

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ & ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ, ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ
ΦΟΡΤΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΑΝΝΙΝΩΝ ΣΕ ΦΛΟΙΟΥΣ
ΚΑΙ ΓΙΓΑΡΤΑ ΣΕ ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΓΗΓΕΝΩΝ ΚΥΠΡΙΑΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ,
ΜΑΡΑΘΕΥΤΙΚΟ ΚΑΙ ΞΥΝΙΣΤΕΡΙ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

που εκπονήθηκε στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

ΣΜΑΡΑΓΔΑ ΣΠΑΝΟΥ

Γεωπόνος - Τεχνολόγος Τροφίμων

ΑΘΗΝΑ 2017

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ, ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ
ΦΟΡΤΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΑΝΝΙΝΩΝ ΣΕ ΦΛΟΙΟΥΣ
ΚΑΙ ΓΙΓΑΡΤΑ ΣΕ ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΓΗΓΕΝΩΝ ΚΥΠΡΙΑΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ,
ΜΑΡΑΘΕΥΤΙΚΟ ΚΑΙ ΞΥΝΙΣΤΕΡΙ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

που εκπονήθηκε στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

ΣΜΑΡΑΓΔΑ ΣΠΑΝΟΥ

Γεωπόνος - Τεχνολόγος Τροφίμων

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σ. Καλλίθρακα (Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ, επιβλέπουσα)

Χ. Δρούζα (Λέκτορας ΤΕΠΑΚ)

Αικ. Μπινιάρη (Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ)

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Σμαράγδα Σπανού, 2017

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της μεταπτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου – Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Δ.Π.Μ.Σ. ‘Αμπελουργία – Οινολογία’ του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μεταπτυχιακή αυτή μελέτη, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανάλυσης Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών 'Αμπελουργία – Οινολογία' του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα πρόσωπα που συντέλεσαν στην πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Σταματίνα Καλλίθρακα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και επιβλέπουσα της παρούσας μελέτης, για την ανάθεση του θέματος και την αμέριστη συμπαράστασή της καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης. Επίσης την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας και για την πολύτιμη καθοδήγηση της όλες τις φορές που της ζητήθηκε.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Χρυσούλα Δρούζα, Λέκτορα του Τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων, του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου για την αμέριστη συμπαράσταση που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα. Μου έδειξε απόλυτη εμπιστοσύνη και ανά πάσα στιγμή είχε την καλή διάθεση να με βοηθήσει και να λύσει οποιαδήποτε απορία που μου είχε δημιουργηθεί. Την ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές της και την καθοδήγηση της κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Επιπλέον την ευχαριστώ για το χρόνο που μου διέθεσε και για όλα όσα με δίδαξε αφού με την επιστημονική κατάρτιση της και τις υποδείξεις της με βοήθησε σημαντικά κατά την διάρκεια του πειράματος και των εργαστηριακών αναλύσεων καθώς και με τη διόρθωση του κειμένου της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Αικατερίνη Μπινιάρη για την συμμετοχή της στην εξεταστική επιτροπή της παρούσας μελέτης αλλά και για τις παρατηρήσεις της στο κείμενο.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στην κα. Ελένη Μιχαηλίδου, υποψήφια διδάκτορα του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου για την πολύτιμη βοήθειά της κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων στην HPLC.

Αθήνα, Μάρτιος 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίστηκαν οι κυπριακές γηγενείς ποικιλίες ως προς το φαινολικό περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική δράση και την περιεκτικότητα σε ολιγομερείς-μονομερείς προανθοκυανιδίνες και πολυμερείς ταννίνες. Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα σταφύλια είναι φυσικά αντιοξειδωτικά και χωρίζονται σε φλαβονοειδείς φαινόλες (φλαβανόλες, φλαβονόλες και ανθοκυανίνες) και σε μη φλαβονοειδείς φαινόλες (βενζοϊκά οξέα και κινναμωνικά οξέα). Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολών συνίσταται στην ιδιότητα τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες.

Στη μελέτη αυτή, ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν φλοιοί και γίγαρτα σταφυλιών, των γηγενών κυπριακών ποικιλιών Μαραθεύτικο (ερυθρή ποικιλία) και Ξυνιστέρι (λευκή ποικιλία). Έγινε ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH σε εκχυλίσματα από φλοιούς και γίγαρτα των σταφυλιών. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν οι ολιγομερείς – μονομερείς προανθοκυανιδίνες και πολυμερείς ταννίνες στα γίγαρτα με τη μέθοδο BSA. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των ανθοκυανινών με τη χρήση της HPLC για την ποικιλία Μαραθεύτικο.

Από τη στατιστική ανάλυση, διαπιστώθηκε ότι τα εξεταζόμενα σταφύλια με βάση την ποικιλία διαφέρουν ως προς την συγκέντρωσή τους σε ολικές φαινολικές ουσίες, ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και ως προς την περιεκτικότητα των ταννινών στα γίγαρτα.

Λέξεις κλειδιά: σταφύλια, Μαραθεύτικο, Ξυνιστέρι, αντιοξειδωτικά, ανθοκυανίνες

ABSTRACT

In the present study grapes from two varieties indigenous to Cyprus have been characterized, on the base of the phenolic content, the antioxidant activity and the concentration in oligomeric-monomeric proanthocyanidines, and polymeric tannins. The phenolic compounds contained in the grapes are natural antioxidants and may be divided into flavonoid phenols (flavanols, flavonols and anthocyanins) and non – flavonoid phenols (benzoic acids and cinnamic acids). The antioxidant activity of the phenolic compounds is originated from their ability to neutralize free radicals.

In the present study, skins and seeds of grapes were used as samples, from the varieties Maratheftiko (red variety) and Xynisteri (white variety). The determination of total phenolics was conducted by the Folin – Ciocalteu method and the determination of the antioxidant capacity by the DPPH method in skins and seeds extracts. In addition, the oligomeric-monomeric proanthocyanidins and polymeric tannins were identified in the seeds extracts by the BSA method. Also, a quantitative determination of the anthocyanins in Maratheftiko variety was held using HPLC.

From the statistical analysis, it was concluded that the examined grapes by variety, differ in their concentration of total phenolic substances, in their antioxidant capacity and in their tannin content of the seeds.

Keywords: grapes, Maratheftiko, Xynisteri, antioxidants, anthocyanes

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	v
ABSTRACT	vi
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xiv
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	xvi
1 Εισαγωγή.....	17
1.1 Ιστορία της αμπέλου και των κρασιών στην Κύπρο	17
1.2 Γηγενείς Κυπριακές ποικιλίες οινοποίησης	20
1.2.1 Ερυθρές Γηγενείς Ποικιλίες	22
1.2.2 Λευκές Γηγενείς Ποικιλίες.....	25
1.3 Μέρη της ράγας και συστατικά	29
1.3.1 Μορφολογία της ράγας.....	29
1.3.2 Χημική σύσταση της ράγας.....	32
1.4 Φάσεις ανάπτυξης της ράγας.....	33
1.5 Φαινολικά συστατικά	37
1.5.1 Φλαβονοειδείς φαινόλες.....	38
1.5.2 Μη φλαβονοειδείς φαινόλες.....	42
1.5.3 Ταννίνες.....	44
1.6 Βιοσύνθεση φαινολικών συστατικών.....	45
1.7 Μεταβολές των φαινολικών συστατικών κατά την ωρίμανση.....	47
1.8 Σταφύλι, φαινολικά συστατικά και υγεία.....	48

1.9	Αντιοξειδωτική δράση.....	51
1.10	Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικών στο σταφύλι.....	51
1.10.1	Μέθοδος προσδιορισμού Folin – Ciocalteu	51
1.10.2	Μέθοδος προσδιορισμού DPPH.....	52
2	Υλικά και Μέθοδοι	53
2.1	Το πείραμα.....	53
2.2	Υλικά	54
2.3	Προετοιμασία δειγμάτων.....	55
2.4	Αναλύσεις σε φλοιούς	55
2.4.1	Μέτρηση Folin – Ciocalteu σε φλοιούς	55
2.4.2	Μέτρηση DPPH σε φλοιούς.....	57
2.4.3	Προσδιορισμός ανθοκυανινών με HPLC	59
2.5	Αναλύσεις σε γίγαρτα.....	61
2.5.1	Μέτρηση Folin – Ciocalteu σε γίγαρτα.....	61
2.5.2	Μέτρηση DPPH σε γίγαρτα	62
2.5.3	Προσδιορισμός ταννινών – Μέθοδος BSA στα γίγαρτα.....	63
3	Αποτελέσματα και συζήτηση.....	67
3.1	Αναλύσεις σε φλοιούς	67
3.1.1	Μέτρηση Folin – Ciocalteu σε φλοιούς	67
3.1.2	Μέτρηση DPPH σε φλοιούς.....	71
3.1.3	Προσδιορισμός ανθοκυανινών με HPLC	74
3.2	Αναλύσεις σε γίγαρτα.....	79
3.2.1	Μέτρηση Folin – Ciocalteu σε γίγαρτα.....	79
3.2.2	Μέτρηση DPPH σε γίγαρτα	81
3.2.3	Μέθοδος BSA στα γίγαρτα	83

3.3	Σύγκριση φλοιών και γιγάρτων	87
3.3.1	Σύγκριση φλοιών και γιγάρτων για τη μέθοδο Folin – Ciocalteu	87
3.3.2	Σύγκριση φλοιών και γιγάρτων για τη μέθοδο DPPH.....	88
4	Συμπέρασμα	89
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Διαμόρφωση αμπελουργικού δυναμικού για τις γηγενείς ποικιλίες κατά το 2012.	20
Πίνακας 2 Οι φαινολικές ενώσεις στα διάφορα μέρη της ράγας	39
Πίνακας 3 Επίδραση στην ανθρώπινη υγεία μερικών φαινολικών ενώσεων από τα σταφύλια	48
Πίνακας 4 Δείγματα σταφυλιών (Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι)	54
Πίνακας 5 Πρόγραμμα διαλυτών	61
Πίνακας 6 Πρότυπα διαλύματα κατεχίνης.	64
Πίνακας 7 Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu.....	67
Πίνακας 8 Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών (mg GAE/g βάρους νωπών φλοιών) στα εκχυλίσματα φλοιών των ερυθρών και λευκών σταφυλιών. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).	69
Πίνακας 9 Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή DPPH.....	71
Πίνακας 10 Αντιοξειδωτική ικανότητα (% ΔA) εκφρασμένη σε mmole trolox/g βάρους νωπών φλοιών στα εκχυλίσματα φλοιών των ερυθρών και λευκών σταφυλιών. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).	72
Πίνακας 11 Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης μαλβιδίνης για τις μικρότερες τιμές των δειγμάτων για μέτρηση των ανθοκυανών με HPLC.....	74
Πίνακας 12 Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης μαλβιδίνης για τις μεγαλύτερες τιμές των δειγμάτων για μέτρηση των ανθοκυανών με HPLC.	75

Πίνακας 13 Συγκέντρωση των επιμέρους ανθοκυανών εκφρασμένες σε mg μαλβιδίνη/g βάρους νωπών φλοιών για τα εκχυλίσματα φλοιών στα σταφύλια της ποικιλίας Μαραθεύτικο. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).....	77
Πίνακας 14 Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών (mg GAE/g βάρους νωπών γιγάρτων) στα εκχυλίσματα γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).....	80
Πίνακας 15 Αντιοξειδωτική ικανότητα (%ΔΑ) εκφρασμένη σε mmole trolox/g βάρους νωπών γιγάρτων στα εκχυλίσματα γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).....	82
Πίνακας 16 Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ταννινών με τη μέθοδο BSA.	83
Πίνακας 17 Συγκέντρωση των ταννινών (mg κατεχίνης/g βάρους νωπών γιγάρτων) στα κλάσματα των εκχυλισμάτων γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).....	85

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1 Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu.....	68
Διάγραμμα 2 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu σε εκχυλίσματα φλοιών στο Μαραθεύτικο.....	70
Διάγραμμα 3 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu σε εκχυλίσματα φλοιών στο Ξυνιστέρι.....	70
Διάγραμμα 4 Πρότυπη καμπύλη για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή DPPH.....	71
Διάγραμμα 5 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη δοκιμή DPPH σε εκχυλίσματα φλοιών στο Μαραθεύτικο.....	73
Διάγραμμα 6 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη δοκιμή DPPH σε εκχυλίσματα φλοιών στο Ξυνιστέρι.....	73
Διάγραμμα 7 Πρότυπη καμπύλη (1) για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC.....	75
Διάγραμμα 8 Πρότυπη καμπύλη (2) για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC.....	76
Διάγραμμα 9 Συγκέντρωση επιμέρους ανθοκυανών στα δείγματα Μαραθεύτικο.....	79
Διάγραμμα 10 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu σε εκχυλίσματα γιγάρτων στο Μαραθεύτικο.....	80
Διάγραμμα 11 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu σε εκχυλίσματα γιγάρτων στο Ξυνιστέρι.....	81
Διάγραμμα 12 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη δοκιμή DPPH σε εκχυλίσματα γιγάρτων στο Μαραθεύτικο.....	82
Διάγραμμα 13 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη δοκιμή DPPH σε εκχυλίσματα γιγάρτων στο Ξυνιστέρι.....	83
Διάγραμμα 14 Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των τανινών με τη μέθοδο BSA.....	84

Διάγραμμα 15 Συγκέντρωση ταννινών εκφρασμένη σε mg κατεχίνης/g βάρους νωπών γιγάρτων στο Μαραθεύτικο.....	86
Διάγραμμα 16 Συγκέντρωση ταννινών εκφρασμένη σε mg κατεχίνης/g βάρους νωπών γιγάρτων στο Ξυνιστέρι.....	86
Διάγραμμα 17 Συγκέντρωση ταννινών εκφρασμένη σε mg κατεχίνης/g βάρους νωπών γιγάρτων στο Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι.	87
Διάγραμμα 18 Συνολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu για τους φλοιούς και τα γίγαρτα των ποικιλιών Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι.	88
Διάγραμμα 19 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH για τους φλοιούς και τα γίγαρτα των ποικιλιών Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι.	89

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

GAE	Ισοδύναμα γαλλικού οξέος
C	Άνθρακας
CO ₂	Διοξείδιο του άνθρακα
SO ₂	Διοξείδιο του θείου
Na ₂ CO ₃	Ανθρακικό νάτριο
H ₂ O	Νερό
FeCl ₃	Χλωριούχος σίδηρος
HCl	Υδροχλώριο
NaCl	Χλωριούχο νάτριο
NaOH	Υδροξείδιο του νατρίου
H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	Φωσφοβολφραμικό οξύ
H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀	Φωσφομολυβδαινικό οξύ
W ₈ O ₂₃	Οξείδιο του βολφαμίου
Mo ₈ O ₂₃	Οξείδιο του μολυβδαίνιου
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
BSA	Bovine Serum Albumin
EtOH	Αιθανόλη
C _A , C _B	Συγκέντρωση ουσίας
rpm	Στροφές
m	Μέτρο
nm	Νανόμετρο
μm	Μικρόμετρο
mm	Χιλιοστόμετρο

cm	Εκατοστόμετρο
μL	Μικρόλιτρο
mL	Χιλιοστόλιτρο
L	Λίτρο
hL	Εκατόλιτρο
μg	Μικρογραμμάριο
mg	Χιλιογραμμάριο
g	Γραμμάριο
Kg	Χιλιόγραμμο ή κιλό
min	Λεπτά
°C	Βαθμοί Κελσίου
%	Επί τοις εκατό
% vol	Αλκοολικοί βαθμοί
Baume, °Brix	Μονάδα μέτρησης σακχάρων

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

LDL-χοληστερόλη	Κακή χοληστερόλη
HDL-χοληστερόλη	Καλή χοληστερόλη
Folin – Ciocalteu	Αντιδραστήριο ανίχνευσης ολικών φαινολικών συστατικών
DPPH	Ρίζα 1,1 – διφαινυλ – 2 – πικρυδραζυλίου
Trolox	6-hydrox-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
TEA	Τριαιθοναλαμίνη
mDP	Μέσος βαθμός πολυμερισμού
COX-1 και 2	Κυκλοοξυγενάση – 1 και 2
ABA	Αμπισισικό οξύ
pH	Πεγά
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
UV	Φασματοσκοπία υπεριώδους
VIS	Φασματοσκοπία ορατού
NMR	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
UV – VIS	Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού
UV – VIS detector	Ανιχνευτής απορρόφησης υπεριώδους – ορατού

1 Εισαγωγή

1.1 Ιστορία της αμπέλου και των κρασιών στην Κύπρο

Τα σταφύλια (*Vitis vinifera*) μέλη της οικογένειας *Vitaceae*, είναι μια από τις ευρέως καλλιεργούμενες και πιο σημαντικές καλλιέργειες φρούτων στον κόσμο (Satisha, Doshi, & Adsule, 2008). Από την άποψη της παραγωγικής αμπελουργίας, το είδος αμπέλου που παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι η άμπελος η οиноφόρος (ευρωπαϊκή άμπελος, *Vitis vinifera* L.), καθώς περιλαμβάνει περισσότερες από 9.000 ποικιλίες που καλλιεργούνται ανά τον κόσμο (Σταυρακάκης, 2015).

Η καλλιέργεια σταφυλιών πιστεύεται ότι προέρχεται από την Αρμενία κοντά στην Κασπία Θάλασσα στη Ρωσία, απ' όπου εξαπλώθηκε δυτικά προς την Ευρώπη και ανατολικά προς το Ιράν και το Αφγανιστάν (Shikhamany, 2001).

Η Κύπρος, αυτό το όμορφο νησί της Μεσογείου, δεν έχει μόνο μια από τις παλαιότερες παραδόσεις στην αμπελοκαλλιέργεια στον κόσμο, αλλά και ήταν για καιρό η πιο ανεπτυγμένη και επιτυχημένη από τις αμπελουργικές χώρες της Ανατολικής Μεσογείου (Johnson & Robinson, 2004). Απ' ότι φαίνεται σε πολλές χώρες, υπήρχε η άγρια άμπελος που χρησιμοποιόταν αρχικά στην άγριά της μορφή και στη συνέχεια στην εξευγενισμένη. Οι πολυμήχανοι αρχαίοι χρησιμοποιούσαν την αγράμπελη αν και δεν ήταν γλυκιά. Αυτό αποδεικνύεται με την ανεύρεση γιγάρτων από αγριοστάφυλα σε δοχεία στην Κύπρο (Παπαδόπουλος, 2003) καθώς επίσης και από αρχαιολογικά ευρήματα σε αρχαία βάζα και ποτήρια κρασιού κατά τη Νεολιθική εποχή (Contò *et al.*, 2014). Επιπλέον, τα ψηφιδωτά στο 'Σπίτι του Διόνυσου' στην Πάφο, μαρτυρούν τη συναρπαστική ιστορία της αμπελουργίας στο νησί (Vrontis & Paliwoda, 2008). Σύμφωνα με επιστημονικά αρχαιολογικά ευρήματα, φαίνεται η Κύπρος να έχει τουλάχιστον 5.000 χρόνια αμπελοοινικής ιστορίας.

Η Κύπρος, υπήρξε ανάμεσα στις χώρες όπου το οиноφόρο ευρω-ασιατικό αμπέλι (*Vitis Vinifera*, L.) εξαπλώθηκε από τα βουνά του Καύκασου μέχρι την κεντρική Ευρώπη και την Υφήλιο. Ο τόπος, παραμένει αμπελουργικός-αγροτικός παρά το μικρό μέγεθος της Κύπρου, το μικρό και πολυτεμαχιασμένο αμπελώνα, την έντονη ανάπτυξη του τουρισμού και άλλων υπηρεσιών. (Γεωργίου & Γεωργίου, 2013) Το αμπέλι, είναι ευρέως καλλιεργούμενο στο νησί περισσότερο από κάθε άλλο είδος φρούτου και σχεδόν το ένα τέταρτο του αγροτικού

πληθυσμού ασχολείται με την αμπελουργία, τουλάχιστον με μερική απασχόληση (Egoumenidou, 2002).

Η αμπελουργία της Κύπρου, ευνοείται από το ορεινό ανάγλυφο, το υψόμετρο, τις θαλάσσιες αύρες, περιφρουρεί το φυσικό περιβάλλον και το παραδοσιακό τοπίο ενώ συμβάλλει στη διατήρηση του κοινωνικού και οικονομικού ιστού των αγροτικών περιοχών (Γεωργίου & Γεωργίου, 2013). Το υψόμετρο παίζει σημαντικό ρόλο για τον καθορισμό της ποιότητας των οινοποιήσιμων σταφυλιών. Όσο υψηλότερα καλλιεργούνται τα αμπέλια, τόσο καλύτερης ποιότητας είναι το κρασί. Στην Κύπρο, ένα σημαντικό ποσοστό οινοποιήσιμων σταφυλιών καλλιεργούνται σε υψόμετρο 700 – 900 m. Η υψηλότερη περιοχή στην οποία καλλιεργούνται οινοποιήσιμα αμπέλια στην Κύπρο είναι το Βουνί – Παναγιάς στην Πάφο και στην Κυπερούντα. (Aristidou, 1990)

Επίσης, το αμπέλι εμποδίζει τη διάβρωση του εδάφους. Η αμπελοκαλλιέργεια, δεν έγκειται απλώς στην αξιοποίηση της πρώτης ύλης για την παραγωγή κρασιού, αλλά στο γεγονός ότι αξιοποιεί κυρίως άγονα, πετρώδη και επικλινή εδάφη σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές (Συμβούλιο Αμπελοοινικών Προϊόντων, 2005).

Η πλειοψηφία των εδαφών των αμπελουργικών περιοχών της Κύπρου είναι ασβεστολιθικά, ιζηματογενή που βρίσκονται σε εναπόθεση πάνω στο μητρικό πέτρωμα. Βρίσκονται κυρίως σε μορφή αναβαθμίδων, στενών δηλαδή λωρίδων γης με κλίση και αβαθείς εδαφικούς ορίζοντες που υποφέρουν από διαβρώσεις. (Γεωργίου & Γεωργίου, 2013) Οι αμπελώνες της Κύπρου είναι ως επί το πλείστον στις νότιες πλαγιές της οροσειράς του Τροόδου (Vrontis & Papasolomou, 2007).

Το pH των εδαφών της Κύπρου, είναι αλκαλικό (7,6-8,5), φτωχό σε οργανική ουσία και άλλα θρεπτικά συστατικά, που συχνά οδηγούν σε μειωμένες παραγωγές σταφυλιών με δυνητικά πλούσια ποιότητα (Γεωργίου & Γεωργίου, 2013).

Ο ρόλος της Κύπρου, σαν αμπελουργική χώρα έχει περαιτέρω επισημανθεί κατά τη διάρκεια της περιόδου των Λουζινιανών (1149-1489) και των Βενετών (1489-1571). Κατά τη διάρκεια του Μεσαίωνα, η Κύπρος διατήρησε στενούς δεσμούς με τα Σταυροφόρα Έθνη, και έτσι παράχθηκε το γλυκό κρασί που ονομάζεται Κουμανδαρία, το οποίο κέρδισε τη διεθνή φήμη. Η εμπορία της Κουμανδαρίας ελεγχόταν από τους κατακτητές του νησιού Σταυροφόρους (Vrontis & Paliwoda, 2008). Το κρασί Κουμανδαρία παρασκευάζεται από

λιαστά σταφύλια, τόσο κόκκινα όσο και λευκά, σε 14 χωριά, στις χαμηλότερες πλαγιές του Τροόδου (Johnson & Robinson, 2004).

Η χρυσή εποχή των κυπριακών κρασιών τελείωσε απότομα με την κατάκτηση του νησιού από τους Τούρκους λόγω των αβάσταχτων φόρων και απαγορεύσεων που πήγαζαν από την μουσουλμανική θρησκεία ελαττώνοντας κατά πολύ τα αμπέλια. Οι Κύπριοι προτιμούσαν να καταστρέψουν τα αμπέλια τους παρά να τα δηλώσουν στους Τούρκους. Μεταξύ του 1850-1860, οι εξαγωγές μειώθηκαν, αφού επιβλήθηκαν ακόμα βαρύτεροι φόροι. Η παραγωγή έπεσε στο μισό και η ποιότητα εγκαταλείφθηκε εκτός από την Κουμανδάρια που εξακολουθούσε να έχει μεγάλη φήμη. Κατά την Τουρκοκρατία, εγκαταλείφθηκαν πολλές αυτόχθονες κυπριακές ποικιλίες. Παράλληλα όμως, λόγω του εμπορίου των Άγγλων, Ολλανδών και Γάλλων, τα κρασιά ευημερούσαν και σταθεροποιούσαν τη θέση τους και τη φήμη τους στα διάφορα κέντρα εμπορίου. Με τη μελέτη και την πειρατεία, οι Κύπριοι, καλυτέρευαν τα αμπέλια και τις ποικιλίες τους και εκλέπτοναν την τέχνη της οινοποίησης και της διατήρησης του κρασιού (Κυθραιώτου, 2010).

Στη δεκαετία του 1960, το ήμισυ της παραγωγής κρασιού του νησιού αποτελούσε το Sherry που η Βρετανία εμπορευόταν. Αυτό άλλαξε το 1996, όταν η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έκρινε ότι μόνο οι αλκοολωμένοι οίνοι από Jerez, Ισπανία, θα μπορούσαν να ονομάζονται 'Sherry'. Ακόμη, η άλλη κύρια αγορά της Κύπρου ήταν η παροχή μεγάλων ποσοτήτων χαμηλής ποιότητας κρασιού σε χώρες της Σοβιετικής Ένωσης. Αυτή η ζήτηση όμως, έπεσε με την κατάρρευση του κομμουνισμού μετά το 1989. Μέσα σε λίγα χρόνια, η Κύπρος είχε χάσει τις κύριες εξαγωγικές αγορές και η συμμετοχή της Ευρωπαϊκής Ένωσης σημαίνει το τέλος στην εξαγωγή επιδοτήσεων (Vrontis, Thrassou, & Czinkota, 2011).

Στο τέλος του 19ου αιώνα, εμφανίζεται στην Ευρώπη η φυλλοξήρα και οι δύο παγκόσμιοι πόλεμοι έσπρωξαν τους Κύπριους, των οποίων οι αμπελώνες ήταν ανέπαφοι από φυλλοξήρα αλλά και από τις συνέπειες των μεγάλων πολέμων, να επιδοθούν ξανά στην αμπελουργία αυξάνοντας τα αμπέλια τους για να ανταποκριθούν στη μεγάλη ζήτηση. Η ανάγκη για γρήγορη επέκταση των αμπελώνων, αύξησε την παραγωγή Μαύρου, μια ποικιλία με πολλαπλές χρήσεις που επέζησε την περίοδο της Τουρκοκρατίας και ήταν σχεδόν η μόνη που πολλαπλασιάστηκε.

Με την ένταξη της Κύπρου στην Ευρώπη, από το 2004 και μετά, δημιουργείται μια νέα εποχή για την κυπριακή οινοποιία (Κυθραιώτου, 2010). Για την αντιμετώπιση του ζητήματος

της ποιότητας, η Κύπρος εισήγαγε νέες διεθνείς δημοφιλείς ποικιλίες σταφυλιών (Vrontis & Paliwoda, 2008).

Σήμερα, καλλιεργούνται αμπέλια με τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες, ιδιαίτερα για την παραγωγή κρασιού. Στην Κύπρο, από το καθεστώς αναφύτευσης του Υπουργείου Γεωργίας και Φυσικών Πόρων ξεκινώντας από το 1970, εισάχθηκαν πολλές δυτικές ευρωπαϊκές ποικιλίες όπως Cabernet Sauvignon, Syrah, Chardonnay και Riesling (Hvarleva *et al.*, 2005).

1.2 Γηγενείς Κυπριακές ποικιλίες οινοποίησης

Οι ποικιλίες της αμπέλου που υπάρχουν στην Κύπρο για αιώνες λέγονται ντόπιες οινοποιήσιμες ποικιλίες (Τμήμα Γεωργίας, 2008). Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του κυπριακού αμπελώνα μέχρι τη δεκαετία του 1960, ήταν η απόλυτη κυριαρχία των δύο γηγενών οινοποιήσιμων ποικιλιών, του Μαύρου (με ποσοστό 80%) και του Ξυνιστεριού (με ποσοστό 20%). Οι ποικιλίες αυτές πλαισιώνονταν από διάφορες άλλες ερυθρές, όπως το Όφθαλμο, Γιαννούδι, Μαραθεύτικο, και λευκές, όπως το Σπούρτικο, Πρωμάρα, Κανέλλα, Μωροκανέλλα οινοποιήσιμες γηγενείς ποικιλίες (Τμήμα Γεωργίας, 2004).

Η συγκομιδή των οινοποιήσιμων σταφυλιών αρχίζει προς το τέλος του Αυγούστου και ολοκληρώνεται περίπου στις αρχές Νοεμβρίου, με το μεγαλύτερο μέρος από αυτά να συγκομίζονται από τα μέσα Σεπτεμβρίου έως τα μέσα Οκτωβρίου (Aristidou, 1990).

Η διαμόρφωση του αμπελουργικού δυναμικού για τις γηγενείς ποικιλίες κατά το 2012 φαίνεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Διαμόρφωση αμπελουργικού δυναμικού για τις γηγενείς ποικιλίες κατά το 2012.

Γηγενείς ποικιλίες	οινοποιήσιμες Έκταση (εκτάρια)	Ποσοστό επί του συνολικού αμπελώνα (%)
Μαύρο	4.195,05	46,31
Ξυνιστέρι	2.161,52	23,86
Μαραθεύτικο	175,75	1,94
Όφθαλμο	107,64	1,19
Άλλες γηγενείς ποικιλίες	548,46	6,05

(Γεωργίου & Γεωργίου, 2013)

Ο Κυπριακός Οργανισμός Τουρισμού για να δώσει την δυνατότητα σε περιηγητές να γνωρίσουν τα αμπελοτόπια της Κύπρου, δημιούργησε τους ‘Δρόμους του Κρασιού’. Αποτελούν μια προκαθορισμένη διαδρομή, η οποία προσφέρει την ευκαιρία επίσκεψης σε αξιοθέατα και προσελκυστικά στοιχεία μιας αμπελουργικής ζώνης, όπως οινοποιεία, αμπελώνες, μουσεία, πατητήρια και διάφορες εκδηλώσεις. Τους ‘Δρόμους του Κρασιού’, όπως φαίνονται στην Εικόνα 1 αποτελούν οι διαδρομές: Λαόνα – Ακάμας, Βουνί Παναγιάς – Αμπελίτης, Κοιλάδα Διορίζου, Κρασοχώρια Λεμεσού, Κουμανδαρία και Πιτσιλιά.



Εικόνα 1 Δρόμοι του κρασιού της Κύπρου

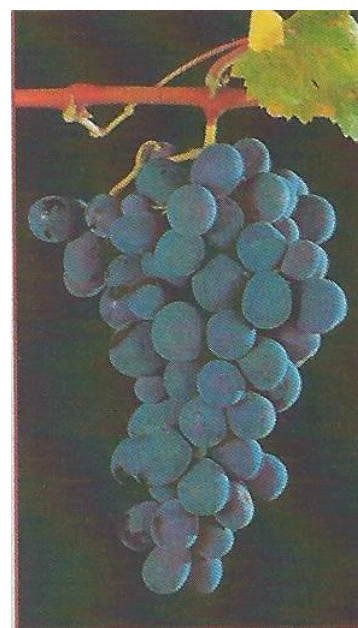
1.2.1 Ερυθρές Γηγενείς Ποικιλίες

1.2.1.1 Μαύρο

Είναι η πιο πολυφυτεμένη ποικιλία της Κύπρου που καλύπτει σχεδόν το 70% της παραγωγής του νησιού. Δίνει σταθερά υψηλές αποδόσεις και αντέχει σε φτωχά εδάφη και στο κλίμα του τόπου (Κυθραιώτου, 2010). Αποτελεί φυτό με μέτρια ευρωστία και ζωηρότητα (Εικόνα 2). Η ποικιλία αυτή προτιμά δροσερά και βαθιά εδάφη, αλλά έχει ευαισθησία στη βοτρυτίδα και στην ευδεμίδα (Τμήμα Γεωργίας, 2008).

Είναι μια από τις κύριες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή Κουμανδαρίας και Ζιβανίας (Κυθραιώτου, 2010). Ωστόσο είναι μια ποικιλία χαμηλής ποιότητας που δίνει μέτρια κρασιά (Συμβούλιο Αμπελοοινικών Προϊόντων, 2010). Οι οίνοι αυτοί δεν έχουν έντονο άρωμα και χρώμα και δεν επιδέχονται μεγάλη παλαίωση, εκτός εάν η οινοποίηση γίνεται με ειδικούς τρόπους (π.χ. αφαίρεση γλεύκους πριν από την έναρξη της ζύμωσης) και έχοντας ώριμα σταφύλια που προέρχονται από μη παραγωγικά αμπέλια ποιοτικά ανώτερων περιοχών, μπορεί να παραχθούν ισορροπημένοι οίνοι ψηλού αλκοολικού βαθμού, με ικανοποιητικό άρωμα και χρώμα οι οποίοι επιδέχονται παλαίωση 2-3 χρόνων (Τμήμα Γεωργίας, 2004).

Η ποικιλία Μαύρο έχει κιτρινωπά νεαρά φύλλα, τα οποία όταν ωριμάσουν μετατρέπονται σε μεγάλα φύλλα σκούρου πράσινου χρώματος, με 5 λοβούς και ανοικτό κορυφαίο κόλπο σε σχήμα U. Η κληματίδα δεν παρουσιάζει χνούδι, είναι γραμμοειδής, ερυθρωπού χρώματος. Ο βότρυς είναι μεγάλου μεγέθους, επιμήκης, κυλινδροειδής-κωνικός και πυκνός. Έχει βάρος μέχρι 1 kg. Η ράγα είναι στρογγυλού σχήματος και μεγάλου μεγέθους 26 x 22 mm, με μαύρο έως μωβ χρώμα, παχιά επιδερμίδα και τραγανή σάρκα. Παρουσιάζει μέσο-όψιμη ωριμότητα, ανάλογα με την περιοχή (Τμήμα Γεωργίας, 2008).



