



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΦΥΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ
ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΠΙΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΜΠΕΛΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΙΤΛΟΣ: «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΥΛΛΙΚΗΣ
ΕΦΑΡΜΟΦΗΣ ΚΑΟΛΙΝΗ ΣΤΟΥΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ
ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ
ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΜΠΕΛΩΝΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΚΑΛΛΙΟΠΗ Κ.
ΤΖΕΛΕΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΠΙΝΙΑΡΗ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΑΘΗΝΑ 2019



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΦΥΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ
ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΠΙΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΜΠΕΛΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΙΤΛΟΣ: «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΥΛΛΙΚΗΣ
ΕΦΑΡΜΟΦΗΣ ΚΑΟΛΙΝΗ ΣΤΟΥΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ
ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ
ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΜΠΕΛΩΝΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΚΑΛΛΙΟΠΗ Κ.
ΤΖΕΛΕΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΠΙΝΙΑΡΗ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΤΙΤΛΟΣ: «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΥΛΛΙΚΗΣ
ΕΦΑΡΜΟΦΗΣ ΚΑΟΛΙΝΗ ΣΤΟΥΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ
ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ
ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΜΠΕΛΩΝΑ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΚΑΛΛΙΟΠΗ Κ.
ΤΖΕΛΕΠΗ**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

ΜΠΙΝΙΑΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΜΠΙΝΙΑΡΗ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΡΟΥΣΣΟΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω την κ. Μπινιάρη Αικατερίνη καθηγήτρια του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και διευθύντρια του εργαστηρίου Αμπελολογίας που είχε την επίβλεψη της εργασίας αυτής, για τη βοήθεια, τις υποδείξεις και τις καίριες παρατηρήσεις της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας, καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο Πανεπιστήμιο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μπούζα Δέσποινα και τον κ. Δασκαλάκη Ιωάννη και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές τους, όχι μόνο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αλλά καθ' όλη τη πορεία μου ακαδημαϊκά.

Επίσης οφείλω να ευχαριστήσω τους καθηγητές του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Ρούσσο Πέτρο και κ. Παπαδάκη Ιωάννη για τη βοήθειά τους και τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή, καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθειά τους. Είμαι σίγουρη ότι η παρουσία τους ήταν αυτή που με βοήθησε στην πραγματοποίηση των στόχων μου.

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αμπελουργίας του Γεωπονικού Πανεπιστήμιου Αθηνών κατά το έτος 2018. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση της διαφυλλικής εφαρμογής της αντιδιαπνευστικής ουσίας καολίνη σε ποσοτικούς και ποιοτικούς παράγοντες της ερυθρής οινοποιήσιμης ποικιλίας Αγιωργίτικο σε συνθήκες σκίασης και ηλιοφάνειας. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση του εμπορικού σκευάσματος *Surround CropProtectant WP* σε χαρακτήρες όπως το μήκος, πλάτος, βάρος σταφυλής και ραγών, ολικά διαλυτά στερεά, ολική και ενεργή οξύτητα (pH), περιεκτικότητα των ραγών σε υγρασία, φλοιό και γίγαρτα και περιεκτικότητα αυτών σε φαινολικά συστατικά στο στάδιο της τεχνολογικής ωριμότητας με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας. Επιπλέον, μελετήθηκε η περιεκτικότητα των φλοιών σε μεμονωμένες ανθοκυάνες στους φλοιούς των ραγών και σε μεμονωμένα οξέα στο γλεύκος των ραγών με τη μέθοδο HPLC αντίστροφης φάσης. Τέλος, μελετήθηκε και το αντιοξειδωτικό δυναμικό των ραγών με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας.

Το εμπορικό σκεύασμα *Surround Crop Protectant WP* αποτελεί ένα αντιδιαπνευστικό και απωθητικό εντόμων, το οποίο δημιουργώντας ένα προστατευτικό επίστρωμα (φιλμ) στην επιφάνεια των φυτών δρα απωθητικά και ερεθιστικά στα έντομα, αλλάζοντας το μήκος κύματος του φωτός που εκπέμπεται από την επιφάνειά της. Το επίστρωμα (φιλμ) **καολίνη** καλύπτει τα φυτά, ενώ επιτρέπει τη φωτοσύνθεση, αντανakλά τις βλαβερές IR και UV ακτινοβολίες και μετριάζει το στρες από διάφορους βιοτικούς παράγοντες, όπως το θερμικό και υδατικό στρες, καθώς και τα ηλιοκαύματα. Επομένως, στο πρώτο μέρος γίνεται αναφορά στις αντιδιαπνευστικές ουσίες με έμφαση στον καολίνη, στις φαινολικές ενώσεις των ραγών, στα μεμονωμένα οξέα και στις αντιοξειδωτικές ουσίες των ραγών με συγκεκριμένες πειραματικές αναφορές.

Εν συνεχεία, στο δεύτερο μέρος γίνεται μια περιγραφή των δύο αγροτεμαχίων, όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα, τα οποία βρίσκονται στην ευρύτερη περιοχή της Νεμέας Ν. Κορινθίας καθώς και λεπτομερείς αναφορές για την πορεία του πειράματος και την υλοποίηση των μετρήσεων. Τέλος, γίνεται στατιστική ανάλυση

των αποτελεσμάτων των μετρήσεων συγκρίνοντάς τα με άλλα πειραματικά αποτελέσματα και διεξάγονται συμπεράσματα. Στη παρούσα μελέτη, αποδείχθηκε ότι υπήρχε μια θετική επίδραση του αντιδιαπνευστικού σκευάσματος με βάση τον καολίνη στους περισσότερους χαρακτήρες, κυρίως όμως στα φαινολικά συστατικά και το αντιοξειδωτικό δυναμικό των ραγών και των φαινολικών, δίνοντας μεγάλη έμφαση στο τελευταίο.

Λέξεις-κλειδιά: *Vitis vinifera* L., Αγιωργίτικο, καολίνης, φαινολικές ενώσεις, ανθοκυάνες, ταννίνες, φλαβονοειδή, φλαβανόλες, φλαβονόλες, φλοιοί, γίγαρτα, οργανικά οξέα, αντιοξειδωτικά, ο-διφαινόλες

Abstract

This present thesis was conducted in the Laboratory of Viticulture of the Agricultural University of Athens in the year 2018. This present research examines the effect of the foliar application of Kaolin anti-respiratory substance on specific quantitative and qualitative factors of the red wine cultivar variety “Agiorgitiko” in shade and sunshine conditions. In particular, the effect of the commercial Surround CropProtectant WP formulation was studied in characters such as length, width, weight of grapes and berries, total soluble solids, total and active acidity (pH), the content of grape berries in moisture, seeds, skin and phenolic components at the stage of technological maturity by the spectrophotometry method. In addition, the content of grape skin in individual anthocyanins and the content of grape must in individual acids by the reverse phase HPLC method was studied. Finally, the antioxidant potential of grapes was studied by the spectrophotometry method.

Surround Crop Protectant WP is an insect-repellent and anti-respiratory formulation that creates a protective film on the surface of plants that acts as a repellent and irritant factor to the insects by altering the wavelength of light emitted from its surface. Kaolin particle film, which covers plants while allowing photosynthesis, reflects harmful IR and UV radiation, mitigates the negative impacts of the abiotic stresses in grapevine, like heat, water stress and sun burnings. Thus, in the first part, reference is made to anti-respiratory substances with emphasis on kaolin, phenolic compounds, individual acids and antioxidants of grapes with specific experimental references of other papers.

Then, in the second part, a description of the two parcels is made, where the experiment was carried out (which are located in the wider area of Nemea in Corinthia). Furthermore, detailed references for the procedure of the experiment and the realization of the measurements are described. Finally, a statistical analysis of the measurements is made, comparing the present results with other research results. Finally, some conclusions are made. In the present study, it was shown that there was a positive effect of the kaolin-based anti-respiratory formulation on the majority of

characters, but mainly on the phenolic components and the antioxidant potential of the grapes, with great emphasis on the latter one.

Keywords: *Vitis vinifera* L., Agiorgitiko, kaolin, phenolic compounds, anthocyanins, tannins, flavonoids, flavanols, flavonols, skins, seeds, organic acids, antioxidants, o-diphenols

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
Κεφάλαιο 1 ^ο : Εισαγωγικό κεφάλαιο.....	11
1.1 Καλλιεργούμενες εκτάσεις και παραγωγή αμπελοοικονομικών προϊόντων παγκοσμίως και στην Ελλάδα	11
1.2 Η καλλιέργεια του Αγιωργίτικου.....	12
1.2.1 Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά του Αγιωργίτικου.....	13
Κεφάλαιο 2 ^ο : Η χρήση του καολίνη στην άμπελο	16
2.1 Η χρήση των αντιδιαπνευστικών στη γεωργία και κατηγοριοποίηση αυτών.....	16
2.2 Αντιδιαπνευστικά που προκαλούν ανάκλαση της ακτινοβολίας.....	17
2.3 Η επίδραση του προστατευτικού φιλμ καολίνη στους αμπελώνες.....	18
Κεφάλαιο 3 ^ο : Τα οργανικά οξέα της ράγας.....	21
3.1 Το τρυγικό οξύ	22
3.2 Το μηλικό οξύ.....	23
3.3 Το ασκορβικό οξύ.....	24
3.4 Οι σχέσεις των οξέων της ομάδας του μηλικού.....	25
Κεφάλαιο 4 ^ο : Τα φαινολικά συστατικά της ράγας	26
4.1 Δομή και κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων της ράγας.....	26
4.2 Φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις.....	27
4.2.1 Φλαβόνες-Φλαβονόλες	28
4.2.2 Φλαβανόλες-Ταννίνες	29
4.2.3 Ανθοκυάνες.....	33
4.3 Οι ο-διφαινόλες ως προϊόντα δράσης των πολυφαινολοξειδασών	37
Κεφάλαιο 5 ^ο : Οι αντιοξειδωτικές ουσίες της ράγας	39
ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	42
Κεφάλαιο 6 ^ο : Υλικά και Μέθοδοι.....	42
6.1 Περιγραφή αμπελώνων.....	42
6.2 Σχεδίαση του πειράματος	42
6.3 Συλλογή των δειγμάτων-Μετρήσεις.....	44
6.4 Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας	45
6.4.1 Βάρος, μήκος και πλάτος σταφυλής.....	45
6.4.2 Μέσο βάρος, μήκος και πλάτος ράγας	45
6.4.3 Ποσοστό υγρασίας και ξηράς ουσίας ράγας	46

6.4.4 Ποσοστό γιγάρτων, φλοιού και σάρκας ράγας.....	46
6.5 Μετρήσεις γλυκογραφικών χαρακτηριστικών.....	46
6.5.1 Μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας (°Brix) με χρήση διαθλασίμετρου.....	46
6.5.2 Μέτρηση ενεργής οξύτητας-pH.....	47
6.5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής οξύτητας.....	48
6.6 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών στους φλοιούς και στα γιγάρτα με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας.....	49
6.6.1 Προετοιμασία δειγμάτων	49
6.6.2 Μέτρηση ολικών ανθοκυανών και φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο Pland	52
6.6.3 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose (μεθυλική κυτταρίνη)	55
6.6.4 Μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων με τη μέθοδο του Χλωριούχου Αργιλίου (AlCl ₃)	57
6.6.5 Μέτρηση των ολικών φλαβονολών με τη μέθοδο της 4-διμεθυλ-αμμινοκινναμωμική αλδεΐδη (4-DMACA) (Arnous A. et al., 2002)	59
6.6.6 Μέτρηση των ολικών φλαβονών και φλαβονολών με τη μέθοδο του Χλωριούχου Αργιλίου (AlCl ₃).....	62
6.6.7 Μέτρηση των ολικών αντιοξειδωτικών με τη μέθοδο FRAP	63
6.6.8 Μέτρηση των ολικών ο-διφαινολών στο εκχύλισμα.....	66
6.7 Προσδιορισμός μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων και οξέων με HPLC αντίστροφης φάσης.....	68
6.7.1 Αρχή λειτουργίας του οργάνου.....	68
6.7.2 Μέτρηση μεμονωμένων ανθοκυανών.....	70
6.7.3 Μέτρηση μεμονωμένων οξέων	72
Κεφάλαιο 7 ^ο : Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	74
7.1 Στατιστική Ανάλυση	74
7.2 Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας.....	74
7.2.1 Βάρος, μήκος, πλάτος σταφυλών και ραγών.....	74
7.2.2 Ποσοστό υγρασίας και ξηράς ουσίας ραγών	77
7.2.3 Ποσοστό φλοιού, γιγάρτων και σάρκας ραγών	78
7.3 Μετρήσεις Γλυκογραφικών Χαρακτηριστικών.....	80
7.4 Μέτρηση μεμονωμένων οξέων.....	82
7.5 Μέτρηση ολικών και μεμονωμένων ανθοκυανών.....	85
7.6 Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων φλοιών και γιγάρτων.....	89
7.7 Μέτρηση ολικών φλαβονολών φλοιών και γιγάρτων	91
7.8 Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών φλοιών και γιγάρτων	93
7.9 Μέτρηση ολικών φλαβονολών και φλαβονών φλοιών και γιγάρτων	94
7.10 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών φλοιών και γιγάρτων	96

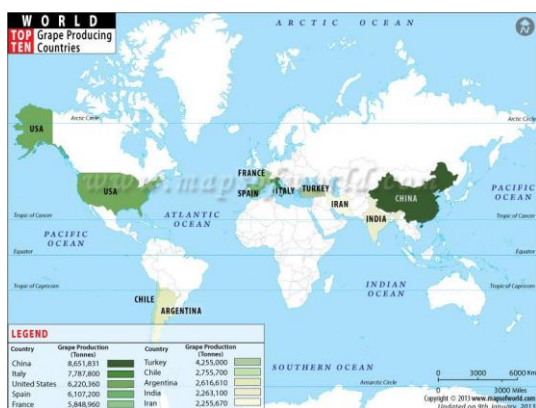
7.11 Μέτρηση ολικών <i>o</i> -διφαινολών φλοιών και γιγάρτων	98
7.12 Μέτρηση ολικών αντιοξειδωτικών φλοιών και γιγάρτων.....	99
Κεφάλαιο 8 ^ο : Συμπεράσματα	101
Ξένη Βιβλιογραφία.....	103
Ελληνική Βιβλιογραφία	112

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγικό κεφάλαιο

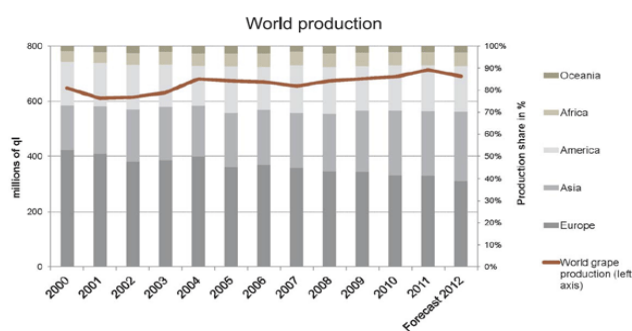
1.1 Καλλιεργούμενες εκτάσεις και παραγωγή αμπελουργικών προϊόντων παγκοσμίως και στην Ελλάδα

Σύμφωνα με τη συνεδρίαση του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου (International Organisation of vine and wine: OIV), που πραγματοποιήθηκε τον Απρίλιο του 2015, ο παγκόσμιος αμπελώνας (επιτραπέζια και οινοποιήσιμα) το 2014 έφθασε συνολικά τα 7.550.000 εκτάρια. Επίσης, η Ισπανία ήταν η πρώτη χώρα καλλιέργειας της αμπέλου (1.020.000 εκτάρια), η Κίνα η δεύτερη (με 799.000 εκτάρια) και η Γαλλία η τρίτη (792.000 εκτάρια). Σύμφωνα με τα στοιχεία του OIV, οι παγκόσμιες εκτάσεις με αμπελοκαλλιέργεια μειώθηκαν μεταξύ 1995 και 2013 κατά 4%. Η μόνη ήπειρος στην οποία κατεγράφη μείωση είναι η Ευρώπη (μείωση κατά 500.000 εκτάρια εκ των οποίων 269.000 εκριζώθηκαν με πριμοδότηση το διάστημα 2008-2011). Αντίθετα σε Ασία, Αμερική, Αφρική και Ωκεανία κατεγράφη μικρή αύξηση (Πετροπούλου-Καραγιαννοπούλου Σ., 2016).



Εικόνα 1: Εξάπλωση της καλλιέργειας της αμπέλου στον κόσμο στις πρώτες χώρες παραγωγής σταφυλιών το έτος 2010 (FAO)

Development of total grapes production



Εικόνα 2: Εξέλιξη της παραγωγής σταφυλιών (σε εκατ.εκατόκιλα) στις πέντε ηπείρους μεταξύ 2000-2012)

Το αμπέλι καλλιεργείται στις μεσογειακές χώρες, στην Κίνα, στις Η.Π.Α., στις χώρες της Νοτίου Αμερικής και στην Ινδία. Πρώτη σε παραγωγή ήπειρος είναι η Ευρώπη και ακολουθεί η Ασία, η Αμερική, η Αφρική και η Ωκεανία (Πετροπούλου-Καραγιαννοπούλου Σ., 2016).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η άμπελος καλλιεργείται πρωτίστως για την παραγωγή οίνου, σταφίδας, επιτραπέζιων σταφυλιών και αποσταγμάτων, και δευτερευόντως για την

παραγωγή χυμού σταφυλής, κονσέρβας σταφυλών, αιθανόλης, όξους, γιγαρτέλαιου, τρυγικού οξέος, ενώ από τα παραπροϊόντα της οινοποίησης παρασκευάζονται λιπάσματα κ.λπ. (Σταυρακάκης Μ., Αμπελουργία, 2013).

Ο ελληνικός αμπελώνας, από τους παλαιότερους στον κόσμο, έχει σήμερα έκταση 1.100.000 στρ. Η Πελοπόννησος και η Κρήτη αποτελούν τα παραδοσιακά αμπελουργικά διαμερίσματα της χώρας με τις μεγαλύτερες εκτάσεις αμπελώνων (Σταυρακάκης Μ., Αμπελουργία, 2013). Σύμφωνα με τα δεδομένα της Στατιστικής Υπηρεσίας, οι καλλιεργούμενες εκτάσεις με αμπέλια στην Ελλάδα παρουσίασαν μια συνεχή μείωση από το 2009 μέχρι το 2013 (Πετροπούλου-Καραγιαννοπούλου Σ., 2016).

Όσον αφορά τις οινοποιήσιμες ποικιλίες, στην Ελλάδα τα περισσότερα οινοποιήσιμα σταφύλια καλλιεργούνται στην Πελοπόννησο, τη Δυτική Ελλάδα αλλά και στην Κρήτη. Η κυριότερη οινοποιήσιμη ποικιλία σταφυλιών στην Ελλάδα είναι το Σαββατιανό σε ποσοστό 17,01%, ενώ τη δεύτερη θέση καταλαμβάνει ο Ροδίτης (ΥΠΑΑΤ, 2013).

Το μισό περίπου της παγκοσμίου παραγωγής οίνου το 2010 παρήχθη από τις μεσογειακές χώρες Γαλλία, Ιταλία και Ισπανία (Πετροπούλου-Καραγιαννοπούλου Σ., 2016). Πρώτη παραγωγός χώρα είναι η Γαλλία, ακολουθούμενη από την Ιταλία, Ισπανία, ΗΠΑ κλπ. Η ποικιλία “Chardonnay”, φαίνεται ότι καταλαμβάνει την πρώτη θέση σε σχέση με τις υπόλοιπες οινοποιήσιμες ποικιλίες, με το σύνολο όμως των διαφόρων ποικιλιών να βρίσκονται στην υψηλότερη θέση συνολικά (NASS,USDA 2013).

1.2 Η καλλιέργεια του Αγιωργίτικου

Από τις ευγενέστερες ερυθρές ελληνικές ποικιλίες, καλλιεργείται εδώ και πολλά χρόνια στην ευρύτερη περιοχή της Νεμέας (27.000 στρ. περίπου), όπου κατά μια εκδοχή παράγονταν κατά την αρχαιότητα (4^{ος} αιώνας π.Χ.) περίφημος ερυθρός οίνος, ο φλιάσιος.

Η ποικιλία Αγιωργίτικο είναι γνωστή και ως Μαύρο Νεμέας ή Μαυρούδι (Νεμέας) και, όπως έδειξαν έρευνες με βιοχημικές μεθόδους, τα αναφερόμενα ως συνώνυμα

Μαυρούδι, Μαυράκι, Μαυροστάφυλο και Καρβουνιάρης είναι διαφορετικές ποικιλίες. Ο Κριμπάς (1943α) περιγράφει το Μαυρούδι ως ξεχωριστή ποικιλία από το Αγιωργίτικο με εμφανείς αμπελογραφικές διαφορές. Ο Guillon (1895) περιγράφει την ποικιλία Mavroudion, Staphilimavron και Mavron και οι Viala και Vermorel (1905) αναφέρουν τις ποικιλίες Mavroudion, Mavrudí, Mavrud και Mavrude (Σταυρακάκης Μ., Αμπελογραφία, 2013).

Η αμπελουργική ζώνη παραγωγής ερυθρών οίνων ΟΠΑΠ (Οίνοι Ονομασίας Προελεύσεως Ανωτέρας Ποιότητας) «Νεμέα» είναι η μεγαλύτερη στην Ελλάδα και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια εδαφικών και κλιματικών συνθηκών (υψόμετρο 250-850 μ.) λόγω της μεγάλης έκτασής της.

Η καλλιέργεια της ποικιλίας Αγιωργίτικο συνίσταται για το αμπελουργικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου, της Ν.Α Αττικής, Πειραιώς, τους νομούς Αιτωλοακαρνανίας, Βοιωτίας, Εύβοιας και επιτρέπεται στους νομούς Δράμας, Πέλλας, Πιερίας και Φλώρινας.

1.2.1 Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά του Αγιωργίτικου

Ποικιλία μετρίως ζωηρή έως ζωηρή, εύρωστη, όψιμης ωρίμανσης, πολύ παραγωγική. Ο τυφλός οφθαλμός είναι γόνιμος. Ο καρποφόρος βλαστός φέρει δύο σταφυλές, συνήθως στον 4^ο και στον 5^ο κόμβο, συχνά όμως εμφανίζονται 3-4 σταφυλές από τον 2^ο έως τον 6^ο κόμβο.

Στους παλαιούς αμπελώνες μορφώνεται σε κύπελλο, με 3-5 βραχίονες, και δέχεται κλάδεμα βραχύ (μία παραγωγική μονάδα με δύο οφθαλμούς). Υπό τις συνθήκες αυτές, η παραγωγή ανά στρέμμα κυμαίνεται στα όρια που προβλέπονται από τη σχετική νομοθεσία. Στους νέους αμπελώνες τα πρέμνα μορφώνονται σε γραμμικά σχήματα (συνήθως σε αμφίπλευρο Royat με 6-8 βραχίονες), το κλάδεμα καρποφορίας είναι βραχύ (μία κεφαλή με 1-2 οφθαλμούς ανά βραχίονα), οι δε αποδόσεις ανά στρέμμα αυξάνονται αρκετά, χωρίς όμως να παρατηρούνται, εκτός από ακραίες περιπτώσεις, αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα των οινικών προϊόντων

(Σταυρακάκης Μ., Αμπελογραφία, 2013). Ερευνητικές εργασίες έδειξαν ότι η ποικιλία Αγιωργίτικο παρουσιάζει μεγάλο δυναμισμό παραγωγής, με την έννοια ότι είναι δυνατή η αύξηση των αποδόσεων ανά πρέμνο και στρέμμα χωρίς να υποβαθμίζεται η ποιότητα των παραγόμενων οίνων (ΕΘΙΑΓΕ 1997, Κουδουράς και VanLeeuwen, 2002).

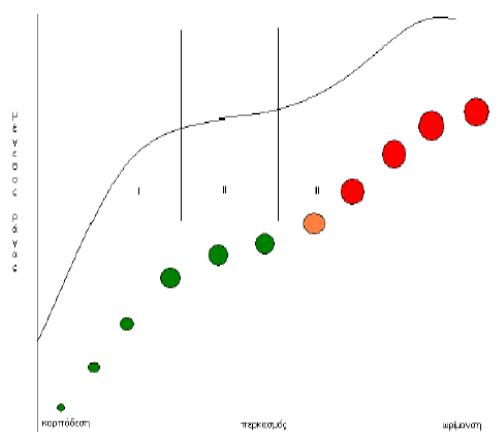
Για αύξηση της παραγωγής χωρίς επιπτώσεις στην ποιότητα συνιστάται η αύξηση του αριθμού των πρέμνων ανά στρέμμα (400-450). Άλλωστε, ο έντονος πολυμορφισμός των εδαφικών συνθηκών-ανάγλυφο, φυσικές και χημικές ιδιότητες εδάφους- και των κλιματικών παραμέτρων που συμβάλλουν στη δημιουργία μεγάλου αριθμού μικροκλιματικών περιοχών, σε συνδυασμό με την πολυκλωνικότητα της ποικιλίας, διαφοροποιούν αισθητά τους γλευκογραφικούς χαρακτήρες και την ποιότητα των παραγόμενων οίνων. Ιδιαίτερο ρόλο φαίνεται να παίζει η διαμόρφωση του αναγλύφου του εδάφους και η αυξημένη ατμοσφαιρική υγρασία υπό την επίδραση των καταβατικών ανέμων («κατά»), ειδικά στους ημιορεινούς αμπελώνες, που επηρεάζουν σημαντικά το βαθμό της υδατικής καταπόνησης των πρέμνων, συμβάλλοντας στην ομαλή ωρίμανση με όλες τις ευεργετικές επιπτώσεις στην ποιότητα των σταφυλών και των παραγόμενων οίνων.

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

Παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στο οίδιο και τις ιώσεις, κυρίως στον μολυσματικό εκφυλισμό, και μέτρια ευαισθησία στον περονόσπορο. Είναι επίσης ευαίσθητη στην ξηρασία και στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα και τον ανοιξιάτικο παγετό. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στην άρδευση, ώστε να αποφευχθεί η έντονη υδατική καταπόνηση αλλά να διατηρηθούν τα πρέμνα σε κατάσταση πολύ ήπιας καταπόνησης, η οποία συμβάλλει στη βελτίωση των φυσιολογικών λειτουργιών.

Ανάλογη προσοχή απαιτείται σε αμπελώνες με βαριά, αργιλώδη, συνεκτικά εδάφη, ώστε με τους κατάλληλους χειρισμούς να αμβλυθούν οι αρνητικές επιπτώσεις από την υπερβολική υγρασία.

Την άνοιξη, σε πρέμνα υψηλής ζοηρότητας, παρατηρούνται προβλήματα στην άνθηση, τη γονιμοποίηση και την καρπόδεση, με αποτέλεσμα τη μικρορραγία και την παρουσία μικρών, πράσινων, αγίγαρτων ραγών. Τα προβλήματα αυτά εντείνονται όταν παρατηρείται σημαντική αυξομείωση της θερμοκρασίας, αλλά πιθανόν να συνδέονται με την τροφοπενία μολυβδαινίου (Σταυρακάκης Μ., Αμπελογραφία, 2013).



Η ανάπτυξη της ράγας στη ποικιλία Αγιωργίτικο, όπως και σε όλες τις εγγίγαρτες ποικιλίες αμπέλου, παρουσιάζει δύο διακεκριμένες φάσεις (I και III) ταχύτατης ανάπτυξης της ράγας που διακόπτονται από μια φάση (II) επίσχεσης του ρυθμού αύξησης, ώστε τελικά η καμπύλη του αριθμού αύξησης των ραγών να είναι διπλή σιγμοειδής (Σταυρακάκης Μ., Αμπελογραφία, 2013).

Εικόνα 3: Διπλή σιγμοειδής καμπύλη της ράγας

Κεφάλαιο 2^ο : Η χρήση του καολίνη στην άμπελο

2.1 Η χρήση των αντιδιαπνευστικών στη γεωργία και κατηγοριοποίηση αυτών

Λιγότερο από το 5% του νερού που απορροφάται από τις ρίζες χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη της καλλιέργειας, το υπόλοιπο 95% διαφεύγει μέσω της διαπνοής. Η μείωση της διαπνοής αποτελεί μια ευκαιρία για την άμβλυση των αρνητικών επιπτώσεων της έλλειψης ύδατος και τη βελτίωση της παραγωγικότητας των καλλιεργειών υπό συνθήκες ξηρασίας, όπου η διαπνοή συχνά υπερβαίνει την πρόσληψη νερού (Πασπάτης Ε., 1998, Poljakoff-Mayber A. and Gale J., 2012).

Τα αντιδιαπνευστικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για να αμβλύνουν τις αρνητικές επιδράσεις της ξηρασίας αφού, μόλις εφαρμοστούν στα φύλλα, περιορίζουν σημαντικά την απώλεια νερού και το θερμικό στρες (Gale J. and Poljakoff-Mayber A. 1967, Rosati A., 2007). Στη σύγχρονη γεωργία σαν αντιδιαπνευστικό ορίζεται κάθε ουσία που όταν εφαρμόζεται σε ένα φυτό μπορεί να περιορίσει τη διαπνοή και κατά συνέπεια την απώλεια νερού και αυτό εξαρτάται τόσο από το είδος της ουσίας, όσο και από το χρόνο και τον τρόπο εφαρμογής της (Πασπάτης Ε., 1998). Η χρήση αντιδιαπνευστικών επιτρέπει στα αέρια να διεισδύουν αλλά όχι στα υγρά, επιτρέποντας τη φυσιολογική αναπνοή του φυτού αλλά μειώνει τη διαπνοή έως και 80% (Πασπάτης Ε., 1998, Bose T.K. et al., 2001, Gindaba J. and Wand S. J. E., 2005, Lolicato S., 2011).

Η εφαρμογή των αντιδιαπνευστικών έχει ευεργετική επίδραση στην ανάπτυξη και καρποφορία πολλών καλλιεργειών οπωρώνων (Kerns D.L. and Wright G.C., 2000, Wunsche J.N et al., 2002, Yazici K. et al., 2005, Al-Abbasy et al., 2006, Morsy M. et al., 2008, Glenn D.M., 2009, El-Khawaga A.S. and Mansour A.E.M., 2014). Οι αντιδιαπνευστικές ενώσεις ήταν ενδιαφέρουσες για το χαμηλό κόστος και την ευκολία εφαρμογής τους (Palliotti A. et al., 2012).

Μεταβολικά	abscisic acid
	alachlor
	CO ₂
	chlormequat chloride
	daminozide
	8-hydroxyquinoline sulphate
	chlorflorecol methyl
	phenyl mercuric acetate (PMA)
	alkenilsuccinic acids
Σχηματισμό μεμβράνης	cetyl alcohol
	hexadecanol
	latex
	octadecanol
	pinolene
	polyacrylate emulsion
	polyvinyl chloride
	polyterpene
	silicone
	κηρός παραφίνης
	γαλακτωματοποιήσιμοι κηροί
Ανακλαστικά της ηλιακής ακτινοβολίας	καολινίτης

Εικόνα 4:Κυριότερες αντιδιαπνευστικές ουσίες

Τα αντιδιαπνευστικά θεωρούνται ότι είναι συνθετικές κυρίως φυτορρυθμιστικές ουσίες και μπορεί να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες με βάση τον τρόπο δράσης:

1. Τα μεταβολικά αντιδιαπνευστικά που επιδρούν στο μεταβολισμό του φυτού και ρυθμίζουν το άνοιγμα των στοματίων.

2. Τα αντιδιαπνευστικά που σχηματίζουν μεμβράνη (film) πάνω στα φύλλα, εμποδίζοντας έτσι τη διαπνοή.

3. Τα αντιδιαπνευστικά που προκαλούν ανάκλαση της προσπίπτουσας στα φυτά ηλιακής ακτινοβολίας (Ahmed Y.M. et al., 2014).

Άλλες ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιδιαπνευστικά είναι το **σαλικυλικό οξύ** (AbdEl- Kareem A.M, 2009, Joseph B. et al., 2010, Abdelaal A.M.K. et al., 2012, Ebrahiem – Asmaa A., 2012), **η χιτοζάνη** (Hummel R.L., 1990, Nitzsche P. et al., 1991, Hadwiger L.A. et al., 1994, Laurie S. et al., 1994, Gu S.L. et al., 1996, Bittelli M. et al., 2001, Jifon J.L. and Syvertsen J.P., 2003, Plaut Z. et al., 2004, Kulikovr S.N. et al., 2006, Faoro F. and Iriti M., 2007, Ahmed Y.M. et al., 2014), **χουμικές ουσίες** (fulvic acid-humic acid) (Nardi S. Et al., 2002, Li M.et al., 2005, Anjum S.A et al., 2011) **το εμπορικό σκεύασμα Vapor gard** (VG, a.i.,di-1-p-menthene), **το Green miracle** και **το folicote** (Ben-Porath B.A. and Greenblat Y., 1994, Masoud A. A. B., 2012, Mohawesh O.E., 2010, Palliotti A. et al., 2013).

2.2 Αντιδιαπνευστικά που προκαλούν ανάκλαση της ακτινοβολίας

Κάθε ουσία που απορροφά τη φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία μέσω του φιλμ σωματιδίων, ενώ μπορεί να ανακλά την ηλιακή ακτινοβολία με μήκος κύματος μεγαλύτερο από 700nm και μικρότερο από 400nm (υπεριώδη και υπέρυθρη ακτινοβολία), έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της προσλαμβανόμενης από το φυτό ολικής ενέργειας, αφού η αξιοποιούμενη από τα φυτά ακτινοβολία έχει μήκος κύματος από 400-700nm. Άμεση συνέπεια της μείωσης της προσλαμβανόμενης από τα φύλλα ολικής ενέργειας είναι η μείωση της θερμοκρασίας των φύλλων κατά 3-4°C και της διαπνοής κατά 30% χωρίς να επηρεάζει σημαντικά, όταν οι συνθήκες

φωτισμού είναι καλές, τη φωτοσύνθεση (Πασπάτης Ε., 1998, Anderson J.E. and Kreith F., 2005, Lipe W.N. and Wendt C.W., 2008). Αντιδιαπνευστικά αυτής της κατηγορίας είναι ο καολίνης, το Purshade (CaCO_3) και το Agsil (K_2SiO_3) (Glenn D.M. and Puterka G.J., 2005, Shellie K.C. and Glenn D.M. 2008, Glenn et al., 2010).



Εικόνα 5: Ορυκτό καολίνη

Ο καολίνης είναι ένα δευτερογενές ορυκτό το οποίο ανήκει στην κατηγορία των φυλλοπυριτικών ορυκτών της αργίλου. Ο χημικός του τύπος είναι $\text{Al}_4\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$, μια μορφή aluminium-silicate ($\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{SiO}_2$). Ουσιαστικά, πρόκειται για λευκή άργιλο η οποία δεν διογκώνεται με το νερό, δεν είναι τραχιά, διασπείρεται εύκολα στο νερό και είναι χημικά αδρανής για ένα μεγάλο εύρος pH (Bostanian N.J. and Racette G., 2008).

