



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

Εργαστήριο Αμπελολογίας

**Μελέτη και αξιολόγηση φαινολικού δυναμικού,  
αμινοξέων, ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτήρων  
γηγενών ποικιλιών αμπέλου (*Vitis Vinifera* L.) της  
ομάδας «Μαυρούδια»**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**ΜΕΛΙΤΙΝΗ Ι. ΞΕΝΑΚΗ**

Επιβλέπουσα: Επίκουρη Καθηγήτρια Α. Μπινιάρη

ΑΘΗΝΑ, 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

Εργαστήριο Αμπελολογίας

**Μελέτη και αξιολόγηση φαινολικού δυναμικού,  
αμινοξέων, ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτήρων  
γηγενών ποικιλιών αμπέλου (*Vitis Vinifera* L.) της  
ομάδας «Μαυρούδια»**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**ΜΕΛΙΤΙΝΗ Ι. ΞΕΝΑΚΗ**

Επιβλέπουσα: Επίκουρη Καθηγήτρια Α. Μπινιάρη

ΑΘΗΝΑ, 2018

## Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Μελέτη και αξιολόγηση φαινολικού δυναμικού, αμινοξέων, ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτήρων γηγενών ποικιλιών αμπέλου (*Vitis Vinifera* L.) της ομάδας «Μαυρούδια»**

ΜΕΛΙΤΙΝΗ Ι. ΞΕΝΑΚΗ

Επιβλέπουσα: Επίκουρη Καθηγήτρια Α. Μπινιάρη

Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής:

ΜΠΙΝΙΑΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ, Επίκουρη Καθηγήτρια

Εργ. Αμπελολογίας, Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια

Εργ. Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης Τεχνολογίας Τροφίμων  
& Διατροφής Ανθρώπου Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής

Εργ. Δενδροκομίας, Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν οι ποιοτικοί και ποσοτικοί χαρακτήρες των σταφυλών γηγενών οινοποιήσιμων ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) Κοτσιφάλι, Λιάτικο, Μανδηλαριά, Βερτζαμί, Κρασάτο, Σκοπελίτικο, Μαυρούδι ψιλό Καλαβρύτων, Αηδάνι και Μαυροθήρικο, που ανήκουν στην ομάδα «Μαυρούδια». Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά την τεχνολογική τους ωρίμανση, από την αμπελουργική συλλογή του Ινστιτούτου Οίνου & Αμπέλου, στην περιοχή της Λυκόβρυσης.

Σε όλες τις ποικιλίες προσδιορίστηκαν οι παρακάτω ποσοτικοί και ποιοτικοί χαρακτήρες: η περιεκτικότητα του χυμού των ραγών σε σάκχαρα με τη χρήση διαθλασιμέτρου, η ολική οξύτητα με τη χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) και η ενεργός οξύτητα (pH) με τη χρήση πεχαμέτρου. Μετρήθηκαν το βάρος πενήντα (50) ραγών, ο μέσος όρος της δύναμης πρόσφυσης των ραγών στον ποδίσκο και οι κατά μέσο όρο διαστάσεις των σταφυλών και των ραγών της κάθε ποικιλίας.

Προσδιορίστηκε ποσοτικά με χρήση φασματοφωτόμετρου η συγκέντρωση του χυμού στα αμινοξέα αργινίνη και προλίνη. Μετρήθηκαν επίσης φασματοφωτομετρικά στους φλοιούς των ραγών η περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις, ολικές φλαβονοειδείς ενώσεις, σε ολικές ανθοκυάνες, η περιεκτικότητα σε συμπυκνωμένες ταννίνες, η περιεκτικότητα σε ολικές φλαβανόλες, ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες και προσδιορίστηκαν ποσοτικά με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) οι κυριότερες ανθοκυάνες καθώς και άλλες μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις. Στα γίγαρτα έγιναν οι ίδιες μετρήσεις εκτός των ολικών ανθοκυανών και των άλλων φαινολικών ενώσεων με την HPLC.

Όλες οι ποικιλίες παρουσίασαν ικανοποιητική περιεκτικότητα σε σάκχαρα, αξιόλογη ολική οξύτητα, αυξημένη περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες και φαινολικές ενώσεις. Ξεχώρισε σε φαινολικό δυναμικό η ποικιλία Βερτζαμί με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες.

Λέξεις κλειδιά: Κοτσιφάλι, Λιάτικο, Μανδηλαριά, Βερτζαμί, Κρασάτο, Σκοπελίτικο, Μαυρούδι ψιλό Καλαβρύτων, Μαύρο Αηδάνι και Μαυροθήρικο, *Vitis vinifera* L., αμινοξέα, φαινολικές ενώσεις, ανθοκυάνες, ταννίνες, φλαβονοειδή, φλαβανόλες, φλαβονόλες, φλοιοί, γίγαρτα, HPLC

# «Analysis of phenolic profile, aminoacids and some qualitative and quantitative characters of the grapes of indigenous Greek grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) using HPLC and Spectrophotometric Analyses»

## Abstract

This study was conducted in the Laboratory of the Viticulture Department of the Agricultural University of Athens in the year 2016-2017, aiming to assay the polyphenolic content of nine red indigenous Greek grapevine varieties ('Kotsifali', 'Liatiko', 'Mandilaria', 'Vertzami', 'Krasato', 'Skopelitiko', 'Black thin of Kalavrita', 'Aidani' and 'Mavrothiriko') along with their aminoacids content. All studied varieties were cultivated in the same region and under the same practices.

The following measurements were conducted on the harvesting ripeness level (technological maturity) for all varieties: the sugar content of the pulp using refractometer, the total titratable acidity (grams of tartaric acid/l) using a sodium hydroxide solution (NaOH) and the pH units using a pH-meter. Specific mechanical analysis of the grape clusters and berries were performed such as: the weight of fifty (50) berries, the average berry mean adhesion force and the average dimensions of the berries and the cluster of each cultivar.

The content of the juice in the amino acids arginine and proline was quantitatively determined by spectrophotometric analyses. Additional measurements were performed in grape skins: the concentration of total phenolic compounds, total flavonoids, total anthocyanins, the condensed tannins concentration, the concentration of total flavanols, total flavons and flavonols. Individual phenolic compounds were quantitatively determined in grape skins, of every cultivar, by HPLC method. The above measurements were conducted in grape seeds too, except of the total anthocyanins concentration and the quantitative determination by HPLC method.

The samples of all cultivars performed an average sugar content as well as the total acidity levels were normal. Despite the fact that anthocyanins and phenolic compounds content was in high levels for all cultivars, statistically significant differences were recorded among them.

These unexploited rare indigenous cultivated varieties contained appreciable amounts of non-colored phenols as well as anthocyanins, proving that they are worthy of further study and use for the production of quality wines by performing appropriate viticulture practices and accept different vinification and maceration methods.

Keywords: Kotsifali, Liatiko, Mandilaria, Vertzami, Krasato, Skopelitiko, Black thin of Kalavrita, Aidani, Mavrothiriko, *Vitis vinifera* L., phenolic compounds, anthocyanins, tannins, flavonoids, flavanols, flavonols, skins, seeds, aminoacids, HPLC.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αμπελολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών των συνεργαζόμενων τμημάτων Επιστήμης Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου και Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια Εργαστηρίου Αμπελολογίας κυρία Αικατερίνη Μπινιάρη, επιβλέπουσα της παρούσας μελέτης, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη, τη φιλική διάθεση και την πολύτιμη καθοδήγησή της, όσες φορές της ζητήθηκε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησής της.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κυρία Σταματίνα Καλλίθρακα, Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου και τον κύριο Ιωάννη Παπαδάκη Επίκουρο Καθηγητή Δενδροκομίας, για τη βοήθειά τους στην ολοκλήρωσή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο καθηγητή κύριο Μ. Ν. Σταυρακάκη για την καθοδήγηση και το ενδιαφέρον του καθώς και την κυρία Δέσποινα Μπούζα, μέλος ΕΔΙΠ του εργαστηρίου για τις συμβουλές της κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης αλλά και για την στήριξή της κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα πρέπει να αποδοθούν επίσης στον υποψήφιο διδάκτορα Δασκαλάκη Ιωάννη για την αμέριστη βοήθειά του και την υπομονή που επέδειξε, αλλά και τον συμφοιτητή μου Ορέστη Γερογιάννη, χωρίς τους οποίους η διεξαγωγή της παρούσας μελέτης θα ήταν πιο δύσκολη.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1.1	ΤΜΗΜΑΤΑ ΣΤΑΦΥΛΗΣ	2
1.1.2	ΜΟΡΦΟΛΟΦΙΑ ΡΑΓΑΣ	2
1.1.3	ΜΕΓΕΘΟΣ ΡΑΓΑΣ	6
1.1.4	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΡΑΓΩΝ	7
1.1.4.1	ΣΤΑΔΙΟ Ι – ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΑΣΙΝΗΣ ΡΑΓΑΣ	8
1.1.4.2	ΣΤΑΔΙΟ ΙΙ – ΠΕΡΚΑΣΜΟΣ (ΓΥΑΛΙΣΜΑ)	8
1.1.4.3	ΣΤΑΔΙΟ ΙΙΙ – ΣΤΑΔΙΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ	9
1.1.5	ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ	10
1.1.6	ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΛΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΜΠΕΛΟ	11
1.1.7	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΛΕΥΚΟΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΟΙΝΟ	13
1.1.8	ΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ	13
1.1.9	ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ	15
1.1.9.1	ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	16
1.1.9.1.1	ΦΛΑΒΟΝΕΣ-ΦΛΑΒΟΝΟΛΕΣ	16
1.1.9.1.2	ΦΛΑΒΑΝΟΛΕΣ-ΤΑΝΝΙΝΕΣ	18
1.1.9.1.2.1	Ο ΡΟΛΟΣ ΚΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΦΛΑΒΑΝΟΛΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ	21
1.1.9.1.2.2	ΟΙ ΤΑΝΝΙΝΕΣ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ	22
1.1.9.1.3	ΑΝΘΟΚΥΑΝΕΣ	23
1.1.9.1.3.1	Ο ΡΟΛΟΣ ΚΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ	25
1.1.9.1.3.2	ΟΙ ΑΝΘΟΚΥΑΝΕΣ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ	26
1.1.9.2	ΜΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	27
1.1.9.2.1	ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ	27
1.1.9.2.1.1	ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΑ ΟΞΕΑ	28
1.1.9.2.1.2	ΥΔΡΟΞΥΚΙΝΝΑΜΩΜΙΚΑ ΟΞΕΑ	29
1.1.9.2.2	ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ	30
1.1.10	ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	32
1.1.11	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	36
1.1.11.1	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	36
1.1.11.2	ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ	37

1.1.11.3 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΚΙ ΕΔΑΦΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	38
1.1.11.4 ΥΔΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	39
1.1.11.5 ΛΙΠΑΝΣΗ	40
1.1.11.6 ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	41
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	42
2.1 ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	42
2.2 ΑΜΠΕΛΩΝΑΣ	42
2.3 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΡΑΓΩΝ	42
2.4 ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΑΦΥΛΗΣ ΚΑΙ ΡΑΓΑΣ	43
2.4.1 ΒΑΡΟΣ ΣΤΑΦΥΛΗΣ	43
2.4.2 ΜΗΚΟΣ ΚΑΙ ΠΛΑΤΟΣ ΣΤΑΦΥΛΗΣ	43
2.4.3 ΜΕΣΟ ΒΑΡΟΣ ΡΑΓΑΣ	43
2.4.4 ΜΕΣΟ ΜΗΚΟΣ ΚΑΙ ΠΛΑΤΟΣ ΡΑΓΑΣ	43
2.4.5 ΔΥΝΑΜΗ ΠΡΟΣΦΥΣΗΣ ΡΑΓΑΣ	44
2.5 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΓΛΕΥΚΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ	44
2.5.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (°BRIX) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΘΛΑΣΙΜΕΤΡΟΥ	44
2.5.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ-PH	44
2.5.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ	45
2.5.3.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	45
2.5.3.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	46
2.5.3.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	46
2.5.3.4 ΈΚΦΡΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	46
2.6 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΓΛΕΥΚΟΥΣ	47
2.6.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ ΣΤΟ ΓΛΕΥΚΟΣ	47
2.6.1.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	47
2.6.1.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	47
2.6.1.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	48
2.6.1.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	48
2.6.1.5 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ	49
2.6.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΛΙΝΗΣ ΣΤΟ ΓΛΕΥΚΟΣ	49
2.6.2.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	49
2.6.2.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	50



2.6.2.3	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	50
2.6.2.4	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	50
2.6.2.5	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΛΙΝΗΣ ΣΤΟ ΓΛΕΥΚΟΣ ΤΩΝ ΡΑΓΩΝ	51
2.7	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΦΛΟΙΟΥΣ, ΣΤΑ ΓΙΓΑΡΤΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΓΛΕΥΚΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ	51
2.7.1	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	51
2.7.1.1	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΛΟΙΩΝ	51
2.7.1.2	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΓΙΓΑΡΤΩΝ	53
2.7.1.3	ΑΡΑΙΩΣΗ	54
2.7.2	ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ILAND	55
2.7.2.1	ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	55
2.7.2.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	55
2.7.2.3	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	56
2.7.2.4	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	56
2.7.2.5	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΟΛΙΚΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ ΚΑΙ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	57
2.7.2.5.1	ΟΛΙΚΕΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΕΣ	57
2.7.2.5.2	ΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	57
2.7.3	ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΩΝ ΤΑΝΝΙΝΩΝ ΜΕ METHYL CELLULOSE (ΜΕΘΥΛΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ)	58
2.7.3.1	ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	58
2.7.3.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	58
2.7.3.3	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	59
2.7.3.4	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΩΝ ΤΑΝΝΙΝΩΝ ΜΕ METHYL CELLULOSE	60
2.7.4	ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟΥ ΑΡΓΙΛΙΟΥ (ALCL <sub>3</sub> )	60
2.7.4.1	ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	60
2.7.4.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	60
2.7.4.3	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	61
2.7.4.4	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	61
2.7.4.5	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	61

2.7.5	ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΑΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ 4-ΔΙΜΕΘΥΛ-ΑΜΜΙΝΟΚΙΝΝΑΜΩΜΙΚΗ ΑΛΔΕΥΔΗ (4-DMACA) (174)	62
2.7.5.1	ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	62
2.7.5.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	62
2.7.5.3	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	63
2.7.5.4	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΑΝΟΛΩΝ	63
2.7.6	ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΩΝ ΚΑΙ ΦΛΑΒΟΝΟΛΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟΥ ΑΡΓΙΛΙΟΥ ( $AlCl_3$ )	64
2.7.6.1	ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	64
2.7.6.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	64
2.7.6.3	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	64
2.7.6.4	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	64
2.7.6.5	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΩΝ ΚΑΙ ΦΛΑΒΟΝΟΛΩΝ	65
2.8	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ HPLC ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ	66
2.8.1	ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ	66
2.8.2	ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΜΟΝΟΜΕΝΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ	67
2.8.2.1	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ HPLC	67
2.8.2.2	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	68
2.8.2.3	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	70
2.8.2.4	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ	70
2.8.3	ΜΕΤΡΗΣΗ ΥΠΟΛΟΙΠΩΝ ΜΕΜΟΝΟΜΕΝΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	71
2.8.3.1	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ HPLC	71
2.8.3.2	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	72
2.8.3.3	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	73
2.8.3.4	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	74
2.9	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	76
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
3.1	ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΡΑΓΑΣ & ΣΤΑΦΥΛΗΣ	76
3.2	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΓΛΕΥΚΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ	79
3.3	ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ & ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	81
3.4	ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ & ΟΛΙΚΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ	83
3.5	ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΩΝ ΤΑΝΝΙΝΩΝ	85

3.6	ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ & ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΑΝΟΛΩΝ	86
3.7	ΜΕΤΡΗΣΗ ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	90
3.8	ΜΕΤΡΗΣΗ ΥΔΡΟΞΥΚΙΝΝΑΜΩΜΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	91
3.9	ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ & ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΑΛΔΕΨΔΩΝ	93
3.9.1.1	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	94
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	100
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	102

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

Η μακράιωνη οινική ιστορία της Ελλάδας από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα, άρρηκτα συνδεδεμένη μέσω της αμπελοκαλλιέργειας και της παραγωγής οίνων με τον πολιτισμό, σημείωσε πολλές διακυμάνσεις, επιτυγχάνοντας παρά τις αντιξοότητες την διαχρονική της παρουσία και εξέλιξη. Τα τελευταία 15 έτη οι ελληνικές αυτόχθονες ποικιλίες λαμβάνουν πια ενεργά μέρος σε αυτήν την εξέλιξη, καθώς σταδιακά αναγνωρίζεται το ποιοτικό τους δυναμικό και στρεφόμενη η ελληνική αγορά στις εξαγωγές, μπορεί να ανταγωνιστεί με αυτές διεθνείς, ήδη αναγνωρισμένες ποιοτικά ποικιλίες, ακολουθώντας την παγκόσμια αναπτυσσόμενη οινική βιομηχανία. Στη συνέχιση της εξωστρεφούς πορείας των γηγενών ποικιλιών, καθολικό ρόλο θα διαδραματίσει η περαιτέρω ακαδημαϊκή έρευνα και ο πειραματισμός των ίδιων των οινοπαραγωγών προς διασφάλιση της βελτίωσης ιδιαίτερος των οινοποιήσιμων γηγενών ποικιλιών αμπέλου και των διαφορετικών βιότυπων τους, αλλά ταυτόχρονα και της διατήρησης του γενετικού τους υλικού.