Εικόνα 2 Ποικιλία Μαύρο

(Τμήμα Γεωργίας, 2008)

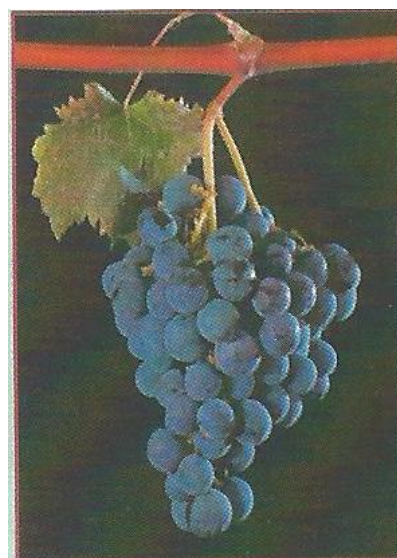
1.2.1.2 Μαραθεύτικο

Ποικιλία γνωστή από το 1893, με το όνομα Μαραθόρβικο (Εικόνα 3) (Τμήμα Γεωργίας, 2008). Βρίσκεται σχεδόν σε ολόκληρο τον κυπριακό αμπελώνα, με μεγαλύτερη παρουσία στην ορεινή Πάφο (Παναγιά, Αμπελίτης) και στην Πιτσιλιά με το συνώνυμο 'Βαμβακάδα' ή 'Βαμβακιά' (Τμήμα Γεωργίας, 2004).

Έχει τα φόντα να δώσει γεμάτα, μαλακά και αρωματικά κρασιά, με δυνατότητες παλαίωσης αλλά είναι αρκετά ταλαιπωρημένη, καλύπτοντας λιγότερο από το 1% της συνολικής παραγωγής (Συμβούλιο Αμπελοοινικών Προϊόντων, 2010). Το στυλ των οίνων από Μαραθεύτικο, είναι μεσαίου σώματος και περισσότερο απαλό παρά έντονο, αλλά με μακρά διάρκεια στον ουρανίσκο (Κυθραιώτου, 2010).

Τα νεαρά φύλλα είναι πρασινωπά με χνούδι στο κάτω μέρος, ενώ τα ώριμα φύλλα είναι σκούρου πράσινου χρώματος, με κοκκινωπή έναρξη των νεύρων. Έχει 5 λοβούς και στενόμακρο κορυφαίο κόλπο σε σχήμα V. Ο βότρυς είναι μέτριου μεγέθους, επιμήκης, κυλινδροειδής-κωνικός, με ράγα ελλειψοειδούς σχήματος, μικρού ως μέτριου μεγέθους, μαύρου και λαμπερού χρώματος, επιδερμίδα με άφθονη επικάλυψη κηρώδους ουσίας, χυμώδης, με μέσο-όψιμη ωριμότητα, ανάλογα με την περιοχή.

Το φυτό χαρακτηρίζεται από μέτρια ως μεγάλη ευρωστία και ζωηρότητα, είναι σχετικά παραγωγικό ανάλογα με τις κλιματολογικές συνθήκες, την περιοχή και τις καλλιεργητικές φροντίδες. Παρουσιάζει προτίμηση στα μέτρια ως χαμηλής γονιμότητας εδάφη. Ποικιλία πολύ ευαίσθητη στη στάχτη.



Εικόνα 3 Ποικιλία Μαραθεύτικο

(Τμήμα Γεωργίας, 2008)

Έχει άνθη φυσιολογικώς θηλυκά, με ατροφικούς στήμονες που συνηγορούν σε ύπαρξη ανθόρροιας (Τμήμα Γεωργίας, 2008). Ανθίζει γρήγορα και μόνο οι ποικιλίες που συνανθούν μπορούν να το γονιμοποιήσουν. Το Σπούρτικο είναι παραδοσιακά μια από τις λίγες ποικιλίες που μπορούν να το γονιμοποιήσουν με επιτυχία (Κυθραιώτου, 2010).

1.2.1.3 Όφθαλμο

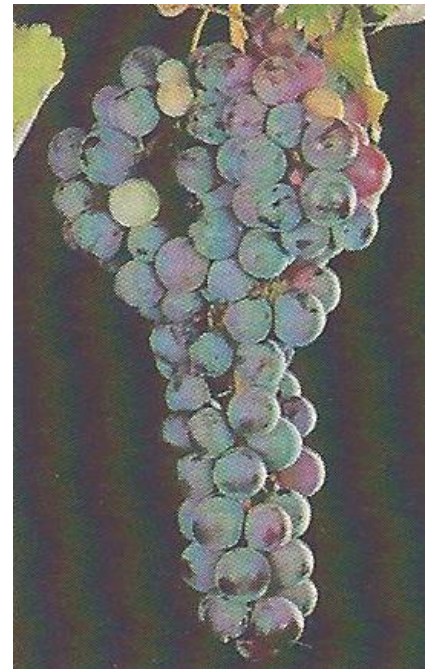
Η ποικιλία αυτή, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, είναι γνωστή από το 1893 με το όνομα 'πόφθαλμο' (Εικόνα 4). Είναι ερυθρή ποικιλία που βρίσκεται σε ολόκληρο τον κυπριακό αμπελώνα, με μεγαλύτερη παρουσία στην Πιτσιλιά (Αγρός, Α. Θεόδωρος) και στην Πάφο (Κελοκέδαρα, Φοίτη).

Όταν δεν αρδεύεται, παράγει οίνους με ικανοποιητικό μέχρι πολύ ικανοποιητικό χρώμα. Οι νέοι οίνοι, οι οποίοι δεν αντέχουν σε μακρόχρονη παλαίωση, έχουν, συνήθως όχι έντονο, χαρακτηριστικό ποικιλιακό άρωμα (άρωμα βασιλικού ή δάφνης, με χορτώδη χροιά Μοσχάτου) και υπερβολικά χαμηλή οξύτητα. Οι περιοχές που δίνουν ποιοτικώς ανώτερα αποτελέσματα είναι η Πιτσιλιά και τα Κρασοχώρια (Τμήμα Γεωργίας, 2004).

Οι οίνοι που δίνει είναι κυρίως με έντονα και περίεργα αρώματα λουλουδιών με μαλακές ταννίνες και ανοικτό χρώμα. Σπάνια ωριμάζει για να δώσει πάνω από 11 βαθμούς αλκοόλης όταν φυτρώνει ως αναρριχητικό (Κυθραιώτου, 2010).

Το φυτό χαρακτηρίζεται από μέτρια ευρωστία με βλαστούς κατακόρυφους και μέτρια μεσογονάτια. Η κορυφή των νεαρών βλαστών είναι συνήθως λευκού χρώματος και χνουδωτή. Η ποικιλία είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στη στάχτη, με μέσο-όψιμη ωριμότητα, ανάλογα με την περιοχή. Η ποικιλία αυτή παρουσιάζει κάποια προβλήματα φυσιολογίας, όπως μικρορραγία και πρασινορραγία.

Τα φύλλα εμφανίζουν υπερκαλυπτόμενο και στενόμακρο κορυφαίο κόλπο σε σχήμα λύρας, και υπερκαλυπτόμενους λοβούς, ανοικτού πράσινου χρώματος στο πάνω μέρος με λευκόγκριζο το κάτω μέρος. Τα ώριμα φύλλα είναι μεγάλα με 5 λοβούς συχνά



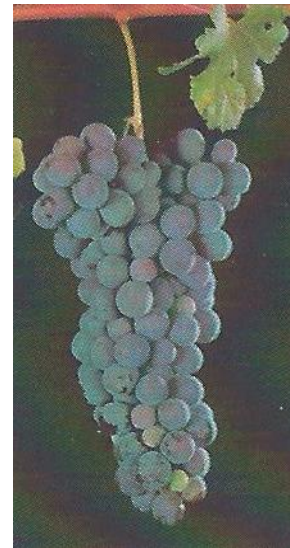
Εικόνα 4 Ποικιλία Όφθαλμο
(Τμήμα Γεωργίας, 2008)

αλληλοεπικαλυπτόμενους, με τον κορυφαίο σε σχήμα λύρας. Ο βότρυς είναι μέτριου μεγέθους, σφαιρικός, πυκνός και μαύρου χρώματος κατά την ωρίμανση. Ο χυμός είναι πλούσιος σε χρωστικά συστατικά, σάρκα γκριζοπράσινη, με αρκετά σάκχαρα, έχει συνήθως 1-2 γκρίζα σπέρματα (Τμήμα Γεωργίας, 2008).

1.2.1.4 Γιαννούδι

Είναι μια ποικιλία η οποία έχει γλυτώσει πρόσφατα από την εξαφάνιση και αναστήθηκε τα τελευταία χρόνια ως μια πραγματικά ενδιαφέρουσα ποικιλία (Κυθραιώτου, 2010). Είναι ερυθρή ποικιλία και εμφανίζεται στην κοινότητα Άλωνας και Μαλλιάς.

Η κορυφή των νεαρών βλαστών της ποικιλίας αυτής είναι χνουδωτή και λευκού χρώματος. Τα ώριμα φύλλα είναι μέτριου μεγέθους, με βαθιούς πλευρικούς κόλπους και με κορυφαίο κόλπο σε σχήμα ανοικτής λύρας. Το πίσω μέρος του φύλλου παρουσιάζει έντονη δικτυωτή υφή με εμφανή νεύρα. Η ποικιλία χαρακτηρίζεται από μέτριο βότρυ σε μεγάλο κοτσάνι, μεγέθους περίπου 18 cm, με ράγες μεγάλου μεγέθους, μαύρου-ιώδους χρώματος (Εικόνα 5) (Τμήμα Γεωργίας, 2008).



Εικόνα 5 Ποικιλία Γιαννούδι

(Τμήμα Γεωργίας, 2008)

1.2.2 Λευκές Γηγενείς Ποικιλίες

1.2.2.1 Ξυνιστέρι

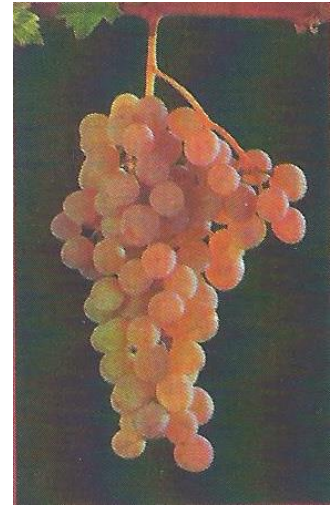
Το Ξυνιστέρι (Εικόνα 6), είναι η σημαντικότερη λευκή ποικιλία οινοποιήσιμου σταφυλιού στην Κύπρο. Είναι ευρέως γνωστό ως το 'άσπρο σταφύλι' και καλλιεργείται σε μεγάλη κλίματα σε όλες τις περιοχές της Κύπρου. Αντιπροσωπεύει περίπου το 20% του κυπριακού αμπελώνα, με έκταση που ξεπερνά τις 22.000 δεκάρια. Το Ξυνιστέρι, μαζί με το Ντόπιο Μαύρο, χρησιμοποιείται στην παραγωγή Κουμανδαρίας και αξιοποιείται εκτός από οινοποίηση και για άλλες χρήσεις (ως νωπό σταφύλι, για παρασκευή παραδοσιακών εδεσμάτων κ.ά.) (Συμβούλιο Αμπελοοινικών Προϊόντων, 2007).

Δίνει ανοιχτόχρωμα κρασιά με καλή αρωματική ένταση, απλά και ευχάριστα. Υστερούν κάπως σε οξύτητα, όπως δηλώνει και το όνομα της ποικιλίας (ξυν – υστέρι, υστερεί σε ξυνό). Είναι ένα πολύ ενδιαφέρον σταφύλι που μπορεί να δώσει πολύ καλά έως και εξαιρετικά υπό κάποιες συνθήκες κρασιά (Συμβούλιο Αμπελοοινικών Προϊόντων, 2010). Δεν έχει έντονο ποικιλιακό άρωμα, γεγονός που ο οινοποιός χρειάζεται δευτερογενή προέλευση αρωμάτων (δηλ. της ζύμωσης), όπως είναι η οινοποίηση όσο το δυνατό πιο καθαρού γλεύκους και ζύμωση σε θερμοκρασία 15-20 °C και οι οίνοι του δεν επιδέχονται μακροχρόνια παλαίωση (Τμήμα Γεωργίας, 2004).

Σε μεγάλο υψόμετρο και σε περιοχές με χαμηλές αποδόσεις, το οινοστάφυλο αυτό ωριμάζει αναδεικνύοντας ένα χρυσαφί χρώμα και μπορεί να παράξει ελκυστικές γεύσεις εσπεριδοειδών. Σε περιοχές με υψηλές αποδόσεις, οι ράγες τείνουν να είναι περισσότερο πράσινες όταν ωριμάσουν με πιο απαλά και ντελικάτα αρώματα (Κυθραιώτου, 2010).

Η ποικιλία είναι εξαιρετικά εύρωστη, ζωνηρή και παραγωγική, με πλούσιο ριζικό σύστημα και με μεγάλη ικανότητα εκμετάλλευσης μεγάλου εδαφικού ορίζοντα. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ανθεκτικότητα στα ξηρά, άγονα εδάφη και στη στάχτη.

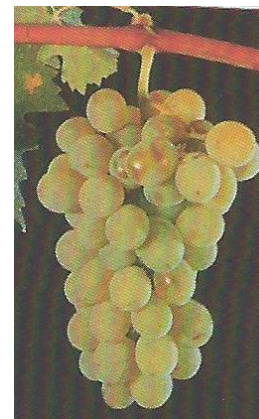
Τα φύλλα της ποικιλίας είναι λαμπερά και χωρίς χνούδι στο νεαρό στάδιο και μετατρέπονται σε μεγάλα και παχιά με 5-9 λοβούς, με κοίλους πλαϊνούς κόλπους, με κορυφαίο κόλπο σε σχήμα λύρας όταν ωριμάσουν. Ο βότρυς είναι μέτριου μεγέθους (17 cm), αραός, με ράγα στρογγυλού σχήματος και μέτριου μεγέθους 17 x 16 mm, χρυσοκίτρινη, με μέσο-όψιμη ωριμότητα, ανάλογα με την περιοχή (Τμήμα Γεωργίας, 2008).



Εικόνα 6 Ποικιλία Ξυνιστέρι
(Τμήμα Γεωργίας, 2008)

1.2.2.2 Σπούρτικο

Η ονομασία της ποικιλίας προήλθε από τη μεγάλη ευαισθησία στο σπάσιμο της ράγας λόγω της εύθραυστης επιδερμίδας. Η ποικιλία Σπούρτικο (Εικόνα 7) εντοπίζεται στην περιοχή Ομόδους, Κυπερούντας και Παναγιά, ενώ στην περιοχή Άλωνα είναι γνωστή ως ‘ασπροστάφυλο’. Είναι ποικιλία με μέσο-όψιμη ωριμότητα, ανάλογα με την περιοχή (Τμήμα Γεωργίας, 2008).



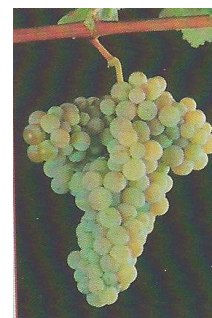
Εικόνα 7 Ποικιλία Σπούρτικο
(Τμήμα Γεωργίας, 2008)

Παράγει πολύ ελαφρούς με χαμηλό αλκοολικό τίτλο οίνους χωρίς ιδιαίτερο φυσικό χαρακτήρα. Παραδοσιακά, εκτιμώταν για την ιδιότητα του να γονιμοποιεί το Μαραθεύτικο (κόκκινη ποικιλία). Στην καλύτερη και σπάνια περίπτωση, παράγει ξηρά δροσερά/crispy κρασιά με ντελικάτα και χορτώδη αρώματα (Κυθραιώτου, 2010).

Η κορυφή των νεαρών βλαστών της ποικιλίας αυτής παρουσιάζουν λευκό χρώμα και είναι χνουδωτοί. Τα ώριμα φύλλα είναι σκούρου πράσινου χρώματος, κυρίως με 5 λοβούς, και με μεγάλους κόλπους. Ο κορυφαίος κόλπος παρουσιάζεται με κλειστό σχήμα λύρας. Ο βότρυς της ποικιλίας αυτής είναι αραιός, μέτριου μεγέθους, με μεγάλες στενόμακρες ράγες, χρυσοκίτρινου χρώματος, χωρίς αρκετό χυμό και με 4 σπέρματα (Τμήμα Γεωργίας, 2008).

1.2.2.3 Πρωμάρα

Το 1893, αναφέρθηκε για πρώτη φορά ως Πρωμάρα (Εικόνα 8) ή ‘Γλυκοπρόμον’. Είναι λευκή ποικιλία και εντοπίζεται στις κοινότητες Ομόδους και Κυπερούντας. Στην Παναγιά εντοπίζεται με το συνώνυμο Μπαστάρτικο που φαίνεται να προέρχεται από την πρωιμότητα που το χαρακτηρίζει.



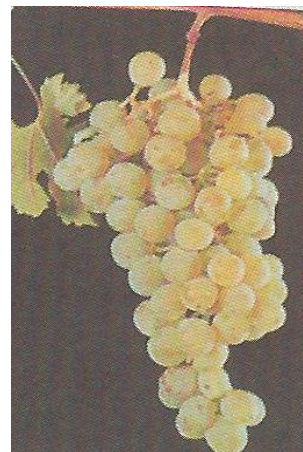
Εικόνα 8 Ποικιλία Πρωμάρα
(Τμήμα Γεωργίας, 2008)

Οι νεαροί βλαστοί της ποικιλίας παρουσιάζουν λευκό χρώμα και είναι χνουδωτοί. Τα ώριμα φύλλα είναι μέτριου μεγέθους, συνήθως με 7-9 λοβούς με βαθείς πλευρικούς κόλπους και στενόμακρο κορυφαίο κόλπο σε σχήμα λύρας. Το κοτσάνι του φύλλου είναι συνήθως ερυθρωπού χρώματος. Ο βότρυς είναι μέτριου μεγέθους, πυκνός, με ράγες μικρού μεγέθους σχήματος οβάλ, πρασινοκίτρινου χρώματος (Τμήμα Γεωργίας, 2008).

1.2.2.4 Κανέλλα

Είναι λευκή ποικιλία, η οποία εντοπίζεται στις κοινότητες Άλωνας, Ομόδους και Παναγιάς. Κινδυνεύει από εξαφάνιση και καταβάλλεται σοβαρή προσπάθεια για συμπερίληψη της στο προ-βασικό και βασικό πολλαπλασιαστικό υλικό για σκοπούς διάσωσης και προώθησης της προς τους αμπελουργούς.

Η κορυφή των νεαρών βλαστών της ποικιλίας αυτής είναι λευκοί και χνουδωτοί. Τα φύλλα είναι μέτριου μεγέθους, με 5 κλειστούς λοβούς. Έχει πλευρικούς κόλπους στο πάνω μέρος και ανοικτούς στο κάτω μέρος, με πολύ ανοικτό κορυφαίο κόλπο σε σχήμα U. Ο βότρυς της ποικιλίας αυτής είναι αραιός, μεγάλου μεγέθους, κιτρινοπράσινου χρώματος, χωρίς αρκετό χυμό (Εικόνα 9) (Τμήμα Γεωργίας, 2008).

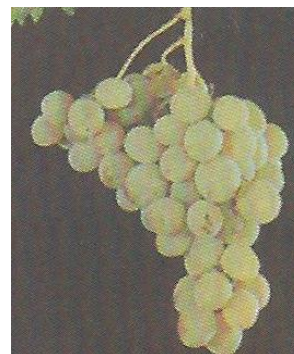


Εικόνα 9 Ποικιλία Κανέλλα
(Τμήμα Γεωργίας, 2008)

1.2.2.5 Μωροκανέλλα

Η ποικιλία αυτή είναι λευκή και εντοπίζεται στην κοινότητα Παναγιάς και στην περιοχή της Μονής Χρυσορρογιάτισσας.

Η κορυφή των νεαρών βλαστών της είναι χνουδωτοί και λευκού χρώματος (Εικόνα 10). Τα ώριμα φύλλα είναι κυκλικά, ελαφρύ μαργαριταρένιου χρώματος, μέτριου μεγέθους, με 5 έως 7 λοβούς, και μεγάλους πλευρικούς κόλπους. Ο κορυφαίος κόλπος είναι στενόμακρος σε σχήμα λύρας. Το πίσω μέρος του φύλλου παρουσιάζει έντονη δικτυωτή υφή. Ο βότρυς της είναι μέτριος και αραιός, μεγέθους 15-17 cm, με ράγες μεγάλου μεγέθους, 22 x 20 mm, χρυσοκίτρινου χρώματος, χωρίς αρκετό χυμό (Τμήμα Γεωργίας, 2008).

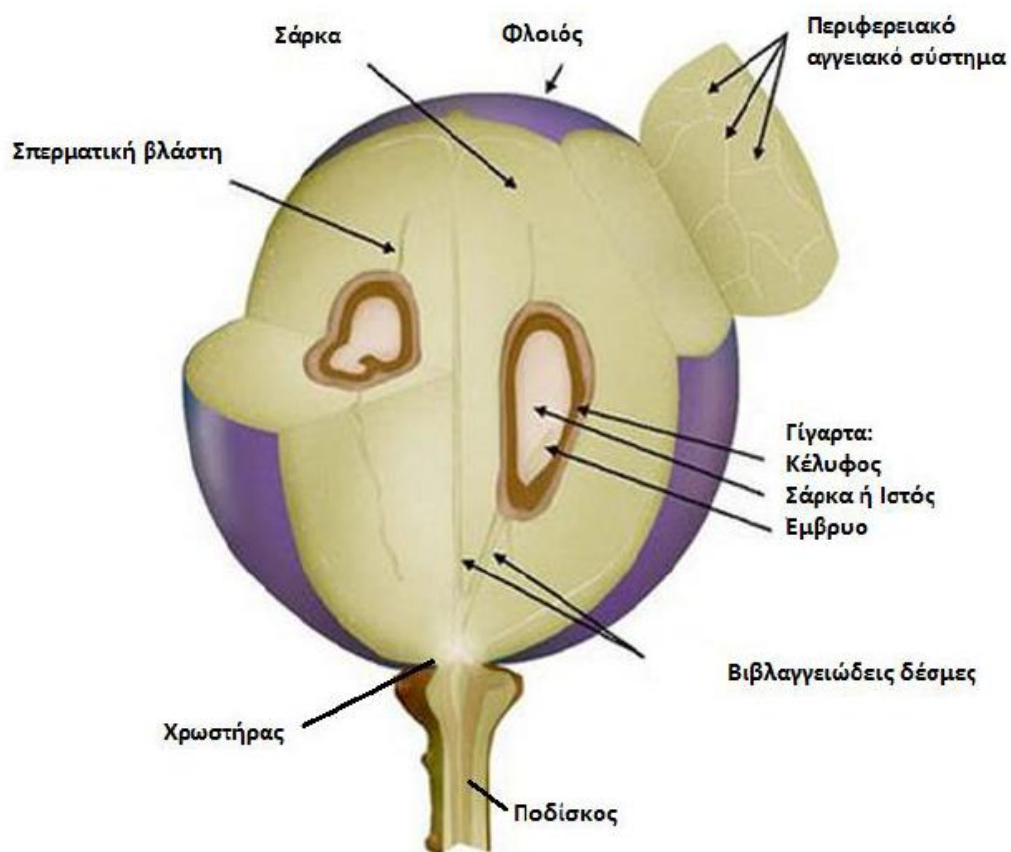


Εικόνα 10 Ποικιλία Μωροκανέλλα
(Τμήμα Γεωργίας, 2008)

1.3 Μέρη της ράγας και συστατικά

1.3.1 Μορφολογία της ράγας

Η ράγα (Εικόνα 11) αποτελεί τον καρπό του αμπελιού (Τσέτουρας, 2009) και ως καρπός περιλαμβάνει από μέσα προς τα έξω: το φλοιό 10 – 20% (περικάρπιο), τη σάρκα 74 – 87% (μεσοκάρπιο και ενδοκάρπιο) και τα γίγαρτα 3 – 6% που περιβάλλονται από το ενδοκάρπιο (Κουράκου-Δραγώνα, 1998; Σουφλερός, 2000).

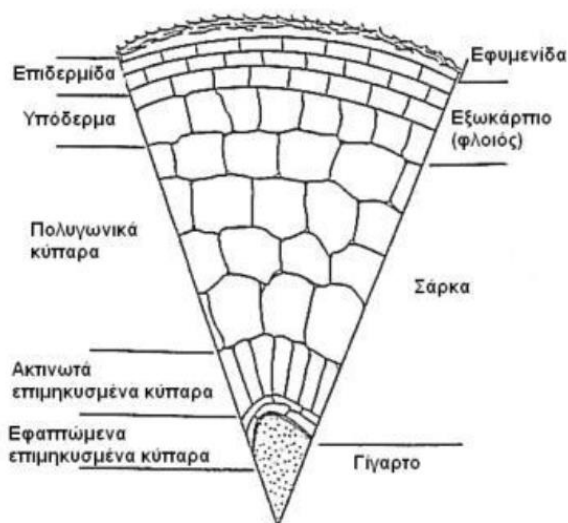


Εικόνα 11 Σχηματική αναπαράσταση της ράγας του σταφυλιού (Kennedy, 2008, εικονογράφηση Ιορδάνη Κουτρομανίδη, Winetitles, *Η εικόνα επεξεργάστηκε ηλεκτρονικά και μεταφράστηκε στα ελληνικά)

1.3.1.1 Φλοιός

Ο φλοιός αποτελείται από την εφυμενίδα, η οποία περιλαμβάνει τις κηρώδεις ουσίες που συνιστούν την κηρώδη ανθηρότητα της ράγας, την επιδερμίδα που αποτελείται από μια στιβάδα με λεπτά, πεπλατυσμένα κύτταρα και το υπόδερμα που περιλαμβάνει μερικές στοιβάδες (6 – 10) κυττάρων με λεπτά τοιχώματα (Εικόνα 12) (Νικολάου, 2008). Ο φλοιός αναλαμβάνει την προστατευτική λειτουργία της ράγας και ο αριθμός των στιβάδων των κυττάρων του φλοιού, καθώς και το μέγεθος και ο όγκος τους είναι συγκεκριμένα για κάθε ποικιλία και ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των διαφόρων ποικιλιών (Considine & Knox, 1981).

Οι κηρώδεις ουσίες της εφυμενίδας παρεμποδίζουν την υπερβολική εξάτμιση του χυμού της ράγας, συντελούν στην γρήγορη απομάκρυνση της βροχής και συγκρατούν τους διάφορους μικροοργανισμούς, αφού περιέχουν μεγάλη θρεπτική αξία για τους ζυμομύκητες που είναι υπεύθυνοι για τις ζυμώσεις του γλεύκους και την παραγωγή του οίνου. Η επιδερμίδα περιέχει αρωματώδη έλαια τα οποία είναι χαρακτηριστικά κάθε ποικιλίας σταφυλιού, ενώ οι πρώτες 2 – 3 στοιβάδες του υποδέρματος περιέχουν τις ανθοκυάνες ή τις φλαβόνες οι οποίες είναι χρωστικές ουσίες και σε αυτές οφείλεται το χρώμα των ερυθρών ή λευκών σταφυλιών, αντίστοιχα. (Σουφλερός, 2000) Επομένως, λόγω των αρωματικών και χρωστικών ουσιών που έχει, ο φλοιός χαρακτηρίζει την οινική ποιότητα της ποικιλίας (Τσέτουρας, 2009).



Εικόνα 12 Οι διάφοροι ιστοί της ράγας (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdieu, 2006, *Η εικόνα επεξεργάστηκε ηλεκτρονικά και μεταφράστηκε στα ελληνικά)

1.3.1.2 Σάρκα

Η σάρκα αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο ποσοστό της ράγας και αποτελείται από 20 – 25 ή και περισσότερες στιβάδες πενταγωνικών ή εξαγωνικών κυττάρων με πολύ λεπτές μεμβράνες (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Κατά την ανάπτυξή της, οι μεμβράνες αυξάνουν 3 – 8 φορές και είναι γεμάτες με κυτταρικό χυμό. Οι οινοποιήσιμες ποικιλίες σταφυλιών έχουν λεπτά και εύθραυστα τοιχώματα κυττάρων, κυρίως των πρώτων στοιβάδων για να διαμορφώνεται κάτω από το φλοιό μια πλήρη ζώνη υγρού που απελευθερώνεται με την παραμικρή ρήξη του φλοιού (Σουφλερός, 2000). Στο κέντρο της σάρκας υπάρχει χώρος (ενδοκάρπιο), ο οποίος είναι διαχωρισμένος από τα μεσαία στρώματα (μεσοκάρπιο) και περιβάλλει τα γίγαρτα (Νικολάου, 2008).

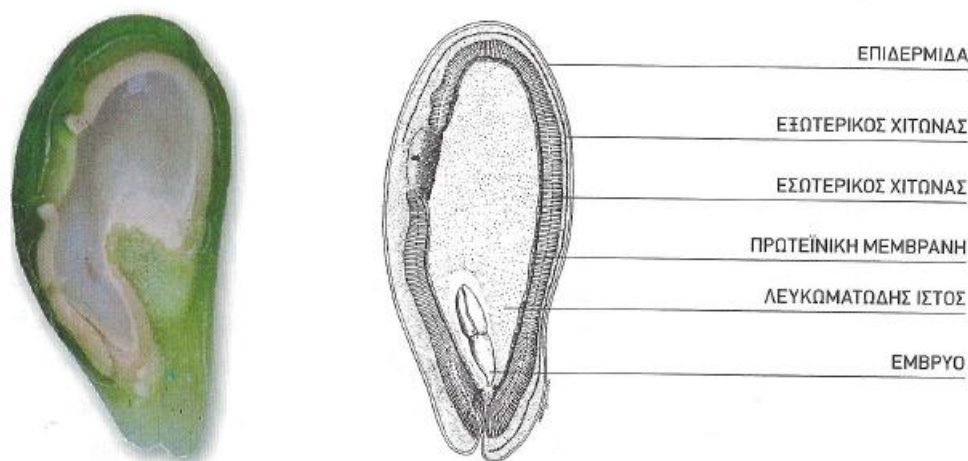
1.3.1.3 Γίγαρτα

Τα γίγαρτα, κοινώς κουκούτσια, είναι τα όργανα αναπαραγωγής της αμπέλου (Σουφλερός, 2000). Το σχήμα και το μέγεθος των γιγάρτων εξαρτάται από το είδος της αμπέλου (Σταυρακάκης, 2013). Θεωρητικά, κάθε ράγα πρέπει να περιέχει 4 γίγαρτα, αφού η ωοθήκη του άνθους σχηματίζεται από την ένωση δύο καρπόφυλλων, το κάθε ένα από τα οποία περιέχει δύο σπερματικές βλάστες. Καθώς όμως δεν αναπτύσσονται και οι 4 σπερματοβλάστες, παρουσιάζεται σπάνια η ράγα να περιέχει 4 γίγαρτα, επομένως συνήθως απαντώνται 1 – 3 γίγαρτα. (Κουράκου-Δραγώνα, 1998)

Από μορφολογικής πλευράς (Εικόνα 13) τα γίγαρτα διακρίνονται από τη ραχιαία πλευρά με τη χάλαζα, την κοιλιακή πλευρά με τους αύλακες, και το ράμφος. Ανατομικά (Εικόνα 14) από έξω προς τα μέσα, τα γίγαρτα αποτελούνται από το κέλυφος με τους χιτώνες και το ενδοσπέρμιο που περιέχει το έμβρυο. (Νικολάου, 2008)



Εικόνα 13 Μορφολογία γιγάρτου (Σταυρακάκης, 2013)



Εικόνα 14 Ανατομία γιγάρτου, μικροσκοπική παρατήρηση (αριστερά) και σχέδιο (δεξιά) (Σταυρακάκης, 2013)

1.3.2 Χημική σύσταση της ράγας

1.3.2.1 Φλοιός

Ο φλοιός παρόλο που αντιπροσωπεύει ένα μικρό ποσοστό επί του βάρους της ράγας, είναι το μέρος του σταφυλιού που βρίσκονται οι οργανικές ουσίες (χρωστικές ενώσεις, αρωματικές ενώσεις, τα συστατικά γεύσης και ταννίνες), που χαρακτηρίζουν τις διάφορες ποικιλίες αμπέλου και διαμορφώνουν στη συνέχεια τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες των διαφόρων ποικιλιακών οίνων (Κουράκου-Δραγώνα, 1998; Grainger & Tattersall, 2005). Το μεγαλύτερο μέρος του φλοιού αποτελείται από νερό (75 – 80% κατά βάρος). Επιπλέον, υπάρχουν ταννίνες 1 – 2% κατά βάρος, όξινες ενώσεις 1 – 1,5% κατά βάρος, ανόργανες ενώσεις 1,5 – 2% κατά βάρος, αζωτούχες ενώσεις 1,5 – 2% κατά βάρος και λοιπές ενώσεις 10 – 15% κατά βάρος. (Σουφλερός, 2000; Τσέτουρας, 2009). Οι φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από το φλοιό (στο κόκκινο σταφύλι) είναι 33% (Krithika, Naik, & Pragalyaashree, 2015).

1.3.2.2 Σάρκα

Η χημική σύσταση της σάρκας, η οποία αντιπροσωπεύει το κύριο συστατικό του γλεύκους, είναι κατά ένα μεγάλο μέρος ίδια με τη σύσταση του γλεύκους (Σουφλερός, 2000). Συνήθως περιέχει νερό 65 – 80% κατά βάρος, ζυμώσιμα σάκχαρα 10 – 30% κατά βάρος και λοιπές ουσίες 5 – 6% κατά βάρος. Τις ουσίες αυτές αποτελούν τα οργανικά οξέα (ελεύθερα και δεσμευμένα), τα ανόργανα συστατικά, οι αζωτούχες ενώσεις, οι πηκτινικές ύλες, οι

χρωστικές (σε βαφικές ποικιλίες), οι ταννίνες και οι αρωματικές ενώσεις που είναι λιγότερες από τον φλοιό (Σουφλερός, 2000; Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Το τρυγικό και μηλικό οξύ αντιπροσωπεύουν το 90% των οξέων στα σταφύλια και δεν κατανέμονται ομοιόμορφα σε όλη τη σάρκα του σταφυλιού, παρουσιάζοντας κοντά στο φλοιό χαμηλότερες οξύτητες απ' ό,τι γύρω από τα γίγαρτα (Lamikanra, Inyang, & Leong, 1995). Η σάρκα, περιλαμβάνει το 1% των φαινολικών ενώσεων (σε κόκκινο σταφύλι) (Krithika *et al.*, 2015).