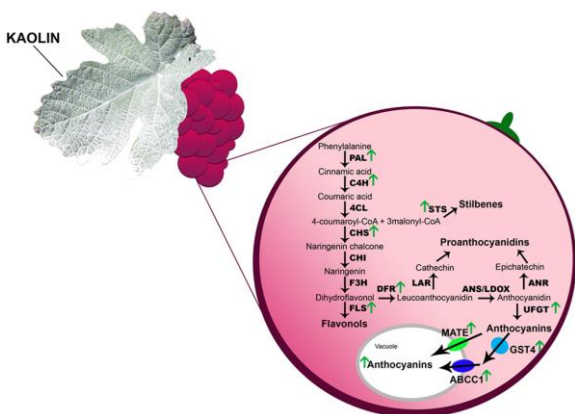
2.3 Η επίδραση του προστατευτικού φιλμ καολίνη στους αμπελώνες

Το μελλοντικό κλίμα στις περιοχές καλλιέργειας αμπελώνων της Μεσογείου θα χαρακτηρίζεται από έντονες καλοκαιρινές συνθήκες, με χαμηλότερη διαθεσιμότητα νερού, αυξημένη θερμοκρασία και αυξημένη ηλιακή ακτινοβολία (ορατή και υπεριώδη). Αυτές οι προβλεπόμενες συνθήκες θα επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη και την απόδοση, καθώς παρουσιάζουν πρόσθετες επιδράσεις στη φυσιολογία των φυτών, συν το γεγονός ότι τα πρέμνα στερούνται μηχανισμών αντίστασης και οι σταφυλές παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία στα ηλιακά εγκαύματα (Correia C.M. and Dinis L.T., 2014).

Προκειμένου να μειωθούν οι περιβαλλοντικές πιέσεις, χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι παράγοντες αντιδιαπνοής στη γεωργία και την αμπελουργία (Glenn D.M. et al., 2010; Shanan N.T and Shalaby E.A., 2011, Chamchaiyaporn D.M. et al., 2013). Σήμερα, ένα σύνολο υποσχόμενων ενώσεων χρησιμοποιείται για την προώθηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του σταφυλιών στην αμπελοκαλλιέργεια (Glenn D.M. et al., 2010, Dinis L.T. et al., 2016b) και για τον έλεγχο των ηλιακών εγκαυμάτων (Glenn D.M. et al. 2001, Glenn D.M., et al. 2002, Glenn D.M., 2009).

Ο καολίνης χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1999 για την αντιμετώπιση της ψύλλας αλλά και άλλων εντόμων στην αχλαδιά, ενώ στην αμπελουργία χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της νόσου του Pierce (Glenn D.M. et al., 2002, Tubajika K. M. et al., 2007).

Έχει αποδειχθεί ότι ο καολίνης έχει σημαντική θετική επίδραση στη θερμοκρασία των φύλλων, στη στοματική αγωγιμότητα, στη καθαρή φωτοσύνθεση, στην αποτελεσματικότητα χρήσης του νερού, στις φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες και στην απόδοση. Η εφαρμογή καολίνης μπορεί να μειώσει σημαντικά τη θερμοκρασία του φύλλου κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών, λόγω της υψηλότερης αντανακλαστικότητας των φύλλων που προσδίδεται από το υπόλευκο αυτό ξηρό φιλμ στα φύλλα. Ο υψηλότερος ρυθμός αναπνοής αυτών των φύλλων, που συνδέεται με υψηλότερη στοματική αγωγιμότητα, μπορεί επίσης να συνεισφέρει στη χαμηλότερη θερμοκρασία φύλλων εξαιτίας του φιλμ καολίνης (Correia C.M. and Dinis L.T., 2014). Ωστόσο, οι ποικιλίες του *V. vinifera* διαφέρουν ως προς την αντίδραση στο θερμικό στρες, καθώς οι ενδογενείς διαφορετικοί μηχανισμοί του στοματικού ελέγχου και η υδατική κατάσταση του πρέμνου μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα του φιλμ υπό συνθήκες ξηρασίας (Schultz H.R., 2002, de Souza C.R. et al. 2005, Shellie K. C., 2013).



Εικόνα 6: Επίδραση της διαφυλλικής εφαρμογής καολίνης στη διέγερση της βιοσύνθεσης των φρανυλοπροπανοειδών και φλαβονοειδών στα κύτταρα των ραγών

Η εφαρμογή φιλμ καολίνης φαίνεται να οδηγεί σε μια σημαντική αύξηση των ποσοτήτων αρκετών δευτερογενών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών και των ανθοκυανινών στα τελευταία στάδια ωρίμανσης, πιθανότατα αποτέλεσμα των μονοπατιών βιοσύνθεσης φαινυλπροπανοειδών και φλαβονοειδών (Conde A. et al., 2016). Η εφαρμογή με καολίνης φαίνεται να προσδίδει μια ευεργετική αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς μειώνει το ποσοστό των

ROS και των υδροξυλίων στις ράγες και τα φύλλα, ενισχύοντας τον μετριασμό των δυσμενών αβιοτικών κλιματικών πιέσεων στην άμπελο, συμβάλλοντας στην προστατευτική του ιδιότητα (Dinis L.T. et al., 2016a, Dinis et al., 2016b). Παράλληλα, η αντιοξειδωτική ικανότητα στις ράγες φαίνεται ότι σχετίζεται με την παρατηρούμενη αυξημένη περιεκτικότητα σε δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως τα

φαινολικά. Η εφαρμογή καολίνη ρυθμίζει τον δευτερογενή μεταβολισμό μέσω της αύξησης της αντιγραφής των γονιδίων που κωδικοποιούν την λύση της αμμωνίας φαινυλαλανίνης και τη συνθάση χαλκόνης (Conde A. et al., 2015). Επίσης, η δραστηκότητα των ενζύμων-κλειδί του κύκλου ασκορβικού-γλουταθειόνης σε φυτά κατεργασμένα με καολίνη οδηγεί σε λιγότερο οξειδωτική βλάβη στους ιστούς των φύλλων και των ραγών (χαμηλότερα επίπεδα H₂O₂ και υπεροξειδωση λιπιδίων), ενώ η μεθυλίωση του DNA φαίνεται να μειώνεται στα φύλλα από πρέμνα κατεργασμένα με καολίνη (Bernardo S. et al., 2017). Η αύξηση των ανθοκυανινών σε σχέση με τα SS φαίνεται να συνδέεται με μείωση της θερμοκρασίας και μειωμένη μετάδοση της ακτινοβολίας στο φύλλωμα του πρέμνου (Shellie K. C. and Bradley A. K., 2013).

Κεφάλαιο 3^ο: Τα οργανικά οξέα της ράγας

Η οξύτητα αποτελεί σημαντικό χαρακτήρα ποιότητας του γλεύκους και του οίνου, προσδίδοντας φρεσκάδα και δριμύτητα ή στυφή γεύση σε σχέση με την παρουσία των υπόλοιπων συστατικών. Η συγκέντρωση των ελεύθερων οργανικών οξέων ποικίλλει στα διάφορα τμήματα της ράγας και βαίνει αυξανόμενη από το φλοιό προς το ενδοκάρπιο, όπου και παίρνει τις μέγιστες τιμές (Lamikanra O. et al., 1995, Σταυρακάκης Μ., Αμπελουργία, 2013). Η υψηλή ή πολύ υψηλή οξύτητα, και μερικές φορές η πολύ χαμηλή οξύτητα όχι μόνο επηρεάζουν την ισορροπία γεύσης, αλλά συχνά καθορίζουν την καταλληλότητα των ποικιλιών οινοποιίας για παραγωγή οίνων.

Η σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων του τρυγικού και του μηλικού οξέος, αλλά και των υπόλοιπων οξέων ποικίλει και μεταβάλλεται ανάλογα με την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης. Ποικιλίες με υψηλή αναλογία τρυγικού προς μηλικό είναι οι πλέον κατάλληλες για την παραγωγή οίνων, ειδικά σε θερμές περιοχές. Το τρυγικό και το μηλικό οξύ αποτελούν το 90% ή και περισσότερο της ολικής οξύτητας. Άλλα οργανικά οξέα που βρίσκονται σε διάφορες αλλά χαμηλές συγκεντρώσεις είναι το κιτρικό οξύ (5-10% της ολικής οξύτητας), το φουμαρικό οξύ, το οξικό οξύ, το γλυκολικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, κ.α..

Την περιεκτικότητα των ραγών σε τρυγικό και μηλικό οξύ επηρεάζουν η ηλιακή ακτινοβολία, η θερμοκρασία και οι καλλιεργητικές επεμβάσεις. Η έκθεση των σταφυλών στο ηλιακό φως προκαλεί αφενός αύξηση της συγκέντρωσης του τρυγικού οξέος και της ογκομετρούμενης οξύτητας σε σχέση με σταφυλές που βρίσκονται στη σκιά και αφετέρου αισθητή μείωση της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος εξαιτίας της ανόδου της θερμοκρασίας, η οποία προκαλεί αύξηση της δραστηρότητας του μηλικού ενζύμου (Σταυρακάκης Μ., Αμπελουργία, 2013). Υψηλές θερμοκρασίες (> 30°C) προκαλούν ταχύτερη μείωση του μηλικού οξέος το οποίο οξειδώνεται ευχερέστερα του τρυγικού οξέος κατά την αναπνοή. Άλλοι μηχανισμοί που οδηγούν στην μείωση της οξύτητας κατά την ωρίμανση είναι i) το αραίωμα αυτών λόγω της αύξησης του όγκου, ii) αύξηση του αναπνευστικού πηλίκου από 1,0 πριν τον περκασμό (υποδηλώνοντας την χρήση των υδατανθράκων ως πηγή ενέργειας) σε 1,4 στην ωρίμανση (υποδηλώνοντας την χρήση των καρβοξυλικών οξέων ως πηγή

ενέργειας), iii) στην αναστολή της σύνθεσής τους και iv) μετατροπή των οξέων σε σάκχαρα (Mullins et al.,1990).

3.1 Το τρυγικό οξύ

Το τρυγικό οξύ αποτελεί ένα ακόμα δείγμα της ιδιαιτερότητας της αμπέλου, αφού οι καλλιεργούμενες ευρωπαϊκές ποικιλίες είναι οι μόνες που συνθέτουν το οξύ αυτό και μάλιστα σε σημαντικές ποσότητες. Το τρυγικό οξύ συντίθενται στα νεαρά φύλλα και στις πράσινες ράγες, οι οποίες περιέχουν υψηλές ποσότητες τρυγικού οξέος, τις υψηλότερες μεταξύ των καλλιεργούμενων ειδών. Από τα δύο ισομερή που παρουσιάζει το τρυγικό οξύ, στις ποικιλίες αμπέλου απαντάται ως L-(+)-στερεοϊσομερές (Σταυρακάκης Μ, Αμπελουργία, 2013).

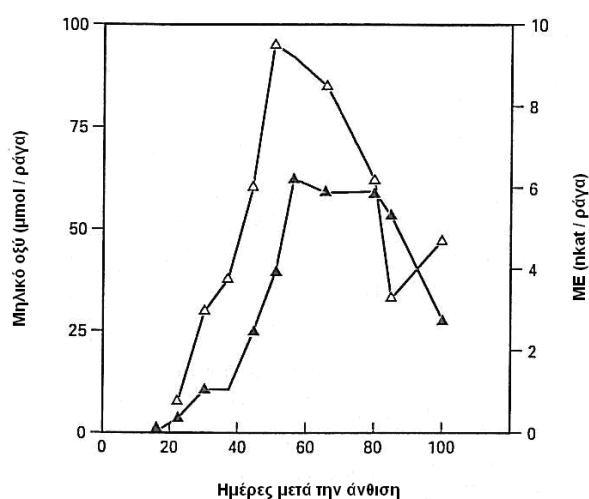
Φαίνεται ότι συντίθεται από την γλυκόζη μέσω των οξέων γαλακτουρονικό, γλυκουρονικό και ασκορβικό. Η συγκέντρωση του τρυγικού οξέος στις ράγες αυξάνει σημαντικά κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων του σταδίου I. Ακολουθεί η περίοδος μείωσης της συγκέντρωσης, ενώ κατά το τέλος των σταδίων I και II αυξάνει σημαντικά, και πριν από το γυάλισμα λαμβάνει μέγιστη τιμή (έντονη κυτταρική διαίρεση) (Kliewer W.M., 1966). Κατά την περίοδο του σταδίου III, η συγκέντρωση του τρυγικού οξέος παρουσιάζει πτωτική τάση λόγω αύξησης της αναπνευστικής δραστηριότητας (Mullins et al.,1990), του όγκου και βάρους της ράγας (Σταυρακάκης Μ, Αμπελουργία, 2013). Ωστόσο, η περιεκτικότητα των ραγών παραμένει αξιοσημείωτα σταθερή, αφού, κατά την περίοδο της ωρίμανσης, ο μεταβολισμός του τρυγικού οξέος είναι βραδύς (Σταυρακάκης Μ, Αμπελουργία, 2013).

Εκτός από την ελεύθερη μορφή, το τρυγικό οξύ απαντά στο γλεύκος με τη μορφή δυσδιάλυτων αλάτων-του όξινου τρυγικού καλίου και του τρυγικού ασβεστίου-αλλά μόνο με την αποδιοργάνωση των κυττάρων και τη θραύση των ραγών στα θλιπτήρια. Παρά την αύξηση της συγκέντρωσης των κυττάρων του φλοιού και του μεσοκαρδίου στα χυμοτόπια λόγω της συνεχιζόμενης εισροής του αλλά και της διάσπασης του ασκορβικού οξέος, το τρυγικό οξύ δε σχηματίζει κρυστάλλους στα ζώντα κύτταρα (Fougere-Rifot et al., 1995).

3.2 Το μηλικό οξύ

Το μηλικό οξύ είναι ασθενέστερο του τρυγικού και συντίθενται στα ώριμα φύλλα και στις πράσινες ράγες ως αποτέλεσμα μιας δευτερογενούς αντίδρασης της φωτοσύνθεσης. Το μηλικό οξύ είναι ένας πολύ ενεργός παράγοντας του μεταβολισμού των ραγών και έχει ένα σημαντικό ρόλο στις αναβολικές αντιδράσεις (στην σκοτεινή φάση της αναγωγής του CO₂, στον καταβολισμό των οξέων κατά τη ανάπτυξη των ραγών κ.α.). Στις ράγες απαντάται ως L-(-)-στερεοϊσομερές και συντίθεται από την γλυκόζη μέσω του πυροσταφυλικού οξέος. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το μηλικό ένζυμο. Κατά τη φάση I, συσσωρεύεται με έντονους ρυθμούς και παρουσιάζει το μέγιστο του λίγο πριν από το γυάλισμα, ενώ κατά τον περκασμό έως τη πλήρη ωρίμανση παρατηρείται σταδιακή μείωση (Mullins et al., 1990).

Οι Mullins et al., (1990) αναφέρουν ότι η μείωση του μηλικού οξέος κατά την ωρίμανση των ραγών φαίνεται ότι οφείλεται στην αποικοδόμηση αυτού είτε από το NADP-συνένζυμο του μηλικού οξέος (τόσο το NADP-συνένζυμο του μηλικού οξέος όσο και το μιτοχονδριακό NAD-ένζυμο του μηλικού οξέος συμμετέχουν στη σύνθεση και αποικοδόμηση του μηλικού οξέος κατά την πορεία ανάπτυξης των ραγών), είτε από την αύξηση της αναπνευστικής δραστηριότητας, είτε τέλος από την δράση της καρβοξυκινάσης του φωσφοενυλοπυροσταφυλικού οξέος. Η μείωση του μηλικού οξέος λόγω της αναπνευστικής δραστηριότητας αυξάνεται από 37% στο στάδιο της πράσινης ράγας, σε 90% στην ωρίμανση.



Επίσης το μηλικό ένζυμο συμμετέχει σημαντικά στην μείωση του μηλικού οξέος, καθώς μέγιστη δραστηριότητά του παρατηρείται όταν η συγκέντρωση του μηλικού οξέος μειώνεται ταχύτατα. Το μηλικό οξύ εντοπίζεται στο κέντρο της ράγας κατά την ανάπτυξη των γιγάρτων ενώ κατά την ωρίμανση εντοπίζεται στους περιφερειακούς ιστούς της ράγας. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της συγκέντρωσης των σακχάρων και της

Εικόνα 7: Αλλαγές του μηλικού οξέος (ανοιχτοί κύκλοι) και του μηλικού ενζύμου (μαύροι κύκλοι) (Matthews et al., 1984) (Πηγή: Mullins et al., 1990)

μείωσης της συγκέντρωσης του μηλικού οξέος (Mullins et al., 1990). Οι Conde et al. (2007) παρατήρησαν ότι η αποικοδόμηση του μηλικού οξέος συμβαίνει παράλληλα με την συσσώρευση των σακχάρων 6-9 εβδομάδες μετά την άνθιση. Το γεγονός αυτό τους οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το μηλικό οξύ είτε μετατρέπεται σε γλυκόζη και φρουκτόζη είτε χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας και υδατανθράκων για την αναπνοή. Οι Ruffner and Hawker (1977) εκτίμησαν ότι ποσοστό σακχάρων λιγότερο από 5% παράγεται μέσω το μηλικού οξέος (Mullins et al., 1990).

3.3 Το ασκορβικό οξύ

Δομικά, η L-AA είναι μία από τις απλούστερες βιταμίνες και σχετίζεται με τα C6 σάκχαρα, που είναι η αλδονο-1,4-λακτόνη ενός εξονικού οξέος (L-γαλακτονικού), και περιέχει μια ομάδα ενοδιόλης στους άνθρακες 2 και 3 (Davey M.W. et al., 2000). Έχουν προταθεί πολλά βιοσυνθετικά μονοπάτια του L-AA, μερικά από τα οποία είναι:

- Βιοσύνθεση του L-AA με βάση τη μετατροπή των παραγώγων της D-γαλακτόζης, δίνοντας έμφαση γύρω από το τελευταίο βήμα, όπου η L-γαλακτονο-1,4-λακτόνη οξειδώνεται σε L-AA από το ένζυμο L-γαλακτονο-1,4-λακτόνης αφυδρογονάση (GLDH)

$$\text{D-Gal} \rightarrow \text{D-GalUA (ester)} \rightarrow \text{L-galactonic acid} \\ \rightarrow \text{L-galactono-1,4-lactone} \rightarrow \text{L-AA}$$
 (Isherwood F.A. et al., 1954).
- Οι Loewus M.W. et al. (1990), πρότειναν μια άλλη βιοσυνθετική οδό από την D-γλυκόζη:

$$\text{D-glucose} \rightarrow \text{D-glucosone} \rightarrow \text{L-sorbosone} \rightarrow \text{L-AA}$$
- Πρόταση ενός νέου μονοπατιού, μέσω της GDP-D-μαννόζης και της GDP-L-γαλακτόζης (Wheeler G.L. et al., 1998).

$$\text{D-Glc} \rightarrow \text{D-Man-1-P} \\ \rightarrow \text{GDP-D-Man} \leftrightarrow \text{GDP-L-Gal} \\ \rightarrow \text{(L-Gal-1-P)} \rightarrow \text{L-Gal} \\ \rightarrow \text{L-galactono-1,4-lactone} \rightarrow \text{L-AA}$$

Λίγα είναι γνωστά για τις διαδικασίες του καταβολισμού L-AA σε φυτά, εκτός από την διάσπαση L-AA ανθρακικού σκελετού που οδηγεί στη παραγωγή tartrate. Το L-AA περιορίζεται σε σύντομο χρονικό διάστημα που συμπίπτει με την άνθηση και καθορίζεται από τη θέση του φύλλου σε σχέση με τους καρπούς. Σε είδη vitaceae, ο σχηματισμός tartrate προκύπτει από τη διάσπαση του δεσμού C4 / C5 του L-AA (Loewus F.A., 1980). Αυτό δημιουργεί ένα L-τρυγικό άλας και ένα θραύσμα C2 που ανακυκλώνεται μέσω των υδατανθράκων, ενδεχομένως ως γλυκοαλδεΐδη. Αυτή η

μετατροπή φαίνεται ότι προχωρά μέσω του 5-κετο-L-ιδικού οξέος (5-keto-L-idonic acid) και αντιπροσωπεύει το πιο πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι (Saito K. and Kasai Z., 1984).

Η συγκέντρωση του L-AA αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της ράγας ώστε να φτάσει στο μέγιστο στο στάδιο πλήρους ωρίμανσης (Cruz-Rus E., et al., 2010). Τα επίπεδα L-AA καθώς και τα ένζυμα αναγέννησης του L-AA είναι ευαίσθητα σε μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών (στρες) παραγόντων. Έχει αποδειχθεί ότι τα φυτά αυξάνουν τα επίπεδα του L-AA ως απάντηση στο υψηλό φως, μια διαδικασία που απαιτεί αρκετές ημέρες. Η ηλικία του φύλλου και η ένταση του φωτός επηρεάζει σαφώς τα επίπεδα ενδογενούς L-AA, με υψηλότερες συγκεντρώσεις να βρίσκονται στους νέους ενεργά αυξανόμενους ιστούς. Είναι ενδιαφέρον ότι, ενώ οι συνθήκες υψηλού φωτισμού έχουν ελάχιστες επιπτώσεις στα επίπεδα του L-AA, η παρουσία χαμηλού φωτισμού μετά, προκαλεί μια παροδική, ταχεία αύξηση στην L-AA, δείχνοντας ότι στην επιστροφή δημιουργείται μια προσωρινή συσσώρευση L-AA (Davey M.W. et al., 2000).

3.4 Οι σχέσεις των οξέων της ομάδας του μηλικού



Εικόνα 8:Βιολογικές σχέσεις των οργανικών οξέων.

Το μηλικό οξύ είναι ένα μονο-υδροξυ-ηλεκτρικό οξύ, τόσο η L- όσο και η D- μορφή του οξέος. Όταν το μηλικό οξύ θερμαίνεται, χάνει νερό και πολλά προϊόντα σχηματίζονται, τα πρώτα από τα οποία είναι το malylic acid και malide. Σε περαιτέρω θέρμανση ένα ή δύο μόρια νερού από κάθε μόριο οξέος χάνονται, σχηματίζοντας μηλεινικό ανυδρίτη και φουμαρικό οξύ. Το μηλεινικό οξύ δεν βρίσκεται στους ζωντανούς ιστούς, αλλά το φουμαρικό οξύ παράγεται ευρέως. Ένα ένζυμο, η φουμαράση, μετατρέπει το φουμαρικό οξύ σε ένα μίγμα ισοροπίας φουμαρικού και μηλικού οξέος και η ίδια ισοροπία επιτυγχάνεται όταν το ένζυμο δρα επί του

μηλικού οξέος μόνο. Το μηλικό οξύ οξειδώνεται εύκολα in vitro και δίνει οξαλικό οξύ (Bennet-Clark T. A, 1933).

Κεφάλαιο 4^ο: Τα φαινολιικά συστατικά της ράγας

4.1 Δομή και κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων της ράγας

Μετά τα σάκχαρα και τα οξέα, οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν πολύ σημαντικά οργανικά συστατικά των ραγών. Αν και αποτελούν μικρό ποσοστό του βάρους των ραγών, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τους χαρακτήρες ποιότητας των σταφυλών και των παραγόμενων οίνων (Ζαχαρόπουλος Χ., 2016). Τα φαινολιικά συστατικά της ράγας είναι είτε μονομερή είτε πολυμερή μόρια και βρίσκονται στο φλοιό, στα γίγαρτα και στη σάρκα. Η περιεκτικότητά τους στα σταφύλια εξαρτάται από την ποικιλία, το περιβάλλον ανάπτυξης των πρέμων, τις καλλιεργητικές τεχνικές και το στάδιο ωριμότητας των σταφυλιών (Di Stefano R. et al., 2008).

Οι ενώσεις αυτές είναι υπεύθυνες για το χρώμα των σταφυλιών και κατά συνέπεια των οίνων, συμμετέχουν στη διαμόρφωση ορισμένων γευστικών χαρακτηριστικών των οίνων όπως η στυφάδα και η τραχύτητα, προσφέρουν στους οίνους αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική προστασία και παίζουν σημαντικό ρόλο στην παλαίωση και στις διάφορες τεχνολογικές κατεργασίες των οίνων (Σουφλερος Ε.Η., 1997). Επιπλέον, συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των οίνων με βάση την παρουσία, την ένταση ή τις αναλογίες ορισμένων από αυτών (Versari A. et al, 2014).

Φαινόλες ονομάζονται τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων που περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια σε αντικατάσταση ισάριθμων υδρογόνων συνδεδεμένων με τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου (Κουράκου - Δραγώνα Σ., 1998). Επομένως το κοινό χαρακτηριστικό τους, είναι η παρουσία ενός αρωματικού δακτυλίου, με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες.

Οι φαινολικές ενώσεις διαίρονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των δακτυλίων φαινόλης που περιέχουν και τα δομικά στοιχεία που προσδένονται σε αυτούς τους δακτυλίους (Balasundram N. et al., 2006). Οι φαινολικές ενώσεις της ράγας χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τα διφαινυλπροπανοειδή (φλαβονοειδείς φαινόλες) και τα φαινυλπροπανοειδή (μη φλαβονοειδείς φαινόλες) (Gomez-Alonso S. et al., 2007). Η ένταση του φωτός και η θερμοκρασία επηρεάζουν

τη σύνθεση των φαινολικών ουσιών ποσοτικά και ποιοτικά, ενώ η δραστηριότητα των ενζυμικών συστημάτων βιοσύνθεσής τους αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας, σε τιμές λίγο χαμηλότερες από την άριστη θερμοκρασία για την ενζυμική δραστηριότητα (>22-25°C) (Σταυρακάκης Μ.Ν. 2013, Ζαχαρόπουλος Χ., 2016).

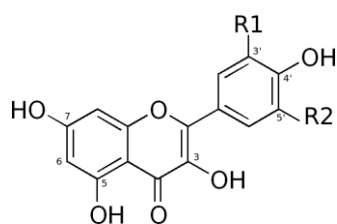
4.2 Φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις

Οι φλαβονοειδείς φαινόλες έχουν βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα (C6-C3-C6) που είναι διατεταγμένοι σε τρεις δακτυλίους με σήμανση Α, Β και C, του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη (Pietta P.G., 2000). Συγκεκριμένα το μόριο τους αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους ενωμένους με πυρυλικό δακτύλιο και μπορεί να είναι ή όχι επίπεδο, ανάλογα με τους δεσμούς των τριών ατόμων άνθρακα του πυρυλίου (Κουράκου - Δραγώνα Σ., 1998). Οι κατηγορίες των φλαβονοειδών φαινολών διαφοροποιούνται από το βαθμό οξειδωσης και υποκατάστασης του C δακτυλίου, ενώ οι ενώσεις της κάθε κατηγορίας διαφοροποιούνται από το βαθμό υποκατάστασης των Α και Β δακτυλίων (Pietta P.G., 2000).

Στην κατηγορία αυτή υπάγονται κυρίως οι φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες (ή κατεχίνες) και οι ανθοκυάνες (Kallithraka S. et al., 2006), καθώς και οι προανθοκυανιδίνες (ή προκυανιδίνες) που είναι ολιγομερή των φλαβανολών και οι ταννίνες που είναι πολυμερή των φλαβανολών. Στη ράγα οι φλαβόνες και φλαβονόλες απαντώνται με την γλυκοσιδιομένη τους μορφή, κατά την οποία το μόριο της φαινόλης είναι ενωμένο με ένα μόριο μονοσακχαρίτη στη θέση 3 του κεντρικού δακτυλίου.

4.2.1 Φλαβόνες-Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες είναι κίτρινες χρωστικές ενώσεις και διαφοροποιούνται μεταξύ τους με βάση την διαφοροποίηση των υποκαταστατών του δακτυλίου C, σε κεμπφερόλη, κερκετίνη και μυρικετίνη (Ribereau-Gayon P. et al., 2006). Μία ακόμα φλαβονόλη που συναντάται συχνά στις ράγες είναι η ρουτίνη η οποία προκύπτει από την ένωση της κερκετίνης με τον δισακχαρίτη ρουτινόζη (Kallithraka S. et al., 2006, Iacopini P. et al., 2008).

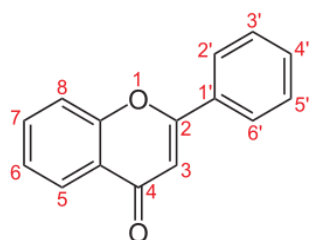


Εικόνα 9: Το μόριο των φλαβονολών

R1	R2	Φλαβονόλη
H	H	Κεμπφερόλη
OH	H	Κερκετίνη
OH	OH	Μυρικετίνη

Εικόνα 10: Το μόριο των μεμονωμένων φλαβονολών

Η περιεκτικότητα της ράγας σε κερκετίνη και μυρικετίνη εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την ποικιλία της αμπέλου (Squadrito M. et al., 2007), ενώ η κεμπφερόλη έχει πάντα μικρότερη περιεκτικότητα. Κάθε ποικιλία παρουσιάζει χαρακτηριστική σύνθεση φλαβονολών (ποιοτικά και ποσοτικά), σε τέτοιο βαθμό που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση των ποικιλιών (Mattivi F. et al., 2006, Masa A. et al., 2007).



Εικόνα 11: Το μόριο των φλαβονών

Φλαβόνη	C3'	C4'	C5'
Απιγενίνη	H	OH	H
Λουτεολίνη	OH	OH	H

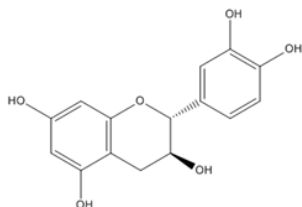
Εικόνα 12: Το μόριο των μεμονωμένων φλαβονών

Εκτός όμως από την ποικιλία και γενικότερα τους γενετικούς παράγοντες η περιεκτικότητα των ραγών σε φλαβονόλες εξαρτάται, επίσης, από το στάδιο ανάπτυξης και διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Terriern et al., 2009). Η βιοσύνθεση των φλαβονολών γίνεται στα στάδια της άνθισης, του περκασμού και κυρίως κατά την διάρκεια ωρίμανσης της σταφυλής που παρουσιάζεται απότομη αύξηση της περιεκτικότητας των φλαβονολών ανά ράγα. Αντίθετα, στα στάδια που η

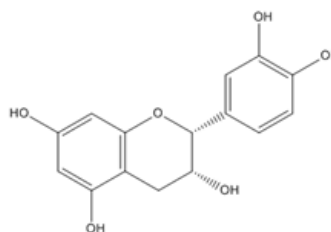
ράγα είναι ακόμα πράσινη η ποσότητα που έχει εντοπιστεί είναι πολύ μικρή (Downey M. et al., 2003). Όσον αφορά τις φλαβόνες, οι πιο κοινά απαντώμενες είναι η λουτεολίνη και απιγενίνη (Pietta P.G., 2000). Σύμφωνα με τους Cheynier V. et al. (1998) ο φλοιός της ράγας μεταξύ των άλλων φαινολικών ενώσεων περιέχει και φλαβόνες.

4.2.2 Φλαβανόλες-Ταννίνες

Οι φλαβανόλες της σταφυλής (ορθότερα φλαβάν-3-όλες καθώς έχουν υδροξυλιωθεί στη θέση 3 του δακτυλίου C) απαντώνται ως μονομερή, oligομερή, αλλά και πολυμερή (Su C., Sigleton V.L., 1969). Η κυριότερη φλαβανόλη στη σταφυλή είναι η κατεχίνη που έχει δύο ασύμμετρα άτομα άνθρακα (C2 και C3), με αποτέλεσμα να δίνει 2 ισομερή trans, τις επονομαζόμενες (+)-κατεχίνες, και 2 ισομερή cis, τις λεγόμενες (-)-επικατεχίνες (Κανελλοπούλου I.A., 2015). Σε μικρότερο βαθμό απαντάται ο γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης [(-)-επικατεχίνη-3-gallate] (Κανελλοπούλου I.A., 2015) και η γαλλοκατεχίνη (Czochanska Z. et al., 1979).



Εικόνα 13:Το μόριο της (+)-κατεχίνης



Εικόνα 14:Το μόριο της (-)-επικατεχίνης

Οι oligομερείς και πολυμερείς ενώσεις των φλαβανολών αποκαλούνται προανθοκυανιδίνες (ή αλλιώς προκυανιδίνες) και ταννίνες αντίστοιχα. Οι προανθοκυανιδίνες διακρίνονται σε δύο τύπους (τον A και B), ανάλογα με το είδος των δεσμών που γίνεται ο πολυμερισμός (Terriern et al., 2009).

Όσον αφορά τις ταννίνες, τα πολυμερή τους εκτός από φλαβανόλες μπορεί να περιέχουν κι άλλες φαινόλες ως δομικές μονάδες. Ο όρος ταννίνες αναφέρεται στην ικανότητα που έχουν να αλληλεπιδρούν ή και να αντιδρούν με πρωτεΐνες και να καθιζάνουν (Terriern et al., 2009). Για να δώσουν σταθερές ενώσεις με τις πρωτεΐνες πρέπει να είναι ογκώδεις, αλλά όχι υπερβολικά διότι στην περίπτωση αυτή ενδέχεται

να μη μπορούν να ενωθούν με τις δραστικές θέσεις των πρωτεϊνών. Επίσης σταθερές ενώσεις μπορούν να δώσουν και με πολυσακχαρίτες (Ribereau-Gayon P. et al., 2006).

Διακρίνουμε δύο κατηγορίες ταννινών, τις συμπυκνωμένες και τις υδρολυόμενες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι συστατικά που σχηματίζονται από μεγάλο βαθμού συμπυκνωμένα προϊόντα των κατεχινών (φλαβαν-3-ολών) και 3,4-φλαβονοδιολών (Ribereau-Gayon P. et al., 2006). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες όταν θερμανθούν και υποστούν κατεργασία με ισχυρά οξέα υδρολύονται στις ερυθρές χρωστικές ανθοκυανιδίνες και γι' αυτό ονομάζονται προανθοκυανιδίνες από μερικούς ερευνητές (Κουράκου - Δραγώνα Σ., 1998, Terriem et al., 2009). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αποτελούν ουσιαστικά το σώμα του οίνου. Αντιπροσωπεύουν το 30-60 % των ολικών φαινολικών παραγώγων και το ποσοστό τους αυξάνεται με την ηλικία του οίνου. Οι αλυσίδες τους σχηματίζουν ένα είδος σκελετού, στον οποίο προστίθενται και άλλα μόρια, όπως πολυσακχαρίτες, ανόργανα στοιχεία ή μόρια νερού (Κουράκου - Δραγώνα Σ., 1998).

Οι υδρολυόμενες ταννίνες -που δεν περιέχονται στη σταφυλή αλλά μόνο στους οίνους- είναι ετερογενή πολυμερή που περιέχουν ένα σάκχαρο και άφθονα μόρια γαλλικού οξέος. Γενικά το μόριο των υδρολυόμενων είναι μικρότερο από ότι των συμπυκνωμένων ταννινών και πιθανώς υδρολύονται ευκολότερα σε σάκχαρο και φαινολικά οξέα (Σουφλέρος E.H., 2000).

