



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
(i) ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ (ii) ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη της επίδρασης του ξεφυλλίσματος στα χαρακτηριστικά
των σταφυλιών και στους παραγόμενους οίνους
από την ερυθρή ποικιλία Λημιό**



Θεόδωρος Ν. Γκριμπίζης

Επιβλέπων καθηγητής:
Γεώργιος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2021

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη της επίδρασης του ξεφυλλίσματος στα χαρακτηριστικά
των σταφυλιών και στους παραγόμενους οίνους
από την ερυθρή ποικιλία Λημνιό**

**“Study of the effect of leafing on the characteristics
of the grapes and the wines produced
from the red variety Limnio”**

Θεόδωρος Ν. Γκριμπίζης

Εξεταστική Επιτροπή:

Γεώργιος Κοτσερίδης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων καθηγητής)
Στέφανος Κουνδουράς, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΑΠΘ
Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη καθηγήτρια ΓΠΑ

Μελέτη της επίδρασης του ξεφυλλίσματος στα χαρακτηριστικά των σταφυλιών και στους παραγόμενους οίνους από την ερυθρή ποικιλία Λημνιό

*ΠΜΣ: Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων. (i) Γαλακτοκομία (ii) Οινολογία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Οινολογίας*

Περίληψη

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο εργαστήριο Οινολογίας, σε συνεργασία με το Κτήμα Γεροβασιλείου την χρονιά 2020-2021. Μελετήθηκε η επίδραση του εντατικού ξεφυλλίσματος κατά την καρπόδεση, στην ποικιλία Λημνιό, τόσο ως προς τα σταφύλια όσο και προς τον παραγόμενο οίνο. Σε οριοθετημένο αμπελώνα του Κτήματος Γεροβασιλείου στην περιοχή της Επανομής, εφαρμόστηκε αφαίρεση των φύλλων (ξεφύλλισμα). Τα μισά φυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας και δεν έγινε αφαίρεση φύλλων, ενώ στα υπόλοιπα έγινε εντατικό ξεφύλλισμα, μετά την καρπόδεση.

Έγιναν μετρήσεις στον αμπελώνα για το υδατικό δυναμικό των φύλλων και για την μεταβολή του μεγέθους των ραγών και των σταφυλών. Επίσης έγιναν μετρήσεις για την επίδραση στον αριθμό των γιγάρτων, το βάρος των γιγάρτων και της φλούδας και το σύνολο των ανθοκυανών με την μέθοδο Glories.

Μετά τον τρύγο, ακολούθησαν μικροοινοποιήσεις με τα παραγόμενα σταφύλια και παράχθηκαν έξι οίνοι, ένας για κάθε πειραματική μονάδα, ή αλλιώς 3 οίνοι για κάθε επέμβαση στο αμπέλι. Στους οίνους αρχικά έγιναν οι βασικές αναλύσεις (ολική οξύτητα, pH, αλκοολικός τίτλος, πτητική οξύτητα, υπολειπόμενα σάκχαρα) καθώς και τα χρωματικά χαρακτηριστικά (ένταση, απόχρωση) τους. Ακολούθησαν μετρήσεις σχετικά με τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ουσιών, των ανθοκυανών και των τανινών. Συγκεκριμένα έγιναν μετρήσεις του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών, αναλύσεις των ολικών ανθοκυανών, των ολικών φαινολικών, των μονομερών ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία (HPLC) και τέλος μέτρηση της συγκέντρωσης των τανινών μετά από συμπλοκοποίηση τους με αλβουμίνη (BSA) και με μεθυλοκυτταρίνη (MCP). Τέλος ακολούθησε οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων από εκπαιδευμένους δοκιμαστές.

Επιστημονική περιοχή: Οινολογία

Λέξεις κλειδιά: Ξεφύλλισμα, Ποικιλία Λημνιό, φαινολικά συστατικά, τανίνες, ανθοκυάνες, ράγες, Επανομή

Study of the effect of leafing on the characteristics of the grapes and the wines produced from the red variety Limnio

*MSc: Modern Food Technology. (i) Dairy (ii) Oenology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Oenology*

Abstract

The following thesis was completed at the Agriculture University of Athens, in the laboratory of Oenology, in collaboration with Ktima Gerovassiliou in the year 2020-2021. The effect of intense defoliation during fruit set was studied in the Limnio variety, both in terms of grapes and the wine produced. In a limited vineyard of Ktima Gerovassiliou in the area of Epanomi defoliation was applied. Half of the plants from the vineyard were used as controls and no leaves were removed, while the rest were intensively defoliated after fruiting.

Measurements were made in the vineyard for the water potential of the leaves, for the change of the size of berries. Measurements were also made for the effect of defoliation on the number and the weight of the seeds and the skin. On the grapes was measured as well the total anthocyanins by the Glories method.

After the harvest, micro-vinification followed with the produced grapes and six wines were produced, one for each experimental unit, or 3 wines for each intervention in the vineyard. The wines were initially subjected to the basic analyzes (total acidity, pH, alcoholic strength, volatile acidity, residual sugars) as well as their color characteristics (intensity, hue). Measurements of total phenolics, anthocyanins and tannins were performed. Specifically, measurements of the Total Phenolic Index, analyzes of total anthocyanins, total phenolics, monomeric anthocyanins by liquid chromatography (HPLC) and finally measurement of the concentration of tannins after their complexation with albumin (BSA) and methyl-cellulose (MCP). Finally, an organoleptic evaluation of the wines by trained tasters followed.

Scientific area: Oenology

Key words: Defoliation, cv Limnio, phenolic content, tannins, anthocyanins, berries, Epanomi

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract.....	4
1. Εισαγωγή	9
1.1 Ιστορικά στοιχεία	9
1.2 Σταφύλι – Δομή ράγας	10
1.3 Στάδια ανάπτυξης της σταφυλής.....	11
1.4 Πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες στο σταφύλι.....	13
1.4.1 Σάκχαρα	13
1.4.2 Οργανικά οξέα	13
1.4.3 Αζωτούχες ενώσεις	14
1.4.4 Φαινολικά συστατικά.....	14
1.4.5 Ανθοκυάνες.....	15
1.4.6 Τανίνες.....	15
1.5 Οι καλλιεργητικές τεχνικές	16
1.5.1 Κλάδεμα.....	17
1.5.2 Βλαστολόγημα	17
1.5.3 Κορυφολόγημα	18
1.6 Ξεφύλλισμα	18
1.6.1 Γενικά.....	18
1.6.2 Χρόνος εφαρμογής ξεφυλλίσματος	19
1.6.3 Επίδραση του ξεφυλλίσματος στα φυσικά χαρακτηριστικά των σταφυλιών.....	20
1.6.4 Επίδραση του ξεφυλλίσματος στην χημική σύσταση των σταφυλιών	21
1.6.5 Μεθοδολογία παρακολούθησης ωρίμανσης σταφυλών.....	23
1.7 Ερυθρή οινοποίηση.....	23
1.8 Η ποικιλία Λημνιό.....	24
1.8.1 Αμπελογραφικά χαρακτηριστικά.....	24
1.8.2 Περιγραφή σταφυλής.....	25
1.8.3 Χαρακτηριστικά οίνων της ποικιλίας	27
1.8.4 Οίνοι από Λημνιό.....	27
2. Υλικά & Μέθοδοι	28
2.1 Πειραματικός αμπελώνας	28
2.2 Μέθοδοι μετρήσεων αμπελώνα	30

2.2.1 Μετρήσεις μεγέθους ραγών και σταφυλών	30
2.2.2 Μέτρηση υδατικού δυναμικού.....	30
2.3 Μέθοδοι παρακολούθησης πορείας ωρίμανσης	31
2.3.1 Μέτρηση βάρους ραγών	31
2.3.2 Προσδιορισμός σακχάρων με διαθλασιμετρία	31
2.3.3 Προσδιορισμός ογκομετρούμενης/ολικής οξύτητας	32
2.3.4 Μέτρηση pH	32
2.4 Μετρήσεις σταφυλιών στον τρύγο.....	33
2.5 Προσδιορισμός φαινολικής ωρίμανσης σταφυλιών με την μέθοδο Glories..	33
2.6 Πειραματική οινοποίηση	35
2.7 Βασικές αναλύσεις οίνων.....	36
2.7.1 Μέτρηση αλκοολικού βαθμού	36
2.7.2 Μέτρηση ολικής οξύτητας.....	37
2.7.3 Μέτρηση pH	37
2.7.4 Μέτρηση πτητικής οξύτητας	37
2.7.5 Μέτρηση αναγόντων σακχάρων	38
2.8 Μέθοδοι μετρήσεων χρώματος και φαινολικών συστατικών.....	39
2.8.1 Χρωματικά χαρακτηριστικά (Ένταση – Απόχρωση)	39
2.8.2 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ).....	39
2.8.3 Ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu	40
2.8.4 Ολικές Ανθοκυάνες.....	40
2.8.5 Προσδιορισμός ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	41
2.8.6 Προσδιορισμός τανινών με τη μέθοδο BSA.....	45
2.8.7 Προσδιορισμός τανινών με την χρήση MCP (methyl cellulose precipitable)	47
2.9 Οργανοληπτική αξιολόγηση	49
2.10 Στατιστική ανάλυση.....	50
3. Σκοπός της εργασίας.....	51
4. Αποτελέσματα & Συζήτηση	52
3.1 Επίδραση του ξεφυλλίσματος κατά την ωρίμανση στον αμπελώνα.....	52
3.2 Υδατικό δυναμικό	53
3.3 Επίδραση του ξεφυλλίσματος στον τρύγο	54
3.4 Ολικές ανθοκυάνες σταφυλιών – Μέθοδος Glories	60

3.5 Επίδραση του ξεφυλλίσματος στους παραγόμενους οίνους.....	62
3.5.1 Βασικές αναλύσεις οίνων.....	62
3.5.2 Μετρήσεις χρώματος	64
3.5.3 Μετρήσεις φαινολικών συστατικών	66
3.5.4 Ανθοκυάνες οίνων	67
3.5.5 Τανίνες οίνων.....	73
3.6 Οργανοληπτικός έλεγχος	74
5. Συμπεράσματα	78
Βιβλιογραφία	80

Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας αλλά και για όλη την υποστήριξη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους του Εργαστηρίου Οινολογίας και πιο συγκεκριμένα τον καθηγητή και επιβλέποντα της μελέτης, κ.Κοτσερίδη Γεώργιο για την καθοδήγηση και την στήριξη στην εκπόνηση του θέματος και την διενέργεια των εργαστηριακών ασκήσεων. Επίσης τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Κουνδουρά Στέφανο για την υπομονή και την στήριξη κατά την εργασία και φυσικά την κα. Προξενιά Νίκη για την συνεχή βοήθεια στο εργαστήριο και στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το Κτήμα Γεροβασιλείου και όλο το προσωπικό για την ιδιαίτερα σημαντική βοήθεια από την παραχώρηση των σταφυλιών και του εξοπλισμού μέχρι και την καθοδήγηση και στήριξη για την δημιουργία και για τις αναλύσεις των οίνων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την ενθάρρυνση και την βοήθεια σε κάθε μου βήμα.

1. Εισαγωγή

1.1 Ιστορικά στοιχεία

Η άμπελος ανήκει στην οικογένεια των φυτών Vitaceae και το σημαντικότερο είδος της είναι το *Vitis vinifera* εκ του οποίου προέρχεται το 90% του συνόλου της παγκόσμιας παραγωγής σταφυλιών. Η συστηματική καλλιέργεια της αμπέλου ξεκίνησε πριν από περίπου 6000 χρόνια, πράγμα που δείχνει ότι η άμπελος ήταν από τα πρώτα φυτά που καλλιέργησε ο άνθρωπος (Soleas et al.,1997).

Η καλλιέργεια της ξεκίνησε από τις περιοχές του Τίγρη και του Ευφράτη και σταδιακά μετά το πέρας πολλών χιλιάδων χρόνων καλλιεργούνταν και στην Μεσοποταμία, την Συρία και την Αίγυπτο. Στην Ελλάδα το κρασί κατά τα ομηρικά χρόνια ήταν καθημερινό ποτό που καταναλώνονταν κυρίως στα συμπόσια των ηρώων όπως αναφέρεται στην Οδύσσεια και την Ιλιάδα. Στην Ιλιάδα και την Οδύσσεια ο Όμηρος επίσης δίνει πολλές πληροφορίες για τους οίνους, τα κελάρια και την δίψα των ηρώων του. Ο Οράτιος μάλιστα τον ονόμασε «Vinosus Homerus» (Όμηρος ο οινολόγος) λόγω της θέρμης με την οποία τραγουδούσε τα εγκώμια του οίνου (Κουράκου,2013).

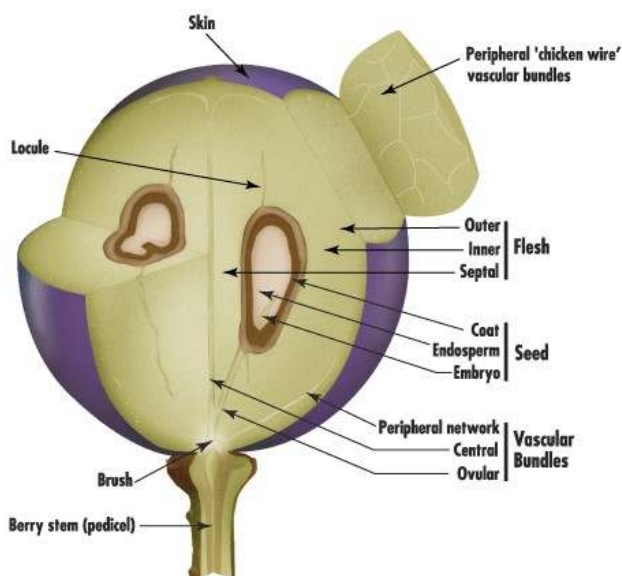
Οι Ρωμαίοι ήρθαν σε επαφή με το κρασί μέσω των Ελλήνων αποίκων και από τους γηγενείς Ετρούσκους και επιδόθηκαν στην αμπελοκαλλιέργεια. Μετά την κατάρρευση της Ρώμης και τις μεταναστεύσεις των λαών η αμπελοργία διέσχισε μια περίοδο ύφεσης. Η διάσωση της αμπελοργίας βασίστηκε σε κληρικούς και μοναχούς που χρειάζονταν το κρασί για τελετουργικούς σκοπούς. Κατά τον Μεσαίωνα η τέχνη του κρασιού γνώρισε ξανά άνθιση (Τσακίρης & Παπούλιας, 1996).

Κατά την βυζαντινή περίοδο οι μεγαλύτερες εκτάσεις αμπελιών ανήκαν στην εκκλησιαστική περιουσία και η καλλιέργεια των αμπελιών και η παραγωγή του κρασιού γινόταν από τους μοναχούς. Στην Δύση σταδιακά το κρασί γνωρίζει μεγάλη ανάπτυξη κατά τον 16^ο αιώνα και αρχίζει η εξάπλωση του σε χώρες όπως η Ισπανία και η Γαλλία. Παράλληλα στο κρασί εισέρχονται αρκετές καινοτομίες όπως η χρήση γυάλινων φιαλών για την αποθήκευση και η χρήση φελλού για το κλείσιμο των φιαλών (Τσακίρης & Παπούλιας, 1996).

Οι ποικιλίες των σταφυλιών διαφοροποιήθηκαν και κατατάχθηκαν σε ποικιλίες και σε κατηγορίες κατά το τέλος του 19^{ου} αιώνα. Σήμερα η αμπελοκαλλιέργεια σε παγκόσμιο επίπεδο στοχεύει στην παραγωγή σταφυλιών με υψηλή ποιότητα, με μικρές στρεμματικές αποδόσεις, καλλιεργώντας ποικιλίες σταφυλιών διεθνείς, αυτόχθονες ή παραδοσιακές (Fregoni,2013).

1.2 Σταφύλι – Δομή ράγας

Η ράγα αποτελεί τον καρπό του φυτού της αμπέλου και για τον σχηματισμό της συμμετέχουν οι ιστοί της ωθήκης. Η ανατομική δομή της ώριμης ράγας (Εικόνα 1, Koytroymanidis, Winetitles) περιλαμβάνει τον φλοιό (10-20%), τη σάρκα (75-90%) και τα γίγαρτα με το αγγειακό σύστημα (3-6%) για τις ποικιλίες που περιέχουν γίγαρτα.



Εικόνα 1: Δομή ράγας σταφυλιού.

Ο φλοιός της ράγας αποτελείται από πηκτίνες, κυτταρίνες, πρωτεΐνες ενώ και το μεγαλύτερο μέρος των οξέων βρίσκεται στο φλοιό υπό μορφή αλάτων. Στον φλοιό επίσης των ερυθρών ποικιλιών, περιέχονται οι ανθοκυάνες που ευθύνονται για το χρώμα των ερυθρών κρασιών. Η επιδερμίδα αποτελείται από 1-2 στρώματα και εκεί βρίσκονται τα αρωματώδη έλαια και οι πρόδρομες αρωματικές ενώσεις που μας δίνουν το χαρακτηριστικό άρωμα της κάθε ποικιλίας. Το μέγεθος της ράγας είναι βασική παράμετρος παρουσίας των προαναφερομένων συστατικών. Με βάση την έρευνα του Hellman (2003), μικρότερες ράγες έχουν καλύτερο χρώμα, τανίνες και αρωματικές ενώσεις σε αντίθεση με μεγαλύτερες ράγες, καθώς οι μικρότερες ράγες έχουν μεγαλύτερο ποσοστό φλοιού στην συνολική μάζα της ράγας. Το ξεφύλλισμα μπορεί να επηρεάσει το βάρος των φλοιών θετικά όταν αυτό γίνεται σε προανθικό στάδιο. Μάλιστα σύμφωνα με τους Roni et al, 2009 το βάρος των φλοιών σε ξεφυλλισμένα φυτά, αυξήθηκε ανεξάρτητα από το τελικό βάρος των ραγών.

Κάτω από τον φλοιό του σταφυλιού βρίσκεται η σάρκα η οποία αποτελείται από το μεσοκάρπιο και από το ενδοκάρπιο. Το μεσοκάρπιο της σάρκας αποτελείται από ένα παρέγχυμα με λεπτά τοιχώματα (Hardie et al, 1996), τα κύτταρα της σάρκας είναι στρογγυλά με μεγάλα κυτταρικά κενά, τα οποία αποτελούν τις κύριες αποθήκες των

σακχάρων, των φαινολικών (Jackson et al,2000), του νερού και των οργανικών οξέων κατά την ωρίμανση της ράγας (Keller et al,2015). Στο ενδοκάρπιο βρίσκεται μια οριοθετημένη στοιβάδα κυττάρων που περικλείουν τα γίγαρτα και είναι πιο πλούσιο σε οξέα και λιγότερο φτωχό σε σάκχαρα. Στις οινοποιήσιμες ποικιλίες τα τοιχώματα της σάρκας είναι συνήθως λεπτά για να γίνεται πιο εύκολα η απελευθέρωση του χυμού κατά την πίεση των σταφυλιών.

Τα γίγαρτα αποτελούν τα όργανα αναπαραγωγής της αμπέλου, κατά τον εγγενή πολλαπλασιασμό. Οι σπόροι των σταφυλιών βρίσκονται σε συγκεκριμένη τοποθεσία και περιβάλλονται από ένα εξωτερικό κάλυμμα, το ενδοσπέρμιο και το έμβρυο. Ο ιδανικός και φυσιολογικός αριθμός γιγάρτων στην ράγα είναι τέσσερα (Keller et al, 2015), λόγω όμως διάφορων παραγόντων όπως η ελλιπής γονιμοποίηση ωαρίων ή η άμβλωση των ωοθηκών, ο αριθμός των γιγάρτων μπορεί να είναι μικρότερος και γενικά να επηρεαστεί το μέγεθος των ραγών, με αποτέλεσμα και το μικρότερο μέγεθος ράγας (Hellman et al, 2013). Στο κάλυμμα των σπόρων, παρατηρείται μεγάλο ποσοστό τανινών και όπως στις τανίνες και τις φαινόλες που υπάρχουν στην σάρκα της ράγας, οι τανίνες πέφτουν με υψηλότερο βαθμό ανά ράγα, μετά τον περκασμό (Conde et al, 2007). Τα γίγαρτα προέρχονται από την γονιμοποίηση των σπερματικών βλαστών και περιβάλλονται από το εσωτερικό ενδοκάρπιο, το μεσοκάρπιο δηλαδή την σάρκα και από το εξωκάρπιο ή αλλιώς τον φλοιό (Jackson et al,2000)(Keller et al, 2015). Τα γίγαρτα επίσης αποτελούν πηγή αυξητικών παραγόντων (αμπισικό οξύ, γιββεριλλίνες) και ακόμη περιέχουν ελαιώδεις ουσίες οι οποίες δεν είναι επιθυμητές κατά την οινοποίηση και για τον λόγο αυτό πρέπει να αποφεύγεται η έκθλιψη των γιγάρτων (Σουφλερός, 2015).

1.3 Στάδια ανάπτυξης της σταφυλής

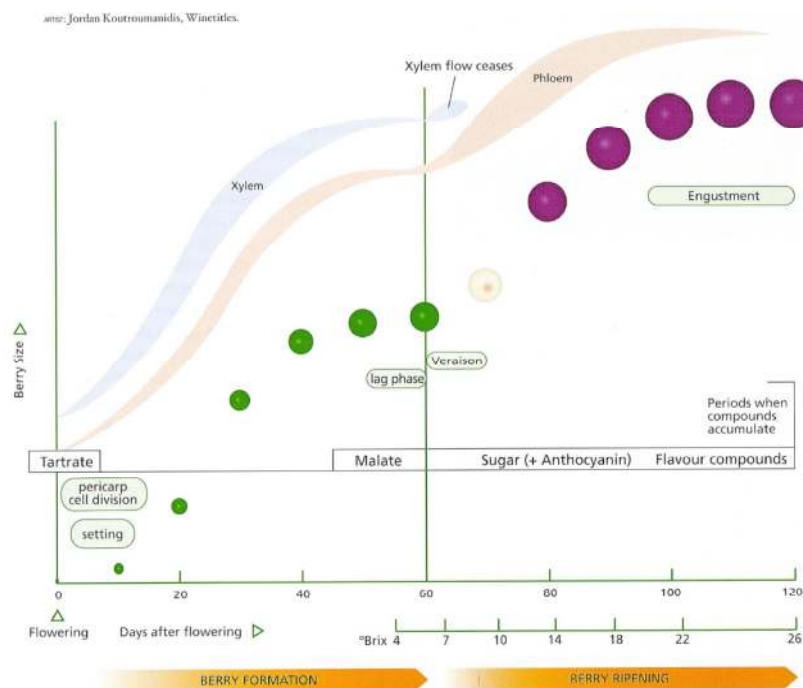
Η διαμόρφωση και η ανάπτυξη του σταφυλιού, ακολουθεί μια διπλή σιγμοειδή καμπύλη με τρεις διαφορετικές φάσεις (Jackson et al, 2000). Η κάθε φάση επιδρά διαφορετικά στην σύσταση των ραγών και στην συσσώρευση των τελικών συστατικών του σταφυλιού.

Η πρώτη φάση διαρκεί από την καρπόδεση ως πριν τον περκασμό (45-65 ημέρες). Κατά την διάρκειά της παρατηρείται έντονη κυτταρική διαίρεση η οποία διαρκεί περίπου 5-6 εβδομάδες μετά την άνθηση. Περίπου δύο εβδομάδες μετά την άνθιση παρατηρείται επίσης αύξηση του μεγέθους της ράγας η οποία συνεχίζεται μέχρι το τέλος της φάσης. Η ράγα αυξάνεται σε μέγεθος και συσσωρεύει διαλυτές ουσίες όπως το τρυγικό και μηλικό οξύ, ενώ η συσσώρευση των σακχάρων είναι σε μικρότερο βαθμό. Το τρυγικό και το μηλικό οξύ συσσωρεύονται στο φλοιό και στην σάρκα των ραγών αντίστοιχα και είναι ιδιαίτερα σημαντικά οξέα για την οινοποίηση. Οι τανίνες επίσης συσσωρεύονται κατά την πρώτη φάση της ανάπτυξης των ραγών και παρουσιάζονται τόσο στο φλοιό όσο και στα γίγαρτα των ραγών (Kennedy,2002).

Η δεύτερη φάση είναι μικρότερη από την πρώτη, διαρκεί από την φάση της παύσης της ανάπτυξης, έως τον περκασμό (8-15 μέρες). Θεωρείται ως μια φάση παύσης της αύξησης του μεγέθους των ραγών, ωστόσο για τους σπόρους των ραγών είναι μια φάση ραγδαίας ανάπτυξης. Κατά την αρχή της δεύτερης φάσης οι ράγες έχουν φτάσει περίπου στο μισό του τελικού τους μέγεθος. Προς το τέλος της δεύτερης φάσης ξεκινά πάλι η συσσώρευση οξέων και τανινών τα οποία φτάνουν στα ανώτατα όρια τους στο στάδιο του περκασμού.

Η τρίτη φάση η οποία διαρκεί από την φυσιολογική ωρίμανση ως την τεχνολογική ωριμότητα (35-55 μέρες), περιλαμβάνει την αύξηση της ελαστικότητας του φλοιού με αποτέλεσμα οι ράγες να γίνονται μαλακές, ενώ ακόμη περιλαμβάνει την αλλαγή του χρώματος των ραγών. Η συσσώρευση των σακχάρων στην τρίτη φάση είναι αρκετά έντονη, ενώ παράλληλα ξεκινά και η μείωση των οξέων. Το μηλικό οξύ μειώνεται διαρκώς μετά το στάδιο του περκασμού μέχρι και το τέλος της ωρίμανσης, ωστόσο εξαρτάται αρκετά από τις κλιματικές συνθήκες. Οι τανίνες των γιγάρτων επίσης μειώνονται μετά το στάδιο του περκασμού λόγω της οξειδωσης. Κατά την τελική φάση της ανάπτυξης των ραγών, διπλασιάζεται το μέγεθος τους και σταδιακά παίρνουν το τελικό τους χρώμα. Οι ράγες φτάνουν στο τελικό τους μέγεθος περίπου 30 μέρες πριν τον τρύγο (Keller,2010).

Στην εικόνα 2 φαίνεται το σχετικό μέγεθος και το χρώμα των ραγών σε διαστήματα 10 ημερών μετά την ανθοφορία, περνώντας από τα κύρια στάδια ανάπτυξης (πράσινοι και ιώδεις δίσκοι). Επίσης, φαίνονται οι περίοδοι κατά τις οποίες συσσωρεύονται ενώσεις, τα επίπεδα σακχάρων ($^{\circ}$ Brix) και μια ένδειξη του ρυθμού εισροής του χυμού στα αγγεία του ξυλώδους ιστού και του ηθμού της ράγας (Koutroumanidis, Winetitles).



Εικόνα 2: Στάδια ανάπτυξης της ράγας.

1.4 Πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες στο σταφύλι

1.4.1 Σάκχαρα

Μια από τις βασικές παραμέτρους στην ωρίμανση των ραγών είναι η συγκέντρωση των σακχάρων με την μορφή της γλυκόζης και της φρουκτόζης. Η συγκέντρωση των σακχάρων είναι συχνά ο πιο σημαντικός παράγοντας, που καθορίζει την ωριμότητα και την χρονική στιγμή του τρύγου. Κατά την ωρίμανση των ραγών, μέσω της φωτοσύνθεσης παράγεται σακχαρόζη και μεταφέρεται στην ράγα (Conde et al, 2007). Επίσης, κατά την ωρίμανση, οι ράγες συγκεντρώνουν ίδια ποσότητα γλυκόζης και φρουκτόζης. Στον περκασμό ωστόσο, ξεκινά η συγκέντρωση σακχάρων και η εισερχόμενη σακχαρόζη μετατρέπεται σε εξόζες, ως αποτέλεσμα των ιμβερτασών. Ωστόσο η τελική συγκέντρωση των σακχάρων στις ράγες εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως ο γενότυπος (Dai et al, 2011), η διαχείριση των αμπελώνων και οι κλιματικές συνθήκες (Mira de Orduna, 2010).

Παρότι όμως το σύνολο των σακχάρων είναι προϊόν της φωτοσύνθεσης, ένα φυτό με αυξημένη ζωηρότητα και περισσότερα φύλλα δεν θα έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση σακχάρων. Στην περίπτωση αυτή θα δημιουργείται αλληλοσκίαση των φύλλων μειώνοντας έτσι την καθαρή φωτοσύνθεση, ενώ επίσης σε τέτοιες συνθήκες αυξάνεται ο ανταγωνισμός των σταφυλιών και των βλαστών για τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης με αποτέλεσμα να φτάνουν λιγότερα σάκχαρα στις ράγες.

1.4.2 Οργανικά οξέα

Τα δύο βασικά οξέα που συναντώνται στις ράγες και αποτελούν περίπου το 90% του συνόλου των οργανικών οξέων σε ώριμα σταφύλια, είναι το τρυγικό οξύ και το μηλικό οξύ (Kanellis et al, 1993) (Lamikara et al, 1995). Άλλα επίσης οξέα που συναντώνται σε μικρότερες ποσότητες είναι το κιτρικό, το ηλεκτρικό, το γαλακτικό και το οξικό οξύ. Η συγκέντρωσή τους ωστόσο είναι σε πολύ χαμηλά ποσοστά (Kliwer, 1966).

Η συγκέντρωση των οξέων στις ράγες, λαμβάνει δράση κατά τον σχηματισμό της ράγας. Το σύνολο των οργανικών οξέων φτάνει στο ανώτερο όριο του στον περκασμό και μετά το στάδιο αυτό ξεκινάει η μείωση των οργανικών οξέων. Η περιεκτικότητα των οργανικών οξέων στην ράγα, εξαρτάται από την ισορροπία που υπάρχει μεταξύ της σύνθεσης τους και της υποβάθμισης τους. Το τρυγικό οξύ είναι το κύριο οξύ από το στάδιο του περκασμού έως και την πλήρη ωρίμανση της ράγας, ενώ από την άλλη, το μηλικό οξύ αυξάνεται μέχρι τον περκασμό και μετά από αυτό το στάδιο ξεκινάει η μείωση του με την ωρίμανση (Kanellis et al, 1993).

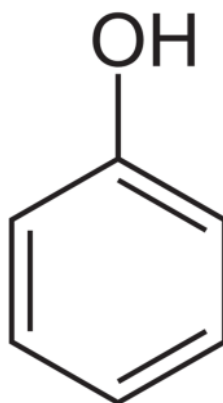
Είναι πολλοί οι παράγοντες που επιδρούν στο σύνολο των οργανικών οξέων στην ράγα όπως, η ποικιλία του σταφυλιού και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες. (Jackson,1993). Το ξεφύλλισμα δεν αποτελεί έναν κυρίαρχο παράγοντα στην επίδραση της οξύτητας καθώς υπάρχουν μελέτες με διαφορετικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα σύμφωνα με τον Poní *et all* (2008) το ξεφύλλισμα προανθικά μείωσε την οξύτητα σε σταφύλια της ποικιλίας Lambrusco ενώ σε έρευνα των Sivilotti *et al* (2016) το ξεφύλλισμα δεν επηρέασε την οξύτητα.

1.4.3 Αζωτούχες ενώσεις

Στο σταφύλι περιέχονται αζωτούχες ενώσεις που περιλαμβάνουν, τα κατιόντα αμμωνίου και ενώσεις οργανικού αζώτου, όπως τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα. Με την ωρίμανση των ραγών το οργανικό άζωτο αυξάνεται και η σύνθεση των αμινοξέων, των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών εμφανίζονται τις τελευταίες 6-8 εβδομάδες της ωρίμανσης των ραγών.(Wermelinger,1999). Τα κύρια ελεύθερα αμινοξέα των σταφυλιών είναι η προλίνη, η αργινίνη και αυτά με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις είναι η αλανίνη, το ασπαρτικό οξύ και το γλουταμικό οξύ. Σε όλες τις ποικιλίες σταφυλιών η συγκέντρωση της προλίνης γίνεται κοντά στην ωρίμανση, σχεδόν τέσσερις μήνες μετά τον περκασμό. Η συγκέντρωση της αργινίνης ξεκινά πριν τον περκασμό και συνεχίζει μέχρι την ωρίμανση.