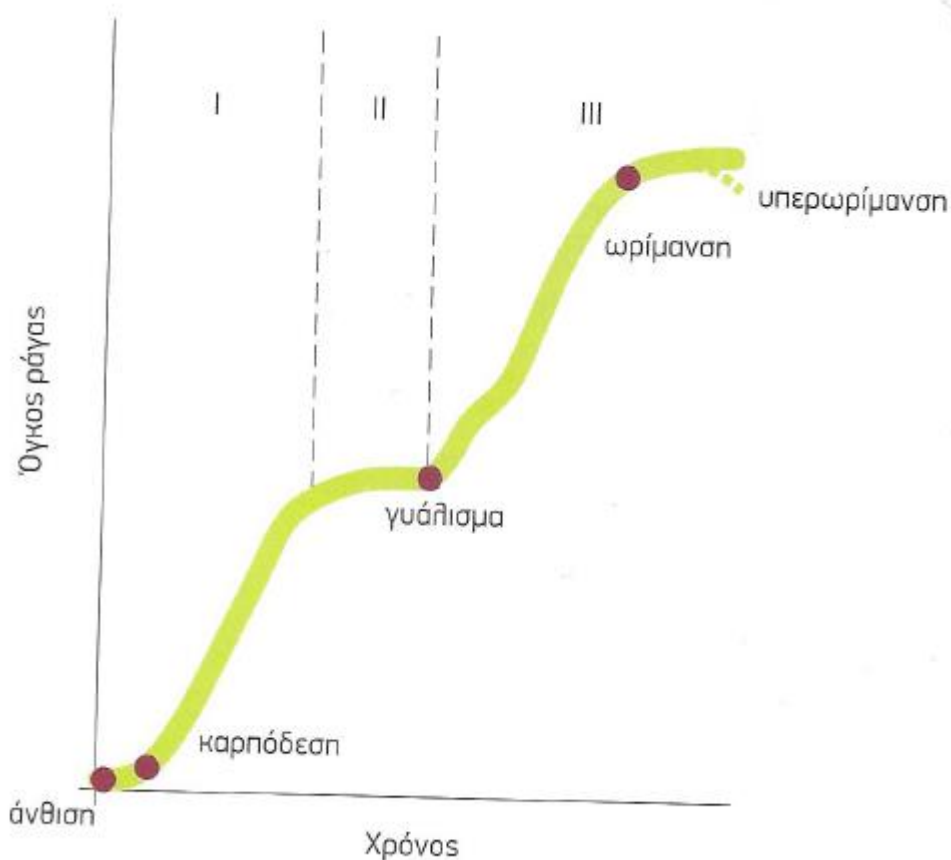
1.3.2.3 Γίγαρτα

Η χημική σύσταση των γιγάρτων είναι νερό 25 – 45% κατά βάρος, υδατάνθρακες 34 – 36% κατά βάρος, έλαια 13 – 20% κατά βάρος, ταννίνες 4 – 6% κατά βάρος, αζωτούχες ενώσεις 4 – 6,5% κατά βάρος, ανόργανα στοιχεία 2 – 4% κατά βάρος και λιπαρά οξέα 1% κατά βάρος (Σουφλερός, 2000; Νικολάου, 2008). Αρκετές φαινολικές ενώσεις των γιγάρτων (κυρίως ταννίνες), εκχυλίζονται στον οίνο κατά τη διάρκεια της οινοποίησης και τα έλαια των γιγάρτων παραλαμβάνονται με διάφορα εκχυλιστικά μέσα ώστε να χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία ή βιομηχανία τροφίμων (Νικολάου, 2008). Τα γίγαρτα φαίνεται να έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό (62%) σε φαινολικά συστατικά (σε κόκκινο σταφύλι) (Krithika *et al.*, 2015), με τα περισσότερα από αυτά να είναι μονομερή φλαβαν-3-όλης (κατεχίνες) και προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες (Sun *et al.*, 1999).

1.4 Φάσεις ανάπτυξης της ράγας

Η ωρίμανση των σταφυλιών είναι ένα βασικό στάδιο ανάπτυξης για τον καθορισμό της ποιότητας τόσο των οινοποιήσιμων, όσο και επιτραπέζιων σταφυλιών (Deytieux *et al.*, 2007). Μετά την γονιμοποίηση και την καρπόδεση, η ανάπτυξη και ωρίμανση των ραγών αποτελούν μια δυναμική διαδικασία, που συνοδεύεται από σημαντικές μοριακές, βιοχημικές, μορφολογικές και φυσιολογικές αλλαγές (Σταυρακάκης, 2013). Οι αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης δεν συμβαίνουν ταυτόχρονα. Κάθε ένωση εξελίσσεται διαφορετικά και επηρεάζεται από γενετικούς, κλιματικούς και γεωγραφικούς παράγοντες και καλλιεργητικές πρακτικές. (Pérez-Magariño & González-San José, 2006) Από τους ίδιους παράγοντες επηρεάζεται επίσης και το τελικό μέγεθος και οι λοιποί χαρακτήρες ποιότητας της ράγας, όπως το χρώμα, το άρωμα και η περιεκτικότητα σε σάκχαρα και οξέα (Σταυρακάκης, 2013).

Τα σταφύλια είναι μη κλιμακτηριακά φρούτα (Boss, Davies, & Robinson, 1996) και η ανάπτυξη της ράγας σταφυλιού ακολουθεί ένα πρότυπο με διπλή σιγμοειδή καμπύλη ανάπτυξης (Εικόνα 15), με κάθε περίοδο ανάπτυξης να διαφέρει σημαντικά στη βιοχημική δραστηριότητα και την επακόλουθη σύνθεση της ράγας (Geny *et al.*, 2003).

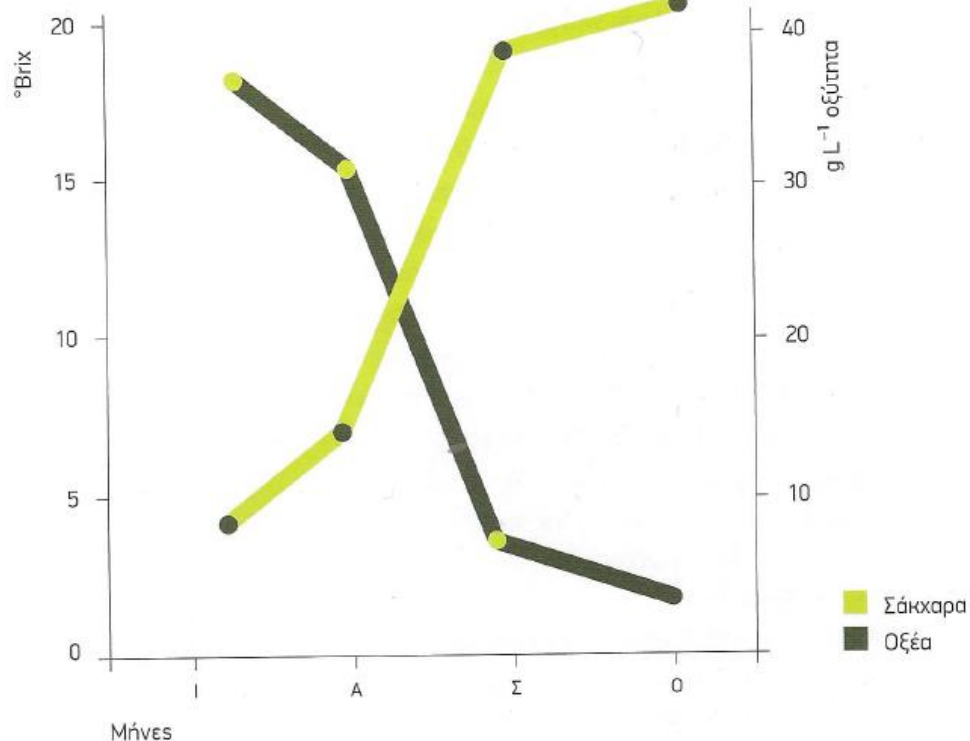


Εικόνα 15 Στάδια ανάπτυξης της ράγας (Σταυρακάκης, 2013)

Στο πρώτο στάδιο, που ονομάζεται στάδιο πράσινης ράγας, παρατηρείται ταχεία ανάπτυξη των γιγάρτων και του περικάρπιου (Σταυρακάκης, 2013). Το στάδιο αυτό έχει διάρκεια από 45 έως 65 ημέρες, ανάλογα με την ποικιλία και τις κλιματολογικές συνθήκες (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b) και αρχίζει από την καρπόδεση και φθάνει μέχρι τον περκασμό, δηλαδή ως τη στιγμή που η ράγα αρχίζει να γυαλίζει και να αλλάζει χρώμα (Σουφλερός, 2000). Παρατηρείται έξαρση της κυτταρικής διαίρεσης στον ιστό του περικάρπιου, το ποσό και η κατεύθυνση των οποίων καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το τελικό μέγεθος και σχήμα του σταφυλιού (Coombe & McCarthy, 2000). Ο αριθμός και το αναπτυξιακό στάδιο των γιγάρτων συσχετίζονται θετικά με τη διάρκεια και την ένταση των κυτταροδιαίρεσεων (Σταυρακάκης, 2013). Στο στάδιο αυτό, τα γίγαρτα προσεγγίζουν το πλήρες μέγεθός τους

(Geny *et al.*, 2003), αφού οι αυξητικές ορμόνες (κυτοκυνίνες και γιββεριλίνες) επιδρούν άμεσα στον αριθμό των γιγάρτων (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b). Σε αυτό το στάδιο, η ράγα είναι σκληρή, πράσινη λόγω της άφθονης χλωροφύλλης που υπάρχει στο φλοιό της και έχει αργή ανάπτυξη. Η κύρια οργανική ένωση που συσσωρεύεται είναι το μηλικό οξύ και γίνεται η εμφάνιση των πρώτων σακχάρων, κυρίως γλυκόζη που δεν ξεπερνούν τα 20 g/Kg (Coombe & McCarthy, 2000; Σουφλερός, 2000).

Στο δεύτερο στάδιο ή στάδιο ανάσχεσης της αύξησης των ραγών (Σταυρακάκης, 2013), ‘Veraison’ ή περκασμός όπως ονομάζεται από τους αμπελουργούς (Coombe, 1992). Κατά το στάδιο αυτό, παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του φλοιού, η ράγα μαλακώνει, τα σάκχαρα αυξάνουν (Εικόνα 16), η οξύτητα μειώνεται λόγω της αραίωσης και εξουδετέρωσης των οξέων της ράγας από το νερό και τα προερχόμενα σ’ αυτό ανόργανα στοιχεία και ο όγκος αυξάνει (Coombe, 1992; Σουφλερός, 2000).



Εικόνα 16 Πορεία συγκέντρωσης σακχάρων και οξέων κατά την ωρίμανση της ποικιλίας Σαββατιανό (Σταυρακάκης, 2013)

Στο στάδιο αυτό, το έμβρυο του γιγάρτου αναπτύσσεται με ταυτόχρονη σκλήρυνση του περιβλήματος του, ενώ πολλά γίγαρτα έχουν αναπτυχθεί πλήρως (Geny *et al.*, 2003). Σύμφωνα με τους Kennedy *et al.* (2001), οι προανθοκυανιδίνες των γιγάρτων, βρίσκονται και στις δύο περιόδους ανάπτυξης των ραγών. Το πράσινο χρώμα των ραγών γίνεται κίτρινο για τις λευκές ποικιλίες και ερυθρό ανοικτό στις ερυθρές ποικιλίες και στη συνέχεια σε βαθύ ερυθρό και η αλλαγή αυτή γίνεται πολύ απότομα, έτσι ώστε μια συγκεκριμένη ράγα να αλλάζει χρώμα μέσα σε μια μέρα (Σουφλερός, 2000). Για το σύνολο των ραγών, όμως, το φαινόμενο αυτό είναι έντονο και μπορεί να διαρκέσει από 8 έως 15 μέρες ή και περισσότερο ανάλογα με το αν η άνθηση είναι αργή. Κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού, είναι χαρακτηριστική η εξάντληση των ουσιών που συντίθενται κατά την ωρίμανση και η αύξηση της συγκέντρωσης του αμπισικού οξέος (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b).

Κατά το 3ο στάδιο, στάδιο ωρίμανσης, εκτείνεται από τον περκασμό μέχρι την ωριμότητα, δηλαδή το σημείο που το σταφύλι είναι ώριμο (Σουφλερός, 2000). Στο στάδιο αυτό, η κυτταρική αύξηση συνεχίζεται και συνοδεύεται από ποικίλες φυσιολογικές μεταβολές (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b). Οι Silacci & Morrison (1990), ανέφεραν ότι η διαλυτότητα της πηκτίνης στο μεσοκάρπιο των σταφυλιών αλλάζει μετά τον περκασμό και οι Nunan *et al.* (1997), παρατήρησαν ότι η κυτταρίνη και οι πολυγαλακτουρονάνες ήταν τα κύρια συστατικά που αντιπροσωπεύουν το 30 – 40% κατά βάρος του πολυσακχαρίτη των τοιχωμάτων. Επίσης, οι Nunan *et al.* (1998), ανέφεραν ότι δεν υπάρχουν σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση του πολυσακχαρίτη στο κυτταρικό τοίχωμα κατά τη διάρκεια του μαλακώματος στην ωρίμανση των σταφυλιών, αλλά συμβαίνουν σημαντικές τροποποιήσεις των επιμέρους συστατικών του πολυσακχαρίτη.

Η αναπνευστική ένταση μειώνεται, ενώ συγκεκριμένες ενζυματικές δράσεις αυξάνονται με ταχύ ρυθμό. Η περίοδος αυτή έχει διάρκεια 35 έως 55 μέρες. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b) Παρατηρείται συσσώρευση σακχάρων εξόζης στους φλοιούς και τη σάρκα, καθώς επίσης και κατιόντων όπως το κάλιο, αμινωξέων και φαινολικών ενώσεων (συμπεριλαμβανομένων των ανθοκυανινών στα ερυθρά σταφύλια) (Coombe & McCarthy, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Η συγκέντρωση του μηλικού οξέος μειώνεται θεαματικά (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b), όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των σακχάρων στο χυμό της σάρκας των ραγών (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Το μέγεθος της ράγας εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό κατά τις διαδικασίες αυτές και υπάρχει συσχετισμός ανάμεσα στις διαστάσεις της ώριμης ράγας και του αριθμού των γιγάρτων που περιέχει (Ribéreau-Gayon *et*

al., 2006b). Τα γιγάρτα αλλάζουν χρώμα από ένα αρχικό πράσινο, σε ένα ανοιχτό κίτρινο και τελικά σε ένα σκούρο καφέ κατά τη συγκομιδή (Geny *et al.*, 2003).

Στο σταφύλι, παρουσιάζονται τα ακόλουθα είδη ωριμότητας:

- Φυσιολογική ή βιολογική ωριμότητα, η οποία χαρακτηρίζεται από την ικανότητα των γιγάρτων να βλαστήσουν
- Βιομηχανική ωριμότητα, που αντιστοιχεί στο ανώτατο απόλυτο ποσό σακχάρων των ώριμων σταφυλιών
- Τεχνολογική ωριμότητα, που αντιστοιχεί στη στιγμή κατά την οποία το σταφύλι μιας ποικιλίας δίνει γλεύκος, όπου η χημική του σύσταση είναι κατάλληλη για τον τύπο του οίνου που πρόκειται να επεξεργαστεί
- Πολυφαινολική ωριμότητα, που περιλαμβάνει όχι μόνο την ολική συγκέντρωση των συστατικών της οικογένειας των πολυφαινολών, αλλά και τη δομή τους και την ικανότητά τους να εκχυλίζονται από τα σταφύλια κατά την αλκοολική ζύμωση (Σουφλερός, 2000)

Στο τέλος του 3ου σταδίου, τα σταφύλια συγκομίζονται (Νικολάου, 2008). Τη συγκομιδή θα κρίνουν η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, χαμηλότερη οξύτητα, πλούσιο χρώμα και πλήρη ποικιλιακό φρουτώδες άρωμα (Herrera, Guesalaga, & Agosin, 2003). Εάν τα σταφύλια παραμείνουν ακόμη περισσότερο πάνω στα φυτά περνούν σε μια κατάσταση 'υπερωρίμανσης'. Τα σάκχαρα φτάνουν σε ένα ανώτατο επίπεδο, ενώ τα οξέα συνεχίζουν να μειώνονται. Οι ράγες είναι ευαίσθητες σε διάφορα παράσιτα και υφίστανται ζημιές κατά την συγκομιδή και διακίνησή τους. (Νικολάου, 2008)

1.5 Φαινολικά συστατικά

Φαινολικά συστατικά ή φαινόλες ονομάζονται οι ενώσεις που στο μόριό τους περιέχουν τη χαρακτηριστική ομάδα φαινόλης (Σουφλερός, 1997). Οι φαινόλες είναι κυκλικά βενζίλια, με ένα ή περισσότερες υδροξυλομάδες που συνδέονται άμεσα με τη δομή του δακτυλίου (Jackson, 2008) αντικαθιστώντας ισάριθμα υδρογόνα (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Παρόλο που στο μόριο τους περιέχουν αλκοολική ομάδα, ωστόσο δεν παρουσιάζουν τυπικά χαρακτηριστικά που να συνδέονται με τις αλειφατικές αλκοόλες (Jackson, 2008).

Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι καλά μελετημένες και έχουν διευκρινιστεί σε διαφορετικά μέρη τόσο των σταφυλιών όσο και της αμπέλου όπως στους φλοιούς και τα γίγαρτα σταφυλιών, καθώς και στα φύλλα και τους βλαστούς της αμπέλου (Souquet *et al.*, 2000)

Οι ενώσεις αυτές είναι υπεύθυνες για το χρώμα των σταφυλιών και έπειτα των οίνων, αποτελούν κομμάτι στη διαμόρφωση ορισμένων γευστικών χαρακτηριστικών των οίνων όπως η στυφάδα και η τραχύτητα, προσφέρουν στα σταφύλια και τους οίνους αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική προστασία και παίζουν σημαντικό ρόλο στην παλαίωση και στις διάφορες τεχνολογικές κατεργασίες των οίνων (Σουφλερός, 1997). Επιπλέον, οι φαινολικές ενώσεις συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των οίνων με βάση την παρουσία, την ένταση ή τις αναλογίες ορισμένων από αυτών (Versari *et al.*, 2014).

Η σύνθεση των πολυφαινολικών ενώσεων του κρασιού εξαρτάται από την ποικιλία του σταφυλιού, την τοποθεσία της αμπέλου, τις καλλιεργητικές συνθήκες, το κλίμα, τον τύπο του εδάφους, την περίοδο της συγκομιδής, τη διαδικασία παραγωγής και την ωρίμανση (Rodríguez-Delgado *et al.*, 2002; Obrique-Slier *et al.*, 2010). Σύμφωνα με μελέτες, όταν τα σταφύλια είναι εκτεθειμένα για αρκετές ώρες στο φως της μέρας παρουσιάζουν αυξημένη βιοσύνθεση φλαβονόλων (Makris, Kallithraka, & Kefalas, 2006) ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή τους (Kallithraka, Mamalos, & Makris, 2007).

Οι φαινολικές ενώσεις διαίρονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των δακτυλίων φαινόλης που περιέχουν και τα δομικά στοιχεία που προσδένονται σε αυτούς τους δακτυλίους με ένα άλλο (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006). Οι φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στα σταφύλια και τους οίνους χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις φλαβονοειδείς φαινόλες (διφαινυλπροπανοειδή) και τις μη φλαβονοειδείς φαινόλες (φαινυλπροπανοειδή). (Gómez-Alonso, García-Romero, & Herмосίν-Gutiérrez, 2007)

1.5.1 Φλαβονοειδείς φαινόλες

Οι φλαβονοειδείς φαινόλες χαρακτηρίζονται από τον C₆-C₃-C₆ σκελετό, που αποτελείται από δύο φαινολικούς δακτύλιους και στο κέντρο ένα δακτύλιο πυρανίου. Οι πιο γνωστές φλαβονοειδείς φαινόλες στα σταφύλια και τους οίνους είναι οι φλαβονόλες, οι φλαβαν-3-όλες (κατεχίνες) και οι ανθοκυανίνες. Συμπεριλαμβάνονται επίσης, μικρές ποσότητες φλαβαν-3,4-διολών (Jackson, 2008). Οι φλαβονόλες (κίτρινες χρωστικές ουσίες) και οι

ανθοκυανίνες (κόκκινες χρωστικές) βρίσκονται κυρίως στη φλούδα, ενώ άλλα φλαβονοειδή (φλαβαν-3-όλη, φλαβαν-3,4-διόλες, μαζί με τα πολυμερή τους) εμφανίζονται στα γίγαρτα και τους μίσχους (Πίνακας 2) (Clarke & Bakker, 2004).

Πίνακας 2 Οι φαινολικές ενώσεις στα διάφορα μέρη της ράγας

Μέρη ράγας	Φαινολικές ενώσεις
Γίγαρτα	Γαλλικό οξύ, (+)-κατεχίνη, επικατεχίνη, διμερής προκυανιδίνη, προανθοκυανιδίνη
Φλοιός	Προανθοκυανιδίνη, ελλαγικό οξύ, μυρισετίνη, κερκετίνη, καιμπερόλη, trans-ρεσβερατρόλη
Φύλλα	Μυρισετίνη, ελλαγικό οξύ, καιμπερόλη, κερκετίνη, γαλλικό οξύ
Μίσχος	Ρουτίνη, κερκετίνη-3-O-glucuronide, trans-ρεσβερατρόλη, αστιλβίνη

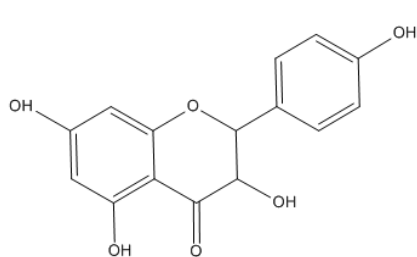
(Xia et al., 2013)

1.5.1.1 Φλαβονόλες

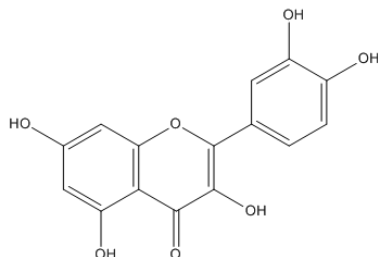
Οι φλαβονόλες, ανάλογα με τη μορφή του πλάγιου δακτυλίου, διακρίνονται σε καμπερόλη (Εικόνα 17), κερκετίνη (Εικόνα 18) και μυρισετίνη (Εικόνα 19) (Σουφλερός, 2000). Βρίσκονται με τη μορφή μονογλυκοζιτών-3 ή μονογλυκουρονοζιτών-3 που σχηματίζονται με την προσκόλληση στη θέση-3 του κεντρικού δακτυλίου (βενζοπυρόνη) ενός μορίου μονοσακχαρίτη (κυρίως γλυκόζης) ή ενός μορίου γλυκουρονικού οξέος. Η κερκετίνη εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε φύλλα σταφυλιού (*Vitis vinifera* L.) το 1873, ενώ οι γλυκοζίτες των καμπερόλης, κερκετίνης και μυρισετίνης έχουν βρεθεί στον επιδερμικό ιστό σταφυλιών (Price et al., 1995). Ειδικότερα, αντιπροσωπεύουν 13 – 30% της συνολικής φαινολικής περιεκτικότητας σε ερυθρά σταφύλια (Cantos, Espín, & Tomás-Barberán, 2002). Η καμπερόλη και η κερκετίνη έχουν αναφερθεί σε ερυθρά και λευκά σταφύλια, ενώ η μυρισετίνη είναι παρούσα μόνο σε ερυθρές ποικιλίες (Cantos et al., 2002; Mattivi et al., 2002).

Οι φλαβονικοί γλυκοζίτες ή φλυκουρονοζίτες του σταφυλιού έχουν την ιδιότητα να υδρολύονται εύκολα, επομένως στους ερυθρούς οίνους να συναντιούνται ελεύθερα η καμπερόλη, κερκετίνη και μυρισετίνη, ενώ στους λευκούς οίνους, οι χρωστικές αυτής της

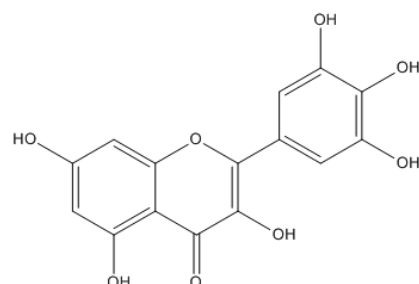
οικογένειας περιέχονται σε ίχνη ή είναι ολότελα απύσες λόγω της τεχνικής της οινοποίησης όπου δεν περιλαμβάνει το στάδιο της εκχύλισης (Σουφλερός, 2000).



Εικόνα 17 Καμφερόλη



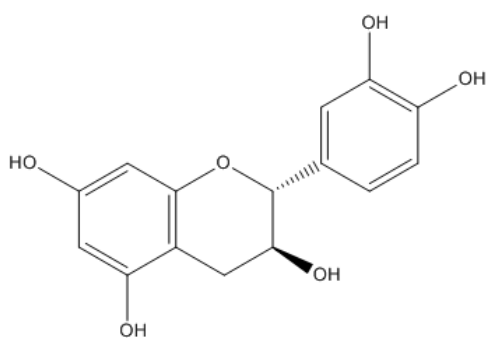
Εικόνα 18 Κερκετίνη



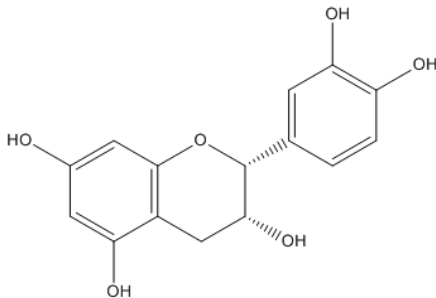
Εικόνα 19 Μυρισετίνη

1.5.1.2 Φλαβαν-3-όλες (κατεχίνες)

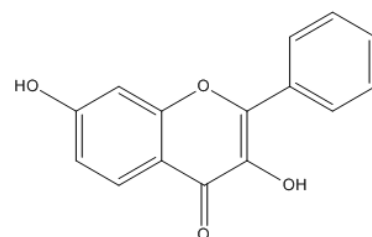
Οι φλαβαν-3-όλες, βρίσκονται κυρίως στα γίγαρτα και εξάγονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οινοποίησης. Οι φλαβαν-3-όλες διακρίνονται στις μονομερείς ομάδες, (+)-κατεχίνη (Εικόνα 20) και (-)-επικατεχίνη (Εικόνα 21), καθώς και στα ολιγομερή, τις προανθοκυανιδίνες (υδροξυφλαβαν-3-όλη, Εικόνα 22) (Carando *et al.*, 1999).



Εικόνα 20 (+)-κατεχίνη



Εικόνα 21 (-)-επικατεχίνη



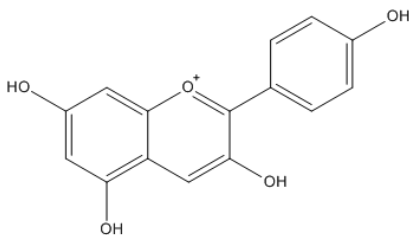
Εικόνα 22 Υδροξυφλαβαν-3-όλη

Οι προανθοκυανιδίνες συνδέονται με C(4) – C(6) ή C(4) – C(8) δεσμούς μεταξύ των φλαβονοειδών. (Bautista-Ortín *et al.*, 2014) Οι προανθοκυανιδίνες στο σταφύλι βρίσκονται στους φλοιούς και τα γίγαρτα και οι κύριες μονομερείς φλαβαν-3-όλες, εκτός από την (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη και τα ισομερή της, βρίσκεται και η (-)-επιγαλλοκατεχίνη και επικατεχίνη-3-O-gallate (Bautista-Ortín *et al.*, 2014; Chira *et al.*, 2009). Οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών διαφέρουν από εκείνες των γιγάρτων στο γεγονός ότι οι

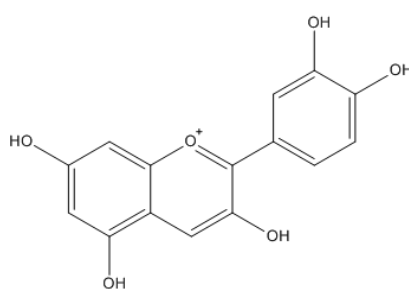
προανθοκυανιδίνες των φλοιών περιλαμβάνουν προδελφινιδίνη, έχουν υψηλότερο βαθμό πολυμερισμού και έχουν χαμηλότερο ποσοστό γαλλικών εστέρων (Chira *et al.*, 2009; Des Gachons & Kennedy, 2003; Rinaldi *et al.*, 2014). Η σύνθεση και ο βαθμός πολυμερισμού των προανθοκυανινών συνδέονται άμεσα με την ένταση της πικρής γεύσης και την αίσθηση της στυφάδας (Curko *et al.*, 2014).

1.5.1.3 Ανθοκυανίνες

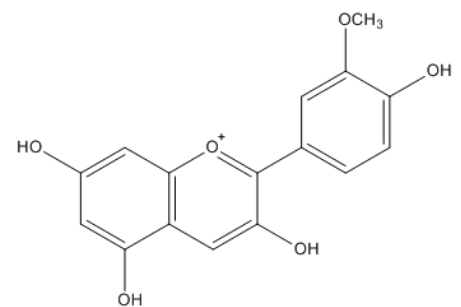
Οι ανθοκυανίνες είναι παράγωγα του φαινυλ-2 βενζοπυρυλίου, του οποίου το μόριο παρουσιάζει κάποια ιδιαιτερότητα που οφείλεται στο ότι περιέχει έναν οξυγονούχο ετερόκυκλο, το πυρύλιο, που είναι μορφή θετικού ιόντος και επιτρέπει το σχηματισμό αλάτων με τα ανιόντα. Ανάλογα με τη μορφή του πλάγιου δακτυλίου διακρίνουμε τις: πελαργονιδίνη (Εικόνα 23), κυανιδίνη (Εικόνα 24), πεονιδίνη (Εικόνα 25), δελφινίνη (Εικόνα 26), πετουνιδίνη (Εικόνα 27) και μαλβιδίνη (οινιδίνη, Εικόνα 28). Τα ερυθρά σταφύλια παρουσιάζουν σημαντική ποσότητα της χρωστικής μαλβιδίνης και γι' αυτό ονομάζεται ως οινιδίνη (Σουφλερός, 2000). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ανθοκυανινών, που αποδίδονται στο θετικό ιόν του δακτυλίου, για την κυανιδίνη και μερικούς γλυκοζίτες του οφείλεται στον αριθμό υπολειμμάτων σακχάρου στη θέση-3, την κατάσταση οξείδωσης του δακτυλίου, την υδροξυλίωση και μεθυλίωση, καθώς και την ακυλίωση με φαινολικά οξέα (Kallithraka, Aliaj, Makris, & Kefalas, 2009).



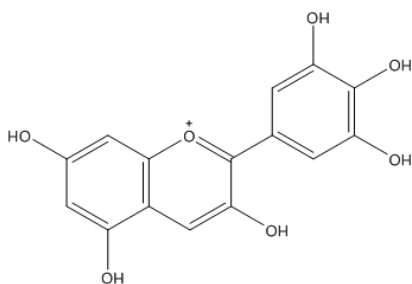
Εικόνα 23 Πελαργονιδίνη



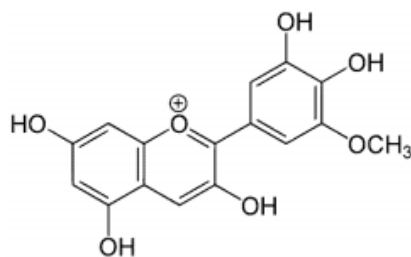
Εικόνα 24 Κυανιδίνη



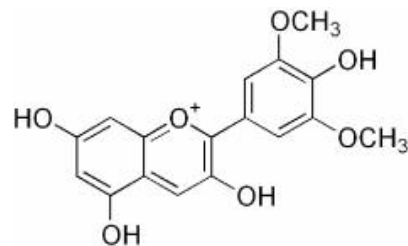
Εικόνα 25 Πεονιδίνη



Εικόνα 26 Δελφινίνη



Εικόνα 27 Πετουνιδίνη



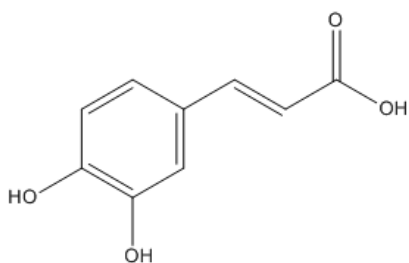
Εικόνα 28 Μαλβιδίνη

1.5.2 Μη φλαβονοειδείς φαινόλες

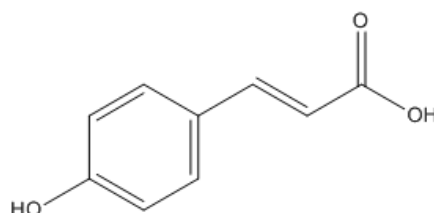
Οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες χαρακτηρίζονται από τον C₆-C₃ σκελετό και αποτελούνται από τα υδροξυκινναμωμικά και υδροξυβενζοϊκά οξέα (Jackson, 2008) και στυλβένια (Obreque-Slier *et al.*, 2010), τα οποία βρίσκονται στα κενοτόπια των κυττάρων του σταφυλίου (Clarke & Bakker, 2004). Τα σταφύλια και ο οίνος περιέχουν 7 βενζοϊκά οξέα και 3 κινναμωμικά.

1.5.2.1 Κινναμωμικά οξέα

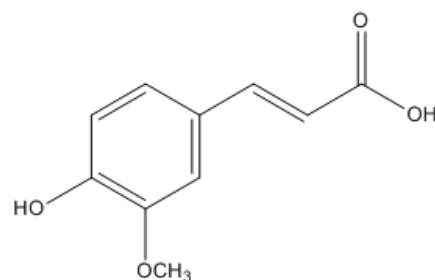
Τα κινναμωμικά οξέα είναι το καφεϊκό (Εικόνα 29), p-κουμαρικό (Εικόνα 30) και φερουλικό οξύ (Εικόνα 31) όμως δεν παρουσιάζονται ελεύθερα στα σταφύλια και στους οίνους, όμως βρίσκονται σε μορφή ενώσεων με τις ανθοκυάνες και το τρυγικό οξύ, με το οποίο δίνουν το π-κουμαρυλοτρυγικό οξύ, καφεϋλοτρυγικό οξύ και φερουλλοτρυγικό οξύ.