Περίπου τα δύο τρίτα της ποσότητας των κατεχινών και προκυανιδινών της σταφυλής συσσωρεύονται στα γίγαρτα (Σταυρακάκης M.N., 2013) σε ποσοστό μέχρι και 56% (Ribereau-Gayon et al., 2006), ενώ στους βοστρύχους και τους φλοιούς απαντώνται σε μικρότερο ποσοστό (20%). Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) είναι μικρότερος του 10 και απαρτίζονται κυρίως από την (+)-κατεχίνη και την (-)-επικατεχίνη και λιγότερο από τον γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης (Kennedy J..A., Jones G.P., 2001, Downey M. et al., 2003, Pastordel Rioj L. et al., 2006). Ως προς τις διμερείς προανθοκυανιδίνες, οι DiStefano και Flamini (2008) αναφέρουν ότι κυριαρχούν αυτές του τύπου B.

Οι ταννίνες φτάνουν μια μέγιστη συγκέντρωση στα γίγαρτα κατά τον περκασμό. Στη συνέχεια μειώνεται σε ένα σχετικά σταθερό επίπεδο μέχρι τα γίγαρτα να ωριμάσουν.

Στους φλοιούς η συγκέντρωση των ταννινών κατά τον περκασμό είναι ήδη υψηλή, φτάνοντας ορισμένες φορές σε αναλογία πάνω από τη μισή συγκέντρωση κατά την ωρίμανση (Ribereau-Gayon P. et al., 2006).

Στους φλοιούς κυριαρχούν οι πολυμερείς ενώσεις των φλαβανολών έναντι των ολιγομερών, ενώ οι μονομερείς κατεχίνες είναι ελάχιστες. Ανάμεσα στις προανθοκυανιδίνες του φλοιού κυρίαρχες είναι η (-)-επικατεχίνη και η (-)-επιγαλλοκατεχίνη (Souquet J.M. et al., 1996, Pastordel Rioj. L. et al., 2006, Σταυρακάκης M.N. 2013) συγκριτικά με το γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης και την (+)-κατεχίνη (Souquet J.M. et al., 1996, Pastordel Rioj.L.et al., 2006), ενώ βρέθηκαν μικρές ποσότητες (+)-γαλλοκατεχίνης (Downey M. et al., 2003). Η αναλογία (-)-επιγαλλοκατεχίνη/(-)-επικατεχίνη στους φλοιούς φαίνεται να εξαρτάται από την ποικιλία της αμπέλου (Di Stefano R. et al., 2008). Επίσης, οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών διαφέρουν από εκείνες των γιγάρτων διότι έχουν χαμηλότερο ποσοστό γαλλικών εστέρων (Rinaldi A. et al., 2014). Η σύνθεση και ο βαθμός πολυμερισμού των προανθοκυανιδινών συνδέονται άμεσα με την ένταση της πικρής γεύσης και την αίσθηση της στυφάδας (Curko N. et al., 2014).

Η σύνθεση των φλαβανολών εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης, τις συνθήκες ανάπτυξης και διάφορους γενετικούς παράγοντες (Kennedy J.A. and Jones G.P., 2001, Downey M. et al., 2003). Ο σχηματισμός των φλαβανολών επηρεάζεται κυρίως από την υπεριώδη ακτινοβολία (Jackson D.I. and Lombard P.B., 1993, Σταυρακάκης M.N. 2013). Έρευνες έχουν δείξει ότι ο γονότυπος της ποικιλίας επιδρά στη σύνθεση των προανθοκυανιδινών και στο βαθμό πολυμερισμού (mDP) των φλοιών και των γιγάρτων (Cosme F. et al., 2009). Αναφορικά με τις ταννίνες και τις προανθοκυανιδίνες, οι υψηλότερες θερμοκρασίες αύξησαν την ποσότητα των προανθοκυανιδινών αλλά δεν είχαν επίδραση στον μέσο βαθμό πολυμερισμού τους (mDP). Αντιθέτως, οι δροσερές θερμοκρασίες ημέρας και η μείωση της διακύμανσης της ημερήσιας θερμοκρασίας μείωσαν την περιεκτικότητα των προανθοκυανιδινών (Cohen et al., 2008).

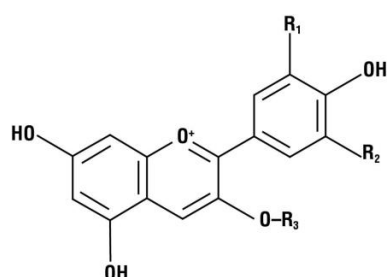
Η έκφραση των γονιδίων που επάγουν τη βιοσύνθεση των συμπυκνωμένων ταννινών στα γίγαρτα γίνεται αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και την καρπόδεση. Ο σχηματισμός των φλαβανολών έχει αυξητική πορεία μέχρι και λίγο χρόνο μετά το

γυάλισμα (Kennedy J.A. et al., 2000). Έπειτα, η συγκέντρωση των μονομερών φλαβονολών μειώνεται απότομα (Romeyer F. et al., 1986, Downey M. et al., 2003), ενώ παρατηρείται μικρή συσσώρευση ολιγομερών προανθοκυανιδινών (Romeyer F. et al., 1986). Κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των γιγάρτων αυξάνει ο πολυμερισμός κι η οξειδωση των ταννινών, και προσδίδουν στα γιγάρτα το κίτρινο-καστανό χρώμα (Kennedy J.A. et al., 2000). Οι Romeyer F. et al. (1986) έδειξαν ότι η κατεχίνη και επικατεχίνη έδειξαν μέγιστη συγκέντρωση κοντά στον περκασμό, και τα διμερή προανθοκυανιδίνης παρουσίασαν αύξηση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των γιγάρτων.

Στους φλοιούς, η σύνθεση των φλαβονολών γίνεται -κυρίως- μερικές βδομάδες μετά την άνθιση (Kennedy J.A. et al., 2001, Downey M. et al., 2003). Η συσσώρευση των προανθοκυανιδινών φαίνεται ότι ολοκληρώνεται πριν το γυάλισμα (Downey M.O. et al., 2006) και στη συνέχεια η συγκέντρωσή τους μειώνεται (Downey M. et al., 2003). Υποστηρίζεται ότι η έκθεση των ραγών στο ηλιακό φως από την καρπόδεση ως την έναρξη ωρίμανσης ενισχύει τον σχηματισμό και τη συσσώρευση των ταννινών στο φλοιό κι αυξάνει τον πολυμερισμό τους. Η αύξηση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική στις ποικιλίες με χαμηλή περιεκτικότητα σε ταννίνες, όμως η έκθεση των σταφυλών στον ήλιο φαίνεται ότι μειώνει τον βαθμό εκχύλισης των ταννινών στη διάρκεια της ωρίμανσης (Downey M.O. et al., 2006). Τέλος, σύμφωνα με τους Kennedy et al. (2000) μετά τον περκασμό έχουμε αύξηση του πολυμερισμού των προανθοκυανιδινών και του μέσου μοριακού βάρους τους.

4.2.3 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες αποτελούν ίσως τη σημαντικότερη κατηγορία των φαινολικών συστατικών της σταφυλής, καθώς είναι οι ερυθρές χρωστικές στις οποίες οφείλουν το πορφυρό, ερυθρό, πορτοκαλί, κυανό ή ιώδες χρώμα τους (Κουράκου - Δραγώνα Σ., 1998) και τις εντοπίζουμε στο φλοιό της ράγας. Εξάιρεση αποτελούν οι «βαφικές» ποικιλίες στις οποίες ανθοκυάνες εντοπίζονται και στη σάρκα.



Εικόνα 15: Η δομή των ανθοκυανιδινών

R_1	R_2	Ανθοκυανιδίνη
OH	H	Κυανιδίνη
OH	OH	Δελφινιδίνη
OCH ₃	H	Παιονιδίνη
OH	OCH ₃	Πετουνιδίνη
OCH ₃	OCH ₃	Μαλβιδίνη
R_3		Μορφή
H		Ανθοκυανιδίνη
Γλυκόζη		3-O-μονογλυκοζίτης

Εικόνα 16: Οι δραστικές ομάδες των μεμονωμένων ανθοκυανιδινών

Τα άγλυκα τμήματα τους λέγονται ανθοκυανιδίνες και έχουν τύπο C6-C3-C6. Έχουν τη βασική δομή του φλαβυλίου, το μόριό τους αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους, που περιβάλλουν ένα δακτύλιο πυρυλίου. Ο Α-δακτύλιος φέρει πάντα δύο φαινολικά -OH στις θέσεις -5 και -7 και ο Β-δακτύλιος ένα φαινολικό -OH στη θέση -4' (Κουράκου - Δραγώνα Σ., 1998, Brouillard R. et al., 2003). Οι κυριότερες ανθοκυανιδίνες που έχουν εντοπισθεί στην άμπελο είναι οι δελφινιδίνη, κυανιδίνη, πετουνιδίνη, παιονιδίνη και μαλβιδίνη. Οι διαφορές μεταξύ τους περιορίζονται στον αριθμό των -OH και -OCH₃ των θέσεων R1 και R2, ο οποίος επηρεάζει τη σταθερότητα και το χρώμα της ανθοκυάνης (Κουράκου- Δραγώνα Σ., 1998). Με την αύξηση των ελεύθερων υδροξυλομάδων αυξάνεται το μπλε χρώμα, ενώ το κόκκινο ενισχύεται ανάλογα με την αύξηση του βαθμού μεθυλίωσης (Jackson R.S., 2008).

Οι ανθοκυάνες που έχουν ταυτοποιηθεί στο φλοιό των σταφυλών και στους οίνους του είδους *Vitis vinifera* είναι οι 3-O-μονογλυκοζίτες και οι 3-O-ακυλομονογλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών. Κατά τα τελευταία στάδια ωρίμανσης της σταφυλής, σχηματίζονται οι εστεροποιημένες μορφές των ανθοκυανών, που είναι

αρκετά διαδεδομένες στη φύση. Σε αυτές τις χρωστικές, το –OH της θέσης 6 του σακχάρου είναι εστεροποιημένο με ένα οργανικό οξύ της αλειφατικής σειράς (π.χ. οξικό οξύ) ή της αρωματικής (π.χ. π-κουμαρικό οξύ) (Mazza G. et al., 1993, Ribereau-Gayón et al., 1999, Castañeda- Ovando et al., 2009).

Οι Alcalde-Eon et al. (2006) αναφέρουν την ύπαρξη ακυλιομένου μορίου ανθοκυάνης με γαλακτικό οξύ σε οίνο που προήλθε από σταφυλές του είδους *Vitis vinifera*, ενώ έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη 3,5-διγλυκοζιτών των ανθοκυανιδινών στους φλοιούς των ραγών ακόμα και σε ποικιλίες *Vitis vinifera* (Baldi A. et al., 1995, Vidal S. et al., 2004, Monagas M. et al., 2009), καθώς μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι οι ανθοκυάνες με μορφή διγλυκοζίτη υπάρχουν μόνο στα «άγρια» είδη του γένους *Vitis*.

Η μαλβιδίνη είναι η κυριότερη ανθοκυανιδίνη στις ερυθρές ποικιλίες. Η ποσότητα των ακυλιομένων ανθοκυανών καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από την ποικιλία και για παράδειγμα μπορεί να απουσιάζουν τελείως από ορισμένες ποικιλίες όπως το Pinot noir (Ribereau-Gayon P. et al., 2006). Η αναλογία των ανθοκυανιδινών, η αναλογία των διαφόρων μορφών των ανθοκυανών, η περιεκτικότητα της κάθε μίας αλλά και του συνόλου τους είναι χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ταξινομικά κριτήρια των ποικιλιών (Roggero J.P. et al., 1986, Ortega Meder M.D. et al., 1994).

Ο σχηματισμός και η συσσώρευση των ανθοκυανών σηματοδοτεί την έναρξη ωρίμανσης των ραγών με την εμφάνιση του χρώματος στο φλοιό των ραγών. Ο χρόνος και ο ρυθμός σύνθεσης και συσσώρευσης τους εξαρτάται από την ποικιλία, την ποσότητα των διαθέσιμων σακχάρων, τη θερμοκρασία, την ηλιακή ακτινοβολία, την υδατική καταπόνηση των πρέμων κ.α. Φαίνεται ότι όταν η συγκέντρωση των σακχάρων στα κύτταρα του φλοιού ανέλθει στα 9 έως 10 °Brix, ενεργοποιούνται τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών (Keller M. et al., 1998). Ο χρόνος αυτός συμπίπτει με την έναρξη απόκτησης της μαλακής υφής της ράγας και της διακοπής του σχηματισμού των φλαβονολών, αλλά δεν αποκλείεται το ερέθισμα να οφείλεται στην παρουσία ABA, η συγκέντρωση του οποίου ενισχύεται από την παρουσία σακχάρων (Peppi M.C. et al., 2006).

Η κατανομή και συγκέντρωση των ανθοκυανών εξαρτάται από την ποικιλία, το βαθμό ωριμότητας, τις κλιματικές συνθήκες, την περιοχή καλλιέργειας και την ποσότητα της παραγωγής (Roggero J.P. et al., 1986, Gonzalez-San Jose M. et al., 1990, Vivas N.G. et al., 2001). Το ερέθισμα προέρχεται κατά κύριο λόγο από το ορατό φάσμα του φωτός (Jackson D.I. and Lombard P.B., 1993, Σταυρακάκης M.N. 2013). Η συγκέντρωση τους επηρεάζεται από τη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας και νύχτας. Ακραίες θερμοκρασίες (άνω των 35°C και κάτω των 15°C) και μεγάλες διαφορές θερμοκρασιών ημέρας/νύχτας μειώνουν τη συγκέντρωση των ανθοκυανών (Jackson D.I., Lombard P.B., 1993, Ribereau-Gayon P. et al., 2006). Έχει διαπιστωθεί σε ελληνικές ποικιλίες ότι η μεν συγκέντρωση των ανθοκυανών ακολουθεί αυξητική πορεία μέχρι τα σταφύλια να φτάσουν σε ένα βαθμό ωριμότητας κι ακολούθως μειώνεται, ενώ η συγκέντρωση των ολικών φαινολών παραμένει πρακτικά σταθερή (Σταυρακάκης M.N. 2013).

A) Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των ανθοκυανών

Το μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των ανθοκυανών είναι ένα γραμμικό μονοπάτι που ξεκινά από το μόριο της φαινυλαλαλίνης και το μαλόνυλ-CoA και καταλήγει στην παραγωγή της γλυκοζυλιωμένης ανθοκυάνης. Εάν δεν υπάρξει κάποια τροποποίηση του B-δακτυλίου του μορίου της ανθοκυάνης, τότε η ανθοκυάνη που παράγεται είναι η πελαργονιδίνη, μέσω υδροξυλίωσης του B-δακτυλίου. Τα ένζυμα που καταλύουν την υδροξυλίωση του B-δακτυλίου, έχουν δράση στις φλαβανόνες ή στις διυδροφλαβονόλες (Menting J.G.T. et al., 1994) και λέγονται 3'-υδροξυλάση των φλαβονοειδών (F3'H) και 3',5'-υδροξυλάσεις (F3'5'H). Η δράση της F3'H έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της κυανιδίνης. Η δράση της F3'5'H παράγει δελφινιδίνη που τείνει περισσότερο προς το κυανό φάσμα (Boss K. et al., 2009).

Άλλες τροποποιήσεις των ανθοκυανών περιλαμβάνουν μεθυλίωση, ακυλίωση και γλυκοζυλίωση (Boss K. et al., 2009). Η μεθυλίωση των ανθοκυανών είναι αναμφίβολα μια σημαντική πλευρά της παραγωγής των ανθοκυανών, δεδομένης της επικράτησης της μαλβιδίνης σε ορισμένες από τις ευρέως καλλιεργούμενες ερυθρές ποικιλίες. Οι ομάδες μεθυλίου μπορεί να προστίθενται (1) στη θέση 3' του B-δακτυλίου της κυανιδίνης για να παραχθεί παιονιδίνη (2) στη θέση 3' του B-

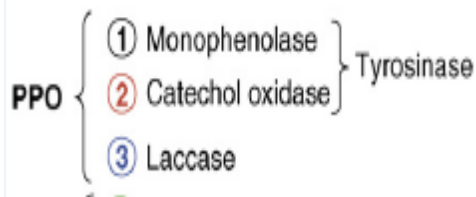
δακτυλίου της δελφινιδίνης προς παραγωγή πετουνιδίνης και (3) στη θέση 3' και 5' του Β-δακτυλίου της δελφινιδίνης προς παραγωγή μαλβιδίνης (Bossip K. et al., 2009).

Η ακυλίωση των ανθοκυανών στα σταφύλια γίνεται με την προσθήκη μιας αλειφατικής ομάδας ακέτυλου ή μιας ομάδας αρωματικού p-κουμαρόυλ (ή περιστασιακά καφεούλ) στη θέση C6 του 3-O-γλυκοζίτη (Mazzuca P. et al., 2005). Φαίνεται ότι αυτές οι τροποποιήσεις αυξάνουν την σταθερότητα του μορίου της ανθοκυάνης κι αλλάζουν την διαλυτότητα τους στο νερό (Strack D. and Wray V., 1994).

Η σύνθεση των ανθοκυανών εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και ακολουθεί η συσσώρευση τους στο χυμοτόπιο των κυττάρων του φλοιού των ερυθρών ποικιλιών αμπέλου. Η πρώτη ανθοκυάνη που σχηματίζεται στους φλοιούς των ερυθρών σταφυλιών είναι η κυανιδίνη, κατά τον περκασμό της ράγας. Στην αρχή αυξάνεται η συγκέντρωσή της στη συνέχεια όμως, λόγω της ασταθούς δομής μετασχηματίζεται ταχέως μέσω ενζυμικών αντιδράσεων στις ανθοκυάνες της δελφινιδίνης και της πετουνιδίνης, οι οποίες με τη σειρά τους ως ασταθείς ενώσεις, μετατρέπονται τελικά στην ανθοκυάνη της παιονιδίνης και της μαλβιδίνης, η οποία είναι η πιο σταθερή απ' όλες και βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό για όλες της ερυθρές ποικιλίες της *Vitis vinifera*. Η μαλβιδίνη και η παιονιδίνη κυριαρχούν μεταξύ των λοιπών ανθοκυανιδινών (κυανιδίνη, δελφινιδίνη και πετουνιδίνη) σε όλες τις έγχρωμες ποικιλίες αμπέλου αλλά και στους παραγόμενους από αυτές οίνους (Σταυρακάκης M.N. 2013).

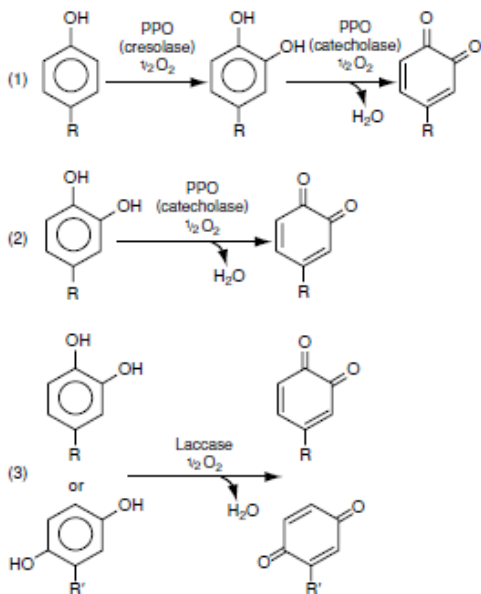
Στις ερυθρές ποικιλίες, οι ανθοκυάνες δείχνουν να συσσωρεύονται στους φλοιούς περίπου δύο εβδομάδες πριν το χρώμα είναι ορατό. Η συγκέντρωση αυξάνει κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, αλλά κατά την πλήρη ωριμότητα φτάνει στο μέγιστο και γενικά μειώνεται (Ribereau-Gayon P. et al., 2006).

4.3 Οι ο-διφαινόλες ως προϊόντα δράσης των πολυφαινολοξειδασών



Εικόνα 17: Οι κατηγορίες των πολυφαινολοξειδασών

Οι ο-διφαινόλες είναι προϊόντα οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων. Οι πολυφαινολοξειδάσες (PPOs) περιλαμβάνουν διαφορετικούς τύπους ενζύμων που περιέχουν χαλκό, όπως η τυροσινάση και η λακκάση.



Εικόνα 18: Οι πολυφαινολοξειδάσες και δράσεις αυτών

Η τυροσινάση αποτελεί συστατικό όλων των σταφυλιών και χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο για να καταλύσει δύο διεργασίες, την υδροξυλίωση των μονοφαινολών στην ορθο-θέση (δραστικότητα μονοφαινολάσης ή κρεσόζης (cresolase activity) και την οξείδωση των ο-διφαινολών σε ο-κινόνες (δραστικότητα διφαινολάσης ή κατεχολικής οξειδάσης (catecholase activity) (Ramsden C.A. and Riley P.A., 2014). Οι κινόνες οδηγούν επίσης σε αντιδράσεις πολυμερισμού και συμπύκνωσης μεταξύ πρωτεϊνών και πολυφαινολών που οδηγούν στο σχηματισμό ανεπιθύμητων καφέ, κόκκινων ή σκούρων χρωστικών (Orenes-Piñero E. et al., 2006, Rolff M. et al., 2011).

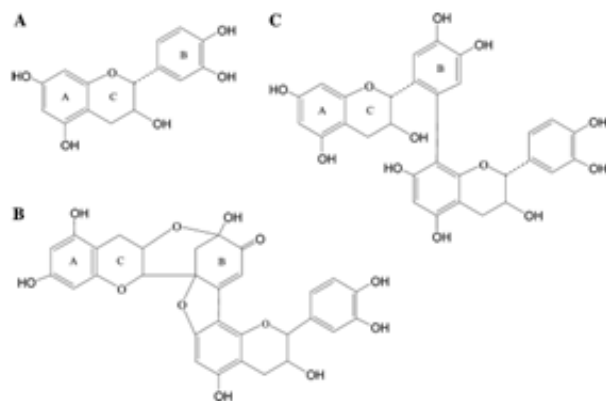
Αυτό το ένζυμο υπάρχει σε όλα τα φυτά (Whitaker J.R., 1972), αλλά η δραστηριότητά του είναι ιδιαίτερα υψηλή στους καρπούς και λαχανικά που περιέχουν σημαντικά επίπεδα φαινολικών ενώσεων, όπως τα σταφύλια (Cantos E. et al., 2002).

Η L-τυροσίνη και η 4-μεθυλοκατεχόλη είναι δύο από τα πιο σημαντικά ενδογενή φαινολικά υποστρώματα για τη τυροσινάση. Η τυροσινάση μετατρέπει την L-τυροσίνη, μια μονοφαινόλη, πρώτα σε L-DOPA (μία ο-διφαινόλη) και αυτή σε ο-ντοπακινόνη, η οποία πολυμερίζεται σχηματίζοντας μελανίνες (De Faria R.O et al., 2007). Οι περισσότερες PPOs των φυτών θεωρούνται ως κατεχολοξειδάσες και καταλύουν μόνο την οξείδωση των ο-διφαινολών (Marusek C.M. et al., 2006).

catechin, chlorogenic acid, catechol, caffeic acid, DOPA, tannins, flavonols, protocatechuic acid, resorcinol, hydroquinone, phenol

Εικόνα 19: Τα κορρότερα υποστρώματα που εννοούν την ενζυματική οξείδωση των σταφυλιών

Αυτό το ένζυμο μπορεί επίσης άμεσα να δράσει στην 4-μεθυλοκατεχόλη (ένα ο-διφαινολικό υπόστρωμα) μόνο με δραστηριότητα της κατεχολάσης. Στην περίπτωση αυτή δεν υπάρχει το πρώτο στάδιο της σύνθεσης μιας ο-διφαινόλης από μία μονοφαινόλη (δραστηριότητα κρεσόζης) (Madani W. et al., 1999).



Εικόνα 20: Η δομή της κατεχίνης (A) και των προϊόντων της οξειδωτικής σύζευξης της κατεχίνης, της διϋδροδιγατεχίνης A (B) και διϋδροδιγατεχίνης B (C)

Σε αντίθεση με την τυροσινάση, οι λακκάσες δεν εμφανίζουν δραστηριότητα μονοφαινολάσης, αλλά οξειδώνουν ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών πολυφαινολών και άλλων ενώσεων (Mayer A.M. and Staples R.C., 2002, Claus H. & Strong P., 2010). Βρίσκονται στα σάπια σταφύλια και οξειδώνουν τις ο-διφαινόλες αλλά και π-διφαινόλες. Βίαιη κατεργασία των σταφυλιών έχει ως αποτέλεσμα εντονότερα φαινόμενα οξείδωσης, καθώς έχουμε μεταφορά των οξειδασών στο γλεύκος.

Κεφάλαιο 5^ο: Οι αντιοξειδωτικές ουσίες της ράγας

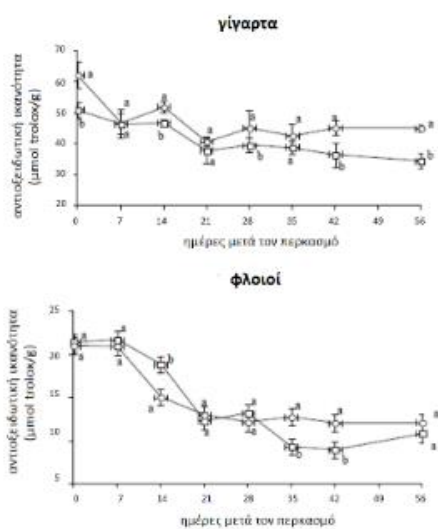
Υπό συνθήκες σοβαρών περιβαλλοντικών πιέσεων, το αναγωγικό ενζυματικό μονοπάτι στους φυτικούς ιστούς μπορεί να επηρεαστεί, καταλήγοντας σε οξειδωτική βλάβη στα συστατικά του κυττάρου συμπεριλαμβανομένης της χλωροφύλλης, των μεμβρανικών λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA, οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο (Bowler C.M. et al., 1992, Dat J. et al., 2000, Molassiotis A. et al., 2006). Κάτω από αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, η απεριόριστη συσσώρευση δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), όπως το απλό οξυγόνο (O_2), το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-), το υπεροξειδίο υδρογόνου (H_2O_2) και η ρίζα υδροξυλίου (OH^-) μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες (Mittler R., 2002, Ahmad P. et al., 2010). Η ανισορροπία της συγκέντρωσης των ROS μεταβάλλει τη ρευστότητα και τη διαπερατότητα της μεμβράνης, οδηγώντας σε μετουσίωση και απενεργοποίηση ορισμένων ενζύμων, αποικοδόμηση ενζύμων και πρωτεϊνών, αποικοδόμηση των χρωστικών και διάσπαση των κλώνων DNA, τα οποία καταλήγουν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Apel K. and Hirt H., 2004, Vacca R.A. et al., 2004). Τα καλύτερα αντιοξειδωτικά είναι τα μόρια τα οποία μπορούν να δώσουν ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο ή άτομο υδρογόνου ώστε να αντιδράσουν με ελεύθερες ρίζες.

Resource	Phenolic compounds
seed	gallic acid, (+)-catechin, epicatechin, dimeric procyanidin, proanthocyanidins
skin	Proanthocyanidins, ellagic acid, myricetin, quercetin, kaempferol, trans-resveratrol
leaf	myricetin, ellagic acid, kaempferol, quercetin, gallic acid
stem	rutin, quercetin 3-O-glucuronide, trans-resveratrol, astilbin
raisin	hydroxycinnamic acid, hydroxymethylfurfural
red wine	malvidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, catechin, quercetin, resveratrol, hydroxycinnamic acid

Τα εκχυλίσματα από γίγαρτα και φλοιούς σταφυλιών περιέχουν φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα, τα οποία αποτελούν ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες (Brewer M.S., 2011). Τα εκχυλίσματα των κορνιορτοποιημένων γιγάρτων εκφράζουν κατά το ήμισυ λιγότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από εκείνη των ολόκληρων γιγάρτων, πράγμα που δείχνει ότι με τη διαδικασία της εκχύλισης του γιγαρτέλαιου καταστρέφονται οι αντιοξειδωτικές ενώσεις. Έχει βρεθεί διαφορετική αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των

διαφορετικών τμημάτων των ραγών (Pastrana-Bonill E. et al., 2003), ενώ έχει προσδιοριστεί μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε φλοιούς και γίγαρτα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, χωρίς ωστόσο να έχει παρατηρηθεί συγκεκριμένο μοτίβο αλλά αναφέρονται διαφορές ανάλογα με την ποικιλία (Jordão and Correia, 2012).

Εικόνα 21: Αντιοξειδωτικές δραστηριότητες των φύλλων, των μερών της ράγας και των προϊόντων των σταφυλών



Εικόνα 22: Αντιοξειδωτική ικανότητα γιγάρτων και φλοιών που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο DPPH κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης για δύο ερυθρές ποικιλίες (O) Tinta Roriz και (□) Touriga Nacional (Πηγή: Jordão and Correia, 2012)

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται κυρίως στις οξειδοαναγωγικές τους ιδιότητες και μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην δέσμευση και εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται περισσότερο στο είδος και τον αριθμό των υποκαταστατών τους παρά στο βασικό σκελετό τους. Η πιο σημαντική παράμετρος αντιοξειδωτικής δράσης είναι ο αριθμός των ελεύθερων υδροξυλίων. Ειδικά τα υδροξύλια του Β δακτυλίου είναι αυτά που συμμετέχουν κυρίως στη δράση των φλαβονοειδών (Rice-Evans et al., 1996, Pannala et al., 2001) γιατί μπορούν να λειτουργήσουν ως δότες κατιόντων υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες. Ο Α δακτύλιος

δεν παίζει σημαντικό ρόλο στη συνολική αντιοξειδωτική δράση. Όσον αφορά το δακτύλιο C, η παρουσία υδροξυλίου στην 3-θέση αυξάνει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών έχει ένα όριο κορεσμού πάνω από το οποίο η ικανότητα αυτή δεν θα μπορούσε να αυξηθεί περαιτέρω με την αύξηση της συγκέντρωσης (Dani C. et al., 2009).

Μεθυλίωση ή γλυκοζυλίωση του υδροξυλίου στην 3-θέση αναστέλλει την αντιοξειδωτική δράση που οφείλεται σε αυτό (Rice – Evans C.A. et al., 1996, Burda S. and Oleszek W., 2001). Αν ο C δακτύλιος είναι ανοικτός ή κλειστός δεν επηρεάζει τη συνολική δράση γιατί και οι χαλκόνες που έχουν ανοικτό C δακτύλιο έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, ενώ η ύπαρξη διπλού δεσμού την αυξάνει (Rice-Evans C.A. et al., 1996, Ratty A. and Das N., 1988). Στη χημική τους δομή οφείλεται ότι είναι πιο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά (in vitro μελέτες) από τις βιταμίνες E και C (Rice–Evans C.A. et al., 1996).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ανθοκυάνες των φυτών και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, συμβάλλουν στην προστασία τους από προσβολές (Castañeda-Ovando et al., 2009). Οι Bagchi et al. (1998) αναφέρουν ότι οι ανθοκυανιδίνες έχουν δείξει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τις βιταμίνες C και E (Castañeda –Ovando A. et al., 2009). Η αντιοξειδωτική τους ιδιότητα έχει αποδοθεί στο άγλυκο μέρος του

μορίου τους, κι αυτό έχει διαπιστωθεί για την κυανιδίνη αλλά και για κάποιους γλυκοζίτες της (Wang H. et al., 1999). Ο αριθμός των υποκατάστατων στην θέση 3 του μορίου, ο βαθμός οξείδωσης του C δακτυλίου, ο βαθμός υδροξυλίωσης και η εστεροποίηση με φαινολικά οξέα, θεωρούνται καθοριστικοί παράγοντες για την εκδήλωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ανθοκυανών (Lapidot T. et al., 1999, Wang H. et al., 1999). Ωστόσο, αναφέρεται ότι η γλυκοζυλίωση της θέσης 3 των ανθοκυανιδινών μειώνει την αντιοξειδωτική δράση του μορίου (Rice-Evans C.A. et al., 1996). Τα πολυμερή της προκυανιδίνης με υψηλότερους βαθμούς πολυμερισμού φαίνεται να έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα (Spranger I. et al., 2008).

Η λιποδιαλυτή βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) και η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C (L-ασκορβικό οξύ) είναι και οι δύο πιο αποτελεσματικές αντιοξειδωτικές βιταμίνες. Η βιολογική σημασία και η αντιοξειδωτική συμπεριφορά του L-AA είναι ότι σε αντίθεση με άλλα αντιοξειδωτικά χαμηλού μοριακού βάρους (α-τοκοφερόλη, ουρικό οξύ, καροτενοειδή, φλαβονοειδή, κ.λπ.), η L-AA είναι σε θέση να τερματίζει τις ριζικές αλυσιδωτές αντιδράσεις με δημιουργία μη τοξικών, μη ριζικών προϊόντων. Επιπλέον, η L-AA, μπορεί να δωρίσει ηλεκτρόνια σε μία ευρεία γκάμα υποστρωμάτων (Davey M.W. et al., 2000).

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 6^ο : Υλικά και Μέθοδοι

6.1 Περιγραφή αμπελώνων



Εικόνα 23: Σχεδίαση πειράματος στον αμπελώνα Μητράκου

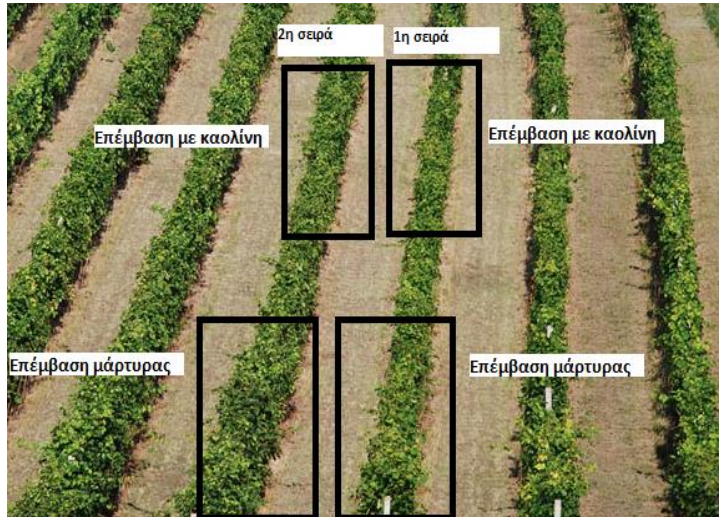
Σκοπός της ερευνητικής εργασίας είναι να διαπιστωθεί η επίδραση της διαφυλλικής εφαρμογής του καολίνη βάσει μετρήσεων συγκεκριμένων χαρακτηριστικών. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 2 διαφορετικούς αμπελώνες. Και οι δύο αμπελώνες βρίσκονται στην ευρύτερη περιοχή της Νεμέας Κορινθίας. Ο πρώτος αμπελώνας βρίσκεται στο χωριό Κούτσι Νεμέας στο κτήμα Μητράκου, σε

υψόμετρο 550 m, και ο δεύτερος στο χωριό Αρχαίας Νεμέας στο κτήμα Παλυβού, σε υψόμετρο 420m. Οι αμπελώνες είναι φυτεμένοι με προσανατολισμό **Borrá-Nότο**. Και στα δύο αμπελοτεμάχια, το υποκείμενο που χρησιμοποιήθηκε είναι το R110, το οποίο έχει καλή προσαρμοστικότητα με την ποικιλία Αγιωργίτικο, είναι ζωηρό υποκείμενο και ανθεκτικό στην ξηρασία. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου του έτους 2018. Οι καλλιεργητικές φροντίδες που έγιναν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου ήταν οι συνήθειες που εφαρμόζονται στην ευρύτερη περιοχή για τη συγκεκριμένη ποικιλία.