1.4.4 Φαινολικά συστατικά

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,1998). Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα των παραγόμενων οίνων, καθώς είναι υπεύθυνες για τα περισσότερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (χρώμα, στυπτικότητα, δομή, ικανότητα παλαίωσης).



Εικόνα 3: Δομή φαινόλης

Οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν στο σύνολο των δευτερογενών μεταβολιτών, που υπάρχουν στα σταφύλια και κυρίως στον φλοιό και τα γίγαρτα, καθώς και στους ποδίσκους των σταφυλιών (Lorrain et al, 2009). Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα φλαβονοειδή και τα μη-φλαβονοειδή. Στα μη-φλαβονοειδή συγκαταλέγονται τα φαινολικά οξέα, ενώ στα φλαβονοειδή κυριαρχούν οι φλαβονόλες, οι ανθοκυάνες και οι προανθοκυανιδίνες (Hernandez-Jimenez et al, 2009). Κατά την διάρκεια της οινοποίησης πρώτα εκχυλίζονται τα φαινολικά συστατικά των φλοιών και ακολουθούν αυτά των γιγάρτων πολύ αργότερα προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης καθώς για την εκχύλιση τους απαιτείται η παρουσία αλκοόλης η οποία επιδρά στην διαπερατότητα της μεμβράνης των γιγάρτων.

1.4.5 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι υπεύθυνες για το κόκκινο χρώμα στις ερυθρές ποικιλίες και συγκεντρώνονται στον φλοιό των σταφυλιών. Οι ανθοκυάνες εντοπίζονται στις 2-3 πρώτες στοιβάδες του φλοιού και η συγκέντρωσή τους γίνεται μετά τον περκασμό και φτάνει στο ανώτατο ποσοστό τους κοντά στον τρύγο. Μετά το στάδιο της ωρίμανσης και στο στάδιο της υπερωρίμανσης οι ανθοκυάνες μπορεί να εμφανιστούν και στην σάρκα λόγω διάχυσης από τα κύτταρα του φλοιού. Το είδος καθώς και η συγκέντρωση των ανθοκυανών στον φλοιό των ραγών, είναι υπεύθυνο για το χρώμα του οίνου, ωστόσο η τελική συγκέντρωσή τους επηρεάζεται σημαντικά από παράγοντες όπως το κλίμα, η ηλιακή ακτινοβολία, το έδαφος και η άρδευση του εδάφους. Το προφίλ των ανθοκυανών της κάθε ποικιλίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση τους (Cheynier et al, 2006). Η βιοσύνθεση τόσο των ανθοκυανών αλλά και των φλαβονολών, ρυθμίζονται από ένζυμα τα οποία είναι ευαίσθητα στην ηλιακή ακτινοβολία και στην θερμοκρασία (Downey et al, 2003) (Hunter et al, 1991). Επομένως οποιαδήποτε αλλαγή στο μικροκλίμα των σταφυλιών, όπως για παράδειγμα το ξεφύλλισμα, μπορούν να επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στην σύνθεση και στην συγκέντρωση των ανθοκυανών και των φλαβονολών στις ράγες.

1.4.6 Τανίνες

Οι τανίνες στο σταφύλι κατανέμονται στα στερεά τμήματα της ράγας και πιο συγκεκριμένα στα γίγαρτα (65%), στους βόστρυχες (22%), στους φλοιούς (12%) και ένα μικρό ποσοστό βρίσκεται στην σάρκα (1%). Οι προανθοκυανιδίνες είναι γνωστές και ως συμπυκνωμένες τανίνες, είναι πολυμερή που συναντώνται στο φλοιό και στα γίγαρτα των ραγών. Οι τανίνες είναι υπεύθυνες για την στυπτικότητα και την πικρή αίσθηση των ερυθρών οίνων. Μεταξύ τους οι τανίνες του φλοιού και αυτές των

γυγάρτων διαφέρουν όχι μόνο ως προς το μέγεθος και την ποσότητα τους αλλά διαφέρουν και ως προς την επίδραση τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων. Τα γύγαρτα είναι πιο πλούσια σε τανίνες μη πολυμερισμένες δίνοντας μια πικρή γεύση, σε αντίθεση με τις πολυμερισμένες τανίνες των φλοιών που συμβάλουν πιο έντονα στην στυπτικότητα των οίνων.

Η συγκέντρωση των τανινών ξεκινά μετά την άνθιση κατά την ανάπτυξη της ράγας και φτάνουν στο ανώτατο όριο τους στον περκασμό (Koundouras,2018). Στους νεαρούς οίνους οι πιο πολλές προανθοκυανιδίνες απαντώνται σε διμερή ή τριμερή μορφή και κατά την διάρκεια της παλαίωσης, ενώνονται με άλλα μονομερή φλαβονοειδή σχηματίζοντας πολυμερισμένες τανίνες. Οι τανίνες ωστόσο μπορεί να είναι και υδρολυόμενες και να αποτελούνται από ένα μόριο γλυκόζης και να είναι εστεροποιημένες συνήθως με φαινολικά οξέα όπως το γαλλικό οξύ και το ελλαγικό οξύ. Ωστόσο οι υδρολυόμενες τανίνες δεν συναντώνται φυσικά στα σταφύλια, αλλά προέρχονται είτε από την λιγνίνη των βαρελιών είτε σε σκευάσματα που χρησιμοποιούνται για την κατεργασία των οίνων. Οι υδρολυόμενες τανίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στους παλαιωμένους οίνους καθώς προστατεύουν από οξειδώσεις ενώ επίσης βελτιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Στην περίπτωση παλαίωσης σε βαρέλι, η σύνθεση των υδρολυόμενων τανινών εξαρτάται και από το βοτανικό είδος της βελανιδιάς που χρησιμοποιείται στην κατασκευή του βαρελιού (Glories,et al.,2006).

1.5 Οι καλλιεργητικές τεχνικές

Οι περισσότερες καλλιεργητικές τεχνικές που εφαρμόζονται στον αμπελώνα επικεντρώνονται στην αύξηση της έκθεσης στον ήλιο και στην καλύτερη κυκλοφορία του αέρα μέσα στο φύλλωμα, εξαιτίας των προνομίων που αυτά προσφέρουν. Πιο συγκεκριμένα τα πλεονεκτήματα από τις κατάλληλες καλλιεργητικές τεχνικές είναι, η μειωμένη υγρασία, η μείωση των μυκητολογικών και βακτηριακών προσβολών (Emmett et al, 1992), η αύξηση της θερμοκρασίας της σταφυλής, η αύξηση της συγκέντρωσης μεταβολιτών και η βελτίωση της ποιότητας του παραγόμενου οίνου (Bordelon et al, 2008). Γενικά επιδιώκεται βελτίωση του μικροκλίματος γύρω από τα σταφύλια. Συνολικά, μέσω των καλλιεργητικών τεχνικών οι αμπελουργοί προσπαθούν να πετύχουν ισορροπία μεταξύ της ζωνρότητας της αμπέλου και της ποιότητας των παραγόμενων σταφυλιών.

Οι κατηγορίες των αμπελοκομικών τεχνικών και επεμβάσεων χωρίζονται σε μόνιμες και εποχιακές. Στις μόνιμες περιλαμβάνονται η τοποθεσία του αμπελώνα, η ποικιλία και το υποκείμενο, η πυκνότητα φύτευσης, ο προσανατολισμός των γραμμών καθώς και το σχήμα διαμόρφωσης. Ενώ στις εποχιακές αμπελοκομικές τεχνικές και επεμβάσεις, συμπεριλαμβάνεται το χειμερινό κλάδεμα, οι θερινές επεμβάσεις στη βλάστηση και την παραγωγή, η άρδευση, η λίπανση, η διαχείριση του εδάφους και η

φυτοπροστασία. Οι μόνιμες αμπελοκομικές επεμβάσεις γίνονται κατά την εγκατάσταση του αμπελώνα και εξαρτώνται κυρίως από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, ενώ οι εποχιακές επεμβάσεις μπορεί να διαφέρουν από την μια καλλιεργητική περίοδο στην άλλη.

Πρακτικές όπως το ξεφύλλισμα, η άρδευση, ο διαφυλλικός ψεκασμός, ή ο ψεκασμός εξωγενών ενώσεων και ο πράσινος τρύγος, μπορούν να επηρεάσουν τον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό. Κάποιες φορές μπορεί να έχουν άμεση επιρροή στο αρωματικό προφίλ των σταφυλιών. Συνήθως ο πρωτογενής μεταβολισμός επηρεάζεται πρώτος, ο οποίος ύστερα μπορεί να επηρεάσει το αρωματικό προφίλ έμμεσα (Alem et al, 2018).

1.5.1 Κλάδεμα

Το κλάδεμα είναι μια από τις βασικότερες καλλιεργητικές τεχνικές. Ως κλάδεμα ορίζεται η οποιαδήποτε αφαίρεση ζωντανών τμημάτων ενός φυτού, η οποία επηρεάζει τη φυσιολογία του φυτού. Το κλάδεμα που γίνεται κατά την χειμερινή περίοδο ανάπαυσης του φυτού, λέγεται χειμερινό κλάδεμα. Τα κλαδέματα που γίνονται κατά την θερινή περίοδο στα ποώδη τμήματα των φυτών είναι γνωστά ως θερινά κλαδέματα και σε αυτά περιλαμβάνονται το ξεφύλλισμα, το βλαστολόγημα και το κορφολόγημα (Νικολάου, 2011). Απώτερος σκοπός των συγκεκριμένων επεμβάσεων, είναι ο έλεγχος της ζωηρότητας και η διαμόρφωση του μικροκλίματος των αμπελώνων. Με την εφαρμογή του κλαδέματος στόχος είναι να μειωθεί η ακροτονία του φυτού και να διατηρηθεί το σχήμα του, να κατανεμηθεί το δυναμικό βλάστησης και παραγωγής και να ρυθμιστεί η πυκνότητα των βλαστών (Νικολάου,2011).

1.5.2 Βλαστολόγημα

Το βλαστολόγημα είναι η αφαίρεση των νεαρών βλαστών μετά την εκβλάστηση τους, οι οποίοι εκπτώσσονται σε ακατάλληλες θέσεις και δεν είναι αναγκαίοι. Εφαρμόζεται κατά την διαμόρφωση των νεαρών φυτών όπου αφαιρούνται έγκαιρα βλαστοί οι οποίοι δεν χρησιμεύουν και θα αφαιρεθούν κατά το χειμερινό κλάδεμα που ακολουθεί. Με την αφαίρεση αυτών των βλαστών αυξάνεται η ζωηρότητα των βλαστών που παραμένουν στο φυτό. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως αυξημένης ζωηρότητας, η αφαίρεση των ενός πολύ μεγάλου μέρους τέτοιων βλαστών οδηγεί και στην υπερβολική ζωηρότητα των βλαστών που παραμένουν με αποτέλεσμα την έντονη σκίαση και την μείωση της γονιμότητας των οφθαλμών (Νικολάου,2011).

1.5.3 Κορυφολόγημα

Η συγκεκριμένη επέμβαση γίνεται στον αμπελώνα κατά την βλαστική περίοδο με στόχο την αφαίρεση ενός τμήματος του βλαστού με μήκος 2cm από την κορυφή ή πολλές φορές με μήκος μεγαλύτερο ώστε να φτάνει μέχρι το μεσογονάτιο διάστημα πάνω από την τελευταία ταξιανθία.

Όταν το κορυφολόγημα εφαρμόζεται πριν την άνθιση επιτυγχάνεται ένα σταμάτημα της αύξησης των βλαστών. Αυτό έχει θετικά αποτελέσματα στην καρπόδεση και τελικά στην αύξηση της παραγωγής. Το βλαστολόγημα μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλες χρονικές περιόδους με διαφορετικά οφέλη. Κατά κύριο λόγο όμως όταν το κορυφολόγημα γίνεται πολύ έντονα και αφαιρούνται μεγάλα τμήματα του φυτού, μειώνεται δραστικά η φωτοσυνθετική επιφάνεια των φυτών (Νικολάου,2011).

Περισσότερα στοιχεία δίνονται παρακάτω για το **ξεφύλλισμα**, την τεχνική στην οποία βασίστηκε η παρούσα μελέτη.

1.6 Ξεφύλλισμα

1.6.1 Γενικά

Το ξεφύλλισμα είναι μια συχνή αμπελουργική επέμβαση στο βλαστικό φύλλωμα των φυτών που έχει ως στόχο την βελτίωση του μικροκλίματος γύρω από τα σταφύλια, την ενίσχυση της ωρίμανσης των σταφυλιών, την μείωση των μυκητολογικών ασθενειών και την καλύτερη εφαρμογή των φυτοφαρμάκων στο φυτό.

Όταν το ξεφύλλισμα γίνεται πριν την καρπόδεση χαρακτηρίζεται πρώιμο ενώ όταν η επέμβαση γίνει μετά τον περκασμό, χαρακτηρίζεται όψιμο. Πρόκειται για την αφαίρεση ενός αριθμού φύλλων από την βάση των βλαστών με σκοπό την καλύτερη έκθεση των σταφυλιών στον ήλιο (Νικολάου, 2011). Ανάλογα με τον αριθμό των φύλλων που αφαιρούνται διαφέρει και κατά την ένταση του. Ως ήπιο ή ελαφρύ ξεφύλλισμα καλείται η επέμβαση κατά την οποία δεν αφαιρούνται όλα τα φύλλα κάτω από την πρώτη σταφυλή, αλλά διατηρούνται 1-2 φύλλα, ενώ από την άλλη όταν αφαιρούνται όλα τα φύλλα κάτω από την πρώτη σταφυλή και 1-2 φύλλα πάνω από την πρώτη σταφυλή τότε το ξεφύλλισμα ονομάζεται εντατικό ή αυστηρό. Το ξεφύλλισμα ακόμη μπορεί να διαφέρει ως προς το αν είναι μονόπλευρο ή αμφίπλευρο, αλλά και στον τρόπο εφαρμογής του, αν είναι δηλαδή γίνεται με την χρήση μηχανημάτων (μηχανικό) ή χειρωνακτικά.



Εικόνες 4, 5: Ξεφύλλισμα με χειρωνακτικό και μηχανικό τρόπο

Με την αφαίρεση των φύλλων από το φυτό περιορίζεται η συνολική φωτοσυνθετική επιφάνεια του φυτού, επομένως μειώνεται και ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης αλλά μειώνονται και τα φωτοσυνθετικά προϊόντα. Το φυτό όμως προσπαθεί να επιφέρει την ισορροπία και να αναπληρώσει τις απώλειες των οργάνων που λειτουργούν ως πηγές θρεπτικών συστατικών και μεταφέρει θρεπτικά συστατικά από διπλανά φύλλα ή από άλλους βλαστούς για να καλύψει τις ανάγκες του (Quinlan & Weaver, 1970). Όταν η εφαρμογή του ξεφυλλίσματος γίνεται στο φυτό πριν από το στάδιο του περκασμού τότε γίνεται έκπτυξη μεσοκάρδιων βλαστών, τα φύλλα των οποίων φωτοσυνθέτουν δυναμικά και πάνω σε αυτά βασίζεται η ωρίμανση των ραγών. Αυτό δείχνει ότι τα φύλλα του βασικού τμήματος του βλαστού επιδρούν περισσότερο στην φωτοσύνθεση σε σύγκριση με τα φύλλα του ανώτερου μέρους των βλαστών (Petrie et al., 2003).

Ο βασικός στόχος του ξεφυλλίσματος είναι να αυξηθεί η έκθεση των σταφυλιών στην ηλιακή ακτινοβολία, πράγμα που σημαίνει ότι αυτόματα θα ανέβει η θερμοκρασία των σταφυλιών και το αποτέλεσμα των δύο αυτών συνθηκών θα είναι, να επηρεάσει τον μεταβολισμό των σταφυλιών και επομένως την σύσταση τους και την ποιότητα τους (Sternad Lemut et al, 2013) (Baino et al, 2015) (Osrecak et al, 2016) (Reynolds et al, 1996). Οι μεταβολές που επέρχονται στα σταφύλια από το ξεφύλλισμα οφείλονται ακόμη στο μικροκλίμα γύρω από τις ράγες, στην αλλαγή της αναλογίας του φυλλώματος προς την παραγωγή, στην ικανότητα αφομοίωσης των φύλλων που παραμένουν στο φυτό, στο μέγεθος της ράγας, καθώς και στην αναλογία του φλοιού προς την σάρκα (Diago et al, 2012).

1.6.2 Χρόνος εφαρμογής ξεφυλλίσματος

Ο χρόνος της εφαρμογής του ξεφυλλίσματος ποικίλει, καθώς μπορεί να γίνει από πολύ νωρίς, προανθικά δηλαδή, μπορεί να γίνει με τον πιο κλασικό τρόπο, ενδιάμεσα της καρπόδεσης και του περκασμού, ενώ μπορεί να γίνει και μετά το στάδιο του περκασμού. Ο χρόνος την εφαρμογής εξαρτάται από παράγοντες όπως η ποικιλία, η περιοχή φύτευσης και το στυλ του παραγόμενου οίνου καθώς η εφαρμογή του

ξεφυλλίσματος σε διαφορετική χρονική στιγμή θα επιφέρει και διαφορετικά αποτελέσματα.

Η εφαρμογή του ξεφυλλίσματος σε προανθικό στάδιο και με μεγάλη ένταση, αφαίρεση δηλαδή όλων των φύλλων από την βάση μέχρι το έκτο φύλλο, έδειξε πτώση της συνολικής παραγωγής σε ποσοστό 40%, χωρίς αυτό να εξαρτάται από την χρονιά, την ποικιλία και το δυναμικό παραγωγής, σύμφωνα με τους Verdenal et al (2016, 2017, 2018). Παρότι μια πτώση της παραγωγής μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα να μην είναι αναγκαίος ο πράσινος τρύγος αργότερα μειώνοντας έτσι το κόστος της καλλιέργειας, το ξεφύλλισμα πρέπει να γίνεται μετά την καρπόδεση για την αποφυγή εκτεταμένης μείωσης της παραγωγής (Verdenal et al, 2018). Μέσω του ξεφυλλίσματος προανθικά, μειώθηκε σημαντικά ο κίνδυνος καψίματος των ραγών από την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. (Verdenal et al, 2019)

Ο πιο συνηθισμένος χρόνος εφαρμογής του ξεφυλλίσματος, είναι κατά την περίοδο διαμόρφωσης των σταφυλιών, μετά την καρπόδεση και πριν το στάδιο του περκασμού, όπου τα σταφύλια αλλάζουν χρώμα. Κατά το στάδιο αυτό, το φυτό της αμπέλου είναι ακόμα σε φάση ανάπτυξης. Έτσι μπορεί να επιτευχθεί το κατάλληλο μικροκλίμα για τα σταφύλια και να μειωθούν οι προσβολές από Ωίδιο και Βοτρυτή. Όσο πιο έντονο είναι μάλιστα το ξεφύλλισμα τόσο πιο αποτελεσματικό είναι στις μυκητολογικές ασθένειες (Verdenal et al, 2018).

Το ξεφύλλισμα κατά τον περκασμό συμβάλλει στην βελτίωση του φωτοσυνθετικού ισοζυγίου, με την αφαίρεση ηλικιωμένων φύλλων. Απότομη έκθεση όμως των σταφυλιών στον ήλιο μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις, όπως καθυστέρηση της ωρίμανσης των σταφυλιών και αύξηση των συμπτωμάτων ηλιακού καψίματος. Μια καθυστερημένη εφαρμογή του ξεφυλλίσματος, ακριβώς πριν από την συγκομιδή των σταφυλιών, μπορεί να καθυστερήσει την ημερομηνία της συγκομιδής κατά 20-30% σύμφωνα με την Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne (CIVC, 2019).

1.6.3 Επίδραση του ξεφυλλίσματος στα φυσικά χαρακτηριστικά των σταφυλιών

Το ξεφύλλισμα μπορεί να προκαλέσει αρκετές μεταβολές στα φυσικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων σταφυλιών, οι οποίες εξαρτώνται από την ποικιλία, από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την ένταση και το χρόνο της εφαρμογής του ξεφυλλίσματος. Τα φυσικά χαρακτηριστικά στα οποία μπορεί να έχει επιρροή το ξεφύλλισμα είναι το μέγεθος και το βάρος των ραγών, και κατ' αντιστοιχία η συνολική παραγωγή, αλλά και το πάχος των φλοιών.

Η εφαρμογή του ξεφυλλίσματος κοντά στην περίοδο της άνθισης με στόχο την αφαίρεση παλαιότερων φύλλων στην βάση του βλαστού προκαλεί μείωση στο μέγεθος των ραγών σε φυτά της ποικιλίας Sangiovese και Trebbiano σύμφωνα με τον

Poni et al. 2006. Παρότι μερικές έρευνες έχουν δείξει ότι μέσω του ξεφυλλίσματος δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές αλλαγές στο μέγεθος των ραγών (Bledsoe et al, 1988) (Reynolds et al, 1996) (Main et al, 2004), κάποιες άλλες έρευνες έχουν αποδείξει ότι η περιορισμένη ανάπτυξη των ραγών, οφείλεται στην πρώιμη εφαρμογή του ξεφυλλίσματος και στον αριθμό των φύλλων που αφαιρέθηκαν (Caspari and Lang, 1996, Ollat and Gaudillere, 1998).

Η εφαρμογή του ξεφυλλίσματος μπορεί να επηρεάσει το βάρος των ραγών και την συνολική παραγωγή ανά πρέμνο. Η αφαίρεση λιγότερων από έξι φύλλα κατά την εφαρμογή του ξεφυλλίσματος, αποδείχθηκε πως δεν επηρεάζει τον συνολικό όγκο παραγωγής ανά πρέμνο σε φυτά της ποικιλίας Pinot noir (Acimovic et al, 2016). Ωστόσο η εφαρμογή του πρώιμου ξεφυλλίσματος σε φυτά της ποικιλίας Graciano και Carignan μείωσε την συνολική παραγωγή ανά πρέμνο (Tardaquila et al, 2010) και σε φυτά της ποικιλίας Sangiovese μείωσε το βάρος σταφυλής (Intrieri et al, 2008).

Εκτός από τις επιδράσεις του ξεφυλλίσματος στο μέγεθος, το βάρος των ραγών και το σύνολο της παραγωγής, το ξεφύλλισμα μπορεί να επηρεάσει το πάχος των φλοιών των σταφυλιών. Όταν το ξεφύλλισμα γίνεται προανθικά, εξαιτίας της παρατεταμένης έκθεσης των ραγών στην ηλιακή ακτινοβολία το πάχος των φλοιών αυξάνεται (Pastore et al, 2013) δίνοντας έτσι σταφύλια με πιο χοντρή φλούδα και μεγαλύτερη αναλογία φλοιού/σάρκας.

Ωστόσο σχετικά με την ένταση του ξεφυλλίσματος και την παρατεταμένη έκθεση των σταφυλιών στην ηλιακή ακτινοβολία και σε υψηλές θερμοκρασίες, αρκετά πειράματα έχουν αποδείξει ότι πρέπει να αποφεύγεται, ειδικά σε θερμές περιοχές, καθώς υπό αυτές τις συνθήκες μειώνονται σημαντικά πολλές μεταβολικές διεργασίες οι οποίες επιδρούν στην συνολική ποιότητα του τελικού προϊόντος (Petropoulos et al, 2011) (Price et al., 1995) (Downey et al., 2006).

1.6.4 Επίδραση του ξεφυλλίσματος στην χημική σύσταση των σταφυλιών

Οι επιπτώσεις της εφαρμογής του ξεφυλλίσματος στην σύσταση των ραγών δεν είναι πάντοτε σταθερές και δεδομένες καθώς εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες οι οποίοι μπορεί να διαφέρουν όπως ο χρόνος εφαρμογής του, η έντασή του, οι ενδογενείς ιδιότητες της κάθε ποικιλίας αλλά ακόμη και από το σύστημα διαμόρφωσης και τον τρόπο και την συχνότητα άρδευσης των φυτών.

Η συσσώρευση των σακχάρων γίνεται στο φυτό μέσω της φωτοσύνθεσης και προέρχεται από τα ξυλώδη μέρη του φυτού όπως ο βλαστός, αν και η μεγαλύτερη ποσότητα σακχάρων προέρχεται από τα φύλλα του φυτού. Τα κυριότερα σάκχαρα που συσσωρεύονται στις ράγες των σταφυλιών είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη που αποτελούν και τα κυριότερα ζυμώσιμα συστατικά του γλεύκους. Το πολύ πρώιμο

ξεφύλλισμα πέρα από την μείωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης μειώνει και την συγκέντρωση σακχάρων στα σταφύλια (Franzone et al, 2011).

Η ολική οξύτητα του γλεύκους είναι το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων των οξέων, είτε βρίσκονται σε διάσταση είτε όχι, με σπουδαιότερα οργανικά οξέα στο γλεύκος να είναι το μηλικό και το τρυγικό (Σουφλερός, 2015). Το ξεφύλλισμα μπορεί να μειώσει την ολική οξύτητα των ραγών σε σταφύλια της ποικιλίας Cabernet Sauvignon (Petrie et al., 2006) ενώ σε πειράματα που έγιναν σε σταφύλια της ποικιλίας Pinot noir το ξεφύλλισμα δεν επηρέασε την οξύτητα (Kemp, 2010).

Το ξεφύλλισμα είναι ιδιαίτερα ωφέλιμο σε ψυχρές περιοχές καθώς επιτρέπει την έκθεση των σταφυλιών στο φως του ηλίου και έτσι ενισχύεται το σύνολο των φαινολικών συστατικών και των ανθοκυανών στις ποικιλίες (Ristic et al, 2007). Επιπλέον, σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Diago et al (2011), το πρώιμο ξεφύλλισμα αυξάνει την συγκέντρωση των ανθοκυανών και των φλαβονολών σε σταφύλια της ποικιλίας Tempranillo, δίνοντας έτσι μια καλύτερη φαινολική σύσταση και καλύτερο χρώμα των οίνων. Ωστόσο στην ίδια έρευνα αποδείχθηκε ότι μεγαλύτερη επίδραση είχε η μέθοδος του ξεφυλλίσματος καθώς το μηχανικό ξεφύλλισμα είχε μεγαλύτερη επιρροή στην φαινολική σύσταση των οίνων. Για πιο θερμά κλίματα όμως και για τον Ελληνικό αμπελώνα δεν είναι πάντοτε ωφέλιμο το ξεφύλλισμα καθώς η παρατεταμένη έκθεση των σταφυλιών αυξάνει την θερμοκρασία στην ράγα, με αποτέλεσμα να μειώνεται η βιοσύνθεση ανθοκυανών και να δημιουργούνται εγκαύματα στις σταφυλές (Petropoulos et al, 2011).

Παρότι τα περισσότερα αρώματα των οίνων προέρχονται από την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης (δευτερογενή αρώματα), τα αρώματα που προέρχονται από τα σταφύλια (πρωτογενή αρώματα) είναι αυτά που προσδίδουν τα ποικιλιακά αρώματα των κρασιών και καθορίζουν την ποιότητα του οίνου (Ribereau- Gayon et al., 2006). Οι κλιματικές συνθήκες, η θερμοκρασία κατά την ωρίμανση και η έκθεση των σταφυλιών στην ηλιακή ακτινοβολία επιδρούν σημαντικά στα ποικιλιακά αρώματα των σταφυλιών (Giovanelli et al., 2007). Για παράδειγμα, η αυξημένη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία σε σταφύλια της ποικιλίας Riesling, Syrah και Chardonnay αύξησε την συγκέντρωση στα νορισοπρενοειδή (Reynolds et al, 2007) (Fischer, 2007) (Bureau et al, 2000). Από την άλλη, σε πείραμα που έγινε στην ποικιλία Cabernet Sauvignon, τα σταφύλια και οι παραγόμενοι οίνοι που προέρχονταν από μη ξεφυλλισμένα φυτά παρουσίασαν μεγαλύτερη συγκέντρωση της β-δαμασκηνόνης σε σχέση με τα σταφύλια από φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα στην καρπόδεση (Lee et al, 2007).

1.6.5 Μεθοδολογία παρακολούθησης ωρίμανσης σταφυλών

Ο χρόνος της ωρίμανσης των σταφυλιών θεωρείται ένα γενετικά ελεγχόμενο χαρακτηριστικό με υψηλή επίδραση του γενοτύπου (Matheou et al.,1995). Εκτός από τον γενότυπο και άλλοι παράγοντες επηρεάζουν το χρόνο ωρίμανσης των σταφυλιών, όπως το κλίμα, το έδαφος και οι τεχνικές καλλιέργειας που εφαρμόζονται.

Μέσω της παρακολούθησης της ωρίμανσης καθορίζεται ο χρόνος τρυγητού των σταφυλιών. Η τεχνολογική ωριμότητα (αναλογία σακχάρων/οξέων), η αρωματική ωριμότητα και η φαινολική ωριμότητα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για την σωστή επιλογή του χρόνου συγκομιδής των σταφυλιών. Το επίπεδο της κάθε ωριμότητας πρέπει να υπολογίζεται με βάση τα χαρακτηριστικά του επιθυμητού προϊόντος.

Ο έλεγχος της πορείας ωρίμανσης περιλαμβάνει την παρακολούθηση των μεταβολών στο χρώμα των γραμμών, την εξέλιξη του βάρους των ραγών, την διακύμανση της περιεκτικότητας των συστατικών και την ποιοτική κατάσταση. Για την παρακολούθηση των χαρακτηριστικών των σταφυλιών συλλέγεται αντιπροσωπευτικό δείγμα από τον αμπελώνα και μετριοούνται το βάρος των ραγών καθώς συνήθως το μέγιστο βάρος των ραγών συμπίπτει με την πλήρη ωρίμανση, μετριέται η συγκέντρωση σακχάρων με χρήση διαθλασίμετρου και η ολική και η ενεργός οξύτητα. Τα παραπάνω δεδομένα είναι αρκετά για τον ακριβή προσδιορισμό του χρόνου του τρυγητού για τα σταφύλια (Σουφλερός,2012).

1.7 Ερυθρή οινοποίηση

Το πρώτο στάδιο της οινοποίησης ξεκινά με τον εκραγισμό των σταφυλιών. Το εκραγιστήριο αποτελείται από έναν διάτρητο κύλινδρο που περιστρέφεται και από έναν άξονα με πτερύγια που περιστρέφεται και αυτός με αντίθετη όμως φορά. Έτσι οι ράγες χωρίζονται από τα κοτσάνια. Οι ράγες στην συνέχεια συνθλίβονται με την βοήθεια δύο κυλίνδρων οι οποίοι επίσης περιστρέφονται. Κατά την σύνθλιψη των ραγών πρέπει να σπάσει ο φλοιός των ραγών αλλά αποφεύγεται το σπάσιμο των γιγάρτων.

Ο σταφυλοπολτός στην συνέχεια μεταφέρεται με την χρήση αντλίας σε ανοξειδωτες δεξαμενές όπου προσθέτονται οι ζύμες με σκοπό την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Η αλκοολική ζύμωση μπορεί να γίνει και χωρίς την χρήση εμπορικών στελεχών ζυμομυκήτων, αλλά με την χρήση των ζυμών που βρίσκονται στους φλοιούς των σταφυλιών και επομένως στο σταφυλοπολτό. Οι ζύμες καταναλώνουν τα σάκχαρα του σταφυλοπολτού και παράγουν αλκοόλη ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνεται διοξείδιο του άνθρακα το οποίο ανεβάζει τους φλοιούς στην επιφάνεια τον δεξαμενών δημιουργώντας ένα πυκνό «καπέλο» (Weber,2002).