Εικόνα 29 Καφεϊκό οξύ



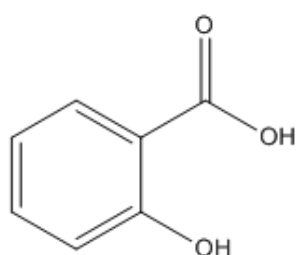
Εικόνα 30 p-κουμαρικό οξύ



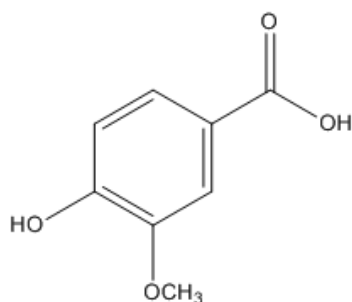
Εικόνα 31 Φερουλικό οξύ

1.5.2.2 Βενζοϊκά οξέα

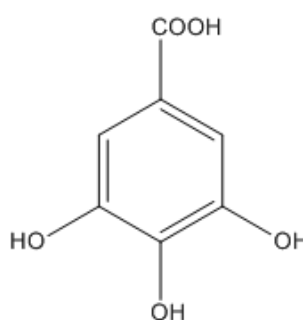
Τα βενζοϊκά οξέα δεν περιέχονται ελεύθερα στο σταφύλι αλλά με τη μορφή σύνθετων χημικών ενώσεων και είναι τα σαλικυλικό (Εικόνα 32), βανιλικό (Εικόνα 33), γαλλικό (Εικόνα 34), γεντισικό οξύ (Εικόνα 35), συριγγικό (Εικόνα 36), πρωτοκατεχικό (Εικόνα 37) και p-υδροξυβενζοϊκό (Εικόνα 38). Τα βενζοϊκά οξέα παρουσιάζονται σε ελεύθερη κατάσταση κατά τη διάρκεια της παλαίωσης των οίνων όπου παρατηρείται και αύξηση της περιεκτικότητάς τους. Αποτελούν επίσης ένα από τα κύρια συστατικά των ταννινών (Σουφλερός, 2000).



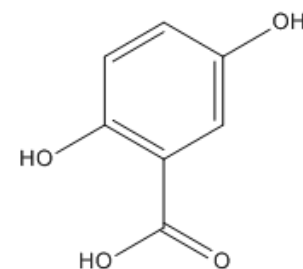
Εικόνα 32 Σαλικυλικό οξύ



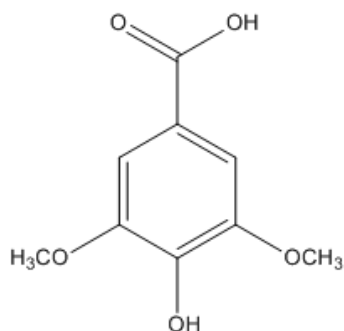
Εικόνα 33 Βανιλικό οξύ



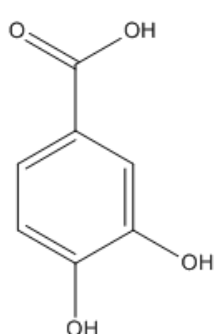
Εικόνα 34 Γαλλικό οξύ



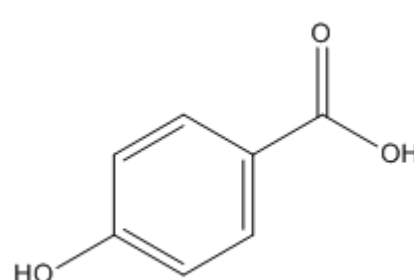
Εικόνα 35 Γεντισικό οξύ



Εικόνα 36 Συριγγικό οξύ



Εικόνα 37 Πρωτοκατεχικό οξύ

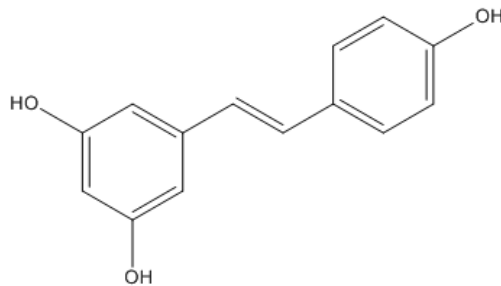


Εικόνα 38 p-υδροξυβενζοϊκό οξύ

1.5.2.3 Στιλβένια

Τα στιλβένια (ρεσβερατρόλη – Εικόνα 39) είναι μια οικογένεια ενώσεων που αποτελούν πιο σύνθετες φαινόλες και το μόριο του στιλβενίου περιέχει δύο βενζοϊκούς δακτυλίους οι οποίοι συνδέονται με ένα αιθάνιο ή ένα αιθυλένιο (Νικολάου, 2008). Η ρεσβερατρόλη εμφανίζεται σε δύο ισομερείς μορφές, την trans- και την cis-, με την trans-ρεσβερατρόλη ή

trans-3,5,4,'-trihydroxystilbene να είναι η μορφή που βρίσκεται σε αφθονία κυρίως στους φλοιούς των σταφυλιών (Kostadinovic *et al.*, 2012). Η ρεσβερατρόλη συντίθεται για αντιμετώπιση της μικροβιακής μόλυνσης και η σύνθεσή της συμβαίνει κατά κύριο λόγο στα κύτταρα του φλοιού, ενώ είναι απύσα ή χαμηλή στη σάρκα των φρούτων (Kallithraka *et al.*, 2001).



Εικόνα 39 Ρεσβερατρόλη

1.5.3 Ταννίνες

Τα πολυμερή των φλαβονοειδών και μη φλαβονοειδών ονομάζονται ταννίνες λόγω της ικανότητάς τους να μαυρίζουν (Jackson, 2008). Ο όρος ταννίνη, περιγράφει το φάσμα πολυφαινολικών ενώσεων που περιλαμβάνουν μονομερή φλαβαν-3-ολών και προανθοκιανιδινών (Downey, Harvey, & Robinson, 2003). Οι ταννίνες είναι παρούσες στους ιστούς των γιγάρτων, των φλοιών και των μίσχων ως ολιγομερή και πολυμερή των υπομονάδων των φλαβαν-3-ολών, (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη, (-)-επιγαλλοκατεχίνη και επικατεχίνη-3-O-gallate (Casassa, Keller, & Harbertson, 2015). Η συνολική περιεκτικότητα σε ταννίνη έχει αναφερθεί ότι είναι σημαντικά υψηλότερη στα γίγαρτα απ' ότι στους φλοιούς, αν και το μήκος των πολυμερών αρκετές φορές είναι χαμηλότερη στα γίγαρτα (Downey *et al.*, 2003)

Οι ταννίνες διαχωρίζονται στις υδρολυόμενες ταννίνες και τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι υδρολυόμενες ταννίνες αποτελούνται από ένα γλυκίδιο πάνω στο οποίο προσκολλώνται διάφορες φαινολικές ενώσεις όπως το γαλλικό οξύ και ελλαγικό οξύ και δεν περιέχονται στο σταφύλι, αλλά είναι δυνατό να περιέχονται σε οίνους αφού αποτελούν τις κύριες εμπορικές ταννίνες που χρησιμοποιούνται στις διάφορες κατεργασίες τους. (Σουφλερός, 2000) Οι ελλαγοταννίνες χαρακτηρίζονται ως υδρολύσιμες συζεύξεις που περιέχουν μία ή

περισσότερες εξαϋδροδιφαινυλ ομάδες, εστεροποιημένες με ένα σάκχαρο, κυρίως γλυκόζη (Lee & Talcott, 2004).

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι φυσικές ταννίνες τόσο στα σταφύλια όσο και στους οίνους και προέρχονται από τον πολυμερισμό της φλαβαν-3-όλης και της φλαβαν-3,4-διόλης. Τα παραπάνω μόρια, δεν είναι ταννίνες, όμως συμπυκνώνονται για να δώσουν ταννίνες. Οι συνηθισμένες φυσικές ταννίνες του σταφυλιού είναι οι φλαβολάνες, οι οποίες είναι ολιγομερή που περιλαμβάνουν 2 – 10 ή 12 στοιχειώδη μόρια (Σουφλερός, 2000). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες έχουν στυφή αίσθηση και δίνουν σταθερότητα χρώματος στον οίνο (Hixson, Bindon, & Smith, 2015).

Στους οίνους υπάρχουν δύο διακριτές διεργασίες οξείδωσης, η ενζυματική και μη ενζυματική. Η αλληλουχία των οξειδωτικών διαδικασιών αρχίζει με οξείδωση των παράγωγων κατεχόλης, όπως το γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ και κατεχίνη, τα οποία είναι εύκολα οξειδώσιμα υποστρώματα στα λευκά κρασιά (Sioumis *et al.*, 2006). Ακολουθεί πολυμερισμός ή συμπύκνωση, συμπλοκοποίηση με αμινο-ενώσεις ή πρωτεΐνες και δευτερογενείς οξειδωτικές αντιδράσεις σχηματίζοντας την κινόνη. Μια τέτοια αντίδραση αμαύρωσης, οδηγεί σε μια αλλαγή στο χρώμα και το άρωμα του χυμού και οδηγεί σε κακής ποιότητας κρασί (Yokotsuka, Shimizu, & Shimizu, 1991).

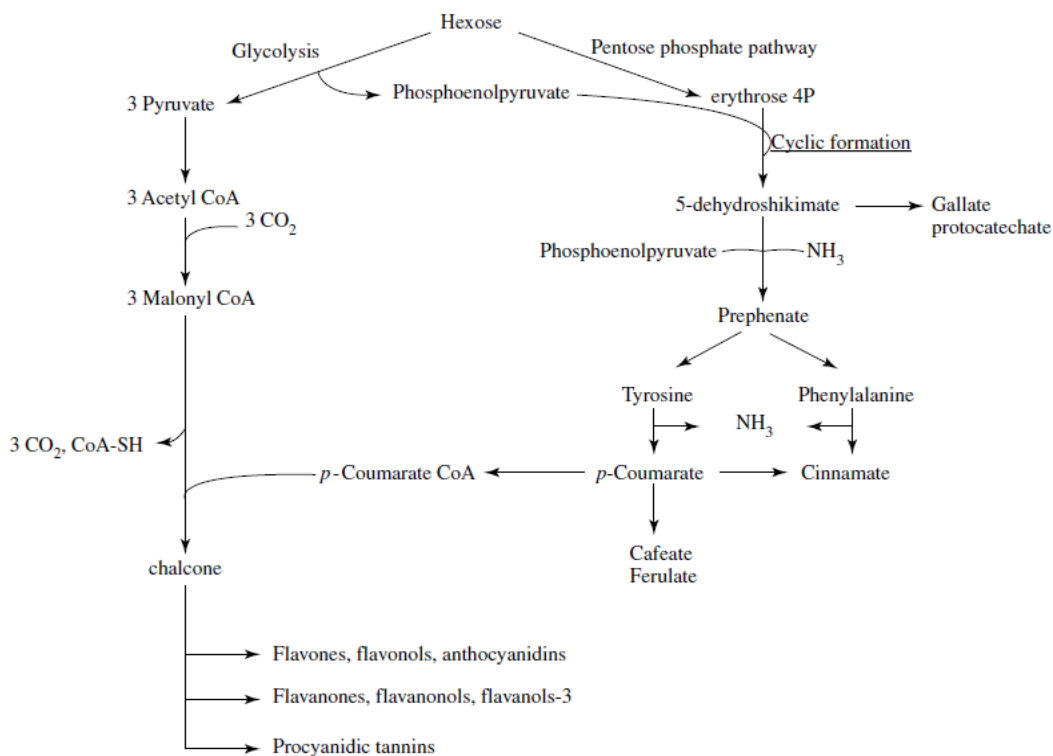
Η σύνθεση των πολυφαινολών προσδιορίζεται με χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC), όμως λόγω των διαφορετικών ποσοτήτων τους είναι δύσκολο να διαχωριστούν χρωματογραφικά και να ανιχνευτούν. Επιπλέον, μπορεί να συνδυαστεί φασματοσκοπία μετά από χημική αντίδραση που περιέχει επιλεκτική ανίχνευση αυτών των ενώσεων (Pascual-Teresa, Santos-Buelga, & Rivas-Gonzalo, 2000). Παρά την πρόοδο της HPLC, της φασματοφωτομετρίας μάζας και του NMR, δεν έχει αναλυθεί η δομή όλων των ταννινών, με τις διμερείς και μερικές τριμερείς προκυανιδίνες να έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a).

1.6 Βιοσύνθεση φαινολικών συστατικών

Η σύνθεση της ράγας του σταφυλιού αλλάζει δραματικά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Kennedy, Matthews, & Waterhouse, 2002). Ένα από τα πιο αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά της ωρίμανσης είναι η ταχεία συσσώρευση φαινολικών χρωστικών, που δίνουν στο κόκκινο

σταφύλι την οινολογική του σπουδαιότητα (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b). Οι φαινολικές ενώσεις του σταφυλιού είναι υπεύθυνες για το χρώμα, το άρωμα, το σώμα και τη δομή των ερυθρών οίνων. Οι ενώσεις αυτές δεν εξελίσσονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των σταφυλιών με τον ίδιο τρόπο όπως τα σάκχαρα, δηλαδή η μέγιστη συγκέντρωσή τους συνήθως δεν συμπίπτει με τη μέγιστη συσσώρευση σακχάρων. (Pérez-Magariño & González-San José, 2006)

Οι φαινολικές ενώσεις συντίθενται στα σταφύλια κατά τη διάρκεια της κανονικής ανάπτυξής τους για την αντιμετώπιση ακραίων συνθηκών (Giovinazzo & Grieco, 2015). Σε γενικές γραμμές, το περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων αυξάνει σε όλη την ωρίμανση των σταφυλιών (Pérez-Magariño & González-San, 2006). Αυτές οι φαινολικές χρωστικές ουσίες είναι δευτερεύοντα προϊόντα του καταβολισμού των σακχάρων (Εικόνα 40) και η σύνθεσή τους είναι άμεσα συνδεδεμένη με την οδό των φωσφορικών πεντοζών. Στην πραγματικότητα, για τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών εμπλέκονται δύο μεταβολικά μονοπάτια. Το μονοπάτι των φαινυλ-προπανοειδών και το μονοπάτι του σικιμικού οξέος που αποτελεί μέρος του πρώτου. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b)



Εικόνα 40 Βιοσυνθετικό μονοπάτι φαινολικών συστατικών (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006b)

1.7 Μεταβολές των φαινολικών συστατικών κατά την ωρίμανση

Η βιοσύνθεση των ανθοκυανινών αρχίζει μόνο όταν η ράγα αρχίζει να ωριμάζει και συνεχίζεται κανονικά σε όλη τη φάση ανάπτυξης (Boss *et al.*, 1996). Η συγκέντρωση των ανθοκυανινών φτάνει στο μέγιστο επίπεδο όταν η ράγα βρίσκεται στο στάδιο ωριμότητας και τα σταφύλια για συγκεκριμένο είδος ποικιλίας έχουν μια μοναδική σύνθεση ανθοκυανινών (Zhu, Zhang, & Lu, 2012).

Οι Downey, Harvey, & Robinson (2003), αναφέρουν ότι κατά τη βιοσύνθεση των ανθοκυανινών τα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση ανθοκυανίνης και ταννίνης, εκφράζονται πριν από τον περκασμό, όταν δεν συντίθενται ανθοκυάνες. Αυτό υποδηλώνει ότι η έκφραση αυτών των γονιδίων, θα μπορούσαν να συσχετίζονται με τη συσσώρευση άλλων φλαβονοειδών προϊόντων, όπως φλαβαν-3-όλες και προανθοκυανιδίνες στον αναπτυσσόμενο καρπό.

Ξεκινώντας από τον περκασμό, οι ανθοκυανίνες συσσωρεύονται στη ράγα των σταφυλιών και συσχετίζονται με την συσσώρευση αυξημένων σακχάρων (Kennedy *et al.*, 2002). Η συσσώρευση ανθοκυανινών ενισχύεται από τη φυτική ορμόνη ABA (αμπισικό οξύ) και καταστέλλεται από συνθετικές αυξίνες, υψηλή θερμοκρασία και χαμηλή ένταση φωτός (Jeong *et al.*, 2004).

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η μαλβιδίνη-3-γλυκοζίτης και τα επίπεδα πεονιδίνης-3-γλυκοζίτης συνήθως αυξάνουν, ενώ οι άλλοι μονογλυκοσίδες ανθοκυανιδινών τείνουν να μειωθούν κατά το τέλος της ωρίμανσης (Jordao, Da Silva, & Laureano, 1998). Αυτό πιθανώς συμβαίνει λόγω του ότι η μαλβιδίνη-3-γλυκοζίτης και η πεονιδίνη-3-γλυκοζίτης είναι τα τελικά προϊόντα της οδού βιοσύνθεσης ανθοκυανινών (Roggero, Coen, & Ragonnet, 1986; Boss, Davies, & Robinson, 1996). Ταυτόχρονα, ακυλιωμένες ανθοκυανίνες τείνουν να αυξάνουν σε όλη την ωρίμανση, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις μειώνουν στο τέλος της διαδικασίας (Gonzalez-San, Santa-Maria, & Diez, 1990; Fernandez-Lopez *et al.*, 1992).

Ο Kennedy (2008), δηλώνει ότι οι ταννίνες και τα υδροξυκιναμωμικά οξέα αυξάνουν μέχρι τον περκασμό. Οι Romeyer, Macheix, & Sapis (1985), χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), μελέτησαν τις μεταβολές στα επίπεδα της κατεχίνης, επικατεχίνης, και διμερή προκυανιδίνης σε γίγαρτα σταφυλιού τεσσάρων

ποικιλιών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Η κατεχίνη και επικατεχίνη έδειξαν κορυφές κοντά στον περκασμό, και τα διμερή προκυανιδίνης B1, B2, και B4 παρουσίασαν αύξηση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των γιγάρτων.

Επιπλέον, σε γενικές γραμμές, έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση της προανθοκυανιδίνης είναι υψηλότερη κατά τον περκασμό. Αργότερα, η συγκέντρωσή της μειώνεται έως ότου κάποια στιγμή λίγο πριν την πλήρη ωρίμανση, να παραμένει σχετικά σταθερή. Ταυτόχρονα, ο μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) της αυξάνει καθ' όλη την ωρίμανση. (Geny *et al.*, 2003; Downey *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2001; Rodríguez-Delgado *et al.*, 2002; González-Manzano, Rivas-Gonzalo, & Santos-Buelga, 2004)

1.8 Σταφύλι, φαινολικά συστατικά και υγεία

Η κατανάλωση των φρούτων παίζει σημαντικό ρόλο ως προστατευτικός παράγοντας της υγείας (Iacopini *et al.*, 2008). Τα σταφύλια είναι μια από τις πιο ευρέως καλλιεργούμενες καλλιέργειες φρούτων σε όλο τον κόσμο, και η σύνθεση και οι ιδιότητές τους ερευνήθηκαν εκτενώς (Πίνακας 3), με αρκετές αναφορές της παρουσίας μεγάλων ποσοτήτων των φαινολικών ενώσεων (Rockenbach *et al.*, 2011). Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες των ενώσεων αυτών ασκούν ευεργετικές επιδράσεις, μειώνοντας το σχηματισμό ελεύθερων ριζών και την πρόληψη οξειδωτικής βλάβης (Setzer, 2011).

Πίνακας 3 Επίδραση στην ανθρώπινη υγεία μερικών φαινολικών ενώσεων από τα σταφύλια

Φαινολική ένωση	Επίδραση
Ρεσβερατρόλη	Απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών Ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων Προστασία κατά της οξειδωσης της μεμβράνης
Κερκετίνη	Αντιβακτηριακή
Κατεχίνη	Αντικαρκινική Απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών Αντιβακτηριακή Αντιφλεγμονώδη Προστασία κατά της οξειδωσης της μεμβράνης

Φλαβανόλη	Απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών
Προκυανιδίνη	Αντικαρκινική Απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών Αντιοξειδωτική Αντιφλεγμονώδη
Ανθοκυανίνη	Αγγειοδιασταλτική Απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών Αντιβακτηριακή Αντιοξειδωτική
Γαλλικό οξύ	Απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών
Επιχατεχίνη	Αντιβακτηριακή

(Xia *et al.*, 2013)

Στις πολυφαινολικές ενώσεις των ερυθρών σταφυλιών στους φλοιούς και τα γίγαρτα, υπάρχουν ορισμένες δευτερεύουσες ενώσεις σημαντικές για την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα: η κατεχίνη και επικατεχίνη (φλαβαν-3-όλες), η κερκετίνη και ο γλυκοζίτης της ρουτίνης (φλαβονόλες), και η trans-ρεσβερατρόλη (στιλβένια). Έχουν αποδειχθεί ότι είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά και έχουν σημαντικές βιολογικές, φαρμακολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Οι 5 αυτές ενώσεις φαίνεται να προστατεύουν την ανθρώπινη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) έναντι της οξείδωσης, πιο αποτελεσματικά από μια α-τοκοφερόλη σε μοριακή βάση, ενεργώντας ως καρδιο-προστατευτικός παράγοντας.

Η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη αναστέλλουν τη συσσώρευση των ανθρωπίνων αιμοπεταλίων *in vitro* και εμφανίζουν δυναμικό για αντικαρκινικές ιδιότητες, η πρώτη με επαγωγή διαφοροποίησης κυττάρων και η δεύτερη, όπως ο γλυκοζίτης της, μέσω αναστολής της πρωτεϊνικής κίνησης της τυροσίνης. Τέλος, η ρεσβερατρόλη είναι σε θέση να μεσολαβήσει για αντιφλεγμονώδεις διεργασίες αναστέλλοντας κυρίως την έκφραση της κυκλοοξυγενάσης-1 και 2 (COX-1 και 2) και τις λειτουργίες της υδροϋπεροξειδάσης. Δείχνει επίσης οιστρογονικές ιδιότητες προς διαφορετικές κυτταρικές σειρές. (Iacopini *et al.*, 2008)

Οι Suarez *et al.* (2007), αναφέρουν ότι τα στιλβένια διαθέτουν αντι-φλεγμονώδη και αντικαρκινική ιδιότητα, αναστέλλουν την οξείδωση ανθρωπίνων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, κι' όλα αυτά συμβάλλουν στον περιορισμό του κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων.

Η *Vitis vinifera* είναι επίσης μια σημαντική πηγή φυτοχημικών όπως το γαλλικό οξύ, η κατεχίνη και η επικατεχίνη γνωστά για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Πολλές είναι οι φυσιολογικές επιδράσεις των φυτοχημικών των σταφυλιών όπως αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιυπερτασικές ιδιότητες. (Krithika *et al.*, 2015)

Οι φαινολικές ενώσεις έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με τη μείωση της αθηροσκλήρωσης, την στεφανιαία καρδιακή νόσο, διάφορες δερματικές διαταραχές (Poudel *et al.*, 2008), ιδιότητες κατά του έλκους, αντιμεταλλαξιόνες, αντιβακτηριακές, αντι-υικές, αντιμυκητιακές ιδιότητες (Datta *et al.*, 2012), ιδιότητες αντι-HIV (Spranger *et al.*, 2008). Οι πολυφαινολικές ενώσεις που προέρχονται από προϊόντα σταφυλιού φαίνεται να συνδέονται με την πρόληψη πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος του Alzheimer και αρκετές μορφές καρκίνου (Villani *et al.*, 2015). Αρκετές μελέτες έχουν τονίσει ότι αυτό συμβαίνει ενδεχομένως από την πρόληψη ενός οξειδωτικού στρες (Datta *et al.*, 2012).

Οι φαινολικές ενώσεις θεωρούνται επίσης ως συντηρητικά εναντίον μικροβίων και της οξείδωσης για τα τρόφιμα (Xia *et al.*, 2013). Οι ανθοκυανίνες, μια από τις μεγάλες ομάδες των χρωστικών ουσιών που ανήκουν στους δευτερεύουσους μεταβολίτες των φλαβονοειδών, έχουν γίνει σημαντικά ως διατροφικά πρόσθετα τροφίμων (Poudel *et al.*, 2008).

Τα γιγάρτα του *Vitis vinifera* περιέχουν 90% προανθοκυανιδίνες που είναι πολυμερή κατεχίνης και το εκχύλισμα των γιγάρτων προανθοκυανιδίνης χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο. Οι προανθοκυανιδίνες είναι ασφαλείς για να καταναλώνονται και είναι γνωστό ότι έχουν ένα ευρύ φάσμα των φαρμακολογικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων. Το εκχύλισμα αυτό έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει αντιβακτηριακή, αντική, αντιμυκητιακή και αντιπαρασιτική ιδιότητα. (Krithika *et al.*, 2015) Αρκετές πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι έχει επίσης αποτέλεσμα στη μείωση της χοληστερόλης, έχει κυτταροτοξική επίδραση στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα, καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, ενισχύει το σχηματισμό του ενδοχονδρικού των οστών με οστεοποίηση και έχει τονωτική δράση για την αγγειογένεση στη δερματική επούλωση των πληγών. Περαιτέρω, η ένωση δεν φαίνεται να επάγει οποιαδήποτε σημαντικά τοξικά αποτελέσματα. (Krithika, Naik, & Pragalyaashree, 2015; Yilmaz & Toledo, 2004)

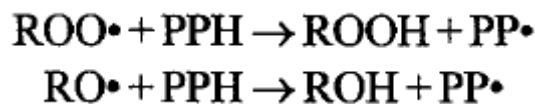
Από την ιδέα του 'γαλλικού παράδοξου', οι πολυφαινόλες από σταφύλια και κόκκινα κρασιά προσέλκυσαν την προσοχή των επιστημόνων να καθορίσουν τη χημική σύνθεσή τους και τις ιδιότητές τους για την υγεία του ανθρώπου (Xia *et al.*, 2013). Η διατροφή των Γάλλων

αποτελεί παράδοξο, αφού με διατροφή υψηλή σε κορεσμένα λιπαρά, παρουσίαζαν χαμηλή θνησιμότητα από στεφανιαία καρδιακή νόσο. Το παράδοξο αυτό μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην υψηλή κατανάλωση ερυθρού κρασιού (Renaud & de Lorgeril, 1992). Ο όρος ‘Γαλλικό Παράδοξο’ φαίνεται να έχει διαδοθεί στις αρχές της δεκαετίας του 1990 (Robertson, 2014).

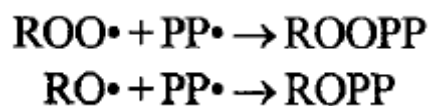
Τέλος, τα σταφύλια είναι πλούσια σε υδατάνθρακες και όχι μια ιδιαίτερα καλή πηγή διαιτητικών ινών. Ωστόσο, είναι μια χρήσιμη πηγή πολλών μετάλλων και βιταμινών Β6, C, E και K (Grainger & Tattersall, 2005).

1.9 Αντιοξειδωτική δράση

Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά δρουν εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες καταλύοντας την οξειδωση των λιπών και άλλων μορίων δίνοντας γρήγορα υδρογόνο στην ελεύθερη ρίζα όπως φαίνεται παρακάτω:



Επιπλέον, η φαινοξυ- ρίζα είναι σχετικά ένα σταθερό ενδιάμεσο, παγιδεύει την ελεύθερη ρίζα και την αποσβάνει. Η ρίζα φαινοξυλίου ενεργεί ενδιάμεσα ως τερματιστής της διάδοσης αντιδράσεων με άλλες ελεύθερες ρίζες:



(Bravo, Sources, & Significance, 2009)

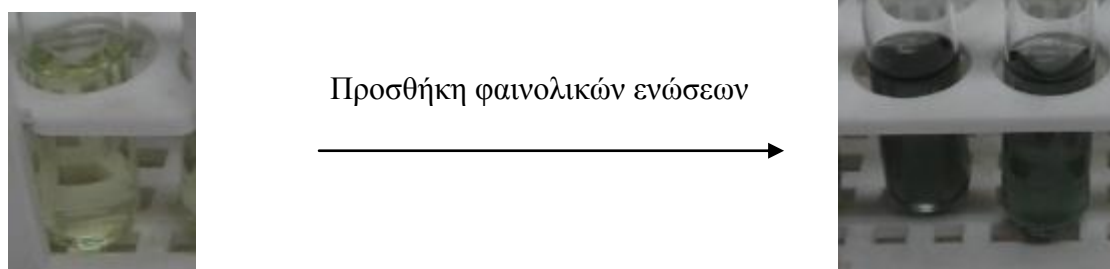
1.10 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικών στο σταφύλι

1.10.1 Μέθοδος προσδιορισμού Folin – Ciocalteu

Οι συνολικές φαινόλες προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο Folin – Ciocalteu (Guendez *et al.*, 2005; Arnous, Makris, & Kefalas, 2002), χρησιμοποιώντας το γαλλικό οξύ (GAE) ως ουσία αναφοράς.

1.10.1.1 Αρχή μεθόδου Folin – Ciocalteu

Όλες οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται μέσα στο κρασί οξειδώνονται με το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu. Το αντιδραστήριο αυτό αποτελεί μίγμα από φωσφοβολφραμικό οξύ ($H_3PW_{12}O_{40}$) και φωσφομολυβδαινικό οξύ ($H_3PMo_{12}O_{40}$), το οποίο μετά από οξείδωση των φαινολών, ανάγεται σε ένα μίγμα μπλε οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και μολυβδαίνιου (Mo_8O_{23}). Το μπλε χρώμα (Εικόνα 41) που παράγεται έχει ένα μέγιστο απορρόφησης στην περιοχή των 750 nm και η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη με τη συνολική ποσότητα των φαινολικών ενώσεων (OIV, 2009).



Αντιδραστήριο
Folin – Ciocalteu

Προϊόν

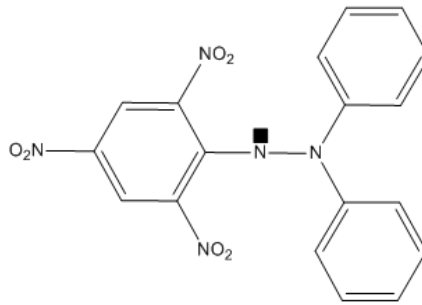
Εικόνα 41 Αρχή μεθόδου Folin – Ciocalteu

1.10.2 Μέθοδος προσδιορισμού DPPH

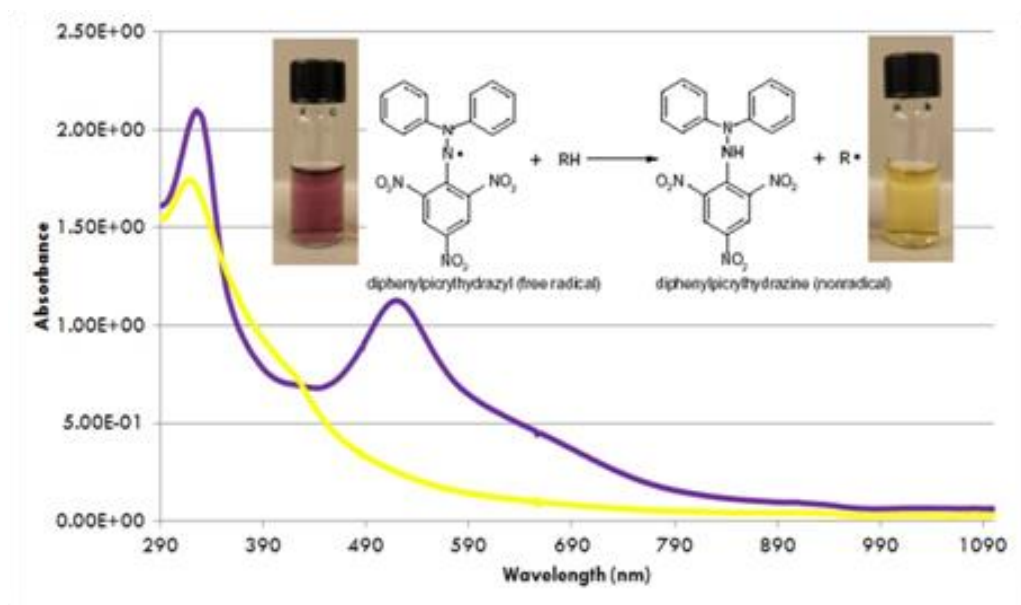
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των οίνων προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο που αναφέρουν οι Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995), Guendez *et al.*, (2005), Arnous, Makris, & Kefalas, (2002) και Li *et al.* (2009), χρησιμοποιώντας το trolox ως πρότυπη ουσία αναφοράς.

1.10.2.1 Αρχή μεθόδου DPPH

Η αρχή της μεθόδου είναι βασισμένη στη θεωρία ότι τα αντιοξειδωτικά δίνουν το υδρογόνο του φαινολικού υδροξυλίου στην ελεύθερη ρίζα 1,1 – διφαινυλ – 2 – πικρυδραζυλίου (DPPH), καταναλώνοντας τη ρίζα (Εικόνα 42) (Lewis, 2012). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος της ρίζας DPPH που από έντονο βιολετί μετατρέπεται σε κίτρινο στην πλήρη κατανάλωση της ρίζας από τα αντιοξειδωτικά (Εικόνα 43).



Εικόνα 42 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζολίου (DPPH)



Εικόνα 43 Μέθοδος DPPH

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Το πείραμα

Το πείραμα διεξήχθη με σκοπό το χαρακτηρισμό σταφυλιών από τις κυπριακές γηγενείς ποικιλίες, Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι, όσο αφορά το αντιοξειδωτικό τους περιεχόμενο, καθώς απαιτείται ενδελεχή έρευνα και ανάλυση. Επίσης, τα σταφύλια από τις γηγενείς κυπριακές ποικιλίες, Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι, δεν έχουν διερευνηθεί μέχρι στιγμής ως προς το αντιοξειδωτικό τους περιεχόμενο σε φλοιούς και γίγαρτα.

Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν 5 περιοχές της Κύπρου για κάθε ποικιλία. Για την ποικιλία Μαραθεύτικο επιλέχθηκαν οι περιοχές: Μαλλιά, Κυπερούντα, Όμοδος που βρίσκονται στην επαρχία Λεμεσού και Στρουμπί, Βουνί Παναγιάς που βρίσκονται στην επαρχία Πάφου. Για την ποικιλία Ξυνιστέρι επιλέχθηκαν οι περιοχές: Μαλλιά, Πάχνα, Όμοδος (επαρχία Λεμεσού) και Στρουμπί, Βουνί Παναγιάς (επαρχία Πάφου). Η δειγματοληψία έγινε από διάφορες περιοχές του αμπελώνα και από διάφορα μέρη του πρέμνου.