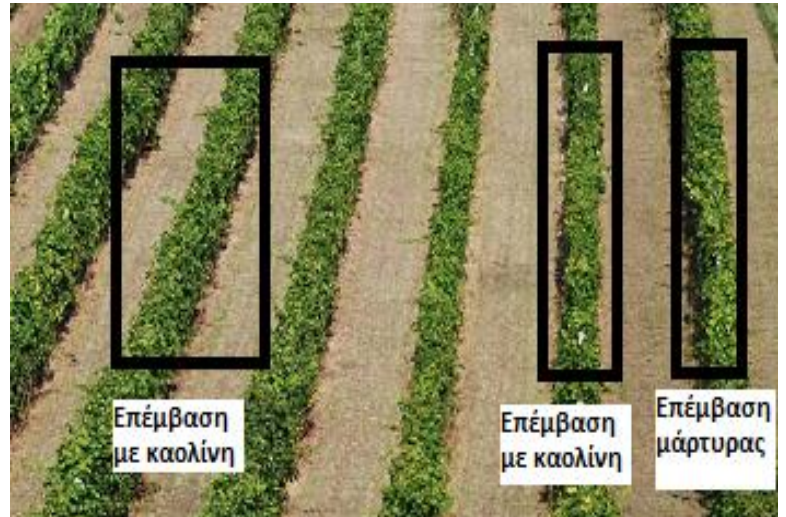
6.2 Σχεδίαση του πειράματος

Το πείραμα διεξήχθη με βάση το εντελώς τυχαίο πειραματικό σχέδιο. Και στα δύο αμπελοτεμάχια πραγματοποιήθηκαν 2 επεμβάσεις (μάρτυρας και εφαρμογή με καολίνη) με 3 επαναλήψεις των 4 πρέμνων. Επιλέχθησαν πρέμνα από 2 σειρές του αμπελοτεμαχίου Μητράκου και 3 σειρές για το αμπελοτεμάχιο Παλυβού. Η ακριβής σχεδίαση του πειράματος φαίνεται σε τυπικά σχεδιαγράμματα των εικόνων 24 και 25 για το αμπελοτεμάχιο Μητράκου και Παλυβού αντίστοιχα. Δώθηκε ιδιαίτερη έμφαση

ώστε η φυλλική επιφάνεια των πρέμνων που δέχτηκαν εφαρμογή με καολίνη να διατηρείται καλυμμένη καθ'όλη τη διάρκεια της βλαστητικής περιόδου.



Εικόνα 24: Σχεδιάγραμμα του πειράματος στον αμπελώνα Μητράκου



Εικόνα 25: Σχεδιάγραμμα του πειράματος στον αμπελώνα Παλυβού



Εικόνα 26: Εμπορικό στέγνωμα καολίνη

Το εμπορικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το *Surround Crop Protectant WP* με δραστική ουσία το *Aluminium silicate 95%*. Η δοσολογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η συνιστώμενη βάσει πάντα της ετικέτας (3kg/στρ). Η συγκεκριμένη δοσολογία εφαρμόστηκε και στα δύο αμπελοτεμάχια. Στη συνέχεια παρατίθενται εικόνες (27-30) από τις επεμβάσεις στον αμπελώνα Μητράκου.



Εικόνα 27: Πρέμνο χωρίς εφαρμογή καολίνη στον αμπελώνα Μητράκου



Εικόνα 28: Πρέμνο με εφαρμογή καολίνη στον αμπελώνα Μητράκου



Εικόνα 29: Φύλλα και σταφυλή με εφαρμογή καολίνη στον αμπελώνα Μητράκου



Εικόνα 30: Φύλλα και σταφυλές χωρίς εφαρμογή καολίνη στον αμπελώνα Μητράκου

6.3 Συλλογή των δειγμάτων-Μετρήσεις

Πέραν της ιδιότητας του καολίνη ως αντιδιαπνευστική ουσία, μελετήθηκε η επίδρασή του τόσο σε συνθήκες σκίασης όσο και σε συνθήκες ηλιοφάνειας. Γι' αυτό το σκοπό, στο αμπελοτεμάχιο Μητράκου συλλέχθηκαν σταφυλές και από τις 2 επεμβάσεις τόσο από τη σκιαζόμενη πλευρά της 1^{ης} σειράς όσο και από τη ηλιαζόμενη πλευρά της 2^{ης} σειράς, όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα της εικόνας 24. Στον αμπελώνα Παλυβού, συλλέχθηκαν σταφυλές από τα πρέμνα και των 2 σειρών όπου εφαρμόστηκε καολίνης και μελετήθηκαν ξεχωριστά (εικόνα 25). Επομένως, **για μελέτη στο εργαστήριο** συλλέχθηκαν από τον αμπελώνα Μητράκου: 5 σταφυλές από τα πρέμνα της σκιαζόμενης πλευράς και ηλιαζόμενης πλευράς αντίστοιχα όπου εφαρμόστηκε καολίνης, 5 σταφυλές από τα πρέμνα-μάρτυρες της σκιαζόμενης και ηλιαζόμενης πλευράς αντίστοιχα (4 επεμβάσεις). Από τον αμπελώνα Παλυβού, συλλέχθηκαν 5 σταφυλές από τα πρέμνα-μάρτυρες και 5 σταφυλές από τα πρέμνα της κάθε σειράς αντίστοιχα όπου εφαρμόστηκε καολίνης (3 επεμβάσεις). Η συλλογή έγινε στο στάδιο της τεχνολογικής ωριμότητας. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε ώστε η δειγματοληψία να γίνει κατά τέτοιο τρόπο που τα αποτελέσματα να είναι όσο γίνεται πιο αντιπροσωπευτικά. Οι σταφυλές συλλέχθηκαν από τους κύριους βλαστούς. Τα δείγματα που συλλέγονταν από κάθε επέμβαση, τοποθετούνταν σε σακούλα στο εξωτερικό της οποίας αναγραφόταν η επέμβαση και η ημερομηνία συλλογής. Η δειγματοληψία έλαβε χώρα κατά τις πρωινές ώρες (08.00-10.00).

Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Αμπελολογίας του Γ.Π.Α όπου ακολούθησαν οι μηχανικές αναλύσεις των σταφυλών και των ραγών και μετρήθηκαν τα ολικά διαλυτά στερεά, η ολική και ενεργή οξύτητα των γλευκών. Ακολούθησε διαχωρισμός των ραγών σε φλοιούς και γίγαρτα για κάθε επέμβαση. Οι φλοιοί και τα γίγαρτα αποξηράθηκαν με την διαδικασία της λυοφυλίσωσης και στη συνέχεια κονιορτοποιήθηκαν σε μύλο. Στη συνέχεια όλα τα δείγματα (φλοιοί, γίγαρτα) διατηρήθηκαν υπό βαθιά κατάψυξη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4 Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας

6.4.1 Βάρος, μήκος και πλάτος σταφυλής

Το βάρος κάθε σταφυλής μετρήθηκε με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Μετρήθηκε το βάρος των σταφυλών κάθε επέμβασης που συλλέχθηκαν και υπολογίστηκε το μέσο βάρος σταφυλής κάθε επέμβασης.

Όσον αφορά το μήκος και πλάτος σταφυλής, η μέτρηση έγινε με ακρίβεια χιλιοστού του μέτρου, από την πρώτη ράγα της σταφυλής μέχρι την τελευταία ράγα της σταφυλής. Για κάθε επέμβαση υπολογίστηκε το μήκος και πλάτος των σταφυλών κάθε επέμβασης που συλλέχθηκαν και εξήχθη το μέσο μήκος και πλάτος σταφυλής κάθε επέμβασης.

6.4.2 Μέσο βάρος, μήκος και πλάτος ράγας

Για τη μέτρηση του βάρους των ραγών χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας. Για τον υπολογισμό του μέσου βάρους των ραγών κάθε επέμβασης έγιναν 3 επαναλήψεις. Συλλέχθηκαν και ζυγίστηκαν 30 ράγες για κάθε επανάληψη και υπολογίστηκε σε μέσο βάρος 100 ραγών κάθε επανάληψης. Στη συνέχεια εξήχθη το μέσο βάρος 100 ραγών της κάθε επέμβασης.



Εικόνα 31: Ψηφιακό Παχύμετρο

Όσον αφορά το μήκος και πλάτος ράγας, η μέτρηση έγινε με παχύμετρο ψηφιακό (βερνιέρος) και η ένδειξη ελήφθη με δύο δεκαδικά ψηφία. Συλλέχθηκαν συνολικά 30 ράγες

από κάθε επέμβαση και εξήχθη το μέσο μήκος και πλάτος ράγας κάθε επέμβασης.

6.4.3 Ποσοστό υγρασίας και ξηράς ουσίας ράγας

Για να υπολογιστεί το ποσοστό υγρασίας και ξηράς ουσίας που περιέχουν οι ράγες, πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε επέμβαση όπου συλλέχθηκαν για κάθε επανάληψη 5 ράγες και υπολογίστηκε το βάρος τους με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο ξηραντήριο και αφέθηκαν για αφυδάτωση για 5 μέρες. Στη συνέχεια, μετά τον πέρασ των 5 ημερών, ξαναζυγίστηκαν και η διαφορά του βάρους πριν και μετά την αποξήρανση έδωσε το ποσοστό υγρασίας που περιέχουν οι ράγες, ενώ το τελικό βάρος των ραγών μετά την αποξήρανση έδωσε το ποσοστό ξηράς ουσίας τους. Στη συνέχεια υπολογίστηκε το ποσοστό υγρασίας και ξηράς ουσίας ραγών κάθε επέμβασης.

6.4.4 Ποσοστό γιγάρτων, φλοιού και σάρκας ράγας

Για να υπολογιστεί το ποσοστό γιγάρτων, φλοιού και σάρκας που περιέχουν οι ράγες, πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε επέμβαση όπου συλλέχθηκαν για κάθε επανάληψη 15 ράγες και ακολούθησε διαχωρισμός των ραγών σε φλοιούς και γιγάρτα. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν ξεχωριστά τα μέρη των ραγών κάθε επανάληψης και εξήχθη το ποσοστό γιγάρτων, φλοιού και σάρκας κάθε επέμβασης.

6.5 Μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών

6.5.1 Μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας (°Brix) με χρήση διαθλασίμετρου



Ο δείκτης διάθλασης του γλεύκους μετριέται με την βοήθεια διαθλασίμετρου και εάν η θερμοκρασία μέτρησης είναι διαφορετική των 20 °C η τιμή διορθώνεται μέσω πίνακα. Αρχικά το διαθλασίμετρο μηδενίζεται.

Το μηδέν του οργάνου ρυθμίζεται με απεσταγμένο νερό και το όριο του διαχωρισμού των δύο ζωνών διαφορετικής φωτεινότητας, πρέπει να βρίσκεται στο μηδέν της κλίμακας. Στη συνέχεια τοποθετούνται δύο σταγόνες του προς εξέταση γλεύκους στην επιφάνεια του σταθερού πρίσματος, κατεβαίνει το κινητό πρίσμα και κατευθύνεται το όργανο προς μια πηγή φωτός. Επίσης στην εν λόγω κλίμακα διακρίνεται μια διαχωριστική γραμμή μεταξύ μίας φωτεινής και μιας σκοτεινής ζώνης. Γίνεται ανάγνωση της ένδειξης εκεί όπου βρίσκεται η διαχωριστική γραμμή. Οι επιφάνειες του πρίσματος, μετά από κάθε μέτρηση, σκουπίζονται με ένα καθαρό πανί. Πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις (επαναλήψεις) και εξήχθη ο μέσος όρος για κάθε επέμβαση.

6.5.2 Μέτρηση ενεργής οξύτητας-pH



Εικόνα 33: Όργανο μέτρησης pH

Ως ενεργή οξύτητα ή pH καλείται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση και δίνουν H^+ . Σε αντίθεση με την ολική οξύτητα, η ενεργή οξύτητα εξαρτάται και από το είδος των οργανικών οξέων διότι π.χ. ο οίνος που περιέχει μια ορισμένη ποσότητα τρυγικού οξέος είναι πιο όξινος από τον οίνο που περιέχει ισόποσο ηλεκτρικό οξύ λόγω του διαφορετικού βαθμού διάστασης των ελεύθερων καρβοξυλομάδων. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η διακύμανση των τιμών του pH εξαρτάται από τη συγκέντρωση των οργανικών οξέων. Το pH του χυμού και του γλεύκους εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του τρυγικού οξέος σε ελεύθερη κατάσταση (είναι το πλέον ισχυρό μεταξύ των οργανικών οξέων της ράγας) και από την παρουσία K^+ , που είναι το κύριο κατιόν του γλεύκους (Σταυρακάκης Μ., Αμπελουργία, 2013).

Βαθμονομείται το όργανο (pH-μετρο) με διαλύματα γνωστού pH. Στη συνέχεια τοποθετείται το δείγμα, που πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία $20^{\circ}C$, σε ποτήρι ζέσεως κι εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο. Λαμβάνεται η ένδειξη του οργάνου με δύο δεκαδικά ψηφία. Πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις και εξήχθη ο μέσος όρος για κάθε επέμβαση.

6.5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής οξύτητας

Αρχή της μεθόδου



Εικόνα 34: Προσδιορισμός ολικής οξύτητας

Η ολική οξύτητα καθορίζεται από το σύνολο των καρβοξυλομάδων και εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα και ανόργανα ανιόντα και κατιόντα. Ο προσδιορισμός βασίζεται στην ογκομέτρηση αλκαλικού διαλύματος (συνήθως NaOH 0,1N) που καταναλώνεται από τα οξέα του γλεύκους μέχρι το pH του δείγματος να φτάσει στην τιμή 7 της κλίμακας του pH. Ως δείκτης για τον καθορισμό του

σημείου εξουδετέρωσης χρησιμοποιείται η φαινολοφθαλεΐνη. Η φαινολοφθαλεΐνη αποτελεί το δείκτη που σηματοδοτεί το τέλος της αντίδρασης, δηλαδή την πλήρη εξουδετέρωση των οξέων του διαλύματος από το NaOH, αλλάζοντας χρώμα σε pH 8,3-10,5. Πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις και εξήχθη ο μέσος όρος για κάθε επέμβαση.

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) κανονικότητας 0,1N.
- Αλκοολικό διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης 10gr/lit (1%). Για την παρασκευή του διαλύματος διαλύονται 10 gr φαινολοφθαλεΐνη σε 1000 ml αλκοόλη 95% vol.

Διαδικασία μέτρησης

Για την διαδικασία της ογκομέτρησης χρησιμοποιείται κωνική φιάλη των 250 ml, στην οποία γίνεται:

- Μεταφορά 10ml γλεύκους
- Προσθήκη 10ml απεσταγμένου νερού
- Προσθήκη 4–5 σταγονών διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης
- Σταδιακή τιτλοδότηση με προσθήκη NaOH 0,1N μέχρι να αλλάξει χρώμα ο δείκτης φαινολοφθαλεΐνης (στις ερυθρές ποικιλίες που ενδιαφέρει για το εν λόγω πείραμα από ερυθρό σε κεραμιδί)

- Σημειώνεται ο όγκος NaOH 0,1 N που χρειάστηκε για την πλήρη εξουδετέρωση των οξέων του δείγματος

Έκφραση αποτελεσμάτων

Έστω n τα καταναλωθέντα mL NaOH 0,1 N. Η ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε meq/L γλεύκους δίνεται από τον τύπο:

$$A = 10 * n \text{ (meq/L γλεύκους)}$$

Ενώ εκφραζόμενη σε gr τρυγικού οξέος/L γλεύκους, δίνεται από τον τύπο:

$$A' = 0,075 * A \text{ (gr τρυγικού οξέος /L γλεύκους)}$$

6.6 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών στους φλοιούς και στα γίγαρτα με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας

6.6.1 Προετοιμασία δειγμάτων

A) Εκχύλιση φλοιών



Εικόνα 35: Ζυγός ακριβείας



Εικόνα 36: Ανάδευση με Turax

Για την εκχύλιση των φλοιών παρασκευάστηκε διάλυμα ακετόνης, μεθανόλης, νερού (σε αναλογία 40:40:19), οξιμισμένο με πυκνό διάλυμα HCl 12M, κατά 1% επί του τελικού όγκου του διαλύματος εκχύλισης. Τα διαλύματα και των τριών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας HPLC. Στη συνέχεια:

- Ζυγίστηκαν 0,4gr φλοιού από κάθε επανάληψη σε ζυγό ακριβείας και αναμείχθηκαν σε 4 ml διαλύματος (αναλογία 1:10).
- Ανάδευση (εικόνα 36) του διαλύματος σε συσκευή Turax στις 8.000 στροφές για 10 δευτερόλεπτα

- Το ομογενοποιημένο διάλυμα εκχυλίστηκε υπό ανάδευση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 25 °C
- Φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 5000 στροφές
- Λήψη του υπερκείμενου (4ml)
- **Επανάληψη της διαδικασίας -2^η φορά-** για το ίζημα από την αρχή, δηλαδή από την προσθήκη 4 ml διαλύματος εκχύλισης
- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρωση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (4ml+4ml=8ml)
- **Επανάληψη της διαδικασίας -3^η φορά-** για το ίζημα από την αρχή
- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρωση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (8ml+4ml=12ml)
- Απόρριψη του ιζήματος
- Τελικός όγκος εκχυλίσματος 12 ml (αναλογία ξηρού βάρους-εκχυλίσματος 1:30)

Ο σκοπός που η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται τρεις φορές συνολικά είναι για να εξασφαλίσουμε ότι στο τελικό διάλυμα θα έχει εκχυλιστεί όλη η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων. Στο τέλος της διαδικασίας υπήρχαν για κάθε επέμβαση τρία διαφορετικά εκχυλίσματα (επανάληψη).

B) Εκχύλιση γιγάρτων



Εικόνα 37: Φυγοκέντρος

Τα γιγάρτα περιέχουν γιγαρτέλαιο (Ristic R., Pland P.G., 2005, Rockenbach I.I. et al., 2011), το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 280 nm. Στο ίδιο μήκος κύματος απορροφούν και οι μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να μη καθίσταται δυνατό να διαχωρισθούν ικανοποιητικά οι ενώσεις στο όργανο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Για αυτό το λόγο πριν τη διαδικασία της εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων, έγινε αφαίρεση του γιγαρτέλαιου από τα κονιορτοποιημένα γιγάρτα με χρήση διαλύματος εξανίου καθαρότητας HPLC, για κάθε επανάληψη, ακολουθώντας την παρακάτω μέθοδο:

- Ζύγισμα 0,4 gr λυοφιλιωμένων και κονιορτοποιημένων γιγάρτων
- Προσθήκη 2 ml εξανίου και ανάδευση
- Φυγοκέντρηση (εικόνα 37) και απόρριψη υπερκείμενου
- **Επανάληψη της διαδικασίας -2^η φορά-** για το ίζημα

Για την εκχύλιση των γιγάρτων παρασκευάστηκε διάλυμα Μεθανόλης-Νερού, αναλογίας 80:19. Το διάλυμα αυτό οξινίστηκε με πυκνό διάλυμα HCl 12M, κατά 1% επί του τελικού όγκου του διαλύματος εκχύλισης. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων από το παραπάνω ίζημα, κάθε επανάληψης:

- Προσθήκη 4 ml διαλύματος εκχύλισης
- Ανάδευση σε συσκευή Turax στις 8.000 στροφές για μερικά δευτερόλεπτα
- Εκχύλιση του ομογενοποιημένου διαλύματος υπό ανάδευση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 25 °C
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 5000 στροφές
- Λήψη του υπερκείμενου (4ml)
- **Επανάληψη της διαδικασίας -2^η φορά-** για το ίζημα από την αρχή, δηλαδή από την προσθήκη 4 ml διαλύματος εκχύλισης
- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (4ml+4ml=8ml)
- **Επανάληψη της διαδικασίας -3^η φορά-** για το ίζημα από την αρχή
- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (8ml+4ml=12ml)
- Απόρριψη του υποκειμένου
- Τελικός όγκος εκχυλίσματος 12 ml (αναλογία ξηρού βάρους-εκχυλίσματος 1:30)

Ο σκοπός που η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται τρεις φορές συνολικά είναι για να εξασφαλίσουμε ότι στο τελικό διάλυμα θα έχει εκχυλιστεί όλη η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων. Στο τέλος της διαδικασίας υπήρχαν για κάθε επέμβαση τρία διαφορετικά εκχυλίσματα (επανάληψη).

Γ) Αραιώση

Εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στους φλοιούς και στα γίγαρτα αποφασίστηκε, κατόπιν δοκιμών, να πραγματοποιηθεί αραιώση των αρχικών εκχυλισμάτων. Η αραιώση που έγινε ήταν 1:40 σε τελικό όγκο διαλύματος 10 ml. Κατά συνέπεια για την παρασκευή του αραιωμένου διαλύματος αραιώθηκαν 0,25ml εκχυλίσματος σε 9,75ml διαλύτη (μεθανόλη) για κάθε εκχύλισμα κάθε επέμβασης. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη καθαρότητας HPLC. Για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν τα προαναφερθέντα αραιωμένα εκχυλίσματα σε όλες τις μεθόδους εκτός από την μέθοδο προσδιορισμού των ολικών φλαβονών και φλαβονολών, των ολικών ανθοκυανών και των ο-διφαινολών. Για τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων, χρησιμοποιήθηκαν τα αρχικά πυκνά εκχυλίσματα, ενώ για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονολών έγινε αραιώση 1:40 για τους φλοιούς και 1:80 για τα γίγαρτα. Επίσης, για τη μέτρηση των αντιοξειδωτικών, έγινε αραιώση 1:80 και 1:160 για τους φλοιούς και τα γίγαρτα αντίστοιχα.

6.6.2 Μέτρηση ολικών ανθοκυανών και φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο Πand

A) Αρχή της μεθόδου

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανών σε φλοιούς και των ολικών φαινολικών ενώσεων σε φλοιούς και γίγαρτα των ραγών αρχικά πρέπει να γίνει εκχύλιση. Μετά την εκχύλιση η μέτρηση των ανθοκυανών γίνεται φασματοφωτομετρικά με μέγιστη απορρόφηση στα 520 nm. Όταν στα 700nm η τιμή είναι μεγαλύτερη του 0,01 ($700\text{nm} > 0,01$), τότε το αποτέλεσμα δεν είναι έγκυρο. Αν μετρηθεί επίσης η απορρόφηση στα 280nm, μετράται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών. Η μέτρηση αυτή μπορεί να μην έχει άμεση συσχέτιση με τις τιμές που προκύπτουν κατά την οινοποίηση αλλά μας παρέχει πληροφορίες για το σύνολο των ολικών φαινολικών στη ράγα (φλοιός, σάρκα, γίγαρτα).

B) Αντιδραστήρια

- Διάλυμα HCl 1M. Για την παρασκευή του διαλύματος αραιώθηκε 1:12 πυκνό HCl 12M σε απιονισμένο νερό.

Γ) Προετοιμασία δειγμάτων-Διαδικασία μέτρησης

Για τη μέτρηση των ολικών ανθοκυανών χρησιμοποιήθηκαν τα πυκνά εκχυλίσματα, ενώ για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών σε φλοιούς και γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα (1:40) που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τα δύο μέρη της ράγας (φλοιοί, γίγαρτα):

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 4000rpm για 10 λεπτά
- Μεταφορά 0,5 ml από το υπερκείμενο σε δοκιμαστικούς σωλήνες
- Προσθήκη 10 ml HCl 1M
- Ανάδευση με vortex
- Παραμονή σε ηρεμία στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες
- Φωτομέτρηση στα 520nm (πλαστική κυψελίδα, λάμπα αλογόνου) και στα 280nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου).

Σε άλλους 2 δοκιμαστικούς σωλήνες αντί για δείγμα προστέθηκε 0,5mL πρότυπου αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών (1:40 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Για τις ολικές ανθοκυάνες χρησιμοποιήθηκε μη αραιωμένο πρότυπο εκχύλισμα φλοιών. Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μηδενισμό του φωτόμετρου, αντίστοιχα.

Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 520nm για τις ανθοκυάνες (πλαστική κυψελίδα, λάμπα αλογόνου) και στα 280nm για τις ολικές φαινολικές ενώσεις (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου) σε φλοιούς και γίγαρτα. Για κάθε επανάληψη παρήχθησαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών ανθοκυανών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η μαλβιδίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (6,25 – 200 ppm). Αντίστοιχα, για τις ολικές φαινολικές ενώσεις κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη με πρότυπη ένωση το γαλλικό οξύ σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (71,87–1150 ppm).

Δ) Υπολογισμοί ολικών ανθοκυανών και ολικών φαινολικών ενώσεων

Ολικές ανθοκυάνες

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα με τελική έκφραση σε mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg μαλβιδίνης / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{520} * 12 * 0,001) / (0,001 * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

όπου %H= ποσοστό υγρασίας

Ολικές φαινολικές ενώσεις

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων εκφράζεται είτε σε γαλλικό οξύ

Έκφραση σε mg γαλλικού οξέος / gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg γαλλικού οξέος / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{280} * 40 * 12 * 0,001) / (0,002 * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg γαλλικού οξέος / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γύγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων εκφράζεται είτε σε γαλλικό οξύ

Έκφραση σε mg γαλλικού οξέος / gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg γαλλικού οξέος / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{280} * 40 * 12 * 0,001) / (0,002 * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg γαλλικού οξέος / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

Για τους φλοιούς και για τα γύγαρτα, το ποσοστό υγρασίας είναι 70% και 30% αντίστοιχα.

6.6.3 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose (μεθυλική κυτταρίνη)

A) Αρχή της μεθόδου

Η μέτρηση συγκέντρωσης συμπυκνωμένων ταννινών με Methyl cellulose είναι ένα μέσο μέτρησης της συγκέντρωσης ταννινών μετά από ομογενοποίηση και εκχύλιση στο κρασί και στα σταφύλια, αλλά και σε άλλα υδατικά διαλύματα (Mercurio M. et al., 2006, Smith P.A., 2005, Sarneckis C. et al., 2006). Η συγκεκριμένη μέθοδος μετράει το σύνολο των ταννινών του δείγματος οίνου ή ράγας. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με άλλα μόρια, όπως η methyl cellulose (μεθυλική κυτταρίνη) και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Το πολυμερές που χρησιμοποιείται είναι η methyl cellulose και ως εκ τούτου, η δοκιμασία μετρά τις ταννίνες που καθιζάνουν με την methyl cellulose, δηλαδή, μετρά την MCP - ταννίνη. Η δοκιμασία βασίζεται στην αφαίρεση των τιμών απορρόφησης στα 280nm των διαλυμάτων με και χωρίς καθίζηση που μετρήθηκαν με την χρήση φασματοφωτομέτρου. Η methyl cellulose δεν απορροφά στα 280nm, και συνεπώς δεν εμποδίζει τις μετρήσεις.

B) Αντιδραστήρια

- Κορεσμένο διάλυμα ammonium sulfate. Η παρασκευή του διαλύματος γίνεται με προσθήκη 300 ml απιονισμένου νερού σε ποτήρι ζέσεως των 500 ml και προστίθενται κρύσταλλοι θειικού αμμωνίου, υπό συνεχή ανάδευση, μέχρι να μην μπορεί να διαλυθεί άλλο. Συνεχίζεται η προσθήκη των κρυστάλλων μέχρι να υπάρχουν στον πάτο κρύσταλλοι θειικού αμμωνίου πάχους 1,5 cm περίπου.
- Διάλυμα methyl cellulose 0,04%. Η παρασκευή του διαλύματος γίνεται με θέρμανση περίπου 300 ml απιονισμένου νερού στους 80 °C και ψύξη περίπου 700 ml απιονισμένου νερού στους 0-5 °C. Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται τα 300 ml

απιονισμένου νερού στους 80 °C και προστίθενται 0,4 gr methyl cellulose μέχρι να διαλυθεί τελείως με συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο 0-5 °C και προστίθεται σιγά σιγά το κρύο νερό, αναδεύοντας το για 20-40 λεπτά. Βγαίνει από το υδατόλουτρο κι αφήνεται υπό ανάδευση για 12 ώρες.

Γ) Προετοιμασία δειγμάτων-Διαδικασία μέτρησης

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα (1:40) που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τα δύο μέρη της ράγας (φλοιοί, γίγαρτα):

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 4000 rpm για 10 λεπτά
- Παίρνουμε 2 πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου (control και treatment):
 - a. control: 1mL αραιωμένου εκχυλίσματος + 2mL ammonium sulfate + H₂O (τελ. V = 10mL). Ανάδευση με vortex και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
 - b. treatment: 1mL αραιωμένου εκχυλίσματος + 3mL methyl cellulose (ανάδευση σε vortex και παραμονή για 2-3 λεπτά) + 2mL ammonium sulfate + H₂O (Vτελ = 10mL). Ανάδευση με vortex και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση για 10min σε 6000rpm.
- Φωτομέτρηση στα 280nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου)

Σε 2 άλλους πλαστικούς σωλήνες αντί για δείγμα προστέθηκε 1 ml πρότυπου αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης για φλοιούς και γίγαρτα, αντίστοιχα (1:40 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μηδενισμό του φωτόμετρου, αντίστοιχα.

Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου). Για κάθε επανάληψη παρήχθησαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους για τα control sample και για τα treatment sample. Υπολογίστηκε η διαφορά των μέσων όρων για κάθε επανάληψη ($A_{280}=A_{CS}-A_{TS}$) και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των συμπυκνωμένων ταννινών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η κατεχίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (7,8125 – 500 ppm).

A) Υπολογισμοί συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των συμπυκνωμένων ταννινών εκφράζεται σε mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{280} * 40 * 12 * 0,001) / (0,011 * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γίγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των συμπυκνωμένων ταννινών εκφράζεται σε mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{280} * 40 * 12 * 0,001) / (0,011 * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

6.6.4 Μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων με τη μέθοδο του Χλωριούχου Αργιλίου ($AlCl_3$)

A) Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου προσδιορισμού των ολικών φλαβονοειδών με το χλωριούχο αργίλιο βασίζεται στο ότι το $AlCl_3$ σχηματίζει σταθερά όξινα σύμπλοκα με την κετονομάδα στη θέση C4 και την υδροξυλική ομάδα είτε της θέσης C3 είτε της θέσης C5 των φλαβονών και φλαβονολών. Επιπρόσθετα, σχηματίζει όξινα, ασταθή,

σύμπλοκα με της όρθο-υδροξυλομάδες των δακτυλίων Α και Β των φλαβονοειδών (Bhaigyabati Th. et al., 2014).

B) Αντιδραστήρια

- Υδατικό διάλυμα NaNO_2 5% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 5 gr NaNO_2 και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml απιονισμένου νερού.
- Υδατικό διάλυμα AlCl_3 10% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 10 gr AlCl_3 και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml απιονισμένου νερού, κάτω από απαγωγό.
- Διάλυμα NaOH 1N

Γ) Προετοιμασία δειγμάτων- Διαδικασία μέτρησης

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα (1:40) που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου. Η διαδικασία αυτή είναι κοινή για τους φλοιούς και τα γίγαρτα. Σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρο:

- Προσθήκη 2 ml απεσταγμένο νερό
- Προσθήκη 0,5 ml αραιωμένου εκχυλίσματος
- Ανάδευση με vortex και προσθήκη 0,15 ml NaNO_2 5% w/v
- Ανάδευση με vortex και μετά από 5 λεπτά προσθήκη 0,15 ml AlCl_3 10% w/v
- Ανάδευση με vortex και μετά από 6 λεπτά προσθήκη 1 ml NaOH 1N
- Ανάδευση με vortex και μετά προσθήκη 1,2ml απεσταγμένο νερό
- Ανάδευση με vortex και μέτρηση των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 510 nm (πλαστική κυψελίδα, λάμπα αλογόνου)

Σε άλλους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες αντί για τα αραιωμένα εκχυλίσματα προστέθηκε 0,5mL αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα (1:40 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη παρήχθησαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη

βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φλαβονοειδών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η κατεχίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (7,8125 – 1000 ppm).

A) Υπολογισμοί ολικών φλαβονοειδών ενώσεων

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονοειδών εκφράζεται σε mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού

- **(A)** Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{510} * 40 * 12 * 0,001) / (0,001 * 0,4)$$

- **(B)** Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γίγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονοειδών εκφράζεται σε mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού

- **(A)** Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{510} * 40 * 12 * 0,001) / (0,001 * 0,4)$$

- **(B)** Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

6.6.5 Μέτρηση των ολικών φλαβονολών με τη μέθοδο της 4-διμεθυλαμμινοκινναμωμική αλδεΰδη (4-DMACA) (Arnous A. et al., 2002)

A) Αρχή της μεθόδου

Οι αλδεΰδες αντιδρούν με τις μ-δифαινόλες προς σχηματισμό ενός έγχρωμου (βαθύ μπλε) ιόντος υπό όξινες συνθήκες. Η αντίδραση έχει αξιοποιηθεί για την εκτίμηση των φλαβονολών καθώς ο δακτύλιος A έχει λειτουργικότητα μ-δифαινόλης (Scalbert A., 1992). Οι Thies and Fischer (1971) πρώτη φορά ανέφεραν το βαθύ μπλε χρωματισμό της 4-DMACA μετά από αντίδραση της με τις κατεχίνες. Μια άλλη ευρύτερα διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό των φλαβονολών είναι αυτή που ως αλδεΰδη χρησιμοποιείται η αρωματική ένωση βανιλίνη. Όμως, η μέθοδος 4-

DMACA έχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της βανιλίνης καθώς παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια και δεν υπάρχει καμία παρεμβολή από τις ανθοκυάνες (Li Y.G. et al., 1996).

B) Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Σκόνη 4-DMACA 100 mg
- Διάλυμα 25% v/v HCl 1N
- Μεθανόλη Καθαρότητας HPLC
- Παρασκευή διαλύματος 4-DMACA 0,1% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού, αναμίχθηκαν 8,5 ml HCl με 91.65 ml μεθανόλης και στη συνέχεια διαλύθηκαν τα 100 mg 4-DMACA υπό συνεχή ανάδευση.