Στα ερυθρά σταφύλια τα συστατικά του ερυθρού χρώματος βρίσκονται στους φλοιούς και επομένως για να πάρει κόκκινο χρώμα το κρασί πρέπει να εκχυλιστούν κατά την οινοποίηση. Για την καλύτερη εκχύλιση των συστατικών των φλοιών στον οίνο γίνεται σπάσιμο του καπέλου είτε με ανάδευση είτε με των φλοιών με το μούστο, είτε με μεταφορά του μούστου στην επιφάνεια της δεξαμενής με την χρήση αντλίας. Ο χρόνος παραμονής των φλοιών με τον μούστο καθώς και οι αναδεύσεις επηρεάζουν το τελικό χρώμα του οίνου.

Αφότου τελειώσει η αλκοολική ζύμωση ο οίνος διαχωρίζεται από τους φλοιούς οι οποίοι μπορούν να οδηγηθούν στο πιεστήριο και να γίνει παραλαβή του οίνου πίεσης, ο οποίος προαιρετικά χρησιμοποιείται στον οίνο.

Η μηλογαλακτική ζύμωση επίσης είναι ένα χαρακτηριστικό της ερυθρής οινοποίησης καθώς κατά την διεργασία αυτή μειώνεται το μηλικό οξύ των οίνων και παράγεται το γαλακτικό οξύ. Η μηλογαλακτική ζύμωση βελτιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ερυθρών οίνων καθώς μαλακώνει την γεύση του οίνου με την αύξηση του γαλακτικού οξέος και επίσης με το πέρας της μηλογαλακτικής ζύμωσης αλλάζει ο αρωματικός χαρακτήρας των οίνων.

Ο οίνος μετά την αλκοολική ζύμωση μπορεί να μεταφερθεί σε βαρέλια εφόσον δεν είναι οίνος άμεσης κατανάλωσης. Τέλος πριν την εμφιάλωση των οίνων γίνονται οι απαραίτητες σταθεροποιήσεις ενώ ακολουθεί η διαύγαση και το φιλτράρισμα των οίνων.

1.8 Η ποικιλία Λημνιό

Το Λημνιό είναι Ελληνική ερυθρή ποικιλία, τα σταφύλια της οποίας χρησιμοποιούνται για οινοποίηση. Είναι από τις αρχαιότερες ποικιλίες σταφυλιών στον κόσμο και πιστεύεται ότι προέρχεται από την Λημνία σταφυλή, όπως αναφέρεται από τον Όμηρο, τον Ησίοδο και τον Αριστοτέλη. Η ποικιλία είναι γνωστή και με την ονομασία Καλαμπάκι (Κουράκου, 2013) .

1.8.1 Αμπελογραφικά χαρακτηριστικά

Ως προς τον αμπελογραφικό χαρακτήρα και τα φαινορικά στάδια, η συγκεκριμένη ποικιλία χαρακτηρίζεται από κορυφή νεαρής βλάστησης μετρίως ανοιχτή έως ανοιχτή, χαλκόχροη έως ερυθρωπή, βαμβακώδης. Τα νεαρά φύλλα είναι πρασινοχαλκόχροα έως ερυθρωπά, πεντάκολπα, βαθύκολπα με έντονα ερυθρή παρυφή, με ερυθρές νευρώσεις, χνοώδεις έως βαμβακώδεις στην κάτω πλευρά του ελάσματος. Ο πώδης βλαστός είναι ημιόρθιος, κυλινδρικός, χνοώδης, ερυθροϊώδης στην νωτιαία πλευρά ερυθρωπός με πράσινες ραβδώσεις στην κοιλιακή πλευρά, με

κόμβους ερυθρούς. Ο μισχικός κόλπος κλειστός, βαθύς σχήματος U ή λύρας, με λοβούς ασύμμετρους που επικαλύπτονται και σχηματίζουν χαρακτηριστική οπή. Οι έλικες είναι μικρού έως μέτριου μήκους, διαλείπουσες, δισχιδείς ή τρισχιδείς, ερυθρωπές, με βελουδοειδή χνοασμό που συχνά φέρουν βοτρύδιο. Οι οφθαλμοί έχουν έντονο ερυθρό χρώμα, ιδίως στην βάση. Ως προς το ανεπτυγμένο φύλλο του φυτού, αυτό είναι μέτριο, σφηνοειδές, πεντάκολλο και βαθύκολλο. Το έλασμα είναι μέτριου πάχους, σχεδόν επίπεδο, ελαφρώς πομφολυγώδες, βαθυπράσινο, τραχύ στην αφή από έρποντα τριχίδια, κυρίως γύρω από το μισχικό σημείο και τις νευρώσεις στην άνω επιφάνεια, φαιοπράσινο ή βαθυπράσινο και κατά τόπου αραχνοϋφές στην κάτω επιφάνεια. Οι πλάγιοι κόλποι φέρουν στην βάση τους οδόντα μετρίου μεγέθους. Οι οδόντες είναι ανισομεγέθεις και μέτριοι με ευθείες πλευρές και ο μίσχος είναι μικρός έως μέτριος, ερυθρωπός με πυκνό βελουδοειδές και αραχνοϋφές χνοασμό (Σταυρακάκης, 2010).

1.8.2 Περιγραφή σταφυλής

Η σταφυλή είναι μέτρια, απλή, ενίοτε πτερυγωτή ή διπλή, κυλινδρική έως κυλινδροκωνική, πυκνή έως πολύ πυκνή με ανισομεγέθεις και ανόμοιου χρώματος ράγες και ο ποδίσκος είναι μέτριου έως μεγάλου μήκους, παχύς, δυσχερούς αποκοπής. Η ράγα της συγκεκριμένης ποικιλίας είναι μέτριου μεγέθους, σφαιρική έως δισκοειδής. Ο φλοιός είναι μέτριου πάχους, ερυθροϊώδης έως ερυθρομέλανος με στυφή γεύση. Η σάρκα της είναι μετρίως ανθεκτική, μετρίως χυμώδης, στυφή, άχρωμη. Τα γίγαρτα είναι συνήθως δύο ή τρία, ενίοτε τέσσερα ανά ράγα, μέτρια, απιοειδή με ράμφος μικρό και οξύ. Η κληματίδα είναι καστανή έως ερυθροκαστανή με φακίδια πλευρώδης και κυκλικής τομής. Η ποικιλία ξεκινάει την βλάστηση της το 3^ο δεκαήμερο του Μαρτίου και ολοκληρώνεται το 2^ο δεκαήμερο του Απριλίου. Η έναρξη της ωρίμανσης γίνεται το 3^ο δεκαήμερο του Αυγούστου (Σταυρακάκης, 2010).



Εικόνα 6: Βλαστός από φυτό ποικιλίας Λημνιό.



Εικόνα 7: Εμπρόσθια και οπίσθια όψη φύλλων της ποικιλίας Λημνιό.



Εικόνα 8: Σταφύλια της ποικιλίας Λημνιό

1.8.3 Χαρακτηριστικά οίνων της ποικιλίας

Το Λημνιό σαν ποικιλία δίνει κρασιά με μέτρια οξύτητα, με σχετικά υψηλό αλκοολικό βαθμό, ενώ έχουν χρώμα μέτριου βάθους. Ως προς τα αρωματικά του χαρακτηριστικά τα κρασιά της ποικιλίας Λημνιό έχουν ελαφρύ και ιδιαίτερο άρωμα με κομψά αρώματα μύτης και στόματος, στα οποία κυριαρχούν αρώματα φρέσκων αρωματικών βοτάνων και κόκκινων φρούτων. Ως προς τα γευστικά τους χαρακτηριστικά έχουν μέτρια οξύτητα, μέτριες τανίνες και σχετικά υψηλό αλκοόλ.

1.8.4 Οίνοι από Λημνιό

Το Λημνιό παλαιότερα σαν ποικιλία συμμετείχε στην παραγωγή των κρασιών του Αγίου Όρους, όπως ο Μονοξυλίτης οίνος. Ωστόσο σήμερα η ποικιλία συμμετέχει στην παραγωγή οίνων με την Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης «Λήμνος» για την παραγωγή ερυθρών μονοποικιλιακών ξηρών οίνων και για την παραγωγή ερυθρών γλυκών οίνων από την ανάμειξη της ποικιλίας Λημνιό (90%) με την ποικιλία Μοσχάτο Αλεξανδρείας (10%). Επίσης η ποικιλία συμμετέχει στην παραγωγή οίνων με την Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης «Πλαγιές Μελίτων» όπου αποτελούνται από την ποικιλία Λημνιό, την ποικιλία Cabernet Sauvignon και την ποικιλία Cabernet Franc.

2020) και ο τρύγος έλαβε χώρα όταν τα σταφύλια είχαν φτάσει στο επιθυμητό στάδιο ωριμότητας και συγκέντρωσης σακχάρων (~228g/L) στις 10 Σεπτεμβρίου 2020.

D	C	D
PLOT 5	PLOT 4	
PLOT 5	PLOT 4	
PLOT 5	PLOT 4	
PLOT 1	PLOT 2	PLOT 3
PLOT 1	PLOT 2	PLOT 3
PLOT 1	PLOT 2	PLOT 3
	PLOT 6	
	PLOT 6	
	PLOT 6	

Σχήμα 2: Τελική κατανομή των plots στον πειραματικό αμπελώνα.
C: Control, D: Defoliation



Εικόνα 9: Γραμμή χωρίς εφαρμογή ξεφυλλίσματος



Εικόνα 10: Γραμμή με εφαρμογή εντατικού ξεφυλλίσματος

2.2 Μέθοδοι μετρήσεων αμπελώνα

2.2.1 Μετρήσεις μεγέθους ραγών και σταφυλών

Οι πρώτες μετρήσεις που ξεκίνησαν στον αμπελώνα έγιναν στις 16 Ιουλίου 2020 και συνεχίστηκαν έως και τον τρύγο, με εβδομαδιαία συχνότητα. Οι μετρήσεις αυτές περιελάμβαναν την μέτρηση του μήκους και του πλάτους των σταφυλών καθώς και την μέτρηση των διαστάσεων πέντε ραγών ανά σταφυλή, για όλες τις σταφυλές των δύο κεντρικών φυτών ανά πειραματική μονάδα. Για την μέτρηση του πλάτους και του μήκους των σταφυλών χρησιμοποιήθηκε χάρακας, ενώ για την μέτρηση των διαστάσεων των ραγών χρησιμοποιήθηκε παχύμετρο ακριβείας.

2.2.2 Μέτρηση υδατικού δυναμικού

Η μέτρηση του υδατικού δυναμικού στους βλαστούς έγινε 3 φορές από την εφαρμογή του ξεφυλλίσματος έως και τον τρύγο. Η πρώτη μέτρηση έγινε στην αρχή του πειράματος μετά το ξεφύλλισμα και ακολούθησε μια μέτρηση στο στάδιο του περκασμού και μια μέτρηση πριν από τον τρύγο. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση φιάλης αζώτου και χρήση θαλάμου πίεσης (Scholander). Για την μέτρηση του υδατικού δυναμικού των βλαστών έγινε επιλογή φύλλων από τα κεντρικά φυτά των πειραματικών μονάδων, τα οποία ήταν ακέραια και υγιή, ενώ ακόμη έπρεπε ακόμη να είναι από την σκιασμένη πλευρά του αμπελώνα και να είναι μεταξύ του 6^{ου} και 9^{ου} κόμβου. Στα συγκεκριμένα φύλλα τοποθετήθηκε μαύρο πλαστικό που τα κάλυψε τελείως και από πάνω καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο έτσι ώστε να μην εισέρχεται φως και παρέμειναν έτσι για μία ώρα.

Μετά το πέρας του χρόνου τα φύλλα αποκόπηκαν από το φυτό. Άμεσα τους έγινε κάθετη τομή και τοποθετήθηκαν ένα-ένα στον θάλαμο όπου και διοχετεύθηκε αέριο άζωτο. Η διοχέτευση του αζώτου έγινε με αργό ρυθμό μέχρι να γίνει ορατή η εμφάνιση υγρασίας στο μίσχο, ώστε να γίνει η ακριβής μέτρηση της πίεσης στο μανόμετρο σε MPa. Η πίεση που χρειάζεται μέχρι την εμφάνιση της υγρασίας είναι ανάλογη της περιεκτικότητας των φυτικών ιστών του φύλλου σε νερό. Επομένως όσο πιο χαμηλή η περιεκτικότητα τόσο και μικρότερη πίεση θα πρέπει να ασκηθεί στο θάλαμο.



Εικόνες 11: Μέτρηση υδατικού δυναμικού.

2.3 Μέθοδοι παρακολούθησης πορείας ωρίμανσης

Μετά το στάδιο του περκασμού, στον αμπελώνα γινόντουσαν μετρήσεις σχετικές με την πορεία ωρίμανσης των σταφυλιών. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν δύο φορές μετά το στάδιο του περκασμού και μέχρι τον τρύγο, σε κάθε plot για τυχαίο δείγμα 25 ραγών από όλα τα φυτά του plot. Οι μετρήσεις αφορούσαν το βάρος των ραγών, το σύνολο των σακχάρων, την ογκομετρούμενη οξύτητα και το pH.

2.3.1 Μέτρηση βάρους ραγών

Η μέτρηση του βάρους των ραγών γινόταν με ζυγό ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων και από το αποτέλεσμα του βάρους σε g, έβγαινε και η μέση τιμή του βάρους ράγας ανά plot.

2.3.2 Προσδιορισμός σακχάρων με διαθλασιμετρία

Ο προσδιορισμός των σακχάρων στα σταφύλια κατά την ωρίμανση γινόταν με την χρήση του διαθλασίμετρου χειρός το οποίο ήταν βαθμονομημένο σε βαθμούς Brix. Στο χυμό των σταφυλιών επειδή το σύνολο των διαλυτών στερεών αποτελείται από σάκχαρα, η μέτρηση στο διαθλασίμετρο αντιστοιχεί σε συγκέντρωση σακχάρων ($^{\circ}\text{Brix} = \frac{\text{g}_{\text{σακχάρων}}}{100\text{g}_{\text{διαλύματος}}}$).

Οι ράγες πολτοποιούνταν χειρωνακτικά με την χρήση ενός ανοξείδωτου σουρωτηριού με σκοπό να συλλεχθεί ο καθαρός χυμός των σταφυλιών. Στην συνέχεια από τον καθαρό χυμό των σταφυλιών, τοποθετούνταν στο πρίσμα του διαθλασίμετρου χειρός μια σταγόνα και λαμβάνονταν η μέτρηση για το σύνολο των

σακχάρων. Παράλληλα γινόταν η μέτρηση της θερμοκρασίας του χυμού των σταφυλιών για την διόρθωση της μέτρησης στην θερμοκρασία αναφοράς (Κοτσερίδης, 2015).

2.3.3 Προσδιορισμός ογκομετρούμενης/ολικής οξύτητας

Ολική οξύτητα καλείται το άθροισμα των ογκομετρούμενων οξέων όταν το pH του οίνου ρυθμίζεται στην τιμή 7 με την προσθήκη τιτλοδοτημένου αλκαλικού διαλύματος. Στην ολική οξύτητα δεν συμπεριλαμβάνεται το διοξείδιο του άνθρακα. Σαν δείκτης χρησιμοποιήθηκε το κυανό της βρωμοθυμόλης το οποίο έχει περιοχή αλλαγής χρώματος το pH 7.

Για την διαδικασία μέτρησης της ολικής οξύτητας σε μια κωνική φιάλη τοποθετείται 10 mL γλεύκους, λίγες σταγόνες κυανό της βρωμοθυμόλης και 30 mL απεσταγμένο νερό. Γεμίζουμε την προχοΐδα με πρότυπο διάλυμα NaOH 0.1M και τιτλοδοτούμε με το διάλυμα ανακατεύοντας συνεχώς την κωνική φιάλη μέχρι να αλλάξει και να σταθεροποιηθεί το χρώμα και να έχει μια κυανοπράσινη χροιά. Η τελική τιμή της προχοΐδας σημειώνεται και η διαφορά της αρχικής με την τελική τιμή της προχοΐδας (n) καταγράφεται.

Για την μετατροπή της ολικής οξύτητας σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο (g/L) γίνεται πολλαπλασιάζοντας, την διαφορά της αρχικής από την τελική τιμή της προχοΐδας (n) με 0,75 (Κοτσερίδης, 2015).

$$\text{Ολική οξύτητα (g/L)} = 0,75 * n$$

2.3.4 Μέτρηση pH

Το pH εκφράζει το σύνολο των καρβοξυλομάδων των οξέων που βρίσκονται σε διάσταση και δίνουν ιόντα H⁺.

Η μέτρηση του pH του γλεύκους έγινε με την χρήση οργάνου για την μέτρηση του pH. Για την διαδικασία της μέτρησης τοποθετείται επαρκής ποσότητα γλεύκους σε θερμοκρασία 20-25 °C, σε ένα ποτήρι ζέσεως μαζί με έναν μαγνήτη και τοποθετείται πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα. Το ηλεκτρόδιο του μηχανήματος πρέπει να μην ακουμπάει στα τοιχώματα του ποτηριού και όταν η ένδειξη παραμείνει σταθερή παίρνουμε την μέτρηση (Κοτσερίδης, 2015).

2.4 Μετρήσεις σταφυλιών στον τρύγο

Οι τελευταίες μετρήσεις που έγιναν στον αμπελώνα την ημέρα του τρύγου έγιναν στις 10 Σεπτεμβρίου 2020. Οι μετρήσεις αυτές περιελάμβαναν την μέτρηση του βάρους των σταφυλών, την μέτρηση της πυκνότητας των σταφυλών και την παραγωγή του κάθε πρέμνου με σκοπό να παρατηρήσουμε τυχόν διαφορές μεταξύ των ξεφυλλισμένων αμπελώνων και των μαρτύρων.

Στην συνέχεια αφού μετρήθηκαν τα παραπάνω συλλέχθηκε τυχαίο δείγμα 50 ραγών ανά plot με σκοπό την μέτρηση του βάρους των φλοιών και των γιγάρτων. Για την μέτρηση του βάρους των φλοιών, αποφλοιώθηκαν χειρωνακτικά το σύνολο των ραγών από την σάρκα και τα γίγαρτα και ζυγίστηκαν ξεχωριστά οι φλοιοί για κάθε πειραματική μονάδα. Τα γίγαρτα συλλέχθηκαν και αφού καταμετρήθηκαν, ξεπλύθηκαν και στέγνωσαν ώστε να μετρηθεί το βάρος τους με ζυγαριά ακριβείας.

Για την μέτρηση επίσης της επίδρασης του ξεφυλλίσματος στα σταφύλια συλλέχθηκε δείγμα 50 ραγών με σκοπό να γίνει προσδιορισμός των ανθοκυανών στα σταφύλια με την μέθοδο Glories.

2.5 Προσδιορισμός φαινολικής ωρίμανσης σταφυλιών με την μέθοδο Glories

Η μέθοδος Glories εκτιμά την φαινολική ωρίμανση των ραγών (Glories,1993). Παρέχει πληροφορίες τόσο ποσοτικές (ολικό δυναμικό σε ανθοκυάνες και τανίνες), όσο και ποιοτικές (εκχυλισιμότητα των ανθοκυανών, βαθμός ωρίμανσης των γιγάρτων) των πολυφαινολών. Στην πράξη η μέθοδος αποτελεί ένα μέσο διάκρισης του φαινολικού δυναμικού μιας ποικιλίας και της δυνατότητας εκχύλισης των ανθοκυανών που εμπεριέχει. Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιείται ένα διάλυμα pH 1 και ένα διάλυμα pH 3,6. Στο pH 1 γίνεται εκχύλιση όλων των ανθοκυανών του δείγματος ενώ το pH 3,6 αντιστοιχεί στις πραγματικές συνθήκες εκχύλισης στη δεξαμενή. Η απελευθέρωση των ανθοκυανών από το φλοιό των ραγών εξαρτάται από το πορώδες των κυτταρικών μεμβρανών που συνδέεται άμεσα με την ωριμότητα των ραγών. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο τιμές pH δίνει μια ένδειξη της εκχυλισιμότητας των χρωστικών ουσιών (AE%), που είναι συνάρτηση τόσο της ωριμότητας των ραγών αλλά και της περατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή AE τόσο πιο εύκολα εκχυλίζονται οι ανθοκυάνες στον οίνο. Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζουν πολύ μεγάλη πρακτική σημασία, δεδομένου ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της διαδικασίας εκχύλισης των ανθοκυανών.

Ομογενοποίηση-Εκχύλιση

Το πρώτο στάδιο της μεθόδου είναι η ομογενοποίηση και η εκχύλιση των συστατικών. Αρχικά μετριούνται και ζυγίζονται με ακρίβεια 50 ράγες σταφυλιού και υπολογίζεται το μέσο βάρος ανά ράγα. Οι ράγες θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία 5-10 °C. Η χαμηλή θερμοκρασία κατά την προετοιμασία του δείγματος το προστατεύει από οξειδώσεις. Κατόπιν μεταφέρονται σε ένα πλαστικό δοχείο και ομογενοποιούνται στις 24000 rpm μέχρι το δείγμα να πάρει ρευστή ομοιογενή μορφή χωρίς να διακρίνονται κομμάτια φλοιών ή γιγάρτων.

Σε δύο πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου τοποθετούνται από 5 g πολτός σταφυλιού στον καθένα και προστίθενται αντίστοιχα 5 mL διαλύματος pH 1 στον ένα και 5 mL διαλύματος pH 3.6 στον άλλο. Οι σωλήνες παραμένουν σε σκοτεινό μέρος για 4 ώρες. Στη συνέχεια γίνεται ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 4000 στροφές. Τα υπερκείμενα συλλέγονται (**Y1** και **Y3.6**) και ακολουθεί διαδικασία προσδιορισμού των ανθοκυανών.

Διαδικασία μέτρησης

Σε δύο φιαλίδια ανάλογου όγκου δημιουργούνται 2 κύρια διαλύματα προσθέτοντας:

1 mL **Y1** + 1 mL αλκοολικό διάλυμα HCl 0.1% + 20 mL υδατικό διάλυμα HCl 2% → **K1**

1 mL **Y3.6** + 1 mL αλκοολικό διάλυμα HCl 0.1% + 20 mL υδατικό διάλυμα HCl 2% → **K3.6**

Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες (x2) ετοιμάζονται τα εξής διαλύματα:

pH1-H₂O → 5 mL **K1** + 2 mL **H₂O** A_{pH1-H₂O}

pH1-SO₂ → 5 mL **K1** + 2 mL **NaHSO₃** A_{pH1-SO₂}

pH3.6-H₂O → 5 mL **K3.6** + 2 mL **H₂O** A_{pH3.6-H₂O}

pH3.6-SO₂ → 5 mL **K3.6** + 2 mL **NaHSO₃** A_{pH3.6-SO₂}

Ακολουθεί ανάδευση στο vortex και παραμονή σε ηρεμία για 20 min. Στο τέλος του χρόνου η ανάδευση επαναλαμβάνεται και μετριούνται οι απορροφήσεις από όλα τα δείγματα, στα 520 nm, με μάρτυρα H₂O. Για τον προσδιορισμό του ΔΦΟ το υπερκείμενο **Y3.6** αραιώνεται 1:100 με απιονισμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη, και μετριέται η απορρόφηση στα 280 nm με κυψελίδες χαλαζία (**A_{280-E3.6}**). Το φωτόμετρο μηδενίζεται με νερό.

Υπολογισμοί

Ολικές Ανθοκυάνες (g/L): TA = (A_{pH1-H₂O} - A_{pH1-SO₂}) * 885,3 / 1000

Εκχυλίσιμες Ανθοκυάνες (g/L): EA = (A_{pH3.6-H₂O} - A_{pH3.6-SO₂}) * 885,3 / 1000

Εκχυλισιμότητα ανθοκυανών: AE (%) = $\frac{TA-EA}{TA} * 100$

2.6 Πειραματική οινοποίηση

Η πειραματική οινοποίηση έλαβε χώρα στο Κτήμα Γεροβασιλείου στις 10 Σεπτεμβρίου 2020. Τα σταφύλια συλλέχθηκαν σε ξεχωριστά τελάρα στον αμπελώνα και μεταφέρθηκαν στο οινοποιείο. Από κάθε πειραματική μονάδα, η οποία αποτελούνταν από 6 φυτά, τρυγήθηκαν όλα τα φυτά ώστε η ποσότητα από κάθε plot να επαρκεί για την κάθε μικροοινοποίηση.

Ο απορραγισμός έγινε με την χρήση εκραγιστηρίου στο οποίο τοποθετήθηκαν τα τελάρα από κάθε plot ξεχωριστά και συλλέχθηκε η σταφυλομάζα τους σε πλαστικές λεκάνες ξεχωριστά για κάθε plot. Η έκθλιψη των σταφυλιών μετά τον απορραγισμό έγινε χειρωνακτικά. Για κάθε plot έγινε μια ξεχωριστή μικροοινοποίηση σε πλαστικά δοχεία των 20 L, δηλαδή στο σύνολο έξι μικροοινοποιήσεις, μια για κάθε plot.

Σε κάθε πλαστικό δοχείο προστέθηκε εμπορικό στέλεχος ζυμομύκητα (200 mg L^{-1} Fermol Premier Cru – AEB) αφού πρώτα είχε γίνει ενεργοποίηση του σε ζεστό νερό για 15 λεπτά. Ενώ μετά από 4 ώρες προστέθηκαν $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ SO}_2$ υπό την μορφή metabisulfite. Στα πλαστικά δοχεία δεν έγινε προσθήκη θρεπτικών. Στην συνέχεια τα δοχεία τοποθετήθηκαν στον χώρο του οινοποιείου και αφότου ξεκίνησε η αλκοολική ζύμωση γινόταν τρεις φορές την ημέρα, για 1 λεπτό, σπάσιμο του καπέλου με τα χέρια με στόχο την ομογενοποίηση του γλεύκους αλλά και την διαβροχή των στέμφυλων.

Η πορεία της ζύμωσης, με κριτήριο την μέτρηση σακχάρων με διαθλασιμετρία, και η θερμοκρασία της ζύμωσης μετρούνταν καθημερινά για κάθε plot και γινόταν καταγραφή των δεδομένων μέχρι και το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης οι οίνοι διαχωρίστηκαν από τους φλοιούς και τα γίγαρτα και οι οίνοι μεταφέρθηκαν σε γυάλινα δοχεία των 10 λίτρων. Εκεί οι οίνοι παρέμειναν σε ηρεμία με απουσία αέρα, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των οίνων από τις χοντρές λάσπες. Ο καθαρός οίνος διαχωρίστηκε από τις χοντρές λάσπες και αμέσως προστέθηκαν $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ SO}_2$ υπό την μορφή metabisulfite ώστε να μην ξεκινήσει η μηλογαλακτική ζύμωση.



Εικόνες 12,13: Οι οίνοι πριν την εμφιάλωση τους και οι οίνοι μετά την μετάγγιση σε γυάλινα δοχεία, στα δοχεία που δεν γέμισαν πλήρως, τοποθετήθηκε αδρανές αέριο.

Οι οίνοι παρέμειναν μέχρι την εμφιάλωση στα γυάλινα δοχεία στα οποία γινόταν δειγματοληπτικά μέτρηση του ελεύθερου και ολικού θειώδη ανυδρίτη ανά μήνα και συμπληρώνονταν η απαιτούμενη ποσότητα έως ότου γίνει η εμφιάλωση. Η εμφιάλωση των οίνων έγινε μετά από τέσσερις μήνες. Από τα γυάλινα δοχεία συλλέχθηκε ο καθαρός οίνος, ο οποίος και εμφιαλώθηκε με την χρήση εμφιαλωτηρίου χειρός σε γυάλινα μπουκάλια των 750 mL.

2.7 Βασικές αναλύσεις οίνων

Μετά το τέλος της εμφιάλωσης ακολούθησαν οι φυσικοχημικές αναλύσεις στους οίνους με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης του ξεφυλλίσματος στις βασικές τους παραμέτρους. Επίσης μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης έγινε μέτρηση των αναγόντων σακχάρων στους οίνους.

Οι βασικές αναλύσεις στους οίνους πραγματοποιήθηκαν με βάση τις επίσημες μεθόδους όπως καθορίζονται από την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία και εφαρμόζονται στα οινολογικά εργαστήρια (OIV, 2006). Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν στους οίνους ήταν:

2.7.1 Μέτρηση αλκοολικού βαθμού

Ο αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο για ένα οινικό προϊόν ονομάζεται ο αριθμός των λίτρων άνυδρης αιθανόλης που περιέχεται σε 100 λίτρα του προϊόντος αυτού όταν οι δύο όγκοι μετριούνται σε θερμοκρασία 20° C. Ο αλκοολικός τίτλος εκφράζεται με το σύμβολο % vol.

Ο προσδιορισμός του αλκοολικού τίτλου γίνεται με την διαδικασία της απόσταξης της αλκοόλης του οίνου σε πρώτο στάδιο και στη συνέχεια μέτρηση του αποστάγματος με αραιομετρία. Για την διαδικασία του προσδιορισμού τοποθετούνται 200 mL δείγματος σε ογκομετρική φιάλη και μετριέται η θερμοκρασία. Το δείγμα μεταφέρεται στην σφαιρική φιάλη της αποστακτικής συσκευής και η ογκομετρική φιάλη ξεπλένεται με 5 mL νερού 4-5 φορές. Για να γίνει αλκαλικό το δείγμα προστίθενται 10 mL εναιωρήματος CaOH και δύο τεμάχια πορώδους ανενεργού υλικού. Η σφαιρική φιάλη συνδέεται με την αποστακτική συσκευή και ξεκινάει η θέρμανση και η απόσταξη. Το απόσταγμα συλλέγεται σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL έως ότου μαζευτεί ποσότητα ίση με τα $\frac{3}{4}$ του αρχικού όγκου του δείγματος. Ο όγκος συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό στα 200 mL και θερμομετρείται. Το

απόσταγμα αναμιγνύεται και μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο. Εκεί εμβαπτίζεται αλκοολόμετρο και θερμόμετρο. Λαμβάνεται η θερμοκρασία και, μετά την εξισορρόπηση του αλκοολομέτρου, ο φαινομενικός τίτλος ο οποίος διορθώνεται στην θερμοκρασία αναφοράς με την βοήθεια πίνακα.

2.7.2 Μέτρηση ολικής οξύτητας

Για την διαδικασία μέτρησης της ολικής οξύτητας σε μια κωνική φιάλη τοποθετούνται 10 mL γλεύκους, λίγες σταγόνες κυανό της βρωμοθυμόλης και 30 mL απεσταγμένο νερό. Γεμίζουμε την προχοΐδα με πρότυπο διάλυμα NaOH 0.1M και τιτλοδοτούμε ανακατεύοντας συνεχώς την κωνική φιάλη μέχρι να αλλάξει και να σταθεροποιηθεί το χρώμα και να έχει μια κυανοπράσινη χροιά. Η τελική τιμή της προχοΐδας σημειώνεται και η διαφορά της αρχικής με την τελική τιμή της προχοΐδας (n) καταγράφεται.

Για την μετατροπή της κατανάλωσης σε ολική οξύτητα, σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο (g/L), πολλαπλασιάζεται η διαφορά της αρχικής από την τελική τιμή της προχοΐδας (n) με 0,75 (Κοτσερίδης, 2015).

$$\text{Ολική οξύτητα (g/L)} = 0,75 * n$$

2.7.3 Μέτρηση pH

Η μέτρηση του pH του γλεύκους έγινε με την χρήση πεχαμέτρου. Για την διαδικασία της μέτρησης τοποθετείται επαρκής ποσότητα γλεύκους σε θερμοκρασία 20-25 °C, σε ένα ποτήρι ζέσεως μαζί με έναν μαγνήτη και τοποθετείται πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα. Το ηλεκτρόδιο πρέπει να μην ακουμπάει στα τοιχώματα του ποτηριού και όταν η ένδειξη παραμείνει σταθερή παίρνουμε την μέτρηση (Κοτσερίδης, 2015).

2.7.4 Μέτρηση πτητικής οξύτητας

Η πτητική οξύτητα αποτελείται από τα οξέα της σειράς του οξικού οξέος που υπάρχουν στο κρασί σε ελεύθερη κατάσταση είτε σε μορφή αλάτων. Τα οξέα της αλειφατικής σειράς με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα (μυρμηκικό, οξικό, βουτυρικό, προπιονικό) έχουν δυσμενή επίδραση στην ποιότητα του οίνου και επηρεάζουν αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων.