2.2 Υλικά

Folin – Ciocalteu, γαλλικό οξύ 100%, ακετονιτρώλιο 99,9%, HCl 37%, NaCl 99,8%, DPPH 95%, trolox 95%, NaOH 99%, ακετόνη $\geq 99\%$, (+) catechin hydrate $>98\%$, TEA $\geq 99\%$, αλβουμίνη $\geq 98\%$ τα οποία αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich, μεθανόλη HPLC 99,8% από την εταιρεία SDS Vortte Partenaire Chimie, Na_2CO_3 $\geq 99\%$ από την εταιρεία Fluka, SDS 85%, οξικός αιθυλεστέρας 99,5%, τρυγικό οξύ, αιθανόλη 99,8% από την εταιρεία Merck, FeCl_3 96% από την εταιρεία BDH Chemicals, μαλβιδίνη 100% από την εταιρεία Polyphenols Laboratories, χλωροφόρμιο 99,9% και φορμικό οξύ 85% από την εταιρεία Scharlau, οξικό οξύ 99,83% από την εταιρεία Fisher Scientific και χρησιμοποιήθηκαν ως έχουν και απιονισμένο νερό.

Τα δείγματα των σταφυλιών καθώς και η ημερομηνία συγκομιδής φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4 Δείγματα σταφυλιών (Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι)

Αριθμός	Ποικιλία	Περιοχή	Υψόμετρο (m)	Κωδικός
1	Μαραθεύτικο	Κυπερούντα	1200	ΚΜ (09-10-16)
2	Μαραθεύτικο	Μαλλιά	650	ΜΜ (27-09-13)
3	Μαραθεύτικο	Βουνί Παναγιάς	1000	ΒΠΜ (21-09-16)
4	Μαραθεύτικο	Στρουμπί	450	ΣΜ (26-09-16)
5	Μαραθεύτικο	Όμοδος	745	ΟΜ (04-10-16)
6	Ξυνιστέρι	Πάχνα	745	ΠΞ (30-08-16)
7	Ξυνιστέρι	Μαλλιά	650	ΜΞ (30-08-16)
8	Ξυνιστέρι	Βουνί Παναγιάς	1000	ΒΠΞ (21-09-16)
9	Ξυνιστέρι	Στρουμπί	450	ΣΞ (26-09-16)
10	Ξυνιστέρι	Όμοδος	745	ΟΞ (04-10-16)

2.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τις αναλύσεις, μετρήθηκαν 100 ράγες και ζυγίστηκαν. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη για μια μέρα. Στη συνέχεια, αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου ξεπαγώσουν και έγινε αποφλοιώση των ραγών, συλλογή και διαχωρισμός των φλοιών και των γιγάρτων και αποθήκευσή τους ξεχωριστά στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Οι φλοιοί και τα γιγάρτα λυοφυλιώθηκαν και κορνιοτοποιήθηκαν στο blender μέχρι να γίνουν σκόνη.

Σε falcon των 50 ml προστέθηκαν 3 g σκόνης φλοιών/ γιγάρτων και έγιναν διαδοχικά δύο εκχυλίσεις. Κατά την πρώτη εκχύλιση προστέθηκαν 25 mL 80/20 ακετόνη/νερό (προσθήκη αζώτου για αποφυγή οξειδωσης) και παραμένει στο shaker (200 rpm/ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) για 3 ώρες. Έγινε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 8000 στροφές στους $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και συλλέχθηκε το εκχύλισμα (A).

Στη συνέχεια, ακολούθησε η δεύτερη εκχύλιση. Στην σκόνη των φλοιών/ γιγάρτων προστέθηκαν 25 mL του δεύτερου διαλύτη 60/40 μεθανόλη/νερό, με προσθήκη αζώτου και τα δείγματα παρέμειναν στο shaker (200 rpm/ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) για 2.5 ώρες. Έγινε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 8000 στροφές στους $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και συλλέχθηκε το εκχύλισμα (B).

Τα εκχυλίσματα (A+B) αναμιγνύθηκαν και συμπυκνώθηκαν σε Rotary Evaporator μέχρι να φύγουν οι διαλύτες (περίπου 40 λεπτά μέχρι 2 ώρες στους $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, ανάλογα με το δείγμα). Το διάλυμα που προέκυψε μεταγγίστηκε σε vial (του οποίου είχε μετρηθεί το βάρος με το καπάκι), προστέθηκε λίγο H_2O , παρέμειναν στην κατάψυξη για μια μέρα και λυοφυλιώθηκαν μέχρι ξηρού για να προκύψει το crude extract. Έπειτα, ζυγίστηκε το βάρος του vial με το καπάκι για να προσδιορίσουμε το ξηρό βάρος των εκχυλισμάτων. Για όλες τις αναλύσεις, από κάθε falcon χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα.

2.4 Αναλύσεις σε φλοιούς

2.4.1 Μέτρηση Folin – Ciocalteu σε φλοιούς

2.4.1.1 Προετοιμασία αντιδραστηρίων

- Model Solution: Σε ποτήρι ζέσεως διαλύθηκαν 1.25 g τρυγικού οξέος σε λίγο απιονισμένο νερό. Ακολούθησε διόρθωση του pH στο 3.5 (με NaOH 1M) και

μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL. Έγινε προσθήκη 30 mL αιθανόλης και αραιώθηκαν σε όγκο με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε ανάδευση.

- Διάλυμα γαλλικού οξέος (1 mg/L): Σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL, διαλύθηκαν 0.05 g ξηρού γαλλικού οξέος με την προσθήκη 5 mL αιθανόλης και αραιώθηκαν σε όγκο με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση.
- Διάλυμα Na₂CO₃ 20%: Σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL μεταφέρθηκαν 50 g Na₂CO₃ και αραιώθηκαν σε όγκο με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε ανάδευση.
- Διάλυμα 10% EtOH/H₂O: Σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL, μεταφέρθηκαν 25 mL αιθανόλης και αραιώθηκαν σε όγκο με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε ανάδευση.
- Αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu: Χρησιμοποιήθηκε έτοιμο το αντιδραστήριο.

2.4.1.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την παρασκευή μιας πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος.

Σε ογκομετρική φιάλη των 50.0 mL προστέθηκαν 0.0500 g ξηρού γαλλικού οξέος, προστέθηκαν 5.0 mL αιθανόλης ώστε να διαλυθεί το γαλλικό οξύ και αραιώθηκαν σε όγκο με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε έντονη ανάδευση. Έτσι παρασκευάστηκε το πυκνό διάλυμα γαλλικού οξέος.

Από το πυκνό διάλυμα γαλλικού οξέος, πάρθηκαν 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00, 3.50, 4.00, 4.50 και 5.00 mL του παραπάνω διαλύματος γαλλικού οξέος (1 mg/L), σε ογκομετρικές φιάλες των 10.0 mL και αραιώθηκαν σε όγκο με διάλυμα 10% EtOH/H₂O. Από αυτά τα πρότυπα αραιωμένα διαλύματα γαλλικού οξέος, ελήφθησαν με πιπέττα 100.0 μL και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, προστέθηκαν 500 μL Folin- Ciocalteu, 780 μL απιονισμένο H₂O, αναμειγνύονται και μετά από ένα λεπτό προσθήκη 1500 μL Na₂CO₃ 20%. Ανάδευση των διαλυμάτων σε vortex. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες παρέμειναν στο σκότος για 60 λεπτά ώστε να γίνει η αντίδραση. Μετρήθηκε η απορρόφηση στο Tecan στα 750 nm. (Τυφλό: στη θέση του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 100 μL 10% EtOH/H₂O)

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, έγινε πρώτα ο υπολογισμός των mg γαλλικού οξέος που υπάρχουν στα πρότυπα διαλύματα. Έτσι λοιπόν, για τα πρότυπα διαλύματα 0.50,

1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00, 3.50, 4.00, 4.50 και 5.00 mL γαλλικού οξέος, υπολογίστηκαν ότι υπάρχουν 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00, 3.50, 4.00, 4.50 και 5.00 mg/L γαλλικού οξέος αντίστοιχα. Κατασκευάστηκε λοιπόν η πρότυπη καμπύλη από το διάγραμμα απορρόφησης στα 750 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (GAE – mg/L) σε κυψελίδα 96-wells στο Tecan.

2.4.1.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τα ολικά φαινολικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin- Ciocalteu. Από το crude extract που προέκυψε από τους φλοιούς, διαλύθηκε 5.00 g/L crude extract φλοιών σε Model Solution (12% αιθανόλη, 5 g/L τρυγικό οξύ, pH 3.5) που αποτέλεσε το μετρούμενο δείγμα για παρακάτω.

Για την εφαρμογή της μεθόδου, σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 100 μ L αραιωμένου δείγματος, 500 μ L Folin- Ciocalteu, 780 μ L απιονισμένο H_2O , αναμειγνύονται και μετά από ένα λεπτό προσθήκη 1500 μ L Na_2CO_3 20%. Ανάδευση των διαλυμάτων σε vortex και παρέμειναν στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 750 nm. (Τυφλό: στη θέση του δείγματος χρησιμοποιούμε 100 μ L Model Solution)

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών έγινε μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος επί την αραιώση (Ολικά φαινολικά = C x αραιώση mg/L γαλλικού οξέος). Το τελικό αποτέλεσμα εκφράστηκαν σε mg GAE/g βάρους νωπών φλοιών.

2.4.2 Μέτρηση DPPH σε φλοιούς

2.4.2.1 Προετοιμασία αντιδραστηρίων

- Model Solution: Σε ποτήρι ζέσεως διαλύθηκαν 1.25 g τρυγικού οξέος σε λίγο απιονισμένο νερό. Ακολούθησε διόρθωση του pH στο 3.5 (με NaOH 1M) και μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL. Έγινε προσθήκη 30.0 mL αιθανόλης και αραιώθηκαν σε όγκο με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε ανάδευση.
- Διάλυμα trolox (2.00 mM): Σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL, μεταφέρθηκαν 12.5 mg ξηρού trolox και αραιώθηκαν σε όγκο με 100% αιθανόλη. Ακολούθησε ανάδευση.
- Διάλυμα DPPH (3.68×10^{-4} M): Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL διαλύθηκαν 0.10001 g ξηρού DPPH και αραιώθηκαν σε όγκο με μεθανόλη. Ακολούθησε έντονη

ανάδευση. Στη συνέχεια 1.45 mL από το πυκνό διάλυμα μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώθηκαν σε όγκο με μεθανόλη. Έγινε μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος για $t_0 = 0$, στα 515 nm με Tecan.

2.4.2.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα trolox.

Σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL, μεταφέρθηκαν 12.50 mg ξηρού trolox και αραιώθηκαν σε όγκο με 100% αιθανόλη. Ακολούθησε ανάδευση. Έτσι παρασκευάστηκε το πυκνό διάλυμα trolox.

Από το πυκνό διάλυμα trolox, μεταφέρθηκαν 0.000, 0.400, 0.800, 0.100, 0.200, 0.300, 0.400, 0.500, 0.625, 0.750, 0.875 και 1.000 mL του παραπάνω διαλύματος trolox (2.00 mM), σε erpendorfs του 1 mL και αραιώθηκαν σε όγκο με αιθανόλη. Από αυτά τα πρότυπα αραιωμένα διαλύματα trolox, ελήφθησαν με πιπέττα 50.00 μ L και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, προστέθηκαν 1950 μ L DPPH 3.68×10^{-4} M, έγινε ανάδευση των διαλυμάτων σε vortex και επώασή τους στο σκοτός για μισή ώρα. Μετρήθηκε η απορρόφηση στο Tecan στα 515 nm.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, έγινε πρώτα ο υπολογισμός των mM trolox που υπάρχουν στα πρότυπα διαλύματα. Έτσι λοιπόν, για τα πρότυπα διαλύματα 0, 0.400, 0.800, 0.100, 0.200, 0.300, 0.400, 0.500, 0.625, 0.750, 0.875 και 1 mL trolox υπολογίστηκαν ότι υπάρχουν 0, 0.0800, 0.160, 0.200, 0.400, 0.600, 0.800, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 και 2.00 mM trolox αντίστοιχα. Κατασκευάστηκε λοιπόν η πρότυπη καμπύλη από το διάγραμμα απορρόφησης στα 515 nm στο Tecan συναρτήσει της % ΔA που βρίσκεται σύμφωνα με τον τύπο (Εξίσωση 1):

$$\% \Delta A_{515} = [(A_{DPPH} - A_{ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}) / A_{DPPH}] * 100, \quad (\text{Εξίσωση 1})$$

όπου ΔA είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα.

2.4.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η αντιοξειδωτική ικανότητα μετριέται με τη μέθοδο DPPH. Από το crude extract που προέκυψε από τους φλοιούς, διαλύθηκε 5.00 g/L crude extract φλοιών σε Model Solution

(12% αιθανόλη, 5 g/L τρυγικό οξύ, pH 3.5) που αποτέλεσε το μετρούμενο δείγμα για παρακάτω.

Για την εφαρμογή της μεθόδου παρασκευάστηκε διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης ελεύθερης ρίζας DPPH, σε μεθανόλη (3.68×10^{-4} M) και μετρήθηκε η απορρόφησή του στα 515 nm ($t=0$). Σε 50.0 μ L αραιωμένου δείγματος (1:5) προστέθηκαν 1950 μ L DPPH, έγινε ανάδευση των διαλυμάτων σε vortex και επώασή τους στο σκοτάδι για μισή ώρα. Μετράται η απορρόφηση στο Tecan στα 515 nm.

Σύμφωνα με την Εξίσωση 1, υπολογίστηκε η % ΔΑ για τις απορροφήσεις των δειγμάτων, όπου ΔΑ είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα. Επιπλέον, από την πρότυπη καμπύλη, τα αποτελέσματα της % ΔΑ των δειγμάτων εκφράστηκαν σε mg/L trolox και ανάχθηκαν σε mmole trolox/g βάρους νωπών φλοιών.

2.4.3 Προσδιορισμός ανθοκυανινών με HPLC

2.4.3.1 Προετοιμασία κινητής και στατικής φάσης

- Κινητή φάση A: Σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, μεταφέρθηκαν 100.0 mL φορμικό οξύ, 30.0 mL ακετονυτρίλιο και αραιώθηκαν σε όγκο με απιονισμένο νερό. Έγινε ανάδευση και φιλτράρισμα με φίλτρο HPLC για να απομακρυνθούν οι φυτσαλίδες.
- Κινητή φάση B: Σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, μεταφέρθηκαν 100.0 mL φορμικό οξύ, 500.0 mL ακετονυτρίλιο και αραιώθηκαν σε όγκο με απιονισμένο νερό. Έγινε ανάδευση και φιλτράρισμα με φίλτρο HPLC για να απομακρυνθούν οι φυτσαλίδες.

2.4.3.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα μαλβιδίνης. Έγιναν δύο πρότυπες καμπύλες, ώστε να καλύπτονται οι μικρότερες και μεγαλύτερες τιμές των δειγμάτων.

Σε ογκομετρική φιάλη του 1.00 mL, προστέθηκαν 0.00224 g ξηρής μαλβιδίνης και αραιώθηκαν με μεθανόλη. Ακολούθησε ανάδευση. Έτσι παρασκευάζεται το πυκνό διάλυμα μαλβιδίνης (2240 mg/L).

- **Καμπύλη για χαμηλές τιμές**

Από το πυκνό διάλυμα μαλβιδίνης (2240 mg/L) πήραμε 1.00, 5.00, 10.0, 18.0, 27.0 και 36.0 μL και αραιώθηκαν στα 1500 μL με μεθανόλη 0.1% HCl. Τα αραιωμένα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε vial και έγινε ανάλυση στην HPLC με το πρόγραμμα προσδιορισμού ανθοκυανών όπως περιγράφεται παρακάτω.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, έγινε πρώτα ο υπολογισμός των mg μαλβιδίνης που υπάρχουν στα πρότυπα διαλύματα. Έτσι λοιπόν, για τα πρότυπα διαλύματα 1.00, 5.00, 10.00, 18.0, 27.0 και 36.0 μL πυκνού διαλύματος μαλβιδίνης, υπολογίστηκαν ότι υπάρχουν 1.49, 4.48, 7.47, 14.9, 26.9, 40.3 και 53.8 mg/L μαλβιδίνης αντίστοιχα. Κατασκευάστηκε λοιπόν η πρότυπη καμπύλη από το ολοκλήρωμα της απορρόφησης στα 520 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης μαλβιδίνης (mg/L).

- **Καμπύλη για υψηλές τιμές**

Από το πυκνό διάλυμα μαλβιδίνης (2240 mg/L) πήραμε 3.60, 5.00, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 και 50.0 μL και αραιώθηκαν σε όγκο στα 150 μL μεθανόλης 0.1% HCl. Οι αραιώσεις τοποθετήθηκαν σε vial και έγινε ανάλυση στην HPLC με το πρόγραμμα προσδιορισμού ανθοκυανών όπως περιγράφεται παρακάτω.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, έγινε πρώτα ο υπολογισμός των mg μαλβιδίνης που υπάρχουν στα πρότυπα διαλύματα. Έτσι λοιπόν, για τα πρότυπα διαλύματα 3.60, 5.00, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 και 50.0 μL πυκνού διαλύματος μαλβιδίνης, υπολογίστηκαν ότι υπάρχουν 53.8, 74.7, 149, 299, 448, 593 και 747 mg/L μαλβιδίνης αντίστοιχα. Κατασκευάστηκε λοιπόν η πρότυπη καμπύλη από το ολοκλήρωμα της απορρόφησης στα 520 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης μαλβιδίνης (mg/L).

2.4.3.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την εκχύλιση των ανθοκυανών χρησιμοποιήθηκαν λυοφυλιωμένοι φλοιοί (το 1/10 που αντιστοιχεί στις 100 ράγες), κορνιοτοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε falcon. Έγινε προσθήκη 12.0 ml διαλύματος οξινισμένης μεθανόλης 0,1% HCl (Kallithraka *et al.*, 2005). Ακολούθησε παραμονή του διαλύματος σε shaker (120 rpm/ 4 °C (Heredia *et al.*, 1998; Gris *et al.*, 2007; Aguirre *et al.*, 2010) για 12 ώρες σε πλήρως σκότος. Έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4400 στροφές στους 20 °C (PoudeI *et al.*, 2008), συλλέχθηκε το υπερκείμενο σε vial και το δείγμα τοποθετήθηκε στην κατάψυξη. Στο ίζημα προστέθηκαν 12.0 ml μεθανόλης

0,1% HCl και έγινε εφαρμογή της διαδικασίας εκχυλίσεων και φυγοκεντρήσεων για ακόμα 2 φορές. Όλα τα εκχυλίσματα που προέκυψαν τοποθετήθηκαν στο αρχικό vial και καταψύχθηκαν. Από το εκχύλισμα, λήφθηκαν 1.50 mL, φιλτράρονται με φίλτρα PTFE 0.45 μm για την παραλαβή ομογενούς διαλύματος με την απομάκρυνση όλων των στερεών υπολειμμάτων που μπορεί να επηρέαζαν αρνητικά τόσο τη χρωματογραφική στήλη, όσο και τα αποτελέσματα των μετρήσεων και έγινε ανάλυση στην HPLC με το πρόγραμμα προσδιορισμού ανθοκυανών (Oeno, 2007). Η πρότυπη καμπύλη έγινε με τα πρότυπα διαλύματα της μαλβιδίνης (mg/L).

2.4.3.4 Πρόγραμμα διαλυτών

Για την ανάλυση των ανθοκυανών στα τελικά διηθημένα δείγματα χρησιμοποιείται το σύστημα υγρής χρωματογραφίας HPLC με ανιχνευτή UV στα 520 nm (Kallithraka *et al.*, 2005), με χρωματογραφική στήλη Waters Spherisorb 4.6 mm x 250 mm με μέγεθος σωματιδίων 5 μm, αντλία και εκχυτήρα. Ο όγκος έκχυσης δείγματος ήταν 20.0 μL και ο διαχωρισμός είχε διάρκεια 45 min. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 40 °C. Το πρόγραμμα μεταβλητής σύστασης της κινητής φάσης φαίνεται στον Πίνακα 5 (Oeno, 2007).

Πίνακας 5 Πρόγραμμα διαλυτών

Χρόνος (min)	Κινητή φάση A % (v/v)	Κινητή φάση B % (v/v)
0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	40	60
41	94	6

(Oeno, 2007)

2.5 Αναλύσεις σε γίγαρτα

2.5.1 Μέτρηση Folin – Ciocalteu σε γίγαρτα

2.5.1.1 Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, είναι τα ίδια με αυτά που έγιναν για την μέτρηση Folin – Ciocalteu στους φλοιούς (βλέπε 2.4.1.1.).

2.5.1.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, είναι η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση Folin – Ciocalteu στους φλοιούς (βλέπε 2.4.1.2.).

2.5.1.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τα ολικά φαινολικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin- Ciocalteu. Από το crude extract που προέκυψε από τα γιγάρτα, διαλύθηκε 2.00 g/L crude extract γιγάρτων σε Model Solution (12% αιθανόλη, 5 g/L τρυγικό οξύ, pH 3.5) που αποτέλεσε το μετρούμενο δείγμα για παρακάτω. (Για το ΣΜ χρησιμοποιήθηκαν γιγάρτα από 200 ράγες λόγω ανισορραγίας που παρουσιάζει το Μαραθεύτικο).

Για την εφαρμογή της μεθόδου, σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 50.0 μL αραιωμένου δείγματος, 500 μL Folin- Ciocalteu, 780 μL απιονισμένο H₂O, αναμειγνύονται και μετά από ένα λεπτό προστέθηκαν 1500 μL Na₂CO₃ 20%. Ακολούθησε ανάδευση των διαλυμάτων σε vortex και παραμονή στο σκοτός για 60 λεπτά. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 750 nm. (Τυφλό: στη θέση του δείγματος χρησιμοποιούμε 50 μL Model Solution)

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών έγινε μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος επί την αραιώση (Ολικά φαινολικά = C x αραιώση mg/L γαλλικού οξέος). Το τελικό αποτέλεσμα εκφράστηκε σε mg GAE/g βάρους νωπών γιγάρτων.

2.5.2 Μέτρηση DPPH σε γιγάρτα

2.5.2.1 Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, είναι τα ίδια με αυτά που έγιναν για την μέτρηση DPPH στους φλοιούς (βλέπε 2.4.2.1.).

2.5.2.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, είναι η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση DPPH στους φλοιούς (βλέπε 2.4.2.2.).

2.5.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Από το crude extract που προκύπτει από τα γίγαρτα, διαλύθηκαν 2.00 g/L crude extract φλοιών σε Model Solution (12% αιθανόλη, 5 g/L τρυγικό οξύ, pH 3.5) που αποτέλεσε το μετρούμενο δείγμα για παρακάτω.

Για την εφαρμογή της μεθόδου παρασκευάστηκε διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης ελεύθερης ρίζας DPPH, σε μεθανόλη (3.68×10^{-4} M) και μετρήθηκε η απορρόφησή του στα 515 nm ($t=0$). Σε 50.0 μ L αραιωμένου δείγματος (1:10) προστίθενται 1950 μ L DPPH, έγινε ανάδευση των διαλυμάτων σε vortex και επώασή τους στο σκότος για μισή ώρα. Μετράται η απορρόφηση στο Tecan στα 515 nm.

Σύμφωνα με την Εξίσωση 1:

$$\% \Delta A_{515} = [(A_{DPPH} - A_{ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}) / A_{DPPH}] * 100,$$

υπολογίστηκε η % ΔA για τις απορροφήσεις των δειγμάτων, όπου ΔA είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα. Επιπλέον, από την πρότυπη καμπύλη, τα αποτελέσματα της % ΔA των δειγμάτων εκφράστηκαν σε mg/L trolox και ανάχθηκαν σε mmole trolox/g βάρους νωπών γιγάρτων.

2.5.3 Προσδιορισμός ταννινών – Μέθοδος BSA στα γίγαρτα

2.5.3.1 Προετοιμασία διαλυμάτων

- Διάλυμα 5% EtOH/H₂O: Σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL μεταφέρθηκαν 12.5 mL αιθανόλης και αραιώθηκαν σε όγκο με απιονισμένο νερό.
- Model Solution: Σε ποτήρι ζέσεως διαλύθηκαν 1.25 g τρυγικού οξέος σε λίγο απιονισμένο νερό. Ακολούθησε διόρθωση του pH στο 3.5 (με NaOH 1M) και μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL. Έγινε προσθήκη 30.0 mL αιθανόλης και αραιώθηκαν σε όγκο με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε ανάδευση.
- Buffer A (200 mM οξικό οξύ, 170 mM NaCl, pH 4.9): Σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο υπήρχαν περίπου 150 mL απιονισμένο νερό, προστέθηκαν 2.40 g οξικό οξύ και 1.98 g NaCl και έγινε ανάδευση μέχρι να διαλυθούν. Έγινε διόρθωση του pH στο 4.9 (με NaOH 1M). Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml και συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό.
- Buffer B (5% w/v τριαιθοναλαμίνη – TEA, 5% w/v Sodium Dodecyl Sulfate – SDS, pH 9,4): Σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο υπήρχε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού,

προστέθηκαν 5.00 mL TEA, 5.00 g SDS και έγινε ανάδευση μέχρι να διαλυθούν. Έγινε διόρθωση του pH στο 9.4 (με HCl 0.01M). Το διάλυμα αφρίζει, παρέμεινε μια μέρα, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό.

- Πρωτεϊνικό διάλυμα Bovine Serum Albumin (BSA-fraction V): διάλυμα A με BSA 1.00 g/L. Σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιείχε μικρή ποσότητα διαλύματος A, προστέθηκαν σιγά-σιγά 100 mg BSA για να μπορέσει να διαλυθεί πιο εύκολα, αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί. Μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL που συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με διάλυμα A.
- Διάλυμα FeCl₃ (10.0 mM FeCl₃ σε HCl 0.01M): Σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL η οποία περιείχε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού, προστέθηκαν 33 μL HCl 6M, 324 mg FeCl₃, έγινε ανάδευση μέχρι να διαλυθούν και συμπληρώθηκε ο όγκος με απιονισμένο νερό.
- Μητρικό διάλυμα κατεχίνης 1.00 g/L: Σε ποτήρι ζέσεως, στο οποίο υπήρχε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού, προστέθηκαν 5.00 mL αιθανόλη, 50.0 mg κατεχίνης και έγινε ανάδευση μέχρι να διαλυθούν. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και συμπληρώθηκε ο όγκος με απιονισμένο νερό.

2.5.3.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κατεχίνης, που κυμαίνονται από 25 έως 300 mg/L κατεχίνη. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία της καμπύλης φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6 Πρότυπα διαλύματα κατεχίνης.

α/α	Πρότυπο διάλυμα 1.00 g/L κατεχίνης (μL)	Διάλυμα TEA – SDS (μL)	Διάλυμα FeCl ₃ (μL)
25	25	850	125
50	50	825	125
100	100	775	125
150	150	725	125
200	200	675	125
250	250	625	125
300	300	575	125

Τα διαλύματα που δημιουργήθηκαν, αναδεύονται (vortex) και παραμένουν κλειστά, σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Καταγράφονται οι απορροφήσεις στα 510 nm με UV/VIS Spectrometer (PerkinElmer precisely Lambda 25) σε κυψελίδα πλαστική μικρής στένωσης (1mm). Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με το διάλυμα TEA – SDS. Έπειτα προστέθηκαν στο δείγμα 125 μL διαλύματος FeCl_3 και μετά το πέρας 10 λεπτών μετρήθηκε ξανά η απορρόφηση (A2) στα 510 nm.

Από την καμπύλη αναφοράς βρίσκουμε τη συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη διαφορά των απορροφήσεων.

2.5.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Σε δοκιμαστικό σωλήνα, μεταφέρθηκαν 0.4 g crude extract γιγάρτων και προστέθηκαν 10 mL 5% EtOH/H₂O και έγινε ανάδευση του δείγματος σε vortex. Έγιναν διαδοχικές εκχυλίσεις.

A. Η πρώτη εκχύλιση έγινε με χλωροφόρμιο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές. Προστέθηκαν 10 mL χλωροφόρμιο και αφού αναδεύεται έντονα, φυγοκεντράται στις 4400 rpm για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρωση, έγινε λήψη του υπερκείμενου διαλύματος και το χλωροφόρμιο απορρίπτεται. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία άλλες δύο φορές κρατώντας το υπερκείμενο μετά την τελευταία εκχύλιση.

B. Στο υπερκείμενο που κρατήθηκε, έγινε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα 3 φορές. Το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε διαχωριστική χοάνη και προστέθηκαν 10 mL οξικού αιθυλεστέρα και αφού αναδεύτηκε αρκετές φορές, το μίγμα παρέμεινε σε ηρεμία έως ότου διαχωριστούν οι δύο φάσεις (οργανική και υδατική φάση). Έγινε λήψη της υπερκείμενης οργανικής φάσης σε falcon των 50 mL και στην εναπομείναν επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία 2 φορές.

Οι φάσεις του οξικού αιθυλεστέρα συγκεντρώθηκαν σε falcon των 50 mL και η υπερκείμενη μετά την τελευταία εκχύλιση σε ένα άλλο falcon των 50 mL.

Τα 30 mL του οξικού αιθυλεστέρα συμπυκνώθηκαν σε Rotary Evaporator αφού προστάθηκαν 1 – 2 mL απιονισμένου νερού.

Τόσο η υδατική, όσο και η οργανική φάση, λυοφυλιώθηκαν μέχρι ξηρού επί 2 ημέρες. (Pappas *et al.*, 2015; Chira *et al.*, 2009) Από τη σκόνη που προκύπτει από την λυοφυλίωση,

δημιουργήθηκαν διαλύματα 2 g/L σε Model Solution (12% αιθανόλη, 5 g/L τρυγικό οξύ, pH 3,5).

Το οργανικό και υδατικό κλάσμα που περιέχει ολιγομερείς – μονομερείς προανθοκυανιδίνες και πολυμερείς ταννίνες αντίστοιχα, μετρήθηκαν με τη μέθοδο καθίζησης με αλβουμίνη (BSA) σύμφωνα με (Kyraleou *et al.*, 2015; Hagerman, 2002).

Η πορεία που ακολουθήθηκε για το σύνολο των δειγμάτων περιγράφεται στη συνέχεια.

Σε eppendorfs, τοποθετήθηκαν 500 μ L δείγματος και προστέθηκαν 1 mL διαλύματος BSA. Έγινε ήπια ανάδευση για 15 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 12000 rpm υπό ψύξη (-5°C). Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και στο ίζημα προστέθηκαν 250 μ L μη πρωτεϊνικού διαλύματος (Buffer A). Ακολούθησε πάλι φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 12000 rpm υπό ψύξη (-5°C) και απορρίφθηκε εκ νέου το υπερκείμενο υγρό. Στο ίζημα προστέθηκε αυτή τη φορά 875 μ L διαλύματος TEA – SDS (Buffer B) και το δείγμα αφέθηκε σε ηρεμία για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, έγινε ανάδευση σε vortex για να διαλυθεί το ίζημα και παρέμεινε για ακόμα 10 λεπτά σε ηρεμία.

Η μέτρηση της απορρόφησης (A1) έγινε στα 510 nm με UV/VIS Spectrometer (PerkinElmer prexiously Lambda 25) σε κυψελίδα πλαστική μικρής στένωσης (1mm), χρησιμοποιώντας ως τυφλό το διάλυμα TEA – SDS. Έπειτα προστέθηκαν στο δείγμα 125 μ L διαλύματος FeCl_3 και μετά το πέρας 10 λεπτών μετρήθηκε ξανά η απορρόφηση (A2) στα 510 nm.

Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων έγινε τοποθετώντας την διαφορά των τιμών των απορροφήσεων $A = (A2) - (A1)$, στην καμπύλη αναφοράς που έχουμε κατασκευάσει. Από την καμπύλη αναφοράς βρίσκουμε την συγκέντρωση που αντιστοιχεί στην διαφορά των απορροφήσεων των δειγμάτων. Η τελική συγκέντρωση ταννινών εκφράστηκε σε mg/L κατεχίνης και στη συνέχεια σε mg κατεχίνης/g βάρους νωπών γιγάρτων.

3 Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Αναλύσεις σε φλοιούς

3.1.1 Μέτρηση Folin – Ciocalteu σε φλοιούς

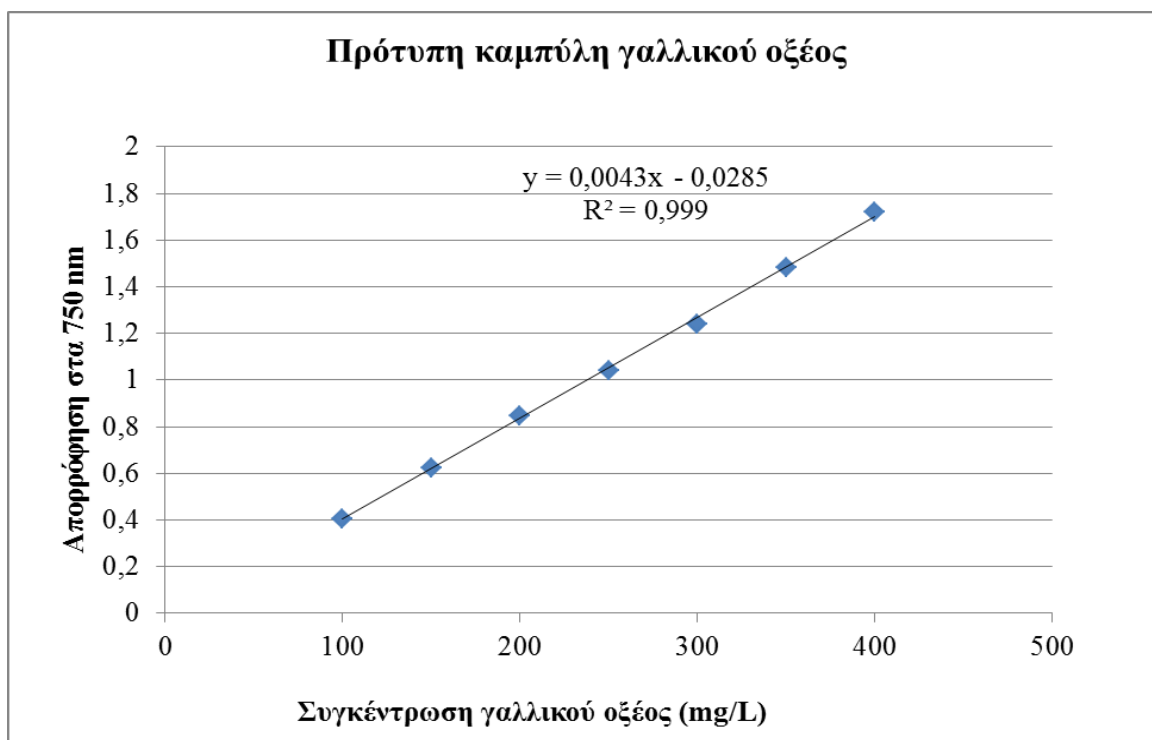
3.1.1.1 Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος στα 750 nm με τη βοήθεια του Tecan. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7 Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu.

mg γαλλικού οξέος/L	Απορρόφηση στα 750 nm
50	0,214
100	0,406
150	0,625
200	0,846
250	1,041
300	1,241
350	1,481
400	1,719
450	1,954
500	2,100

Με βάση τις τιμές του παραπάνω πίνακα κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 1) απορρόφησης στα 750 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος (mg/L).