Γ) Προετοιμασία δειγμάτων

Για τους φλοιούς χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα (1:40) που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου. Όμως, επειδή στα γίγαρτα η συγκέντρωση των φλαβονολών είναι αρκετά μεγαλύτερη από τους φλοιούς έγινε μία επιπλέον αραιώση στο ήδη αραιωμένο εκχύλισμα των γιγάρτων, με μεθανόλη καθαρότητας HPLC, σε αναλογία 1:2. Επομένως, η τελική αραιώση των γιγάρτων που χρησιμοποιήθηκε στη μέτρηση αυτή ήταν 1:80.

Δ) Διαδικασία μέτρησης

Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τους φλοιούς και για τα γίγαρτα. Σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:

- Μεταφορά 1 ml διαλύματος 4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde
- Προσθήκη 200 μl αραιωμένου εκχυλίσματος κι έπειτα ανάδευση με vortex
- Παραμονή των δειγμάτων σε ηρεμία για 10 λεπτά
- Μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 640 nm

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για αραιωμένο εκχύλισμα προστέθηκαν 200 μl πρότυπου αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα (1:40 για πρότυπο εκχύλισμα φλοιών και 1:80 για πρότυπο εκχύλισμα γιγάρτων σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη παρήχθησαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φλαβονολών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η κατεχίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (7,8125 – 62,5 ppm).

E) Υπολογισμοί ολικών φλαβονολών

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονολών εκφράζεται σε mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{640} * 40 * 12 * 0,001) / (0,045 * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γίγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονολών εκφράζεται σε mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{640} * 80 * 12 * 0,001) / (0,045 * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

6.6.6 Μέτρηση των ολικών φλαβονών και φλαβονολών με τη μέθοδο του Χλωριούχου Αργιλίου (AlCl_3)

A) Αρχή της μεθόδου-Αντιδραστήρια

Η αρχή της μεθόδου αναφέρεται παραπάνω στη μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Μεθανόλη Καθαρότητας HPLC
- Διάλυμα AlCl_3 5% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 5 gr AlCl_3 και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml μεθανόλης καθαρότητας HPLC, κάτω από απαγωγό.

B) Προετοιμασία δειγμάτων-Διαδικασία μέτρησης

Στη μέτρηση αυτή δεν χρησιμοποιήθηκε το αραιωμένο εκχύλισμα όπως στις υπόλοιπες μετρήσεις, καθώς η συγκέντρωση των φλαβονολών θα ήταν δύσκολα ανιχνεύσιμη. Γι αυτό χρησιμοποιήθηκε κατευθείαν το πυκνό εκχύλισμα.

Σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:

- Μεταφέρθηκαν 0,2 ml εκχυλίσματος
- Προσθήκη 2 ml μεθανόλης και ακολουθεί ανάμιξη
- Προσθήκη 0,1 ml διάλυμα AlCl_3 κι ακολουθεί ανάμιξη
- Προσθήκη 2,7 ml μεθανόλη και ακολουθεί ανάμιξη
- Παραμονή του δείγματος για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ηρεμία
- Μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 425 nm

Σε άλλους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες αντί για πυκνό εκχύλισμα προστέθηκαν 0,2 ml μη αραιωμένου πρότυπου εκχυλίσματος φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη παρήχθηκαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης

καμπύλης των ολικών φλαβονών και φλαβονολών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ενώση η ρουτίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (31,25– 500 ppm).

Γ) Υπολογισμοί ολικών φλαβονών και φλαβονολών

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονών και φλαβονολών εκφράζεται σε mg ρουτίνης / gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg ρουτίνης / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{425} * 12 * 0,001) / (0,002 * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg ρουτίνης / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γύγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονών και φλαβονολών εκφράζεται σε mg ρουτίνης / gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg ρουτίνης / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{425} * 12 * 0,001) / (0,002 * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg ρουτίνης / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

6.6.7 Μέτρηση των ολικών αντιοξειδωτικών με τη μέθοδο FRAP

A) Αρχή της μεθόδου- Αντίδραστήρια

Η μέθοδος FRAP στηρίζεται στο γεγονός ότι σε χαμηλό pH μπορεί να παρακολουθείται η μείωση του συμπλόκου τριπυριδυλ-τριαζίνης (Fe III TPTZ) σιδήρου σε μορφή σιδήρου (που έχει έντονο κυανό χρώμα) με μέτρηση της μεταβολής στην απορρόφηση στα 593 nm. Η αντίδραση δεν είναι ειδική, καθώς οποιαδήποτε αντίδραση που έχει χαμηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής, υπό συνθήκες αντίδρασης, από εκείνη της αντίδρασης ενώσεων σιδήρου, θα προκαλέσει το σχηματισμό ιόντων σιδήρου (FeIII σε FeII). Η αλλαγή στην απορρόφηση

επομένως, σχετίζεται άμεσα με τη συνδυασμένη ή "συνολική" αναγωγική ισχύ των αντιοξειδωτικών ενώσεων που υπάρχουν στο μίγμα αντίδρασης και δίνουν ηλεκτρόνια (Benzie F.F. and Strain J.J., 1999). Παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού συγκέντρωσης 0,3M και pH=3,6 (3,1gr CH₃COONa και 16ml CH₃COOH σε τελικό όγκο 1lt διαλύματος)
- Διάλυμα TPTZ 10mM/lt σε διάλυμα HCl 40mM/lt. Συγκεκριμένα, 0.0312gr TPTZ (C₁₈H₁₂N₆,mr 312.33) (Sigma-Aldrich) διαλύεται σε 10ml 40mM HCl.
- Διάλυμα FeCl₃6H₂O 20mM/lt. Προετοιμάζεται διαλύοντας 0,054gr χλωριούχου σιδήρου (FeCl₃6H₂O, mr 270,3) σε 10ml νερό
- HCl 40mM. Προετοιμάζεται διαλύοντας 0,033ml HCl 37% σε 10ml νερό

Το διάλυμα εργασίας FRAP παρασκευάζεται με ανάμιξη:

- ✓ 25ml ρυθμιστικού διαλύματος
- ✓ 2,5ml διαλύματος TPTZ
- ✓ 2,5ml διαλύματος FeCl₃6H₂O

B) Προετοιμασία δειγμάτων-Διαδικασία μέτρησης

Για τους φλοιούς και τα γύγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου. Όμως, επειδή η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών είναι αρκετά μεγάλη έγινε μία επιπλέον αραιώση στα ήδη αραιωμένα εκχυλίσματα τόσο των φλοιών όσο και των γυγάρτων, με μεθανόλη καθαρότητας HPLC, σε αναλογία 1:2 και 1:4 αντίστοιχα. Επομένως, η τελική αραιώση των αρχικών πυκνών εκχυλισμάτων φλοιών και γυγάρτων που χρησιμοποιήθηκε στη μέτρηση αυτή ήταν 1:80 και 1:160 αντίστοιχα.

Σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:

- Μεταφέρθηκαν 0,1 ml αραιωμένου εκχυλίσματος
- Προσθήκη 1,1ml διαλύματος FRAP και ακολουθεί ανάμιξη με vortex
- Παραμονή του δείγματος για 10 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 37°C
- Μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 593 nm

Σε άλλους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες αντί για αραιωμένο εκχύλισμα προστέθηκε από 0,1 ml αραιωμένου πρότυπου διαλύματος εκχύλισης (1:80 και 1:160 για εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη παρήχθησαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση το trolox σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

Γ) Υπολογισμοί ολικών αντιοξειδωτικών

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονών και φλαβονολών εκφράζεται σε mg trolox / gr νωπού ιστού

- **(A)** Υπολογισμός mg trolox / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{593} * 80 * 12 * 0,001) / (0,0124 * 0,4)$$

- **(B)** Υπολογισμός mg trolox / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γίγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονών και φλαβονολών εκφράζεται σε mg trolox / gr νωπού ιστού

- **(A)** Υπολογισμός mg trolox / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{593} * 160 * 12 * 0,001) / (0,0124 * 0,4)$$

- **(B)** Υπολογισμός mg trolox / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

6.6.8 Μέτρηση των ολικών ο-διφαινολών στο εκχύλισμα

A) Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός των ολικών ο-διφαινολών βασίζεται στη μέθοδο που περιγράφεται από τους Roussos and Pontikis (2001). Μετά από δοκιμές, αποφασίστηκε να γίνει ξεχωριστή μέτρηση διαλυμάτων με και χωρίς προσθήκη $\text{NaMoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Το τελικό αποτέλεσμα βασίστηκε στην αφαίρεση των τιμών απορρόφησης στα 370nm των διαλυμάτων με και χωρίς προσθήκη του παραπάνω αντιδραστηρίου, που μετρήθηκαν με την χρήση φασματοφωτομέτρου.

B) Προετοιμασία δειγμάτων-Διαδικασία μέτρησης

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα πυκνά εκχυλίσματα που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου. Επομένως δεν πραγματοποιήθηκε καμία αραιώση.

- Παίρνουμε 2 πλαστικούς σωλήνες φυγόκεντρου (control και treatment):
 - a) Control: Σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:
 - Σε 900ml απεσταγμένο νερό προστίθεται 100ml εκχυλίσματος του δείγματος και ακολουθεί καλή ανάδευση
 - Προστίθεται 1ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M pH=5,8
 - Ακολουθεί ανάδευση και μετά προστίθεται 2ml απεσταγμένου νερού
 - b) Treatment: Σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:
 - Σε 900ml απεσταγμένο νερό προστίθεται 100ml εκχυλίσματος του δείγματος και ακολουθεί καλή ανάδευση.
 - Προστίθεται 1ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M pH=5,8
 - Ακολουθεί ανάδευση και μετά προστίθεται 2ml 5% w/v $\text{NaMoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - Στη συνέχεια ακολουθεί πάλι ανάδευση και τέλος παραμονή των δειγμάτων σε ηρεμία για 15min πριν τη μέτρηση
 - Μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 370 nm

Σε 2 άλλους πλαστικούς σωλήνες αντί για πυκνό εκχύλισμα προστέθηκε μη αραιωμένο πρότυπο εκχύλισμα φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 370nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου). Για κάθε επανάληψη παρήχθησαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους για τα control sample και για τα treatment sample. Υπολογίστηκε η διαφορά των μέσων όρων για κάθε επανάληψη ($A_{370}=A_{CS}-A_{TS}$) και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ο-διφαινολών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση το καφεϊκό οξύ σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (31,25– 250 ppm).

Γ) Υπολογισμοί ο-διφαινολών

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονών και φλαβονολών εκφράζεται σε mg καφεϊκού οξέος / gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg καφεϊκού οξέος / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{370} * 12 * 0,001) / (0,009 * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg καφεϊκού οξέος / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γίγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονών και φλαβονολών εκφράζεται σε mg καφεϊκού οξέος / gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg καφεϊκού οξέος / gr ξηρού ιστού:

$$(A_{370} * 12 * 0,001) / (0,009 * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg καφεϊκού οξέος / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

6.7 Προσδιορισμός μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων και οξέων με HPLC αντίστροφης φάσης

6.7.1 Αρχή λειτουργίας του οργάνου

Ο όρος χρωματογραφία (chromatography) περιλαμβάνει πλήθος αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται κοινώς στον διαχωρισμό των συστατικών μιγμάτων ουσιών. Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες -συστατικά ενός μίγματος- μέσω μίας στατικής φάσης (static phase). Η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη ή σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση από πορώδες στερεό υλικό ή από υγρό καθλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις. Η αλληλεπίδραση αυτή οφείλεται στις διαφορές των συστατικών του μίγματος σε ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, όπως π.χ. διαφορές στο μέγεθος του μορίου, το φορτίο, την πτητικότητα και τη διαλυτότητα. Στην υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography ή LC) η κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή (Καρκαλούσος Π. et al, 2015).

Στη χρωματογραφία HPLC η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας μέσω χρωματογραφικής στήλης. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και μειώνει το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό. Κατά συνέπεια επιτρέπει τη χρήση στηλών που το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει, είναι μεγαλύτερο γιατί χρησιμοποιείται υλικό πλήρωσης με μικρό μέγεθος σωματιδίων. Ως αποτέλεσμα, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων. Τα δείγματα που αναλύονται με HPLC βρίσκονται αποκλειστικά σε υγρή μορφή (Καρκαλούσος Π. et al, 2015).

Η HPLC έχει δύο μορφές, την HPLC κανονικής φάσης και την HPLC αντίστροφης φάσης που είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή. Σε αυτή, ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων (μη πολικά) σε υδρόφοβη (μη πολική) στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Το

γεγονός ότι η στατική φάση δεν είναι πολική οφείλεται, στις μακριές αλυσίδες υδρογονάνθρακα που είναι προσδεμένες στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού. Τα μη πολικά μόρια στο διαχωριζόμενο δείγμα προσροφούνται ισχυρά στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα, ενώ τα πολικά μόρια κινούνται ταχύτερα διαμέσου της στήλης και εκκλύονται νωρίτερα (Καρκαλούσος Π. et al, 2015). Παρακάτω συνοψίζονται τα στάδια της HPLC:

- i. Καθορισμένη ποσότητα δείγματος «εμβολιάζεται» στην κινητή φάση στην αρχή της στήλης.
- ii. Το δείγμα μετακινείται στη στήλη υπό τη συνεχή ροή της κινητής φάσης.
- iii. Τα επιμέρους συστατικά του δείγματος κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης.
- iv. Το κλάσμα κάθε συστατικού που βρίσκεται στην κινητή φάση μετακινείται υπό τη συνεχή ροή της κινητής φάσης.
- v. Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων κάθε συστατικού εξαρτάται από το κλάσμα του χρόνου παραμονής τους στην κινητή φάση ως προς το χρόνο παραμονή τους στην στατική φάση και είναι ανάλογη του συντελεστή κατανομής του συστατικού στις δύο φάσεις.
- vi. Τα επιμέρους συστατικά, με την προϋπόθεση ότι έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής, μετακινούνται με διαφορετική μέση ταχύτητα μέσα στη στήλη, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται σε ζώνες.
- vii. Τα συστατικά εξέρχονται από τη στήλη και ανιχνεύονται από κατάλληλο ανιχνευτή που βρίσκεται στην έξοδο της στήλης (Καρκαλούσος Π. et al, 2015).

6.7.2 Μέτρηση μεμονομένων ανθοκυανών

A) Αντιδραστήρια κι εξοπλισμός για την HPLC

Για την παρούσα μελέτη ο εξοπλισμός του οργάνου HPLC αποτελείται από:

- αντλία gradient, shimadzu Nexera X2
- στήλη xselect της WatersC₁₈, διαστάσεων 250 x 4,6 mm και διαμέτρου 4.6 μm,
- ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων UV-Vis (PDA)

Η κινητή φάση αποτελείται από τον διαλύτη A (υδατικό διάλυμα 8% v/v μυρμηγκικού οξέος) και τον διαλύτη B (μεθανόλη). Ο ρυθμός ροής είναι 1mL/min με όγκο δείγματος 10μL (αυτόματη έγχυση), ανίχνευση στα 520nm και το πρόγραμμα έκλουσης είναι το εξής:

- 95% διαλύτης A αρχικά (0 min)
- 50% διαλύτης A στο 25 min
- 5% διαλύτη A στο 30 min
- 95% διαλύτη A στο 35 min όπου διατηρήθηκε ισοκρατικά για επιπλέον 5 min.

B) Αντιδραστήρια- Διαδικασία μέτρησης

- Λήψη 0,1ml αρχικού πυκνού εκχυλίσματος φλοιών σε πλαστικό σωλήνα
- Προσθήκη 0,9ml νερό Καθαρότητας HPLC και ανάδευση (τελικός όγκος 1ml / αραιώση 1:10)
- Φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος με φίλτρο 0,2μm και ταυτόχρονη μεταφορά του σε κατάλληλους περιέκτες για αυτόματο δειγματολήπτη
- Τοποθέτηση του περιέκτη στο όργανο της HPLC

Για κάθε επανάληψη πάρθηκε μία μέτρηση στην HPLC, καθώς το όργανο παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιώντας τις πρότυπες καμπύλες, βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων σε κάθε ανθοκυάνη ξεχωριστά. Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών της κάθε ανθοκυάνης, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα νερού καθαρότητας HPLC (όπως και για τα

δείγματα) στα οποία προστέθηκαν κλιμακούμενες συγκεντρώσεις των μονογλυκοζιτών-3 της κάθε ανθοκυάνης.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ταυτοποίηση των ανθοκυανών στα δείγματα βάση των πρότυπων ουσιών των ανθοκυανών, συγκρίνοντας τους χρόνους συγκράτησης (t_R) και το φάσμα απορρόφησης. Οι ανθοκυάνες που ταυτοποιήθηκαν είναι, η δελφινιδίνη, η κυανιδίνη, η μαλβιδίνη, ο κουμαρικός εστέρας και οξικός εστέρας της μαλβιδίνης, η παιονιδίνη και η πετουνιδίνη. Στον πίνακα 1 φαίνεται το ύψος των πρότυπων ουσιών των ανθοκυανών με βάση τις συγκεντρώσεις τους.

Πίνακας 1: Σχέσεις ύψους και συγκεντρώσεων πρότυπων ουσιών των ανθοκυανών

ppm	delfinidin 3 o-glucoside	cyanidin 3 o-glucoside	malvidin 3 o-glucoside	peonidin 3 o-glucoside	petunidin 3 o-glucoside
6,25	16198	14668	13150	32383	13314
12,625	32374	29610	26840	65937	27119
25	64886	58249	51837	128540	53012
50	113887	102155	89573	222345	93111

Γ) Υπολογισμός μεμονωμένων ανθοκυανών

Πίνακας 2: Κλίση πρότυπης καμπύλης των μεμονωμένων ανθοκυανών

ανθοκυάνες	κλίση πρότυπης καμπύλης
δελφινιδίνη	2354
κυανιδίνη	2115
μαλβιδίνη	1864
παιονιδίνη	4623
πετουνιδίνη	1927

Για τον υπολογισμό των ανθοκυανών καταγράφηκε και χρησιμοποιήθηκε το ύψος της καμπύλης της κάθε ανθοκυάνης, καθώς η συγκέντρωση της είναι συνάρτηση του ύψους. Κατά συνέπεια, από την καμπύλη αυτή και μετρώντας το ύψος της κορυφής της άγνωστης ουσίας βρίσκεται η ποσότητά της στο

δείγμα. Στο πίνακα 2 φαίνεται η κλίση της πρότυπης καμπύλης κάθε ανθοκυάνης.

Ο υπολογισμός αυτός γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των μεμονωμένων εκφράζεται σε mg ανθοκυάνης/gr νωπού ιστού:

- (A) Υπολογισμός mg ανθοκυάνης / gr ξηρού ιστού:

$$(Υψος * 10 * 12 * 0,001) / (κλίση πρότυπης καμπύλης * 0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg ανθοκυάνης / gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H * (A)]$$

6.7.3 Μέτρηση μεμονωμένων οξέων

A) Αντιδραστήρια κι εξοπλισμός για την HPLC

Στην περίπτωση της μέτρησης των μεμονωμένων οξέων, ο εξοπλισμός του οργάνου HPLC αποτελείται από:

- Αντλία gradient, shimadzu Nexera X2
- Στήλη xselect της WatersC₁₈, διαστάσεων 250 x 4,6 mm και διαμέτρου 5 μm, που λειτουργεί στους 20 °C, υπό συνθήκες ισοκρατικής (ταχύτητα ροής κινητής φάσης 0,8 mL / min).
- Ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων UV-Vis (PDA)
- Η κινητή φάση αποτελείται από το υδατικό διάλυμα μυρμηγκικού οξέος (0,1%). Ο ρυθμός ροής είναι 0,8 mL / min με όγκο δείγματος 10μL (αυτόματη έγχυση)
- Ανίχνευση στα 210nm

B) Αντιδραστήρια- Διαδικασία μέτρησης

Για τον διαχωρισμό των οργανικών οξέων (τρυγικό, μηλικό, ηλεκτρικό και φουμαρικό οξύ) χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα γλευκών των ραγών τα οποία αραιώθηκαν 1:5 σε 5% μετα-φωσφορικό οξύ. Συγκεκριμένα:

- Λήψη 0,2ml εκχυλίσματος σε πλαστικό σωλήνα
- Προσθήκη 0,8ml μετα-φωσφορικού οξέος και ανάδευση (τελικός όγκος 1ml / αραιώση 1:5)
- Φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος με φίλτρο 0,22μm και ταυτόχρονη μεταφορά του σε κατάλληλους περιέκτες για αυτόματο δειγματολήπτη
- Τοποθέτηση του περιέκτη στο όργανο της HPLC

Για κάθε επανάληψη πάρθηκε μία μέτρηση στην HPLC, καθώς το όργανο παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιώντας τις πρότυπες καμπύλες, βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων σε κάθε οξύ ξεχωριστά. Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών του κάθε οξέος, παρασκευάστηκαν διαλύματα (όπως και για τα δείγματα) μεταφωσφορικού οξέος στα οποία προστέθηκαν κλιμακούμενες συγκεντρώσεις των μεμονωμένων οξέων.

Πίνακας 3: Σχέσεις ύψους και συγκεντρώσεων πρότυπων ουσιών οργανικών οξέων

ppm	ασκορβικό	ηλεκτρικό	μηλικό	τρυγικό	φουμαρικό
100	116686	423518	6594	16345	28469
200	214866	704346	12187	29996	54387
400	410813	995172	25688	65343	114561

Στη συνέχεια, ακολούθησε ταυτοποίηση των οργανικών οξέων στα δείγματα βάση των πρότυπων ουσιών των οξέων, συγκρίνοντας τους χρόνους συγκράτησης (t_R) και το φάσμα απορρόφησης. Τα οξέα

που ταυτοποιήθηκαν είναι ασκορβικό, το ηλεκτρικό, το μηλικό, το τρυγικό και φουμαρικό οξύ. Στον πίνακα 3 φαίνεται το ύψος των πρότυπων ουσιών των οξέων με βάση τις συγκεντρώσεις τους.

Γ) Υπολογισμός μεμονωμένων οξέων

Πίνακας 4: Κλίση πρότυπης καμπύλης των μεμονωμένων οργανικών οξέων

οργανικά οξέα	κλίση πρότυπης καμπύλης
ασκορβικό	1042
ηλεκτρικό	2768
μηλικό	63,67
τρυγικό	160,8
φουμαρικό	283,5

Για τον υπολογισμό των οργανικών οξέων καταγράφηκε και χρησιμοποιήθηκε το ύψος της καμπύλης του κάθε οξέος, καθώς η συγκέντρωσή του είναι συνάρτηση του ύψους. Κατά συνέπεια, από την καμπύλη αυτή και μετρώντας το ύψος της κορυφής της άγνωστης ουσίας βρίσκεται η ποσότητά

της στο δείγμα. Στο πίνακα 4 φαίνεται η κλίση της πρότυπης καμπύλης κάθε οργανικού οξέος.

Ο υπολογισμός αυτός γίνεται σε ένα βήμα και η περιεκτικότητα των μεμονωμένων οξέων εκφράζεται σε μg οργανικού οξέος/ml γλεύκους:

- Υπολογισμός μg οργανικού οξέος / ml γλεύκους
($\text{Υψος} \cdot 5$) / (κλίση πρότυπης καμπύλης)

Κεφάλαιο 7^ο : Αποτελέσματα-Συζήτηση

7.1 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων έγινε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης *Jump 8.0 (SAS Institute Inc)*. Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (Analysis of Variance). Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Student's Test, σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Στην παράθεση των αποτελεσμάτων οι μέσοι όροι ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου υποδηλώνοντας την ύπαρξη ή μη στατιστικά σημαντικής διαφοράς και από το στατιστικό σφάλμα του μέσου. Τα διαγράμματα και οι πίνακες έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος *Excel Microsoft*.

Στο αμπελώνα Μητράκου, όπου αναγράφεται ο αριθμός I αναφέρεται στην σκιαζόμενη πλευρά της 1^{ης} σειράς και όπου II αναφέρεται στη ηλιαζόμενη πλευρά της 2^{ης} σειράς. Στον αμπελώνα Παλυβού, οι επεμβάσεις I και II αναφέρονται στα πρέμνα των δύο σειρών όπου εφαρμόστηκε ο καολίνης.

7.2 Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας

7.2.1 Βάρος, μήκος, πλάτος σταφυλών και ραγών

Πίνακας 5: Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής

Επέμβαση	βάρος σταφυλής (gr)	πλάτος σταφυλής (cm)	μήκος σταφυλής (cm)
Παλυβού μάρτυρας	127 ± 13,32de	7 ± 0,58c	12,5 ± 1,26b
Παλυβού I	118,33 ± 1,33e	7,67 ± 0,17bc	15,33 ± 0,33ab
Παλυβού II	148,67 ± 11,79cde	10,67 ± 0,33a	15,67 ± 0,67ab
Μητράκου καολίνης I	163 ± 8,14cd	8,83 ± 0,17abc	14,33 ± 0,67ab
Μητράκου καολίνης II	265,67 ± 25,65a	10 ± 1ab	15,33 ± 0,67ab
Μητράκου μάρτυρας I	180 ± 6,03bc	8,33 ± 0,33abc	14,67 ± 0,33ab
Μητράκου μάρτυρας II	217,67 ± 4,1b	10,33 ± 0,44a	16,67 ± 0,17a

Από τον πίνακα 5 φαίνεται ότι, όσον αφορά το βάρος σταφυλής, η επέμβαση Μητράκου καολίνης II παρουσιάζει το μεγαλύτερο βάρος σε σχέση με όλες τις άλλες επεμβάσεις και με στατιστικά σημαντική διαφορά (265,67gr). Δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές οι επεμβάσεις Μητράκου μάρτυρας I και II, ενώ η επέμβαση Μητράκου μάρτυρας I δεν διαφέρει επίσης στατιστικά σημαντικά από τις επεμβάσεις Παλυβού II και Μητράκου καολίνης I. Οι επεμβάσεις Παλυβού II, Μητράκου καολίνης I και Παλυβού μάρτυρας δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, ενώ όλες οι επεμβάσεις του Παλυβού δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Η επέμβαση Παλυβού I παρουσιάζει ωστόσο το μικρότερο βάρος σταφυλής (118,33gr).

Όσον αφορά το πλάτος σταφυλής (πίνακας 5), οι επεμβάσεις Παλυβού II και Μητράκου μάρτυρας II δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, αλλά διέφεραν στατιστικά σημαντικά από την επέμβαση Παλυβού μάρτυρας. Οι επεμβάσεις Παλυβού I, Μητράκου καολίνης I και II και Μητράκου μάρτυρας I δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Παλυβού I, Μητράκου καολίνης I και Μητράκου μάρτυρας I δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Τη μεγαλύτερη τιμή έδωσε η επέμβαση Παλυβού II (10,67cm) και τη μικρότερη η επέμβαση Παλυβού μάρτυρας (7cm).

Όσον αφορά το μήκος σταφυλής (πίνακας 5), τη μεγαλύτερη τιμή (16,67cm) έδωσε η επέμβαση Μητράκου μάρτυρας II και τη μικρότερη η επέμβαση Παλυβού μάρτυρας (12,5cm), διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Επιπλέον, οι υπόλοιπες επεμβάσεις δεν διαφέρουν επίσης στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Πίνακας 6: Μηχανικές αναλύσεις ράγας

Επέμβαση	μήκος ράγας (mm)	πλάτος ράγας (mm)	βάρος 100 ραγών (gr)
Παλυβού μάρτυρας	16,05 ± 0,26a	15,02 ± 0,31a	223,3 ± 7,26a
Παλυβού I	15,34 ± 0,26ab	13,96 ± 0,31ab	195 ± 12,58a
Παλυβού II	14,69 ± 0,12bc	14,29 ± 0,16ab	191,67 ± 4,41a
Μητράκου καολίνης I	16,09 ± 0,45a	14,24 ± 0,3ab	200 ± 10,18a
Μητράκου καολίνης II	15,22 ± 0,20ab	13,71 ± 0,16bc	214,44 ± 6,76a
Μητράκου μάρτυρας I	13,94 ± 0,28c	12,62 ± 0,12c	186,8 ± 2a
Μητράκου μάρτυρας II	15,99 ± 0,06a	14,90 ± 0,13a	200 ± 17,64a

Όσον αφορά το μήκος ράγας (πίνακας 6), οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Μητράκου καολίνης I και Μητράκου μάρτυρας II δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τις επεμβάσεις Παλυβού II και Μητράκου μάρτυρας I (η τελευταία παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή, 13,94mm). Οι επεμβάσεις Παλυβού I, Μητράκου καολίνης II και Παλυβού II δεν έχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές, με τη τελευταία να μη διαφέρει στατιστικά σημαντικά ούτε από την επέμβαση Μητράκου μάρτυρας I. Τη μεγαλύτερη τιμή παρουσιάζει η επέμβαση Μητράκου καολίνης I (16.09mm).

Από τον πίνακα 6 φαίνεται ότι, όσον αφορά το πλάτος ράγας, οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας και Μητράκου μάρτυρας II δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με την πρώτη να έχει τη μεγαλύτερη τιμή (15,02mm). Οι επεμβάσεις Παλυβού I, II, Μητράκου καολίνης I και II δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, αν και η τελευταία προαναφερθείσα δε διαφέρει στατιστικά ούτε από τη επέμβαση Μητράκου μάρτυρας I (η οποία παρουσιάζει και τη μικρότερη τιμή- 12,62mm).

Όσον αφορά το βάρος των 100 ραγών (πίνακας 6), όλες οι επεμβάσεις δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Τη μεγαλύτερη τιμή όμως παρουσιάζει η επέμβαση Παλυβού μάρτυρας (223,3gr) και τη μικρότερη η επέμβαση Μητράκου μάρτυρας I (186.8gr).

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι υπάρχει μια θετική επίδραση του καολίνης στο βάρος και το πλάτος της σταφυλής, και μάλιστα η ηλιαζόμενη πλευρά του αμπελώνα Μητράκου παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά το βάρος σταφυλής, ενώ έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα στον αμπελώνα Παλυβού όσον αφορά το πλάτος σταφυλής. Δεν υπήρξε κάποια εξισορροπημένη θετική επίδραση του καολίνης επί του μήκους της σταφυλής σε κανέναν από τους δύο αμπελώνες. Τα θετικά αποτελέσματα του καολίνης συμφωνούν με τους Moutinho-Pereira J. και Dinis L.-T. (2014), οι οποίοι ανέφεραν ότι η εφαρμογή καολίνης μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερη απόδοση ανά φυτό, ιδιαίτερα σε καλλιεργητικές περιόδους χαμηλότερης παραγωγής. Επίσης, τα αποτελέσματα συμφωνούν με τη άποψη ότι η βελτίωση της φυσιολογικής δραστηριότητας των φυτών που έχουν υποστεί κατεργασία με καολίνη έχει θετική επίδραση στην απόδοση, λόγω υψηλότερου βάρους των σταφυλών (Correia C.M. and Dinis L.T., 2014).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι υπήρχε μια αναλογία μήκους και πλάτους ράγας στις περισσότερες επεμβάσεις. Παρατηρείται μια θετική αλλά όχι αξιοσημείωτη (στατιστικά σημαντική) επίδραση του καολίνης στο βάρος και μήκος των ραγών στον αμπελώνα Μητράκου, κυρίως όμως υπάρχει μια μικρή αύξηση του βάρους των ραγών στην ηλιαζόμενη πλευρά όπου έχει εφαρμοστεί καολίνης. Το πλάτος των ραγών δεν φαίνεται να επηρεάστηκε σε κανέναν από τους δύο αμπελώνες. Στον αμπελώνα Παλυβού δεν παρουσιάστηκε κάποια θετική επίδραση του καολίνης επί των παραπάνω χαρακτηριστικών. Τα παραπάνω θετικά αποτελέσματα του καολίνης συμφωνούν με τους *Teerapat. et al. (2014)*, οι οποίοι αναφέρουν ότι ο ψεκασμός με καολίνης έδωσε πολύ σημαντικά υψηλότερες τιμές του βάρους και διαμέτρων των ραγών. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να αποδοθούν στο γεγονός η προσπίπτουσα ηλιακή ακτινοβολία στην ηλιαζόμενη πλευρά ήταν μεγαλύτερη, με θετικά αποτελέσματα λόγω μεγαλύτερης φωτοσύνθεσης και παραγωγής υδατανθράκων. Όσον αφορά τον αμπελώνα Παλυβού, όπου δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή επί των χαρακτηριστικών αυτών, τα αποτελέσματα συμφωνούν με τους *Brillante L. et al. (2016)* οι οποίοι αναφέρουν ότι η χρήση καολίνης δεν επηρέασε το βάρος και τη ποσότητα των ραγών και των σταφυλών.

7.2.2 Ποσοστό υγρασίας και ξηράς ουσίας ραγών

Πίνακας 7: Μέτρηση ποσοστού υγρασίας και ξηράς ουσίας ράγας

Επέμβαση	ποσοστό υγρασίας ράγας (%)	ποσοστό ξηράς ουσίας ράγας (%)
Παλυβού μάρτυρας	73,88 ± 0,55ab	26,12 ± 0,55ab
Παλυβού I	75,88 ± 0,52a	24,12 ± 0,52b
Παλυβού II	74,19 ± 0,92ab	25,81 ± 0,92ab
Μητράκου καολίνης I	68,76 ± 2,55b	31,24 ± 2,55a
Μητράκου καολίνης II	72,1 ± 0,9ab	27,9 ± 0,9ab
Μητράκου μάρτυρας I	72,72 ± 0,23ab	27,28 ± 0,23ab
Μητράκου μάρτυρας II	75,16 ± 0,36a	24,84 ± 0,36b

Όσον αφορά το ποσοστό υγρασίας που περιέχουν οι ράγες, φαίνεται από τον πίνακα 7 ότι οι επεμβάσεις Παλυβού I και Μητράκου μάρτυρας II δεν παρουσιάζουν σημαντικά στατιστικές διαφορές μεταξύ τους, με την πρώτη να έχει το μεγαλύτερο ποσοστό (75,88%). Οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας και Παλυβού II, Μητράκου καολίνης II, Μητράκου μάρτυρας I και Μητράκου καολίνης I δεν έχουν στατιστικά

σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, με τη τελευταία προαναφερθείσα να παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή (68,76%) και διαφέρει στατιστικά σημαντική διαφορά από τις επεμβάσεις Παλυβού Ι και Μητράκου μάρτυρας ΙΙ .

Όσον αφορά το ποσοστό ξηράς ουσίας (πίνακας 7), η επέμβαση Μητράκου καολίνης Ι εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό (31,24%) με σημαντικές στατιστικές διαφορές από τις επεμβάσεις Παλυβού Ι και Μητράκου μάρτυρας ΙΙ (οι οποίες δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους). Οι υπόλοιπες επεμβάσεις δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Το μικρότερο ποσοστό εμφανίζει η επέμβαση Παλυβού Ι (24,12%).