Στις εγχώριες αμπελογραφίες (Κριμπάς-1943, Λογοθέτης-1966) και στον Εθνικό Κατάλογο ποικιλιών αναφέρονται περισσότερες από 300 ελληνικές ποικιλίες με τα συνώνυμα τους, από τις οποίες μόνο συγκεκριμένες παρουσιάζαν μέχρι σήμερα οινοποιητικό ενδιαφέρον και ακόμα λιγότερες είναι καλλιεργημένες σε παραγωγικούς εμπορικά αμπελώνες. Η σχετικά πρόσφατη τάση οινοποίησης γηγενών ποικιλιών αμπέλου χρήζει μεγάλης σχολαστικότητας, συνέπειας και ποιοτικής αξιολόγησης των χαρακτήρων τους λόγω πολυκλωνικότητας και ποικιλομορφίας.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ερυθρές γηγενείς ποικιλίες, με διακριτές διαφορές στη φαινολική τους σύσταση, παραμένοντας σε μεγάλο βαθμό ανεξερευνήτες, πλην ελαχίστων περιπτώσεων όπως το Ξινόμαυρο και το Αγιωργίτικο. Η διαμόρφωση της φαινολικής σύστασης εξαρτάται από την ποικιλία (γενότυπος), από το μικροκλίμα της περιοχής (θερμοκρασία, έδαφος, βροχοπτώσεις, ηλιοφάνεια) και τις ποικίλες αμπελοκομικές τεχνικές. Η παραγωγή ερυθρών οίνων ποιότητας με δυναμικό παλαίωσης, πέραν της φαινολικής σύστασης της πρώτης ύλης που διαμορφώνεται στον αμπελώνα, είναι στενά συνδεδεμένη και με τις τεχνικές οινοποίησης και της μετέπειτα ωρίμανσης. Η γνώση της σύστασης και της μορφολογίας της πρώτης ύλης, δίνει την δυνατότητα της βέλτιστης αξιοποίησης των διαφορετικών τμημάτων τως ραγών της σταφυλής και της χημικής σύστασης αυτών.

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή σκοπό έχει την ανάλυση της φαινολικής σύστασης εννέα ερυθρών γηγενών ποικιλιών αμπέλου, που ανήκουν στην ομάδα «Μαυρούδια». Οι ποικιλίες που συμμετείχαν στην μελέτη αυτή, δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς στο παρελθόν ως προς το φαινολικό τους δυναμικό. Μελλοντική επανάληψη των αναλύσεων θα συμβάλλει στην καταγραφή-χαρακτηρισμό των δυνατοτήτων τους (varietal profiling) και στην αξιοποίηση των δεδομένων με στοχευμένη αμπελουργική διαχείριση, αποσκοπώντας σε υψηλότερη ποιότητα πρώτης ύλης.

### 1.1.1 ΤΜΗΜΑΤΑ ΣΤΑΦΥΛΗΣ

Το σταφύλι αποτελεί τον καρπό του φυτού της αμπέλου, του βοτανικού γένους *Vitis* και του είδους *Vinifera* L., που περιλαμβάνει περί τις 10.000 διαφορετικές ποικιλίες. Ως πρώτη ύλη έχει καθοριστικό ρόλο στη σύσταση, τον τύπο και την ποιότητα του παραγόμενου οίνου.

Κάθε σταφυλή (βότρυς) απαρτίζεται από:

- Το ξυλώδες μέρος που ονομάζεται βόστρυγας και αποτελεί το 3-7 % κ.β. της σταφυλής.
- Τις ράγες οι οποίες αποτελούν το 93-97% κ.β. της σταφυλής (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

### 1.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΦΙΑ ΡΑΓΑΣ

Ο καρπός της αμπέλου είναι πραγματική ράγα καθώς αποτελείται αποκλειστικά από ιστούς της ωθήκης. Είναι σαρκώδης καρπός σε όλο του το βάθος και αποτελείται από:

- Τον φλοιό που συνιστά το περικάρπιο
- Τη σάρκα που διαχωρίζεται σε μεσοκάρπιο και ενδοκάρπιο
- Τα γίγαρτα που περιβάλλονται από το ενδοκάρπιο

Ο φλοιός αποτελεί κατά μέσο όρο 15% του συνολικού βάρους της ράγας και περιέχει τις κύριες και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις, μείζονος οργανοληπτικής σημασίας. Χωρίζεται εξωτερικά προς το εσωτερικό της ράγας στην εφυμενίδα, την επιδερμίδα και την υποδερμίδα. Επίσης φέρει στομάτια των οποίων η δραστηριότητα μειώνεται κατά την πορεία ωρίμανσης των ραγών (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

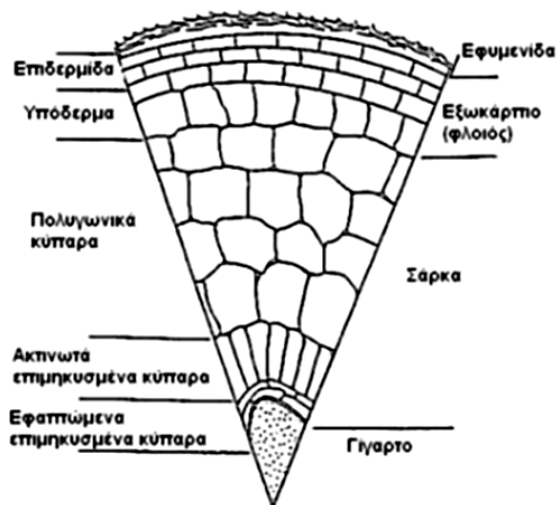
Η εφυμενίδα αποτελεί το εξωτερικό τοίχωμα των κυττάρων της επιδερμίδας του φλοιού και καλύπτεται από κηρώδεις ουσίες, καλούμενες και ως κέρινη ανθηρότητα, η οποία εμφανίζεται όταν η ανάπτυξη της ράγας φθάσει το μέγεθος μπιζελιού. Η κέρινη ανθηρότητα αποτελείται από λιπαρά οξέα, κυρίως ολεανικό οξύ (79%), αλκοόλες, ίχνη εστέρων και αλδεύδες. Οι ουσίες αυτές εμποδίζουν την απώλεια αλλά και την είσοδο

ύδατος, συντελούν στην ταχεία απομάκρυνση της βροχής, προφυλάσσουν μερικώς τις ράγες από προσβολές των εντόμων και μυκητολογικών ασθενειών, συμβάλλουν στον περιορισμό των μηχανικών ζημιών και των εγκαυμάτων των ραγών από τον ήλιο, συγκρατούν τους ζυμομύκητες και περιέχουν συστατικά με μεγάλη θρεπτική αξία για αυτούς (Σταυρακάκης, 2013). Το πάχος και η δομή της κέρινης ανθηρότητας επηρεάζονται από τον γενότυπο και το περιβάλλον, επομένως και οι προστατευτικές της λειτουργίες ποικίλουν από χρονιά σε χρονιά.

Η επιδερμίδα αποτελείται από πεπλατυσμένα δισκοειδή κύτταρα που διατάσσονται σε μία έως δύο στιβάδες και είναι μη φωτοσυνθετικά. Το πάχος των επιδερμικών κυττάρων συσχετίζεται θετικά με την αντοχή στις καταπονήσεις και στις προσβολές από εχθρούς και ασθένειες και εξαρτάται από την ποικιλία της αμπέλου. Επί της επιδερμίδας διαφόρων ποικιλιών σχηματίζονται φακίδια, καστανά στίγματα τα οποία φελλοποιούνται στην πορεία της ωρίμανσης της ράγας (Κουράκου-Δραγώνα, Θέματα Οινολογίας, 1998)

Η υποδερμίδα βρίσκεται εσωτερικά της επιδερμίδας και αποτελείται από 10 – 17 στοιβάδες πεπλατυσμένων πάλι κυττάρων, μεγαλύτερων αυτών της επιδερμίδας, ο αριθμός των οποίων διαφέρει σε κάθε ποικιλία. Από τις στοιβάδες αυτές, οι 2-3 πρώτες περιέχουν τις ανθοκυάνες, χρωστικές στις οποίες οφείλεται το χρώμα των ερυθρών σταφυλιών. Τα κύτταρα αυτά όταν ακόμα είναι νεαρά είναι φωτοσυνθετικά ενεργά και σταδιακά χάνουν το άμυλο και την χλωροφύλλη τους και συσσωρεύουν μικροποσότητες αρωματικών ελαίων και φλαβονοειδών, προχωρώντας η ανάπτυξή τους προς τον περκασμό (Wine science). Να σημειωθεί πως εξαίρεση αποτελούν ορισμένες «βαφικές» ποικιλίες, οι οποίες περιέχουν χρωστικές ουσίες και στην σάρκα τους. Τα φαινολικά συστατικά του φλοιού αποτελούν το 30% του συνόλου των φαινολικών ενώσεων της ράγας (Watson B. , 2003).

Το μεσοκάρπιο ή αλλιώς σάρκα αποτελείται από 25-30 στιβάδες κυττάρων με λεπτές μεμβράνες, μεγάλα χυμοτόπια που περιέχουν τον κυτταρικό χυμό και αποτελεί σχεδόν 80% του συνολικού βάρους της ώριμης ράγας. Η σάρκα περιέχει νερό (65 - 80%), σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη (10 - 30%), οργανικά οξέα (κυρίως τρυγικό, μηλικό και κιτρικό), ανόργανα κατιόντα μετάλλων (κυρίως καλίου), αζωτούχες ουσίες (πρωτεΐνες, αμινοξέα, αμμωνία), πηκτινικές ύλες (δομικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων), κάποιες αρωματικές ουσίες και φαινολικές ενώσεις. Τα φαινολικά συστατικά της σάρκας συνεισφέρουν μόνο στο 10% του συνόλου των φαινολικών συστατικών των ραγών (Watson B., 2003).



**Εικόνα1** :Οι επιμέρους ιστοί της ράγας (Ribereau-Gayon et. al.,2006)

Στο μεσοκάρπιο διακρίνονται δύο επιμέρους ζώνες με ασαφή όμως όρια μεταξύ τους, η εξωτερική κι η εσωτερική. Η πρώτη αποτελείται από μικρό αριθμό κυτταρικών στιβάδων με πολύ μεγάλα, επιμήκη, κατά την έννοια της ακτίνας, κύτταρα με παχειά τοιχώματα. Η δεύτερη στιβάδα, το ενδοκάρπιο έχει μικρότερα σχετικά κύτταρα, με παχύτερα τοιχώματα, που διατάσσονται κάθετα προς την έννοια της ακτίνας της ράγας και περικλείουν τα γίγαρτα. Στην ώριμη ράγα η διάκριση του ενδοκαρπίου είναι δυσχερής.

<b>Συστατικά φλοιών</b>	<b>Περιεκτικότητα (% κ.β.)</b>
Νερό	75 – 80
Ταννίνες	1 – 2
Όξινες ενώσεις	1 - 1.5
Ανόργανες ενώσεις	1.5 – 2
Αζωτούχες ενώσεις	1.5 – 2
Λοιπές ουσίες	10 – 15

**Πίνακας 1:** Περιεκτικότητα συστατικών των φλοιών (Σουφλερός, 2000)

<b>Συστατικά σάρκας</b>	<b>Περιεκτικότητα (% κ.β.)</b>
Νερό	65 – 80
Σάκχαρα	10 – 30
Οργανικά οξέα, Ανόργανες ενώσεις, Αζωτούχες ενώσεις, Πηκτινικές ύλες, Αρωματικές ουσίες, Ταννίνες κλπ.	5 – 6

Πίνακας 2: Περιεκτικότητα συστατικών της σάρκας (Σουφλερός, 2000)

Τα γίγαρτα είναι τα όργανα αναπαραγωγής της αμπέλου και αποτελούν το 4-5% του βάρους της ράγας. Κάθε ράγα δύναται να περικλείει έως 4 γίγαρτα, καθώς η ωοθήκη του άνθους σχηματίζεται από την ένωση δύο καρπόφυλλων και το κάθε ένα περιέχει δύο σπερματικές βλάστες προς γονιμοποίηση. Συνήθως απαντώνται 1-3, ενώ υπάρχουν ράγες που δεν περικλείουν γίγαρτα. Ο αριθμός των γιγάρτων ανά ράγα επηρεάζεται από την ποικιλία και τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν κατά την άνθιση. Οι περιπτώσεις στις οποίες έχουμε ανάπτυξη αγιγάρτων ραγών ή ραγών με γίγαρτα που στερούνται εμβρύων, οφείλονται στο φαινόμενο της εξ ερεθισμού παρθενοκαρπίας και στο φαινόμενο της στενοσπερμοκαρπίας, αντίστοιχα (Σταυρακάκης, 2013).

Μορφολογικά στα γίγαρτα διακρίνουμε το οξύ μέρος (ράμφος) και το υπόλοιπο σώμα που διαιρείται σε δύο λοβούς. Εσωτερικά της σάρκας του σώματος βρίσκεται το έμβρυο και εξωτερικά η σάρκα προστατεύεται από το κέλυφος. Τα γίγαρτα είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά (φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή, κυρίως ταννίνες), περιέχουν επιπλέον υψηλές συγκεντρώσεις ελαιωδών ουσιών (10%) και λιγότερες συγκεντρώσεις ρητινωδών συστατικών. Αποτελούν το 60% του συνόλου των φαινολικών ενώσεων των ραγών.



<b>Συστατικά</b>	<b>Περιεκτικότητα (% κ.β.)</b>
Νερό	25 – 45
Υδρογονάνθρακες	34 – 36
Ελαιώδεις ουσίες	10-15
Ταννίνες	5 –8
Αζωτούχες ενώσεις	4 - 6.5
Ανόργανες ουσίες	2 – 4
Λιπαρά οξέα	1

Πίνακας 3: Περιεκτικότητα συστατικών των γιγάρτων (Σουφλερός, 2000)

Έχει σημειωθεί ότι οι εγγίγαρτες ποικιλίες περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις αυξητικών ουσιών και αμπισσικού οξέος σε σχέση με τις αγίγαρτες, καθώς τα γίγαρτα αποτελούν έδρα σχηματισμού φυτορρυθμιστικών ουσιών. Γενικά, το μέγεθος και η σύνθεση των ραγών επηρεάζεται από την παρουσία των γιγάρτων όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των γιγάρτων τόσο μεγαλύτερου όγκου είναι η ράγα με συγκριτικά μικρότερες συγκεντρώσεις σε σάκχαρα και νιτρώδη συστατικά αλλά με μεγαλύτερα επίπεδα οξύτητας (Σταυρακάκης, 2013).