Διάγραμμα 1 Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu.

Η πρότυπη καμπύλη έχει γραμμικό συντελεστή 0,999 και ακολουθεί την εξίσωση $A = 0,0043C - 0,0285$ (όπου A η απορρόφηση στα 750 nm – άξονας Y , και C η συγκέντρωση σε mg του γαλλικού οξέος – άξονας X).

3.1.1.2 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων

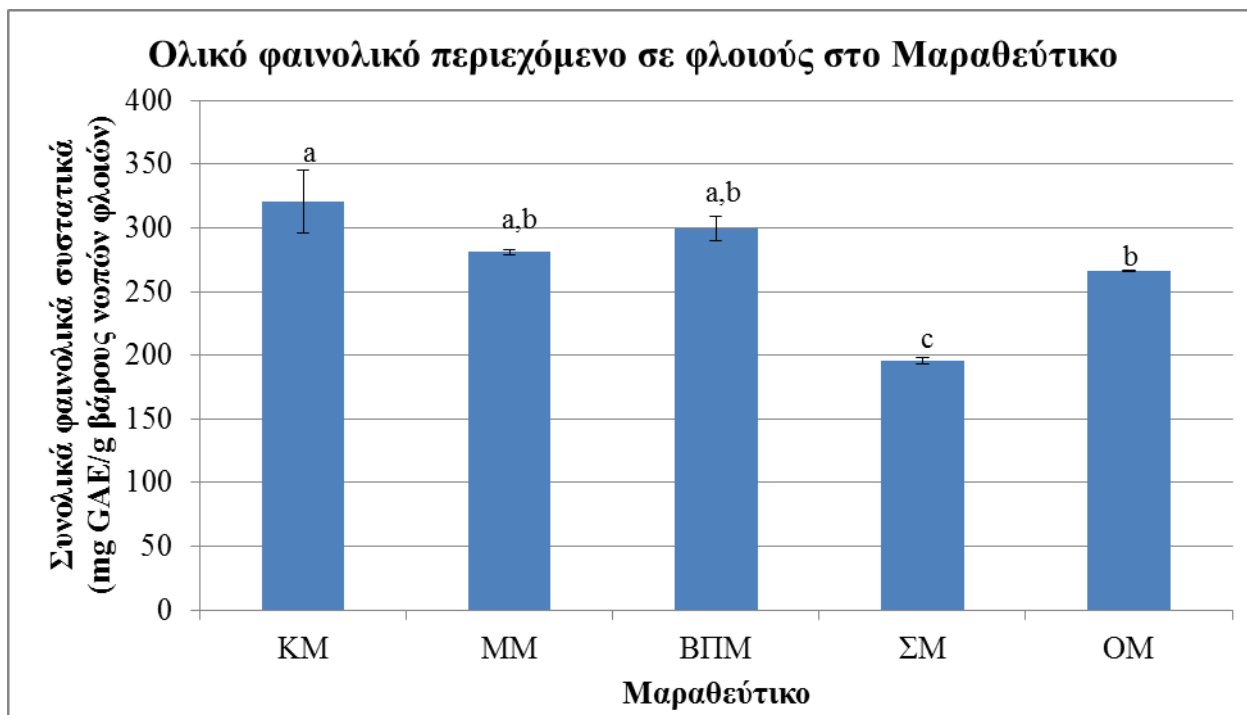
Έγινε μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 750 nm, για τα εκχυλίσματα φλοιών για ερυθρά και λευκά σταφύλια, για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ουσιών. Η ανάλυση έγινε εις διπλούν. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης. Ο υπολογισμός των τιμών έγινε με την εξίσωση του γραφήματος $A = 0,0043C - 0,0285$. Κατόπιν, υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε τιμή. Τέλος, έγινε η μετατροπή των τιμών σε mg GAE/g βάρους νωπών φλοιών.

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας για τα εκχυλίσματα φλοιών των ερυθρών και λευκών σταφυλιών:

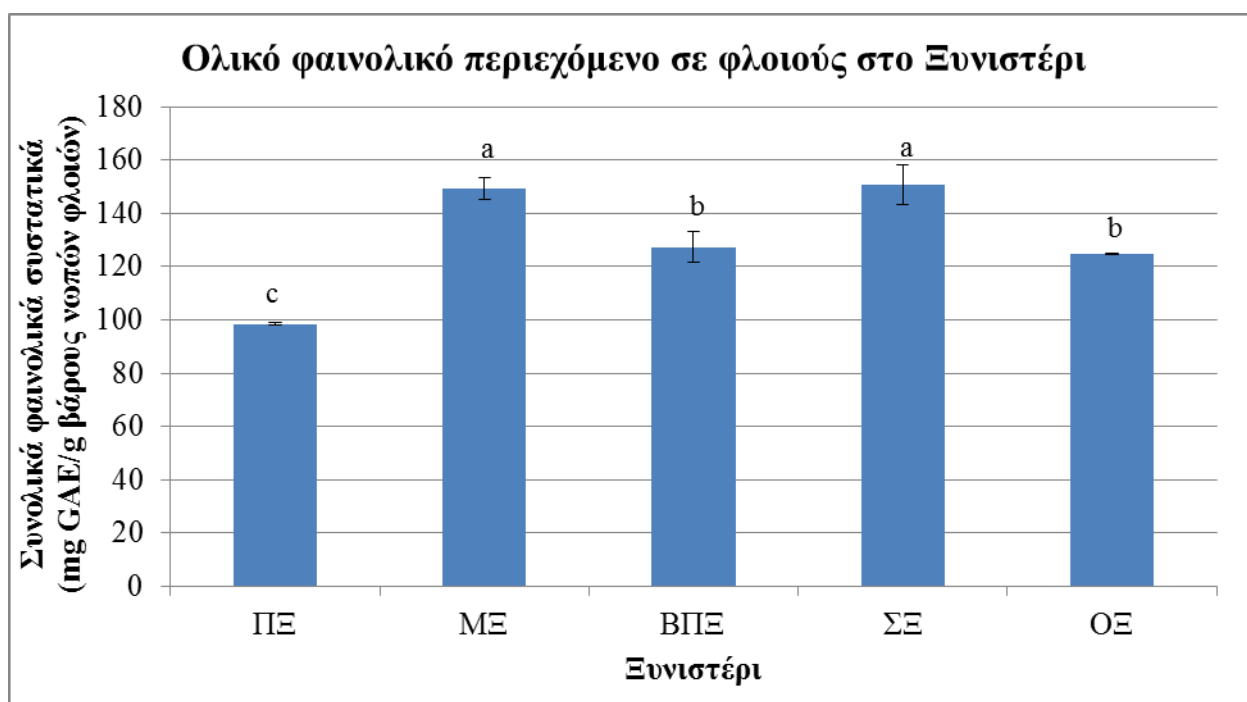
Πίνακας 8 Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών (mg GAE/g βάρους νωπών φλοιών) στα εκχυλίσματα φλοιών των ερυθρών και λευκών σταφυλιών. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).

Δείγμα	Ολικά φαινολικά συστατικά (mg GAE/g βάρους νωπών φλοιών)	Δείγμα	Ολικά φαινολικά συστατικά (mg GAE/g βάρους νωπών φλοιών)
KM	321 \pm 25 a	ΠΞ	99 \pm 0,5 c
MM	281 \pm 2 a,b	ΜΞ	149 \pm 4 a
ΒΠΜ	299 \pm 9 a,b	ΒΠΞ	127 \pm 6 b
ΣΜ	195 \pm 2 c	ΣΞ	151 \pm 7 a
ΟΜ	266 \pm 0,5 b	ΟΞ	125 \pm 0,4 b

Στα παρακάτω Διαγράμματα 2 και 3 παρουσιάζεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο για τα εκχυλίσματα φλοιών των ερυθρών και λευκών σταφυλιών, αντίστοιχα και οι διαφορές τους με βάση τη στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT). Με βάση τα διαγράμματα, παρατηρούμε ότι τα σταφύλια της ποικιλίας Μαραθεύτικο, από τις περιοχές Κυπερούντα, Μαλλιά και Βουνί Παναγιάς έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών συστατικών στους φλοιούς, ενώ στα σταφύλια της ποικιλίας Ξυνιστέρι, τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών συστατικών έχουν τα σταφύλια από τις περιοχές Μαλλιά και Στρουμπί. Η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά ποικίλλει λόγω της ποικιλίας των σταφυλιών, της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας, των κλιματολογικών συνθηκών των αμπελώνων, τον τύπο του εδάφους, τις γεωγραφικές τοποθεσίες και την ωρίμανση των σταφυλιών (Stratil, Kubáň, & Fojtová, 2008; Šeruga, Novak, & Jakobek, 2011; Geana *et al.*, 2015)



Διάγραμμα 2 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu σε εκχυλίσματα φλοιών στο Μαραθεύτικο.



Διάγραμμα 3 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu σε εκχυλίσματα φλοιών στο Ξυμιστέρι.

3.1.2 Μέτρηση DPPH σε φλοιούς

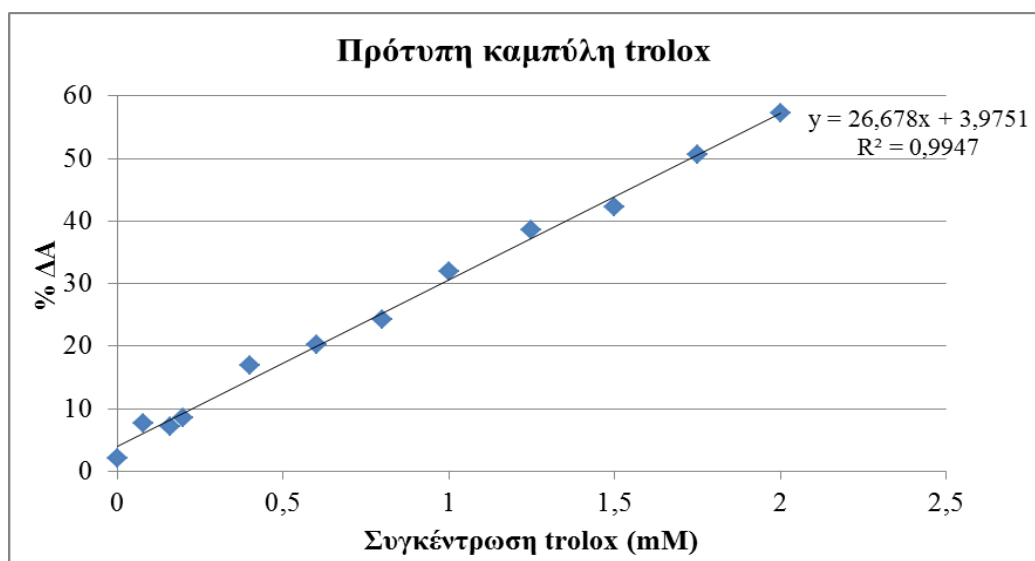
3.1.2.1 Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων trolox στα 515 nm με τη βοήθεια του Tecan και με τη βοήθεια της Εξίσωσης 1 και μετατροπή σε %ΔΑ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9 Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή DPPH.

mM trolox	%ΔΑ
0	2,174
0,080	7,620
0,160	7,113
0,200	8,547
0,400	16,91
0,600	20,26
350	24,30
400	31,97
450	38,52
500	42,33

Με βάση τις τιμές του παραπάνω πίνακα κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 4) από το διάγραμμα %ΔΑ συναρτήσει της συγκέντρωσης trolox (mM).



Διάγραμμα 4 Πρότυπη καμπύλη για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή DPPH.

Η πρότυπη καμπύλη έχει γραμμικό συντελεστή 0,9947 και ακολουθεί την εξίσωση $A = 26,678C + 3,9751$ (όπου A η %ΔΑ – άξονας Y, και C η συγκέντρωση σε mM trolox – άξονας X).

3.1.2.2 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων

Μετρήθηκαν δείγματα εκχυλισμάτων φλοιών για ερυθρά και λευκά σταφύλια και έγινε μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 515 nm, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα δύο φορές. Ακολούθησε αναγωγή των αποτελεσμάτων με την βοήθεια της Εξίσωσης 1 και τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων με βάση την πρότυπη καμπύλη και την εξίσωση του γραφήματος $A = 26,678C + 3,9751$. Κατόπιν, υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε τιμή. Τέλος, έγινε η μετατροπή των τιμών σε mmole trolox/g βάρους νωπών φλοιών.

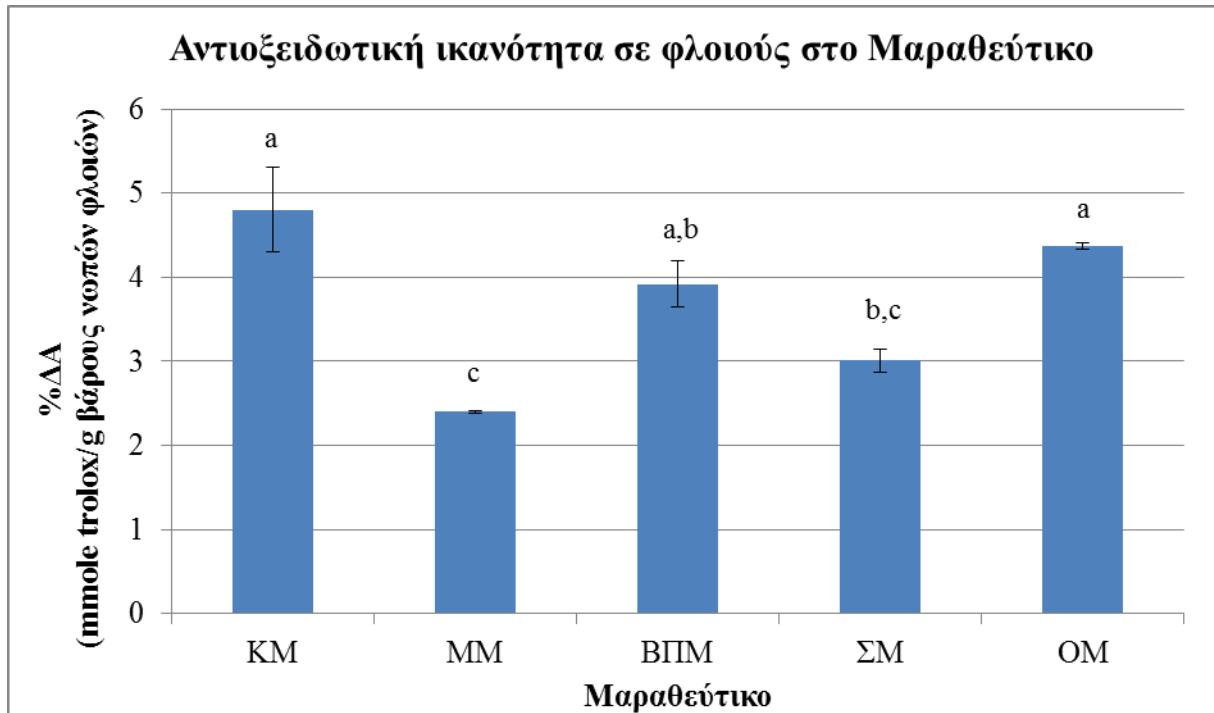
Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας για τα εκχυλίσματα φλοιών των ερυθρών και λευκών σταφυλιών:

Πίνακας 10 Αντιοξειδωτική ικανότητα (%ΔΑ) εκφρασμένη σε mmole trolox/g βάρους νωπών φλοιών στα εκχυλίσματα φλοιών των ερυθρών και λευκών σταφυλιών. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).

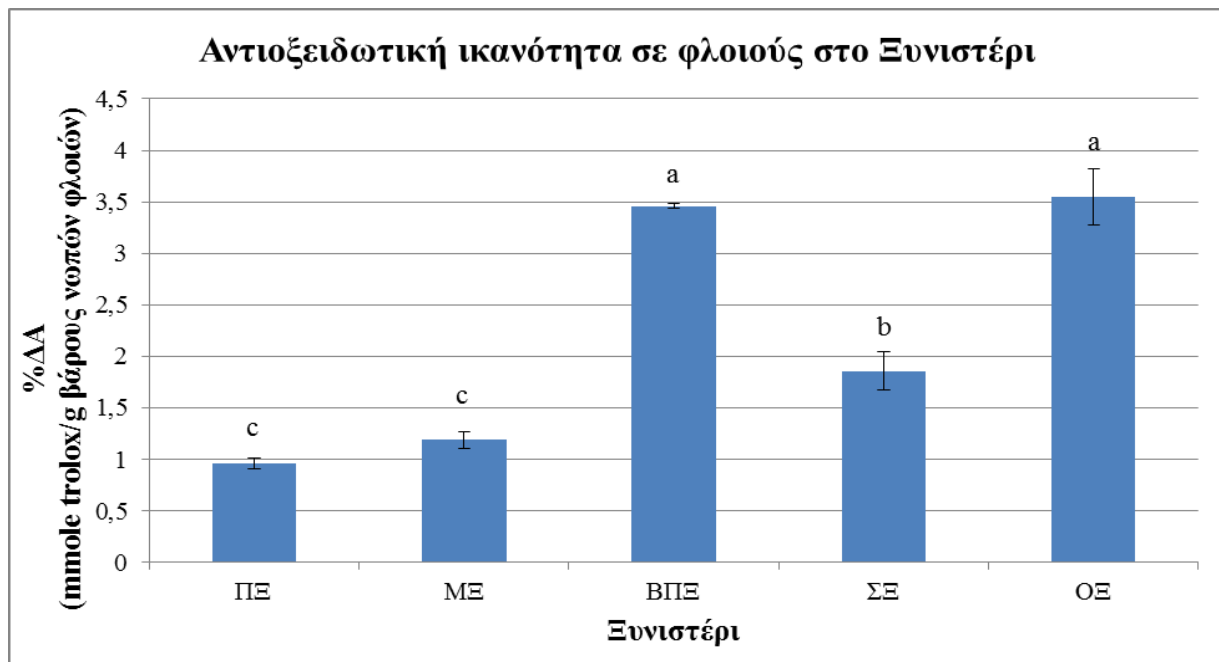
Δείγμα	%ΔΑ (mmole trolox/g βάρους νωπών φλοιών)	Δείγμα	%ΔΑ (mmole trolox/g βάρους νωπών φλοιών)
KM	4,8 \pm 0,5 a	ΠΞ	1,0 \pm 0 c
MM	2,4 \pm 0 c	ΜΞ	1,2 \pm 0 c
ΒΠΜ	3,9 \pm 0,3 a,b	ΒΠΞ	3,5 \pm 0 a
ΣΜ	3,0 \pm 0,1 b,c	ΣΞ	1,9 \pm 0,1 b
ΟΜ	4,4 \pm 0 a	ΟΞ	3,6 \pm 0,3 a

Στα παρακάτω Διαγράμματα 5 και 6 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα για τα εκχυλίσματα φλοιών των ερυθρών και λευκών σταφυλιών, αντίστοιχα και οι διαφορές τους με βάση τη στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT). Τα KM, ΒΠΜ και ΟΜ (φλοιοί) παρουσιάζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα στην

ποικιλία Μαραθεύτικο, ενώ για την ποικιλία Ξυνιστέρι, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζουν τα ΒΠΞ και ΟΞ, τα οποία είναι και υψηλότερα από τα ΜΜ και ΣΜ της ποικιλίας Μαραθεύτικο.



Διάγραμμα 5 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη δοκιμή DPPH σε εκχυλίσματα φλοιών στο Μαραθεύτικο.

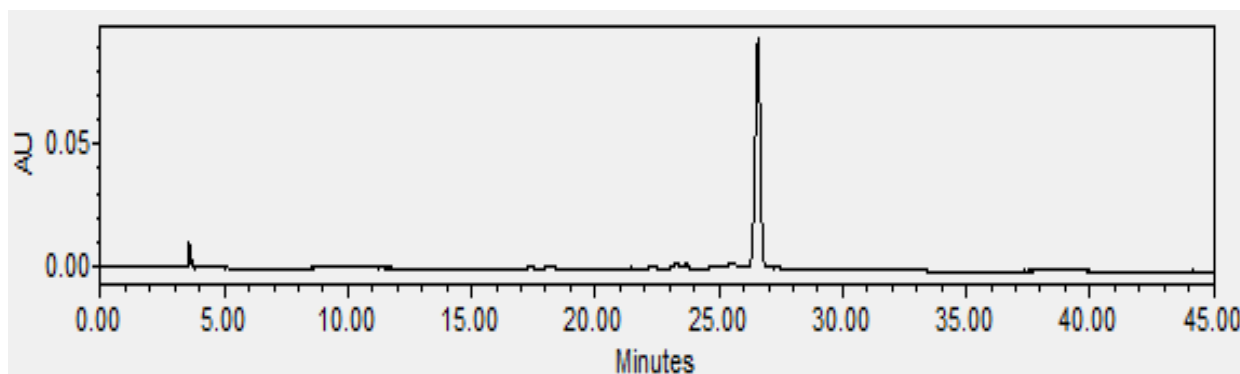


Διάγραμμα 6 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη δοκιμή DPPH σε εκχυλίσματα φλοιών στο Ξυνιστέρι.

3.1.3 Προσδιορισμός ανθοκυανών με HPLC

3.1.3.1 Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων μαλβιδίνης στα 520 nm στην HPLC (χρωματογράφημα – Εικόνα 43). Έγιναν δύο πρότυπες καμπύλες, ώστε να καλύπτονται οι μικρότερες και μεγαλύτερες τιμές των δειγμάτων.



Εικόνα 44 Χρωματογράφημα HPLC της πρότυπης ουσίας μαλβιδίνης για συγκέντρωση 149,33 mg/L.

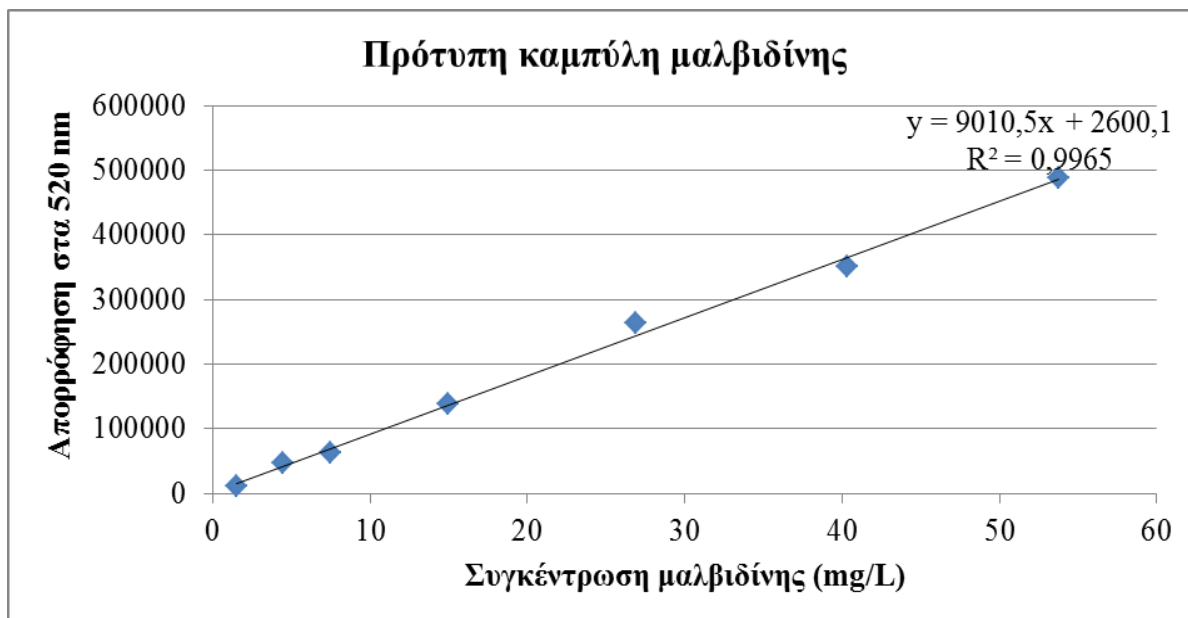
- **Πρότυπη καμπύλη για χαμηλές τιμές απορροφήσεων**

Τα αποτελέσματα για τις χαμηλές τιμές παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11 Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης μαλβιδίνης για τις μικρότερες τιμές των δειγμάτων για μέτρηση των ανθοκυανών με HPLC.

mg μαλβιδίνης/L	Απορρόφηση στα 520 nm (Area)
1,49	11047,5
4,48	46352
7,47	63416
14,9	138995
26,9	264148
40,3	351140,5
53,8	488641

Με βάση τις τιμές του παραπάνω πίνακα κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 7) από το διάγραμμα απορρόφησης στα 520 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης μαλβιδίνης (mg/L).



Διάγραμμα 7 Πρότυπη καμπύλη (1) για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC.

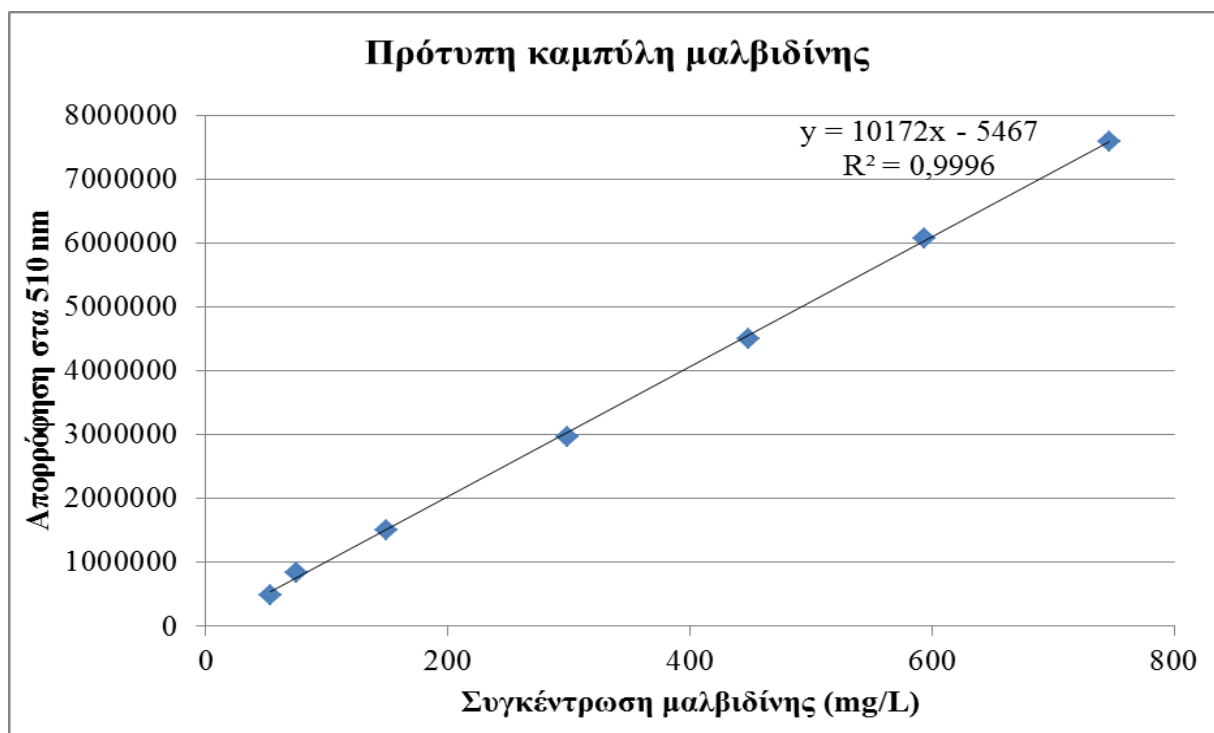
- **Πρότυπη καμπύλη για υψηλές τιμές απορροφήσεων**

Τα αποτελέσματα για τις υψηλές τιμές παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12 Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης μαλβιδίνης για τις μεγαλύτερες τιμές των δειγμάτων για μέτρηση των ανθοκυανών με HPLC.

mg μαλβιδίνης/L	Απορρόφηση στα 520 nm (Area)
53,8	488641
74,7	849506,5
149	1517347
299	2977047
448	4507491
593	6081471
747	7590076

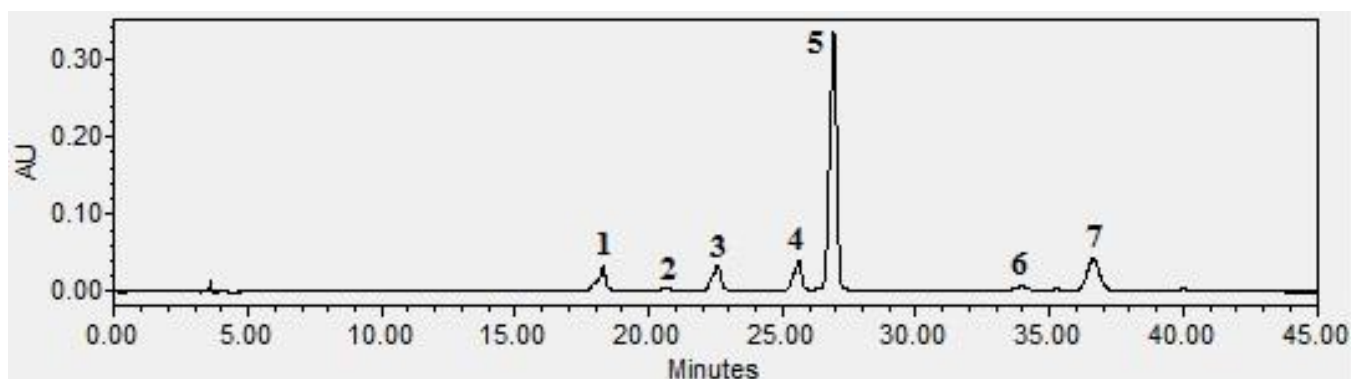
Με βάση τις τιμές του παραπάνω πίνακα κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 8) από το διάγραμμα απορρόφησης στα 520 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης μαλβιδίνης (mg/L).



Διάγραμμα 8 Πρότυπη καμπύλη (2) για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC.

3.1.3.1 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων

Στα δείγματα εκχυλισμάτων φλοιών για τα σταφύλια της ποικιλίας Μαραθεύτικο, έγινε μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 520 nm, για την εκτίμηση των ανθοκυανών (χρωματογράφημα – Εικόνα 44).



Εικόνα 45 Χρωματογράφημα HPLC του δείγματος OM. Όπου, 1. delphinidol-3-glucoside, 2. cyanidol-3-glucoside, 3. petunidol-3-glucoside, 4. peonidol-3-glucoside, 5. malvidol-3-glucoside, 6. peonidol-3-acetylglucoside, 7. malvidol-3-acetylglucoside.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα δύο φορές. Ακολούθησε υπολογισμός των αποτελεσμάτων με βάση τις πρότυπες καμπύλες και τις εξισώσεις τους. Κατόπιν, υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε τιμή. Τέλος, έγινε η μετατροπή των τιμών σε mg μαλβιδίνης/g βάρους νωπών φλοιών.

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας για τα εκχυλίσματα φλοιών των σταφυλιών της ποικιλίας Μαραθεύτικο:

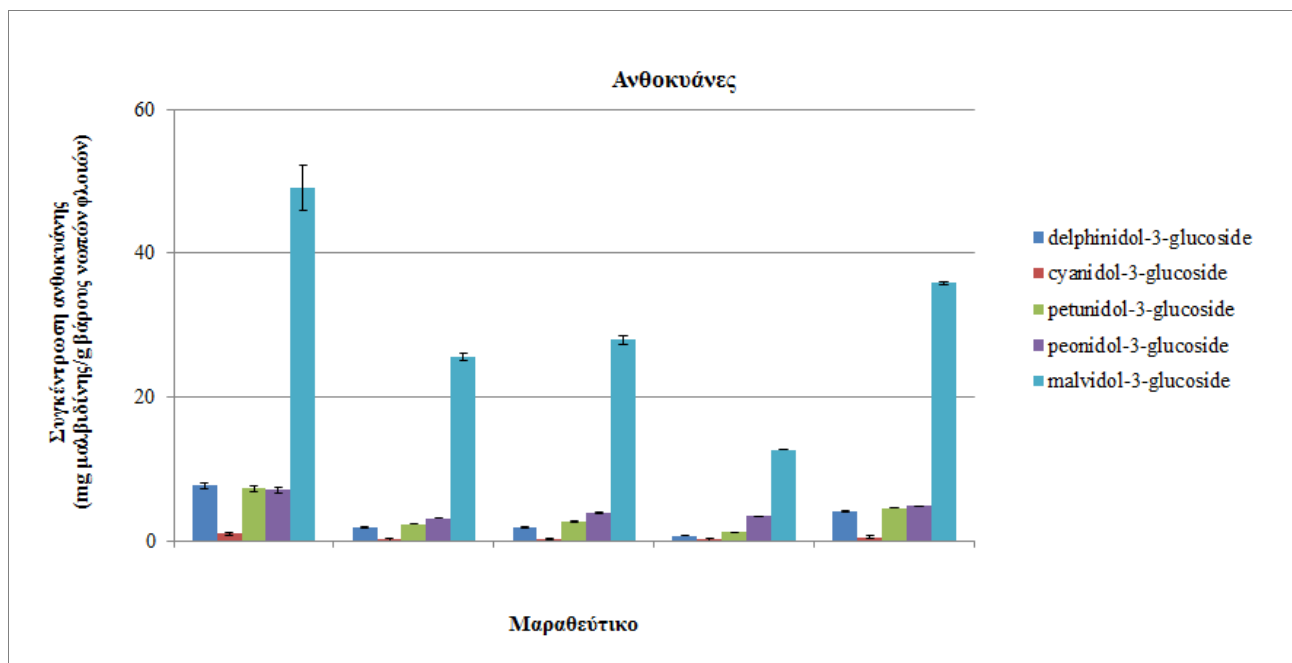
Πίνακας 13 Συγκέντρωση των επιμέρους ανθοκυανών εκφρασμένες σε mg μαλβιδίνης/g βάρους νωπών φλοιών για τα εκχυλίσματα φλοιών στα σταφύλια της ποικιλίας Μαραθεύτικο. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).