Από τα δεδομένα φαίνεται ότι υπάρχει μια θετική επίδραση του καολίνη όσον αφορά το περιορισμό της απώλειας υγρασίας στον αμπελώνα Παλυβού. Στον αμπελώνα Μητράκου δεν παρατηρείται η ίδια θετική επίδραση. Η θετική επίδραση του καολίνη στον αμπελώνα Παλυβού συμφωνεί με την άποψη ότι ο καολίνης προτείνεται σε πολλές καλλιέργειες για τη μείωση της θερμικής καταπόνησης και έλλειψης νερού, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα χρήσης νερού (WUE) (Elkins R. et al., 2001, Glenn D.M. et al., 2001, Jifon J.L. and Syvertsen J.P., 2003, Shellie K.M. and Glenn D.M., 2008). Ακόμα, τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από τους Shellie K. C. και Bradley A. K. (2013), οι οποίοι παρατήρησαν αυξημένο νωπό βάρος ραγών κάτω από ήπια υδατική καταπόνηση όταν εφαρμόστηκε φιλμ σωματιδίων στο φύλλωμα των πρέμνων στις ποικιλίες Cabernet Sauvignon και Malbec. Έτσι, επιβεβαιώνεται ο ρόλος του καολίνη ως προστατευτικό αντιδιαπνευστικό.

7.2.3 Ποσοστό φλοιού, γιγάρτων και σάρκας ραγών

Πίνακας 8: Μέτρηση ποσοστού φλοιού, γιγάρτων και σάρκας ράγας

Επέμβαση	ποσοτό βάρους φλοιού ράγας (%)	ποσοτό βάρους γιγάρτων ράγας (%)	ποσοστό βάρους σάρκας ράγας (%)
Παλυβού μάρτυρας	25,38 ± 1,02ab	4,06 ± 0,11ab	70,56 ± 1,1b
Παλυβού Ι	22,86 ± 0,31bc	4,42 ± 0,21a	72,72 ± 0,10ab
Παλυβού ΙΙ	24,43 ± 0,72abc	4,64 ± 0,8a	70,93 ± 0,80b
Μητράκου καολίνης Ι	23,49 ± 0,86abc	3,13 ± 0,35b	73,38 ± 0,67ab
Μητράκου καολίνης ΙΙ	21,21 ± 0,16c	2,95 ± 0,4b	75,84 ± 1,22a
Μητράκου μάρτυρας Ι	26,62 ± 0,52a	3,40 ± 0,32ab	69,98 ± 0,76b
Μητράκου μάρτυρας ΙΙ	26,15 ± 0,42ab	3,02 ± 0,99b	70,83 ± 0,51b

Όσον αφορά το ποσοστό βάρους φλοιού ράγας (πίνακας 8), φαίνεται ότι η επέμβαση Μητράκου μάρτυρας I έχει τη μεγαλύτερη τιμή (26,62%) και στατιστικά σημαντικές διαφορές από τις επεμβάσεις Παλυβού I και Μητράκου καολίνης II. Η τελευταία εμφανίζει τη μικρότερη τιμή (21,21%) και δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις επεμβάσεις Παλυβού I και II και Μητράκου καολίνης I, ενώ διαφέρει σημαντικά από τις υπόλοιπες. Τέλος, οι επεμβάσεις Παλυβού I και II, Μητράκου καολίνης I και Μητράκου μάρτυρας II δεν διαφέρουν επίσης στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Όσον αφορά το ποσοστό βάρους γιγάρτων των ραγών (πίνακας 8), οι επεμβάσεις Παλυβού I και II δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με τη δεύτερη προαναφερθείσα να παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό (4,64%), ενώ διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τις επεμβάσεις Μητράκου καολίνης I, II και Μητράκου μάρτυρας II (οι τελευταίες δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους). Οι επεμβάσεις του Παλυβού και αυτή του Μητράκου μάρτυρας I δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, ενώ οι επεμβάσεις Μητράκου και αυτή του Παλυβού μάρτυρας δε διαφέρουν επίσης σημαντικά μεταξύ τους. Η επέμβαση Μητράκου καολίνης II παρουσιάζει το μικρότερο ποσοστό (2,95%).

Όσον αφορά το ποσοστό βάρους σάρκας των ραγών (πίνακας 8), το μεγαλύτερο ποσοστό παρουσιάζει η επέμβαση Μητράκου καολίνης II (75,84%), ενώ διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις επεμβάσεις Μητράκου μάρτυρας I, Μητράκου μάρτυρας II, Παλυβού μάρτυρας και Παλυβού II, ενώ δε διαφέρει από τις υπόλοιπες. Όλες οι επεμβάσεις (πλην της επέμβασης Μητράκου καολίνης II) δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Τη μικρότερη τιμή παρουσιάζει η επέμβαση Μητράκου μάρτυρας I (69,98%).

Μελετώντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων, φαίνεται ότι υπάρχει μια θετική επίδραση του καολίνη μόνο στο ποσοστό σάρκας και γιγάρτων (το τελευταίο αναφέρεται στον αμπελώνα Παλυβού), γεγονός που δείχνει πιθανότητα για μεγαλύτερο ποσοστό γλεύκους και φαινολικών. Δεν παρουσιάστηκε κάποια θετική επίδραση από την εφαρμογή του καολίνη όσον αφορά το ποσοστό φλοιού σε κανέναν από τους δύο αμπελώνες. Ακόμα, παρατηρείται μεγαλύτερο το ποσοστό φλοιού σε σχέση με το ποσοστό γιγάρτων και μάλιστα συμφωνεί με την άποψη ότι η σάρκα (μεσοκάρπιο) αντιστοιχεί στο 56-90% και τα γίγαρτα στο 4-10%, ανάλογα με την ποικιλία (Σταυράκης Μ, Αμπελουργία, 2013).

7.3 Μετρήσεις Γλυκογραφικών Χαρακτηριστικών

Πίνακας 9: Μέτρηση γλυκογραφικών χαρακτηριστικών

Επέμβαση	ολικά διαλυτά στερεά (°brix)	Ενεργή οξύτητα (pH)	ολική οξύτητα (gr tartaric acid/lt γλεύκους)
Παλυβού μάρτυρας	20,8 ± 0,0a	3,74 ± 0,00b	7,13 ± 0,22a
Παλυβού I	19,27 ± 0,59c	3,91 ± 0,00a	7,88 ± 0,22a
Παλυβού II	19,47 ± 0,07bc	3,91 ± 0,00a	5,88 ± 0,45b
Μητράκου καολίνης I	21,2 ± 0,0a	3,73 ± 0,00b	4,13 ± 0,00c
Μητράκου καολίνης II	20,4 ± 0,0ab	3,57 ± 0,00c	5 ± 0,12bc
Μητράκου μάρτυρας I	21 ± 0,12a	3,93 ± 0,04a	3 ± 0d
Μητράκου μάρτυρας II	19,4 ± 0,0bc	3,73 ± 0,00b	4,5 ± 0,0c

Όσον αφορά τα ολικά διαλυτά στερεά (πίνακας 9), οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Μητράκου καολίνης I, II και Μητράκου μάρτυρας I δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, με τη επέμβαση Μητράκου καολίνης I να έχει τη μεγαλύτερη τιμή (21,2 °Brix). Οι προαναφερθείσες επεμβάσεις (πλην αυτής του Μητράκου καολίνης II) διαφέρουν σημαντικά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Οι επεμβάσεις Μητράκου καολίνης II, Μητράκου μάρτυρας II και Παλυβού II δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Οι δύο τελευταίες προαναφερθείσες δε διαφέρουν επίσης στατιστικώς σημαντικά από την επέμβαση Παλυβού I, η οποία παρουσίασε τη μικρότερη τιμή (19,27°Brix).

Όσον αφορά το pH (πίνακας 9), οι επεμβάσεις Παλυβού I, II και Μητράκου μάρτυρας I δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, με τη τελευταία να εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή (3,93), ενώ διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τις υπόλοιπες. Οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Μητράκου καολίνης I και Μητράκου μάρτυρας II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ η επέμβαση Μητράκου καολίνης II διαφέρει απ' όλες τις άλλες επεμβάσεις και παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή (3,57).

Όσον αφορά την ολική οξύτητα (πίνακας 9), οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας και Παλυβού I δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, με τη τελευταία προαναφερθείσα επέμβαση να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή (7,88gr tartaric acid/lt γλεύκους). Οι επεμβάσεις Παλυβού II και Μητράκου καολίνης II δε διαφέρουν

στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, με τη τελευταία προαναφερθείσα να μη διαφέρει στατιστικά σημαντικά ούτε από τις επεμβάσεις Μητράκου καολίνης Ι και Μητράκου μάρτυρας ΙΙ (οι οποίες δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους). Η επέμβαση Μητράκου μάρτυρας Ι παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή (3gr tartaric acid/lit γλεύκους) διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

Ο καολίνης φαίνεται να έχει μια θετική επίδραση όσον αφορά τα ολικά διαλυτά στερεά στον αμπελώνα Μητράκου, χωρίς αξιοσημείωτη διαφορά ανάμεσα σε σκιαζόμενη και ηλιαζόμενη πλευρά (χωρίς επίσης σημαντικά στατιστικές διαφορές από τους μάρτυρες). Αυτή η θετική επίδραση δε φαίνεται να ισχύει και για τον αμπελώνα Παλυβού. Ο καολίνης φαίνεται να έχει θετική επίδραση όσον αφορά την ενεργή οξύτητα (pH) στον αμπελώνα Παλυβού, όμως δεν ισχύει το ίδιο για τον αμπελώνα Μητράκου. Ακόμη, φαίνεται ότι ο καολίνης αύξησε ελάχιστα την ολική οξύτητα και στους δύο αμπελώνες (χωρίς όμως σημαντικά στατιστικές διαφορές από τους μάρτυρες), παρουσιάζοντας ο αμπελώνας Παλυβού μεγαλύτερες τιμές σε σύγκριση με τον αμπελώνα Μητράκου. Ο γλευκογραφικός χαρακτήρας που επηρεάστηκε κυρίως από την εφαρμογή καολίνης είναι το pH.

Επομένως, φαίνεται ότι ο καολίνης προσφέρεται για προϋμηση της παραγωγής καθώς αυξάνονται ουσιαστικά τα σάκχαρα του γλεύκους και το pH, το οποίο αυξάνεται λόγω της μείωσης των οργανικών οξέων (κυρίως του μηλικού) και της αύξησης των κατιόντων (κυρίως K^+), ενώ κατά το τέλος της περιόδου ωρίμανσης, η αύξηση του pH οφείλεται, επί το πλείστον, στη συγκέντρωση των K^+ (Σταυρακάκης Μ., Αμπελοργία, 2013).

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα αποτελέσματα σε μελέτη στη ποικιλία Perlette όπου φάνηκε ότι η χρήση καολίνης αύξησε τα ολικά διαλυτά στερεά, αλλά δεν συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μελέτης ότι ο καολίνης δεν είχε επίδραση επί του pH και της τιτλοδοτημένης οξύτητας (Conde A., 2018). Τα αποτελέσματα επίσης συμφωνούν με τον Σταυρακάκη Μ. (Αμπελογραφία, 2013) ο οποίος αναφέρει ότι στη ποικιλία Αγιωργίτικο, το γλεύκος της ποικιλίας χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (220-240 gr/lit), το pH κυμαίνεται μεταξύ 3,4 και 3,8 και η οξύτητα μεταξύ 4,4-6,4 gr/lit (χαμηλή), αν και σε κάποιες επεμβάσεις παρατηρήθηκαν τόσο υψηλότερες όσο και χαμηλότερες τιμές.

7.4 Μέτρηση μεμονωμένων οξέων

Πίνακας 10: Μέτρηση μεμονωμένων οργανικών οξέων

Επέμβαση	ασκορβικό οξύ ($\mu\text{g/ml}$ γλεύκους)	ηλεκτρικό οξύ ($\mu\text{g/ml}$ γλεύκους)	μηλικό οξύ ($\mu\text{g/ml}$ γλεύκους)	τρυγικό οξύ ($\mu\text{g/ml}$ γλεύκους)	φουμαρικό οξύ ($\mu\text{g/ml}$ γλεύκους)
Παλυβού μάρτυρας	68,6 \pm 1,73b	5,41 \pm 0,27a	1238,55 \pm 30,55c	5763,86 \pm 154,03a	87,23 \pm 8,12a
Παλυβού I	67,35 \pm 1,22b	6,1 \pm 0,85a	3869,30 \pm 174,94a	4457,43 \pm 23,09b	68,62 \pm 22,55ab
Παλυβού II	24,13 \pm 2c	4,63 \pm 0,59a	2281,77 \pm 240,33b	4807,82 \pm 444,68b	86,77 \pm 10,46a
Μητράκου καολίνης I	14,48 \pm 0,59d	4,39 \pm 0,10ab	1053,72 \pm 20,61cd	3113,11 \pm 31,21c	43,20 \pm 0,97ab
Μητράκου καολίνης II	13,99 \pm 0,3d	2,36 \pm 0,49b	503,27 \pm 13,23d	2361,18 \pm 32,92c	23,05 \pm 2,22b
Μητράκου μάρτυρας I	86,77 \pm 1,82a	5,55 \pm 0,16a	1358,25 \pm 153,62c	2861,38 \pm 151,87c	82,6 \pm 0,06a
Μητράκου μάρτυρας II	85,49 \pm 1,81a	3,96 \pm 0,09ab	906,79 \pm 31,16cd	2538,53 \pm 44,32c	56,03 \pm 1,7ab

Όσον αφορά το ασκορβικό οξύ (πίνακας 10), η επέμβαση Μητράκου μάρτυρας I και II δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Η πρώτη από τις προαναφερθείσες παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή (86,77 $\mu\text{g/ml}$ γλεύκους). Οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας και Παλυβού I δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Οι επεμβάσεις Μητράκου καολίνης I και II δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Η επέμβαση Παλυβού II διαφέρει στατιστικώς σημαντικά απ' όλες τις άλλες επεμβάσεις. Η επέμβαση με τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Μητράκου καολίνης II (13,99 $\mu\text{g/ml}$ γλεύκους).

Όσον αφορά το ηλεκτρικό οξύ (πίνακας 10), όλες οι επεμβάσεις του αμπελώνα Παλυβού και Μητράκου, πλην της επέμβασης Μητράκου καολίνης II, δε παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η τελευταία προαναφερθείσα διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από όλες τις επεμβάσεις του αμπελώνα Παλυβού και της επέμβασης Μητράκου μάρτυρας I, ενώ δε διαφέρει από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Παρουσιάζει επίσης και τη μικρότερη τιμή (2,36 $\mu\text{g/ml}$ γλεύκους). Η επέμβαση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος παρουσιάζει αυτή του Παλυβού I (6,1 $\mu\text{g/ml}$ γλεύκους).

Όσον αφορά το μηλικό οξύ (πίνακας 10), η επέμβαση Παλυβού I διαφέρει στατιστικώς σημαντικά απ' όλες τις άλλες επεμβάσεις, έχοντας τη μεγαλύτερη τιμή

(3869,3μg/ml γλεύκους). Η επέμβαση Παλυβού II διαφέρει επίσης στατιστικώς σημαντικά απ'όλες τις άλλες επεμβάσεις. Οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Μητράκου μάρτυρας I, Μητράκου καολίνης I και Μητράκου μάρτυρας II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ οι δύο τελευταίες προαναφερθείσες δε διαφέρουν από την επέμβαση Μητράκου καολίνης II (η οποία παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή, 503,27μg/ml γλεύκους).

Όσον αφορά το τρυγικό οξύ (πίνακας 10), όλες οι επεμβάσεις του αμπελώνα Μητράκου δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν από τις επεμβάσεις του αμπελώνα Παλυβού. Οι επεμβάσεις Παλυβού I και II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τις άλλες επεμβάσεις. Η επέμβαση Παλυβού μάρτυρας διαφέρει στατιστικώς σημαντικά απ' όλες τις άλλες επεμβάσεις, έχοντας τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ (5763,86 μg/ml γλεύκους). Τη μικρότερη τιμή παρουσιάζει η επέμβαση Μητράκου καολίνης II (2361,18 μg/ml γλεύκους).

Όσον αφορά το φουμαρικό οξύ (πίνακας 10), όλες οι επεμβάσεις Μητράκου και Παλυβού δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, πλην της επέμβασης Μητράκου καολίνης II. Η τελευταία προαναφερθείσα δε διαφέρει επίσης στατιστικώς σημαντικά από τις επεμβάσεις Παλυβού I, Μητράκου καολίνης I και Μητράκου μάρτυρας II και παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή (23,05 μg/ml γλεύκους). Τη μεγαλύτερη τιμή εμφανίζει η επέμβαση Παλυβού μάρτυρας (87,23 μg/ml γλεύκους).

Το τρυγικό και μηλικό οξύ βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα υπόλοιπα οξέα, κάτι που συμφωνεί με τον Σταυρακάκη Μ. (Αμπελουργία, 2013) ο οποίος αναφέρει ότι αποτελούν το 90% ή και περισσότερο της ολικής οξύτητας. Το ηλεκτρικό και φουμαρικό οξύ παρουσιάζουν μικρότερες συγκεντρώσεις από το μηλικό, πιθανόν επειδή αποτελούν οξέα της ομάδας του μηλικού (Bennet-Clark T. A, 1933). Το ασκορβικό οξύ (L-AA), μέσω της διάσπασης του δεσμού C4 / C5, μετατρέπεται σε τρυγικό οξύ (Cruz-Rus E., et al., 2010), δίνοντας μια πιθανή εξήγηση γιατί παρουσιάζει μικρότερες συγκεντρώσεις από το τρυγικό στην παρούσα μελέτη.

Οι επεμβάσεις στον αμπελώνα Παλυβού παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές τρυγικού και μηλικού οξέος σε σχέση με τον αμπελώνα Μητράκου, ενώ οι σκιαζόμενες

πλευρές (τόσο η επέμβαση με καολίνη όσο και ο μάρτυρας) στον αμπελώνα Μητράκου παρουσίασαν υψηλότερες τιμές ως προς όλα τα οξέα. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η περιεκτικότητα όλων των οργανικών οξέων ήταν μικρότερη στην ηλιαζόμενη πλευρά όπου είχε γίνει εφαρμογή με καολίνη.

Στον αμπελώνα Παλυβού επηρεάστηκαν θετικά οι επεμβάσεις που είχαν δεχθεί εφαρμογή με καολίνη ως προς το μηλικό οξύ. Το τρυγικό οξύ δε φαίνεται να επηρεάστηκε από την εφαρμογή του καολίνη σε κανέναν από τους δύο αμπελώνες, παρουσιάζοντας ωστόσο υψηλότερη τιμή στη σκιαζόμενη πλευρά που δέχτηκε εφαρμογή με καολίνη στον αμπελώνα Μητράκου (χωρίς σημαντικά στατιστικές διαφορές από τις υπόλοιπες επεμβάσεις). Τα παραπάνω συμφωνούν με τον Conde A. (2018) ο οποίος παρατήρησε ότι η εφαρμογή του καολίνη στα πρέμνα αυξάνει τη συγκέντρωση των οργανικών οξέων.

Όσον αφορά το ασκορβικό οξύ, δε φαίνεται να επηρεάστηκε θετικά η συγκέντρωσή του από την εφαρμογή καολίνη ιδιαίτερα στον αμπελώνα Μητράκου, όπου ο μάρτυρας και στις δύο πλευρές (ηλιαζουσα και σκιαζόμενη) παρουσιάζει υψηλότερες τιμές από την επέμβαση που δέχτηκαν εφαρμογή καολίνη (τόσο σε ηλιαζουσα και σκιαζόμενη πλευρά). Τα αποτελέσματά μας δε συμφωνούν με τους Conde A. et al. (2015) οι οποίοι αναφέρουν ότι οι ώριμες σταφυλές που είχαν δεχθεί εφαρμογή καολίνη περιείχαν υψηλότερες ποσότητες βιταμίνης C. Η μικρότερη περιεκτικότητα των ραγών σε ασκορβικό οξύ στη επέμβαση με καολίνη σε σχέση με τον μάρτυρα μπορεί να αποδοθεί ίσως στο γεγονός ότι, τα φυτά αυξάνουν τα επίπεδα του L-ασκορβικού οξέος ως απάντηση στο υψηλό φως (Davey M.W. et al., 2000). Έτσι, πιθανολογείται ότι ο καολίνης λειτούργησε ως αντιστρεσογόνος παράγοντας ενάντια στις αντίξοες καλοκαιρινές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Μελετώντας το ηλεκτρικό οξύ, φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκε ιδιαίτερα η συγκέντρωσή του από την εφαρμογή καολίνη σε κανέναν από τους δύο αμπελώνες. Μια μικρή αύξηση παρατηρήθηκε στην επέμβαση με καολίνη στον αμπελώνα Παλυβού (Παλυβού Ι). Τέλος, η εφαρμογή καολίνη φαίνεται ότι επίσης δεν επηρέασε τη συγκέντρωση του φουμαρικού οξέος σε κανέναν από τους δύο αμπελώνες.

7.5 Μέτρηση ολικών και μεμονωμένων ανθοκυανών

Πίνακας 11: Μέτρηση ολικών και μεμονωμένων ανθοκυανών

Επέμβαση	ολικές ανθοκυάνες (mg malvidin/g νωπού ιστού)	δελφινιδίνη (mg delphinidin/g νωπού ιστού)	κυανιδίνη (mg cyanidin/g νωπού ιστού)	μαλβιδίνη (mg malvidin/g νωπού ιστού)
Παλυβού μάρτυρας	4,33 ± 0,09c	0,043 ± 0,0012b	0,019 ± 0,001a	0,85 ± 0,021c
Παλυβού I	2,97 ± 0,05d	0,019 ± 0,004b	0,007 ± 0,002b	0,65 ± 0,315c
Παλυβού II	4,45 ± 0,07c	0,033 ± 0,001b	0,013 ± 0,001ab	0,86 ± 0,021c
Μητράκου καολίνης I	5,18 ± 0,19b	0,089 ± 0,058a	0,017 ± 0,001a	1,42 ± 0,112ab
Μητράκου καολίνης II	7,42 ± 0,05a	0,079 ± 0,0169a	0,013 ± 0,001ab	1,56 ± 0,259a
Μητράκου μάρτυρας I	5,24 ± 0,02b	0,039 ± 0,002b	0,009 ± 0,001b	0,98 ± 0,035bc
Μητράκου μάρτυρας II	4,6 ± 0,06c	0,036 ± 0,001b	0,01 ± 0,001b	0,88 ± 0,031c

Όσον αφορά τη συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανών στις ράγες (πίνακας 11), φαίνεται ότι οι επεμβάσεις Μητράκου καολίνης I και Μητράκου μάρτυρας I δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, διαφέροντας όμως σημαντικά από τις άλλες επεμβάσεις. Η επέμβαση με τη μεγαλύτερη τιμή (7,42 mg malvidin/g νωπού ιστού) και παρουσιάζοντας στατιστικώς σημαντικές διαφορές από τις άλλες επεμβάσεις είναι αυτή του Μητράκου καολίνης II. Οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Παλυβού II και Μητράκου μάρτυρας II δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, διαφέροντας όμως σημαντικά από τις άλλες επεμβάσεις. Τέλος, η επέμβαση με τη μικρότερη τιμή και με στατιστικώς σημαντικές διαφορές από τις άλλες επεμβάσεις είναι αυτή του Παλυβού I (2,97 mg malvidin/g νωπού ιστού).

Όσον αφορά τη περιεκτικότητα των φλοιών των ραγών σε δελφινιδίνη (πίνακας 11), όλες οι επεμβάσεις δε διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους, πλην των επεμβάσεων Μητράκου καολίνης I και II. Οι τελευταίες προαναφερθείσες δε διαφέρουν μεταξύ τους, και μάλιστα η επέμβαση Μητράκου καολίνης I παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή (0,089 mg delphinidin/g νωπού ιστού). Η επέμβαση με τη μικρότερη περιεκτικότητα σε δελφινιδίνη είναι η επέμβαση Παλυβού I (0,019 mg delphinidin/g νωπού ιστού).

Όσον αφορά τη περιεκτικότητα των φλοιών των ραγών σε κυανιδίνη (πίνακας 11), οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Μητράκου καολίνης I, Παλυβού II και Μητράκου καολίνης II δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Οι δύο

τελευταίες προαναφερθείσες όμως επεμβάσεις δε διαφέρουν σημαντικά από τις επεμβάσεις Παλυβού I, Μητράκου μάρτυρας I και II. Η επέμβαση με τη μεγαλύτερη και μικρότερη τιμή είναι αυτή του Παλυβού μάρτυρας (0,019 mg cyanidin/g νωπού ιστού) και Παλυβού I (0,007 mg cyanidin/g νωπού ιστού), αντίστοιχα.

Όσον αφορά τη περιεκτικότητα των φλοιών των ραγών σε μαλβιδίνη (πίνακας 11), όλες οι επεμβάσεις του αμπελώνα Παλυβού, και οι επεμβάσεις Μητράκου μάρτυρας I και II δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ η επέμβαση Παλυβού I έχει τη μικρότερη τιμή (0,65 mg malvidin/g νωπού ιστού). Οι επεμβάσεις Μητράκου καολίνης I και II δε παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ η επέμβαση Μητράκου καολίνης I δε διαφέρει σημαντικά ούτε από την επέμβαση Μητράκου μάρτυρας I. Τέλος, η επέμβαση με στατιστικώς σημαντικές διαφορές απ' όλες τις επεμβάσεις και με τη μεγαλύτερη τιμή (1,56 mg malvidin/g νωπού ιστού) είναι αυτή του Μητράκου καολίνης II.

Πίνακας 12: Μέτρηση μεμονωμένων ανθοζωανών

Επέμβαση	κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (mg malvidin/g νωπού ιστού)	οξικός εστέρας της μαλβιδίνης (mg malvidin/g νωπού ιστού)	παιονιδίνη (mg reonidin/g νωπού ιστού)	πετουνιδίνη (mg petunidin/g νωπού ιστού)
Παλυβού μάρτυρας	0,394 ± 0,010ab	0,047 ± 0,023b	0,090 ± 0,029a	0,062 ± 0,003b
Παλυβού I	0,317 ± 0,009b	0,043 ± 0,001b	0,041 ± 0,008c	0,033 ± 0,004b
Παλυβού II	0,48 ± 0,017ab	0,045 ± 0,001b	0,085 ± 0,003ab	0,052 ± 0,0017b
Μητράκου καολίνης I	0,647 ± 0,035ab	0,095 ± 0,006a	0,064 ± 0,004bc	0,113 ± 0,009a
Μητράκου καολίνης II	0,359 ± 0,187b	0,077 ± 0,023ab	0,058 ± 0,011c	0,104 ± 0,019a
Μητράκου μάρτυρας I	0,746 ± 0,006a	0,073 ± 0,003ab	0,047 ± 0,002c	0,057 ± 0,022b
Μητράκου μάρτυρας II	0,517 ± 0,040ab	0,055 ± 0,003ab	0,043 ± 0,001c	0,049 ± 0,001b

Όσον αφορά τη περιεκτικότητα των φλοιών των ραγών σε κουμαρικό εστέρα της μαλβιδίνης (πίνακας 12), όλες οι επεμβάσεις πλην αυτών του Παλυβού I και Μητράκου καολίνης II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Όλες οι επεμβάσεις πλην αυτής του Μητράκου μάρτυρας I, η οποία παρουσίασε και τη μεγαλύτερη τιμή (0,746 mg malvidin/g νωπού ιστού), δε παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η επέμβαση με τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Παλυβού I (0,317 mg malvidin/g νωπού ιστού).

Όσον αφορά τη περιεκτικότητα των φλοιών των ραγών σε οξικό εστέρα της μαλβιδίνης (πίνακας 12), όλες οι επεμβάσεις Μητράκου δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, με την επέμβαση Μητράκου καολίνης I να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή (0,095 mg malvidin/g νωπού ιστού). Όλες οι επεμβάσεις Παλυβού και αυτές του Μητράκου πλην αυτής του Μητράκου καολίνης I δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Η επέμβαση Παλυβού I παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή (0,043 mg malvidin/g νωπού ιστού).

Όσον αφορά τη περιεκτικότητα των φλοιών των ραγών σε παιονιδίνη (πίνακας 12), οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας και Παλυβού II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, και η 1^η προαναφερθείσα επέμβαση παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή (0,090 mg peonidin/g νωπού ιστού). Οι επεμβάσεις Παλυβού II και Μητράκου καολίνης I δε διαφέρουν επίσης σημαντικά μεταξύ τους, όμως η τελευταία προαναφερθείσα δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις Μητράκου, καθώς και από την επέμβαση Παλυβού I. Η επέμβαση με τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Παλυβού I (0,041 mg peonidin/g νωπού ιστού).

Όσον αφορά τη περιεκτικότητα των φλοιών των ραγών σε πετουνιδίνη (πίνακας 12), οι επεμβάσεις Μητράκου καολίνης I και II δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Η επέμβαση Μητράκου καολίνης I εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή (0,113 mg retunidin/g νωπού ιστού). Όλες οι επεμβάσεις του αμπελώνα Παλυβού, καθώς και οι επεμβάσεις Μητράκου μάρτυρας I και II δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η επέμβαση με τη μικρότερη τιμή έχει αυτή του Παλυβού I (0,033 mg retunidin/g νωπού ιστού).

Μελετώντας τις ολικές και μεμονωμένες ανθοκυάνες, η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις από τη παιονιδίνη, πετουνιδίνη και μαλβιδίνη στη πλειοψηφία των επεμβάσεων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη είναι οι πιο ασταθής, λόγω των φαινολικών –OH σε ο-θέση. Αυτές οι δύο είναι και οι πρόδρομοι ανθοκυανιδίων σταθερότερων μορφών, όπως η παιονιδίνη και η μαλβιδίνη, που δεν έχουν –OH σε ο-θέση (Κουράκου - Δραγώνα Σ., 1998, Jackson R.S., 2008). Μάλιστα, η μαλβιδίνη ήταν η επεκτρατέστηρη ανθοκυάνη, κάτι που επιβεβαιώνεται από τους Ribereau-Gayon P. et al. (2006), οι οποίοι αναφέρουν ότι η μαλβιδίνη είναι η κυριότερη

ανθοκυανιδίνη στις ερυθρές ποικιλίες, φτάνοντας μέχρι και το 90% στην ποικιλία Grenache και σχεδόν 50% στην ποικιλία Sangiovese.

Ο καολίνης φαίνεται ότι είχε θετική επίδραση στη συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανών στον αμπελώνα Μητράκου, και μάλιστα στην ηλιαζόμενη πλευρά τα αποτελέσματα ήταν ακόμα καλύτερα. Αυτή η θετική επίδραση δεν παρατηρήθηκε όμως στον αμπελώνα Παλυβού. Ο καολίνης είχε θετική επίδραση στις ανθοκυάνες δελφινιδίνη, κυανιδίνη, πετουνιδίνη, μαλβιδίνη και του οξικού εστέρα του στον αμπελώνα Μητράκου, χωρίς να παρατηρούνται τα ίδια ευεργετικά αποτελέσματα και στον αμπελώνα Παλυβού. Μάλιστα, η ηλιαζόμενη πλευρά στον αμπελώνα Μητράκου παρουσίασε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά κυρίως τη μαλβιδίνη. Από τους 2 εστέρες της μαλβιδίνης, μόνο ο οξικός εστέρας φαίνεται να επηρεάστηκε από την εφαρμογή του καολίνης παρουσιάζοντας υψηλότερη τιμή στη σκιαζόμενη πλευρά του αμπελώνα Μητράκου. Ακόμα, παρατηρείται ότι στην επέμβαση με καολίνη στον αμπελώνα Παλυβού (Παλυβού Ι) τόσο η μαλβιδίνη όσο και οι εστέρες της ήταν σε μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τις άλλες επεμβάσεις και ότι η εστεροποίηση της μαλβιδίνης ήταν υπέρ του σχηματισμού του κουμαρικού εστέρα σε όλες τις επεμβάσεις (εστεροποίηση με οργανικό οξύ της αρωματικής σειράς) σε σχέση με τον οξικό εστέρα (εστεροποίηση με οργανικό οξύ της αλειφατικής σειράς) (Mazza G. et al., 1993, Ribereau- Gayón et al., 1999, Castañeda- Ovando et al., 2009).

Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι ο καολίνης είχε μια θετική επίδραση όσον αφορά στη περιεκτικότητα των φλοιών των ραγών σε ολικές και μεμονωμένες ανθοκυάνες. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνονται από πλήθος εργασιών οι οποίες αναφέρουν μια αύξηση στη συνολική συγκέντρωση ανθοκυανών εφαρμόζοντας καολίνη (Jianqiang Song et al., 2012, Shellie K. C and Bradley A. K., 2013, Conde A. et al., 2015, Shellie K.C., 2015). Μάλιστα, οι ανθοκυάνες των φυτών και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, συμβάλλουν στην προστασία τους από προσβολές (Castañeda-Ovando A. et al., 2009). Ιδιαίτερα η αύξηση της συγκέντρωσης της μαλβιδίνης αποτελεί ένα πολύ θετικό στοιχείο καθώς, σύμφωνα με τους Rivero-Perez M.D. et al. (2008), η malvidin-3-glucoside έδειξε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα στις ανθοκυανίνες του οίνου.

Σε σχετικές μελέτες, οι τιμές που καταγράφηκαν στους φλοιούς όσον αφορά τις ολικές ανθοκυάνες για το Αγιοργίτικο ήταν 148,6-310,8 mg/100g ν.ι (Koundouras S. et al. 2013), μετρήσεις σχετικά μικρότερες από αυτές της παρούσας μελέτης. Ακόμη, σύμφωνα με άλλες μελέτες, η περιεκτικότητα σε μαλβιδίνη ήταν 148,6-310,8 mg/ 100g ν.ι (Koundouras S. et al. 2013), οι τιμές της δελφινιδίνης ήταν 5,4-8,4 mg/ 100g ν.ι (Koundouras S. et al. 2013), η πετουνιδίνη παρουσίασε 3,1-20,2 mg/ 100g ν.ι (Koundouras S. et al. 2013), η περιεκτικότητα σε παιονιδίνη κυμάνθηκε μεταξύ 2,8 και 23,0 mg/ 100g ν.ι (Koundouras S. et al. 2013) και η περιεκτικότητα σε κουμαρικό εστέρα της μαλβιδίνης κυμάνθηκε από 0,385-0,455 mg/ 100g ν.ι (Κόγκκου Χ.Σ., 2014) τιμές που επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματά μας.