Ο προσδιορισμός της πτητικής οξύτητας γίνεται με τιτλοδότηση των πτητικών οξέων που διαχωρίζονται από τον οίνο με απόσταξη με υδρατμούς και συμπύκνωση ατμών. Για την διαδικασία απομακρύνεται το CO₂ με αντλία σε φιάλη κενού και γίνεται απόσταξη με υδρατμούς, όπου 20 mL οίνου μεταφέρονται σε φιάλη απόσταξης με ταυτόχρονη προσθήκη 0,5g τρυγικού οξέος. Συλλέγονται 250 mL αποστάγματος και το απόσταγμα ογκομετρείται με διάλυμα NaOH 0.1 M παρουσία δείκτη φαινολοφθαλεΐνης. Προστίθενται 4 σταγόνες αραιωμένου HCL ¼, 2 mL διαλύματος αμύλου και μερικοί κρύσταλλοι KJ. Τέλος γίνεται τιτλοδότηση του ελεύθερου SO₂ με διάλυμα I₂ 0,005 M.

Η πτητική οξύτητα εκφρασμένη σε g/L οξικού οξέος δίνεται από τον τύπο

$$A = 0,3 (n - 0,1n')$$

Όπου n τα mL NaOH 0.1 M που καταναλώθηκαν από την πρώτη τιτλοδότηση και n' τα mL I₂ 0,005 M που καταναλώθηκαν κατά την δεύτερη (Κοτσερίδης, 2015).

2.7.5 Μέτρηση αναγόντων σακχάρων

Τα ανάγοντα σάκχαρα είναι τα σάκχαρα που διαθέτουν ελεύθερη αλδεϋδική ομάδα ή κετονική ομάδα και ανάγουν το αλκαλικό διάλυμα του χαλκού. Μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης πάντα παραμένει ένα μικρό μη ζυμώσιμο ποσοστό αναγόντων σακχάρων και αυτά κυρίως είναι οι πεντόζες που δεν αποικοδομούνται από τους ζυμομύκητες. Ανάλογα με την τελική συγκέντρωση των σακχάρων ο οίνος χαρακτηρίζεται ως Ξηρός (0-2 g/L αναγωγικά σάκχαρα), Ημίξηρος (2-18 g/L αναγωγικά σάκχαρα), Ημίγλυκος (18-40 g/L αναγωγικά σάκχαρα) και Γλυκός (πάνω από 40 g/L αναγωγικά σάκχαρα).

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων σε μια κωνική φιάλη των 300 mL με εσμύρισμα μεταφέρεται διαυγές δείγμα 20 mL και 5 mL νερό. Μεταφέρονται 25 mL αλκαλικού διαλύματος χαλκού και η κωνική φιάλη προσαρμόζεται σε κάθετο ψυκτήρα και το δείγμα υφίσταται βρασμό για 10 λεπτά. Αμέσως μετά γίνεται ταχεία ψύξη του δείγματος με τρεχούμενο νερό και προστίθεται 10 mL KI 30% (w/v) και 25 mL θειικό οξύ (H₂SO₄) 25%. Τέλος γίνεται τιτλοδότηση με θειοθειικό νάτριο (Na₂S₂O₃) 0,1 N.

Έστω n τα mL που καταναλώθηκαν από την ογκομέτρηση μέχρι το διάλυμα να πάρει κίτρινο χρώμα και n' τα mL που καταναλώθηκαν στο λευκό προσδιορισμό. Από σχετικό πίνακα βρίσκεται η αντιστοιχία της διαφοράς (n'-n) και των mg των σακχάρων που περιέχονται σε mL διηθήματος που χρησιμοποιήθηκαν. Το τελικό αποτέλεσμα δίνεται μετά από διαίρεση του αποτελέσματος με 20 ανάλογα με την ποσότητα διηθήματος που χρησιμοποιήθηκε και εκφράζεται σε g σακχάρων ανά λίτρο οίνου.

2.8 Μέθοδοι μετρήσεων χρώματος και φαινολικών συστατικών

2.8.1 Χρωματικά χαρακτηριστικά (Ένταση – Απόχρωση)

Το χρώμα των οίνων είναι το αποτέλεσμα της εκλεκτικής απορρόφησης ορισμένων ακτινοβολιών του ηλιακού φάσματος και οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις. Στους ερυθρούς οίνους το μέγιστο απορρόφησης παρουσιάζεται στα 520 nm (ερυθρό). Με την πάροδο του χρόνου η απορρόφηση στα 520 nm μειώνεται και αυξάνεται η απορρόφηση στα 420 nm (κίτρινο). Οι τιμές αυτές δεν καλύπτουν πλήρως νέους οίνους όπως στην περίπτωση μας. Η μέτρηση της απορρόφησης στα 620 nm (κυανό) χρησιμοποιείται για την καλύτερη αξιολόγηση των νέων οίνων, η απορρόφηση αυτή αποδίδεται στις μορφές της βάσης της κινόνης των ελεύθερων και ενωμένων ανθοκυανών.

Η μέτρηση των χρωματικών χαρακτηριστικών των οίνων έγινε σύμφωνα με την μέθοδο του OIV (2009). Για την λήψη των τιμών των απορροφήσεων χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο και έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα τρία μήκη κύματος, 420, 520 και 620 nm. Οι μετρήσεις έγιναν με κυψελίδες των 10 mm και το φωτόμετρο μηδενίστηκε με απιονισμένο νερό. Οι οίνοι δεν χρειάστηκαν αραίωση.

Η ένταση του χρώματος των οίνων εκφράζεται με το άθροισμα των απορροφήσεων $A_{420}, A_{520}, A_{620}$

$$E = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

ενώ η απόχρωση των οίνων λαμβάνεται από τον λόγο της A_{420} και A_{520} (Glories 1984).

$$A = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

2.8.2 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)

Ο δείκτης των φαινολικών ουσιών μετρά την περιεκτικότητα των φλαβονοειδών φαινολών δηλαδή των ανθοκυανών και των τανινών, των μη φλαβονοειδών (φαινολικά οξέα) αλλά και κάποιων μη φαινολικών ουσιών που απορροφούν στα 280 nm. Για την μέτρηση του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών ακολουθήθηκε η μέθοδος των Ribereau Gayon et al. (1998) κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα μέτρησης στο υπεριώδες (UV) και κυψελίδες χαλαζία. Λαμβάνονταν απορρόφηση στα 280nm. Μοναδικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ορισμένες ενώσεις όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες δεν παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 280 nm, ωστόσο είναι μια εύκολη και γρήγορη μέθοδος με μικρό ποσοστό λάθους. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δίνονται από την ακόλουθη σχέση:

$$\Delta\Phi\text{O} = \text{OD}_{280} * \text{Αραιώση δείγματος}$$

Όπου OD_{280} είναι η ένδειξη του οργάνου.

2.8.3 Ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu

Η μέθοδος Folin – Ciocalteu (Waterman και Mole, 1994) είναι μια φωτομετρική μέθοδος που μετράει το σύνολο των φαινολικών ουσιών του δείγματος. Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων του οίνου από το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu. Υπολογίζεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο χωρίς διάκριση των φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu, ως διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων, ανάγεται σε μείγμα κυανών οξειδίων, κατά την οξείδωση των φαινολών. Το κυανό προϊόν της αντίδρασης παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 765 nm και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na_2CO_3 και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος με την χρήση πρότυπης καμπύλης.

Για την διαδικασία, μεταφέρονται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες κατά σειρά

- 2 mL απιονισμένο νερό
- 50 μL δείγμα
- 250 μL Folin – Ciocalteu
- 750 μL Na_2CO_3 20%
- 1950 μL απιονισμένο νερό

Μετά από κάθε προσθήκη γίνεται ανάδευση στο vortex. Στο τέλος οι δοκιμαστικοί σωλήνες παραμένουν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε ηρεμία, για την ανάπτυξη του χρωμοφόρου και ακολουθεί η μέτρηση στα 765 nm. Ο μάρτυρας, με τον οποίο μηδενίζεται το φωτόμετρο, αντί για δείγμα έχει νερό. Με την χρήση πρότυπης καμπύλης της μορφής $y=ax+b$ υπολογίζεται η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών του δείγματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, λαμβάνοντας υπόψη την αραιώση που τυχόν έγινε.

2.8.4 Ολικές Ανθοκυάνες

Η μέθοδος προσδιορισμού των ολικών ανθοκυανών βασίζεται στην ιδιότητα τους, να δίνουν άχρωμες ενώσεις με το HSO_3^- . Μετά την προσθήκη μιας ποσότητας όξινου θεικού άλατος, η αλλαγή του χρώματος στους οίνους είναι ανάλογη της περιεκτικότητάς τους σε ανθοκυάνες (Ribereau–Gayon et al, 1965).

Για την πραγματοποίηση της μεθόδου δημιουργείται ένα κύριο διάλυμα με 1 mL δείγματος, 1 mL αλκοολικού διαλύματος HCL 0,1% και 20 mL υδατικού διαλύματος

HCL 2%. Από το κύριο διάλυμα παρασκευάστηκαν δύο δείγματα, το πρώτο με 5 mL κύριου διαλύματος και 2 mL αποσταγμένου νερού και το δεύτερο με 5 mL κύριου διαλύματος και 2 mL διαλύματος όξινου θειώδους νατρίου (NaHSO₃) 15%. Τα δείγματα σφραγίστηκαν με parafilm και παρέμειναν σε ηρεμία για 20 λεπτά. Στο τέλος του χρόνου μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των δειγμάτων στα 520 nm και η συγκέντρωση ανθοκυανών υπολογίστηκε από την σχέση:

$$\text{Ανθοκυάνες (mg/L)} = (\text{OD}_{\text{H}_2\text{O}} - \text{OD}_{\text{NaSO}_3}) * 875$$

OD_{H₂O}: Η απορρόφηση του δείγματος που προστέθηκε νερό

OD_{NaSO₃}: Η απορρόφηση του αποχρωματισμένου δείγματος

2.8.5 Προσδιορισμός ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (Kallithraka, 2005).

Τα δείγματα οίνου φιλτραρίστηκαν με φίλτρο σύριγγας πορότητας 0.2 μm και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη για HPLC. Η ανάλυση των ανθοκυανών έγινε σε σύστημα HPLC Waters 2695 LC System συνοδευόμενο από ανιχνευτή 2996 DAD Detector. Η στήλη ήταν SVEA C18, 5 μm, 110 Å (4.6x250mm) (Nanologica). Η έκλυση έγινε βαθμιδωτά (gradient) με διαλύτες (A) 10 % φορμικό οξύ σε δις-απεσταγμένο νερό και (B) MeOH επιπέδου καθαρότητας HPLC σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Χρόνοι και συγκέντρωση διαλυτών κατά την έκλυση

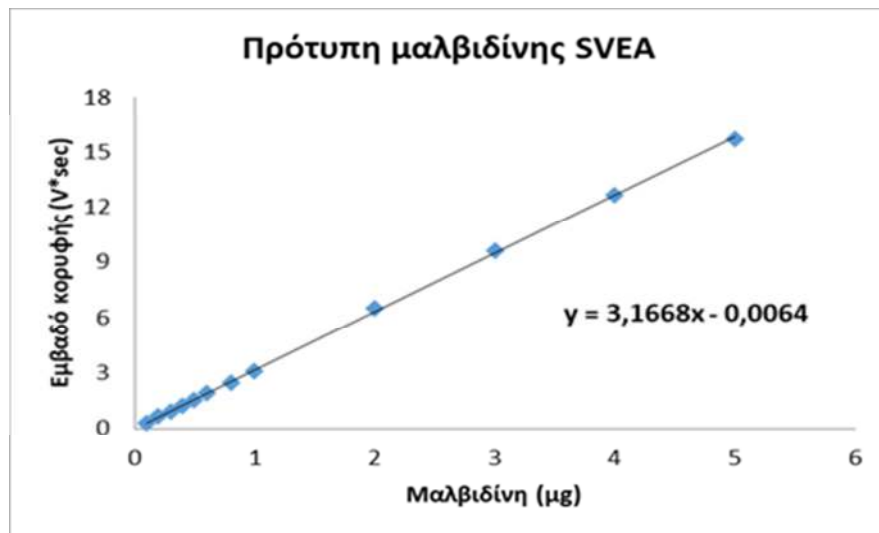
Χρόνος (min)	Διαλύτης A (10 % φορμικό οξύ σε dH ₂ O)	Διαλύτης B (MeOH)
αρχικές συνθήκες	90	10
22	50	50
32	5	95
34	5	95
35	90	10
38	90	10

Η ροή ήταν 1 mL/min και ο όγκος έγχυσης 50 μL. Η ανίχνευση, καθώς και η βαθμονόμηση έγινε στα 520 nm. Η επεξεργασία και η ολοκλήρωση των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό Empower.

Για την βαθμονόμηση της μεθόδου παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα μαλβιδίνης 0.1 mg/mL. Η ταυτοποίηση της μαλβιδίνης βασίστηκε στην σύγκριση της τιμής κατακράτησης της κορυφής από τα πρότυπα διαλύματα. Με ενέσεις διαφορετικού όγκου ανάλογα με την ποσότητα της μαλβιδίνης που θέλουμε και αντιστοιχίζοντας την μάζα της μαλβιδίνης με το εμβαδό των κορυφών που προκύπτουν από την HPLC κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη. Από την ευθεία που την περιγράφει υπολογίστηκε η ποσότητα των ανθοκυανών σε ισοδύναμα μαλβιδίνης στα δείγματα των οίνων όπως φαίνεται στον επόμενο πίνακα 2 και σχήμα 3:

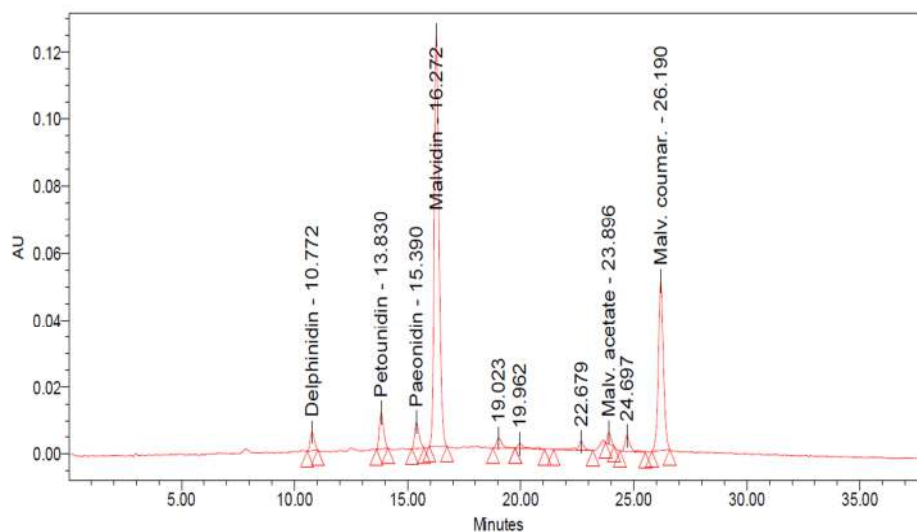
Πίνακας 2 Διαδικασία υπολογισμού ανθοκυανών με HPLC

Πρότυπη μαλβιδίνη		
		Διαιρούμε το εμβαδό δια 1,000,000 (από $\mu V \cdot sec$ σε $V \cdot sec$)
Μαλβιδίνη (μg)	Area ($\mu V \cdot sec$)	Area ($V \cdot sec$)
0,1	311757	0,312
0,2	640844	0,641
0,3	924649	0,925
0,4	1246932	1,247
0,5	1529953	1,530
0,6	1874350	1,874
0,8	2490618	2,491
1	3102811	3,103
2	6487320	6,487
3	9637376	9,637
4	12648143	12,648
5	15713116	15,713
Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης στα δείγματα:		
1. Λαμβάνονται τα εμβαδά των κορυφών από την HPLC (είναι σε $\mu V \cdot sec$)		
2. Μετατρέπονται σε $V \cdot sec$ διαιρώντας με 1.000.000		
3. Εφαρμόζεται η πρότυπη ευθεία και υπολογίζεται η κάθε κορυφή σε ισοδύναμο μαλβιδίνης (ME) (σε μg)		
4. Από τον όγκο της ένεσης υπολογίζεται η κάθε κορυφή σε ισοδύναμο μαλβιδίνης (ME) σε $mg/L \rightarrow ME(mg/L) = [ME(\mu g)/\acute{o}γκος \acute{e}νεσης(mL)]$		



Σχήμα 3: Πρότυπη καμπύλη μαλβιδίνης

Οι υπόλοιπες ανθοκυάνες, αφού προσδιορίστηκε ο χρόνος κατακράτησης-εμφάνισης στο χρωματογράφημα με πρότυπες ουσίες, η βαθμονόμησή τους έγινε σε ισοδύναμα μαλβιδίνης (ME). Από την ανάλυση προσδιορίστηκαν, κατά σειρά εμφάνισης στο χρωματογράφημα οι μονογλυκοζίτες Δελφινιδίνη (Dp), Πετουνιδίνη (Pt), Παιονιδίνη (Pn), Μαλβιδίνη (Mv) και οι ακυλιωμένες ανθοκυάνες, οξικός εστέρας (Mv-ac) και κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (Mv- coum) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14:Χρωματογράφημα που απεικονίζει τις ανθοκυάνες, 3-O- μονογλυκοζίτες της δελφινιδίνης (Delphinidin), της πετουνιδίνης (Petounidin), της παιονιδίνης (Peonidin), της μαλβιδίνης (Malvidin), ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης (Malv. Acetate) και ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (Malv. Coumar.).

2.8.6 Προσδιορισμός τανινών με τη μέθοδο BSA

Η συγκεκριμένη μέθοδος (Hangerman & Butler, 1978, Harbertson et al, 2002) μετράει τις τανίνες εκείνες του δείγματος που μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με πρωτεΐνη. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των τανινών με άλλα μόρια, όπως η αλβουμίνη (πρωτεΐνη) και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Στην συνέχεια της μεθόδου τα αδιάλυτα σύμπλοκα επαναδιαλύονται σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζεται η συγκέντρωση τανινών μετά από αντίδραση με χλωριούχο σίδηρο. Ο χλωριούχος σίδηρος αντιδρά με τα μόρια των πολυφαινόλων και σχηματίζει σύμπλοκα $Fe - (Or)_6$ τα οποία έχουν ιώδες χρώμα σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζονται ποσοτικά μετρώντας την απορρόφηση στα 510nm. Η συγκέντρωση των τανινών στα σύμπλοκα τανίνης – πρωτεΐνης είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης του δείγματος. Είναι σημαντικό για την ποσοτική παραλαβή του συνόλου των τανινών του δείγματος, το πρωτεϊνικό διάλυμα να περιέχει διπλάσια ποσότητα αλβουμίνης σε σχέση με την συγκέντρωση των τανινών, χωρίς η περίσσεια πρωτεΐνης να επηρεάζει τα αποτελέσματα.

Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται είναι τα παρακάτω:

- Model wine: 12% αιθανόλη, 5g/L τρυγικό οξύ, pH:3,3 με NaOH 1N
- Διάλυμα A: 200mM acetic acid, 170Nm NaCl και NaOH (pH 4,9)
- Πρωτεϊνικό διάλυμα BSA 1g/L: 100mg BSA-fraction V διαλυμένα σε 100mL Διαλύματος A
- Διάλυμα TEA-SDS:5% v/v triethanolamine (TEA), 10% w/v sodium dodecyl sulfate (SDS)
- Διάλυμα $FeCl_3$: 10 mM $FeCl_3$ σε 0,01 N HCL
- Πρότυπο διάλυμα κατεχίνης 1g/L για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης

Σε erpendorf των 2 mL τοποθετούνται 500 μ L αραιωμένου δείγματος και 1 mL πρωτεϊνικού διαλύματος BSA. Αναδεύεται ήπια για 15 λεπτά και το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 12500 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται 250 μ L μη πρωτεϊνικού διαλύματος χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 12500 rpm. Το υπερκείμενο πάλι απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται 875 μ L διαλύματος TEA-SDS και αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex και μετριέται η απορρόφηση στα 510 nm (A1) με κυψελίδα στένωσης. Τέλος προστίθενται 125 μ L $FeCl_3$ και μετά από 15 λεπτά μετριέται πάλι η απορρόφηση στα 510nm (A2). Το όργανο μηδενίζεται με διάλυμα TEA-SDS. Για τον υπολογισμό των τανινών υπολογίζεται η διαφορά των απορροφήσεων A2-A1.

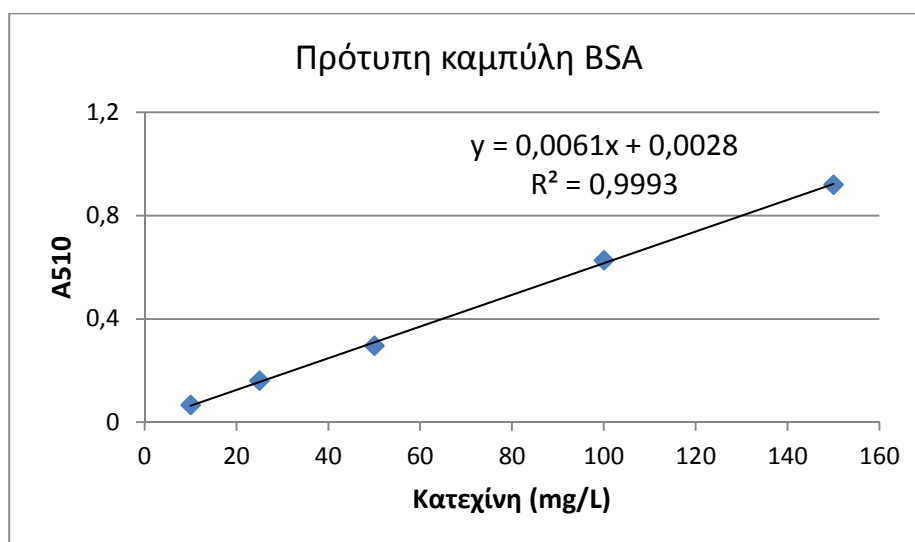
Για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάζονται συγκεντρώσεις κατεχίνης από 50 έως 150 mg/L και ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού δημιουργώντας τα μίγματα όπως εμφανίζονται στον ακόλουθο πίνακα 3. Τα μίγματα που δημιουργούνται αναδεύονται

στο vortex και παραμένουν κλειστά, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 min. Παίρνουμε τις απορροφήσεις στα 510 nm. Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις της κατεχίνης με τις απορροφήσεις τους σε ένα σύστημα αξόνων λαμβάνεται ή καμπύλη αναφοράς και η ευθεία της μορφής $y=ax+b$ που την περιγράφει.

Πίνακας 3: Πρότυπες συγκεντρώσεις διαλύματος κατεχίνης.

συγκέντρωση κατεχίνης (mg/L)	διάλυμα κατεχίνης (μL)	διάλυμα TEA-SDS (μL)	Διάλυμα FeCl ₃ (μL)
10	10	865	125
25	25	850	125
50	50	825	125
100	100	775	125
150	150	725	125

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων τανινών στα δείγματα με τη μέθοδο BSA χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη ευθεία που φαίνεται στο σχήμα 4. Από την πρότυπη ευθεία υπολογίζεται η συγκέντρωση των τανινών του αραιωμένου δείγματος, σε ισοδύναμα κατεχίνης, CE. Η τελική συγκέντρωση των τανινών στο δείγμα οίνου είναι $C=CE*(\text{αραίωση})$ mg/L οίνου.



Σχήμα 4: Πρότυπη ευθεία κατεχίνης για τη μέθοδο BSA

2.8.7 Προσδιορισμός τανινών με την χρήση MCP (methyl cellulose precipitable)

Η συγκεκριμένη μέθοδος (Sarnekis et al, 2006; Smith et al, 2015; Mercurio and Smith, 2006) μετράει σχεδόν το σύνολο των τανινών στον οίνο. Η ανάλυση βασίζεται στην συμπλοκοποίηση ενός πολυμερούς, όπως ο πολυσακχαρίτης μεθυλοκυτταρίνη, με τις τανίνες του οίνου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό αδιάλυτων πολυμερών συμπλόκων τα οποία στη συνέχεια καθιζάνουν. Η ανάλυση βασίζεται στην διαφορά των τιμών απορρόφησης στα 280 nm (A₂₈₀) των διαλυμάτων με και χωρίς την καθίζηση των συμπλοκοποιημένων τανινών, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Η μεθυλοκυτταρίνη δεν απορροφά στα 280nm και συνεπώς δεν παρεμβάλλεται στη μέτρηση. Για τον προσδιορισμό, είναι απαραίτητη η παρουσία ενός μάρτυρα (blanc), δηλαδή διαλύματος οίνου στο οποίο δεν γίνεται προσθήκη αντιδραστηρίου μεθυλοκυτταρίνης και δείγματος οίνου στον οποίο έχει γίνει προσθήκη μεθυλοκυτταρίνης. Η απορρόφηση του δείγματος αναφοράς (blanc) στα 280nm δείχνει την τιμή για όλες τις φαινολικές ενώσεις (σύνολο φαινολικών) που υπάρχουν στον οίνο (A_{280,bl}), ενώ η απορρόφηση στα 280nm του επεξεργασμένου δείγματος με μεθυλοκυτταρίνη, εκφράζει τις φαινολικές ενώσεις που παραμένουν εν διαλύσει μετά την κατακρήμνιση των συμπλόκων τανινών με μεθυλοκυτταρίνη (A_{280,s}).

Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται είναι τα παρακάτω:

- Κορεσμένο διάλυμα θεικού αμμωνίου (ammonium sulfate)
- Διάλυμα 0,04 % μεθυλ-κυτταρίνης (methyl cellulose)
- Πρότυπο διάλυμα κατεχίνης 1 g/L

Για την διαδικασία της μέτρησης ετοιμάζεται ο μάρτυρας σε erpendorf στον οποίο προστίθενται 50 μL οίνου (αν χρειάζεται αραιωμένος), 400 μL κορεσμένου θεικού αμμωνίου και 1550 μL απιονισμένου νερού και αναδεύονται σε vortex. Το διάλυμα παραμένει για 10 λεπτά σε ηρεμία και στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 10000 rpm και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία και μετριέται η απορρόφηση του στα 280 nm (A_{280-bl}).

Για το δείγμα, σε erpendorf προστίθενται 50 μL οίνου τον οποίο έχουμε αραιώσει αν χρειάζεται, 600 μL διάλυμα μεθυλοκυτταρίνης και το δείγμα αναδεύεται ήπια με αναστροφή μερικές φορές και αφήνεται σε ηρεμία για 2-3 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθενται 400 μL κορεσμένου θεικού αμμωνίου και 950 μL απιονισμένου νερού και αναδεύονται στο vortex. Για 10 λεπτά παραμένει σε ηρεμία και στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 10000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία και μετριέται η απορρόφηση στα 280 nm (A_{280-s}).

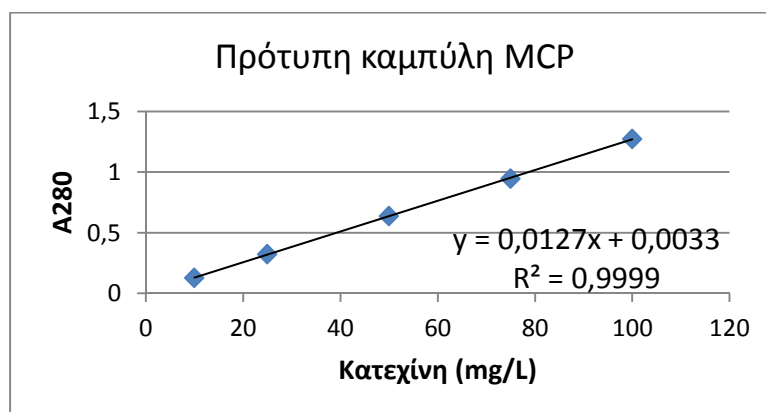
Η μέθοδος βαθμονομήθηκε με πρότυπα διαλύματα κατεχίνης. Για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάζονται οι παρακάτω συγκεντρώσεις κατεχίνης, από 10 έως 100 mg/L, σε τελικό όγκο 2 mL.

Πίνακας 4: Πρότυπες συγκεντρώσεις διαλύματος κατεχίνης.

[Κατεχίνη] (mg/L)	Πρότυπο διάλυμα κατεχίνης 1 g/L (μL)	H ₂ O (μL)
10	20	1980
25	50	1950
50	100	1900
75	150	1850
100	200	1800

Λαμβάνονται κατευθείαν οι απορροφήσεις των συγκεντρώσεων στα 280 nm. Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις της κατεχίνης με τις απορροφήσεις τους σε ένα σύστημα αξόνων λαμβάνεται ή καμπύλη αναφοράς και η ευθεία που την περιγράφει της μορφής $y=ax+\beta$ (Σχήμα 5).

Από τη διαφορά: $A_{280,tan} = (A_{280,b1}) - (A_{280,s})$ στις μετρήσεις των δειγμάτων οίνων υπολογίζεται η απορρόφηση που οφείλεται στις τανίνες. Στη συνέχεια, από την πρότυπη ευθεία, υπολογίζεται η συγκέντρωση των τανινών, σε ισοδύναμα κατεχίνης, στο διάλυμα μέτρησης (Cds). Η τελική συγκέντρωση των τανινών στο δείγμα οίνου, σε (mg/L), είναι: $C_{wine} = C_{ds} * 40$ (αραίωση δείγματος οίνου) όπου το 40 είναι ο συντελεστής αραίωσης του δείγματος στο διάλυμα μέτρησης.



Σχήμα 5: Πρότυπη ευθεία κατεχίνης για τη μέθοδο MCP

2.9 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων έγινε στο εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Είχε ως στόχο την καταγραφή μιας ολοκληρωμένης εικόνας για τη δυναμικότητα της ποικιλίας, σε συνδυασμό με τις φυσικοχημικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, και πώς επηρεάζεται το οργανοληπτικό προφίλ του οίνου από την επέμβαση στον αμπελώνα. Η αξιολόγηση έγινε ανά plot.

Το πάνελ των γευσιγνωστών αποτελούνταν από μια ομάδα 12 εκπαιδευμένων δοκιμαστών. Οι οίνοι σερβιρίστηκαν σε τυποποιημένα ποτήρια γευσιγνωσίας οίνου ΙΝΑΟ, σε θερμοκρασία 20°C, υπό λευκό φως και καλυμμένα με πλαστικό επίθεμα για την ελαχιστοποίηση της διαφυγής πτητικών συστατικών. Οι δοκιμαστές κάθονταν σε ξεχωριστές θέσεις χωρίς οπτική επαφή ο ένας από τον άλλο. Ο χώρος είχε θερμοκρασία περίπου 20-22°C, καλό εξαερισμό και ήταν απαλλαγμένος από παρεμβολές όσον αφορά το θόρυβο, την οπτική διέγερση και την οσμή του περιβάλλοντος. Τα δείγματα δόθηκαν στους δοκιμαστές επισημασμένα με τυχαιοποιημένους τριψήφιους αριθμούς για την αναγνώριση. Ανάμεσα στα δείγματα οι γευσιγνώστες κρατούσαν διαλείμματα τουλάχιστον 2 λεπτών.

Έγινε οπτική και οσφρητική και γευστική αξιολόγηση στα κριτήρια που φαίνονται στο παρακάτω φύλλο γευσιγνωσίας (Εικόνα 15), με βάση κλίμακα 5 σημείων. Τα κριτήρια επιλέχθηκαν μετά από συνεργασία με το εκπαιδευμένο πάνελ του εργαστηρίου Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών και ήταν, στην οπτική αξιολόγηση, η «ένταση χρώματος» και η «απόχρωση». Στην οσφρητική αξιολόγηση οι οίνοι αξιολογήθηκαν, στην «ένταση αρώματος», στην οσμή «κόκκινα φρούτα», «φράουλα», «αποξηραμένα φρούτα» και «άνθη». Τέλος, στην γευστική αξιολόγηση, στην «οξύτητα», την «στυπτικότητα» και σαν γενική εντύπωση στο κριτήριο «ποιότητα». Οι βαθμολογίες για το κάθε κριτήριο συγκεντρώθηκαν κι έγινε στατιστική ανάλυση.