A/A	delphinidol-3- glucoside	cyanidol-3- glucoside	petunidol-3- glucoside	peonidol-3- glucoside	malvidol-3- glucoside
(mg μαλβιδίνης/g βάρους νωπών φλοιών)					
KM	7,63 \pm 0,46a	0,94 \pm 0,04 a	7,22 \pm 0,49 a	7,05 \pm 0,39 a	49,09 \pm 3,06 a
MM	1,82 \pm 0,02 c	0,13 \pm 0,03 c	2,32 \pm 0,04 c	3,07 \pm 0,02 d	25,59 \pm 0,50 c
ΒΠΜ	1,83 \pm 0,04 c	0,22 \pm 0,05 c	2,66 \pm 0,06 c	3,92 \pm 0,06 c	27,89 \pm 0,56 c
ΣΜ	0,66 \pm 0,01d	0,10 \pm 0,00 c	1,22 \pm 0,01 d	3,37 \pm 0,05 c,d	12,64 \pm 0,06 d
ΟΜ	4,07 \pm 0,03b	0,47 \pm 0,02 b	4,49 \pm 0,02 b	4,80 \pm 0,08 b	35,88 \pm 0,22 b

Αναλύοντας τα γραφήματα που λαμβάνονται από την HPLC, για την ποικιλία Μαραθεύτικο στα 5 δείγματα, τα αποτελέσματα των ανθοκυανών ανά επιμέρους ανθοκύανη, φαίνονται στο πιο κάτω Διάγραμμα 9. Τα ευρήματα έδειξαν ότι η ο γλυκοζίτης της μαλβιδίνης είναι η επικρατούσα ανθοκύανη, όπως αποδεικνύεται για έναν αριθμό άλλων ειδών *V. vinifera*, συμπεριλαμβανομένων Syrah (Roggero *et al.*, 1986), Cabernet Franc, Merlot και Pinot Noir (Mazza *et al.*, 1999), Αγιωργίτικο (Dourtoglou *et al.*, 1994), Tempranillo (Esteban, Villanueva, & Lissarrague, 2001), Αγιωργίτικο και Κοτσιφάλι (Benatzourou & Lanaridis, 1997) και άλλες (Kallithraka *et al.*, 2005). Μια έρευνα στην Κροατία φαίνεται να συμφωνεί επίσης με τις υπόλοιπες έρευνες αφού ο γλυκοζίτης της μαλβιδίνης είχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στις ποικιλίες Plavac mali και Babic (Curko *et al.*, 2014).

Η σειρά της αφθονίας στην παρούσα μελέτη με βάση τις μέσες τιμές για κάθε ανθοκυάνη ήταν ο γλυκοζίτης της μαλβιδίνης (Mv) (μέση περιεκτικότητα σε 30,22 mg μαλβιδίνης/g βάρους νωπών φλοιών), ακολουθούμενη από τον γλυκοζίτη της πεονιδίνης (Pn) (4,44 mg μαλβιδίνης/g βάρους νωπών φλοιών), τον γλυκοζίτη της πετουιδίνης (Pt) (3,58 mg μαλβιδίνης/g βάρους νωπών φλοιών), τον γλυκοζίτη της δελφινιδίνης (Dp) (3,20 mg μαλβιδίνης/g βάρους νωπών φλοιών) και τον γλυκοζίτη της κυανιδίνης (Cy) (0,37 mg μαλβιδίνης/g βάρους νωπών φλοιών). Η ίδια σειρά αφθονίας των ανθοκυανών παρατηρείται και στη μελέτη των Bakker & Timberlake, (1985) σε 16 ποικιλίες σταφυλιών, καθώς επίσης και στην έρευνα που έγινε από Kallithraka *et al.*, (2009) για τις ποικιλίες Αγιωργίτικο, Ξινόμαυρο, Μανδηλαριά, Merlot, Cabernet Sauvignon και Syrah.

Παρ' όλα αυτά, οι σχετικές ποσότητες όλων των ανθοκυανών δείχνουν να ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας ποικιλίας. Για παράδειγμα, η Dp κυμαίνεται από 0,66 έως 7,63 mg MvE/g βάρους νωπών φλοιών και η Mv από 12,64 έως 49,09 mg μαλβιδίνης/g βάρους νωπών φλοιών. Οι μεγάλες αυτές μεταβολές έχουν αποδοθεί πιθανόν σε διάφορους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη βιοσύνθεση ανθοκυανών, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης στον ήλιο και άλλες μικροκλιματικές συνθήκες, καθώς και το στάδιο ωρίμανσης κλπ. (Kallithraka *et al.*, 2009) Επιπλέον, οι Kallithraka *et al.*, (2005) σημειώνουν ότι η διανομή των ανθοκυανών επηρεάζεται σημαντικά κατά τα διάφορα στάδια ωρίμανσης. Σε μελέτη που διεξήχθη στο Tekirdag' Viticulture Research Institute, δηλώνεται ότι η διαφορετική περιοχή παραγωγής των ποικιλιών σταφυλιού μπορεί να αποτελεί σημαντικό παράγοντα στον οποίο οφείλονται οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των ανθοκυανών μιας ποικιλίας (Orak, 2007).



Διάγραμμα 9 Συγκέντρωση επιμέρους ανθοκυανών στα δείγματα Μαραθεύτικο.

3.2 Αναλύσεις σε γίγαρτα

3.2.1 Μέτρηση Folin – Ciocalteu σε γίγαρτα

3.2.1.1 Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης

Η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, είναι η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση Folin – Ciocalteu στους φλοιούς (βλέπε 3.1.1.1.).

3.2.1.2 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων

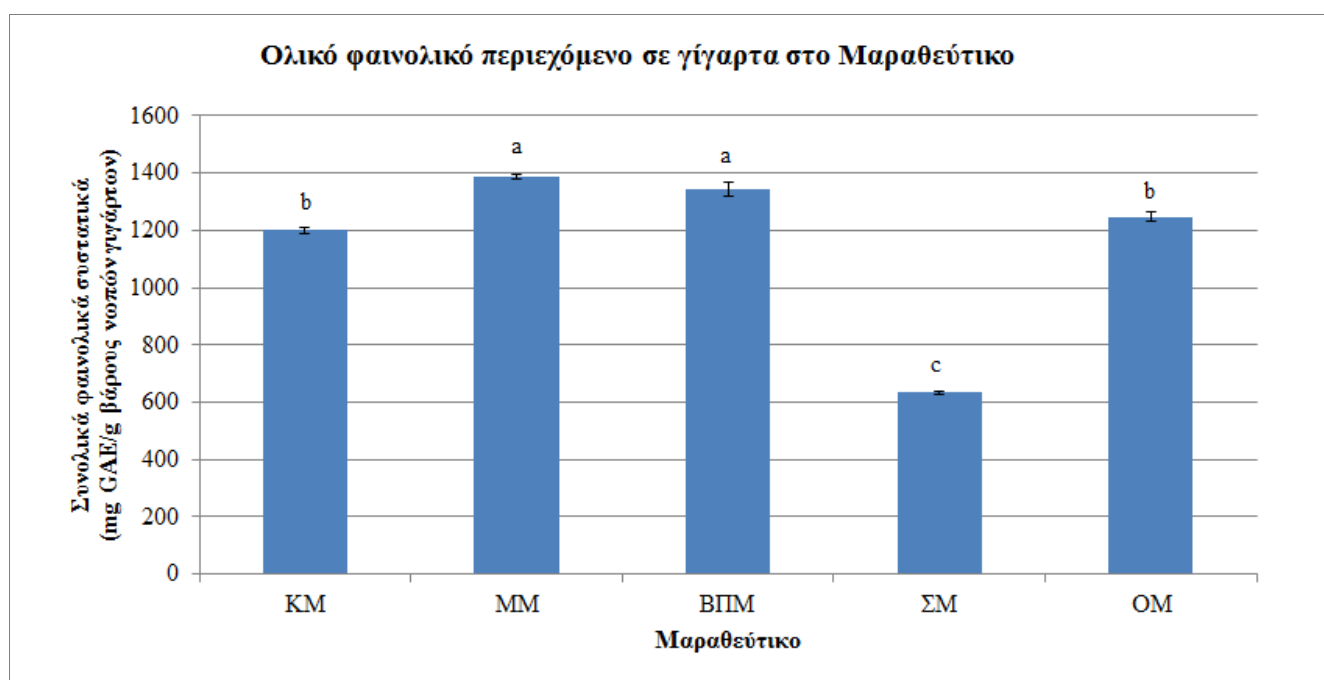
Έγινε μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 750 nm, για τα εκχυλίσματα γιγάρτων για ερυθρά και λευκά σταφύλια, για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ουσιών. Η ανάλυση έγινε εις διπλούν. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης. Ο υπολογισμός των τιμών έγινε με την εξίσωση του γραφήματος $A = 0,0043C - 0,0285$. Κατόπιν, υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε τιμή. Τέλος, έγινε η μετατροπή των τιμών σε mg GAE/g βάρους νεπών γιγάρτων.

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας για τα εκχυλίσματα γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών:

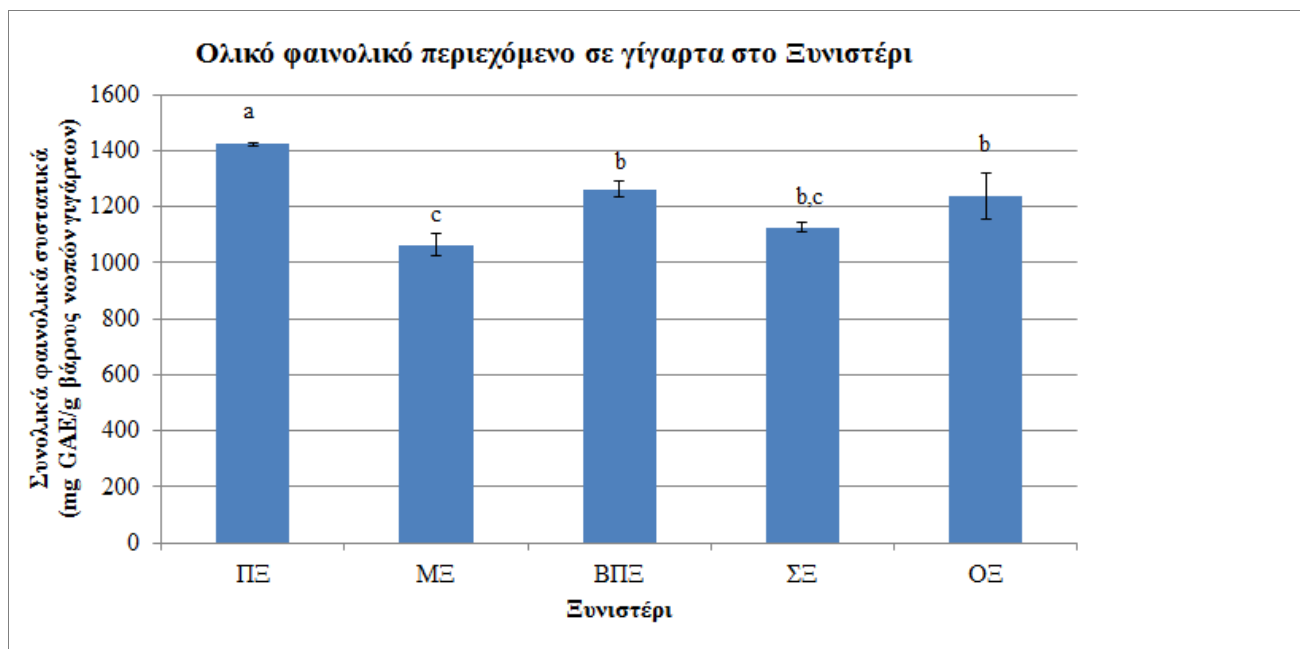
Πίνακας 14 Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών (mg GAE/g βάρους νοπών γιγάρτων) στα εκχυλίσματα γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).

Δείγμα	Ολικά φαινολικά συστατικά (mg GAE/g βάρους νοπών γιγάρτων)	Δείγμα	Ολικά φαινολικά συστατικά (mg GAE/g βάρους νοπών γιγάρτων)
KM	1202 \pm 11 b	ΠΞ	1423 \pm 6 a
MM	1386 \pm 9 a	ΜΞ	1064 \pm 41 c
ΒΠΜ	1342 \pm 24 a	ΒΠΞ	1262 \pm 27 b
ΣΜ	635 \pm 6 c	ΣΞ	1125 \pm 16 b,c
ΟΜ	1247 \pm 17 b	ΟΞ	1239 \pm 82 b

Στα παρακάτω Διαγράμματα 10 και 11 παρουσιάζεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο για τα εκχυλίσματα γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών, αντίστοιχα και οι διαφορές τους με βάση τη στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT). Με βάση τα διαγράμματα, παρατηρούμε ότι τα σταφύλια της ποικιλίας Μαραθεύτικο, από τις περιοχές Μαλλιά και Βουνί Παναγιάς έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών συστατικών στα γίγαρτα, ενώ στα σταφύλια της ποικιλίας Ξυνιστέρι, τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών συστατικών έχουν τα σταφύλια από την περιοχή Πάχνα.



Διάγραμμα 10 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu σε εκχυλίσματα γιγάρτων στο Μαραθεύτικο.



Διάγραμμα 11 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu σε εκχυλίσματα γιγάρτων στο Ξυνιστέρι.

3.2.2 Μέτρηση DPPH σε γίγαρτα

3.2.2.1 Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης

Η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, είναι η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση DPPH στους φλοιούς (βλέπε 3.1.2.1.).

3.2.2.2 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων

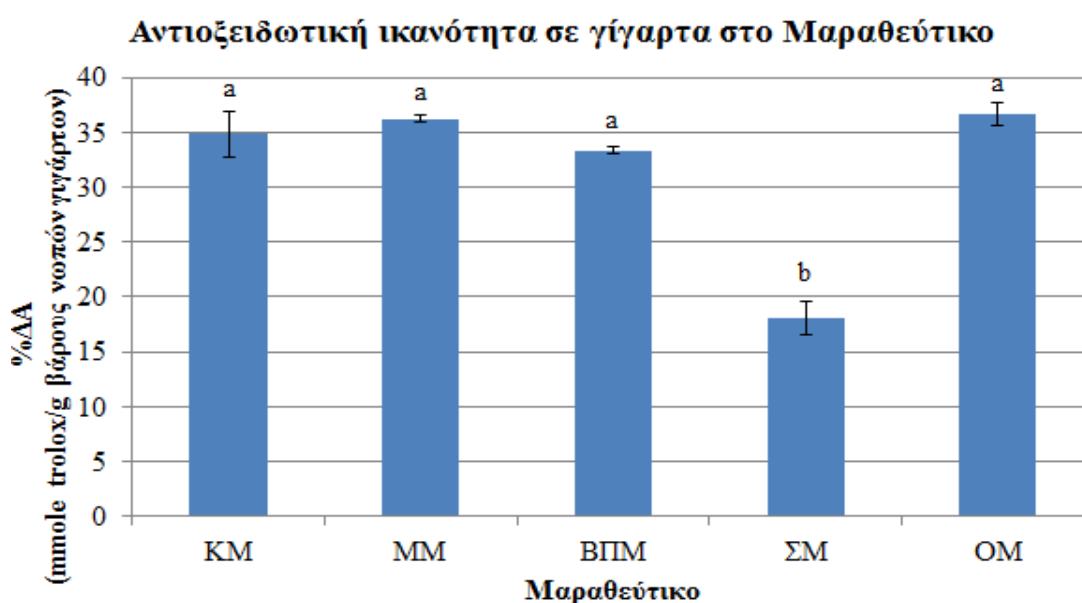
Μετρήθηκαν δείγματα εκχυλισμάτων γιγάρτων για ερυθρά και λευκά σταφύλια και έγινε μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 515 nm, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα δύο φορές. Ακολούθησε αναγωγή των αποτελεσμάτων με την βοήθεια της Εξίσωσης 1 και τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων με βάση την πρότυπη καμπύλη και την εξίσωση του γραφήματος $A = 26,678C + 3,9751$. Κατόπιν, υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε τιμή. Τέλος, έγινε η μετατροπή των τιμών σε mmole trolox/g βάρους νοσπών γιγάρτων.

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας για τα εκχυλίσματα γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών:

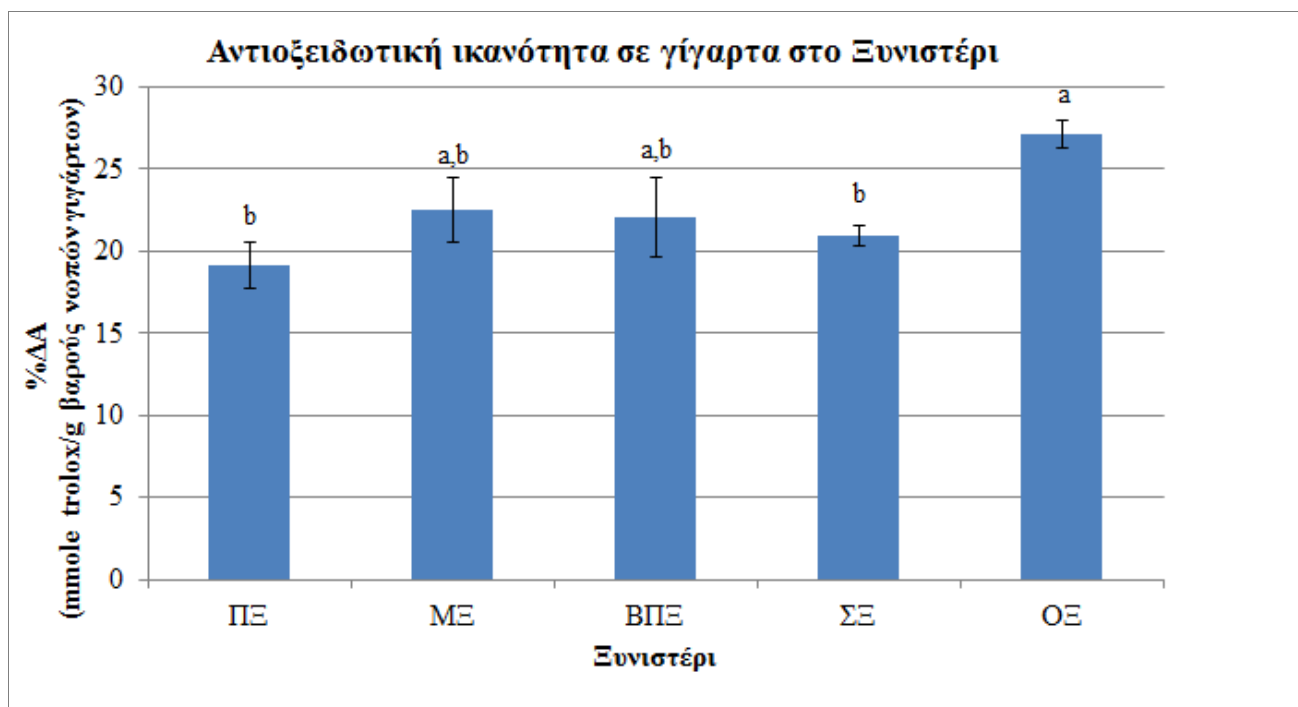
Πίνακας 15 Αντιοξειδωτική ικανότητα (%ΔΑ) εκφρασμένη σε mmole trolox/g βάρους νωπών γιγάρτων στα εκχυλίσματα γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).

Δείγμα	%ΔΑ (mmole trolox/g βάρους νωπών γιγάρτων)	Δείγμα	%ΔΑ (mmole trolox/g βάρους νωπών γιγάρτων)
KM	35 \pm 2 a	ΠΞ	19 \pm 1,4 b
MM	36 \pm 0,3 a	ΜΞ	23 \pm 2,0 a,b
ΒΠΜ	33 \pm 0,3 a	ΒΠΞ	22 \pm 2,5 a,b
ΣΜ	18 \pm 1,5 b	ΣΞ	21 \pm 0,7 b
ΟΜ	37 \pm 1 a	ΟΞ	27 \pm 0,8 a

Στα παρακάτω Διαγράμματα 12 και 13 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα για τα εκχυλίσματα γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών, αντίστοιχα και οι διαφορές τους με βάση τη στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT). Τα KM, MM, ΒΠΜ και ΟΜ (γίγαρτα) παρουσιάζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα στην ποικιλία Μαραθεύτικο, ενώ για την ποικιλία Ξυνιστέρι, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζουν τα ΜΞ, ΒΠΞ και ΟΞ, η οποία είναι υψηλότερη και από το ΣΜ δείγμα της ποικιλίας Μαραθεύτικο.



Διάγραμμα 12 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη δοκιμή DPPH σε εκχυλίσματα γιγάρτων στο Μαραθεύτικο.



Διάγραμμα 13 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη δοκιμή DPPH σε εκχυλίσματα γιγάρτων στο Ξυνιστέρι.

3.2.3 Μέθοδος BSA στα γίγαρτα

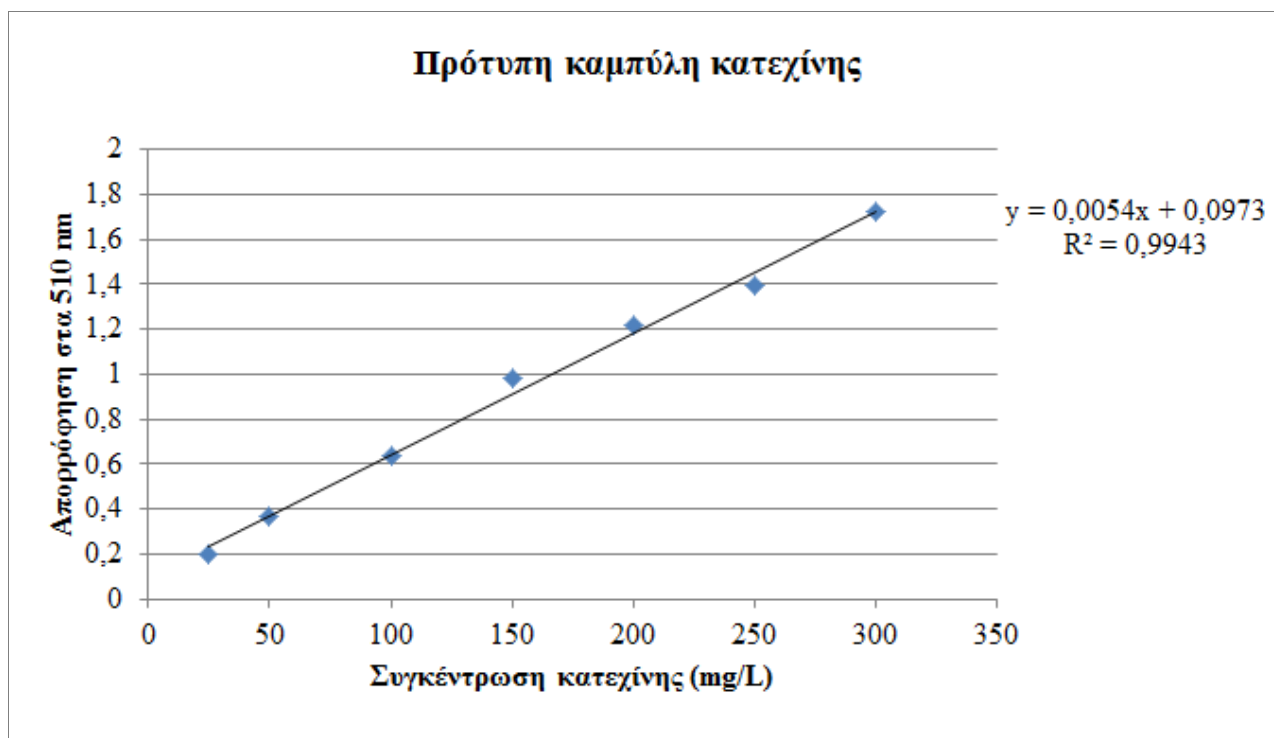
3.2.3.1 Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων κατεχίνης στα 510 nm με τη βοήθεια του UV/VIS Spectrometer (PerkinElmer precisely Lambda 25). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16 Μετρούμενες τιμές για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ταννινών με τη μέθοδο BSA.

mg κατεχίνης/L	Απορρόφηση στα 510 nm
25,0	0,199
50,0	0,366
100	0,635
150	0,984
200	1,214
250	1,397
300	1,722

Με βάση τις τιμές του παραπάνω πίνακα κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 14) από το διάγραμμα απορρόφησης στα 510 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης κατεχίνης (mg/L).



Διάγραμμα 14 Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των τανινών με τη μέθοδο BSA.

Η πρότυπη καμπύλη έχει γραμμικό συντελεστή 0,9943 και ακολουθεί την εξίσωση $A = 0,0054C + 0,0973$ (όπου A η απορρόφηση στα 510 nm – άξονας Y, και C η συγκέντρωση σε mg κατεχίνης – άξονας X).

3.2.3.2 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων

Έγινε μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 510 nm, για τα κλάσματα των εκχυλισμάτων των γιγάρτων για ερυθρά και λευκά σταφύλια, για τον προσδιορισμό των ταννινών. Η ανάλυση έγινε εις διπλούν. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης. Ο υπολογισμός των τιμών έγινε με την εξίσωση του γραφήματος $A = 0,0054C + 0,0973$. Κατόπιν, υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε τιμή. Τέλος, έγινε η μετατροπή των τιμών σε mg κατεχίνης/g βάρους νεπών γιγάρτων.

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας για τα κλάσματα των εκχυλισμάτων των γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών:

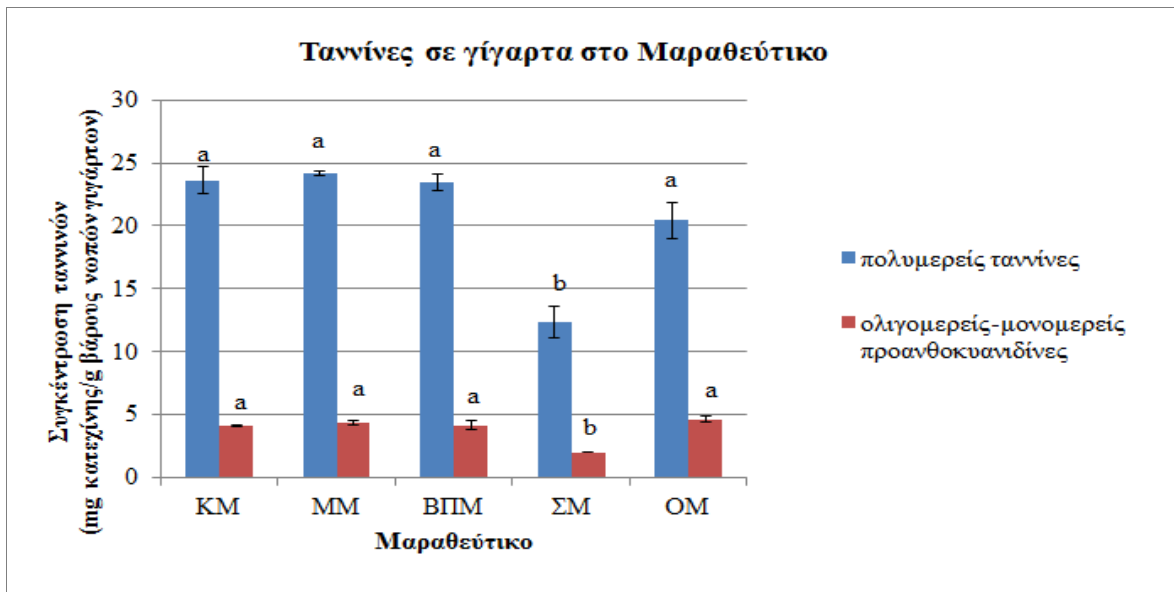
Πίνακας 17 Συγκέντρωση των ταννινών (mg κατεχίνης/g βάρους νοπών γιγάρτων) στα κλάσματα των εκχυλισμάτων γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα) έπειτα από στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT).

Δείγμα	Πολυμερείς ταννίνες	Ολιγομερείς-μονομερείς προανθοκυανιδίνες	Δείγμα	Πολυμερείς ταννίνες	Ολιγομερείς-μονομερείς προανθοκυανιδίνες
KM	23,6 \pm 1,1 a	4,1 \pm 0,1 a	ΠΞ	14,8 \pm 0,7 c	2,9 \pm 0,2 a
MM	24,1 \pm 0,2 a	4,3 \pm 0,2 a	ΜΞ	14,5 \pm 0,5 c	2,6 \pm 0,1 a
ΒΠΜ	23,5 \pm 0,7 a	4,2 \pm 0,4 a	ΒΠΞ	18,2 \pm 0,2 b	3,4 \pm 0,3 a
ΣΜ	12,3 \pm 1,2 b	2,0 \pm 0,0 b	ΣΞ	19,6 \pm 0,5 b	4,4 \pm 1,1 a
ΟΜ	20,4 \pm 1,4 a	4,6 \pm 0,3 a	ΟΞ	22,3 \pm 0,9 a	4,2 \pm 0,0 a

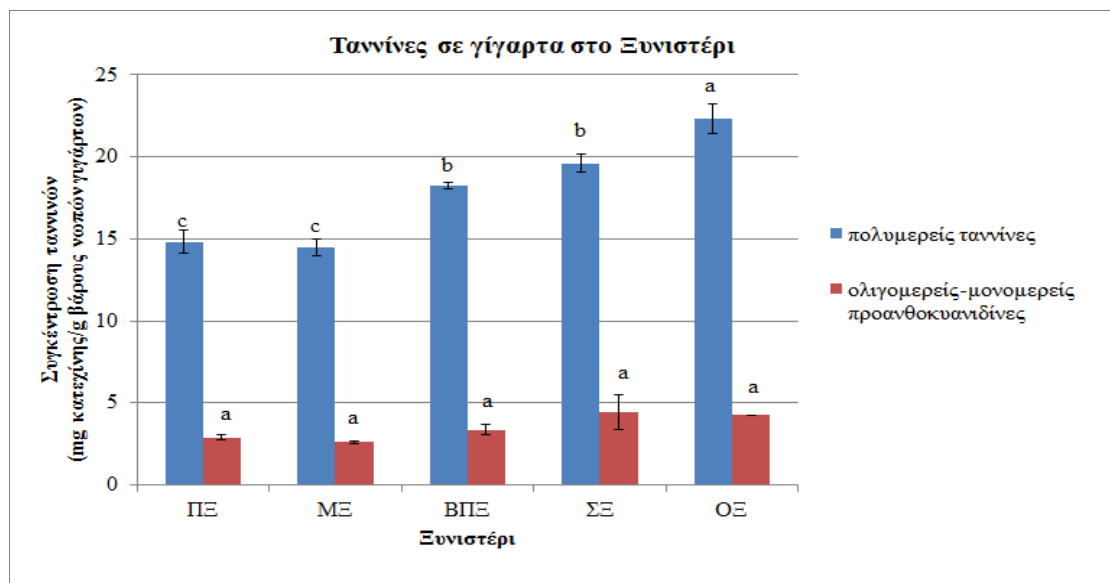
Στα παρακάτω Διαγράμματα 15 και 16 παρουσιάζεται η συγκέντρωση ταννινών για τα εκχυλίσματα γιγάρτων των ερυθρών και λευκών σταφυλιών, αντίστοιχα και οι διαφορές τους με βάση τη στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το Duncan's Multiple Range Test (MRT). Στα γίγαρτα από την ποικιλία Μαραθεύτικο παρουσιάζονται ομοιόμορφες συγκεντρώσεις πολυμερών και ολιγομερών-μονομερών ταννινών εκτός από το δείγμα ΣΜ που παρουσιάζει και στις δύο περιπτώσεις μικρότερες ποσότητες. Στα γίγαρτα από την ποικιλία Ξυνιστέρι, παρομοίως παρουσιάζονται ομοιόμορφες συγκεντρώσεις ολιγομερών-μονομερών ταννινών, όμως οι πολυμερείς ταννίνες δείχνουν ανομοιόμορφες συγκεντρώσεις με το ΟΞ να έχει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Το Διάγραμμα 17 φανερώνει ότι και στις δύο ποικιλίες η συγκέντρωση των ολιγομερών-μονομερών προανθοκυανινών είναι αισθητά μικρότερη απ' ό,τι η συγκέντρωση των πολυμερών ταννινών. Επιπλέον, οι μέσες συγκεντρώσεις τόσο των πολυμερών όσο και των ολιγομερών-μονομερών ταννινών στην ποικιλία Μαραθεύτικο είναι υψηλότερες απ' ό,τι στην ποικιλία Ξυνιστέρι.