### **1.1.3 ΜΕΓΕΘΟΣ ΡΑΓΑΣ**

Το μέγεθος των ραγών μιας ποικιλίας αμπέλου καταγράφεται στο στάδιο της τεχνολογικής ωρίμανσης και εκφράζεται συμβατικά με το μέσο όρο της διαμέτρου της ράγας. Χαρακτηρίζεται ως:

- Πολύ μεγάλη, όταν  $\varnothing$  μεγαλύτερη των 24 mm
- Μεγάλη, όταν  $\varnothing$  μεγαλύτερη των 18 mm
- Μέτρια, όταν  $\varnothing$  μεγαλύτερη των 12 mm
- Μικρή, όταν  $\varnothing$  μεγαλύτερη των 8 mm
- Πολύ μικρή, όταν  $\varnothing$  μικρότερη των 8 mm

Η πλειοψηφία των ελληνικών ποικιλιών χαρακτηρίζεται από μέτριου μεγέθους ράγες. Το μέγεθος αυτό όμως είναι συμβατικό και εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων πέραν της ποικιλίας όπως ο βιότυπος-κλώνος, οι κλιματολογικές

συνθήκες, το έδαφος, η ηλικία των πρέμων, ο χρόνος του τρυγητού, η άρδευση και άλλες αμπελοκομικές τεχνικές. Έτσι από οινολογικής πλευράς μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το βάρος 50 ραγών ή εγκυρότερα 100 ραγών.

Οι «ευγενέστερες» -με τον όρο της ποιότητας- ποικιλίες παγκοσμίως έχουν μέσο βάρος ράγας 1,0-1,5 gr (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Το μικρό μέγεθος ραγών έχει νόημα ιδιαίτερος στις ερυθρές ποικιλίες, καθώς έτσι η σταφυλομάζα κατά το στάδιο της εκχύλισης βρίσκεται σε υψηλότερη ποσότητα φλοιών, εξασφαλίζοντας χρωστικές, φαινολικά παράγωγα και αρωματικές ενώσεις που κατά κύριο λόγο βρίσκονται σε αυτούς. Κατά μια έννοια οι ερυθρές ποικιλίες ποιότητας είναι μικρόρραγες, χωρίς να συνεπάγεται πως όλες οι μικρόρραγες ποικιλίες μπορούν δώσουν οίνους με φαινολικό πλούτο.

#### **1.1.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΡΑΓΩΝ**

Στις εγγύαρτες ποικιλίες, ο ρυθμός ανάπτυξης των ραγών ακολουθεί μια διπλή σιγμοειδή καμπύλη, δηλαδή χωρίζεται σε τρεις φάσεις οι οποίες καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας ως παραμέτρους το βάρος, την διάμετρο και το μήκος των ραγών (Σουφλερός, 2000). Οι τρεις φάσεις που παρατηρούνται είναι οι εξής:

- Στάδιο I : περίοδος ταχύτατης ανάπτυξης η οποία χαρακτηρίζεται από έντονη κυτταροδιαίρεση.
- Στάδιο II : περίοδος επίσχεσης του ρυθμού ανάπτυξης (lag phase) κατά την οποία μειώνεται ο ρυθμός αύξησης και ανάπτυξης των ραγών και αυξάνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των γιγάρτων.
- Στάδιο III : περίοδος ταχύτατης ανάπτυξης όπου ο ρυθμός αύξησης των ραγών ακολουθεί ανοδική πορεία μέχρι την ωρίμανση αυτών.

Στις αγίγαρτες ποικιλίες οι παραπάνω φάσεις δεν είναι ευδιάκριτες λόγω απουσίας των γιγάρτων, επέρχεται μικρή διάρκεια της φάσης II (Ribereau-Gayon P. et al., 2006).

#### **1.1.4.1 Στάδιο Ι – Στάδιο πράσινης ράγας**

Το στάδιο Ι της πρώτης ταχείας ανάπτυξης των γιγάρτων και του μεσοκαρπίου, διαρκεί 6-8 εβδομάδες περίπου, οφείλεται αρχικά στις έντονες κυτταροδιαιρέσεις και στη συνέχεια στην αύξηση των διαστάσεων των κυττάρων (Σταυρακάκης, 2013). Οι ράγες είναι σφιχτές ενώ το χρώμα τους είναι πράσινο λόγω παρουσίας της χλωροφύλλης. Παρά το γεγονός ότι οι ράγες παρουσιάζουν φωτοσυνθετική δραστηριότητα, τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης αυτής δεν αρκούν για τη θρέψη της ράγας (τα φύλλα αποτελούν την κυριότερη πηγή των απαιτούμενων συστατικών για την ανάπτυξή της). Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής η χλωροφύλλη είναι η επικρατούσα χρωστική. Στις ράγες εκδηλώνεται έντονη μεταβολική δραστηριότητα, η συγκέντρωση των σακχάρων είναι χαμηλή ενώ παρατηρείται αφομοίωση αμύλου, συσσώρευση οργανικών οξέων και έντονη αναπνευστική δραστηριότητα (Ribereau-Gayon P. et al., 2006).

#### **1.1.4.2 Στάδιο ΙΙ – Περκασμός (γυάλισμα)**

Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων παρεμποδιστών της αύξησης και μικρών συγκεντρώσεων υποκινητών της αύξησης. Ξεκινάει 35 – 80 ημέρες μετά την άνθιση και διαρκεί 7 – 40 ημέρες. Η διάρκεια του ρυθμού επίσχεσης της ανάπτυξης των ραγών εξαρτάται από την ποικιλία (πρώιμη/όψιμη, εγγίγαρτη/αγίγαρτη), τον χρόνο άνθισης, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τον ανταγωνισμό μεταξύ των οργάνων του πρέμνου (Ribereau-Gayon P. et al., 2006).

Κατά την διάρκεια του σταδίου ΙΙ παρατηρείται ταχεία ανάπτυξη του εμβρύου το οποίο προς το τέλος της φάσης αυτής αποκτά το τελικό του μέγεθος. Οι ράγες, από την άλλη, αρχίζουν να γίνονται πιο μαλακές ενώ οι χλωροπλάστες αρχίζουν να αποδιοργανώνονται σε πλαστίδια. Η ράγα χάνει προοδευτικά το πράσινο χρώμα και τη σκληρότητά της ενώ παράλληλα εμφανίζονται οι διάφορες χρωστικές επί του φλοιού. Η ράγα στο στάδιο αυτό, λειτουργεί κυρίως ως αποθηκευτικό όργανο. Το πράσινο χρώμα των ραγών στις μεν λευκές ποικιλίες περνάει στο κίτρινο, στις δε ερυθρές περνάει πρώτα στο ερυθρό ανοικτό και στη συνέχεια στο βαθύ ερυθρό. Αυτή η αλλαγή του χρώματος είναι απότομη, έτσι ώστε μια συγκεκριμένη ράγα να αλλάζει χρωματισμό σε διάστημα μίας μέρας (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

### 1.1.4.3 Στάδιο III – Στάδιο ωρίμανσης

Το στάδιο III διαρκεί 35-55 ημέρες και χαρακτηρίζεται από ταχεία αλλαγή της εμφάνισης και της δομής των ραγών. Κατά τη φάση αυτή παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των ραγών (λόγω της επιμήκυνσης των κυττάρων), μείωση της σφριγυλότητας των ραγών και αύξηση της περιεκτικότητας σε γλυκόζη, φρουκτόζη, ελεύθερα αμινοξέα (κυρίως αργινίνη και προλίνη), πρωτεΐνες και ολικό άζωτο. Οι συγκεντρώσεις των αμμωνιακών και των οργανικών οξέων (κυρίως του μηλικού οξέος) μειώνονται, αποικοδομείται η χλωροφύλλη (που βρίσκεται στο φλοιό) ενώ παρατηρείται συσσώρευση των ανθοκυανών, των χρωστικών και των αρωματικών συστατικών. Στο στάδιο αυτό, οι ράγες σχεδόν διπλασιάζουν τον όγκο τους, γεγονός που οφείλεται κυρίως στην αύξηση της εισροής νερού και σακχάρων, και στην εκ νέου μεγέθυνση των διαστάσεων των κυττάρων του μεσοκαρπίου. Ο ρυθμός αύξησης του όγκου και του βάρους των ραγών λαμβάνει μέγιστες τιμές στην αρχή του σταδίου, ακολούθως μειώνεται, και στο τέλος της περιόδου, κατά την πλήρη ωρίμανση, αυξάνει εκ νέου. Λίγο πριν από το περκασμό, η περιεκτικότητα των ραγών σε νερό ανέρχεται στο 85-90%, κατά την πλήρη ωρίμανση μειώνεται στο 75-80% και τέλος κατά την υπερωρίμανση, κατέρχεται στο 70% του νωπού βάρους των ραγών (Κοτσερίδης , 2005).



Εικόνα 2: Η πορεία ανάπτυξης των ραγών( Henrique Luis Silva de Noronha, 2008).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ωρίμανση των σταφυλιών και κατ' επέκταση την ποιότητα του οίνου μπορούν να διακριθούν σε σταθερούς των οποίων η επίδραση δεν μεταβάλλεται από έτος σε έτος και σε μεταβλητούς οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη ποιότητα μιας συγκεκριμένης παραγωγικής περιόδου. Στους σταθερούς παράγοντες περιλαμβάνονται η ποικιλία της αμπέλου, το υποκείμενο, το μεσόκλιμα και η σύσταση του εδάφους. Στους μεταβλητούς περιλαμβάνονται οι ετήσιες καιρικές συνθήκες, οι αποστάσεις φύτευσης, οι καλλιεργητικές τεχνικές καθώς και τυχόν ασθένειες (Σουφλερός, 1997).

### **1.1.5 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ**

Το μοριακό άζωτο που βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στην ατμόσφαιρα (78%) εξαιτίας της χαμηλής του χημικής δράσης, δεν δύναται να αξιοποιηθεί από τους φυτικούς οργανισμούς. Για να ενσωματωθεί στην οργανική ύλη πρέπει να δευσμευθεί, να αναχθεί και να μετατραπεί στην αμμωνιακή του μορφή (Ribereau-Gayon 2006). Έτσι το ριζικό σύστημα των πρέμων απορροφά άζωτο από το εδαφικό διάλυμα με τη μορφή των νιτρικών ιόντων ( $\text{NO}_3^-$ ) μέσω του φαινομένου της νιτροποίησης, της μετατροπής δηλαδή του κατιόντος αμμωνίου ( $\text{NH}_4^+$ ) του εδάφους σε ιόντα  $\text{NO}_3^-$  με τη δράση των αζωτοβακτηρίων. Μετά την απορρόφησή τους από τη ρίζα, μέρος των  $\text{NO}_3^-$  ανάγεται σε νιτρώδη ( $\text{NO}_2^-$ ) και τελικά σε αμμωνιακά ιόντα, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα μεταφέρεται στο βλαστό και στα φύλλα διαμέσου του ανιόντος χυμού, όπου και μετατρέπεται σε  $\text{NH}_4^+$ . Το αμμωνιακό άζωτο είτε χρησιμοποιείται απευθείας στο ριζικό σύστημα και ενσωματώνεται στην οργανική ύλη, είτε μεταφέρεται στα υπέργεια όργανα του πρέμνου. Το άζωτο αποταμιεύεται στα γίγαρτα, στις κληματίδες ή στις ρίζες σε μη τοξικές μορφές, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα αμινοξέα και τα αμιδία. Το  $\text{NH}_4^+$  αποτελεί τη βασική δομική μονάδα την οποία χρησιμοποιούν τα πρέμνα για να συνθέσουν τις οργανικές αζωτούχες ουσίες, αρχικά τα αμινοξέα, τα οποία αποτελούν και την κύρια μορφή διακίνησης και αποθησαυρισμού του N στην άμπελο (Σταυρακάκης, 2013).

Κατά το στάδιο της πράσινης ράγας, η μεταφορά του αζώτου γίνεται τόσο από τα αγγεία του ξύλου όσο και του ηθμού, με τη μορφή είτε των νιτρικών είτε της γλουταμίνης, ενώ μετά την έναρξη ωρίμανσης γίνεται μόνο από τα αγγεία του ηθμού

και κυρίως με τη μορφή της γλουταμίνης, η οποία, μόλις εισέλθει στη ράγα, μετατρέπεται με τη δράση του ενζύμου αμινοτρανσφεράση σε άλλα αμινοξέα.

Υπολογίζεται ότι περίπου το 50-60% του ολικού αζώτου των ραγών συσσωρεύεται μετά την έναρξη ωρίμανσης, κυρίως με τη μορφή των αμινοξέων και άλλων χαμηλού μοριακού βάρους πεπτιδίων, τα οποία στην πλήρη ωρίμανση αποτελούν το 50-90% των συνολικών αζωτούχων ουσιών της ράγας, ενώ το υπόλοιπο αποτελείται κατά κύριο λόγο από πρωτεΐνες, αμμωνιακά και νιτρικά άλατα (Roubelakis-Angelakis, 1991).

Από τα αμινοξέα το μεγαλύτερο ποσοστό καταλαμβάνουν η αλανίνη, η αργινίνη, το ασπαρτικό οξύ, το  $\gamma$  - αμινοβουτυρικό οξύ, η σερίνη, η προλίνη, η θρεονίνη και το γλουταμικό οξύ. Από αυτά τον κυριότερο αποταμιευτικό ρόλο στην άμπελο έχουν η αργινίνη και η προλίνη, όπου και τα δύο χρησιμοποιούνται ως δείκτες του επιπέδου του αζώτου στην άμπελο. Μεταξύ των ελεύθερων αμινοξέων, η προλίνη και η αργινίνη κυριαρχούν στο χυμό των ραγών και αποτελούν το 60-70% των αμινοξέων των ώριμων ραγών (Mullins M.G. et al., 1992).

Αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοξέων στο ξύλο, στις ρίζες και στους καρπούς κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου δείχνει πιθανή μετακίνηση αμινοξέων στα όργανα αυτά. Οι ρίζες είναι ο πλουσιότερος σε αμινοξέα ιστός καθώς και τόπος αποθήκευσης κατά τους μήνες του ληθάργου, ενώ τα φύλλα είναι ο ιστός που κυρίως παράγει αμινοξέα, ιδίως την αργινίνη. Οι ράγες δρουν ως ιστός που παράγει αμινοξέα όταν είναι πράσινες, ενώ αποθηκεύουν αμινοξέα μετά το γυάλισμα (Kliewer W.M. 1991). Στα ώριμα σταφύλια, τα αμινοξέα αντιπροσωπεύουν το 30-40% του συνολικού αζώτου. (Ribereau-Gayon et al., 2006).

### **1.1.6 Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΛΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΜΠΕΛΟ**

Η αργινίνη στις ράγες θεωρείται ότι συντίθεται εξ' αρχής από  $\text{NH}_4^+$  και δεν προϋπάρχει (Krueger R., Kliewer W.M., 1995). Το  $\text{NH}_4^+$  προέρχεται από την αναγωγή των νιτρικών ιόντων, ενσωματώνεται στο γλουταμικό οξύ με την βοήθεια του ενζύμου συνθετάση της γλουταμίνης προς σχηματισμό γλουταμίνης και ύστερα στο  $\alpha$ -κετογλουταρικό οξύ με τη δράση του ενζύμου γλουταμική αφυδρογονάση προς σχηματισμό του άλατος του γλουταμικού οξέος. Το γλουταμικό άλας μέσω

αντιδράσεων ακετυλίωσης και τρανσαμίνωσης μετατρέπεται σε ορνιθίνη, η οποία με τη δράση του ενζύμου καρβοτρανσφεράση της ορνιθίνης (OCT), το οποίο δρα σε φύλλα και ράγες, μετατρέπεται σε κιτρουλλίνη, η οποία με τη σειρά της μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από τα ένζυμα συνθετάση και λυάση του αργινοηλεκτρικού οξέος, που δρουν μόνο στα φύλλα, μετατρέπεται σε αργινίνη (Roubelakis-Angelakis A.K., Kliewer W.M., 1978).