Δοκιμαστής:						
	Κλίμακα βαθμολόγησης: 1-5					
Δείγματα						
<u>Οπτική αξιολόγηση</u>						
Ένταση χρώματος (μικρή - μέτρια - υψηλή)						
Απόχρωση (πορτοκαλί - κόκκινο - μωβ)						
<u>Οσφρητική αξιολόγηση</u>						
Ένταση αρώματος (άτονο-μέτριο-έντονο)						
Κόκκινα Φρούτα (λίγο-μέτριο-πολύ)						
Φράουλα (λίγο-μέτριο-πολύ)						
Αποξηραμένα φρούτα (λίγο-μέτριο-πολύ)						
Άνθη (λίγο-μέτριο-πολύ)						
<u>Γευστική αξιολόγηση</u>						
Οξύτητα (χαμηλή-μέτρια-υψηλή)						
Στυπτικότητα (χαμηλή-μέτρια-υψηλή)						
<u>Συνολική εκτίμηση</u>						
Ποιότητα (αποδεκτό-μέτριο-άριστο)						

Εικόνα 15: Φύλλο γευσιγνωσίας οίνων Λημιό

2.10 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την επίδραση του ξεφυλλίσματος στα φυσικά χαρακτηριστικά των σταφυλιών, αλλά και στην χημική σύσταση και το οργανοληπτικό προφίλ των παραγόμενων οίνων, έγινε με την εφαρμογή μονόδρομης ανάλυσης της διακύμανσης τους (One - Way ANOVA) με επίπεδο σημαντικότητας (p value) $p < 0,05$. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με την χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics V.26.

3. Σκοπός της εργασίας

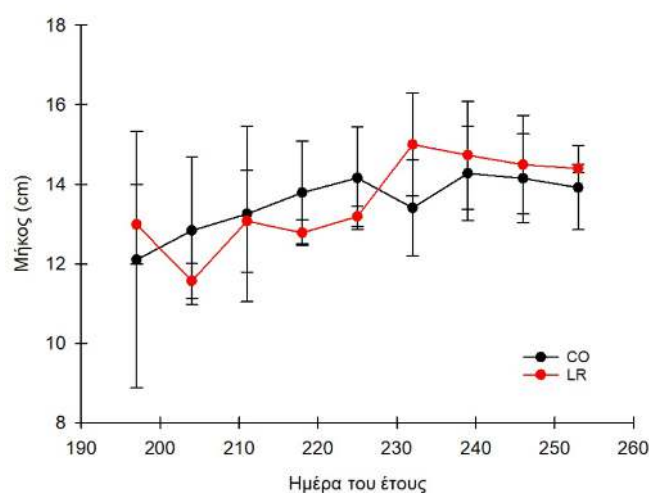
Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να εξεταστούν οι επιδράσεις που ξεφυλλίσματος στην ποικιλία Λημνιό. Το ξεφύλλισμα είναι μια βασική καλλιεργητική τεχνική, η οποία μπορεί να επιφέρει αλλαγές στα σταφύλια καθώς και στους παραγόμενους οίνους. Πιο συγκεκριμένα θα μελετηθούν οι επιδράσεις στα ποσοτικά και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των σταφυλιών αλλά και στους παραγόμενους οίνους με την εφαρμογή εντατικού ξεφυλλίσματος, σε σύγκριση με τα φυτά που δεν θα υποστούν καθόλου ξεφύλλισμα. Σκοπός είναι να μελετηθούν οι επιδράσεις στην συγκεκριμένη ποικιλία με στόχο τις βέλτιστες καλλιεργητικές τεχνικές για την παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας.

Συγκεκριμένα, θα μελετηθεί η επίδραση του ξεφυλλίσματος στο στάδιο της καρπόδεσης, όχι μόνο στα παραγόμενα σταφύλια και στα χαρακτηριστικά τους, αλλά και στους παραγόμενους οίνους τόσο ως προς την φυσικοχημική τους σύσταση όσο ως και προς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά.

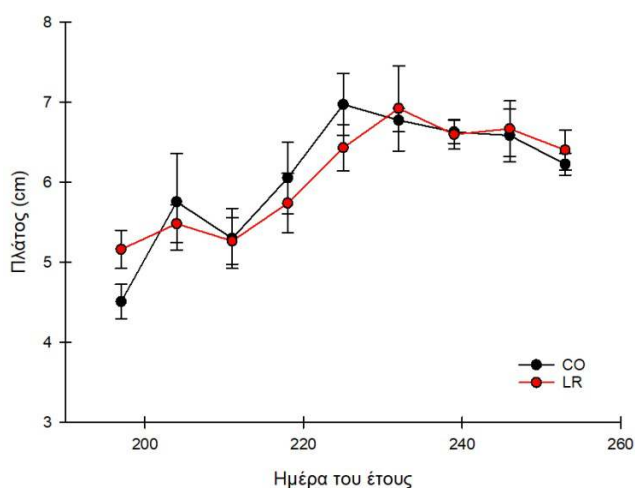
4. Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.1 Επίδραση του ξεφυλλίσματος κατά την ωρίμανση στον αμπελώνα

Σε πρώτο στάδιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των παραμέτρων που μελετήθηκαν κατά την διάρκεια της ωρίμανσης των σταφυλιών στον αμπελώνα σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που αναφέρονται στις μεθόδους. Στα γραφήματα που ακολουθούν φαίνεται η μαθηματική και στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν το μέγεθος των ραγών (μήκος, πλάτος και πάχος).

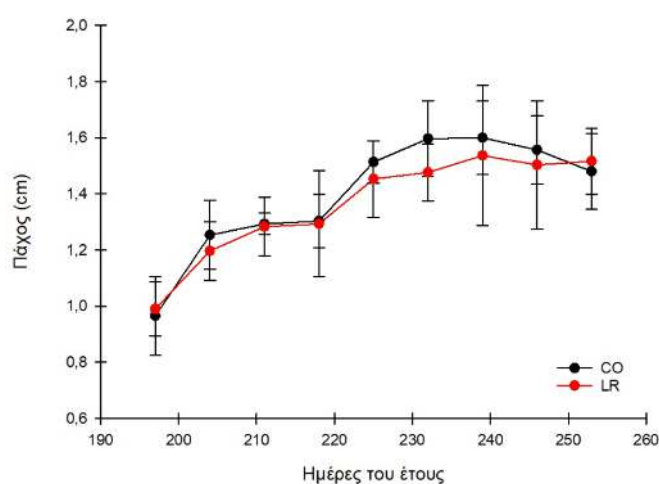


Γράφημα 1: Πορεία εξέλιξης του μήκους των σταφυλιών κατά μέσο όρο. CO: Control (μάρτυρας) LR: Leaf Removal (ξεφύλλισμα)



Γράφημα 2: Πορεία εξέλιξης του πλάτους των σταφυλιών μέσο όρο. CO: Control (μάρτυρας) LR: Leaf Removal (ξεφύλλισμα)

Στα γραφήματα 1 και 2 φαίνεται η πορεία εξέλιξης του μήκους και του πλάτους των ραγών αντίστοιχα από το ξεφύλλισμα, το οποίο έγινε στο στάδιο της πράσινης ράγας, έως και τον τρύγο. Όπως φαίνεται και στα δύο γραφήματα, μεταξύ του μάρτυρα και των φυτών που είχαν υποστεί εντατικό ξεφύλλισμα τα αποτελέσματα ήταν παρεμφερή με τις μέσες τιμές των ξεφυλλισμένων φυτών να είναι υψηλότερες από αυτές του μάρτυρα τόσο στο μήκος, όσο και στο πλάτος ειδικά πριν την ωρίμανση. Ωστόσο μεταξύ τους δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές καθώς το p value για το μήκος και το πλάτος των σταφυλών δεν ήταν σε καμία από τις μετρήσεις μικρότερο του 0,05.



Γράφημα 3: Πορεία εξέλιξης του πάχους των ραγών. CO: Control (μάρτυρας) LR: Leaf Removal (ξεφύλλισμα)

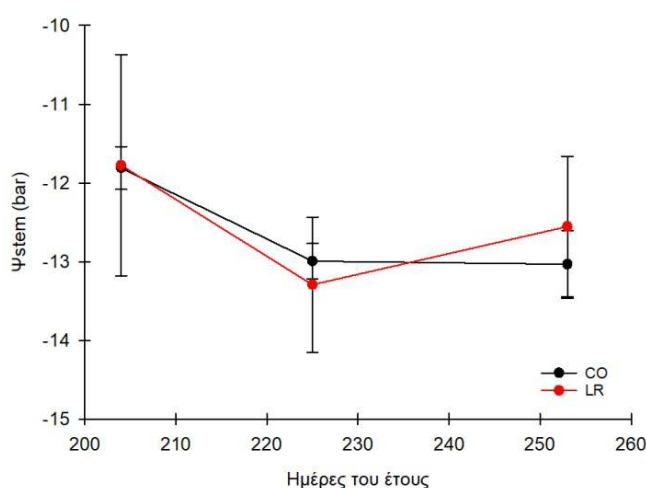
Παράλληλα με την μέτρηση των δυο διαστάσεων των σταφυλών, έγιναν μετρήσεις και του πάχους των ραγών. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 3, το μέγεθος των ραγών ήταν μεγαλύτερο στον μάρτυρα σε σύγκριση με τα ξεφυλλισμένα φυτά καθ' όλη την διάρκεια της ανάπτυξης των σταφυλιών εκτός από την αρχή των μετρήσεων στο στάδιο της πράσινης ράγας και στον τρύγο όπου το πάχος των ραγών από ξεφυλλισμένα φυτά ήταν ελαφρώς μεγαλύτερο από αυτά των μη ξεφυλλισμένων φυτών. Αυτό επιβεβαιώνει τα στοιχεία της βιβλιογραφίας (Main et al, 2004) σχετικά με την αύξηση του πάχους των ραγών, όμως σε καμία από τις μετρήσεις δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

3.2 Υδατικό δυναμικό

Η μέτρηση του υδατικού δυναμικού είναι μια μέτρηση μέσω της οποίας μπορούμε να μετρήσουμε το διαθέσιμο νερό στο φυτό. Στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε η μέτρηση του μεσημβρινού υδατικού δυναμικού του βλαστού Ψ_{stem} . Η μέτρηση έγινε μετά το στάδιο της καρπόδεσης, στο στάδιο του περκασμού και στον τρύγο. Η υδατική καταπόνηση από τον περκασμό έως και τον τρύγο μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα

των σταφυλιών, καθώς αν είναι πολύ έντονη, $\Psi_{stem} < -14$ bar, έχει ως αποτέλεσμα οίνους με υψηλό αλκοολικό βαθμό, χαμηλή οξύτητα και περισσότερο στυπτικές τανίνες. Ενώ μια ήπια υδατική έλλειψη -11 έως -14 bar έχει ευνοϊκή επίδραση στην αναλογία σακχάρων/οξέα του γλεύκους, αύξηση των φαινολικών ενώσεων στους φλοιούς και καλύτερη φαινολική ωρίμανση των τανινών των γιγάρτων (Ojeda et al, 2002).

Σύμφωνα με το Γράφημα 4, το μεσημβρινό υδατικό δυναμικό κινήθηκε σε τιμές ήπιας υδατικής καταπόνησης (-11 έως -14 bar) τόσο για τα φυτά που είχαν ξεφυλλιστεί όσο και για τα φυτά μάρτυρες. Επίσης, οι χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν κατά την μέτρηση στο στάδιο του περκασμού όπου για τα φυτά μάρτυρες το Ψ_{stem} ήταν $-12,97$ bar, ενώ για τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα το Ψ_{stem} είχε την τιμή $-13,3$ bar. Οι μετρήσεις ωστόσο του μεσημβρινού υδατικού δυναμικού δεν είχαν στατιστική διαφορά μεταξύ τους σε καμία από τις τρεις μετρήσεις (p value₁=0,591, p value₂=0,678, p value₃=0,448).



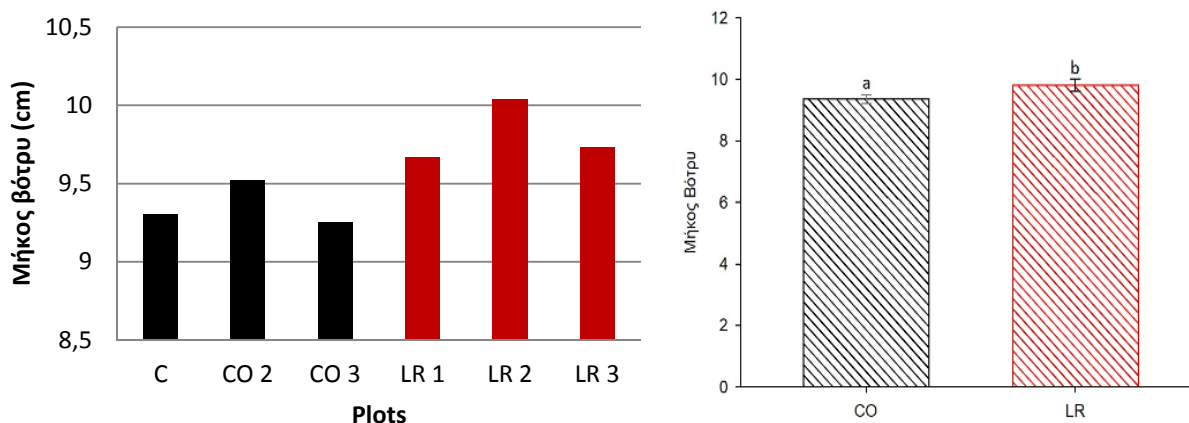
Γράφημα 4: Πορεία διαθέσιμου νερού στα φυτά. CO: Control (μάρτυρας) LR: Leaf Removal (ξεφύλλισμα)

3.3 Επίδραση του ξεφυλλίσματος στον τρύγο

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν όταν τα σταφύλια έφτασαν στην τεχνολογική ωριμότητα και αφορούν μετρήσεις σταφυλιών και ραγών.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 5, όπου εμφανίζονται οι τιμές του μήκους του βότρου για κάθε πειραματική μονάδα ξεχωριστά, για τα φυτά στα οποία δεν εφαρμόστηκε ξεφύλλισμα την μεγαλύτερη τιμή παρουσίασε το plot CO 2 (9,79cm) ενώ τα

υπόλοιπα plot από τα φυτά μάρτυρες δεν παρουσίασαν μεγάλη διαφορά από την μέγιστη τιμή του μήκους του βότρου για τα μη ξεφυλλισμένα φυτά. Από την άλλη, στα plot που εφαρμόστηκε ξεφύλλισμα, την μεγαλύτερη τιμή παρουσίασαν τα φυτά από την πειραματική μονάδα LR 2 (10,04cm) ενώ οι υπόλοιπες πειραματικές μονάδες των φυτών που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα δεν παρουσίασαν μεγάλες αποκλίσεις από την μέγιστη τιμή.

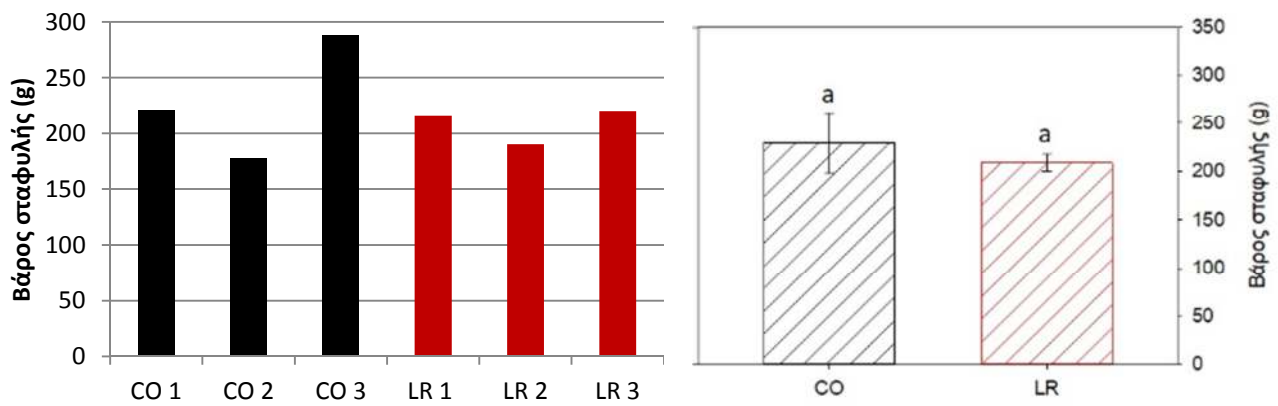


Γραφήματα 5,6: Τιμές μήκους βότρου (cm) για κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 5) και Μήκος βότρου κατά το μέσο όρο σε φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 6). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Κατά την μέτρηση και σύγκριση των μέσων όρων των μετρήσεων για τα φυτά μάρτυρες (CO) και για τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα (LR) διαπιστώνουμε ότι υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων. Πιο συγκεκριμένα για τα φυτά μάρτυρες η μέση τιμή ήταν 9,30 cm ενώ για τα φυτά με εφαρμογή ξεφυλλίσματος η μέση τιμή ήταν 9,74 cm. Οι δύο τιμές μεταξύ τους παρουσίασαν σημαντική στατιστική διαφορά με p value ίσο με 0,032 τιμή μικρότερη από το όριο του 0,05.

Άρα, κατά την μέτρηση του μήκους του βότρου στον τρύγο, παρατηρήθηκε ότι τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα, είχαν μεγαλύτερο μήκος βότρου από τα φυτά μάρτυρες και μάλιστα με στατιστικά σημαντική διαφορά.

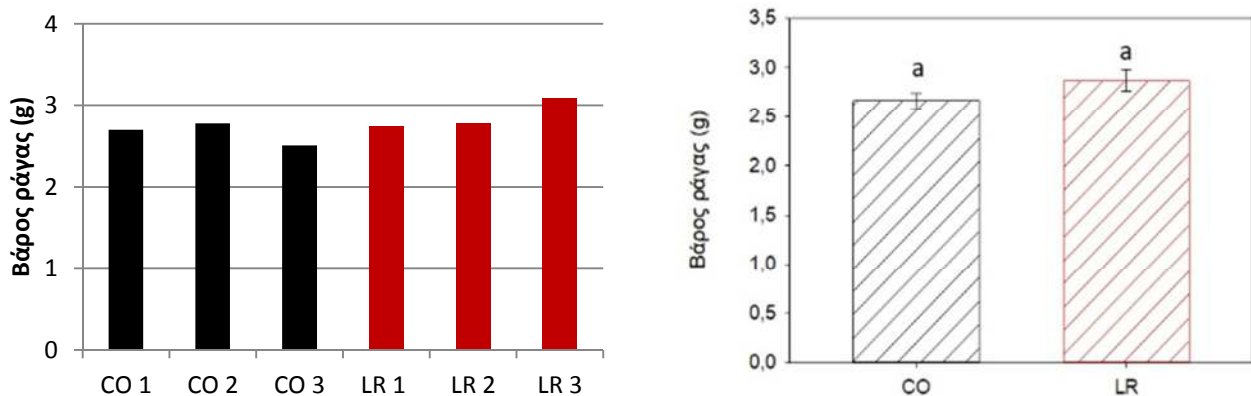
Σε ότι αφορά το βάρος των σταφυλών, τα αποτελέσματα φαίνονται στο Γράφημα 7 ανά πειραματική μονάδα και στο 8 ως μέσος όρος μαζί με την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η μέτρηση του βάρους της σταφυλής για κάθε πειραματική μονάδα μετρήθηκε από τυχαίο δείγμα 10 σταφυλών και υπολογίστηκε η μέση τιμή τους ώστε να βρεθεί το μέσο βάρος σταφυλής ανά πειραματική μονάδα. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 7 η πειραματική μονάδα CO 3 με φυτά μάρτυρες εμφάνισε την μέγιστη τιμή βάρους 288,4 g ενώ οι τιμές των υπόλοιπων πειραματικών μονάδων δεν εμφάνισαν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ τους. Αν υπολογιστούν οι μέσοι όροι των επαναλήψεων (γράφημα 8) για το βάρος των σταφυλών, τα φυτά που δεν είχαν υποστεί ξεφύλλισμα είχαν υψηλότερες τιμές χωρίς ωστόσο πάλι να παρουσιάζεται στατιστική διαφορά (p value = 0,575).



Γραφήματα 7, 8: Τιμές βάρους σταφυλής (g) για κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 7) και Μέσοι όροι των επαναλήψεων σε φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 8). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Ανάλογα, οι μετρήσεις του βάρους ανά ράγα φαίνονται στα γραφήματα 9 (ανά πειραματική μονάδα, και 10 (μέσοι όροι). Η μέτρηση του βάρους ράγας για κάθε πειραματική μονάδα μετρήθηκε σε τυχαίο δείγμα 50 ραγών από κάθε πειραματική μονάδα κατά τον τρύγο και όπως φαίνεται στο Γράφημα 9 εμφανίζει μεγαλύτερη τιμή στην πειραματική μονάδα LR 3 με μέση τιμή 3,09 g ανά ράγα. Οι υπόλοιπες πειραματικές μονάδες δεν εμφανίζουν ιδιαίτερες αποκλίσεις με την μέγιστη τιμή, με ελάχιστη τιμή να εμφανίζει η πειραματική μονάδα CO 3 με τιμή 2,51 g.

Στο Γράφημα 10 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές του βάρους ανά ράγα των πειραματικών μονάδων για τα φυτά μάρτυρες (CO) και για την εφαρμογή ξεφυλλίσματος (LR). Όπως φαίνεται το ξεφύλλισμα αύξησε το βάρος της ράγας στα φυτά ωστόσο χωρίς αυτό να παρουσιάζει στατιστική διαφορά (p value = 0,205)

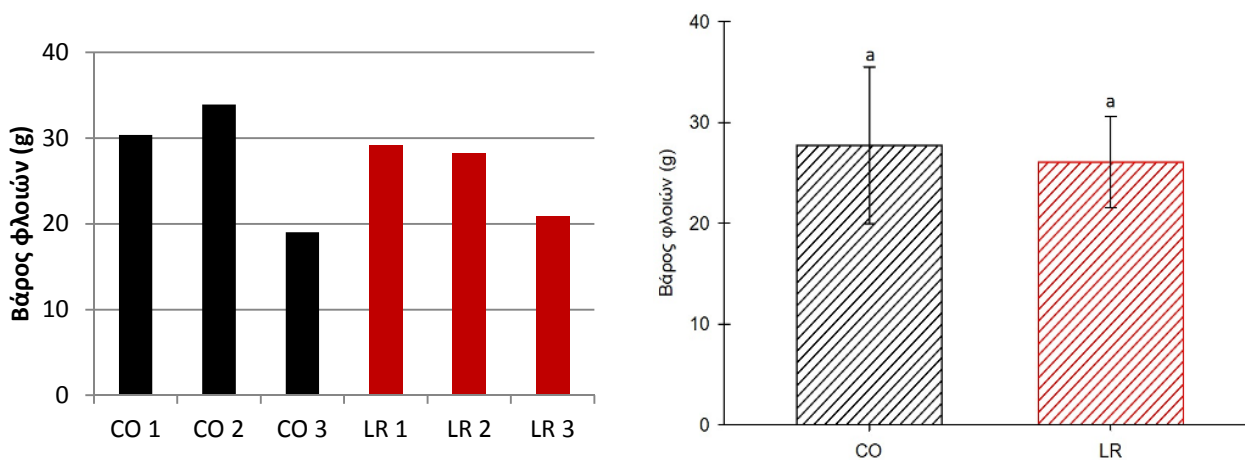


Γραφήματα 9, 10: Τιμές βάρους ράγας (g) για κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 9) και Μέσοι όροι Βάρους ράγας σε φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 10). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Σε συνδυασμό με τα Γραφήματα 1-3 που αφορούν τα μεγέθη σταφυλής και το πάχος ράγας μπορούμε να θεωρήσουμε ότι τα φυτά που έγινε εφαρμογή ξεφυλλίσματος είχαν σταφυλές με μεγαλύτερο μέγεθος, αλλά οι ράγες, παρότι ήταν βαρύτερες, είχαν μικρότερο πάχος και το συνολικό βάρος των σταφυλών ήταν μικρότερο.

Επόμενο μέγεθος για το οποίο καταγράφηκαν δεδομένα ήταν το βάρος των φλοιών. Σε ένα τυχαίο σύνολο 50 ραγών για κάθε πειραματική μονάδα μετρήθηκε το βάρος των φλοιών αφού έγινε χειρωνακτικά αποφλοιώση των ραγών και αφού οι φλοιοί πλύθηκαν και στέγνωσαν με την χρήση απορροφητικού χαρτιού. Το βάρος των φλοιών των ραγών ανά πειραματική μονάδα παρουσιάζεται στο Γράφημα 11 όπου η μέγιστη τιμή παρατηρείται στην πειραματική μονάδα CO 2 με τιμή 33,9 g. Οι πειραματικές μονάδες CO 3 και LR 3 παρουσιάζουν τις χαμηλότερες τιμές για κάθε εφαρμογή. Οι υπόλοιπες πειραματικές μονάδες μεταξύ τους δεν έχουν μεγάλες αποκλίσεις.

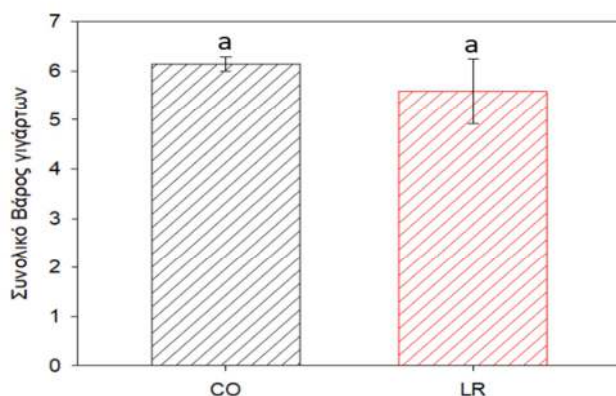
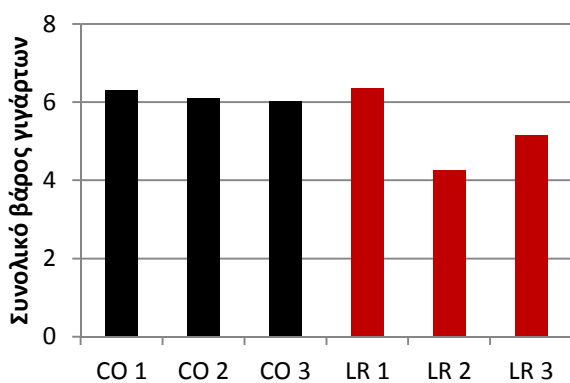
Στο Γράφημα 12 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των πειραματικών μονάδων για την εφαρμογή του ξεφυλλίσματος (LR) και για τα φυτά μάρτυρες (CO). Πιο συγκεκριμένα, το συνολικό βάρος των φλοιών από τα φυτά μάρτυρες ήταν μεγαλύτερο (CO: 27,8 g) σε σύγκριση με τα φυτά όπου εφαρμόστηκε ξεφύλλισμα (LR: 26,1g) χωρίς ωστόσο να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Η διαφορά στην αναλογία του βάρους των φλοιών και της σάρκας που εμφανίζεται σε προηγούμενες μελέτες (Poni et al, 2009) οφείλεται κυρίως στο χρονικό σημείο της εφαρμογής ξεφυλλίσματος. Σε αύξηση του βάρους των φλοιών οδηγεί το προανθικό ξεφύλλισμα, ενώ στην μελέτη μας έγινε μετά την άνθιση.



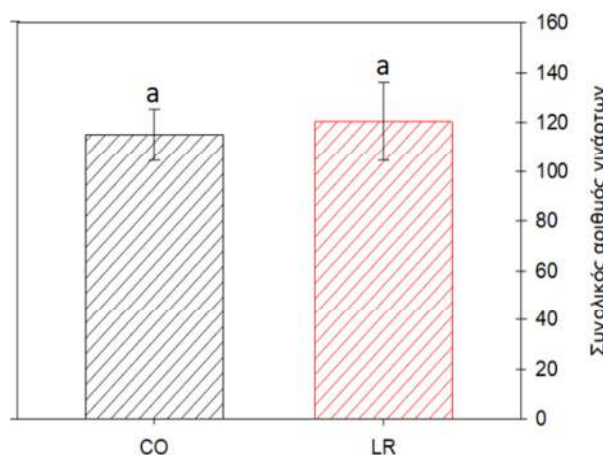
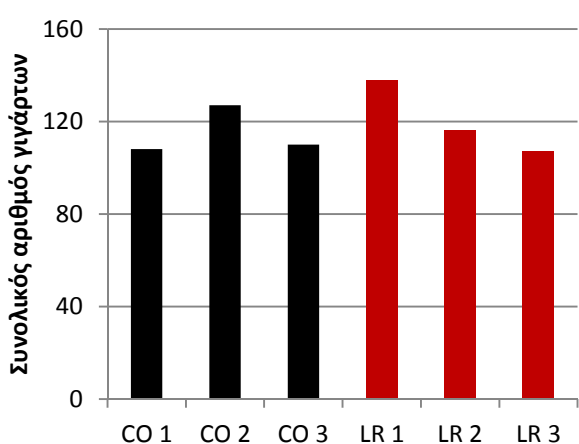
Γραφήματα 11, 12: Τιμές συνολικού βάρους φλοιών (g) για κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 11). Μέσοι όροι συνολικού βάρους φλοιών σε φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 12). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Η τελευταία παράμετρος που εξετάστηκε στις πειραματικές μονάδες κατά τον τρύγο ήταν το βάρος και ο αριθμός των γιγάρτων και τα αποτελέσματα των μετρήσεων ακολουθούν.

Σε τυχαίο δείγμα 50 ραγών από κάθε πειραματική μονάδα συλλέχθηκαν τα γίγαρτα από κάθε ράγα τα οποία πλύθηκαν και στέγνωσαν με την χρήση απορροφητικού χαρτιού και στην συνέχεια μετρήθηκε το συνολικό τους βάρος (Γράφημα 13) καθώς και ο συνολικός τους αριθμός (Γράφημα 15) ανά πειραματική μονάδα. Όπως παρατηρούμε το μέγιστο βάρος στο σύνολο των γιγάρτων παρουσιάστηκε στην πειραματική μονάδα LR 1 ωστόσο οι τιμές των υπόλοιπων πειραματικών μονάδων που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα δεν ήταν εξίσου υψηλές σε αντίθεση με τις τιμές των πειραματικών μονάδων των φυτών μάρτυρες που ήταν σχετικά κοντά στην μέγιστη τιμή.



Γραφήματα 13, 14: Τιμές βάρους γιγάρτων (g) για κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 13). Μέσοι όροι βάρους γιγάρτων σε φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφύλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 14). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

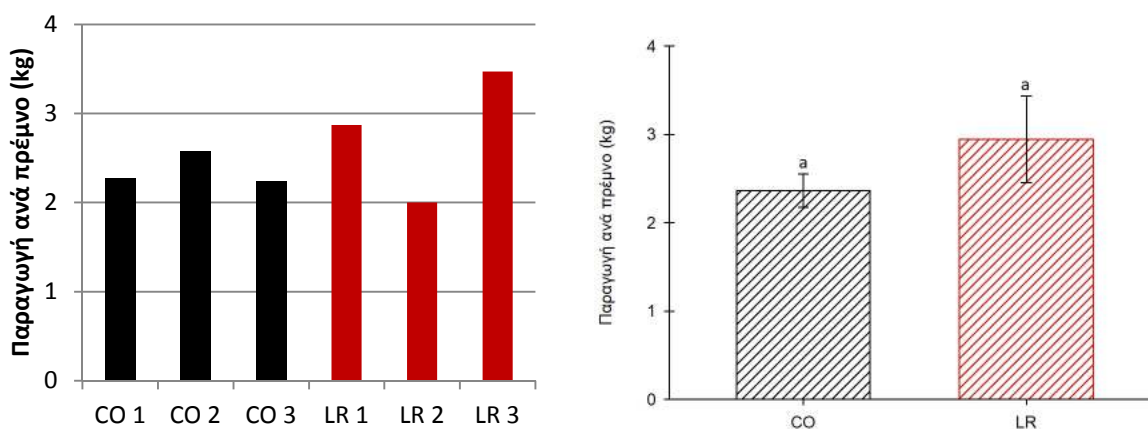


Γραφήματα 15, 16: Τιμές συνολικού αριθμού γιγάρτων 50 ραγών (g) για κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 15). Μέσοι όροι συνολικού αριθμού γιγάρτων σε φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφύλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 16). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Ο μεγαλύτερος συνολικός αριθμός των γιγάρτων ανά πειραματική μονάδα παρουσιάζεται στην πειραματική μονάδα LR 1 ενώ οι τιμές για τις υπόλοιπες πειραματικές μονάδες είναι παρόμοιες, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 15.

