδόσεις Τροχαλία.
- Μπακασιέτας, Κ. (n.d.). *nemeawineland*. Retrieved from <http://www.nemeawineland.com/agiorgitiko>.
- Σουφλερός, Ε. (2015). *Οινολογία*. Θεσσαλονίκη.
- Σταυρακάκης, Μ. (2010). *Αμπελογραφία*. Αθήνα: Εκδόσεις Τροπή.
- Σταυρακάκης, Μ. (2013). *Αμπελουργία*. Αθήνα: Τροπή.
- Τσακίρης, Α. (2014). *Οινολογία: από το σταφύλι στο κρασί 4η Έκδοση*. Αθήνα: Εκδόσεις Ψυχάλου.