Το αμινοξύ προλίνη συσσωρεύεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις ως αντίδραση σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως ξηρασία, αλατότητα, υψηλές θερμοκρασίες και υψηλή ένταση φωτός (Roubelakis-Angelakis A.K., Kliewer W.M., 1978). Πρόδρομη ένωση στη βιοσύνθεση προλίνης είναι το L-γλουταμινικό οξύ. Τα δύο ένζυμα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προλίνης είναι η 5-καρβοξυλική συνθετάση της πυρολλίνης (P5CR) και η καρβοξυλική αναγωγή της πυρολλίνης (P5CS) (Kishor P.B.K., Sangam S., et. al, 2005). Η προλίνη δρα ως ωσμωλύτης για τη ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης. Επίσης συνεισφέρει στην σταθερότητα των υπό-κυτταρικών δομών (π.χ. μεμβράνες και πρωτεΐνες), αλληλοεπιδρώντας με φωσφολιπίδια. Η προλίνη βοηθά στην απενεργοποίηση ελεύθερων ριζών, ως πηγή ενέργειας και αζώτου, ρυθμίζει τα εν δυνάμει δυναμικά κάτω από συνθήκες καταπόνησης και αποτελεί σημαντικό συστατικό των πρωτεϊνών στα κυτταρικά τοιχώματα.

Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη βιοσύνθεση προλίνης δεν είναι γνωστοί. Από τις ελάχιστες πληροφορίες που υπάρχουν φαίνεται πως η συσσώρευση προλίνης στα φυτά επιτυγχάνεται τόσο από βιοσυνθετικά μονοπάτια εξαρτημένα από το ABA (αμπισισικό οξύ) ή ανεξάρτητα από το ABA (Chiang H., Dandekar A. M., 1995, Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 1997, Zhu J. K., 2001). Το ABA είναι γνωστό ότι παράγεται στα φυτικά κύτταρα μετά από περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Η σύνθεση του ABA προάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την καταπόνηση και ακολουθεί σύνθεση συμβατών ωσμωλυτών, όπως η προλίνη (Zhu J. K., 2002). Η προλίνη επίσης προστατεύει τις μεμβράνες από οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από υψηλή συγκέντρωση αλάτων (Zhu J. K., 2001).

Η υδατική καταπόνηση επηρεάζει τη συγκέντρωση των αμινοξέων. Έτσι επειδή η προλίνη δρα ως σταθεροποιητής των δομών του κυττάρου και εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται η συγκέντρωσή της ως απάντηση των πρέμων στην ξηρασία. Η υψηλή συγκέντρωσή της προλίνης προσδίδει γλυκύτητα στο χυμό των

ώριμων ραγών, ενώ παράλληλα προστατεύει τα κύτταρα από ωσμωτική καταπόνηση που προκαλεί η αυξημένη συγκέντρωση των σακχάρων (Hua B., Guo W.Y., 2002).

### **1.1.6.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΛΕΥΚΟΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΟΙΝΟ**

Τα αζωτούχα συστατικά του χυμού είναι σημαντικοί μεταβολίτες των ζυμών. Η αρχική περιεκτικότητα του μούστου σε ολικό άζωτο καθώς και οι σχετικές συγκεντρώσεις των επιμέρους αζωτούχων συστατικών επηρεάζουν σημαντικά την αύξηση των κυττάρων της ζύμης, το ρυθμό της αλκοολικής ζύμωσης, τα τελικά προϊόντα που σχηματίζονται και κατά συνέπεια τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού (Van Heeswijck R., et.al. 2001). Σε μούστους με χαμηλή περιεκτικότητα σε ολικό άζωτο παρατηρήθηκαν αργές ζυμώσεις, οι οποίες είχαν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ποιοτικά υποβαθμισμένου οίνου (Bisson F.L., 1991).

Η αμμωνία και το άλας του γλουταμικού οξέος είναι εύκολα διαθέσιμες πηγές αζώτου για τις ζύμες, όμως και άλλα αζωτούχα συστατικά, όπως η αργινίνη, μπορούν να μεταβολιστούν από τις ζύμες. Η προλίνη δεν μεταβολίζεται από τις ζύμες παρά μόνο κάτω από ειδικές συνθήκες του χυμού των ραγών (Bisson F.L., 1991). Η αργινίνη που υπήρχε σε μούστους ανεπαρκούς περιεκτικότητας σε άζωτο αφομοιώθηκε σχεδόν ολοκληρωτικά από τις ζύμες, ενώ τα επίπεδα της προλίνης στο κρασί ήταν υψηλότερα από αυτά του μούστου σε όλες τις περιπτώσεις (Ough, C.S., Stashak, R.M., 1974).

### **1.1.7 ΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ**

Τα φαινολικά συστατικά περιλαμβάνουν ένα ευρύ πλήθος χημικών ενώσεων, διαφορετικών δομών και λειτουργιών και αποτελούν μια από τις βασικές κατηγορίες των δευτερογενών μεταβολιτών (Waterhouse, 2002). Απλές φαινόλες ονομάζονται οι χημικές ενώσεις που περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια ως υποκαταστάτες, ενώ πολυφαινόλες ονομάζονται οι ενώσεις που περιλαμβάνουν πολλαπλούς φαινολικούς δακτυλίους στη δομή τους (ο όρος αρωματικός δακτύλιος αναφέρεται στο βενζόλιο και στις ενώσεις που περιέχουν ένα τουλάχιστον βενζολικό δακτύλιο, η συσχέτιση του αρωματικού χαρακτήρα με την



ευχάριστη οσμή θεωρείται ατυχής). Εντούτοις, ο ορισμός αυτός δεν είναι εντελώς ικανοποιητικός, δεν περιλαμβάνει ενώσεις που δεν έχουν υδροξύλια ως υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο (και άρα αυστηρά δε μπορούν να χαρακτηριστούν ως φαινολικά), όπως το κινωμικό οξύ, αλλά έχει επικρατήσει στην οινική βιβλιογραφία να εξετάζονται από κοινού με τα φαινολικά συστατικά (Jackson, 1998).

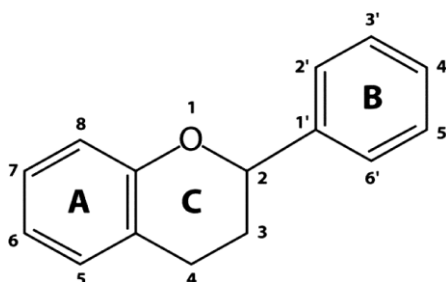
Μετά τα σάκχαρα και τα οξέα, οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν πολύ σημαντικά οργανικά συστατικά των ραγών. Αν και αποτελούν μικρό ποσοστό του βάρους των ραγών, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τους χαρακτήρες ποιότητας των σταφυλών και των παραγόμενων οίνων. Οργανοληπτικά είναι υπεύθυνα τόσο για το χρώμα και την στυφότητα των ερυθρών κρασιών, όσο και για την κιτρινωπή απόχρωση των λευκών, καθώς οι λευκές ποικιλίες δεν μπορούν να συνθέσουν ανθοκυάνες. Λειτουργούν ως φυσικά συντηρητικά του κρασιού λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής τους δράσης και παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την παλαίωση του οίνου (Ribereau-Gayon P., et al., 2006).

Τα φαινολικά συστατικά είτε μονομερή είτε πολυμερή μόρια, προέρχονται κατά κύριο λόγο από τα στερεά μέρη της ράγας, του φλοιού, των γιγάρτων και σε μικρότερη αναλογία της σάρκας. Έτσι βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους ερυθρούς και ερυθρωπούς-ροζέ οίνους, όπου εκχυλίζεται το μεγαλύτερο μέρος, ύστερα από την επαφή του γλεύκους με τα στέμφυλα. Η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών εξαρτάται από την ποικιλία, από το περιβάλλον ανάπτυξης των πρέμων, τις καλλιεργητικές τεχνικές και των στάδιο ωριμότητας των σταφυλιών (Jackson, 1998, Conde et al., 2007). Επιπλέον οι φαινολικές ενώσεις μέσω της κατανάλωσης ερυθρού οίνου, είναι υπεύθυνες για διάφορα οφέλη στον ανθρώπινο οργανισμό (όπως η προστασία από καρδιαγγειαγή νόσο) μέσω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων (Park YK, Kim JS, Kang MH. 2004, Bernatova I, Pechanova O, Babal P, Kysela S, Stvrtina S, Andriantsitohaina R., 2002). Συγκεκριμένα οι υδροξυλικές ομάδες στα μόρια των πολυφαινολών μπορούν να δεχτούν ένα ηλεκτρόνιο και να σχηματίσουν σταθερές ρίζες, σταματώντας με αυτό τον τρόπο τις αντιδράσεις οξειδωσης στα κύτταρα.

## 1.1.8 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ

Το κοινό χαρακτηριστικό των φαινολικών ενώσεων είναι η παρουσία ενός αρωματικού δακτυλίου, με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Οι φαινολικές ενώσεις διαίρούνται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των δακτυλίων φαινόλης που περιέχουν και τα δομικά στοιχεία που προσδένονται σε αυτούς τους δακτυλίους. Οι φαινολικές ενώσεις της ράγας χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τις φλαβονοειδείς φαινόλες (διφαινυλπροπανοειδή) και τις μη φλαβονοειδείς φαινόλες (φαινυλπροπανοειδή) (Ribereau-Gayon P., et al., 2006).

Οι φλαβονοειδείς φαινόλες έχουν βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα (C6-C3-C6) που είναι διατεταγμένα σε τρεις δακτυλίους με σήμανση A, B και C του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη (Gomez-Alonso S. et al., 2007). Συγκεκριμένα το μόριο τους αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους ενωμένους με πυρυλικό δακτύλιο και μπορεί να είναι ή όχι επίπεδο, ανάλογα με τους δεσμούς των τριών ατόμων άνθρακα του πυρυλίου. Οι κατηγορίες των φλαβονοειδών φαινολών διαφοροποιούνται από το βαθμό οξείδωσης και υποκατάστασης του C δακτυλίου, ενώ οι ενώσεις της κάθε κατηγορίας διαφοροποιούνται από το βαθμό υποκατάστασης των A και B δακτυλίων (Gomez-Alonso S. et al., 2007). Στην κατηγορία αυτή υπάγονται κυρίως οι φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες (ή κατεχίνες), οι ανθοκυάνες καθώς και οι προανθοκυανιδίνες (ή προκυανιδίνες) που είναι ολιγομερή των φλαβανολών και οι ταννίνες που είναι πολυμερή των φλαβανολών (Kallithraka S., Tsoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P., 2006).



**Εικόνα 3:** Βασική δομή φλαβονοειδών φαινολών (Research Gate)

Οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες χαρακτηρίζονται από τον C6-C3 σκελετό και απαρτίζονται από τα φαινολικά οξέα κι ειδικότερα τα παράγωγα του βενζοϊκού και

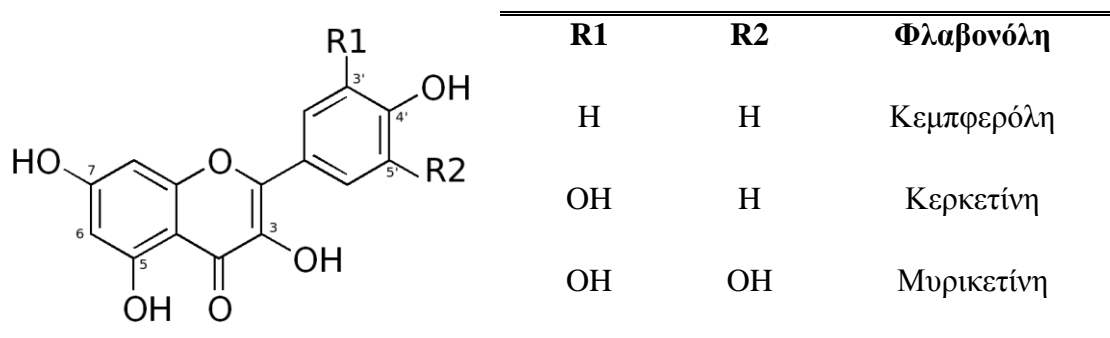
του κινναμωμικού οξέος, των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ανθράκων του δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί με υδροξυλομάδες και μεθόξυ-ομάδες, και τα στυλβένια (Kallithraka S., Tsoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P., 2006). Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα είναι το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ από τις βασικές ενώσεις του βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος αντίστοιχα με επιπρόσθετες ομάδες -OH. Τα σταφύλια και ο οίνος περιέχουν βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα. Οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται στα 100-200 g/L στους ερυθρούς οίνους και 10-20 g/L στους λευκούς (Versari, A., Laurie et al., 2014).

### 1.1.8.1 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

#### 1.1.8.1.1 Φλαβόνες-Φλαβονόλες

Στη ράγα οι ενώσεις αυτές απαντώνται με την γλυκοζυλιωμένη τους μορφή, κατά την οποία το μόριο της φαινόλης είναι ενωμένο με ένα μόριο μονοσακχαρίτη στη θέση 3 του κεντρικού δακτυλίου.

Οι **φλαβονόλες** είναι κίτρινες χρωστικές ενώσεις και διαφοροποιούνται μεταξύ τους με βάση την διαφοροποίηση των υποκαταστατών του δακτυλίου C, σε κεμπφερόλη, κερκετίνη και μυρικετίνη. Μία ακόμα φλαβονόλη που συναντάται συχνά στις ράγες είναι η ρουτίνη, η οποία προκύπτει από ένωση της κερκετίνης με τον δισακχαρίτη ρουτινόζη. Βρίσκονται στο υπόδημα του φλοιού των ραγών, στις πρώτες στοιβάδες των κυττάρων. Ποικιλίες αμπέλου με χονδρό φλοιό ή μικρόραγες (μεγάλο ποσοστό φλοιών έναντι σάρκας), περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονολών που συμβάλλουν στην σταθερότητα του χρώματος του παραγόμενου οίνου (McDonald et al., 1998).

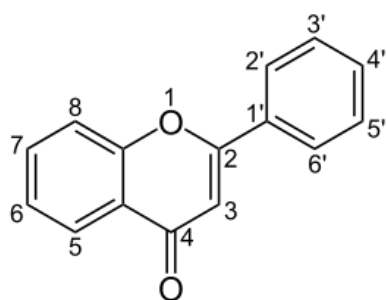


**Εικόνα 4:** Το μόριο των φλαβονολών (Research Gate)

Η περιεκτικότητα της ράγας σε κερκετίνη και μυρικετίνη εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την ποικιλία της αμπέλου, ενώ η κεμπφερόλη έχει πάντα μικρότερη περιεκτικότητα. Οι λευκές ποικιλίες αμπέλου περιέχουν ίχνη της μυρικετίνης. Κάθε ποικιλία παρουσιάζει χαρακτηριστική σύνθεση φλαβονολών (ποιοτικά και ποσοτικά), σε τέτοιο βαθμό που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση των ποικιλιών (Iacopini P., Baldi M., Storchi P., Sebastiani L., 2008). Σύμφωνα με τους Mattivi et al., 2006 η περιεκτικότητα των ραγών σε φλαβονόλες κυμαίνεται μεταξύ 2 και 30 mg/kg ράγας για τις λευκές ποικιλίες και 4 έως 78 mg/kg ράγας για τις ερυθρές ποικιλίες. Εκτός όμως από την ποικιλία και γενικότερα τους γενετικούς παράγοντες η περιεκτικότητα των ραγών σε φλαβονόλες εξαρτάται, επίσης, από το στάδιο ανάπτυξης και διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (ηλιοφάνεια, βροχοπτώσεις, θερμοκρασία κ.α.).