7.6 Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων φλοιών και γιγάρτων

Πίνακας 13: Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων φλοιών και γιγάρτων

Επέμβαση	ολικά φαινολικά φλοιού (mg gallic acid/g νωπού ιστού)	ολικά φαινολικά γιγάρτων (mg gallic acid/g νωπού ιστού)
Παλυβού μάρτυρας	5,04 ± 0,32b	14,23 ± 0,38ab
Παλυβού I	3,95 ± 0,16c	11,62 ± 1,13b
Παλυβού II	2,94 ± 0,09d	17,36 ± 2,51ab
Μητράκου καολίνης I	5,37 ± 0,17b	19,74 ± 1,75a
Μητράκου καολίνης II	6,96 ± 0,3a	16,33 ± 1,68ab
Μητράκου μάρτυρας I	5,55 ± 0,14b	20,86 ± 1,06a
Μητράκου μάρτυρας II	4,82 ± 0,04bc	18,9 ± 1,77ab

Όσον αφορά τα ολικά φαινολικά των φλοιών (πίνακας 13), η επέμβαση με στατιστικώς σημαντικές διαφορές από τις υπόλοιπες, και μάλιστα με τη μεγαλύτερη τιμή (6,96 mg gallic acid/g νωπού ιστού) είναι αυτή του Μητράκου καολίνης II. Οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Μητράκου καολίνης I, Μητράκου μάρτυρας I και II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, διαφέρουν όμως σημαντικά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις, πλην αυτής του Μητράκου μάρτυρας II. Η τελευταία προαναφερθείσα δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από την επέμβαση Παλυβού I. Η επέμβαση που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από όλες τις επεμβάσεις και μάλιστα με τη μικρότερη τιμή (2,94 mg gallic acid/g νωπού ιστού) είναι αυτή του Παλυβού II.

Όσον αφορά τα ολικά φαινολικά των γιγάρτων (πίνακας 13), όλες οι επεμβάσεις πλην αυτής του Παλυβού Ι δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Ακόμα, όλες οι επεμβάσεις πλην αυτών του Μητράκου καολίνης Ι και Μητράκου μάρτυρας Ι δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, και μάλιστα η επέμβαση Μητράκου μάρτυρας Ι παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή (20,86 mg gallic acid/g νωπού ιστού). Η επέμβαση με τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Παλυβού Ι (11,62 mg gallic acid/g νωπού ιστού).

Μελετώντας τα ολικά φαινολικά, φαίνεται ότι τα γιγάρτα παρουσιάζουν περισσότερα ολικά φαινολικά σε σχέση με τους φλοιούς, γεγονός που συμφωνεί με τον Γερογιάννη Ορέστη (2017) και Κόγκου Χ.Σ. (2014). Ακόμα, η εφαρμογή με καολίνη είχε θετικά αποτελέσματα όσον αφορά τους φλοιούς στον αμπελώνα Μητράκου, και μάλιστα η ηλιαζόμενη πλευρά εμφάνισε τα καλύτερα αποτελέσματα. Απ' την άλλη πλευρά, ο καολίνης είχε κάποια θετικά αποτελέσματα στα ολικά φαινολικά των γιγάρτων στον αμπελώνα Παλυβού (καθώς η επέμβαση Παλυβού ΙΙ παρουσίασε τη μεγαλύτερη τιμή από τις επεμβάσεις Παλυβού). Επομένως, παρατηρείται μια θετική επίδραση του καολίνης στα ολικά φαινολικά τόσο των φλοιών όσο και των γιγάρτων. Το γεγονός ότι η ηλιαζόμενη πλευρά έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα είναι λογικό καθώς το ηλιακό φως αποτελεί το απαραίτητο ερέθισμα για την ενεργοποίηση των ενζυμικών συστημάτων τα οποία θα καταλήξουν στο σχηματισμό των φαινολικών ουσιών (Σταυρακάκης Μ.Ν., Αμπελουργία, 2013). Τα αποτελέσματά μας συμπίπτουν με αυτά των Conde A. et al. (2015&2016) οι οποίοι βρήκαν ότι οι ώριμες σταφυλές που είχαν δεχτεί εφαρμογή με καολίνη περιείχαν υψηλότερες ποσότητες ολικών φαινολικών κατά 40% σε σχέση με τους σταφυλές που δε δέχτηκαν τέτοια εφαρμογή.

Σύμφωνα με τους Rice-Evans C.A. et al. (1996) και Pannala S. et al. (2001), η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται κυρίως στις οξειδοαναγωγικές τους ιδιότητες και μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην δέσμευση και εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών. Επομένως, η θετική επίδραση του καολίνης επί της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών αποτελεί θετικό στοιχείο για την αντιοξειδωτική δυνατότητα των ραγών και κατ'επέκταση του παραγόμενου οίνου. Τα αποτελέσματά μας δεν συμφωνούν με αυτά της Κόγκου Χ.Σ. (2014) η οποία αναφέρει για το Αγιωργίτικο τιμές ολικών φαινολικών μεγαλύτερες σε σχέση με την παρούσα μελέτη τόσο για τους φλοιούς (10,39-12,26

mg gallic acid/g νωπού ιστού) όσο και για τα γιγάρτα (50,55-58,91 mg gallic acid/g νωπού ιστού).

7.7 Μέτρηση ολικών φλαβανολών φλοιών και γιγάρτων

Πίνακας 14: Μέτρηση ολικών φλαβανολών φλοιών και γιγάρτων

Επέμβαση	ολικές φλαβανόλες φλοιού (mg catechin/g νωπού ιστού)	ολικές φλαβανόλες γιγάρτων (mg catechin/g νωπού ιστού)
Παλυβού μάρτυρας	3,66 ± 0,03c	26,86 ± 0,44bc
Παλυβού I	2,6 ± 0,05d	27,08 ± 0,63bc
Παλυβού II	3,65 ± 0,03c	29,67 ± 0,48ab
Μητράκου καολίνης I	4,44 ± 0,18b	28,19 ± 0,83bc
Μητράκου καολίνης II	4,95 ± 0,01a	32,55 ± 0,31a
Μητράκου μάρτυρας I	3,6 ± 0,06c	31,44 ± 0,71a
Μητράκου μάρτυρας II	3,62 ± 0,1c	26,33 ± 0,98c

Όσον αφορά τις ολικές φλαβανόλες των φλοιών (πίνακας 14), η επέμβαση με τη μεγαλύτερη τιμή (4,95 mg catechin/g νωπού ιστού) σε ολικές φλαβανόλες είναι αυτή του Μητράκου καολίνης II, με σημαντικές στατιστικές διαφορές από τις άλλες επεμβάσεις. Η επέμβαση Μητράκου καολίνης I διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις άλλες επεμβάσεις. Οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Παλυβού II, Μητράκου μάρτυρας I και II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν από τις άλλες επεμβάσεις. Η επέμβαση με τη μικρότερη τιμή σε ολικές φλαβανόλες είναι αυτή του Παλυβού I, με σημαντικές στατιστικές διαφορές από τις άλλες επεμβάσεις (2,6 mg catechin/g νωπού ιστού).

Όσον αφορά τις ολικές φλαβανόλες των γιγάρτων (πίνακας 14), οι επεμβάσεις Μητράκου καολίνης II, Μητράκου μάρτυρας I και Παλυβού II δε παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν σημαντικά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις (πλην αυτής του Παλυβού II). Η τελευταία προαναφερθείσα δε διαφέρει επίσης στατιστικά σημαντικά από τις επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Παλυβού I και Μητράκου καολίνης I. Οι τελευταίες προαναφερθείσες δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ούτε με την επέμβαση Μητράκου μάρτυρας II. Οι επεμβάσεις με τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη τιμή είναι αυτές του Μητράκου

καολίνης II (32,55 mg catechin/g νεπού ιστού) και Μητράκου μάρτυρας II (26,33 mg catechin/g νεπού ιστού) αντίστοιχα.

Μελετώντας τη περιεκτικότητα των ραγών σε φλαβανόλες, τα γίγαρτα φαίνεται να περιέχουν περισσότερες φλαβανόλες σε σχέση με τους φλοιούς. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί με τους Ribereau-Gayon et al. (2006) και Σταυρακάκης Μ.Ν. (Αμπελουργία, 2013) οι οποίοι αναφέρουν ότι τα δύο τρίτα της ποσότητας των κατεχινών και προκυανιδινών της σταφυλής συσσωρεύονται στα γίγαρτα, σε ποσοστό μέχρι και 56%, ενώ στους βοστρύχους και τους φλοιούς απαντώνται σε μικρότερο ποσοστό (20%).

Τα πρέμνα της ηλιαζόμενης πλευράς που δέχτηκαν εφαρμογή με καολίνη στον αμπελώνα Μητράκου έδωσαν τις υψηλότερες τιμές σε ολικές φλαβανόλες τόσο στους φλοιούς όσο και στα γίγαρτα, ενώ ο καολίνης έδωσε κάποια θετικά αποτελέσματα ως προς τις ολικές φλαβανόλες των γιγάρτων στον αμπελώνα Παλμβού. Επομένως, φαίνεται ότι η εφαρμογή με καολίνη έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα ως προς τις ολικές φλαβανόλες των φλοιών και των γιγάρτων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ένα πολύ θετικό στοιχείο καθώς οι κατεχίνες κι οι υπόλοιπες φλαβανόλες προσδίδουν αμυντικές ιδιότητες στα φυτά έναντι των επιβλαβών εντόμων (Mazza G. et al., 1993) αλλά και πιθανών προσβολών από παθογόνους μύκητες, ενώ στους φλοιούς των ραγών θεωρείται ότι προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία. Σε άλλη μελέτη, τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι η δραστηριότητα εναντίον των ριζών υδροξυλίου οφειλόταν στις φλαβανόλες και όχι τόσο στις ανθοκυανίνες (Arnous A. et al., 2002), προσδίδοντας αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ακόμα, οι Yilmaz Y. et al. (2004) αναφέρουν ότι οι μονομερείς φλαβανόλες όπως η κατεχίνη έδειξαν υψηλό αντιοξειδωτικό δυναμικό σε σχέση με τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις. Όλα τα παραπάνω μας οδηγούν στην άποψη ότι ο καολίνης, επιδρώντας θετικά στις συγκεντρώσεις των φλαβανολών, προσφέρει ευεργετικές αντιοξειδωτικές και αμυντικές ιδιότητες.

Σε σχετικές έρευνες, η περιεκτικότητα των ολικών φλαβανολών στους φλοιούς στο Αγιωργίτικο ήταν 19,708-38,121 mg κατεχίνης/g ν.ι (Τσαπάρας Δ.Ι., 2013) και στα γίγαρτα 40,596-49,523 mg κατεχίνης/g ν.ι., τιμές μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες της παρούσας μελέτης.

7.8 Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών φλοιών και γιγάρτων

Πίνακας 15: Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών φλοιών και γιγάρτων

Επέμβαση	ολικά φλαβονοειδή φλοιού (mg catechin/g νωπού ιστού)	ολικά φλαβονοειδή γιγάρτων (mg catechin/g νωπού ιστού)
Παλυβού μάρτυρας	12,56 ± 0,92b	166,36 ± 12,78ab
Παλυβού I	10,52 ± 1,25b	176,31 ± 5,52a
Παλυβού II	12,4 ± 0,71b	145,23 ± 3,9abc
Μητράκου καολίνης I	14,16 ± 0,77b	115,27 ± 2,78c
Μητράκου καολίνης II	22,48 ± 0,44a	130,11 ± 7,94c
Μητράκου μάρτυρας I	21,77 ± 0,15a	135,8 ± 4,9bc
Μητράκου μάρτυρας II	21,08 ± 0,74a	127,49 ± 6,82c

Όσον αφορά τα ολικά φλαβονοειδή των φλοιών (πίνακας 15), όλες οι επεμβάσεις του αμπελώνα Μητράκου πλην αυτής του Μητράκου καολίνης I δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Όλες οι επεμβάσεις του αμπελώνα Παλυβού καθώς και η επέμβαση Μητράκου καολίνης I δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Οι επεμβάσεις με τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Μητράκου καολίνης II (22,48 mg catechin/g νωπού ιστού) και Παλυβού I (10,52 mg catechin/g νωπού ιστού), αντίστοιχα.

Όσον αφορά τα ολικά φλαβονοειδή των γιγάρτων (πίνακας 15), όλες οι επεμβάσεις του αμπελώνα Μητράκου και αυτή του Παλυβού II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις (πλην αυτής του Παλυβού II). Όλες οι επεμβάσεις του αμπελώνα Παλυβού όμως δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις (πλην αυτής του Παλυβού II). Οι επεμβάσεις με τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Παλυβού I (176,31 mg catechin/g νωπού ιστού) και Μητράκου καολίνης I (115,27 mg catechin/g νωπού ιστού), αντίστοιχα.

Αναφερόμενοι στη περιεκτικότητα των ραγών σε ολικά φλαβονοειδή, τα γίγαρτα φαίνεται να περιέχουν περισσότερα φλαβονοειδή σε σχέση με τους φλοιούς, γεγονός που έρχεται να επιβεβαιώσει τους Butkhirp L. et al. (2010) και Γερογιάννη Ορέστη

(2017). Τα πρέμνα της ηλιαζόμενης πλευράς που δέχτηκαν εφαρμογή με καολίνη στον αμπελώνα Μητράκου έδωσαν τις υψηλότερες τιμές σε ολικά φλαβονοειδή στους φλοιούς. Επίσης, ο καολίνης έδωσε κάποια θετικά αποτελέσματα ως προς τα ολικά φλαβονοειδή των γιγάρτων στον αμπελώνα Παλυβού. Επομένως, φαίνεται ότι η εφαρμογή με καολίνη έδωσε καλά αποτελέσματα ως προς τα ολικά φλαβονοειδή φλοιών και γιγάρτων. Τα αποτελέσματά μας συμπίπτουν με αυτά των Conde A. et al. (2016) οι οποίοι αναφέρουν ότι οι ώριμες σταφυλές που δέχτηκαν εφαρμογή με καολίνη περιείχαν υψηλότερες ποσότητες ολικών φλαβονοειδών κατά 24% σε σχέση με τις σταφυλές που δε δέχτηκαν καμία επέμβαση. Αυτό το αποτέλεσμα αποτελεί θετικό στοιχείο καθώς τα φλαβονοειδή αποτελούν αντιοξειδωτικές ουσίες και μάλιστα οι ιδιότητες αυτές οφείλονται περισσότερο στο είδος και τον αριθμό των υποκατάστατων τους παρά στο βασικό σκελετό τους (Rice-Evans et al., 1996, Pannala et al., 2001).

7.9 Μέτρηση ολικών φλαβονολών και φλαβονών φλοιών και γιγάρτων

Πίνακας 16: Μέτρηση ολικών φλαβονών και φλαβονολών φλοιών και γιγάρτων

Επέμβαση	ολικές φλαβόνες-φλαβονόλες φλοιού (mg rutin/ g νωπού ιστού)	ολικές φλαβόνες-φλαβονόλες γιγάρτων (mg rutin/ g νωπού ιστού)
Παλυβού μάρτυρας	0,89 ± 0,03c	0,45 ± 0,01b
Παλυβού I	0,72 ± 0,04c	0,44 ± 0,001b
Παλυβού II	1,05 ± 0,1bc	0,46 ± 0,034b
Μητράκου καολίνης I	1,54 ± 0,13a	0,49 ± 0,252b
Μητράκου καολίνης II	1,63 ± 0,07a	0,46 ± 0,00b
Μητράκου μάρτυρας I	0,98 ± 0,09c	0,53 ± 0,01ab
Μητράκου μάρτυρας II	1,46 ± 0,11b	0,59 ± 0,025a

Όσον αφορά τις ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες των φλοιών (πίνακας 16), όλες οι επεμβάσεις του αμπελώνα Παλυβού και αυτή του Μητράκου μάρτυρας I δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις (πλην αυτής του Παλυβού II). Οι επεμβάσεις Μητράκου καολίνης I και II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν από τις υπόλοιπες

επεμβάσεις. Οι επεμβάσεις Παλυβού ΙΙ και Μητράκου μάρτυρας ΙΙ επίσης δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Οι επεμβάσεις με τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη τιμή είναι αυτού Μητράκου καολίνης ΙΙ (1,63 mg rutin /g νωπού ιστού) και Παλυβού Ι (0,72mg rutin /g νωπού ιστού), αντίστοιχα.

Όσον αφορά τις ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες των γιγάρτων (πίνακας 16), όλες οι επεμβάσεις, πλην αυτής του Μητράκου μάρτυρας ΙΙ, δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις (πλην αυτής του όμως Μητράκου μάρτυρας Ι). Οι επεμβάσεις όμως Μητράκου μάρτυρας Ι και ΙΙ δε διαφέρουν επίσης στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Οι επεμβάσεις με τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Μητράκου μάρτυρας ΙΙ (0,59 mg rutin /g νωπού ιστού) και Παλυβού Ι (0,44 mg rutin /g νωπού ιστού), αντίστοιχα.

*Αναφερόμενοι στη περιεκτικότητα των ραγών σε ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες, οι φλοιοί φαίνεται να περιέχουν περισσότερες ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες σε σχέση με τα γίγαρτα. Τα αποτελέσματα αυτά συμπίπτουν με τον Γερογιάννη Ορέστη (2017) ο οποίος εξετάζοντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων των ολικών φλαβονών και φλαβονολών σε γηγενείς ποικιλιών αμπέλου (*Vitis Vinifera L.*) της ομάδας «Μαυρούδια», διαπίστωσε ότι η περιεκτικότητα τους είναι μεγαλύτερη στους φλοιούς από τα γίγαρτα. Μάλιστα, η κατανομή αυτή στα μέρη της ράγας είναι αντίστροφη από τις φλαβανόλες.*

Τα πρέμνα της ηλιαζόμενης πλευράς που δέχτηκαν εφαρμογή με καολίνη στον αμπελώνα Μητράκου έδωσαν τις υψηλότερες τιμές σε ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες στους φλοιούς. Όσον αφορά τα γίγαρτα, δε φαίνεται ότι ο καολίνης είχε κάποια επίδραση σε κανέναν από τους δύο αμπελώνες. Φαίνεται επομένως ότι η εφαρμογή με καολίνη έδωσε καλά αποτελέσματα ως προς τις ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες μόνο στους φλοιούς των ραγών.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν θετικό στοιχείο καθώς, σύμφωνα τους Jordão A.M. και Correia A.C., (2012), οι ανθοκυάνες δεν είναι ο πιο ισχυρός αμυντικός μηχανισμός που αναπτύσσεται στους φλοιούς των σταφυλιών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης και ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλοιών οφείλεται όχι τόσο στις ανθοκυάνες όσο σε άλλες ουσίες όπως οι φλαβονόλες που έχουν πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Rice-Evans et al., 1996,

Burda & Oleszek, 2001). Το γεγονός ότι βρέθηκε θετική επίδραση του καολίνης επί των ολικών φλαβονών-φλαβονολών ειδικά στην ηλιαζόμενη πλευρά είναι θετικό καθώς η βιοσύνθεση των φλαβονολών επάγεται από την έκθεση στο φως, οι οποίες προστατεύουν από την UV-ακτινοβολία (*Downey M.O. et al., 2004, Cortell J. and Kennedy J.A., 2006, Pereira G. E. et al., 2006*).

7.10 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών φλοιών και γιγάρτων

Πίνακας 17: Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών φλοιών και γιγάρτων

Επέμβαση	συμπυκνωμένες ταννίνες φλοιού (mg catechin/g νωπού ιστού)	συμπυκνωμένες ταννίνες γιγάρτων (mg catechin/g νωπού ιστού)
Παλυβού μάρτυρας	2,24 ± 0,13a	8,5 ± 0,29c
Παλυβού I	1,1 ± 0,05c	5,76 ± 0,11d
Παλυβού II	1,45 ± 0,08bc	3,36 ± 0,14e
Μητράκου καολίνης I	1,71 ± 0,05abc	9,15 ± 0,31c
Μητράκου καολίνης II	2,34 ± 0,27a	10,64 ± 0,22b
Μητράκου μάρτυρας I	1,71 ± 0,15abc	11,96 ± 0,42a
Μητράκου μάρτυρας II	2,01 ± 0,03ab	11,58 ± 0,13ab

Όσον αφορά τις συμπυκνωμένες ταννίνες των φλοιών (πίνακας 17), όλες οι επεμβάσεις πλην αυτών του Παλυβού I και II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Οι επεμβάσεις Παλυβού I, II, Μητράκου καολίνης I και Μητράκου μάρτυρας I δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επίσης οι επεμβάσεις Μητράκου μάρτυρας I, II, Μητράκου καολίνης I και Παλυβού II. Οι επεμβάσεις με τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Μητράκου καολίνης II (2,34 mg catechin/g νωπού ιστού) και Παλυβού I (1,1mg catechin/g νωπού ιστού) αντίστοιχα.

Όσον αφορά τις συμπυκνωμένες ταννίνες των γιγάρτων (πίνακας 17), οι επεμβάσεις Μητράκου μάρτυρας I και II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ η τελευταία δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά ούτε από την επέμβαση Μητράκου καολίνης II. Οι επεμβάσεις Μητράκου καολίνης I και Παλυβού μάρτυρας δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Οι επεμβάσεις Παλυβού I και II διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά τόσο

μεταξύ τους όσο και με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Οι επεμβάσεις με τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Μητράκου μάρτυρας I (11,96 mg catechin/g νωπού ιστού) και Παλυβού II (3,36 mg catechin/g νωπού ιστού) αντίστοιχα.

Όσον αφορά τη περιεκτικότητα των ραγών σε συμπυκνωμένες ταννίνες, τα γίγαρτα παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές συμπυκνωμένων ταννινών σε σχέση με τους φλοιούς, γεγονός που συμφωνεί με τους Τσαπάρας Δ.Ι. (2013) και Κόγκου Χ.Σ. (2014). Τα πρέμνα της ηλιαζόμενης πλευράς που δέχτηκαν εφαρμογή με καολίνη στον αμπελώνα Μητράκου έδωσαν τις υψηλότερες τιμές σε συμπυκνωμένες ταννίνες στους φλοιούς, ενώ δεν υπήρξε κάποια αξιόλογη επίδραση του καολίνη επί των συμπυκνωμένων ταννινών των γιγάρτων. Ο αμπελώνας Παλυβού δε φαίνεται να επηρεάστηκε θετικά ως προς την περιεκτικότητα των συμπυκνωμένων ταννινών, τόσο των φλοιών όσο και των γιγάρτων. Επομένως, η περιεκτικότητα των συμπυκνωμένων ταννινών από την εφαρμογή καολίνη δε φαίνεται να επηρεάστηκε ιδιαίτερα παρά μόνο στον έναν από τους δύο αμπελώνες και μόνο όσον αφορά τους φλοιούς. Σε σχετικές μελέτες για τη περιεκτικότητα των ραγών σε συμπυκνωμένες ταννίνες, οι φλοιοί είχαν 23,925-44,764 mg κατεχίνης/ gr ν.ι (Τσαπάρας Δ.Ι., 2013) και τα γίγαρτα 47,279-65,721 mg κατεχίνης/ gr ξ.ι (Τσαπάρας Δ.Ι., 2013), τιμές μεγαλύτερες από αυτές της παρούσας μελέτης. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την Κόγκου Χ.Σ. (2014) η οποία αναφέρει ότι για την ποικιλία Αγιωργίτικο οι ταννίνες των φλοιών κυμάνθηκαν μεταξύ 1,38-2,34mg catechin/g νωπού ιστού, ενώ αυτές των γιγάρτων κυμάνθηκαν μεταξύ 14,51-19,78, τιμές λίγο μεγαλύτερες από αυτές της παρούσας μελέτης.

7.11 Μέτρηση ολικών *o*-διφαινολών φλοιών και γιγάρτων

Πίνακας 18: Μέτρηση ολικών *o*-διφαινολών φλοιών και γιγάρτων

Επεμβάση	ολικές <i>o</i> -διφαινόλες φλοιού (mg caffeic acid/g νωπού ιστού)	ολικές <i>o</i> -διφαινόλες γιγάρτων (mg caffeic acid/g νωπού ιστού)
Παλυβού μάρτυρας	0,24 ± 0,02b	1,56 ± 0,013b
Παλυβού I	0,213 ± 0,009b	1,69 ± 0,008a
Παλυβού II	0,24 ± 0,006b	1,75 ± 0,014a
Μητράκου καολίνης I	0,29 ± 0,006a	1,51 ± 0,026bc
Μητράκου καολίνης II	0,307 ± 0,003a	1,58 ± 0,016b
Μητράκου μάρτυρας I	0,24 ± 0,00b	1,54 ± 0,03bc
Μητράκου μάρτυρας II	0,233 ± 0,003b	1,46 ± 0,015c

Όσον αφορά τις ολικές *o*-διφαινόλες των φλοιών (πίνακας 18), όλες οι επεμβάσεις, πλην αυτών του Μητράκου καολίνης I και II δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Οι επεμβάσεις Μητράκου καολίνης I και II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, αλλά όπως αναφέρθηκε, διαφέρουν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Οι επεμβάσεις με τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Μητράκου καολίνης II (0,307 mg caffeic acid/g νωπού ιστού) και Παλυβού I (0,213mg caffeic acid/g νωπού ιστού) αντίστοιχα.

Όσον αφορά τις ολικές *o*-διφαινόλες των γιγάρτων (πίνακας 18), οι επεμβάσεις Παλυβού I και II δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν σημαντικά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Μητράκου καολίνης I και II και Μητράκου μάρτυρας I δε παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, διαφέροντας από τις υπόλοιπες επεμβάσεις, πλην των επεμβάσεων Μητράκου καολίνης I και Μητράκου μάρτυρας I οι οποίες δε διαφέρουν σημαντικά ούτε από την επέμβαση Μητράκου μάρτυρας II. Οι επεμβάσεις με τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Παλυβού II (1,75 mg caffeic acid/g νωπού ιστού) και Μητράκου μάρτυρας II (1,46 mg caffeic acid/g νωπού ιστού), αντίστοιχα.

*Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα γίγαρτα φαίνεται να περιέχουν περισσότερες ολικές *o*-διφαινόλες σε σχέση με τους φλοιούς. Τα πρέμνα της ηλιαζόμενης πλευράς που δέχτηκαν εφαρμογή με καολίνη στον αμπελώνα Μητράκου έδωσαν τις υψηλότερες τιμές σε ολικές *o*-διφαινόλες στους φλοιούς, ενώ δεν υπήρξε κάποια*

αξιόλογη επίδραση του καολίνη στον αμπελώνα Παλυβού. Ο αμπελώνας Παλυβού φαίνεται να επηρεάστηκε θετικά ως προς την περιεκτικότητα των ολικών ο-διφαινολών των γιγάρτων. Συμπερασματικά, η περιεκτικότητα των ολικών ο-διφαινολών από την εφαρμογή καολίνη φαίνεται να επηρεάστηκε θετικά, τόσο σε φλοιούς όσο και στα γιγάρτα. Μπορεί οι ο-διφαινόλες να προσφέρονται ως υπόστρωμα για την οξείδωση των πολυφαινολών (κεφάλαιο 4.3), ωστόσο οι διφαινόλες είναι πιο αποτελεσματικές αντιοξειδωτικές από τις απλούστερες φαινόλες που οφείλονται στη σταθεροποίηση της φαινοξυ-ρίζας μέσω δεσμού υδρογόνου (Amico V. et al., 2008).

7.12 Μέτρηση ολικών αντιοξειδωτικών φλοιών και γιγάρτων

Πίνακας 19: Μέτρηση ολικών αντιοξειδωτικών φλοιών και γιγάρτων

Επέμβαση	ολικά αντιοξειδωτικά φλοιού (mg trolox/g νωπού ιστού)	ολικά αντιοξειδωτικά γιγάρτων (mg trolox/g νωπού ιστού)
Παλυβού μάρτυρας	24,2 ± 1,57bcd	147,88 ± 9,19a
Παλυβού I	19,94 ± 0,81d	134,94 ± 5,88a
Παλυβού II	22,55 ± 1,38cd	143,4 ± 13,05a
Μητράκου καολίνης I	28,86 ± 0,71b	139,31 ± 9,71a
Μητράκου καολίνης II	37,45 ± 1,57a	168,06 ± 8,29a
Μητράκου μάρτυρας I	25,36 ± 0,55bc	163,19 ± 3,85a
Μητράκου μάρτυρας II	26,81 ± 0,78bc	175,83 ± 13,23a

Όσον αφορά τα ολικά αντιοξειδωτικά των φλοιών (πίνακας 19), η επέμβαση Μητράκου καολίνης II διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις και εμφανίζει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα (37,45 mg trolox/g νωπού ιστού). Οι επεμβάσεις Μητράκου μάρτυρας I και II, Μητράκου καολίνης I και Παλυβού μάρτυρας φαίνεται να μη διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Οι επεμβάσεις Παλυβού μάρτυρας, Παλυβού II, Μητράκου μάρτυρας I και II δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Οι επεμβάσεις Παλυβού φαίνεται να μη διαφέρουν επίσης σημαντικά μεταξύ τους. Τέλος, η επέμβαση Παλυβού I παρουσιάζει και τη μικρότερη περιεκτικότητα σε ολικά αντιοξειδωτικά (19,94 mg trolox/g νωπού ιστού).

Όσον αφορά τα ολικά αντιοξειδωτικά των γιγάρτων (πίνακας 19), όλες οι επεμβάσεις δε φαίνεται να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Οι επεμβάσεις με τη μεγαλύτερη και τη μικρότερη τιμή είναι αυτή του Μητράκου μάρτυρας II (175,83 mg trolox/g νωπού ιστού) και Παλυβού I (134,94 mg trolox/g νωπού ιστού), αντίστοιχα.

Μελετώντας το αντιοξειδωτικό δυναμικό των ραγών, τα γίγαρτα φαίνεται να περιέχουν περισσότερα αντιοξειδωτικά σε σχέση με τους φλοιούς, γεγονός που συμφωνεί με την Κόγκκου Χ.Σ. (2014). Αυτό το αποτέλεσμα επίσης συμφωνεί με τους Pastrana-Bonill E. et al. (2003), οι οποίοι ισχυρίζονται ότι η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα βρίσκεται στα γίγαρτα, στη συνέχεια στο φλοιό, ενώ η σάρκα εμφανίζει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Τα πρέμνα της ηλιαζόμενης πλευράς που δέχτηκαν εφαρμογή με καολίνη στον αμπελώνα Μητράκου έδωσαν τις υψηλότερες τιμές σε ολικά αντιοξειδωτικά στους φλοιούς, ενώ δεν υπήρξε κάποια αξιολογη επίδραση του καολίνη στον αμπελώνα Παλυβού. Δεν υπήρξε κάποια αξιολογη μεταβολή των ολικών αντιοξειδωτικών των γιγάρτων εφαρμόζοντας καολίνη σε κανέναν από τους δύο αμπελώνες.

Τα αποτελέσματά μας συμπίπτουν με τους Dinis et al. (2016a & b) οι οποίοι παρατήρησαν ότι οι χαμηλότερες ποσότητες ROS, η αυξημένη απομάκρυνση υδροξυλίων και η παραγωγή αντιοξειδωτικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων φαινολικών, συμβάλλουν στην προστατευτική ιδιότητα του καολίνη στην άμπελο (Dinis L.T. et al., 2016a). Η αύξηση των ολικών αντιοξειδωτικών στους φλοιούς αποτελεί ένα πολύ θετικό στοιχείο για τους παραγόμενους οίνους και κατ'επέκταση για την ανθρώπινη υγεία.

Κεφάλαιο 8^ο: Συμπεράσματα

- Η διαφυλλική εφαρμογή με καολίνη στο παρόν πείραμα στη ποικιλία Αγιωργίτικο φαίνεται να επηρέασε θετικά τις διαστάσεις και κυρίως το βάρος των σταφυλών και των ραγών και μάλιστα, παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η ηλιαζόμενη πλευρά στον αμπελώνα Μητράκου.
- Στο παρόν πείραμα, ο καολίνης φαίνεται να επιβεβαιώνει το ρόλο του ως αντιδιαπνευστική ουσία καθώς συνέβαλλε στον περιορισμό της απώλειας υγρασίας των ραγών, κάτι που θέλουμε να αποφύγουμε κάτω από πολύ υψηλές θερμοκρασίες και έντονη ηλιακή ακτινοβολία.
- Η εφαρμογή με καολίνη μπορεί να μην επηρέασε θετικά το ποσοστό φλοιού των ραγών, όμως η αύξηση του ποσοστού σάρκας και των γιγάρτων είναι επιθυμητό καθώς δίνει περισσότερες πιθανότητες για μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε γλεύκος και φαινολικά.
- Τα γλευκοχαρακτηριστικά χαρακτηριστικά των ραγών φαίνεται να επηρεάστηκαν από τη διαφυλλική εφαρμογή του καολίνης. Η θετική επίδραση του καολίνης επί των ολικών διαλυτών στερεών και κυρίως της ενεργής οξύτητας (pH) αποτελεί θετικό στοιχείο καθώς είναι δείγμα πρωΐμισης.
- Ο καολίνης φαίνεται ότι αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση μηλικού οξέος και ελάχιστα του τρυγικού, ενώ δεν επηρέασε τη συγκέντρωση του φουμαρικού, ηλεκτρικού και ασκορβικού οξέος. Τέλος, η περιεκτικότητα όλων των οργανικών οξέων ήταν μικρότερη στην ηλιαζόμενη πλευρά όπου είχε γίνει εφαρμογή με καολίνη.
- Ο καολίνης φαίνεται ότι είχε θετική επίδραση στη συγκέντρωση των ολικών αλλά και των περισσότερων μεμονωμένων ανθοκυανών. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι επηρεάστηκαν θετικά οι ολικές ανθοκυάνες και η μαλβιδίνη στην ηλιαζόμενη πλευρά όπου είχε εφαρμοστεί καολίνης.
- Ο καολίνης παρουσίασε επίσης μια θετική επίδραση κυρίως στα ολικά φαινολικά, ολικά φλαβονοειδή, στις ολικές φλαβανόλες, ολικές ο-διφαινόλες τόσο των φλοιών όσο και των γιγάρτων, ιδιαίτερα στην ηλιαζόμενη πλευρά στους περισσότερους από τους παραπάνω χαρακτήρες. Φαίνεται ότι η εφαρμογή με καολίνη έδωσε καλά αποτελέσματα ως προς τις συμπτωκνωμένες

ταννίνες, ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες μόνο στους φλοιούς των ραγών. Η θετική αυτή επίδραση του καολίνη σε αυτούς τους χαρακτήρες, σε συνδυασμό με τις υψηλότερες τιμές σε ολικά αντιοξειδωτικά των φλοιών που παρουσίασαν οι ψεκασμένες με καολίνη σταφυλές, αποτελεί ένα πολύ θετικό στοιχείο για την ανιοξειδωτική ικανότητα των σταφυλών και των παραγόμενων προϊόντων τους.