Στα Γραφήματα 14, 16 φαίνεται οι μέσο όροι και οι τυπικές αποκλίσεις του βάρους αλλά και του συνολικού αριθμού των γιγάρτων από τις ράγες των φυτών μάρτυρες αλλά και των ραγών από τα φυτά της επέμβασης. Τα ξεφυλλισμένα φυτά παρουσίασαν χαμηλότερο μέσο όρο στο συνολικό βάρος των γιγάρτων (5,7 g), σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες που είχαν υψηλότερη μέση τιμή στο σύνολο του βάρους των γιγάρτων (6,1 g). Τα γίγαρτα ωστόσο των ξεφυλλισμένων φυτών κατά μέσο όρο είναι περισσότερα σε συνολικό αριθμό (120) έναντι των φυτών που δεν εφαρμόστηκε το ξεφύλλισμα (114) επομένως το βάρος τους ήταν ανεξάρτητο από το σύνολο τους, χωρίς όμως καμιά από τις δυο μετρήσεις να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Όταν προσδιορίστηκε η ώρα της συγκομιδής, τα σταφύλια τρυγήθηκαν ανά πειραματική μονάδα. Οι σταφυλές από τον ίδιο αριθμό φυτών για κάθε πειραματική μονάδα συλλέχθηκαν και μετρήθηκε η συνολική παραγωγή και στην συνέχεια η παραγωγή ανά πρέμνο για κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 17). Τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα παρουσίασαν αύξηση στην συνολική παραγωγή ανά πρέμνο, με την υψηλότερη τιμή να παρουσιάζεται για την πειραματική μονάδα LR 3 ωστόσο και οι υπόλοιπες πειραματικές μονάδες δεν είχαν μεγάλες αποκλίσεις από την μέγιστη τιμή. Στο Γράφημα 18 φαίνεται και η αύξηση της συνολικής παραγωγής ανά πρέμνο για τον μέσο όρο των φυτών που ήταν μάρτυρες και για τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα ωστόσο αυτή η αύξηση της παραγωγής δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά. Αυτό επιβεβαιώνεται και με προηγούμενες μελέτες (Verdenal et al, 2019), όπου το ξεφύλλισμα μετά την άνθιση και πριν τον περκασμό δεν έχει κάποια σημαντική επίδραση στην συνολική παραγωγή του πρέμνου.



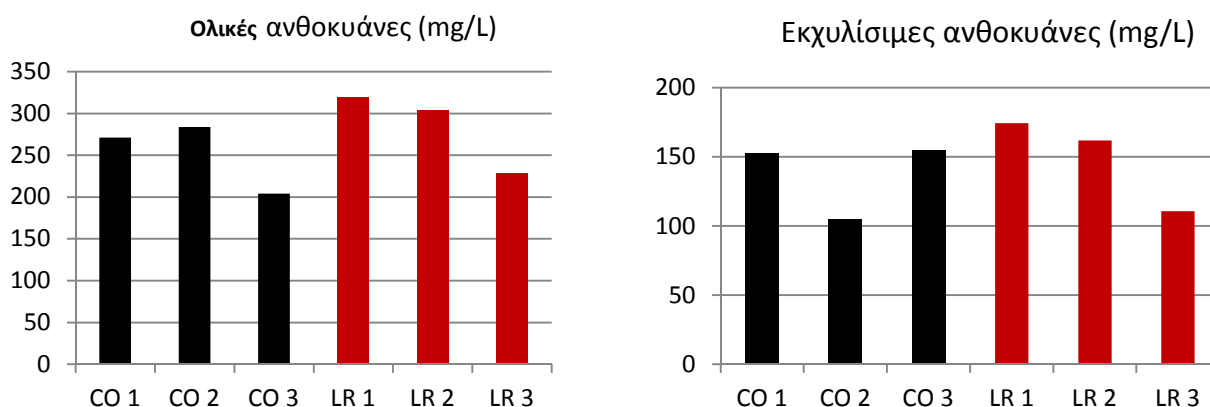
Γραφήματα 17, 18: Τιμές συνολικής παραγωγής ανά πρέμνο (Kg) για κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 17). Μέσοι όροι συνολικής παραγωγής ανά πρέμνο σε φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 18). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

3.4 Ολικές ανθοκυάνες σταφυλιών – Μέθοδος Glories

Για την μελέτη της επίδρασης του ξεφυλλίσματος στο σύνολο των ολικών ανθοκυανών, στο σύνολο των εκχυλίσιμων ανθοκυανών και επομένως και στην εκχυλισιμότητα των ανθοκυανών εφαρμόστηκε η μέθοδος Glories σε σταφύλια, σε ολόκληρες ράγες.

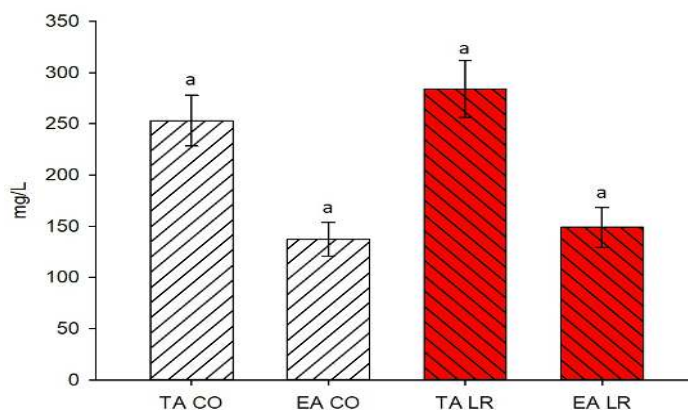
Η μέθοδος Glories εκτιμά την φαινολική ωρίμανση των ραγών. Παρέχει πληροφορίες τόσο ποσοτικές (ολικό δυναμικό σε ανθοκυάνες και ταννίνες), όσο και ποιοτικές (εκχυλισιμότητα των ανθοκυανών, βαθμός ωρίμανσης των γιγάρτων) των πολυφαινολών. Στην πράξη η μέθοδος αποτελεί ένα μέσο διάκρισης του φαινολικού δυναμικού μιας ποικιλίας και της δυνατότητας εκχύλισης των ανθοκυανών που περιέχει. Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιείται ένα διάλυμα pH 1 και ένα διάλυμα pH 3,6. Στο pH 1 γίνεται εκχύλιση όλων των ανθοκυανών του δείγματος ενώ το pH 3,6 αντιστοιχεί στις πραγματικές συνθήκες εκχύλισης στη δεξαμενή. Η απελευθέρωση των ανθοκυανών από το φλοιό των ραγών εξαρτάται από το πορώδες των κυτταρικών μεμβρανών που συνδέεται άμεσα με την ωριμότητα των ραγών. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο τιμές pH δίνει μια ένδειξη της εκχυλισιμότητας των χρωστικών ουσιών (AE %), που είναι συνάρτηση τόσο της ωριμότητας των ραγών αλλά και της περατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζουν πολύ μεγάλη πρακτική σημασία, δεδομένου ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της διαδικασίας εκχύλισης των ανθοκυανών. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή της εκχυλισιμότητας των ανθοκυανών τόσο πιο εύκολα εκχυλίζονται στον οίνο.

Αρχικά υπολογίστηκε το σύνολο των ανθοκυανών και οι εκχυλίσιμες ανθοκυάνες και τα αποτελέσματα φαίνονται στα γραφήματα 19 και 20 αντίστοιχα για κάθε πειραματική μονάδα. Στο γράφημα 21 φαίνονται οι αντίστοιχοι μέσοι όροι και η στατιστική τους επεξεργασία.



Γραφήματα 19, 20: Ολικές ανθοκυάνες και εκχυλίσιμες ανθοκυάνες ανά πειραματική μονάδα για φυτά μάρτυρες (CO) και για φυτά που έγινε ξεφύλλισμα (LR).

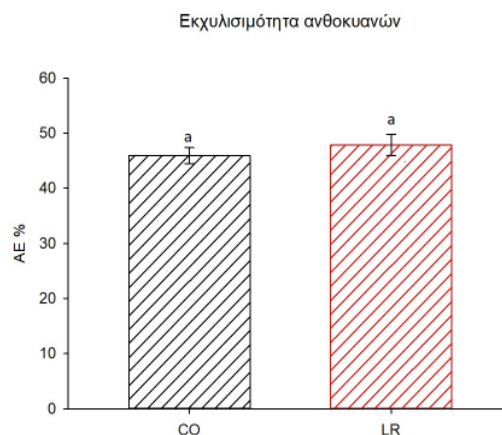
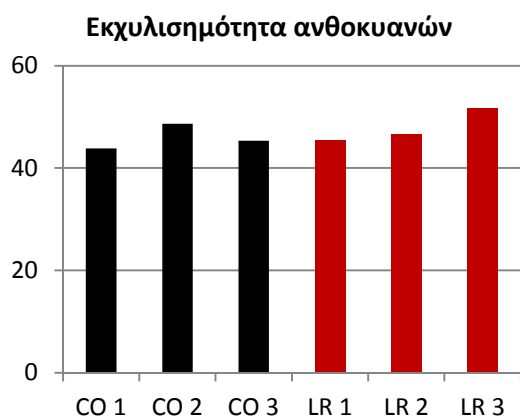
Ολικές και εκχυλίσιμες ανθοκυάνες



Γραφήματα 21: Ολικές και εκχυλίσιμες ανθοκυάνες (mg/L) όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο *Glories*. TA CO: Ολικές ανθοκυάνες μάρτυρα, EA CO: Εκχυλίσιμες ανθοκυάνες μάρτυρα, TA LR: Ολικές ανθοκυάνες ξεφυλλισμένων φυτών, EA LR: Εκχυλίσιμες ανθοκυάνες ξεφυλλισμένων φυτών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι στατιστικά διαφορετικές.

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 19 οι ολικές ανθοκυάνες των πειραματικών μονάδων που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα παρουσιάζουν ως επί το πλείστον υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με τις ολικές ανθοκυάνες από τα φυτά που δεν είχαν υποστεί ξεφύλλισμα. Οι εκχυλίσιμες ανθοκυάνες ανά πειραματική μονάδα παρουσιάζονται στο Γράφημα 20 και όπως φαίνεται οι τιμές των πειραματικών μονάδων από τα φυτά μάρτυρες είναι χαμηλότερες. Αυτό σημαίνει ότι οι εκχύλιση των ανθοκυανών στα σταφύλια των συγκεκριμένων πειραματικών μονάδων ήταν ευκολότερη.

Στο Γράφημα 21 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των πειραματικών μονάδων για τα φυτά μάρτυρες και για τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα και μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι υπάρχει αύξηση των ολικών ανθοκυανών με το ξεφύλλισμα ωστόσο η εκχυλισιμότητα των ανθοκυανών με το ξεφύλλισμα είναι δυσκολότερη.



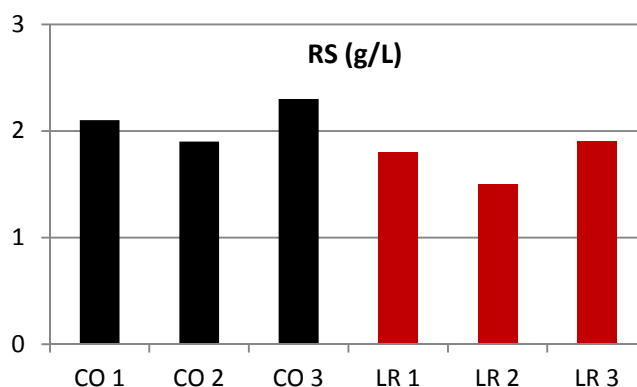
Γραφήματα 22, 23: Ποσοστό εκχυλισιμότητας των ολικών ανθοκυανών για κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 22). Μέσοι όροι του επί τοις % σε φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 23). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα Γραφήματα 22 και 23 όπου φαίνεται το ποσοστό εκχυλισιμότητας των ολικών ανθοκυανών ανά πειραματική μονάδα και οι μέσοι όροι της κάθε εφαρμογής, με τις πειραματικές μονάδες των φυτών χωρίς την εφαρμογή ξεφυλλίσματος να παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές άρα και ευκολότερη εκχύλιση των ολικών ανθοκυανών. Σε καμία περίπτωση όμως τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

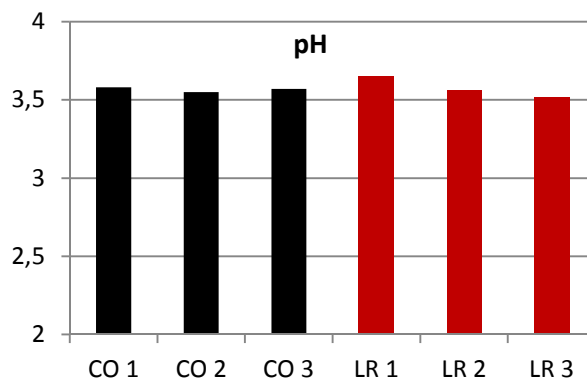
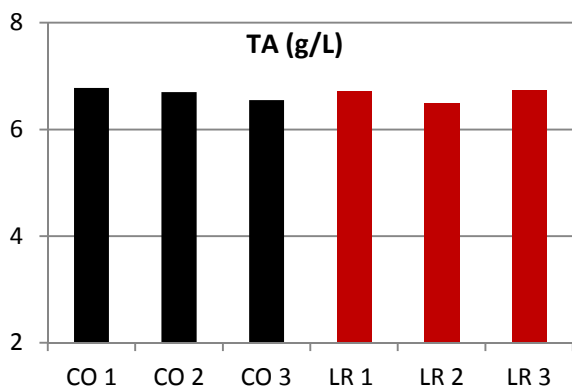
3.5 Επίδραση του ξεφυλλίσματος στους παραγόμενους οίνους

3.5.1 Βασικές αναλύσεις οίνων

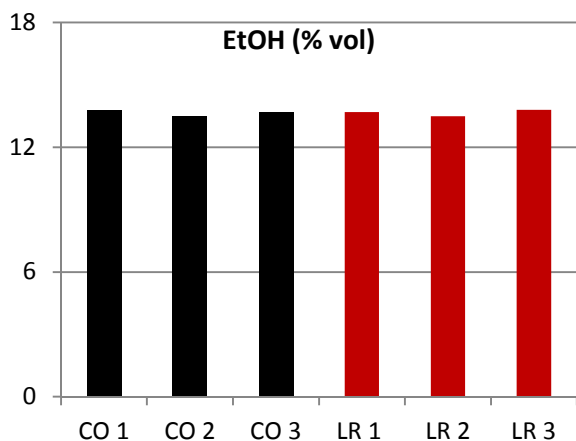
Τα σταφύλια που τρυγήθηκαν από τα πρέμνα της κάθε πειραματικής μονάδας οινοποιήθηκαν ξεχωριστά και με το ίδιο πρωτόκολλο έτσι ώστε τυχόν διαφορές στην πρώτη ύλη να αποτυπωθούν στους παραγόμενους οίνους. Στα γραφήματα που ακολουθούν φαίνονται τα αποτελέσματα των βασικών αναλύσεων των πειραματικών οίνων ανά πειραματική μονάδα.



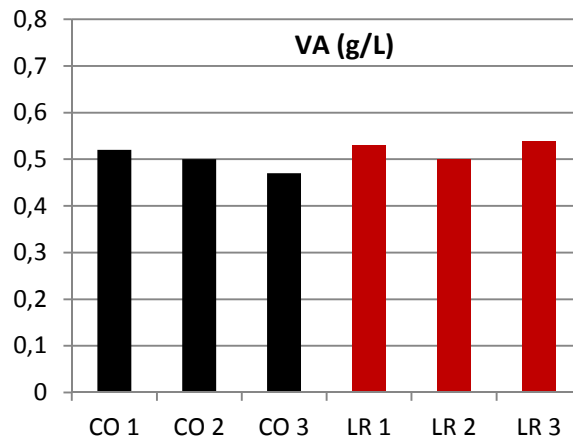
Γράφημα 24: Υπολειπόμενα σάκχαρα στους οίνους που προέκυψαν από τα σταφύλια των πειραματικών μονάδων (CO: μάρτυρες, LR: με ξεφύλλισμα)



Γράφημα 25: Ογκομετρούμενη οξύτητα στους οίνους που προέκυψαν από τα σταφύλια των πειραματικών μονάδων (CO: μάρτυρες, LR: με ξεφύλλισμα)



Γράφημα 26: Ενεργή οξύτητα, pH, στους οίνους που προέκυψαν από τα σταφύλια των πειραματικών μονάδων (CO: μάρτυρες, LR: με ξεφύλλισμα)



Γράφημα 27: Αλκοολικός τίτλος(% vol) των οίνων που προέκυψαν από τα σταφύλια των πειραματικών μονάδων (CO: μάρτυρες, LR: με ξεφύλλισμα)

Γράφημα 28: Πτητική οξύτητα στους οίνους που προέκυψαν από τα σταφύλια των πειραματικών μονάδων (CO: μάρτυρες, LR: με ξεφύλλισμα)

Στο γράφημα 24 φαίνεται η συγκέντρωση των υπολειπόμενων σακχάρων στους οίνους. Είναι η ανάλυση που πιστοποιεί το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Τιμές περίπου 2 g/L είναι ενδεικτικές για την πλήρη ζύμωση των σακχάρων και την κατάταξη των οίνων στην κατηγορία των ξηρών. Οι υπόλοιπες αναλύσεις (γραφήματα 25-28) έδωσαν τιμές κοντά στις συνήθεις για ερυθρούς οίνους χωρίς στατιστική διαφορά ανάμεσα στις επεμβάσεις. Οι μέσοι όροι των επαναλήψεων φαίνονται στον πίνακα 2 κι επιβεβαιώνεται ότι οι παραγόμενοι οίνοι, τόσο από σταφύλια μάρτυρες, όσο και από τα σταφύλια των ξεφυλλισμένων φυτών δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, έγιναν μετρήσεις για την ολική οξύτητα ως προς τρυγικό οξύ, για το pH, για τον αλκοολικό τίτλο και την πτητική οξύτητα των οίνων. Σε κανένα μέγεθος δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστική διαφορά με την εφαρμογή του ξεφυλλίσματος.

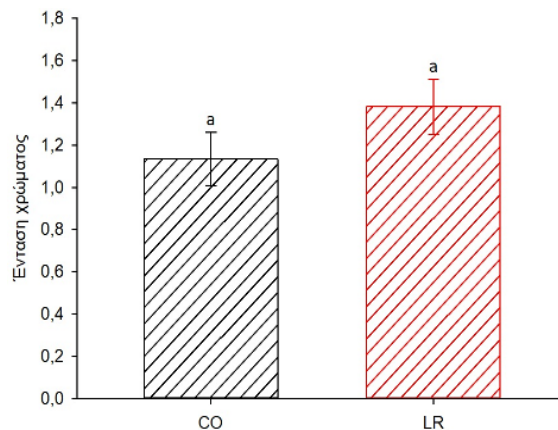
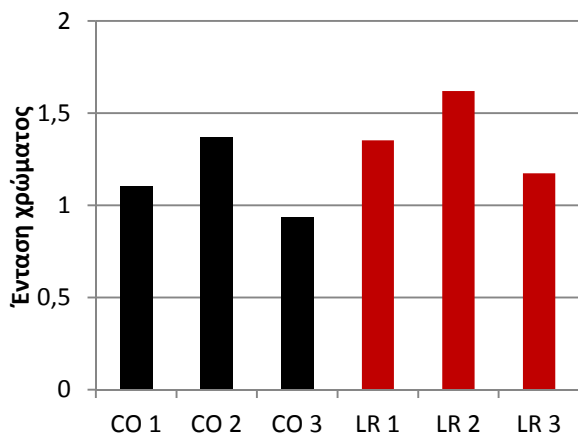
Πίνακας 2: Μέσες τιμές βασικών αναλύσεων των οίνων που προήλθαν από τα φυτά μάρτυρες (CO) και τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα (LR). **RS**: Ανάγοντα σάκχαρα, **AT**: Ογκομετρούμενη οξύτητα **pH**: Ενεργός οξύτητα, **EtOH**: Αλκοολικός τίτλος, **VA**: Πτητική οξύτητα

	RS	TA	pH	EtOH(%vol)	VA
CO	2,1	6,7	3,56	13,6	0,49
LR	1,7	6,6	3,57	13,7	0,52
p value	ns	ns	ns	ns	ns

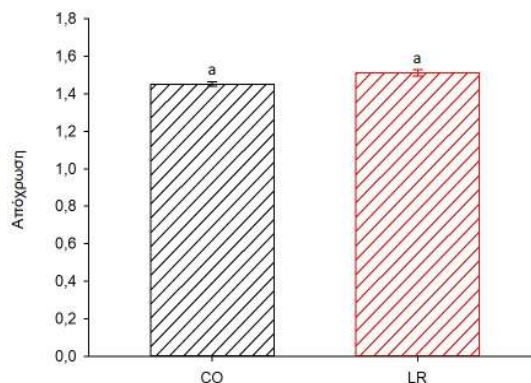
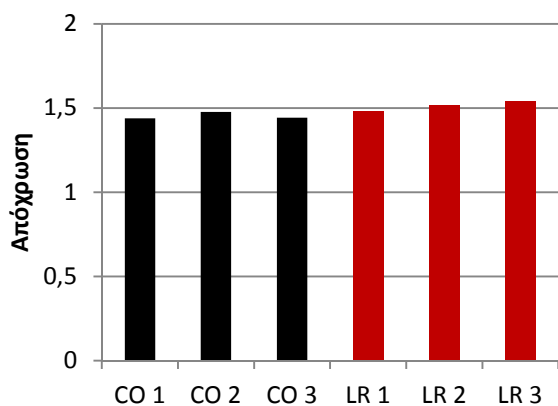
3.5.2 Μετρήσεις χρώματος

Το χρώμα των ερυθρών οίνων είναι συνέπεια της εκχύλισης των έγχρωμων συστατικών των φλοιών στο εν ζυμώσει γλεύκος κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Για την ποσοτική εκτίμηση του χρώματος χρησιμοποιούνται τα χρωματικά χαρακτηριστικά, η ένταση και η απόχρωση, δύο παράμετροι που προκύπτουν από την φωτομέτρηση του δείγματος σε τρία μήκη κύματος, 420, 520 και 620 nm. Η ένταση είναι το άθροισμα της απορρόφησης στα τρία μήκη ενώ η απόχρωση είναι ο λόγος της απορρόφησης στα 420 προς την απορρόφηση στα 520 nm. Η ένταση αποτελεί ένδειξη της 'ποσότητας' και του 'βάθους' του χρώματος ενώ η απόχρωση είναι ένδειξη της ηλικίας των οίνων.

Στα γραφήματα 29 και 30 φαίνεται η ένταση χρώματος των οίνων για κάθε πειραματική μονάδα ξεχωριστά και οι μέσοι όροι των επαναλήψεων καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία. Σαν γενική παρατήρηση θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι οι οίνοι δεν χαρακτηρίζονται από το έντονο χρώμα τους. Ένταση του επιπέδου 1-1,5 χαρακτηρίζει τους ροζέ ή πολύ ελαφρείς ερυθρούς οίνους. Το ξεφύλλισμα φαίνεται πως αύξησε την ένταση του χρώματος των παραγόμενων οίνων καθώς, σύμφωνα με το Γράφημα 29, οι οίνοι από φυτά που έχουν υποστεί ξεφύλλισμα έχουν υψηλότερες τιμές χρωματική έντασης με μέγιστη τιμή να παρουσιάζει ο οίνος της πειραματικής μονάδας LR 2. Ωστόσο μεταξύ των υπόλοιπων παραγόμενων οίνων δεν παρουσιάζονται μεγάλες αποκλίσεις πράγμα που δικαιολογεί και τις κοντινές τιμές των μέσων όρων της χρωματικής έντασης. Στο Γράφημα 30 φαίνεται πως η ένταση του χρώματος αυξήθηκε με το ξεφύλλισμα. Η ένταση των ξεφυλλισμένων φυτών είχε μέσο όρο έντασης 1,38 ενώ η μέτρηση της έντασης του χρώματος των οίνων που παράχθηκαν από τα φυτά μάρτυρες είχε μέσο όρο 1,13. Παρότι υπάρχει μεγάλη διαφορά στους μέσους όρους των εντάσεων η στατιστική επεξεργασία δεν ανίχνευσε σημαντικές διαφορές στους μέσους όρους.



Γραφήματα 29, 30: Μέτρηση έντασης χρώματος των οίνων για κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 29). Μέσοι όροι της έντασης χρώματος στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 30). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.



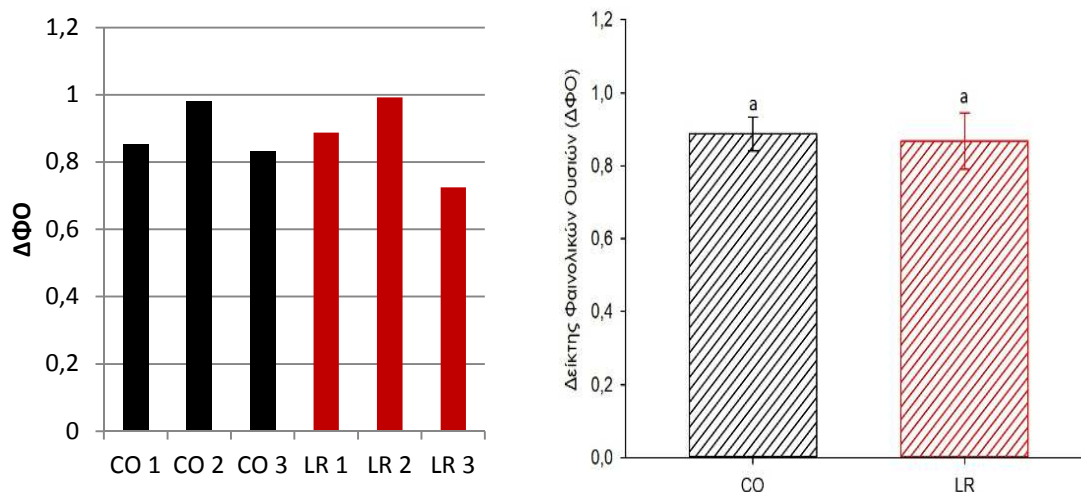
Γραφήματα 31, 32: Μέτρηση απόχρωσης χρώματος των οίνων για κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 31). Μέσοι όροι της απόχρωσης στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 32). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Στα γραφήματα 31 και 32 παρουσιάζεται η απόχρωση των οίνων τόσο από τα ξεφυλλισμένα φυτά όσο και από τα φυτά που δεν είχαν υποστεί ξεφύλλισμα με τιμές χωρίς διαφοροποιήσεις, περίπου κοντά στο 1,5. Βέβαια για φρέσκους οίνους, οι τιμές αυτές είναι σχετικά μεγάλες. Σε επίπεδο οίνου ανά πειραματική μονάδα φαίνεται πως υπάρχει μια αύξηση στην απόχρωση με την εφαρμογή του ξεφυλλίσματος αλλά οι διαφορές είναι στο επίπεδο του δεύτερου δεκαδικού ψηφίου της τελικής τιμής. Πιο συγκεκριμένα για τα φυτά μάρτυρες ο μέσος όρος της απόχρωσης από τις τρεις επαναλήψεις ήταν 1,456 ενώ για τα ξεφυλλισμένα φυτά ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων ήταν 1,514. Οι οίνοι δεν παρουσίασαν στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

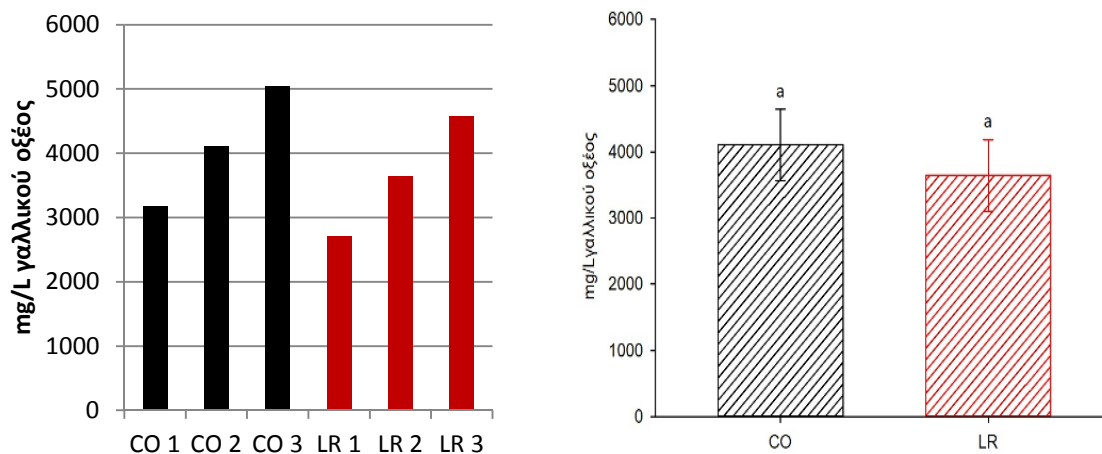
3.5.3 Μετρήσεις φαινολικών συστατικών

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν σημαντική παράμετρο των οίνων γιατί από αυτές εξαρτάται το χρώμα και οι αποχρώσεις, κυρίως, των ερυθρών και ροζέ οίνων αλλά και οι ιδιαίτεροι γευστικοί χαρακτήρες τους. Είναι υπεύθυνες για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της ποιότητας των οίνων κατά τη συντήρηση και παλαίωση. Για τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού 'φορτίου' των οίνων θα εξεταστούν δύο μέθοδοι, ο Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) και τα ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin.

Ο προσδιορισμός του ΔΦΟ βασίζεται στην ισχυρή απορρόφηση των βενζολικών δακτυλίων των φαινολικών ενώσεων στο υπεριώδες φως, το μέγιστο της οποίας παρατηρείται στα 280 nm. Έτσι λοιπόν για κάθε δείγμα έγινε η μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των επαναλήψεων. Στα γραφήματα 33 και 34 φαίνονται οι τιμές του ΔΦΟ για του οίνους ανά πειραματική μονάδα αλλά και οι μέσοι όροι των επαναλήψεων μετά από στατιστική επεξεργασία (γράφημα 34). Οι τιμές μεταξύ των πειραματικών μονάδων δεν παρουσιάζουν αποκλίσεις με εξαίρεση την τιμή της πειραματικής μονάδας LR 3 η οποία είναι ελαφρώς μικρότερη σε σχέση με τις υπόλοιπες απορροφήσεις. Η μικρή διαφορά ανάμεσα στις επεμβάσεις φαίνεται και στο γράφημα 34 όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές του ΔΦΟ. Για τα φυτά μάρτυρες ο ΔΦΟ ήταν 0,886 κατά μέσο όρο ενώ για τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα η μέση τιμή ήταν 0,868. Μεταξύ των τιμών δεν εμφανίστηκε στατιστική διαφορά και επομένως μπορούμε να πούμε ότι το ξεφύλλισμα δεν είχε κάποια επίδραση στον Δείκτη Φαινολικών Ουσιών.



Γραφήματα 33, 34: Μέτρηση ΔΦΟ στους οίνους από κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 33). Μέσοι όροι του ΔΦΟ στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 34). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.