Η βιοσύνθεση των φλαβονολών γίνεται στα στάδια της άνθισης, του περκασμού και κυρίως κατά την διάρκεια ωρίμανσης της σταφυλής που παρουσιάζεται απότομη αύξηση της περιεκτικότητας των φλαβονολών ανά ράγα. Αντίθετα, στα στάδια που η ράγα είναι ακόμα πράσινη η ποσότητα που έχει εντοπιστεί είναι πολύ μικρή (Terrier N., Poncet-Legrand C., Cheynier V., 2009).

Οι **φλαβόνες** είναι φαινολικές ενώσεις που απαντώνται σε μια σειρά από φρούτα, λαχανικά κ.α. Συγκεκριμένα διάφοροι σπόροι δημητριακών και αρωματικά βότανα περιέχουν τις φλαβόνες λουτεολίνη και απιγενίνη. Σύμφωνα με τους Cheynier et al. (1998) ο φλοιός της ράγας μεταξύ των άλλων φαινολικών ενώσεων περιέχει και φλαβόνες.

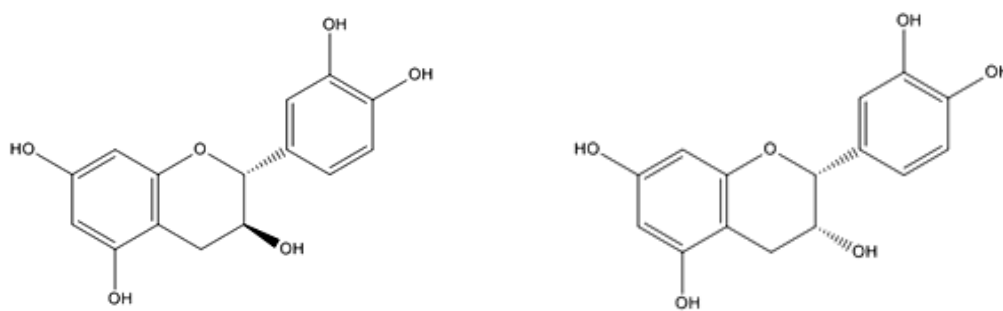


<b>Φλαβόνη</b>	<b>C3'</b>	<b>C4'</b>	<b>C5'</b>
<i>Απιγενίνη</i>	<i>H</i>	<i>OH</i>	<i>H</i>
<i>Λουτεολίνη</i>	<i>OH</i>	<i>OH</i>	<i>H</i>

**Εικόνα 5:** Το μόριο των Φλαβονών (Research Gate)

### 1.1.8.1.2 Φλαβανόλες-Ταννίνες

Οι **φλαβανόλες** της σταφυλής (ορθότερα φλαβάν-3-όλες καθώς έχουν υδροξυλιωθεί στη θέση 3 του δακτυλίου C) απαντώνται ως μονομερή, ολιγομερή, αλλά και πολυμερή. Η κυριότερη φλαβανόλη στη σταφυλή είναι η κατεχίνη που έχει δύο ασύμμετρα άτομα άνθρακα (C2 και C3), με αποτέλεσμα να δίνει 2 ισομερή *trans*, τις επονομαζόμενες (+)-κατεχίνες, και 2 ισομερή *cis*, τις λεγόμενες (-)-επικατεχίνες. Σε μικρότερο βαθμό απαντάται ο γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης [(-)-επικατεχίνη-3-gallate] (61) και η γαλλοκατεχίνη (Wang S.P., Huang K.J., 2004).



Εικόνα 6: (+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη

Οι ολιγομερείς ενώσεις των φλαβανολών αποκαλούνται **προανθοκυανιδίνες** (ή αλλιώς προκυανιδίνες) και οι πολυμερείς ενώσεις **ταννίνες**. Οι προανθοκυανιδίνες διακρίνονται σε δύο τύπους (τον Α και Β), ανάλογα με το είδος των δεσμών που γίνεται ο πολυμερισμός. Στις προανθοκυανιδίνες Β-τύπου, οι δομικές μονάδες των φλαβανολών συνδέονται με δεσμούς C4-C8 ή/και C4-C6, δίνοντας την δυνατότητα για δημιουργία διακλαδιζόμενων δομών. Ο Α-τύπος προανθοκυανιδινών προκύπτει από την διπλή σύνδεση με δεσμούς C2-O-C7 ή C2-O-C5 συμπληρωματικά των δεσμών C4-C6 ή C4-C8 (Rodriguez et al., 2006).

Τα πολυμερή τους εκτός από φλαβανόλες μπορεί να περιέχουν κι άλλες φαινόλες ως δομικές μονάδες. Ο όρος ταννίνες αναφέρεται στην ικανότητα που έχουν να αλληλεπιδρούν ή και να αντιδρούν με πρωτεΐνες και να καθιζάνουν. Για να δώσουν σταθερές ενώσεις με τις πρωτεΐνες πρέπει να είναι ογκώδεις, αλλά όχι

υπερβολικά διότι στην περίπτωση αυτή ενδέχεται να μη μπορούν να ενωθούν με τις δραστικές θέσεις των πρωτεϊνών.

Διακρίνουμε δύο κατηγορίες ταννινών, τις **συμπυκνωμένες** και τις **υδρολυόμενες**. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι συστατικά που σχηματίζονται από μεγάλου βαθμού συμπυκνωμένα προϊόντα των κατεχινών (φλαβαν-3-ολών) και 3,4-φλαβονοδιολών. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες όταν θερμανθούν και υποστούν κατεργασία με ισχυρά οξέα υδρολύονται στις ερυθρές χρωστικές ανθοκυανιδίνες και γι' αυτό ονομάζονται προανθοκυανιδίνες από μερικούς ερευνητές (Rodriguez et al., 2006). **Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αποτελούν ουσιαστικά το σώμα ενός οίνου. Αντιπροσωπεύουν το 30-60 % των ολικών φαινολικών παραγώγων και το ποσοστό τους αυξάνεται με την ηλικία του οίνου.** Οι αλυσίδες τους σχηματίζουν ένα είδος σκελετού, στον οποίο προστίθενται και άλλα μόρια, όπως πολυσακχαρίτες ανόργανα στοιχεία ή μόρια νερού. Τα χαρακτηριστικά των ταννινών είναι επομένως το M.B., ο αριθμός, ο βαθμός πολυμερισμού και το είδος των πολυμερών.

Η ομάδα έρευνας των Ribereau-Gayon κ.ά. (2000), ταυτοποίησε διαφορετικούς τύπους των ταννινών στους φλοιούς, στα γίγαρτα και στους βοστρύχους για διάφορες ποικιλίες και για τα τρία στάδια ανάπτυξης της ράγας. Βρέθηκε ότι οι ταννίνες των **γιγάρτων** είναι προκυανιδίνες με σχετικά μικρό βαθμό πολυμερισμού στο στάδιο του περκασμού, που αυξάνεται κατά την πορεία ωρίμανσης και είναι χαρακτηριστικές για την έντονη **στυπτικότητα** τους ( $DP \approx 10-30$ ). Οι ταννίνες των φλοιών έχουν πιο πολύπλοκη δομή και η μεταβολή του βαθμού πολυμερισμού είναι μικρή ( $DP \approx 1-80$ ). Είναι στην πλειονότητά τους διμερείς και τριμερείς προκυανιδίνες και κατά την πορεία ωρίμανσης βαθμιαία απενεργοποιούνται με πρωτεΐνες, χάνοντας την στυπτικότητά και επιθετικότητά τους. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι στα γίγαρτα υπήρχε η μεγαλύτερη περιεκτικότητα και κατά μέσο όρο αγγίζει το 56%. Περίπου τα δύο τρίτα της ποσότητας των κατεχινών και προκυανιδινών της σταφυλής συσσωρεύονται στα γίγαρτα (Κοτσεριδής, 2005).

Στους βοστρύχους και τους φλοιούς απαντώνται σε μικρότερο ποσοστό, περί το 20%. Υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές σχετικά με την κατανομή των φλαβανολών στα γίγαρτα (ανάλογα με τα μοριακά τους βάρη). Παρόλα αυτά έχει αναφερθεί ότι ο μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) είναι 12 κι ότι απαρτίζονται κυρίως από την (+)-κατεχίνη και την (-)-επικατεχίνη και λιγότερο από τον γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης (Σουφλερός, 2000, Kennedy-Jones, 2001).

Στους φλοιούς κυριαρχούν οι πολυμερείς ενώσεις των φλαβονολών έναντι των ολιγομερών, ενώ οι μονομερείς κατεχίνες είναι ελάχιστες. Ανάμεσα στις προανθοκυανιδίνες του φλοιού κυρίαρχες είναι η (-)-επικατεχίνη και η (-)-επιγαλλοκατεχίνη συγκριτικά με το γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης και την (+)-κατεχίνη, ενώ βρέθηκαν μικρές ποσότητες (+)-γαλλοκατεχίνης. Η αναλογία (-)-επιγαλλοκατεχίνης με την (-)-επικατεχίνη στους φλοιούς φαίνεται να εξαρτάται από την ποικιλία της αμπέλου. Επίσης, οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών διαφέρουν από εκείνες των γιγάρτων διότι έχουν χαμηλότερο ποσοστό γαλλικών εστέρων. **Η σύνθεση και ο βαθμός πολυμερισμού των προανθοκυανιδινών συνδέονται άμεσα με την ένταση της πικρής γεύσης και την αίσθηση της στυφότητας.**

Σύμφωνα πάλι με τους Ribereau-Gayon κ.ά. (2006) από έρευνες που έγιναν σχετικά με την παρουσία των προκυανιδινών σε σταφύλια, βρέθηκαν επίσης, αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις συμπλοκών **ταννινών - πολυσακχαριτών** και **ταννινών - πρωτεϊνών** που δίνουν την αίσθηση της στρογγυλότητας, ενώ ο συνδυασμός ανθοκυανών και ταννινών τους δίνει μια ιδιαίτερη πικράδα. Οι ταννίνες των βοστρύχων είναι πολυμερισμένες προκυανιδίνες με παρόμοια συμπεριφορά των ταννινών των γιγάρτων και παρόμοιας έντονης στυπτικότητας.

Οι υδρολυόμενες ταννίνες -που δεν περιέχονται στη σταφυλή αλλά μόνο στους οίνους- είναι ετερογενή πολυμερή που περιέχουν ένα σάκχαρο και άφθονα μόρια γαλλικού οξέος. Τα μόρια του γαλλικού οξέος συνδέονται στο μόριο της υδρολυόμενης ταννίνης κατά ποικίλους τρόπους. Ενώ στο μόριο της ταννίνης υπάρχει πάντα ένα σάκχαρο, το οποίο συνήθως είναι γλυκόζη, χωρίς όμως να αποκλείεται η παρουσία κάποιου άλλου σακχάρου εκτός της γλυκόζης. Γενικά το μόριο των υδρολυόμενων είναι μικρότερο από ότι των συμπυκνωμένων ταννινών και πιθανώς υδρολύονται ευκολότερα σε σάκχαρο και φαινολικά οξέα. Είναι οι κύριες εμπορικές ταννίνες που νόμιμα αναγνωρίζονται για προσθήκη στους οίνους.

Ως προς την σάρκα των ραγών των ποικιλιών της ευρωπαϊκής αμπέλου οι κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες απαντώνται μόνο σε ίχνη, όμως αποτελούν και τις κύριες πολυφαινόλες της σάρκας. Αντίθετα, στις «βαφικές ποικιλίες» η συγκέντρωση των παραπάνω ουσιών στα κύτταρα της σάρκας ανέρχεται περίπου στο 11% ή και περισσότερο.

#### 1.1.8.1.2.1 Ο ρόλος κι εξέλιξη των φλαβανολών κατά την ωρίμανση

Εξαιτίας της στυπτικότητας τους οι κατεχίνες κι οι υπόλοιπες φλαβανόλες προσδίδουν αμυντικές ιδιότητες στα φυτά έναντι των επιβλαβών εντόμων αλλά και πιθανών προσβολών από παθογόνους μύκητες (Curko et al., 2014), ενώ στους φλοιούς των ραγών προστατεύουν από την υπερϊώδη ακτινοβολία.

Η σύνθεση των φλαβανολών εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης, τις συνθήκες ανάπτυξης και διάφορους γενετικούς παράγοντες. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο γονότυπος της ποικιλίας επιδρά στη σύνθεση των προανθοκυανιδινών και στο βαθμό πολυμερισμού (mDP) των φλοιών και των γιγάρτων (Kennedy et al., 2001).

Η έκφραση των γονιδίων που επάγουν τη βιοσύνθεση των συμπυκνωμένων ταννινών στα γιγάρτα γίνεται αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και την καρπόδεση. Ο σχηματισμός των φλαβανολών έχει αυξητική πορεία μέχρι και λίγο χρόνο μετά το γυάλισμα. Έπειτα, η συγκέντρωση των μονομερών φλαβανολών μειώνεται απότομα, ενώ παρατηρείται μικρή συσσώρευση ολιγομερών προανθοκυανιδινών (Kennedy, Matthews, Waterhouse, 2000).

Στους φλοιούς, η σύνθεση των φλαβανολών γίνεται κυρίως μερικές βδομάδες μετά την άνθιση. Η συσσώρευση των προανθοκυανιδινών φαίνεται ότι ολοκληρώνεται πριν το γυάλισμα και στη συνέχεια η συγκέντρωσή τους μειώνεται (Kennedy, Matthews, Waterhouse, 2000).

Υποστηρίζεται ότι η έκθεση των ραγών στο ηλιακό φως από την καρπόδεση ως την έναρξη ωρίμανσης ενισχύει τον σχηματισμό και τη συσσώρευση των ταννινών στο φλοιό κι αυξάνει τον πολυμερισμό τους. Η αύξηση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική στις ποικιλίες με χαμηλή περιεκτικότητα σε ταννίνες, όμως η έκθεση των σταφυλών στον ήλιο φαίνεται ότι μειώνει τον βαθμό εκχύλισης των ταννινών στη διάρκεια της ωρίμανσης. Τέλος, σύμφωνα πάλι με τους Kennedy κ.ά. (2000) μετά τον περκασμό έχουμε αύξηση του πολυμερισμού των προανθοκυανιδινών και του μέσου μοριακού βάρους τους.



### 1.1.8.1.2.2 Οι ταννίνες στον οίνο

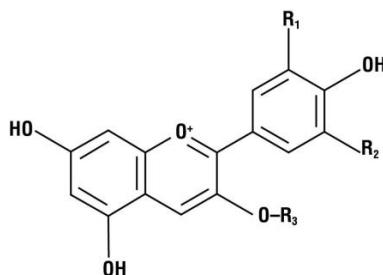
Οι φλαβανόλες είναι τα κυριότερα φαινολικά συστατικά στους ερυθρούς οίνους κι η περιεκτικότητά τους μπορεί να φτάνει σε χιλιάδες mg/L και οι προκυανιδίνες προέρχονται κυρίως από τα γιγάρτα. Συνεισφέρουν στη γεύση, στην αίσθηση της στυπτικότητας ακόμα και πικράδας, ενώ επίσης εμπλέκονται στο οξειδωτικό καφέτιασμα, στο θόλωμα και στο ίζημα που μπορεί να αναπτυχθεί στους ερυθρούς οίνους. Παρόλο που ο φυσικοχημικός μηχανισμός της αίσθησης της στυπτικότητας δεν έχει πλήρως διερευνηθεί, είναι ευρέως αποδεκτό ότι προέρχεται από την αλληλεπίδραση των ταννινών με τις πρωτεΐνες του σάλιου με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκου ταννίνης-πρωτεΐνης στη στοματική κοιλότητα. Η αίσθηση της στυπτικότητας των ταννινών γίνεται εντονότερη όσο αυξάνεται ο πολυμερισμός τους και ο βαθμός εστεροποίησης τους με το γαλλικό οξύ.