- *Ολοκληρώνοντας, στη παρούσα μελέτη είναι εμφανής η θετική επίδραση της εφαρμογής καολίνη στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας Αγιωργίτικο, κάτι που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών σε ερυθρές οινοποιήσιμες ποικιλίες.*

Ξένη Βιβλιογραφία

- Abd El-Kareem A.M., 2009. Relation of fruiting in Crimson seedless grapevines to spraying antioxidants M. Sc. Thesis Fac. of Agric. Minia Univ. Egypt.
- Abdelaal, A.M. K. Masoud, A.A.B. and Mohamed, A.Y., 2012. Response of Taimour mango trees to application of the antioxidant Glutathione. *Menufiya J. Agric. Res.* 37 (3): 603-610.
- Ahmad, P., Jaleel, C.A. et al., 2010. Roles of enzymatic and no-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 161–175.
- Ahmed Y.M. Ahmed, 2014. Impact of Spraying Some Antitranspirants on Fruiting of Williams Bananas Grown Under Aswan Region Conditions. *Stem Cell:* 5(4)
- Al- Abbasy, U.K.; Mohamed, I.M. Morsy, M.E. and Ahmed- Doaa, A.H., 2006. Harmful reduction of saline irrigation water in Flame seedless grape nurslings by antitranspirant vapor guard. 3rd Syrian and Egyptian conf. entitled food and agriculture in Arab World Development and Future challenges.
- Alcalde-Eon C., Escribano-Bailon M.T., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C., 2006. Changes In The Detailed Pigment Composition Of Red Wine During Maturity And Ageing. *Anal. Chim. Acta* 563: 238–254
- Amico V., Chillemi R., Mangiafico S., Spatafora C., Tringali C., 2008. Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC–DAD analysis and antioxidant activity. *Bioresour. Technol.*,99, 5960–5966.
- Anderson J.E. and Kreith F., 2005. Effects of film-forming and silicone antitranspirants on four herbaceous plant species. *Plant and Soil*, 49(1): 161-173
- Anjum S. A., Wang L., Farooq M., Xue L. and Ali S., 2011. Fulvic acid application improves the maize performance under well-watered and drought conditions. *J. Agron. Crop Sci.* N 0931-2250.
- Apel K. and Hirt H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Arnous A., Makris D.P., Kefalas P., 2002. Correlation Of Pigment And Flavanol Content With Antioxidant Properties In Selected Aged Regional Wines From Greece. *Journal Of Food Composition And Analysis* 15: 655–665
- Bagchi D., Garg A., Krohn R.L., Bagchi M., Bagchi iD.J., Balmoori J., Stohs S.J., 1998. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *General Pharmacology*
- Balasundram N., Sundram K., Samman S., 2006. Phenolic Compounds In Plants And Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, And Potential Uses. *Food Chemistry*, 99(1): 191–203
- Baldi A., Romani A., Mulinacci N., Vincieri F., Caseta B., 1995. Hplc/Ms Application To Anthocyanins Of *Vitis Vinifera* L. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 2104–2109
- Bennet-Clark T. A., 1933. The Role Of The Organic Acids In Plant Metabolism. *New Phytologist*. Volume 32, Issue 1, pp 51-57
- Ben-Porath B.A. and Greenblat Y., 1994. Effect of antitranspiration on yield and fruit size of apricot grown under different water regimes. Galilee Tech. Center, Kiryat shmona.
- Benzie F.F. and Strain J.J., 1999. Ferric Reducing/ Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods in enzymology*. vol. 299:15-23.
- Bernardo S., Dinis L.-T. et al., 2017. Kaolin particle film application lowers oxidative damage and DNA methylation on grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Environmental and Experimental Botany* 139: 39–47

- Bhaigyabati Th., Grihanjali D.P., Bag G.C., 2014. Total Flavonoid Content And Antioxidant Activity Of Aqueous Rhizome Extract Of Three Hedychium Species Of Manipur Valley. *Research Journal Of Pharmaceutical, Biological And Chemical Sciences*, 5(5): 970-976
- Bittelli M., M. Flury, G.S. Campbell, and E.J. Nichols. 2001. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agr. For. Meteorol.* 107:167–175.
- Bose T. K., Mitra S. K. and Sanyal D., 2001. *Fruits-Tropical and Sub-Tropical*. Naya Udyog. Pp. 100-105.
- Bossp.K., Davies C.,2009. Molecular Biology Of Anthocyanin Accumulation In Grape Berries, *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Ed:Roubelakis-Angelakisk.A., 265-268
- Bostanian N.J., Racette G., 2008. Particle films for managing arthropod pests of apple. *J Econ Entomol.*:101(1):145-50.
- Bowler C.M., Van Montagu M., Inze D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83–116.
- Brewer M.S., 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Vol.10:221
- Brillante L. et al., 2016. Comparing Kaolin and Pinolene to Improve Sustainable Grapevine Production during Drought. *Plos One*
- Brouillard R., Chssaing S., Fougerousse A., 2003. Why Are Grape/Fresh Wine Anthocyanins So Simple And Why Is That Red Wine Color Lasts So Long? *Phytochemistry*, 64: 1179-1186
- Burda S. and Oleszek W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Butkhup L., Chowtivannakul S., Gaensakoo R., Prathepha P., Samappito S., 2010. Study Of The Phenolic Composition Of Shiraz Red Grape Cultivar (*Vitis Vinifera* L.) Cultivated In North-Eastern Thailand And Its Antioxidant And Antimicrobial Activity. *South African Journal For Enology And Viticulture*, 31(2): 89-98
- Cantos E., Espin J. C., & Toma's-Barbera'n F., 2002. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5691–5696.
- Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernandez M.L., Paez-Hernandez M.E., Rodriguez J.A., Galan-Vidal C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Chamchaiyaporn T., Jutamanee K., et al., 2013. Effects of kaolin clay coating on mango leaf gas exchange, fruit yield and quality. *Kasetsart J* 47:479–491
- Cheynier V., Moutounet M., Sarni-Manchado P., 1998. *Les Composés Phénolique Lavoisier Press, Enologie*, 123–162
- Claus H. and Strong P., 2010. Laccase. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 1–22.
- Cohen S.D., Tarara J.M., Kennedy J.A., 2008. Assessing The Impact Of Temperature On Grape Phenolic Metabolism. *Anal. Chim. Acta*, 621:57-67
- Conde A. et al. 2015. Kaolin exogenous application boosts antioxidant capacity and phenolic content in berries and leaves of grapevine under summer stress. *Journal of plant physiology* 191
- Conde A. et al., 2016. Kaolin foliar application has a stimulatory effect on phenylpropanoid and flavonoid pathways in grape berries. August 2016, Volume 7
- Conde A., Neves A. et al., 2018. Kaolin particle film application stimulates photoassimilate synthesis and modifies the primary metabolome of grape leaves *Journal of Plant Physiology* 223: 47–56
- Conde C., Silva P., Fontes N., Dias A.C.P., Tavares R.M., Sousa M.J., Agasse A., Delrot S., Geros H., 2007. Biochemical Changes Throughout Grape Berry Development And Fruit And Wine Quality. *Food* 1(1): 1-22
- Correia C.M. and Dinis L.T., 2014. Climate change and adaptation strategies for Viticulture *Journal of International Scientific Publications: Agriculture and Food*, Volume 2, 424-429

- Cortell J. and Kennedy J.A., 2006. Effect Of Shading On Accumulation Of Flavonoid Compounds In (*Vitis Vinifera* L.) Pinot Noir Fruit And Extraction In A Model System. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 8510–8520
- Cosme F., Ricardo-Da Silva J.M., Laureano O., 2009. Tannin Profiles Of *Vitis Vinifera* L. Cv. Red Grapes Growing In Lisbon And From Their Monovarietal Wines. *Food Chemistry*, 112: 197-204
- Cruz-Rus E., Botella M.A, Valpuesta V., Gomez-Jimenez M.C., 2010. Analysis of genes involved in L-ascorbic acid biosynthesis during growth and ripening of grape berries *Journal of Plant Physiology* 167:739–748
- Curko N., Kovacevic Ganic K., Gracin L., Dapic M., Jourdes M., Teissedre P. L., 2014. Characterization Of Seed And Skin Polyphenolic Extracts Of Two Red Grape Cultivars Grown In Croatia And Their Sensory Perception In A Wine Model Medium. *Food Chemistry*, 145: 15–22
- Czochanska, Z., Foo L.Y., Newman R.H., Porter L.J., Thomas W.A., Jones W.T., 1979. Direct Proof Of A Homogeneous Polyflavan-3-Ol Structure For Polymeric Proanthocyanidins, pp. 465
- Dani C., Oliboni L.S., Vanderlinde R., Pra D., Dias J.F., Yoneama M.L., Bonatto D., Salvador M., Henriques J.A.P., 2009. Antioxidant activity and phenolic and mineral content of rose grape juice. *J. Med. Food.*, 12, 188–192.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* 57, 779–795.
- Davey M.W., Montagu Marc Van, Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I.J.J., Strain J.J, Favell D., Fletcher J., 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agric* 80:825-860
- De Faria R.O., Moure V.R., Lopes M.A., Krieger N. & Mitchell D.A., 2007. The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technology and Biotechnology*, 45(3), 287–294.
- de Souza, C.R. et al., 2005. Impact of deficit irrigation on water use efficiency and carbon isotope composition of field-grown grapevines under Mediterranean climate. *J. Exp. Bot.* 56:2163-2172.
- Di Stefano R., Flamini R., 2008. *Hyphenated Techniques In Grape And Wine Chemistry*. Cra, Viticulture Research Center, Conegliano Veneto, Italy, 33
- Dinis L.T. and Ferreira H., 2016b. Kaolin based, foliar reflective film protects photosystem II structure and function in grapevine leaves exposed to heat and high solar radiation. *Photosynthetica* 54:47–55
- Dinis L.T., Bernardo S. et al., 2016a. Kaolin exogenous application boosts antioxidant capacity and phenolic content in berries and leaves of grapevine under summer stress. *J. Plant Physiol.* 191,45–53.
- Downey M., Harvey J., Robinson S., 2003. Synthesis Of Flavonols And Expression Of Flavonol Synthase Genes In The Developing Grape Berries Of Shiraz And Chardonnay (*Vitis Vinifera* L.). *Austr. J Grape Wine Res.*, 9: 110–121
- Downey M.O., Dokoozlian N.K., Krstic M.P., 2006. Cultural Practice And Environmental Impacts On The Flavonoid Composition Of Grapes And Wine: A Review Of Recent Research. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:257-268.
- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P., 2003. Analysis Of Tannins In Seeds And Skins Of Shiraz Grapes Throughout Berry Development. *Aust J. Of Grape And Wine Research*, 9(1): 15–27
- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P., 2004. The Effect Of Bunch Shading On Berry Development And Flavonoid Accumulation In Shiraz Grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 10: 55–73

- Ebrahiem- Asmaa A., 2012. Alleviating the adverse effects of sunburn on the production of Red Roomy grapevines growing under Minia region conditions. *Minia J. of Agric. Res. & Develop.* (32) 1:165-175.
- El- Khawaga A.S. and Mansour A.E.M., 2014. Enhancing the efficiency of irrigation water use by using some antitranspirants in Wonderful pomegranate orchards. *Middle East Journal of Agric. Res.* 3(3): 694-700.
- Elkins R., Mitcham E., et al., 2001. Use of kaolinic clay to enhance on-tree color retention of red sensation Bartlett pear fruit. *HortScience*, 36(3): 498
- Faoro F. and Iriti M., 2007. Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens. *Caryologia* 60, 121–124.
- Fougete-Rifot M., Benharbit El-Alami N., Brun O., Bouard J., 1995. Ontogenesis of the gynoeceum of *Vitis vibifera* L. var. Chardonnay in relation to the appearance of tannic vacuoles. *J.Int.Sci.Vigne Vin* 29:105-130
- Gale J., and Poljakoff-Mayber A., 1967. Plastic films on plants as antitranspirants. *Science* 156:650-652.
- Gindaba J. and Wand S. J. E., 2005. Sunburn in apples and effectiveness of control measures. Combined Congress, 10-13 January 2005, Potchefstroom, South Africa, Abstract pp 43.
- Glenn D. M., 2009. Particle film mechanisms of action that reduce the effect of environmental stress in "Empire" apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134 (3): 314 - 321.
- Glenn M.D., Cooley N, et al., 2010. Impact of kaolin particle film and water deficit on wine grape water use efficiency and plant water relations. *Hortscience*; 45: 1178–1187.
- Glenn M.D., Puterka G.J. et al., 2001. Particle film application influences apple leaf physiology, fruit yield and fruit quality. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126(2): 175-181
- Glenn, D.M., and Puterka G.J., 2005. Particle films: A new technology for agriculture. In *Horticultural Reviews*, Vol. 31. J. Janick (ed.), pp. 1-44. Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Glenn, D.M., Prado E. et al., 2002. A reflective processed-kaolin particle film affects fruit temperature, radiation reflection and solar injury in apple. *J. Am. Soc.Hort. Sci.*, 127: 188193.
- Gomez-Alonso S., Garcia-Romero E., Hermosín-Gutiérrez., 2007. Hplc Analysis Of Diverse Grape And Wine Phenolics Using Direct Injection And Multidetector By Dad And Fluorescence. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 20(7): 618–626
- Gonzalez-San Jose M., Santa Maria G., Diez C.,1990. Anthocyanins As Parameters For Differentiating Wines By Grape Variety, Wine-Growing Region And Wine-Making Methods. *J. Food Comp. Anal.*, 3: 54–66
- Gu S.L., Fuchigami L.H, Guak S.H. and Shin C., 1996. Effects of short-term water stress, hydrophilic polymer amendment, and antitranspirant on stomatal status, transpiration, water loss, and growth in 'Better Boy' tomato plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:831–837.
- Guillon J.M., 1895. *Les cepages orientaux*, G.Carre, Paris
- Hadwiger L.A., Ogawa T., Kuyama H., 1994. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7, 531–533.
- Hummel R.L., 1990. Water relations of container-grown woody and herbaceous plants following antitranspirant sprays. *HortScience* 25:772–775.
- Iacopini P., Baldi M., Storchi P., Sebastiani L., 2008. Catechin, Epicatechin, Quercetin, Rutin And Resveratrol In Red Grape: Content, In Vitro Antioxidant Activity And Interactions. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 21: 589– 598.
- International Organisation of Vine and Wine (OIV)
- Isherwood F.A., Chen Y.T. and Mapson L.W., 1954. Synthesis of Lascorbic acid in plants and animals. *Biochem J.* , 56:1-21
- Jackson D.I., Lombard P.B., 1993. Environmental And Management Practices Affecting Grape Composition And Wine Quality. A Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44: 409-430
- Jackson, R. S., 2008. *Wine Science: Principles And Applications* pp. 27,28

- Jianqiang Song, Shellie C. K, Hua Wang, Michael C., 2012. Qian. Influence of deficit irrigation and kaolin particle film on grape composition and volatile compounds in Merlot grape (*Vitis vinifera* L.) Food Chemistry 134: 841–850
- Jifon J.L. and Syvertsen J.P. 2003. Kaolin particle film applications can increase photosynthesis and water use efficiency of ‘Ruby Red’ grapefruit leaves. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:107–112.
- Jordão A.M. and Correira A.C., 2012. Relationship between antioxidant capacity, proanthocyanidin and anthocyanin content during grape maturation of Touriga Nacional and Tinta Roriz grape varieties. South African Journal of Enology and Viticulture
- Joseph B., Jin D. and Sujata S., 2010. Insight into the role of exogenous salicylic acid in plants grown under environment. Asian J. of Crop. Sci. 2: 226- 235.
- Kallithraka S., Tsoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P., 2006. Principal Phenolic Compounds In Greek Red Wines. Food Chemistry, 99: 784–793
- Keller, M., Hrazdina, G. 1998. Interaction Of Nitrogen Availability During Bloom And Light Intensity During Veraison. ii. Effects On Anthocyanin And Phenolic Development During Grape Ripening. Am. J. Enol. V. 49 (3): 341-349
- Kennedy J.A. and Jones G.P., 2001. Analysis Of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis In The Presence Of Excess Phloroglucinol. J. Agric. Food Chem., 49(4): 1740–1746
- Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse A.L., 2000. Changes In Grape Seed Polyphenols During Fruit Ripening. Phytochemistry, 55:77-85
- Kerns D.L. and Wright, G. C., 2000. Protective and yield enhancement qualities of kaolin on lemons. Citrus and Deciduous Fruit and Nut Research Report, College Agric. And Life Sciences, Arizona Univ., Tucson, Arizona, 85721.
- Kliewer W.M., 1966. Sugars and organic acids of *Vitis vinifera*, Plant Physiology 41:923-931.
- Koundouras S., Kanakis I., Drossou E., Kallithraka S., Kotseridis Y., 2013. Effects Of Post-Veraison 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, 47(1): 115-128
- Kulikov S.N., Chirkov S.N., Il’ina A.V., Lopatin S.A., Varlamov V.P., 2006. Effect of molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. Appl. Biochem. Microbiol. 42, 200–203.
- Lamikanra O., Inyang I.D and Leong S., 1995. Distribution and Effect of Grape Maturity on Organic Acid Content of Red Muscadine Grapes. J.Agric. FoodGhem., 43: 3026-3028
- Lapidot T., Harel S., Akiri B., Granit, R., Kanner, J., 1999. pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry
- Laurie S., Bradbury M. and Stewart G.R., 1994. Relationships between leaf temperature, compatible solutes and antitranspirant treatment in some desert plants. Plant Sci. 100:147–156.
- Li M. S., Li S., and Zhang B. L. C., 2005. Physiological effect of new FA antitranspirant on winter wheat at ear filling stage. J. Agric. Sci. China. 4: 820-825.
- Li Y.G., Tanner G., Larkin P., 1996. The Dmaca–HCl Protocol And The Threshold Proanthocyanidin Content For Bloat Safety In Forage Legumes. Journal Of The Science Of Food And Agriculture, 70(1):89 – 101
- Lipe W.N. and Wendt C.W., 2008. Effects of antitranspirants on yield, grade distribution, and water use of potatoes. Am. J. of Potato Res., 55(4): 203-209.
- Loewus F.A., 1980. L-ascorbic acid: metabolism, biosynthesis, function, in The Biochemistry of Plants; A Comprehensive Treatise, Ed by Stumpf PK and Conn EE, Academic Press, New York, pp 77-101
- Loewus M.W., Bedgar D.L., Saito K. and Loewus F.A., 1990. Conversion of L-sorbosone to L-ascorbic acid by a NADP-dependent dehydrogenase in bean and spinach leaf. Plant Physiol 94:1492-1495

- Lolicato S., 2011. Sunburn Protection for Fruit – a practical manual for orchardists in northern Victoria. Department of Primary Industries, Victoria.
- Madani W., Kermasha S., & Bisakowski B., 1999. Inhibition of tyrosinase activity by a polyphenol esterase using selected phenolic substrates. *Phytochemistry*, 52, 1001–1008.
- Marusek C. M., Trobaugh N. M., Flurkey W. H., & Inlow J. K., 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 108–123.
- Masa A., Vilanova M., Pomar F., 2007. Varietal Differences Among The Flavonoid Profile Of White Grape Cultivars Studied By High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* 1164: 291–297
- Masoud A. A. B., 2012. Impact Of Some Antitranspirants On Yield And Fruit Quality Of Hamawy Apricot Trees Grown In Sandy Soils. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 8(2): 78-82
- Mattivi F., Guzzon R., Vrhovsek U., Stefanini M., Velasco R., 2006. Metabolite Profiling Of Grape: Flavonols And Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 7692–7702
- Mayer A.M. and Staples R.C., 2002. Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 551–565.
- Mazza G., Miniati E., 1993. *Anthocyanins In Fruits, Vegetables And Grains*. Ed: Crc, Boca Raton
- Menting J.G.T., Scopes R.K., Stevenson T.W., 1994. Characterization Of Flavonoid 3',5'-Hydroxylase In Microsomal Membrane Fraction Of *Petunia Hybrida* Flowers. *Plant. Physio.*, 106:633-642
- Mercurio M., Smith P.A., 2006. New formats for the methyl cellulose precipitable (MCP) tannin assay allow high throughput measurement of grape and wine tannin by industry. *Technical Review*, 164: 1-10
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7,405–410.
- Mohawesh O.E., Al-Absi K.M., Tadros M.J., 2010. Effect of antitranspirant application on physiological and biochemical parameters of three orange cultivars grown under progressive water deficit. *Adv. Hort. Sci.*, 24(3): 183-194
- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G., Therios, I., 2006. Boron-induced oxidative damage, antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh). *Environ. Exp. Bot.* 56, 54–62.
- Monagas M., Bartolome B., 2009. Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Compounds. *Wine Chemistry and Biochemistry*, Chapter 9A. Ed: Moreno-Arribas M.V.- Polo M.C.
- Morsy M., Abd El- Aal A. M. K. and Abd El- Aal H. A., 2008. Attempts to find the best preharvest treatment required for obtaining the optimum marketable fruits and its effect on storage life of "Manfalouty" pomegranates. I. Evaluating of some soil and foliar treatments on splitting, sunburn, yield and fruit quality. *Minia J. of Agric. Res. & Develop.* 28 (2): 263 - 283.
- Moutinho-Pereira J., Dinis L.T. et al., 2014. Physiological and yield responses of grapevines to kaolin under summer stress.
- Mullins G.M., Bouguet Al. and Williams E.L., 1990. *Biology of grapevine.*, Cambridge University Press, USA.
- Nardi S., Pizzeghello D., Muscolo A. and Vianello A., 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *J. Soil Biol. Biochem.* 34: 1527–1536.
- National Agricultural Statistics Service_United States Department of Agriculture (NASS, USDA)
- Nitzsche P., Berkowitz G.A. and Rabin J., 1991. Development of a seedling-applied antitranspirant formulation to enhance water status, growth, and yield of transplanted bell pepper. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116:405–411.

- Orenes-Piñero E., García-Carmona F., & Sánchez-Ferrer A., 2006. Latent of polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): Purification, activation and some properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2172–2178
- Ortega Meder M.D., Rivas Gonzalo J.C., Vicente J.L., Santosbuelga C., 1994. Differentiation Of Grapes According To The Skin Anthocyanin Composition, 85, pp. 441
- Palliotti A., Panara F., Famiani F., Sabbatini P., Howell S. G., Silvestroni O. and Poni S., 2013. Postveraison Application of Antitranspirant Di-1-*p*-Menthene to Control Sugar Accumulation in Sangiovese Grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 64:3
- Palliotti, A., O. Silvestroni, F. Leoni, and S. Poni. 2012. Maturazione dell'uva e gestione della chioma in *Vitis vinifera*: Processi e tecniche da riconsiderare in funzione del cambiamento del clima e delle nuove esigenze del mercato. *Italus Hortus* 19:1-15.
- Pannala S., Chan T., O'Brien P., Rice-Evans C., 2001. Flavonoid Bring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*
- Pastordel Rio J.L., Kennedy J.A., 2006. Development Of Proanthocyanidins In *Vitis Vinifera*, L. Cv. Pinot Noir Grapes And Extraction Into Wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57(2): 125–132
- Pastrana-Bonill, E., Akoh C.C., Sellappan S., Krewer G, 2003. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.*:51, 5497–4503
- Peppi M.C., Fidelibus M.W., Dokoozlian N., 2006. Absisic Acid Application Timing And Concentration Affect Firmness, Pigmentation And Color Of “Flame Seedless” Grapes, 4: 231
- Pereira G. E., Gaudillere J.P., Pieri P., Hilbert G., Maucourt M., Deborde C., Moing A., Rolin, D., 2006. Microclimate Influence On Mineral And Metabolic Profiles Of Grape Berries. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 6765–6775
- Pietta P.G., 2000. Flavonoids As Antioxidants. *Journal Of Natural Products*, 63: 1035-1042
- Plaut Z., Magril Y. and Kedem U., 2004. A new film forming material, which reduces water vapour conductance more than CO₂ fixation in several horticultural crops. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 79:528–532.
- Poljakoff-Mayber A., Gale J., 2012. Physiological basis and practical problems of reducing transpiration. In: Kozlowski, T.T. (Ed.), *Plant Responses and Control of Water Balance*, vol.3. Academic Press, Inc., New York, pp.277–306.
- Ramsden, C. A. & Riley P. A., 2014. Tyrosinase: the four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22, 2388–2395.
- Ratty A. and Das N., 1988. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*.
- Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A., 2006. *Handbook Of Enology, Volume 1, The Microbiology Of Wine And Vinifications*. Ed: 2nd John Wiley & Sons, Ltd, 43, 66, 243, 244 255, 256
- Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A., 2006. *Handbook Of Enology, Volume 2, The Chemistry Of Wine Stabilization And Treatments*. Ed: 2nd John Wiley & Sons, Ltd, 141, 142
- Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., 1999. *Handbook of Enology, vol. 2.*
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Pagangas G., 1996. Structure and antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*.
- Rinaldi A., Jourdes M., Teissedre P. L., Moio L., 2014. A Preliminary Characterization Of Aglianico (*Vitis Vinifera* L. Cv.) Grape Proanthocyanidins And Evaluation Of Their Reactivity Towards Salivary Proteins. *Food Chemistry*, 164: 142–149
- Ristic R., Illand P.G., 2005. Relationships between seed and berry development of *Vitis Vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 43–58

- Rivero-Perez M.D., Muniz P., Gonzalez-Sanjose M.L, 2008. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 2815–2822.
- Rockenbach I.I., Gonzaga L.V., Rizelio V.M., De Souza Schmidt Gonçalves A.E., Genovese M.I., Fett R., 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, 44: 897–901
- Roggero J.P., Coen S., Larice J.L., 1986. Etude Comparative De La Composition Anthocyanique Des Cepages, 85, pp 440
- Roggero J.P., Coen S., Ragonet B., 1986. High Performance Liquid Chromatography Survey On Changes In Pigment Content In Reopening Grapes Of Syrah. An Approach To Anthocyanin Metabolism. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 77–83
- Rolff M., Schottenheim J., Decker H. & Tuczec F., 2011. Copper-O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: Molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chemical Society Reviews*, 40,4077–4098.
- Romeyer F., Macheix J.J., Sapis J.C., 1986. Changes And Importance Of Oligomeric Procyanidins During Maturation Of Grape Seeds, pp 472
- Rosati A., 2007. Physiological effects of kaolin particle film technology: A review. *Funct. Plant Sci. Biotech.* 1:100-105.
- Roussos P.A and Pontikis C.A., 2001. Phenolic compounds in olive explants and their contribution to browning during the establishment stage in vitro. *Gartenbauwissenschaft*, 66 (6). S. 298-303
- Saito K. and Kasai Z., 1984. Synthesis of L-(-)-tartaric acid from Lascorbic acid via 5-keto-D-gluconic acid in grapes. *Plant Physiol* 76:170-174
- Sarneckis C., Dambergs R.G., Jones P., Mercurio M., Herderich M.J., Smith P., 2006. Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimized tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(1): 39-49
- Scalbert A., 1992. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. *Plant Polyphenols (Basic Life Sciences.)*. Ed: Hemingway RW & Laks P.E., 59: 259-280
- Schultz H.R., 2002. Viticulture and atypical aging. *Proceedings of 32th Annual New York Wine Industry Workshop*.
- Shanan N.T., Shalaby E.A., 2011. Influence of some chemical compounds as antitranspirant agents on vase life of *Monstera deliciosa* leaves. *Afr J Agric Res* 6(1):132–139
- Shellie K., 2015. Foliar reflective film and water deficit increase anthocyanin to soluble solids ratio during berry ripening in Merlot. *Am J Enol Vitic.*; 66: 348–356
- Shellie K.C. and Glenn. D.M. 2008. Wine grape response to foliar particle film under differing levels of preveraison water stress. *HortScience* 43:1392-1397.
- Shellie K.C. and Bradley A. K., 2013. Kaolin Particle Film and Water Deficit Influence Malbec Leaf and Berry Temperature, Pigments, and Photosynthesis. *Am. J. Enol. Vitic.* 64:2
- Smith P.A., 2005. Precipitation of tannin with methyl cellulose allows tannin quantification in grape and wine samples. *Technical Review. The Australian Wine Research Institute, Adelaide, Australia*, 158: 3-7
- Souquet J.M., Cheynier V., Brossaud F., Moutounet M., 1996. Polymeric Proanthocyanidins From Grape Skins. *Phytochemistry*, 43(2): 509–512
- Spranger I., Sun B., Mateus A.M., de Freitas V., Ricardo-da-Silva J.M., 2008. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chem.*, 108, 519–532.
- Squadrito M., Corona O., Ansaldi G., Di Stefano R., 2007. Relazioni fra i percorsi biosintetici degli HCTA, dei flavonoli e degli antociani nella buccia dell'uva, 39, pp 37
- Strack D. and Wray V., 1994. The Anthocyanins. In: Harborne Jb (Ed) *The Flavonoids*. Chapman & Hall/Crc Press, Washington Dc

- Su C., Singleton V.L., 1969. Identification Of Three Flavan-3-Ols From Grapes. *Phytochemistry*, 8: 1553–1558
- Teerapat T. et al., 2014. Photosynthetic performance, carbohydrate contents and yield affected by kaolin particle film application in grape. *International Bioscience Conference and the 5th International PSU-UNS Bioscience Conference*, T1-P6, pp 61-65
- Terriern., Poncet-Legrand C., Cheynier V., 2009. Flavanols, Flavonols And Dihydroflavonols. *Wine Chemistry And Biochemistry*, Chapter 9b. Ed: Moreno-Arribas M.V.-Polo M.C., 465,473
- Thies M. and Fischer R., 1971. A new colour reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4- dimethylaminocinnamaldehyde. *Στο J. Chromatogr.*, 467: 185-193
- Tubajika K.M., Civerolo E.L. et al., 2007. The effects of kaolin, harpin, and imidacloprid on development of Pierce’s disease in grape. *Crop Prot.*; 26: 92–99.
- Vacca R.A., de Pinto M.C., Valenti D., Passarella S., Marra E., De Gara L., 2004. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol.* 134,1100–1112.
- Versari, A., Laurie, V. F., Ricci, A., Laghi, L., Parpinello, G. P., 2014. Progress In Authentication, Typification And Traceability Of Grapes And Wines By Chemometric Approaches. *Food Research International*, 60: 2–18
- Viala P., Vermorel V., 1905. *Traite general d’ ampelographie*, τ. 7, Masson, Paris
- Vidal S., Francis L., Guyot S., Marnet N., Kwiatkowski M., Gawel R., Cheynier V., Waters E.J., 2003. The Mouth-Feel Properties Of Grape And Apple Proanthocyanidins In A Wine-Like Medium. *J. Sci. Food Agric.*, 83: 564–573
- Vivas N.G., Nonier M.F., Guerra C., Vivas N., 2001. Anthocyanin In Grape Skins During Maturation Of *Vitis Vinifera* L. Cv. Caberent Sauvignon And Merlot Noir From Different Bordeaux Terroirs. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 35: 149–156
- Wang H., Nair M.G.; Strasburg G.M., Chang Y.C., Booren A.M., Gray J.I., De Witt D.L., 1999. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycone, cyaniding, from tart cherries. *Journal of Natural Products*
- Wheeler G.L., Jones M.A. and Smirnoff N., 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393:365-369
- Whitaker J. R., 1972. *Principles of enzymology for the food science*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Wunsche J.N., Lombardini L., Greer D.H., Palmer, J.W. and Woolf A.B., 2002. Surround particle film applications- effect on whole canopy physiology of apple XXVIth international Horticulture Congress & Exhibition, August 11-1 2 p. 565-571, Toronto.
- Yazici K., Karasahin I., Sahin G., Erka, M. and Kaynak I., 2005. Effects of kaolin applications and modified atmosphere conditions on protection in pomegranate. (*Punica granatum* L. cv. Hicaznar). III International Horticultural Crop Protection Congress, September 6-9, Antakya, Turkey.
- Yilmaz Y., Toledo R.T., 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 255–260.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Γερογιάννης Ορέστης, 2017. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας (Ινστιτούτο Οίνου Αθηνών). Μελέτη της αμπελουργικής ζώνης της Νεμέας, Αθήνα, 1997
- Ζαχαροπούλου Χ., 2016. Επίδραση Του Υποκειμένου Στην Διακύμανση Της Συγκέντρωσης Των Αμινοξέων Και Φαινολικών Συστατικών Των Ποικιλιών Σαββατιανό Και Ασύρτικο – Μελέτη Αμινοξέων Και Φαινολικού Δυναμικού Ορισμένων Ελληνικών Ποικιλιών Οινοποιίας Αμπέλου (*Vitis vinifera* L.). Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 8, 9, 37, 40, 41, 42
- Κανελλοπούλου Ι.Α., 2015. Μελέτη Του Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού Ταννινών Σε Φλοιούς Και Γίγαρτα Της Ποικιλίας Αγιωργίτικο Από Τέσσερις Υποζώνες Της Περιοχής Νεμέας Για Τα Έτη 2012-2013-2014. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 13
- Καρκαλούσος Π., Γεωργίου Ζ., Κρούπης Χ., Παπαϊωάννου Α., Πλαγερης Π., Σπυροπούλου Β., Τσοτσου Γ., Φουντζουλα Χ., 2015. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (Απόδοσης) Στην Κλινική Χημεία. Βασικές Αρχές Και Παραδείγματα. Εργαστηριακές Ασκήσεις Κλινικής Χημείας. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 8: 219-257
- Κόγκκου Χ.Σ., 2014. Επίδραση άρδευσης και διαφυλλικής λίπανσης με απενεργοποιημένους ζυμομύκητες στη χημική σύσταση δειγμάτων σταφυλιών και οίνων *Vitis vinifera* L. cv. Αγιωργίτικο. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Κουνδουράς Σ.Λ., VanLeeuwen C., 2002. Επίδραση παραγόντων του περιβάλλοντος στην οινοποιήσιμη ποικιλία αμπέλου Αγιωργίτικο (*Vitisvinifera*, cvΑγιorgitiko) στην περιοχή Νεμέας. 1.Υδατικό καθεστώς και φυσιολογικές παράμετροι της αμπέλου, Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα 4: 14-27
- Κουράκου - Δραγώνα Σ., 1998. Θέματα Οινολογίας. Εκδ: Τροχαλία, Αθήνα, Στο 7 Σελ. 6-9,37, Στο 47 Σελ. 14, 16, 26-28
- Κριμπάς Β., 1943α. Ελληνική Αμπελογραφία, τόμος 1, Αθήνα.
- Πασπάτης Α.Ε., 1998. Φυτορρυμιστικές ουσίες. Ο ρόλος τους στα φυτά και οι εφαρμογές τους στις καλλιέργειες.
- Πετροπούλου-Καραγιαννοπούλου Σ., Γεωπόνος-Καθηγήτρια ΤΕΙ Πελοποννήσου, Σημειώσεις Αμπελουργίας, Καλαμάτα, 2016
- Σουφλερός Ε.Η., 1997. Οινολογία. Επιστήμη Και Τεχνογνωσία, Τόμος Ι. Θεσσαλονίκη, 66, 191, 205
- Σουφλερός Ε.Η., 2000. Οινολογία : Επιστήμη Και Τεχνογνωσία. Θεσσαλονίκη, 7 Σελ. 38
- Σταυρακάκης Μ., 2013: Αμπελουργία
- Σταυρακάκης Μ., 2013: Αμπελογραφία
- Τσαπάρας Δ.Ι., 2013. Μελέτη Της Επίδρασης Της Λίπανσης Καλίου Στα Φαινολικά Συστατικά Των Ραγών Της Ποικιλίας Αγιωργίτικο Για Το Έτος 2010. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. 82,85
- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και τροφίμων (ΥΠΑΑΤ)