Γραφήματα 35, 36: Μέτρηση ολικών φαινολικών (mg/L GAE) στους οίνους από κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 35). Μέσοι όροι της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών (mg/L GAE) στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 36). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu κι αφού βαθμονομήθηκε με πρότυπη καμπύλη σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) παρουσιάζεται στα γραφήματα 35 και 36. Στο γράφημα 35, όπου παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών ανά πειραματική μονάδα, φαίνεται πως οι οίνοι των φυτών που δεν είχαν υποστεί ξεφύλλισμα έχουν ελαφρώς μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τους οίνους των φυτών που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα. Οι διαφορές ωστόσο μεταξύ τους έχουν αρκετή διασπορά κι αυτό φαίνεται στο γράφημα 36 με την μαθηματική επεξεργασία όπου η τυπική απόκλιση δεν επιτρέπει την ανίχνευση στατιστικά σημαντικής διαφοράς.

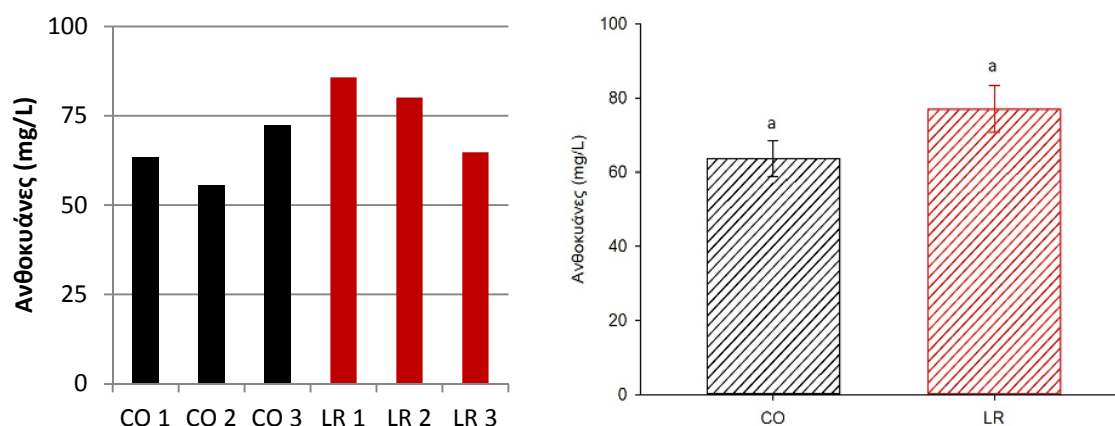
Όπως στην μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm (γράφημα 34), έτσι και στην μέτρηση των ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin – Ciocalteu (γράφημα 36), οι μέσοι όροι των αναλύσεων στους οίνους από φυτά που δεν είχαν υποστεί ξεφύλλισμα εμφάνισαν μεγαλύτερες τιμές από αυτούς των ξεφυλλισμένων φυτών χωρίς όμως να παρουσιάζουν στατιστική διαφορά μεταξύ τους ($p=0,573$).

3.5.4 Ανθοκυάνες οίνων

Πέρα από την γενική εκτίμηση που έχουμε για το χρώμα των οίνων με την μέτρηση της έντασης και της απόχρωσης, θελήσαμε να εξετάσουμε την επίδραση των διάφορων συστατικών που συμβάλουν στην έκφραση του χρώματος των ερυθρών οίνων και για τον λόγο αυτό ακολούθησαν μετρήσεις των ολικών ανθοκυανών και των ανθοκυανών με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας.

Για τον φωτομετρικό προσδιορισμό των ολικών ανθοκυανών στους οίνους ακολουθήθηκε το σχετικό πρωτόκολλο και μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 520

nm. Τα αποτελέσματα από την μέτρηση ανά πειραματική μονάδα και οι μέσοι όροι των πειραματικών μονάδων όπως και η στατιστική τους επεξεργασία φαίνονται στα γραφήματα 37 και 38.



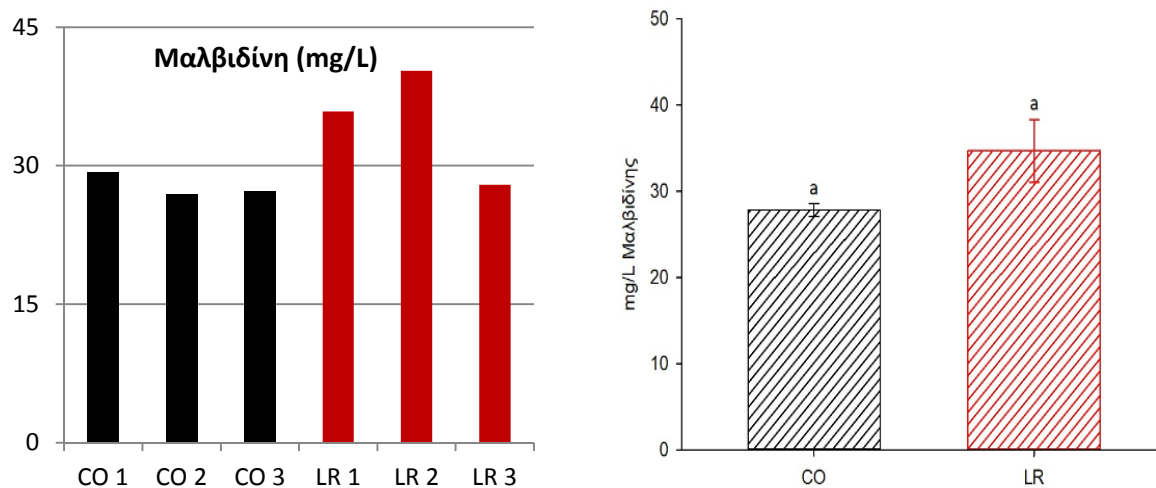
Γραφήματα 37, 38: Μέτρηση ολικών ανθοκυανών (mg/L) στους οίνους από κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 37). Μέσοι όροι της συγκέντρωσης ολικών ανθοκυανών (mg/L) στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 38). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Στο Γράφημα 37 φαίνονται οι ολικές ανθοκυάνες των οίνων ανά πειραματική μονάδα για τα φυτά που έχουν υποστεί ξεφύλλισμα (LR) και για τα φυτά μάρτυρες (CO). Όπως φαίνεται, οι ανθοκυάνες στο σύνολο τους στους οίνους των ξεφυλλισμένων φυτών ήταν περισσότερες και παρουσίασαν υψηλότερες τιμές ανά πειραματική μονάδα σε σύγκριση με την πλειοψηφία των οίνων από τα φυτά μάρτυρες.

Το ίδιο παρατηρείται και στο Γράφημα 38 όπου παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών των ολικών ανθοκυανών. Οι ανθοκυάνες στο σύνολο τους στους οίνους των ξεφυλλισμένων φυτών είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις ωστόσο δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά καθώς η διασπορά ήταν αρκετά μεγάλη (η μία επανάληψη δεν ήταν τόσο υψηλή σε ανθοκυάνες όσο οι άλλες δυο). Ωστόσο παρότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά φαίνεται ότι το ξεφύλλισμα επηρέασε θετικά το σύνολο των ανθοκυανών στους οίνους. Αυτό που παρατηρήθηκε κατά την μέθοδο μέτρησης των ανθοκυανών είναι ότι κατά την προσθήκη του θειώδη ανυδρίτη τα δείγματα αποχρωματίστηκαν τελείως σε σχέση με τα δείγματα που προστέθηκε απλώς νερό. Αυτό έγινε γιατί οι ανθοκυάνες που επικρατούν στους φρέσκους οίνους, είναι κατά κύριο λόγο ελεύθερες και συνεπώς αποχρωματίζονται με την προσθήκη του θειώδη ανυδρίτη.

Επόμενο στάδιο της ανάλυσης των ανθοκυανών ήταν ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των κύριων μονομερών ανθοκυανών του οίνου με τη βοήθεια της ενόργανης ανάλυσης. Στους οίνους, λοιπόν, έγινε προσδιορισμός των ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Προσδιορίστηκαν οι μονογλυκοζίτες της Μαλβιδίνης, της Δελφινιδίνης, της Πετουινιδίνης, της Παιονιδίνης, του

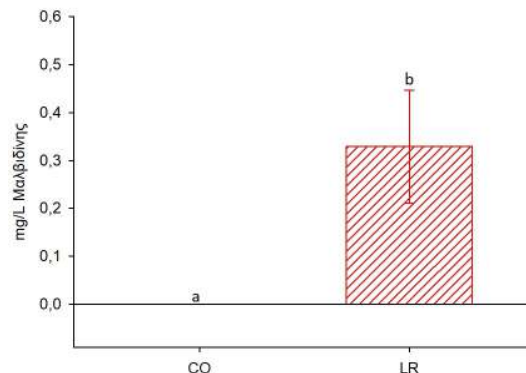
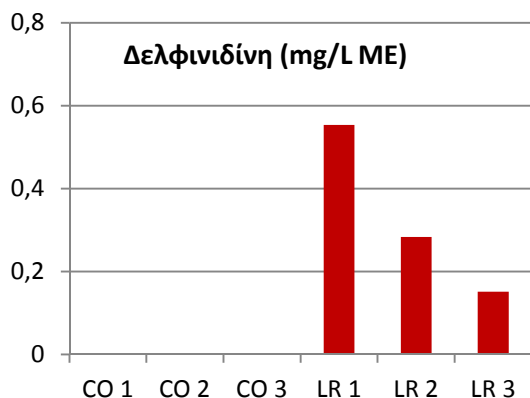
Κουμαρικού και του Οξικού εστέρα της Μαλβιδίνης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.



Γραφήματα 39, 40: Μέτρηση συγκέντρωσης μαλβιδίνης (mg/L) στους οίνους από κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 39). Μέσοι όροι της συγκέντρωσης της μαλβιδίνης (mg/L) στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 40). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

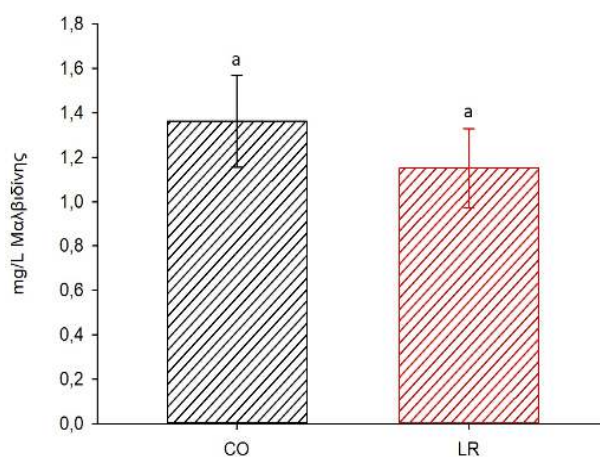
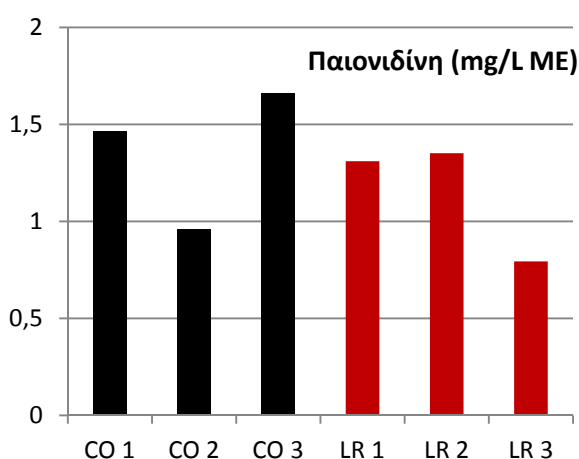
Η μαλβιδίνη είναι η κύρια ανθοκυάνη των οίνων και η συγκέντρωσή της φαίνεται στα γραφήματα 39 και 40. Το ξεφύλλισμα φαίνεται πως αύξησε την συγκέντρωση σε επίπεδο πειραματικής μονάδας καθώς όπως παρατηρούμε στο Γράφημα 39 οι τιμές των συγκεντρώσεων για τα φυτά που έχουν υποστεί ξεφύλλισμα είναι μεγαλύτερες κατά κύριο λόγο από τις τιμές των φυτών μάρτυρες. Η μέγιστη τιμή παρουσιάζεται για την πειραματική μονάδα LR 2. Στο γράφημα 40 βλέπουμε την συγκέντρωση μαλβιδίνης, κατά μέσο όρο, στους οίνους της ομάδας ελέγχου (CO) και στους οίνους των ξεφυλλισμένων φυτών (LR). Η συγκέντρωση της Μαλβιδίνης στους οίνους των ξεφυλλισμένων φυτών είναι αρκετά υψηλότερη 34,703 mg/L σε σχέση με την συγκέντρωση των οίνων από τα φυτά μάρτυρες 27,826 mg/L. Ωστόσο μεταξύ τους τα δείγματα δεν παρουσίασαν στατιστική διαφορά (p value=0,136.)

Οι υπόλοιπες ανθοκυάνες υπολείπονται σε συγκέντρωση αλλά κάθε μία έχει τη δική της συνεισφορά στο χρώμα των οίνων. Στα γραφήματα 41-50 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων ανθοκυανών των οίνων.



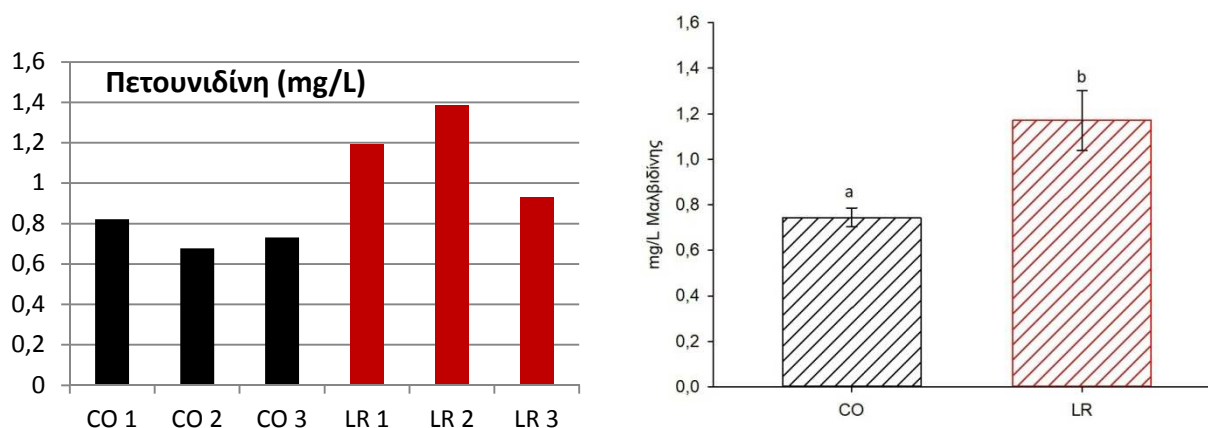
Γραφήματα 41, 42: Μέτρηση συγκέντρωσης δελφινιδίνης (mg/L ME) στους οίνους από κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 41). Μέσοι όροι της συγκέντρωσης της δελφινιδίνης (mg/L ME) στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφύλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 42). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Το ξεφύλλισμα φαίνεται πως επηρέασε σε μεγάλο βαθμό την συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της Δελφινιδίνης. Στην διαδικασία ανίχνευσης μέσω της υγρής χρωματογραφίας σε όλες τις επαναλήψεις των οίνων από τα φυτά μάρτυρες δεν ανιχνεύτηκε συγκέντρωση του μονογλυκοζίτη της Δελφινιδίνης. Από την άλλη στους οίνους από τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα η μέση τιμή ήταν 0,329 mg/L. Ο μονογλυκοζίτης της Δελφινιδίνης ήταν ανιχνεύσιμος σε όλες τις πειραματικές μονάδες που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα σε αντίθεση με τα φυτά μάρτυρες. Αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική $p \text{ value} = 0,05$ και επομένως φαίνεται ότι το ξεφύλλισμα επηρέασε σημαντικά την συγκέντρωση Δελφινιδίνης.



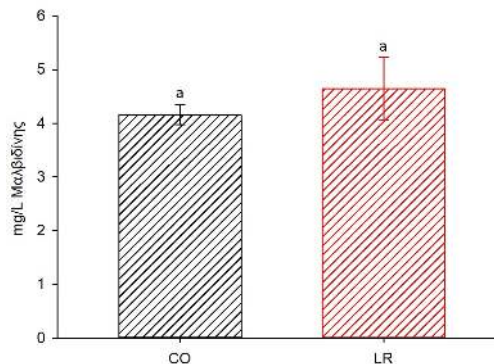
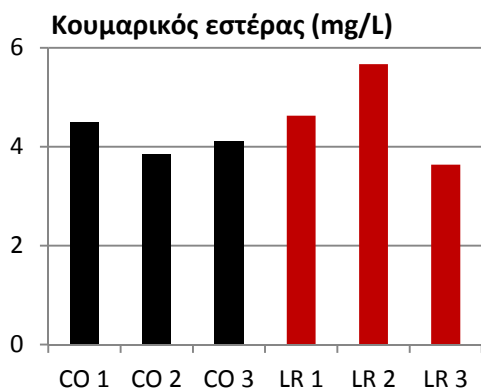
Γραφήματα 43, 44: Μέτρηση συγκέντρωσης παιονιδίνης (mg/L ME) στους οίνους από κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 43). Μέσοι όροι της συγκέντρωσης της δελφινιδίνης (mg/L ME) στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφύλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 44). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Η εφαρμογή του ξεφυλλίσματος επηρέασε αρνητικά την συγκέντρωση της παιονιδίνης καθώς, όπως παρατηρούμε στο Γράφημα 43, οι πειραματικές μονάδες των φυτών μάρτυρες παρουσιάζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις παιονιδίνης σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις των ξεφυλλισμένων φυτών. Οι διαφορές στις συγκεντρώσεις παρατηρούνται και στο Γράφημα 44 με την έκφραση των μέσων όρων. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης Παιονιδίνης σε ισοδύναμα Μαλβιδίνης για τους οίνους των φυτών χωρίς ξεφύλλισμα ήταν 1,36 mg/L ενώ για τους οίνους από τα φυτά με ξεφύλλισμα η μέση τιμή ήταν 1,15 mg/L. Παρότι η διαφορά μεταξύ των μέσων όρων είναι αρκετά μεγάλη κατά την στατιστική ανάλυση δεν παρουσιάστηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων (p value=0,484).

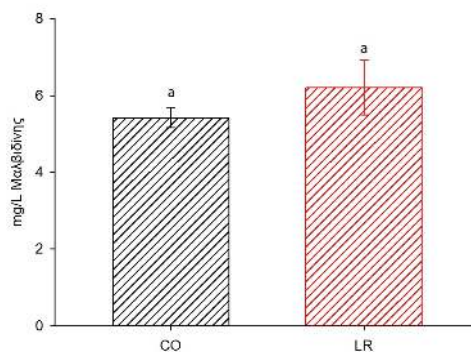
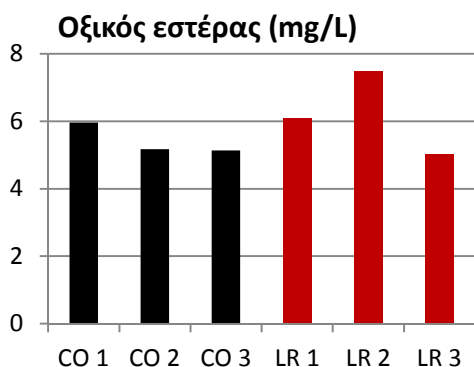


Γραφήματα 45, 46: Μέτρηση συγκέντρωσης πετουνιδίνης (mg/L ME) στους οίνους από κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 45). Μέσοι όροι της συγκέντρωσης της πετουνιδίνης (mg/L ME) στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 46). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Η συγκέντρωση της Πετουνιδίνης αυξήθηκε σημαντικά με την εφαρμογή του ξεφυλλίσματος στα σταφύλια. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στο Γράφημα 45 οι τιμές των συγκεντρώσεων για τα φυτά που έχουν υποστεί ξεφύλλισμα είναι μεγαλύτερες από αυτές των φυτών μάρτυρες. Η διαφορά στις συγκεντρώσεις στο Γράφημα 46, όπου παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των πειραματικών μονάδων είναι στατιστικά σημαντική (p value=0,037). Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της Πετουνιδίνης για τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα ήταν 1,17 mg/L σε αντίθεση με την συγκέντρωση της Πετουνιδίνης για τα φυτά μάρτυρες όπου είχαν μέση τιμή 0,74 mg/L.



Γραφήματα 47, 48: Μέτρηση συγκέντρωσης του κουμαρικού εστέρα της μαλβιδίνης (mg/L ME) στους οίνους από κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 47). Μέσοι όροι της συγκέντρωσης του κουμαρικού εστέρα της μαλβιδίνης (mg/L ME) στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 48). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

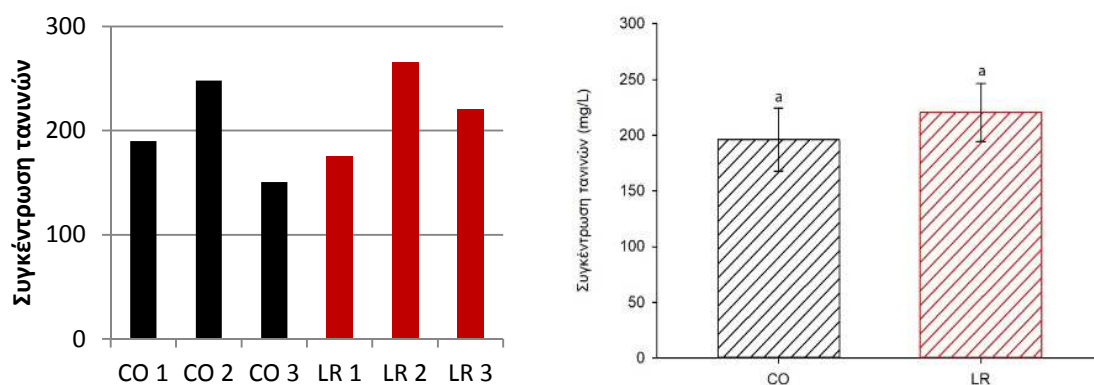


Γραφήματα 49, 50: Μέτρηση συγκέντρωσης του οξικού εστέρα της μαλβιδίνης (mg/L ME) στους οίνους από κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 49). Μέσοι όροι της συγκέντρωσης του οξικού εστέρα της μαλβιδίνης (mg/L ME) στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 50). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Ως προς την συγκέντρωση του κουμαρικού και του οξικού εστέρα της Μαλβιδίνης το μοτίβο είναι παρόμοιο και στις δύο περιπτώσεις (γραφήματα 48-50). Ανά πειραματικές μονάδες οι τιμές των συγκεντρώσεων τόσο για τον κουμαρικό όσο και για τον οξικό εστέρα της μαλβιδίνης δεν παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις. Πιο συγκεκριμένα για την συγκέντρωση του κουμαρικού εστέρα η μέση τιμή στους οίνους από φυτά μάρτυρες ήταν 4,157 mg/L και στους οίνους από ξεφυλλισμένα φυτά 4,641 mg/L. Αντίστοιχα για τον οξικό εστέρα η μέση τιμή στους οίνους από φυτά μάρτυρες ήταν 5,426 mg/L και στους οίνους από ξεφυλλισμένα φυτά ήταν 6,201 mg/L. Και στις δύο περιπτώσεις (Γραφήματα 48 και 50) υπήρχε αύξηση της συγκέντρωσης των μονογλυκοζιτών ωστόσο σε καμία από τις δύο περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά με τις τιμές των p value να είναι για τον κουμαρικό εστέρα p value= 0,477.

3.5.5 Τανίνες οίνων

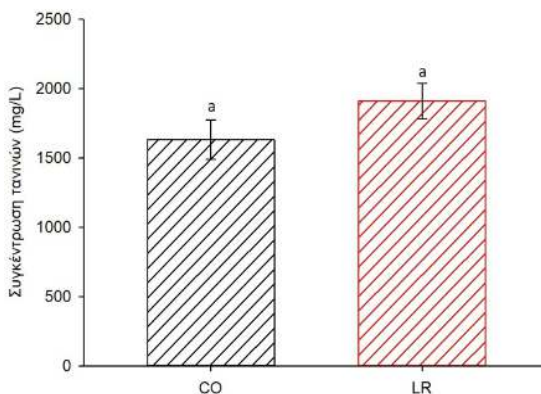
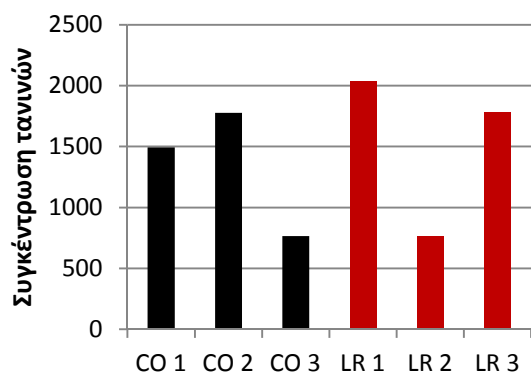
Οι τανίνες είναι τα φαινολικά συστατικά των οίνων τα οποία κυρίως ευθύνονται για την αίσθηση της στυπτικότητας αλλά και για την εξέλιξη του οργανοληπτικού χαρακτήρα των οίνων κατά την παλαίωση μέσα από διαδικασίες πολυμερισμού και οξειδωσης. Οι μέθοδοι προσδιορισμού τους βασίζονται στην συμπλοκοποίησή τους με διάφορα πολυμερή. Οι τανίνες που συμπλοκοποιούνται με αλβουμίνη συσχετίζονται με την αίσθηση της στυπτικότητας (Harbertson, 2002) ενώ αυτές που συμπλοκοποιούνται με μεθυλοκυτταρίνη δίνουν καλύτερη εικόνα των ολικών τανινών (Sarneckis, 2006)



Γραφήματα 51, 52: Μέτρηση συγκέντρωσης των τανινών BSA (mg/L CE) στους οίνους από κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 51). Μέσοι όροι της συγκέντρωσης των τανινών BSA (mg/L CE) στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 51). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

Στα γραφήματα 51 και 52 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των τανινών που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Harbertson (BSA) σε ισοδύναμα κατεχίνης. Παρατηρούμε ότι οι τανίνες ανά πειραματική μονάδα παρουσίασαν μεγάλη παραλλακτικότητα, με τις τιμές των οίνων από τα φυτά μάρτυρες να είναι γενικά υψηλότερες. Σε ότι αφορά τους μέσους όρους (γράφημα 52) η συγκέντρωση των τανινών στους οίνους από τα φυτά μάρτυρες ήταν μικρότερη (196,7 mg/L κατεχίνης) ενώ στους οίνους από τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα η συγκέντρωση των τανινών ήταν 218,8 mg/L. Φαίνεται ότι το ξεφύλλισμα ενίσχυσε την ανάπτυξη των τανινών BSA, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν μεταξύ τους στατιστική διαφορά p value= 0,565.

Ακολούθως, οι τανίνες που συμπλοκοποιήθηκαν με μεθυλοκυτταρίνη (MCP) φαίνονται στα γραφήματα 53 και 54.

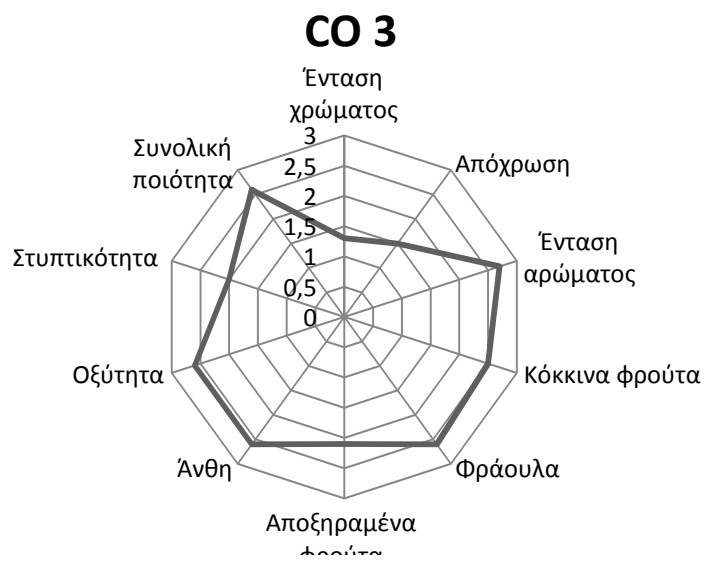
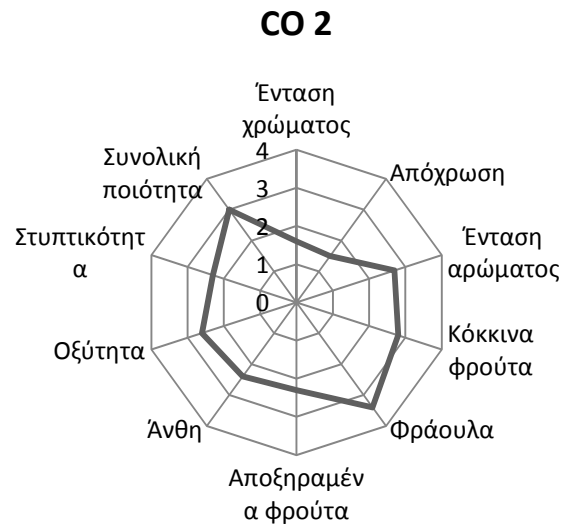
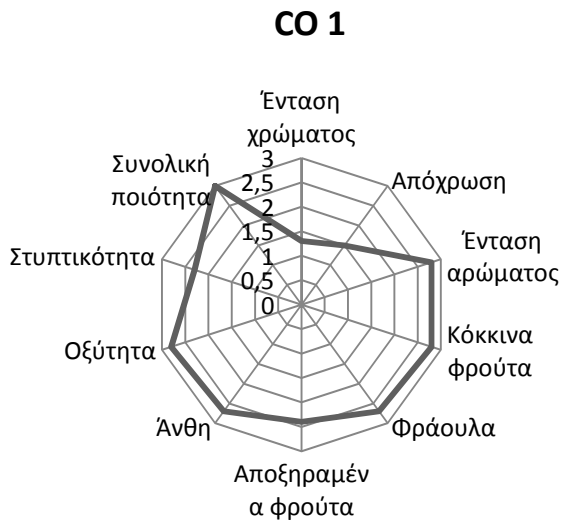


Γραφήματα 53, 54: Μέτρηση συγκέντρωσης των τανινών με την χρήση MCP (mg/L CE) στους οίνους από κάθε πειραματική μονάδα (Γράφημα 53). Μέσοι όροι της συγκέντρωσης των τανινών με την χρήση MCP (mg/L CE) στους παραγόμενους οίνους από φυτά μάρτυρες (CO) και ξεφυλλισμένα φυτά (LR) (Γράφημα 54). Τιμές με διαφορετικά γράμματα (a,b) είναι σημαντικά διαφορετικές.