Κατά την πρώτη φάση της ερυθρής οινοποίησης, εκχυλίζεται κυρίως κατεχίνη από τους φλοιούς και στην επόμενη φάση εκχυλίζονται κατεχίνες και προκυανιδίνες από τα γιγάρτα. Η εκχύλιση εν συνεχεία από τους φλοιούς παρεμποδίζεται ( $D_p$  φλοιών >  $D_p$  γιγάρτων) καθώς συμβαίνει προσρόφηση σε στερεά μέρη, ένωση με πρωτεΐνες, οξείδωση ή πολυμερισμός. Εκχυλίζονται πιο εύκολα τα μονομοριακά φαινολικά. Τα υψηλά πολυμερισμένα εκχυλίζονται δυσκολότερα ή δεν εκχυλίζονται. Όσο αυξάνεται ο βαθμός πολυμερισμού των ταννινών (ειδικά των φλοιών) τόσο δυσχεραίνει η δυνατότητα να εκχυλιστούν από το φλοιό της ράγας στο γλεύκος, κατά συνέπεια στον οίνο η στυπτικότητα μπορεί να είναι λιγότερο έντονη. Έτσι ποικιλίες με μεγάλο αριθμό γιγάρτων ανά ράγα (Ξινόμαυρο, Μανδηλαριά) περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις προκυανιδινών. (Καλλίθρακα Σ., Σημειώσεις Χημείας 2016).

Οι ταννίνες επιδρούν και στο χρώμα των ερυθρών οίνων μέσω του φαινομένου του «συγχρωματισμού» (copigmentation) με τις ανθοκυάνες. Μέσω του φαινομένου αυτού προσδίδουν σταθερότητα στο χρώμα του οίνου κατά την διάρκεια της παλαίωσης των οίνων.

### 1.1.8.1.3 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες αποτελούν επίσης σημαντική κατηγορία φαινολικών συστατικών της σταφυλής, καθώς είναι οι ερυθρές χρωστικές στις οποίες οφείλουν το πορφυρό, ερυθρό, πορτοκαλί, κυανό ή ιώδες χρώμα τους. Στη ράγα τις εντοπίζουμε στο φλοιό. Εξαιρέση αποτελούν οι «βαφικές» ποικιλίες (π.χ. Alicante Bouschet) στις οποίες ανθοκυάνες εντοπίζονται και στη σάρκα.



<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>Ανθοκυανιδίνη</b>
OH	H	Κυανιδίνη
OH	OH	Δελφινιδίνη
OCH <sub>3</sub>	H	Παιονιδίνη
OH	OCH <sub>3</sub>	Πετουνιδίνη
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Μαλβιδίνη

<b>R<sub>3</sub></b>	<b>Μορφή</b>
H	Ανθοκυανιδίνη
Γλυκόζη	3-O-μονογλυκοζίτης
Γλυκόζη + Οξύ	3-O-ακυλομονογλυκοζίτης

**Εικόνα 7 :** Η δομή των ανθοκυανιδινών κι οι μορφές των ανθοκυανών  
(ACS chemistry of life)

Τα άγλυκα τμήματα τους λέγονται ανθοκυανιδίνες και έχουν τύπο C6-C3-C6. Έχουν τη βασική δομή του φλαβυλίου, το μόριό τους αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους, που περιβάλλουν ένα δακτύλιο πυρυλίου. Ο Α-δακτύλιος φέρει πάντα δύο φαινολικά -OH στις θέσεις -5 και -7 και ο Β-δακτύλιος ένα φαινολικό -OH στη θέση - 4'. Οι κυριότερες ανθοκυανιδίνες που έχουν εντοπισθεί στην άμπελο είναι οι δελφινιδίνη, κυανιδίνη, πετουνιδίνη, πεονιδίνη και μαλβιδίνη. Οι διαφορές μεταξύ τους περιορίζονται στον αριθμό των -OH και -OCH<sub>3</sub> των θέσεων R1 και R2, ο οποίος επηρεάζει τη σταθερότητα και το χρώμα της ανθοκυάνης. Με την αύξηση των ελεύθερων υδροξυλομάδων αυξάνεται το μπλε χρώμα, ενώ το κόκκινο ενισχύεται ανάλογα με την αύξηση του βαθμού μεθυλίωσης. Από τις ανθοκυανιδίνες των σταφυλιών και των οίνων η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη είναι οι πιο ασταθείς, λόγω των φαινολικών -OH σε ο-θέση. Αυτές οι δύο είναι και οι πρόδρομοι ανθοκυανιδίων σταθερότερων μορφών, όπως η παιονιδίνη και η μαλβιδίνη, που δεν έχουν -OH σε Ο-θέση (Kallithraka S., Tsoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P., 2006).

Οι ανθοκυάνες που έχουν ταυτοποιηθεί στο φλοιό των σταφυλών και στους οίνους του είδους *Vitis vinifera* είναι οι 3-Ο-μονογλυκοζίτες και οι 3-Ο-ακυλομονογλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών. Η ακυλίωση γίνεται στη θέση C6 του μορίου γλυκόζης (που είναι ενωμένο με το μόριο της ανθοκυανιδίνης) με εστεροποίηση με οξικό ή p-κουμαρικό ή καφεϊκό οξύ. Οι Alcalde-Eon κ.ά. (2006) αναφέρουν την ύπαρξη ακυλιομένου μορίου ανθοκυάνης με γαλακτικό οξύ σε οίνο που προήλθε από σταφυλές του είδους *Vitis vinifera*. Η χρήση αναλυτικών τεχνικών επιβεβαίωσε και την ύπαρξη 3,5-διγλυκοζιτών των ανθοκυανιδινών στους φλοιούς των ραγών ακόμα και σε ποικιλίες *Vitis vinifera*, καθώς μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι οι ανθοκυάνες με μορφή διγλυκοζίτη υπάρχουν μόνο στα «άγρια» είδη του γένους *Vitis* (Vidal S., Meudec E., Cheynier V., Skouroumounis G., Hayasaka Y., 2004). Επιβεβαίωσαν για πρώτη φορά την ύπαρξη ολιγομερών (μέχρι τριμερή) των ανθοκυανών από εκχύλισμα φλοιών ραγών. Τα ολιγομερή αυτά πιθανά να ήταν ενωμένα είτε με το δεσμό Α-τύπου (δεσμός άνθρακα-άνθρακα και αιθερικός δεσμός) είτε με Β-τύπου (δεσμός άνθρακα-άνθρακα).

Η κατανομή και συγκέντρωση των ανθοκυανών εξαρτάται από την ποικιλία, το βαθμό ωριμότητας, τις κλιματικές συνθήκες, την περιοχή καλλιέργειας και την ποσότητα της παραγωγής (Monagas M., Bartolome B., 2009.). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η μαλβιδίνη είναι η κυριότερη ανθοκυανιδίνη στις ερυθρές ποικιλίες,

φτάνοντας μέχρι και το 90% στην ποικιλία Grenache και σχεδόν 50% στην ποικιλία Sangiovese. Η ποσότητα των ακυλιωμένων ανθοκυανών καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από την ποικιλία και για παράδειγμα μπορεί να απουσιάζουν τελείως από ορισμένες ποικιλίες όπως το Pinot noir. Η αναλογία των ανθοκυανιδίων, η αναλογία των διαφόρων μορφών των ανθοκυανών, η περιεκτικότητα της κάθε μίας αλλά και του συνόλου τους είναι χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ταξινομικά κριτήρια των ποικιλιών (Guerra C., Vivas N., 2001).

#### **1.1.8.1.3.1 Ο ρόλος κι εξέλιξη των ανθοκυανών κατά την ωρίμανση**

Ο σχηματισμός και η συσσώρευση των ανθοκυανών σηματοδοτεί την έναρξη ωρίμανσης των ραγών με την εμφάνιση του χρώματος στο φλοιό των ραγών. Ο χρόνος και ο ρυθμός σύνθεσης και συσσώρευσης τους εξαρτάται από την ποικιλία, την ποσότητα των διαθέσιμων σακχάρων, τη θερμοκρασία, την ηλιακή ακτινοβολία, την υδατική καταπόνηση των πρέμων κ.α. Οι ακριβείς συνθήκες για την έναρξη του σχηματισμού των ανθοκυανών δεν είναι πλήρως γνωστές, αλλά φαίνεται ότι, όταν η συγκέντρωση των σακχάρων στα κύτταρα του φλοιού ανέλθει στα 9 έως 10 °Brix, ενεργοποιούνται τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών. Ο χρόνος αυτός συμπίπτει με την έναρξη απόκτησης της μαλακής υφής της ράγας και της διακοπής του σχηματισμού των φλαβονολών, αλλά δεν αποκλείεται το ερέθισμα να οφείλεται στην παρουσία ABA, η συγκέντρωση του οποίου ενισχύεται από την παρουσία σακχάρων (Ortega Meder M.D., Rivas Gonzalo J.C., et al., 1994).

Η σύνθεση των ανθοκυανών εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και ακολουθεί η συσσώρευση τους στο χυμοτόπιο των κυττάρων του φλοιού των ερυθρών ποικιλιών αμπέλου. Η πρώτη ανθοκυάνη που σχηματίζεται στους φλοιούς των ερυθρών σταφυλιών είναι η κυανιδίνη, κατά τον περκασμό της ράγας. Στην αρχή αυξάνεται η συγκέντρωσή της στη συνέχεια όμως, λόγω της ασταθούς δομής μετασχηματίζεται ταχέως μέσω ενζυμικών αντιδράσεων στις ανθοκυάνες της δελφινιδίνης και της πετουινιδίνης, οι οποίες με τη σειρά τους ως ασταθείς ενώσεις, μετατρέπονται τελικά στην ανθοκυάνη της παιονιδίνης και της μαλβιδίνης, η οποία είναι η πιο σταθερή απ' όλες και βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό για όλες της ερυθρές ποικιλίες της *Vitis vinifera*. Επομένως, κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των ερυθρών σταφυλιών, η συγκέντρωση των διαφόρων ανθοκυανών μεταβάλλεται με σημαντικές

αμπελοκομικές και οινολογικές επιπτώσεις, διότι η τελική κατανομή επηρεάζει την ένταση και τη σταθερότητα του χρώματος των παραγόμενων οίνων. Η μαλβιδίνη και η παιονιδίνη κυριαρχούν μεταξύ των λοιπών ανθοκυανιδίων (κυανιδίνη, δελφινιδίνη και πετουνιδίνη) σε όλες τις έγχρωμες ποικιλίες αμπέλου αλλά και στους παραγόμενους από αυτές οίνους.

Υποστηρίζεται ότι η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την σύνθεση των ανθοκυανών ενισχύεται από την παρουσία του ABA, ενώ παρεμποδίζεται από συνθήκες σκίασης. Η ευαισθησία του ABA στις υψηλές θερμοκρασίες (άνω των 30 °C) δίνει και μια πιθανή ερμηνεία για τη μείωση της σύνθεσης ανθοκυανών στις σταφυλές που εκτίθενται απευθείας στο ηλιακό φως (Peppi M.C., Fidelibus M.W., Dokoozlian N., 2006). Από τη μελέτη της πορείας συγκέντρωσης των ανθοκυανών και των ολικών φαινολών κατά την ωρίμανση των σταφυλών ελληνικών ποικιλιών αμπέλου διαπιστώθηκε ότι η μεν συγκέντρωση των ανθοκυανών ακολουθεί αυξητική πορεία μέχρι τα σταφύλια να φτάσουν σε ένα βαθμό ωριμότητας κι ακολούθως μειώνεται, ενώ η συγκέντρωση των ολικών φαινολών παραμένει πρακτικά σταθερή (Κοτσεριδής Γ., 2005).

#### **1.1.8.1.3.2 Οι ανθοκυάνες στον οίνο**

Τέσσερις διαφορετικές δομές ανθοκυανών υπάρχουν σε ισορροπία σε όξινο ή αλκαλικό μέσο: το κατιόν φλαβυλίου (ερυθρού χρώματος), η άνυδρη βάση (κυανού χρώματος), η ημικεταλική ψευδοβάση (άχρωμη) και η χαλκόνη (άχρωμη) (Yamane T., Jeong et al., 2006). Κατά συνέπεια το pH του μέσου καθορίζει και την απόχρωση των ανθοκυανών. Σε ισχυρά όξινο περιβάλλον οι ανθοκυάνες και ιδιαίτερα η μαλβιδίνη, έχουν ερυθρό χρώμα, όταν όμως το pH αυξάνεται και το περιβάλλον γίνεται λιγότερο όξινο αποκτούν μία άγχρωμη μορφή και αυτό το φαινόμενο μπορεί να επαναλαμβάνεται συνεχώς ανάλογα με το pH. Στο pH του οίνου, το ποσοστό της άγχρωμης μαλβιδίνης είναι σχετικά υψηλό, ενώ σε χαμηλό pH οι ερυθροί οίνοι έχουν εντονότερο χρώμα.

Σύμφωνα με τον Σουφλερό (1997) το χρώμα των νέων ερυθρών οίνων καθορίζεται κυρίως από τις ανθοκυάνες και λιγότερο από τις ταννίνες. Δεν ισχύει το ίδιο όμως με τους «γηρασμένους» οίνους των οποίων το χρώμα καθορίζεται από μια σειρά χημικών μεταβολών, όπως η οξειδωση των ανθοκυανών, η αντιδρασή τους με

τον θειώδη ανυδρίτη που προστίθεται στους οίνους αλλά και με ένωση τους με άλλες φαινολικές ενώσεις όπως οι ταννίνες.

### **1.1.8.2 Μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες που έχουν βρεθεί στα σταφύλια της αμπέλου είναι τα φαινολικά οξέα και ειδικότερα τα παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος, των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ανθράκων του δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί με υδροξυλομάδες και μεθόξυ ομάδες, και τα στυλβένια. Τις ενώσεις αυτές τις εντοπίζουμε και στους οίνους λόγω της εκχύλισης τους από τους φλοιούς και τη σάρκα των σταφυλιών ως γλυκοζίτες, αλλά και από το ξύλο των βαρελιών, όπου γίνεται η παλαίωση (Ribereau-Gayon et al.,2006).

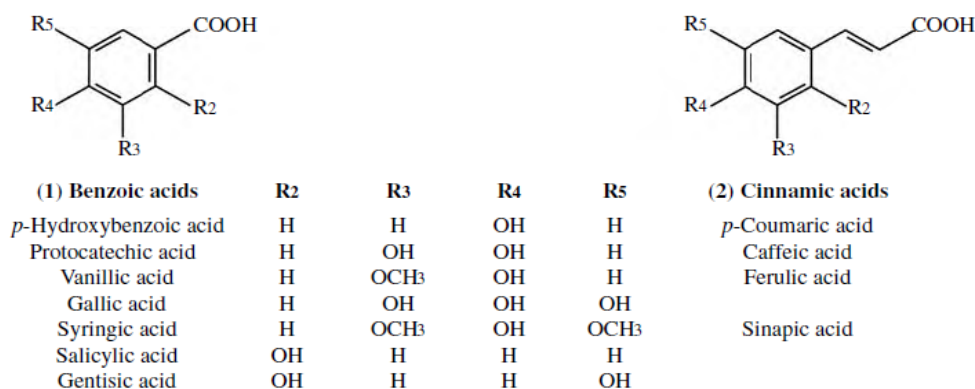
Οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες, ενώ είναι άχρωμες, βελτιώνουν και σταθεροποιούν το χρώμα των ερυθρών οίνων μέσω διαμοριακών κι ενδομοριακών αντιδράσεων και μερικές εξ αυτών (πχ. ρεσβερατρόλη) παρουσιάζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δραστηριότητα.