Η μέθοδος BSA, αλλιώς μέθοδος καταβύθισης πρωτεΐνης, είναι η καταλληλότερη μέθοδος για την εκτίμηση της στυφάδας, δεδομένου ότι, η αντίληψη της στυπτικότητας στο στόμα είναι το αποτέλεσμα μιας παρόμοιας καταβύθισης των σιελογόνων πρωτεϊνών με ταννίνη (Kyraleou *et al.*, 2015) Με βάση την παρούσα μελέτη φαίνεται όπως και στη μελέτη των Weidner *et al.*, (2012), ότι όλα τα εκχυλίσματα που μελετούνται είναι ικανά να σχηματίσουν

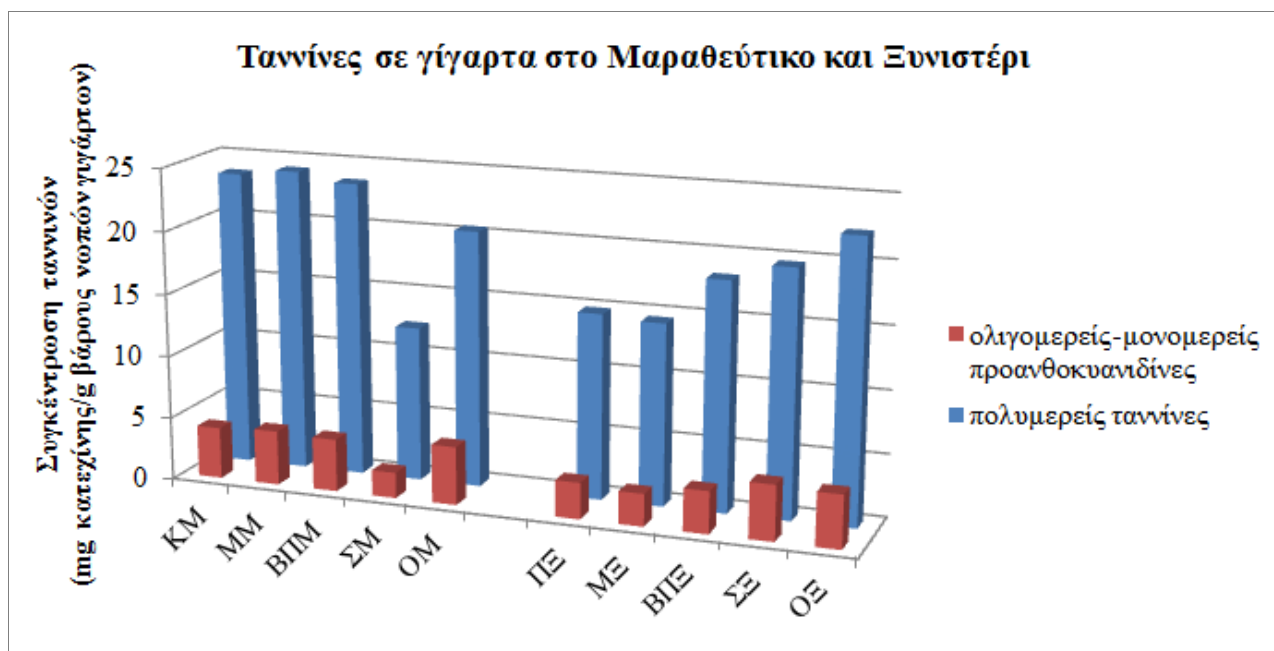
δεσμούς με την πρωτεΐνη BSA. Τέλος, οι Kennedy *et al.*, (2000); Ali *et al.*, (2010); Bonarska-Kujawa *et al.*, (2012) έχουν δείξει ότι τα γίγαρτα των σταφυλιών είναι μια πλούσια πηγή προανθοκυανιδινών, οι οποίες μπορούν να εμφανιστούν και με εστερικούς δεσμούς με το γαλλικό οξύ.



Διάγραμμα 15 Συγκέντρωση ταννινών εκφρασμένη σε mg κατεχίνης/g βάρους νοπών γιγάρτων στο Μαραθεύτικο.



Διάγραμμα 16 Συγκέντρωση ταννινών εκφρασμένη σε mg κατεχίνης/g βάρους νοπών γιγάρτων στο Ξυνιστέρι.



Διάγραμμα 17 Συγκέντρωση ταννινών εκφρασμένη σε mg κατεχίνης/g βάρους νοπών γιγάρτων στο Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι.

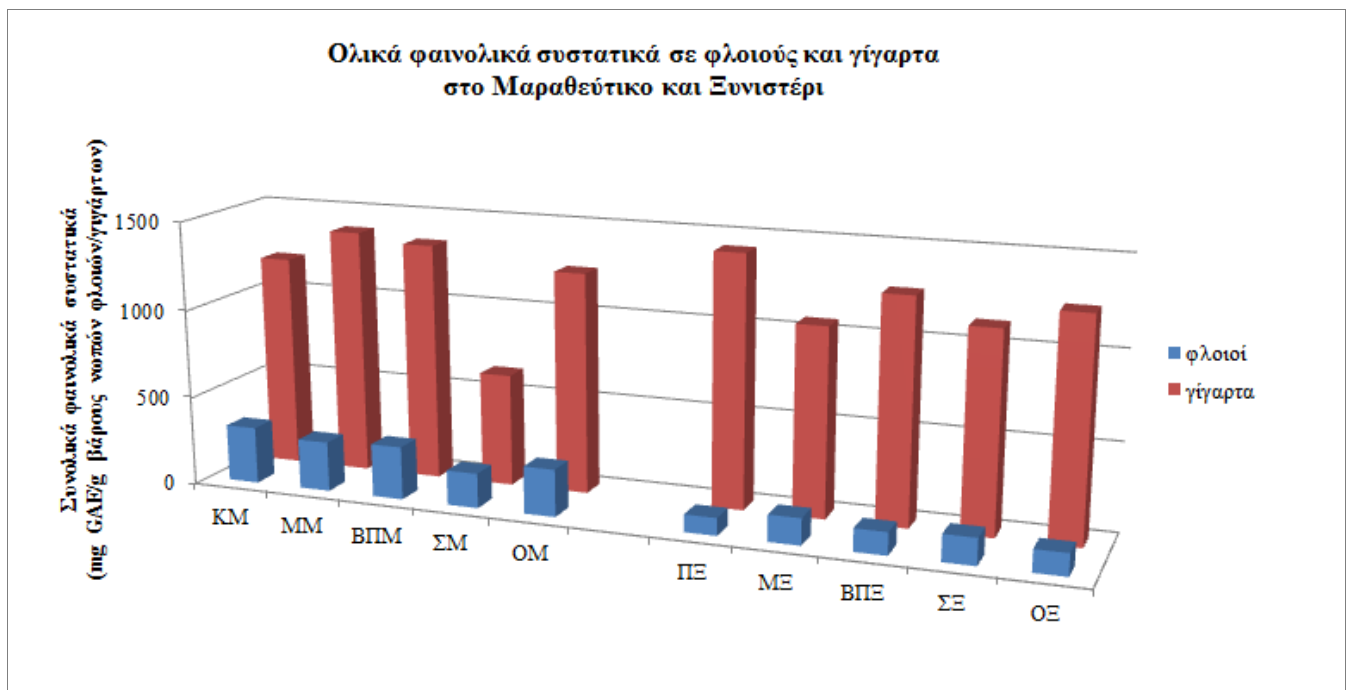
3.3 Σύγκριση φλοιών και γιγάρτων

3.3.1 Σύγκριση φλοιών και γιγάρτων για τη μέθοδο Folin – Ciocalteu

Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 18, η ποικιλία Μαραθεύτικο παρουσιάζει υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών απ' ότι το Ξυνιστέρι τόσο στους φλοιούς, όσο και στα γίγαρτα. Οι Iacopini *et al.*, (2008), αναφέρουν ότι η μεταβλητότητα που βρίσκεται στα συνολικά φαινολικά, επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι οι γονότυποι επηρεάζουν την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες τόσο στους φλοιούς, όσο και στα γίγαρτα. Η έρευνα των Rodríguez-Montealegre *et al.* (2006), συμφωνεί με την παρούσα έρευνα. Οι ερευνητές βρήκαν ότι το σύνολο των ολικών φαινολικών συστατικών στους φλοιούς των λευκών σταφυλιών ήταν χαμηλότερο απ' ότι στους φλοιούς των ερυθρών σταφυλιών. Εξηγούν ότι αυτό συμβαίνει λόγω της περιεκτικότητας σε γλυκοζίτη της μυρισετίνης και γλυκοζίτη της κερκετίνης στους φλοιούς των ερυθρών σταφυλιών, ενώ απουσιάζουν από τους φλοιούς των λευκών σταφυλιών.

Γενικότερα, το ποσό των συνολικών φαινολικών συστατικών ήταν υψηλότερο και με πιο ομοιόμορφες συγκεντρώσεις στα γίγαρτα σε σχέση με τους φλοιούς και στις δύο ποικιλίες. Αυτό παρουσιάζεται και στην έρευνα των Iacopini *et al.* (2008), Kantz & Singleton (1990)

και Negro, Tommasi, & Miceli (2003). Ωστόσο, η συγκέντρωση των πολυφαινολών στα γίγαρτα μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Kennedy *et al.*, 2000). Πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ότι το μέγεθος της ράγας έμμεσα επηρεάζει την τελική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων τόσο στους φλοιούς, όσο και στα γίγαρτα. Το μέγεθος της ράγας καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες αλλά και από τις καλλιεργητικές φροντίδες κατά τη διάρκεια της βλαστικής περιόδου. (Rodríguez-Montealegre *et al.*, 2006) Αυτό βρίσκει εφαρμογή στο δείγμα ΣΜ που παρουσίασε μικρότερο ποσοστό φαινολικών σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα της ποικιλίας μαραθεύτικο καθώς παρουσίαζε ανισορραγία.

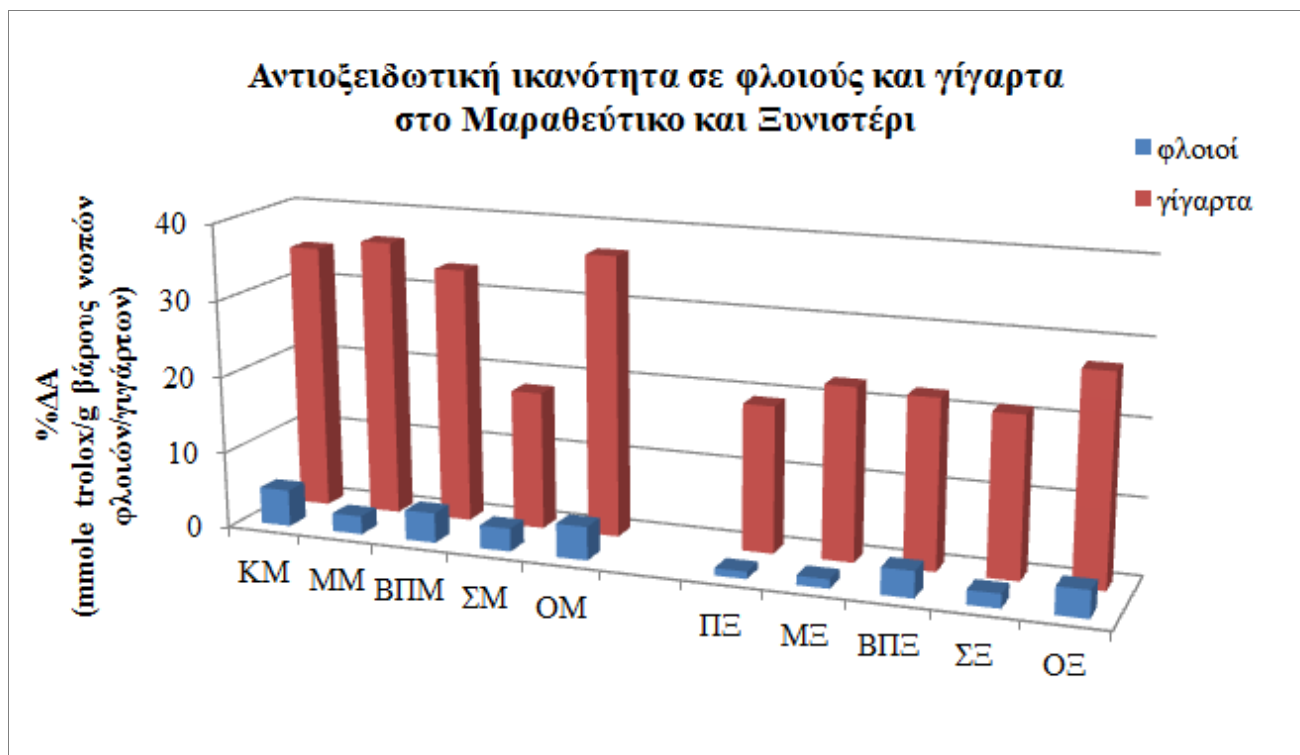


Διάγραμμα 18 Συνολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu για τους φλοιούς και τα γίγαρτα των ποικιλιών Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι.

3.3.2 Σύγκριση φλοιών και γιγάρτων για τη μέθοδο DPPH

Σε γενικές γραμμές, παρατηρήθηκε ότι η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων σταφυλιών ήταν υψηλότερη για τα γίγαρτα απ' ό τι για τους φλοιούς και στις δύο ποικιλίες που εξετάστηκαν (Διάγραμμα 19). Η διαφορά αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το μεγάλο φαινολικό περιεχόμενο των γιγάρτων και από την πλούσια περιεκτικότητα των γιγάρτων σε galloylated φλαβανόλες, ενώσεις με υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε υδατικό μέσο (Rockenbach *et al.*, 2011). Επιπλέον, οι Bordiga *et al.* (2011), αναφέρουν ότι

το φαινόμενο αυτό συμβαίνει λόγω του ότι παρουσιάζεται δυσκολία των μεγάλου μοριακού βάρους μορίων να αντιδράσουν με τη ρίζα DPPH, λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισής τους.



Διάγραμμα 19 Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH για τους φλοιούς και τα γίγαρτα των ποικιλιών Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι.

4 Συμπέρασμα

Η μελέτη αυτή είχε σκοπό να ερευνήσει και να χαρακτηρίσει τις γηγενείς ποικιλίες Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι ως προς το αντιοξειδωτικό τους περιεχόμενο, καθώς απαιτείται ενδελεχή έρευνα και ανάλυση. Το ολικό τους φαινολικό περιεχόμενο έγινε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu τόσο στους φλοιούς όσο και στα γίγαρτα και πραγματοποιείται εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους δραστηριότητας με τη δοκιμή DPPH. Ερευνήθηκε η συγκέντρωση των ανθοκυανών στους φλοιούς της ποικιλίας Μαραθεύτικο με την HPLC, ενώ ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ταννινών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο BSA. Συγκρίνοντας λοιπόν τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων, διαπιστώθηκαν αρκετά

συμπεράσματα τα οποία σχετίζονται άμεσα με τις διαφορές του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των φλοιών και των γιγάρτων καθώς επίσης και των ποικιλιών.

Τα στοιχεία που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνουν ότι οι ερυθρές ποικιλίες έχουν υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο απ' ότι οι λευκές ποικιλίες, καθώς επίσης και τα γιγάρτα σε σχέση με τους φλοιούς. Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων ακολουθεί την ίδια πορεία όπως και τα ολικά φαινολικά συστατικά, με την ποικιλία Μαραθεύτικο να παρουσιάζει υψηλότερη %ΔΑ τόσο στα γιγάρτα όσο και στους φλοιούς σε σχέση με την ποικιλία Ξυνιστέρι.

Όσον αφορά την συγκέντρωση των ανθοκυανών στα εκχυλίσματα φλοιών στο Μαραθεύτικο, αναφέρεται ότι η επικρατούσα ανθοκυάνη είναι η μαλβιδίνη και ακολουθούν σε μικρότερες ποσότητες οι πεονιδίνη, πετουνιδίνη, δελφινιδίνη και τέλος η κυανιδίνη.

Η μέθοδος BSA, έδειξε ότι η περιεκτικότητα των ταννινών στα γιγάρτα των δύο ποικιλιών μπορούν να καταβυθίσουν την πρωτεΐνη BSA, με τις πολυμερείς ταννίνες να είναι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις απ' ότι οι ολιγομερείς-μονομερείς προανθοκυανιδίνες και στις δύο ποικιλίες.

Παρ' όλο που η έρευνα καλύπτει μεγάλο μέρος για τον χαρακτηρισμό του αντιοξειδωτικού περιεχομένου των ποικιλιών Μαραθεύτικο και Ξυνιστέρι, απαιτείται περαιτέρω μελέτη σχετικά με τα επιμέρους φαινολικά συστατικά με HPLC. Οι ποικιλίες αυτές παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στο ερευνητικό κοινό, αφού είναι γηγενείς κυπριακές ποικιλίες και δεν έχουν προηγουμένα εξεταστεί.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aguirre, M. J., Chen, Y. Y., Isaacs, M., Matsuhira, B., Mendoza, L., & Torres, S. (2010). Electrochemical behaviour and antioxidant capacity of anthocyanins from Chilean red wine, grape and raspberry. *Food Chemistry*, *121*(1), 44–48.
- Ali, K., Maltese, F., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews*, *9*(3), 357–378.
- Aristidou, G. A. (1990). *Cyprus Wine*. Nicosia, Cyprus: M&M LITHOPLUS LTD.
- Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2002). Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, *15*(6), 655–665.
- Bakker, J., & Timberlake, C. F. (1985). The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *36*(12), 1315–1324.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, *99*(1), 191–203.
- Bautista-Ortín, A. B., Cano-Lechuga, M., Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E. (2014). Interactions between grape skin cell wall material and commercial enological tannins. Practical implications. *Food Chemistry*, *152*, 558–565.
- Bena-tzourou, I., & Lanaridis, P. (1997). Etude des variations des anthocyanes pendant la maturation des raisins de cinq cepages rouges, cultivés en Grèce. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 205–212.
- Bonarska-Kujawa, D., Sarapuk, J., Bielecki, K., Oszmiański, J., & Kleszczyńska, H. (2012). Antioxidant activity of extracts from apple, chokeberry and strawberry. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *62*(4), 229–234.
- Bordiga, M., Travaglia, F., Locatelli, M., Coisson, J. D., & Arlorio, M. (2011). Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chemistry*, *127*(1), 180–187.
- Boss, P. K., Davies, C., & Robinson, S. P. (1996). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes. *Plant Physiology*, *111*(1 996), 1059–1066.
- Boss, P. K., Davies, C., & Robinson, S. P. (1996). Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *2*(3), 163–170.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30.
- Bravo, L., Sources, D., & Significance, N. (2009). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, *56*(11).
- Cantos, E., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2002). Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(20), 5691–5696.

- Carando, S., Teissedre, P. L., Pascual-Martinez, L., & Cabanis, J. C. (1999). Levels of flavan-3-ols in French wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 4161–4166.
- Casassa, L. F., Keller, M., & Harbertson, J. F. (2015). Regulated deficit irrigation alters anthocyanins, tannins and sensory properties of Cabernet Sauvignon grapes and wines. *Molecules*, *20*(5), 7820–7844.
- Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., & Teissedre, P. L. (2009). Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(2), 545–553.
- Clarke, R. J., & Bakker, J. (2004). *Wine flavour chemistry*. Oxford, UK ; Blackwell Pub., c2004.
- Considine, J. A., & Knox, R. B. (1981). Tissue origins, cell lineages and patterns of cell division. *Planta*, *115*, 403–412.
- Contò, F., Vrontis, D., Fiore, M., & Thrassou, A. (2014). Strengthening regional identities and culture through wine industry cross border collaboration. *British Food Journal*, *116*(11), 1788–1807.
- Coombe, B. G. (1992). Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture*, *43*(1), 101–110.
- Coombe, B. G., & McCarthy, M. G. (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *6*(2), 131–135.
- Curko, N., Kovacevic Ganic, K., Gracin, L., Dapic, M., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2014). Characterization of seed and skin polyphenolic extracts of two red grape cultivars grown in Croatia and their sensory perception in a wine model medium. *Food Chemistry*, *145*, 15–22.
- Darra, N. El, Tannous, J., Mouncef, P. B., Palge, J., Yaghi, J., Vorobiev, E., ... Maroun, R. (2012). A comparative study on antiradical and antimicrobial properties of red grapes extracts obtained from different varieties. *Food and Nutrition Sciences*, *3*(10), 1420–1432.
- Des Gachons, C. P., & Kennedy, J. A. (2003). Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(20), 5877–5881.
- Deytieux, C., Geny, L., Lapaillerie, D., Claverol, S., Bonneau, M., & Doneche, B. (2007). Proteome analysis of grape skins during ripening. *Journal of Experimental Botany*, *58*(7), 1851–1862.
- Dourtoglou, V. G., Yannovits, N. G., Tychopoulos, V. G., & Vamvakias, M. M. (1994). Effect of Storage under CO₂ Atmosphere on the volatile, amino acid, and pigment constituents in red grape (*Vitis vinifera* L. Var. Agiorgitiko), *42*, 338–344.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., & Robinson, S. P. (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *9*(2), 110–121.

- Egoumenidou, E. (2002). From the grape to the vat: traditional buildings and installations for the production and storage of wine in Cyprus (18th - 20th century). *DOURO - Estudos & Documentos*, 13(3), 135–142.
- Esteban, M. A., Villanueva, M. J., & Lissarrague, J. R. (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(4), 409–420.
- Fernandez-Lopez, J. A., Hidalgo, V., Almela, L., & Roca, J. M. L. (1992). Quantitative changes in anthocyanin pigments of *Vitis vinifera* cv monastrell during maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58(1), 153–155.
- Geana, E. I., Dinca, O. R., Ionete, R. E., Artem, V., & Niculescu, V. C. (2015). Monitoring trans -Resveratrol in Grape Berry Skins During Ripening and in Corresponding Wines by HPLC, 53(1), 73–80.
- Geny, L., Saucier, C., Bracco, S., Daviaud, F., & Glories, Y. (2003). Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8051–8054.
- Giovinazzo, G., & Grieco, F. (2015). Functional properties of grape and wine polyphenols. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 454–462.
- Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7), 618–626.
- González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2004). Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 283–289.
- Gonzalez-San Jose, M. L., Santa-Maria, G., & Diez, C. (1990). Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region, and wine-making methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 3(1), 54–66.
- Grainger, K., & Tattersall, H. (2005). *Wine production: vine to bottle*. Blackwell.
- Gris, E. F., Ferreira, E. A., Falcão, L. D., & Bordignon-Luiz, M. T. (2007). Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. *Food Chemistry*, 100(3), 1289–1296.
- Guendez, R., Kallithraka, S., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2005). Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chemistry*, 89(1), 1–9.
- Hagerman, A. E. (2002). Protein precipitable phenolics, 1–2.
- Heredia Francia-Aricha, E.M., Rivas-Gonzalo, J.C., Vicario, I.M., and Santos-Buelga, C., F. J. (1998). Chromatic characterisation of anthocyanins from red grapes-I. pH effect. *Food Chemistry*, 63(4), 491–498.
- Herrera, J., Guesalaga, a, & Agosin, E. (2003). Shortwave near infrared spectroscopy for non-destructive determination of maturity of wine grapes. *Measurement Science and Technology*, 14(5), 689–697.

- Hixson, J. L., Bindon, K. A., & Smith, P. A. (2015). Evaluation of direct phloroglucinolysis and colorimetric depolymerization assays and their applicability for determining condensed tannins in grape marc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(45), 9954–9962.
- Hvarleva, T., Hadjinicoli, a, Atanassov, I., Atanassov, a, & Ioannou, N. (2005). Genotyping *Vitis vinifera* L. cultivars of Cyprus by microsatellite analysis. *Vitis*, *44*(2), 93–97.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., & Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(8), 589–598.
- Jackson, R. S. (2008). *Wine science : principles and applications*. Amsterdam : Elsevier, 2008.
- Jeong, S. T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S., & Esaka, M. (2004). Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*, *167*(2), 247–252.
- Johnson, H., & Robinson, J. (2004). *The world of wine*. London : Mitchell Beazley, 2005.
- Jordao, A. M., Da Silva, J. M. R., & Laureano, O. (1998). Evolution of anthocyanins during grape maturation of two varieties (*Vitis vinifera* L.), Castelao Frances and Touriga Francesa. *Vitis*, *37*(2), 93–94.
- Kallithraka, S., Aliaj, L., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2009). Anthocyanin profiles of major red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Greece and their relationship with *in vitro* antioxidant characteristics. *International Journal of Food Science and Technology*, *44*, 2385–2393.
- Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I., El-Zajouli, A., & Kefalas, P. (2001). The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chemistry*, *75*(3), 355–363.
- Kallithraka, S., Mamalos, A., & Makris, D. P. (2007). Differentiation of young red wines based on chemometrics of minor polyphenols constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 3233–3239.
- Kallithraka, S., Mohdaly, A. A.-A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2005). Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): Association with antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, *18*(5), 375–386.
- Kantz, K., & Singleton, V. L. (1990). Isolation and determination of polymeric polyphenols using Sephadex LH-20 and analysis of grape tissue extracts. *American Journal of Enology and Viticulture*, (December 1989), 223–228.
- Kennedy, J. A. (2008). Grape and wine phenolics: observations and recent findings. *Ciencia E Investigacion Agraria*, *35*(2), 77–90.
- Kennedy, J. A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E. J., & Jones, G. P. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(11), 5348–5355.
- Kennedy, J. A., Matthews, M. A., & Waterhouse, A. L. (2002). Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture*, *53*(4), 268–274.

- Kennedy, J. A., Troup, G. J., Pilbrow, J. R., Hutton, D. R., Hewitt, D., Hunter, C. R., Jones, G. P. (2000). Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 244–254.
- Kostadinovic, S., Wilkens, A., Stefova, M., Ivanova, V., Vojnoski, B., Mirhosseini, H., & Winterhalter, P. (2012). Stilbene levels and antioxidant activity of Vranec and Merlot wines from Macedonia: Effect of variety and enological practices. *Food Chemistry*, 135(4), 3003–3009.
- Krithika, V., Naik, R., & Pragalyaashree. (2015). Functional properties of grape (*Vitis vinifera*) seed extract and possible extraction techniques -A review. *Agricultural Reviews*, 36(4), 313–320.
- Kyraleou, M., Pappas, C., Voskidi, E., Kotseridis, Y., Basalekou, M., Tarantilis, P. A., & Kallithraka, S. (2015). Diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy for simultaneous quantification of total phenolics and condensed tannins contained in grape seeds. *Industrial Crops and Products*, 74, 784–791.
- Lamikanra, O., Inyang, I. D., & Leong, S. (1995). Distribution and effect of grape maturity on organic acid content of red muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (43), 3026–3028.
- Lee, J. H., & Talcott, S. T. (2004). Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 361–366.
- Lewis, M. J. (2012). Natural Product Screening: Anti-oxidant Screen for Extracts.
- Li, H., Wang, X., Li, Y., Li, P., & Wang, H. (2009). Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112(2), 454–460.
- Makris, D. P., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 396–404.
- Mattivi, F., Zulian, C., Nicolini, G., & Valenti, L. (2002). Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 37–56.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4009–4017.
- Negro, C., Tommasi, L., & Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87(1), 41–44.
- Nunan, K. J., Sims, I. M., Bacic, A., Robinson, S. P., & Fincher, G. B. (1998). Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology*, 118 (3): 783-792.
- Nunan, K., Sims, I., Bacic, A., Robinson, S., & Fincher, G. (1997). Isolation and characterization of cell walls from the mesocarp of mature grape berries (*Vitis vinifera*). *Planta*, 61, 93–100.
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, Á., López-Solís, R., Zamora-Marín, F., Ricardo-Da Silva, J. M., & Laureano, O. (2010). Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from carménère and cabernet sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3591–3599.

- Oeno. (2007). HPLC-Determination of nine major anthocyanins in red and rosé wine. *OIV Method*, 2007, 1–13.
- OIV. (2009). Folin-Ciocalteu Index.
- Orak, H. H. (2007). Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Scientia Horticulturae*, 111(3), 235–241.
- Pappas, C., Kyraleou, M., Voskidi, E., Kotseridis, Y., Taranilis, P. A., & Kallithraka, S. (2015). Direct and Simultaneous Quantification of Tannin Mean Degree of Polymerization and Percentage of Galloylation in Grape Seeds Using Diffuse Reflectance Fourier Transform-Infrared Spectroscopy. *Journal of Food Science*, 80(2), C298–C306.
- Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. G. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5331–5337.
- Pérez-Magariño, S., & González-San José, M. L. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96(2), 197–208.
- Poudel, P. R., Tamura, H., Kataoka, I., & Mochioka, R. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 622–625.
- Price, S. F., Breen, P. J., Valladao, M., & Watson, B. T. (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 187–194.
- Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339(8808), 1523.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006a). *Handbook of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments* (Vol. 2).
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006b). *Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1).
- Rinaldi, A., Jourdes, M., Teissedre, P. L., & Moio, L. (2014). A preliminary characterization of Aglianico (*Vitis vinifera* L. cv.) grape proanthocyanidins and evaluation of their reactivity towards salivary proteins. *Food Chemistry*, 164, 142–149.
- Robertson, R. P. (2014). Red wine and diabetes health: Getting skin in the game. *Diabetes*, 63(August 2013), 31–38.
- Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Rizelio, V. M., Gonçalves, A. E. de S. S., Genovese, M. I., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, 44(4), 897–901.
- Rodríguez-Delgado, M. Á., González-Hernández, G., Conde-González, J. E., & Pérez-Trujillo, J. P. (2002). Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry*, 78, 523–532.

- Rodríguez-Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacón Vozmediano, J. L., Martínez Gascueña, J., & García Romero, E. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 687–693.
- Roggero, J. P., Coen, S., & Ragonnet, B. (1986). High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(1), 77–83.
- Romeyer, F. M., Macheix, J. J., & Sapis, J. C. (1985). Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry*, 25(1), 219–221.
- Satisha, J., Doshi, P., & Adsule, P. G. (2008). Influence of rootstocks on changing the pattern of phenolic compounds in Thompson seedless grapes and its relationship to the incidence of powdery mildew. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32(1), 1–9.
- Šeruga, M., Novak, I., & Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124(3), 1208–1216.
- Setzer, W. N. (2011). Lignin-derived oak phenolics: A theoretical examination of additional potential health benefits of red wine. *Journal of Molecular Modeling*, 17, 1841–1845.
- Shikhamany, S. D. (2001). Grape production in India. *FAO*.
- Silacci, M. W., & Morrison, J. C. (1990). Changes in pectin content of Cabernet Sauvignon grape berries during maturation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(2), 111–115.
- Sioumis, N., Kallithraka, S., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2006). Kinetics of browning onset in white wines: Influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chemistry*, 94, 98–104.
- Souquet, J., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1076–1080.
- Spranger, I., Sun, B., Mateus, A. M., Freitas, V. de, & Ricardo-da-Silva, J. M. (2008). Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chemistry*, 108(2), 519–532.
- Stratil, P., Kubáň, V., & Fojtová, J. (2008). Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(4), 242–253.
- Suarez, R., Monagas, M., Bartolome, B., & Gomez-Cordoves, C. (2007). Phenolic composition and colour of *Vitis vinifera* L. cv merlot wines from different vintages and aging time in bottle. *Ciencia E Technica Vitivinicola*, 22(2), 35–44.
- Sun, B. S., Pinto, T., Leandro, M. C., Ricardo-Da-Silva, J. M., & Spranger, M. I. (1999). Transfer of catechins and proanthocyanidins from solid parts of the grape cluster into wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(2), 179–184.
- Versari, A., Laurie, V. F., Ricci, A., Laghi, L., & Parpinello, G. P. (2014). Progress in authentication, typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches. *Food Research International*, 60, 2–18.

- Villani, T. S., Reichert, W., Ferruzzi, M. G., Pasinetti, G. M., Simon, J. E., & Wu, Q. (2015). Chemical investigation of commercial grape seed derived products to assess quality and detect adulteration. *Food Chemistry*, 170, 271–280.
- Vrontis, D., & Paliwoda, S. J. (2008). Branding and the Cyprus wine industry, 16(3), 145–159.
- Vrontis, D., & Papasolomou, I. (2007). Brand and product building: the case of the Cyprus wine industry. *Journal of Product & Brand Management*, 16(3), 159–167.
- Vrontis, D., Thrassou, A., & Czinkota, M. R. (2011). Wine marketing: A framework for consumer-centred planning. *Journal of Brand Management*, 18(February 2010), 245–263.
- Weidner, S., Powalka, A., Karamać, M., & Amarowicz, R. (2012). Extracts of phenolic compounds from seeds of three wild grapevines-comparison of their antioxidant activities and the content of phenolic compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3444–3457.
- Xia, E., He, X., Li, H., Wu, S., Li, S., & Deng, G. (2013). Biological activities of polyphenols from grapes. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, 47–58.
- Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 255–260.
- Yokotsuka, K., Shimizu, T., & Shimizu, T. (1991). Polyphenoloxidase from six mature grape varieties and their activities towards various phenols. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(3), 156–162.
- Zhu, L., Zhang, Y., & Lu, J. (2012). Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3492–3510.
- Γεωργίου, Θ., & Γεωργίου, Θ. (2013). Παρουσίαση βασικών πληροφοριών σε άνεργους που ενδεχομένως να δραστηριοποιηθούν στον αμπελοοινικό τομέα της Κύπρου. Retrieved from [http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/2B60352403F5D654C2257C150041DE83/\\$file/9150_Αμπελοοινικός_Τομέας_της_Κύπρου_Παρουσίαση_σε_Άνεργους_Ιούνιος_2013.pdf?OpenElement](http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/2B60352403F5D654C2257C150041DE83/$file/9150_Αμπελοοινικός_Τομέας_της_Κύπρου_Παρουσίαση_σε_Άνεργους_Ιούνιος_2013.pdf?OpenElement)
- Κουράκου-Δραγώνα, Σ. (1998). *Θέματα οινολογίας: επιστήμη και τεχνολογία στους τομείς της οινοποιητικής τεχνικής*. Αθήνα: Εκδόσεις Τροχαλία-Γ. Τρουφάκος & ΣΙΑ Ε.Ε.
- Κυθραιώτου, Φ. (2010). *Το βιβλίο του κυπριακού κρασιού*. [Λευκωσία]: Πανεπιστήμιο Λευκωσίας, 2010.
- Νικολάου, Ν. Α. (2008). *Αμπελουργία*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Σύγχρονη παιδεία.
- Παπαδόπουλος, Κ. Δ. (2003). *Οινολογία για όλους*. Λεμεσος-Αθήνα: Κυπροέπεια, 2003.
- Σουφλερός, Ε. Η. (1997). *Οίνος και αποστάγματα: Μέθοδοι ανάλυσης*. Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου 1997.
- Σουφλερός, Ε. Η. (2000). *Οινολογία : επιστήμη και τεχνολογία*. Θεσσαλονίκη: 2000.
- Σταυρακάκης, Μ. Ν. (2013). *Αμπελουργία*. Εκδόσεις: ΤΡΟΠΗ.
- Σταυρακάκης, Μ. Ν. (2015). *Αμπελογραφία*. Εκδόσεις: ΤΡΟΠΗ.

- Συμβούλιο Αμπελοοινικών Προϊόντων. (2005). *Ποικιλιακή δομή του Κυπριακού Αμπελώνα*.
- Συμβούλιο Αμπελοοινικών Προϊόντων. (2007). *Η γηγενής ποικιλία Ξυνιστέρι και ο ρολος της στις Ονομασίες Προέλευσης της Κύπρου*.
- Συμβούλιο Αμπελοοινικών Προϊόντων. (2010). *Τα κυπριακά κρασιά δηλώνουν ηχηρό παρόν*.
- Τμήμα Γεωργίας. (2004). *Οι Οινοποιήσιμες Ποικιλίες του Κυπριακού Αμπελώνα*.
- Τμήμα Γεωργίας. (2008). Παρουσίαση ντόπιων οινοποιήσιμων ποικιλιών της αμπέλου. Αμπελοοινικά χαρακτηριστικά.
- Τσέτουρας, Π. Λ. (2009). *Η τέχνη της αμπελοουργίας: Αμπέλι οινοποιίας*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.