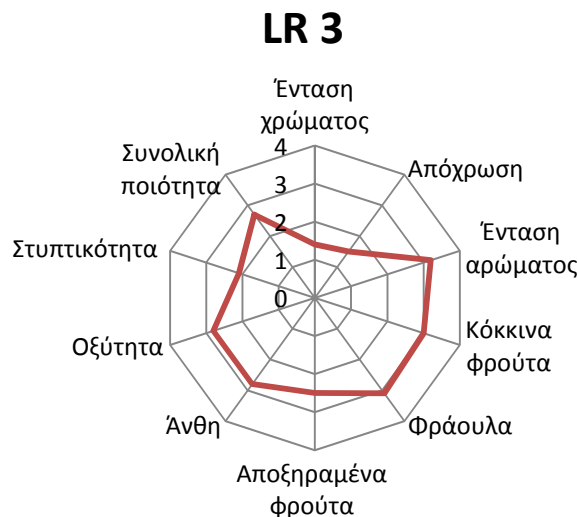
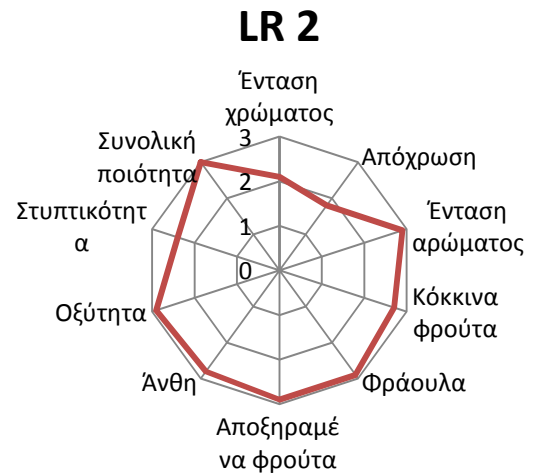
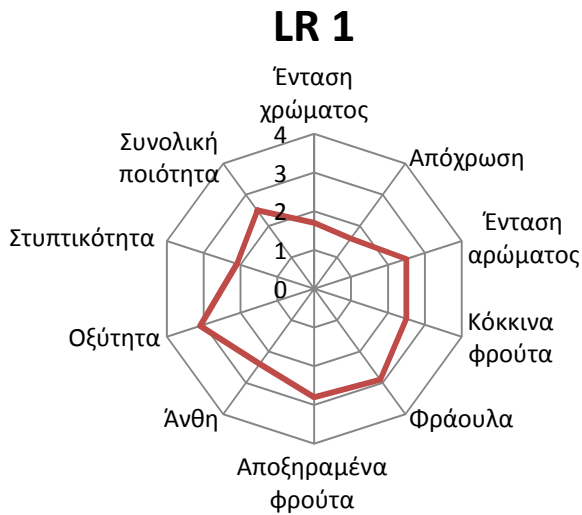
Στο Γράφημα 53 μπορούμε να παρατηρήσουμε την συγκέντρωση τανινών MCP σε ισοδύναμα κατεχίνης ανά πειραματική μονάδα. Παρατηρούμε ότι οι πειραματικές μονάδες CO 3, LR 2 έχουν ιδιαίτερα χαμηλές τιμές σε σχέση με τις υπόλοιπες πειραματικές μονάδες. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις είναι πολύ κοντά στις τιμές ωστόσο στα ξεφυλλισμένα φυτά υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης. Η αύξηση αυτή παρατηρείται και με τον υπολογισμό των μέσων όρων των πειραματικών μονάδων όπως φαίνεται στο Γράφημα 54. Για την ακρίβεια η μέση τιμή των τανινών από τους οίνους των φυτών χωρίς ξεφύλλισμα είχε μέσο όρο 1627 mg/L ενώ οι οίνοι από τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα είχαν μέσο όρο 1910 mg/L. Οι τιμές μεταξύ τους δεν παρουσίασαν στατιστικές διαφορές p value=0,725. Η αύξηση αυτή δεν παρουσιάζει στατιστική διαφορά στα δείγματα όμως συμφωνεί με την βιβλιογραφία ότι το ξεφύλλισμα επηρεάζει την αύξηση των τανινών.

3.6 Οργανοληπτικός έλεγχος

Είναι πολύ σημαντικό να εξεταστούν οι επιδράσεις του ξεφυλλίσματος στους παραγόμενους οίνους όχι μόνο ως προς την σύστασή τους, αλλά και ως προς το οργανοληπτικό τους προφίλ. Σκοπός ήταν να καταλάβουμε την επίδραση κάποιας διαφοράς στην σύσταση των οίνων σε επίπεδο αναλύσεων αλλά και να διαπιστώσουμε τον βαθμό επίδρασης στο οργανοληπτικό προφίλ του τελικού προϊόντος. Στα αραχογράμματα που ακολουθούν φαίνονται οι βαθμολογίες που έλαβαν οι πειραματικοί οίνοι κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση από εκπαιδευμένο πάνελ δοκιμαστών, 55-57 για τους οίνους από σταφύλια χωρίς ξεφύλλισμα και 58-60 για τους οίνους από τα σταφύλια της επέμβασης (ξεφύλλισμα) ανά πειραματική μονάδα.



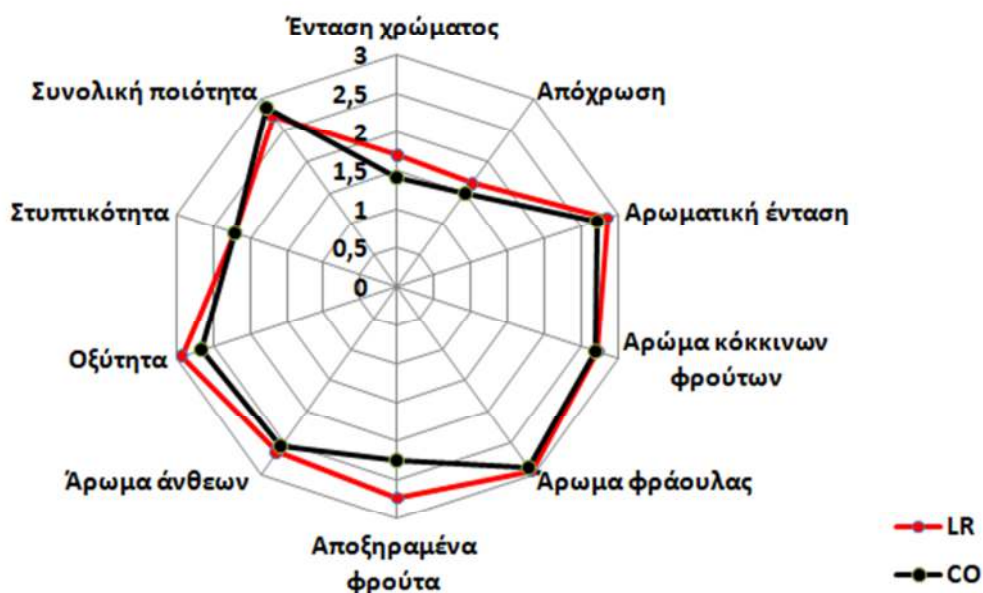
Γράφημα 55,56,57: Διαγράμματα οργανοληπτικών χαρακτηριστικών οίνων από φυτά που δεν έχουν υποστεί ξεφύλλισμα (CO).



Γράφημα 58,59,60: Διαγράμματα οργανοληπτικών χαρακτηριστικών οίνων από φυτά που έχουν υποστεί ξεφύλλισμα (LR).

Η γευσίγνωσία έγινε από εκπαιδευμένο πάνελ 10 ατόμων και δοκιμάστηκαν οι οίνοι από κάθε πειραματική μονάδα που οινοποιήθηκε ξεχωριστά. Κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο αξιολογήθηκαν σε κλίμακα από 1 έως 5, το χρώμα των οίνων ως προς την ένταση και την απόχρωση του, αξιολογήθηκε η αρωματική ένταση καθώς και τα επικρατέστερα αρώματα των οίνων (άρωμα κόκκινων φρούτων, άρωμα φράουλας, άρωμα αποξηραμένων φρούτων, άρωμα ανθέων), ενώ ακόμη αξιολογήθηκε η οξύτητα και η στυπτικότητα των οίνων καθώς και η συνολική ποιότητα των οίνων. Παρατηρούμε ότι οι οίνοι έχουν μικρές διαφορές μεταξύ τους ακόμη και μεταξύ των πειραματικών μονάδων. Στο γράφημα 61 φαίνεται η βαθμολόγηση των οίνων κατά μέσο όρο.

Όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε παρατηρώντας τα γραφήματα, η διαφορά της έντασης και της απόχρωσης του χρώματος που εντοπίστηκε με την μέτρηση της απορρόφησης με την χρήση φωτόμετρου, ήταν αισθητή και από τους γευσιγνώστες μεταξύ των οίνων. Ως προς την αρωματική ένταση και το σύνολο των αρωμάτων, οι οίνοι από τα ξεφυλλισμένα φυτά παρουσίασαν υψηλότερη βαθμολογία τόσο σε επίπεδο πειραματικής μονάδας όσο και σε επίπεδο μέσου όρου, για την αρωματική ένταση ενώ έδειξε να επικρατεί περισσότερο το άρωμα των αποξηραμένων φρούτων. Οι οίνοι από τα ξεφυλλισμένα φυτά κρίθηκαν ότι είχαν υψηλότερη οξύτητα από τους οίνους των φυτών χωρίς ξεφύλλισμα παρότι η οξύτητα κατά τις αναλύσεις δεν παρουσίασε σχετικές διαφορές. Τέλος στην αξιολόγηση της συνολικής ποιότητας των οίνων οι μέσες τιμές των γευσιγνωστών ήταν πολύ κοντά μεταξύ τους, οι οίνοι από τα φυτά μάρτυρες ήταν ελαφρώς υψηλότερη LR=2,73/5 και CO=2,86/5. Σε καμία βαθμολογία δεν παρατηρήθηκε ωστόσο κάποια στατιστική διαφορά.



Γράφημα 61: Μέσες τιμές των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των πειραματικών μονάδων με βάση την εφαρμογή ξεφυλλίσματος (LR) ή όχι (CO).

5. Συμπεράσματα

Το ξεφύλλισμα στην ποικιλία Λημνιό μετά το στάδιο της καρπόδεσης δεν επηρέασε σημαντικά τα χαρακτηριστικά των σταφυλιών ως προς το μέγεθος των σταφυλών (Γράφημα 1,2), το πάχος των ραγών (Γράφημα 3), το βάρος της ράγας (Γράφημα 6) ή το βάρος των φλοιών (Γράφημα 11) και τον αριθμό των γιγάρτων (Γράφημα 15). Ωστόσο η αφαίρεση των φύλλων παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στο μήκος βότρυ των σταφυλιών (Γράφημα 5). Επίσης, ενώ φαίνεται ότι τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα παρουσίασαν μεγαλύτερη παραγωγή ανά πρέμνο αυτό δεν είναι στατιστικά σημαντικό (Γράφημα 17). Σχετικά με το σύνολο των ολικών ανθοκυανών στα σταφύλια, τα σταφύλια που προέρχονταν από τα ξεφυλλισμένα φυτά είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών (Γράφημα 19), ωστόσο όπως φαίνεται στο Γράφημα 22, οι ολικές ανθοκυάνες των σταφυλιών από τα συγκεκριμένα φυτά ήταν λιγότερο εύκολα εκχυλίσιμες.

Στους οίνους και στις βασικές αναλύσεις το ξεφύλλισμα δεν εμφάνισε στατιστικές διαφορές (Πίνακας 2). Ως προς τα χρωματικά χαρακτηριστικά των οίνων υπήρχε αύξηση τόσο στην ένταση (Γράφημα 29) όσο και στην απόχρωση (Γράφημα 31) των οίνων που προέρχονταν από τα φυτά που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα χωρίς ωστόσο αυτό να παρουσιάζει στατιστική διαφορά. Ως προς το Δείκτη Φαινολικών Ουσιών παρουσιάστηκε μείωση στους οίνους από τα ξεφυλλισμένα φυτά (Γράφημα 33), η οποία επιβεβαιώθηκε και με την μέθοδο Folin –Ciocalteu (Γράφημα 35) χωρίς ωστόσο να παρουσιάζεται στατιστική διαφορά και στις δύο περιπτώσεις.

Το ξεφύλλισμα έδειξε να επηρεάζει θετικά το σύνολο των ολικών ανθοκυανών το οποίο σε γενικές γραμμές ήταν χαμηλό λόγω των χαρακτηριστικών της ποικιλίας, ωστόσο κατά τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) το σύνολο των ανθοκυανών στους οίνους από ξεφυλλισμένα φυτά ήταν μεγαλύτερο για όλους τους μονογλυκοζίτες εκτός από τον μονογλυκοζίτη της Παιονιδίνης, ενώ στατιστικά σημαντική ήταν η διαφορά που παρουσιάστηκε στην ανίχνευση του μονογλυκοζίτη της Δελφινιδίνης (Γράφημα 41) και στο μονογλυκοζίτη της Πετουνιδίνης (Γράφημα 45). Αξίζει να σημειωθεί πως το ξεφύλλισμα σε αντίστοιχα πειράματα που έγιναν στην ποικιλία Αγιωργίτικο έδειξε να επιδρά αρνητικά στο σύνολο των ανθοκυανών αυξάνοντας μόνο των μονογλυκοζίτη της Μαλβιδίνης και μειώνοντας τους υπόλοιπους μονογλυκοζίτες (Petrooulos, 2011).

Ως προς τις τανίνες, κατά τον προσδιορισμό των τανινών με την μέθοδο MCP, το ξεφύλλισμα έδειξε ότι επηρέασε το σύνολο των τανινών, καθώς οι συγκεκριμένοι οίνοι είχαν υψηλότερη συγκέντρωση τανινών χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (Γράφημα 53). Το ίδιο παρουσιάστηκε και κατά τον προσδιορισμό των τανινών με την μέθοδο BSA για το δείκτη στυπτικότητας των οίνων.

Ο οργανοληπτικός έλεγχος (Γράφημα 61) που πραγματοποιήθηκε στους οίνους από το εκπαιδευμένο πάνελ, επιβεβαίωσε ότι η ένταση και η απόχρωση των οίνων από τα ξεφυλλισμένα φυτά ήταν μεγαλύτερη χωρίς όμως να παρουσιάζει στατιστική διαφορά. Επίσης κατά την αξιολόγηση των αρωματικών χαρακτηριστικών των οίνων, η αρωματική ένταση στους οίνους από τα ξεφυλλισμένα φυτά ήταν μεγαλύτερη καθώς και τα αρώματα φράουλας, αποξηραμένων φρούτων και τα αρώματα ανθέων ήταν εντονότερα σε σχέση με τους οίνους από τα φυτά που δεν είχαν υποστεί ξεφύλλισμα. Οι οίνοι που είχαν υποστεί ξεφύλλισμα επίσης αξιολογήθηκαν με μεγαλύτερη οξύτητα από τους γευσιγνώστες, ενώ ως προς την στυπτικότητα δεν υπήρχαν διαφορές παρότι στις αναλύσεις οι συγκεκριμένοι οίνοι παρουσίασαν υψηλότερη στυπτικότητα. Τέλος ως προς την συνολική ποιότητα των οίνων κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο, παρότι δεν υπήρχαν στατιστικές διαφορές οι οίνοι που δεν είχαν υποστεί ξεφύλλισμα συγκέντρωσαν ελαφρώς υψηλότερη βαθμολογία.

Συμπερασματικά η εφαρμογή του εντατικού ξεφυλλίσματος στους αμπελώνες της ποικιλίας Λημιό στην περιοχή της Επανομής μετά το στάδιο της καρπόδεσης, έχει μικρή επίδραση τόσο στα χαρακτηριστικά των παραγόμενων σταφυλιών όσο και στην συνολική φυσικοχημική σύσταση των παραγόμενων οίνων.

Για την περιοχή της Επανομής και την ποικιλία Λημιό, το εντατικό ξεφύλλισμα κατά το στάδιο της πράσινης ράγας δεν επηρέασε τα χαρακτηριστικά των σταφυλιών, ούτε επηρέασε το σύνολο των ανθοκυανών στους παραγόμενους οίνους με στατιστικά σημαντική διαφορά. Ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά το ξεφύλλισμα δεν επηρέασε τα χρωματικά χαρακτηριστικά και την αρωματική ένταση των οίνων.

Επομένως αποδείχθηκε ότι η αύξηση της έκθεσης των σταφυλιών στην ηλιακή ακτινοβολία δεν είναι πάντοτε ευεργετική για όλες τις ποικιλίες και οι επιρροές που επιφέρει στα παραγόμενα σταφύλια και τους παραγόμενους οίνους λόγω των δεδομένων καιρικών συνθηκών που επικρατούσαν την συγκεκριμένη καλλιεργητική περίοδο, ή πιθανόν λόγω των χαρακτηριστικών της ποικιλίας ή των χαρακτηριστικών της συγκεκριμένης περιοχής, η εφαρμογή του ξεφυλλίσματος να μην είναι τόσο αποτελεσματική.

Βιβλιογραφία

Acimovic D., Tozzini L., Green A., Sivilotti P., Sabbatini P. (2016). Identification of a defoliation severity threshold for changing fruitset, bunch morphology and fruit composition in Pinot noir. *A.J. Grape Wine Res.* 22, 399-408. Doi:10.1111/ajgw.12235

A. Rapp & H. Mandery (1986) Wine aroma. *Experientia* 42, 873-884

Alem H., Rigou P., Schneider R., Ojeda H., Torregrosa L. (2018). Impact of agronomic practices on grape aroma composition: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*

Baiano A., De Gianni A., Previtali Ma. Del Nobile Ma., Novello V., De Palma L. (2015). Effects of defoliation on quality attributes of Nero di Troia (*Vitis vinifera* L.) grape and wine. *Food Res Int* 75:260-269

Bledsoe A.M., Kliewer W.M., Marois J.J. (1988). Effects of timing and severity of leaf removal on yield and fruit composition of Sauvignon Blanc grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* 1: 49-54

Bordelon BP, Skinkis PA, Howard PH (2008). Impact of training system on vine performance and fruit composition of 'Traminette'. *American Journal of Enology and Viticulture* 59: 39-46

Bureau S., Baumes R., Razungles A. (2000). Effects of bunch shading on glycosylated flavor precursors in grapes of *Vitis vinifera* L. cv. Syrah. *J. Agric. Food Chem.* 48 1290-1297

C. Coetzee, J. Brand, G. Emerton, D. Jacobson, A. C. Silva Ferreira, W.J. du Toit (2015). Sensory interaction between 3-mercaptohexan-1-ol, 3-isobutyl-2-methoxypyrazine and oxidation- related compounds. *Aust J Grape Wine Res* 20:178-185

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

Conde BC., Silva P., Fontes N., Dias ACP., Tavares RM., Sousa MJ., Agasse A., Delrot S., Geros H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1:1-22

Dai ZW., Ollat N., Gomes E., Decroocq S., Tandonnet J-P., Bordenavel L., Pieri P., Hilbert G., Kappel C., Van Leeuwen C., Vivin P., Delrot S. (2011). Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 413-425

- Deloire A., Rogiers S., Antalick G., Pellegrino A. (2020). Berry primary and secondary metabolites in response to sunlight and temperature in the grapevine fruit zone. IVES DOI: <https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2020.4498>
- Diago MP, Ayestaran B., Guadalupe Z., Garrido A., Tardaguila J. (2012). Phenolic composition of Tempranillo wines following early defoliation of the vines. *J Sci Food Agric* 92:925-934
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP (2003). Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust J Grape Wine Res* 9:110-121
- Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP (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
- Emmett RW, Harris AR, Taylor RH, McGechem JK (1992). Grape diseases and vineyard protection. *Viticulture Vol. 2. Practises*. Coombe BG, Dry Pr (Eds). Winetitles, Adelaide 232-278
- Fischer, U. (2007). Flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability Wine aroma. Springer Publishers, Berlin, Germany. 11,241-267
- Gunata YZ, Bayonove CL, Baumes RL, Cordonnier RE (1985). The aroma of grapes. Localiization and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components cv. Muscat during first development and maturation. *J Sci Food Agric* 36: 857-862
- Harbertson JF, Kennedy JA, Adams DO (2002). Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture.*, 53(1, pp 54-59
- Hangerman Ann E., Butler Larry G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food. Chem.* 26:809-812
- Hardie WJ., O'Brien TP., Jaudzems VG. (1996). Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2(2): 97-141
- Haselgrove L., Botting D, Van Heeswijk R, Hoj PB, Dry PR, Ford C, Iland PG (2000). Canopy microclimate and berry composition: the effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis Vinifera* Lcv. Shiraz grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 141-149
- Hellman EW. (2003). Grapevine structure and function. *Oregon Viticulture*. Hellman, EW (ed.). Oregon State University Press, Corvallis pp 5-19

- Hernandez-Jimenez A, Gomez-Plaza E, Martinez- Cutillas A, Kennedy JA (2009). Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell x Syrah grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 10798-10803
- Hunter J.J., Visser J.E. (1990). The effect of partial defoliation on growth characteristics of *Vitis vinifera* L.cv. Cabernet Sauvignon. Reproductive growth. *South African Journal of Enology and Viticulture*: 11, 26-32
- Hunter JJ, De Villiers OT, Watts JE (1991). The effects of partial defoliation on quality characteristics of *Vitis vinifera* L.cv. Cabernet Sauvignon grapes. II. Skin color, skin sugar, and wine quality. *Am J Enol Vitic* 42: 13-18
- Intrieri C., Filippetti I., Allegro G., Centinari M., Poni S. (2008). Early defoliation (hand vs mechanical) for improved crop control and grape composition in Sangiovese (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* 14, 25-32.
- Jackson DI., Lombart PB. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality-a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 44: 409-430
- Jackson RS: Grapevine Structure and Function, Chapter 5 in *Wine Science*, 2nd edition Academic Press, San Diego,2000, pp 66-71
- Kanellis AK., Roubelakis-Angelakis KA. (1993). Grape. In: *Biochemistry of Fruit Ripening*, Seymour G, Taylor J, Tucker G (Eds.). London: Chapman & Hall pp 189-234
- Keller M: *The science of Grapevines: Anatomy and Physiology*. 2nd edition, Academic Press, Oxford, 2015, pp 522
- Keller M. (2010). *The Science of Grapevines : Anatomy and Physiology*. Academic Press, Burlington, Massachusetts
- Kennedy J. (2012). *Understanding grape berry development*. Practical Winery and Vineyard
- Kliwer WM. (1966). Sugars and Organic Acids of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology* 41: 923-931
- Koundouras Stefanos (2018). Environmental and Viticultural Effects on Grape Composition and Wine Sensory Properties. *Elements* 14(3): 173-178
- Lamikanra O., Inyang ID., Leong S. (1995). Distribution and Effect of Grape Maturity on Organic Acid Content of Red Muscadine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(12): 3026-3028
- Lawless, H.T., Heymann, H. (1998). *Sensory evaluation of food. Principles and practices*. Chapman & Hall, New York, Usa

- Lorrain B, Chira K, Teissedre P-L (2011). Phenolic composition of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009 vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chemistry* 126: 1991-1999
- Lee S., Seo M., Riu M., Cott. J., Block D., Dokoozlian N, Ebeler S. (2007). Vine microclimate and norisoprenoid concentration in Cabernet Sauvignon grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 58:291-301
- Main G. L., Morris J.R. (2004). Leaf removal effects on Cynthiana yield, juice composition and wine composition. *American Journal of Enology and Viticulture*: 55, 147-152
- Matheoy A., Stavropoulos N., Samaras S. (1995). Studies on the table grape germplasm grown in Northern Greece I. Maturity time, bunch characteristics and yield, pp 155-158
- Marais J., Van Wyck C., Rapp A. (1991). Carotenoid levels in maturing grapes as affected by climatic regions, sunlight and shade. *South African Journal of Enology and Viticulture*.12,64-69
- Marais, J. (1998). Effects of grape temperature, oxidation and skin contact on Sauvignon Blanc juice and wine composition and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture* 19: 10-16
- Margalit, Y., (1997). In: J. Crum (ed.). *Concepts in Wine Chemistry*. Wine Appreciation Guild Ltd., San Francisco, USA. Pp 16-18, 76-82
- Maria P Diago, Bele'n Ayestara'n, Zenaida Guadalupe, A' Ivaro Garrido, Javier Tardaguila (2011). Phenolic composition of Tempranillo wines following early defoliation of the vines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(4): 925-934
- Mira de Orduna R (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food and Research International* 43: 1844-1855
- Nicoletti I., Bellincontro A., De Rossi A., De Sanctis F., Tiberi D., Pietromachi P. *et al* (2013). Postharvest dehydration of Nebbiolo grapes grown at altitude is affected by time of defoliation. *Aust J Grape Wine Res* 19:358-368
- Osrecak M., Karoglan M., Kozina B. (2016). Influence of leaf removal and reflective mulch on phenolic composition and antioxidant activity of Merlot, Teran and Plavac mali wines (*Vitis vinifera* L.). *Sci Hort* 209:261-269
- Paolo Sivilotti, Jose Carlos Herrera, Klemen Lisjak, Helena Basa Cesnik, Paolo Sabbatini, Enrico Peterlunger, Simone Diego Castellarin (2016). Impact of leaf removal, applied before and after flowering on anthocyanin, tannin, and methoxypyrazine concentrations in Merlot (*Vitis vinifera* L.) grapes and wines. *J. Agric Food Chem* 64,22, 4487-4496

- Pastore C., Zenoni S., Fasoli M., Pezzoti M., Tornielli GB., Filippetti I. (2013). Selective defoliation affects plant growth, fruit transcriptional ripening program and flavonoid metabolism in grapevine. *BMC Plant Biol* 13:30-45
- Price SF., Breen PJ., Valladao M., Watson BT. (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am J Enol Vitic* 46:187-194
- Petropoulos,S., Kallithraka,S., & Paraskevopoulos, I. (2011). Influence of Some Viticultural Practices on the Polyphenolic Content of Wines Produced from cv.Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 2011, 45, n°4, pp 235-243
- Petrie P.R., Clingeleffer P.R. (2006). Crop thinning (hand vs mechanical), grape maturity and anthocyanins concentration: outcome from irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) in a warm climate. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 21-29
- Poni S., Bernizzon F., Civardi S., Libelli N. (2009). Effects of pre-bloom leaf removal on growth of berry tissues and must composition in two red *Vitis vinifera* L. cultivars. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15(2): 185-193
- Poni S., Casalini L., Bernizzoni F., Civardi S., Intrietti C. (2006). Effects of early defoliation on shoot photosynthesis, yield components and grape composition. *American Journal of Enology and Viticulture* 57, 397-407
- R. Baumes, J. Wirth, S. Bureau, Y. Gunata, A. Razungles (2002). Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: Experiments supportive for and apo-carotenoid pathway in grapevines. *Analytica Chimica Acta* 458(1): 3-14
- Reynolds AG., Wardle DA., Naylor AP. (1996) Impact of training system, vine spacing, and basal leaf removal on Riesling. Vine performance, berry composition, canopy microclimate, and vineyard labor requirements. *American Journal of Enology and Viticulture* 47:63-76
- Reynolds A., Schlosser J., Power R., Roberts R., Willwerth J., C. de Savigny (2007). Magnitude and interaction of viticulture and enological effects. Impact of canopy management and yeast strain on sensory and chemical composition of Chardonnay Musque. *Am. J. Enol. Vitic.* 58:1:12-24
- Reynolds, A.G., Vanden Heuvel, J.E. (2009). Influence of grapevine training systems on vine growth and fruit composition: A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 60: 2251-268
- Ribereau- Gayon,P. Glories Y., Marujean, A., Dubourdieu,D. (2006). Handbook of enology. The chemistry of wine stabilization and treatments. In: (ed), John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, England
- Ribererau – Gayon P., Stonestreet E. (1965). Determination of anthocyanins in red wine. *Bull Soc Chim Fr.*, pp 2649-2652

- Ribereau Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 1998. *Traité d'Oenologie.2. Chimie du vin. Stabilisation et traitements.* Dunod, Paris, France
- Ristic R., Downey M., Iland P., Bindon K., Francis L., Herderich M, Robinson S. (2007). Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Aust. J. Grape Wine Res.* 13: 53-65
- Robinson SP., Davies C. (2000). Molecular biology of grape berry ripening. *Australian journal of Grape and Wine Research* 6: 175-188
- Roland A., Caveliere F., Schneider R. (2012). How organic and analytical chemistry contribute to knowledge of the biogenesis of varietal thiols in wine: a review. *Flavour Fragrance J* 27: 266-272
- Sarneckis C., Damberg B., Jones P., Mercurio M. (2006). Qualification 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
- Schwab W, Wost M (2015). Understanding the constitutive and induced biosynthesis of monno and sesquiterpenes in grapes (*Vitis vinifera*): a key to unlocking the biochemical secrets of unique grape aroma profiles. *J Agric Food Chem* 63: 10591-10603
- Sternad Lemut M., Sivilotti P., Franceschi P. Wehrens R., Vrhovsek U. (2013). Use of metabolic profiling to study grape skin polyphenol behavior as a result of canopy microclimate manipulation in a Pinot Noir vineyard. *J Agric Food Chem* 61:8976-8986
- Soleas GJ., Diamandis EP., Goldberg DM. (1997). Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J. Clin. Lab Anal.* 11: 287-313
- Tardaquila J., Martinez de Toda F., Poni S., Diago M.P. (2010). Impact of early leaf removal on yield and fruit and wine composition of *Vitis vinifera* L. Graciano and Carignan. *Am. J. Enolo. Vitic.* 61,372-38
- Teixera A., Eiras-Dias J., Castellarin SD., Geros H. (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences* 14(9): 18711-18739
- Thibaut Verdenal, Vivian Zufferey, Agnes Dienes-Nagy, Gilles Bourdi, Katia Gindro, Jean-Laurent Spring (2019) Defoliation of the vines before or after berry set: Physiological consequences and qualitative factors. *International Viticulture & Enology Society*. DOI: <https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2019.2528>
- Van Leeuwen C., Tregoat O., Chone X., Bois B., Pernet D., Gaudillere J-P. (2009). Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red

Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 43: 121-134

Verdenal T., Zufferey J., Spring L., Rosti J., Dienes-Nagy A., Lorenzini F., Viret O. (2016). Benefits and risks of early defoliation on the grape variety *Vitis vinifera* Doral in the Vaud canton. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 48: 176-182

Verdenal T., Zufferey V., Dienes-Nagy A., Belcher S., Lorenzini F., Rosti J., Koestel C., Gindro K., Spring L. (2018). Intensity and timing of defoliation on white cultivar Chasselas under the temperate climate of Switzerland. *Oeno One* 52: 93-104

Verdenal T., Zufferey V., Dienes-Nagy A., Bourdin G., Gindro K., Spring L. (2019). Timing and intensity of grapevine defoliation: An extensive overview on five cultivars in Switzerland. *American Journal of Enology and Viticulture*

Verdenal T., Zufferey V., Dienes-Nagy A., Gindro K., Belcher S., Lorenzini F., Rosti J., Koestel C., Spring L., Viret O. (2017). Pre-floral defoliation affects berry structure and enhances wine sensory parameters. *Oeno One* 51: 263-275

Waterman PG., Mole S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford : Blackwell Scientific Publ, 83-91

Wermelinger B: Nitrogen Dynamics in Grapevine. *Physiology and Modeling*. Proc. Int. Symp. Nitrogen in grape and wines, Seattle WA, USA (Ed J. M. Rantz) 1999 pp23-31

Winterhalter P, Schreier P. (1994). C13-norisoprenoid glycosides in plant tissues: an overview on their occurrence, composition and role as flavor precursors. *Flavour Fragr J* 9: 281-287

Yujuan L., Sha X., Xueqiang G., Changzheng S., Zhenwen Z., Jiangfei M. (2018). Methoxypyrazines biosynthesis and metabolism in grape: a review. *Food Chem* 245: 1141-1147

Zoecklein P.W., Wolf T.K., Duncan N.W., Judge J.M., Cooke M.K. (1992). Effects of fruit zone leaf removal on yield, fruit composition and fruit rot incidence of Chardonnay and White Riesling (*Vitis vinifera* L.) grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*: 43, 139-148

Weber R., Nelson M., Gay S. (2002). *Modeling wine production*. Institution of Engineers Australia, pp 237-240

Vitocoltura di Qualita: M. Fregoni, 2013

Κουράκου – Δραγώνα Σταυρούλα (2013). *Άμπελος και οίνος στον Αρχαίο Ελληνικό κόσμο*.

Κοτσερίδης Γ. (2015), *Οινολογία I Εργαστηριακές ασκήσεις*

- Νικολάου, Ν. (2011), Αμπελουργία. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, 11-20,25-57
- Σταυρακάκης, Μ. Ν. (2010). Αμπελογραφία. Εκδόσεις Τροπή, 158-160
- Σουφλερός, Ε. (2015). Οινολογία και Επιστήμη και Τεχνολογία. 33-34,73-75,115
- Τσακίρης, Α., Παπούλιας Θ. (1996). Οινολογία: Από το σταφύλι στο κρασί