#### **1.1.8.2.1 Φαινολικά οξέα**

Η συγκέντρωση των φαινολικών οξέων είναι μεγαλύτερη στις ερυθρές ποικιλίες σε σχέση με τις λευκές, καθώς και στα χυμοτόπια των κυττάρων της σάρκας των ραγών (αποτελούν το κυριότερο φαινολικό συστατικό) σε σχέση με αυτά του φλοιού (Κοτσεριδής Γ., 2005). Τα φαινολοξέα απαντούν στα σταφύλια ως ετεροζίτες ή εστέρες (ταννίνες γαλλικού και ελλαγικού), όμως κατά την οινοποίηση και συντήρηση των οίνων υδρολύονται αργά, με όξινη υδρόλυση οι ετεροζίτες και με αλκαλική οι εστέρες, με αποτέλεσμα στους οίνους να βρίσκονται και σε ελεύθερη μορφή. Η συγκέντρωσή τους στους ερυθρούς οίνους κυμαίνεται σε 100–200 mg/L, ενώ στους λευκούς 10–20 mg/L (Ribereau-Gayon et al.,2006).

Είναι ενώσεις που παρουσιάζουν αντιβιοτικές και αντισηπτικές ιδιότητες, γι' αυτό χρησιμοποιούνται και στη συντήρηση των τροφίμων. Στον οίνο είναι σημαντικά καθώς επιδρούν στη μικροβιολογική του κατάσταση και κυρίως απέναντι στα

βακτηρία. Παίζουν ρόλο στην οξειδωτική μετατροπή του χρώματος των λευκών γλευκών και οίνων σε καστανό καθώς οξειδώνονται εύκολα (κυρίως το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ). Από οργανοληπτική σκοπιά τα φαινολικά οξέα δεν έχουν κανένα άρωμα. Τα σταφύλια κι οι οίνοι περιέχουν δύο κατηγορίες φαινολικών οξέων τα υδρόξυβενζοϊκά και τα υδρόξυκινναμωμικά οξέα.



**Εικόνα 8:** Φαινολικά οξέα (Handbook of Enology)

#### 1.1.8.2.1.1 Υδρόξυβενζοϊκά οξέα

Η περιεκτικότητα των υδρόξυβενζοϊκών οξέων στους οίνους παρουσιάζει μεγάλη παραλλακτικότητα καθώς εξαρτάται από την ποικιλία και τις συνθήκες ανάπτυξης του πρέμνου. Η δομή των υδρόξυβενζοϊκών οξέων χαρακτηρίζεται από τον C6-C1 σκελετό καθώς είναι παραγωγα του βενζοϊκού οξέος. Τα πιο κοινά εξ αυτών που απαντώνται στα σταφύλια και στους οίνους είναι το γαλλικό οξύ, το γεντισικό οξύ, το *p*-υδρόξυβενζοϊκό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το συρινγκικό οξύ, το σαλικυλικό οξύ και το βανιλλικό οξύ. Η διαφοροποίηση μεταξύ τους οφείλεται στους διαφορετικούς υποκατάστατες που έχει ο βενζοϊκός δακτύλιος (Monagas M., Bartolome B., Gomez-Cordoves C., 2005).

Στα σταφύλια δεν περιέχονται ελεύθερα, αλλά με τη μορφή σύνθετων χημικών ενώσεων (όπως γλυκοζιτών και εστέρων), στις οποίες φαίνεται να συμμετέχουν και ανθοκυάνες. Επίσης, ορισμένα από αυτά, όπως το γαλλικό αποτελούν βασικά συστατικά της δομής των τανινών. Στους οίνους βρίσκονται και στην ελεύθερη μορφή τους, ενώ η περιεκτικότητά τους σε αυτή τη μορφή παρουσιάζει αύξηση κατά τη διάρκεια της παλαίωσης των οίνων. Το γαλλικό οξύ

είναι αυτό που βρίσκεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ το σαλικυλικό και το γεντισικό οξύ βρίσκονται σε ίχνη (Ribereau-Gayon et al.,2006).

#### **1.1.8.2.1.2 Υδροξυκινναμωμικά οξέα**

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα έχουν σκελετό C6-C3 κι ανήκουν στην ομάδα των φαινυλπροπανοϊδών. Είναι και τα επικρατέστερα φαινολικά οξέα στο σταφύλι και βρίσκονται στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού και της σάρκας. Τα κυριότερα εξ αυτών είναι παράγωγα του καφεϊκού οξέος, του p-κουμαρικού οξέος, του φερουλικού οξέος και του σιναπικού οξέος. Τα παράγωγα τους μπορεί να βρίσκονται είτε με τη cis είτε με την trans μορφή τους. Οι trans μορφή, όμως, είναι πιο σταθερή και για αυτό απαντάται συχνότερα.

Στα σταφύλια και στους οίνους συνήθως δεν απαντώνται υπό ελεύθερη μορφή, αλλά υπό τη μορφή των εξής ενώσεων:

- με τις ανθοκυάνες μέσω εστεροποίησης, κυρίως του καφεϊκού και του p-κουμαρικού οξέος, με τη γλυκόζη του μονογλυκοζίτη προς σχηματισμό ακυλιομένων ανθοκυανών.
- και εστέρων του τρυγικού οξέος με το καφεϊκό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ. Τα εστεροποιημένα οξέα που προκύπτουν από αυτή την ένωση είναι το καφαρικό (ή καφεοϋλτρυγικό) οξύ, το κουταρικό (ή p-κουμαρυλτρυγικό) οξύ και το φερταρικό (ή φερουλυλτρυγικό οξύ) οξύ, αντίστοιχα.
- Ενώ με την ελεύθερη τους μορφή βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση (Jackson, R. S., 2008).

Στις ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου οι διαφορές των υδροξυκινναμωμικών οξέων στον χυμό της ράγας είναι κυρίως ποσοτικές. Το καφαρικό οξύ κυριαρχεί ποσοτικά έναντι του κουταρικού και φερταρικού οξέος, καθώς η περιεκτικότητα του μπορεί να φτάνει έως και 50% της συνολικής περιεκτικότητας των υδροξυκινναμωμικών οξέων. Παρομοίως, στο φλοιό της ράγας κυριαρχεί το καφαρικό οξύ, αλλά και το κουταρικό, ενώ το φερταρικό οξύ απαντάται σε μικρές ποσότητες. Η περιεκτικότητα των παραγώγων των υδροξυκινναμωμικών οξέων καθορίζονται από αρκετούς παράγοντες όπως η καλλιεργούμενη ποικιλία, οι



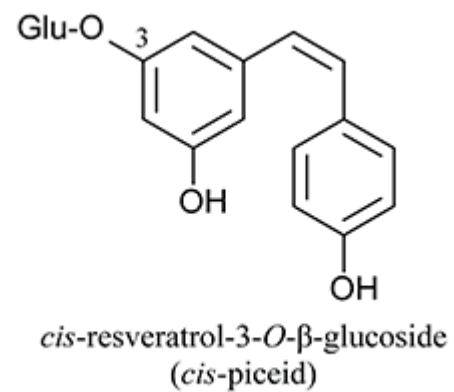
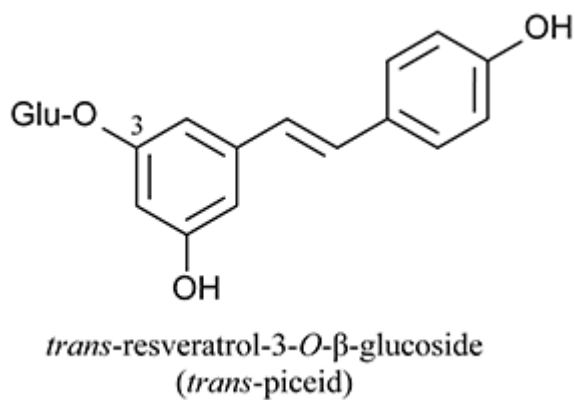
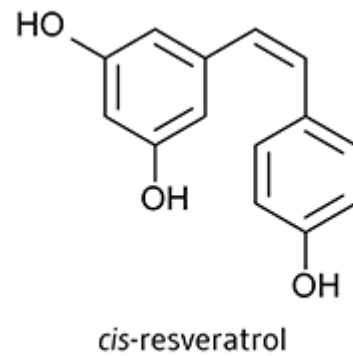
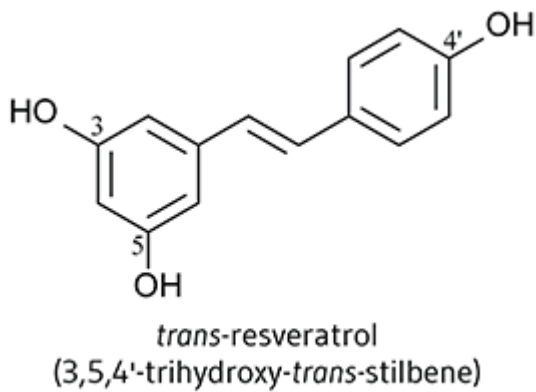
κλιματικές συνθήκες κ.α. Οι εστέρες αυτοί είναι ιδιαίτερα ευοξειδωτα συστατικά του γλεύκους και ευθύνονται για το καφέτιασμα των λευκών γλευκών (Monagas M., Bartolome B., Gomez-Cordoves C., 2005).

#### 1.1.8.2.2 Στιλβένια

Στα σταφύλια υπάρχει μία ακόμα πιο πολύπλοκη ομάδα μη φλαβονοειδών πολυφαινολών, τα στιλβένια, η οποία απαντάται και στους οίνους. Η βασική δομή τους αποτελείται από δύο βενζοϊκούς δακτύλιους που συνδέονται μεταξύ τους με μια αλυσίδα αιθανίου ή μεθανίου. Υπάρχουν σε διάφορα είδη φυτών, όμως τα σταφύλια και ο οίνος θεωρούνται η σημαντικότερη πηγή στιλβενίων για τη διατροφή του ανθρώπου, στην οποία μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο καθώς έχουν αντιοξειδωτικές κι αντικαρκινικές ιδιότητες (Buiarelli F., Coccioli F. et al., 2007).

Τα στιλβένια ανήκουν στην ομάδα των φυτοαλεξινών οι οποίες αποτελούν μηχανισμό ανοχής των φυτών σε ασθένειες, κυρίως μυκητολογικές και λιγότερο βακτηριακές. Εκτός από τις μυκητολογικές και βακτηριολογικές προσβολές, η περιεκτικότητα των στιλβενίων στις ράγες εξαρτάται από διάφορους άλλους παράγοντες όπως οι κλιματικές συνθήκες, η καλλιεργούμενη ποικιλία, η UV ακτινοβολία και η ύπαρξη ιόντων βαρέων μετάλλων. Η συγκέντρωση των φυτοαλεξινών μειώνεται μετά την έναρξη της ωρίμανσης, καθώς αυξάνει η συγκέντρωση των ανθοκυανών. Αναφέρεται σχετικά ότι σε ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου υπάρχει πολύ μικρός βαθμός συσχέτισης της περιεκτικότητας των ολικών ανθοκυανών με τις φυτοαλεξίνες ((Jeandet et al., 1995, Bourhis et al., 1996)).

Η ρεσβερατρόλη ή αλλιώς το 3,5,4'-τριυδροξυστιλβένιο αποτελεί την σημαντικότερη φυτοαλεξίνη στην άμπελο, βρίσκεται μόνο στα κύτταρα των φλοιών (σε συγκεντρώσεις 1-3 mg/L) και συντίθεται ως απάντηση σε καταπονήσεις των πρέμων, όπως, για παράδειγμα, σε προσβολές από διάφορα παθογόνα (κυρίως *Botrytis cinerea*) ή στην έντονη ξηρασία. Η ρεσβερατρόλη απαντάται στη φύση με τις παρακάτω μορφές: ως ελεύθερη μορφή με δύο ισομερή (cis και trans) και ως β-γλυκοζίτες. Οι 3-O-β-D-γλυκοζίτες της cis και trans ρεσβερατρόλης αποκαλούνται piceid (Rentzsch M., Wilkens A., Winterhalter P., 2009).



**Εικόνα 9:** Χημικές δομές ρεσβερατρόλης (Oregonstate.edu)

Οι ολιγομερείς και πολυμερείς ενώσεις των στυλβενίων αποκαλούνται βινιφερίνες και προκύπτουν από οξειδωτικό πολυμερισμό της μονομερούς ρεσβερατρόλης μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (Τζαμος Ε., 2007). Στα σταφύλια και στους οίνους έχουν ταυτοποιηθεί διάφορες πολυμερείς ενώσεις των στυλβενίων. Τέτοιες είναι τα δύο διυδροδιμερή της ρεσβερατρόλης ε-βινιφερίνη και δ-βινιφερίνη, η παλλιδόλη που είναι διμερής ένωση της ρεσβερατρόλης, η α-βινιφερίνη που είναι τριμερής ένωση της ρεσβερατρόλης και η τετραμερής της ένωση hopeaphenol (Jean-Denis J.B., Pezet R., Tabacchi R., 2006).

### 1.1.9 Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των φαινολικών ενώσεων

Ένα από τα πλέον αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά της ωρίμανσης είναι η ραγδαία συσσώρευση φαινολικών συστατικών, που δίνουν στα ερυθρά σταφύλια την οινολογική τους σημασία. Αυτές οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες του καταβολισμού των σακχάρων. Τα μεταβολικά τους μονοπάτια είναι παρόντα και μερικώς ενεργά κατά την έναρξη ανάπτυξης της ράγας (Jackson D.I., Lombard P.B., 1993).

Οι φλαβονοειδείς ενώσεις έχουν δύο βενζοϊκούς δακτύλιους ενωμένους με μία αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα, συνήθως σε οξυγονωμένη ετεροκυκλική μορφή (πυρύλιο). Ο ένας βενζοϊκός δακτύλιος προκύπτει από συμπύκνωση τριών μορίων ακέτυλο συνένζυμου Α (CoA), που προέρχονται από τις αντιδράσεις του κύκλου του Krebs. Ο άλλος βενζοϊκός δακτύλιος δημιουργείται από τη συμπύκνωση μιας 4-P-ερυθρόζης, που είναι ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου της P-πεντόζης, με το φωσφοενολοπυροσταξυλικό οξύ (PEP). Αυτό το βιοσυνθετικό μονοπάτι γνωστό ως μονοπάτι του σικιμικού οξέος, οδηγεί στην παραγωγή του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος, καθώς και σε αρωματικά αμινοξέα (PHE, TYR). Η παρουσία πολλών διαφορετικών φλαβονοειδών ενώσεων στο σταφύλι οφείλεται στις πολλαπλές μεταβολές (υδροξυλίωση, μεθοξυλίωση, εστεροποίηση, γλυκοζιδίωση) των ενώσεων αυτών.

Το μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης των φλαβονοειδών έχει πολλές διακλαδώσεις. Στα αρχικά του στάδια παράγονται ενδιάμεσες ενώσεις που λειτουργούν ως πρόδρομες για την παραγωγή πολλών άλλων σχετικών ενώσεων. Σε αυτά τα μεταβολικά μονοπάτια, η αμμωνιακή λύαση της φαινυλαλανίνης (PAL) είναι το ένζυμο που εξαλείφοντας τις  $\text{NH}_3$  ρίζες αποσπά την φαινυλαλανίνη από την σύνθεση των πρωτεϊνών (βασικός μεταβολισμός) μέσω της παραγωγής του trans-κινναμωμικού οξέος και άλλων φαινολικών ενώσεων. Η PAL εντοπίζεται στα κύτταρα της επιδερμίδας της ράγας καθώς και στα γίγαρτα. Η μέγιστη δραστηριότητα της στα γίγαρτα εντοπίζεται κατά την περίοδο της πράσινης ράγας. Στη συνέχεια μετά τον περκασμό μειώνεται, για να φτάσει σε ελάχιστα επίπεδα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της ράγας. Η δραστηριότητα της PAL στο φλοιό της ράγας είναι πολύ έντονη κατά την έναρξη ανάπτυξης της ράγας, ενώ στη συνέχεια μειώνεται μέχρι τον περκασμό. Στις ερυθρές ποικιλίες, η δραστηριότητα αυτή στους φλοιούς αυξάνεται εκ

νέου στην έναρξη του περκασμο. Υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της PAL και στην ένταση του χρώματος της ράγας.

Η πρώτη φλαβονοειδής φαινόλη που παράγεται είναι η χαλκόνη και το ένζυμο που εμπλέκεται είναι η συνθάση της χαλκόνης (CHS). Η συνθάση της χαλκόνης είναι το πρώτο εξειδικευμένο ένζυμο του μονοπατιού σύνθεσης των φλαβονοειδών (συμπύκνωση των δύο δακτυλίων). Η δραστηριότητα της παρουσιάζει έντονη αύξηση στην έναρξη του περκασμού και στη συνέχεια μειώνεται απότομα (Downey M., Harvey J., Robinson S., 2003).

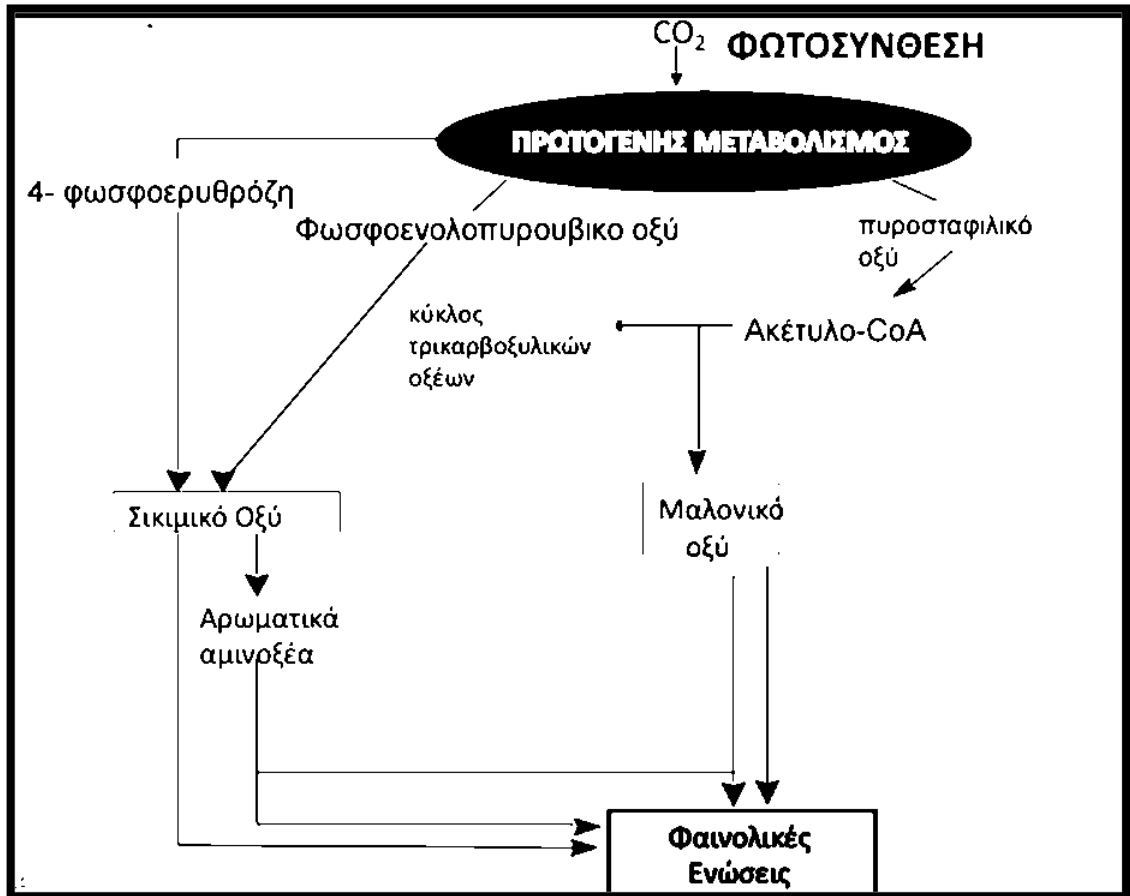
Στη συνέχεια οι χαλκόνες μέσω της δράσης της ισομεράσης της χαλκόνης (CHI) -που καταλύει το κλείσιμο του δακτυλίου- μετατρέπονται σε φλαβανόνες. Αυτό το στάδιο μπορεί να συμβεί και αυθόρμητα αλλά με πιο αργό ρυθμό από όταν καταλύεται από το ένζυμο CHI. Στη συνέχεια, μέσω της δράσης της 3-υδροξυλάσης της φλαβανόνης (F3H) έχουμε υδροξυλίωση της φλαβανόνης προς σχηματισμό διυδροφλαβονόλης. Από τις διυδροφλαβονόλες μπορούν να προκύψουν:

- Φλαβονόλες
- Λευκοανθοκυανιδίνες μέσω της δράσης του ενζύμου διυδροφλαβονόλη 4-ρεδοκτάση (DFR)

Από τις λευκοανθοκυανιδίνες φαίνεται ότι έχουμε σχηματισμό προανθοκυανιδινών, οι οποίες με τη σειρά τους θα οδηγήσουν στην παραγωγή:

- Είτε συμπυκνωμένων ταννινών
- Είτε ανθοκυανιδινών

Οι ταννίνες φτάνουν μια μέγιστη συγκέντρωση στα γίγαρτα κατά τον περκασμό. Στη συνέχεια μειώνεται σε ένα σχετικά σταθερό επίπεδο μέχρι τα γίγαρτα να ωριμάσουν. Στους φλοιούς η συγκέντρωση των ταννινών κατά τον περκασμό είναι ήδη υψηλή, φτάνοντας ορισμένες φορές σε αναλογία πάνω από τη μισή συγκέντρωση κατά την ωρίμανση (Soleas G.J., Goldberg D.M., et al., 1995).



**Εικόνα 10:** Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των φαινολικών ενώσεων  
(opencourses.auth.gr)

Η ακριβής διαδικασία της μετατροπής των λευκοανθοκυανιδινών σε ανθοκυανιδίνες δεν είναι γνωστή. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την επόμενη μετατροπή σε αυτό το μεταβολικό μονοπάτι της σύνθεσης των ανθοκυανών είναι η διοξυγενάση της λευκοανθοκυανιδίνης (LDOX) - αποκαλείται και συνθάση της ανθοκυανιδίνης (ANS). Εικάζεται ότι το βασικό προϊόν της δράσης της LDOX είναι η άχρωμη 2-φλαβεν-3,4-διόλη, η οποία δύναται να μετατραπεί σε έγχρωμη ανθοκυανιδίνη με αφαίρεση του υδροξυλίου σε όξινο περιβάλλον. Εάν αυτό μπορεί να συμβαίνει in vino, τότε δεν απαιτείται κανένα ένζυμο απόυδροξυλίωσης για τη σύνθεση των ανθοκυανιδινών. Δεν αποκλείεται όμως η πιθανότητα να υπάρχει ένα τέτοιο ένζυμο που να καταλύει αυτή την αντίδραση. Έπειτα, οι ανθοκυανιδίνες μπορούν να σταθεροποιηθούν μέσω της προσθήκης ενός μορίου γλυκόζης στη θέση C3 του δακτυλίου C. Αυτή η αντίδραση

καταλύεται από το ένζυμο UDP-γλυκόζη (Cohen S.D., Tarara J.M., Kennedy J.A., 2008).

Το μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των ανθοκυανών είναι ένα γραμμικό μονοπάτι που ξεκινά από το μόριο της φαινυλαλαίνης και το μαλόνυλ-CoA και καταλήγει στην παραγωγή της γλυκοζυλιωμένης ανθοκυάνης. Εάν δεν υπάρξει κάποια τροποποίηση του Β-δακτυλίου του μορίου της ανθοκυάνης, τότε η ανθοκυάνη που παράγεται είναι η πελαργονιδίνη. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ανθοκυάνες της ράγας της αμπέλου υπόκεινται σε υδροξυλίωση του Β-δακτυλίου. Τα ένζυμα που καταλύουν την υδροξυλίωση του Β-δακτυλίου, έχουν δράση στις φλαβανόνες ή στις διυδροφλαβονόλες και λέγονται 3'-υδροξυλάση των φλαβονοειδών (F3'H) και 3',5'-υδροξυλάσεις (F3'5'H). Η δράση της F3'H έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της κυανιδίνης. Η δράση της F3'5'H παράγει δελφινιδίνη που τείνει περισσότερο προς το κυανό φάσμα.

Άλλες τροποποιήσεις των ανθοκυανών περιλαμβάνουν μεθυλίωση, ακυλίωση και γλυκοζυλίωση. Η μεθυλίωση των ανθοκυανών είναι αναμφίβολα μια σημαντική πλευρά της παραγωγής των ανθοκυανών, δεδομένης της επικράτησης της μαλβιδίνης σε ορισμένες από τις ευρέως καλλιεργούμενες ερυθρές ποικιλίες. Οι ομάδες μεθυλίου μπορεί να προστίθενται:

- ο στη θέση 3' του Β-δακτυλίου της κυανιδίνης για να παραχθεί πεονιδίνη,
- ο στη θέση 3' του Β-δακτυλίου της δελφινιδίνης προς παραγωγή πετουνιδίνης,
- ο στη θέση 3' και 5' του Β-δακτυλίου της δελφινιδίνης προς παραγωγή μαλβιδίνης

Η ακυλίωση των ανθοκυανών στα σταφύλια γίνεται με την προσθήκη μιας αλειφατικής ομάδας ακέτυλου ή μιας ομάδας αρωματικού p-κουμαρόνυλ (ή περιστασιακά καφεόλυ) στη θέση C6 του 3-O-γλυκοζίτη. Φαίνεται ότι αυτές οι τροποποιήσεις αυξάνουν την σταθερότητα του μορίου της ανθοκυάνης κι αλλάζουν την διαλυτότητα τους στο νερό.

Οι ανθοκυάνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα, αλλά η συσσώρευση γίνεται στο χυμοτόπιο. Για το μηχανισμό μεταφοράς υπάρχουν δύο θεωρίες. Η πρώτη υποδεικνύει ότι γίνεται μέσω ενός συστήματος που χρησιμοποιείται από τα φυτά για την αναγνώριση, τη μεταφορά και το μεταβολισμό των ζιζανιοκτόνων. Αυτό πιθανά να συμβαίνει γιατί οι ανθοκυάνες είναι τοξικές στο κυτταρόπλασμα. Ενώ η δεύτερη υποδεικνύει ότι το ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) δρα ως

πρωτεΐνη μεταφορέας στην οποία προσδένονται οι ανθοκυάνες και τις συνοδεύει στον κατάλληλο μεταφορέα για μεταφορά στο χυμοτόπιο.

Στις ερυθρές ποικιλίες, οι ανθοκυάνες δείχνουν να συσσωρεύονται στους φλοιούς περίπου δύο εβδομάδες πριν το χρώμα είναι ορατό. Η συγκέντρωση αυξάνει κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, αλλά κατά την πλήρη ωριμότητα φτάνει στο μέγιστο και γενικά μειώνεται (Gomez-Alonso S. et al., 2007) Η παρουσία των ανθοκυανών συνδέεται με την συσσώρευση των σακχάρων στο σταφύλι, αλλά ακόμη δεν έχει αποδειχτεί καμία άμεση σχέση. Διάφορες παράμετροι, όπως το ηλιακό φως, αυξάνουν την ταχύτητα συσσώρευσης των ανθοκυανών χωρίς να επιδρούν στη συσσώρευση των σακχάρων του φλοιού (Boss P.K., Davies C., Robinson S.R., 1996).

### **1.1.10 Παράγοντες που επιδρούν στη βιοσύνθεση και στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων**

#### **1.1.10.1 Ποικιλία**

Η κάθε ποικιλία έχει διαφορετική ικανότητα συσσώρευσης φαινολικών ουσιών. Σε γενικές γραμμές, οι ερυθρές ποικιλίες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, σε σχέση με τις λευκές αν και μεταξύ των ερυθρών ποικιλιών υπάρχει σαφής διαφοροποίηση ως προς το ανθοκυανικό τους προφίλ. Κατά τους Boss κ.ά. (1996) το ανθοκυανικό προφίλ των ερυθρών ποικιλιών είναι προκαθορισμένο γενετικά και η βιοσύνθεση των ανθοκυανών αντανακλά στην πολυπλοκότητα των γονιδιακών μονοπατιών. Επομένως, οι διαφορές στο ανθοκυανικό προφίλ που παρατηρούνται μεταξύ των ποικιλιών, οφείλονται στις παραλλαγές του μονοπατιού της βιοσύνθεσης. Το ανθοκυανικό και προανθοκυανιδινικό προφίλ χρησιμοποιείται στη διάκριση των ποικιλιών (Pomar F., Novo M., Masa A., 2005).

Από τις ενδογενείς ιδιότητες της ποικιλίας, η ζωηρότητα επιδρά στη σύνθεση των φαινολικών ουσιών. Διαπιστώθηκε ότι οι ράγες από πρέμνα μέτριας ή χαμηλής ζωηρότητας παρουσιάζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε προανθοκυανιδίνες και αυξημένα ποσοστά σε επιγαλοκατεχίνες και ανθοκυανιδίνες. Επίσης οίνοι που προέρχονται από σταφύλια πρέμνων μικρής ζωηρότητας παρουσιάζουν αυξημένη

περιεκτικότητα σε ταννίνες φλοιού σε σχέση με εκείνους που προέρχονται από πολύ ζωηρά πρέμνα.

Η συγκέντρωση επίσης, των κατεχινών και προανθοκυανιδινών διαφέρει σημαντικά, με ιδιαίτερα πλούσιες τις ποικιλίες με μεγάλο ποσοστό γιγάρτων λόγω μικρών ραγών, όπως το Pinot noir ή με μεγάλο αριθμό γιγάρτων ανά ράγα σταφυλών, όπως το Ξινόμαυρο.

Διαφορές επίσης ανάμεσα στις ποικιλίες έχουν διαπιστωθεί και ως προς τα στιλβένια. Θα περιμέναμε ότι οι ράγες από πρέμνα που οι γενότυποι τους επιδεικνύουν ανθεκτικότητα σε ασθένειες ότι θα περιέχουν υψηλότερα επίπεδα στιλβενίων σε σχέση με τους ευαίσθητους γενότυπους στις ασθένειες. Σε ορισμένες περιπτώσεις αυτό επιβεβαιώνεται, ενώ σε άλλες δεν επιβεβαιώνεται (Jackson D.I., Lombard P.B., 1993). Όπως και για τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις, οι ερυθρές ποικιλίες έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα στιλβενίων από με τις λευκές. Οι Romero-Pérez κ.ά. (1999) εντόπισαν διαφορές στη συγκέντρωση της piceid σε εμπορικούς χυμούς από ερυθρές και λευκές ποικιλίες. Η μέση συγκέντρωση στους ερυθρούς χυμούς ήταν 3.38 mg/l για την trans-piceid και 0.79 mg/l για την cis-piceid, ενώ στους λευκούς χυμούς η μέση συγκέντρωση ήταν 0.18 mg/l trans-piceid και 0.26 mg/l cis-piceid. Επίσης, οι Bavaresco κ.ά. (1997) βρήκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ρεσβερατρόλη και piceid σε σταφύλια των ποικιλιών Barbera και Croatina (ερυθρές) σε σύγκριση με την Malvasia di Candia aromatica (λευκή). Οι Li κ.ά. (2006) σε έρευνα που πραγματοποίησαν συγκρίναν εγίγαρτες με αγίγαρτες ποικιλίες και βρήκαν υψηλότερα επίπεδα ρεσβερατρόλης στις εγίγαρτες. Επίσης, συγκρίνοντας οινοποιήσιμες και επιτραπέζιες ποικιλίες βρήκαν υψηλότερα επίπεδα ρεσβερατρόλης στη σάρκα και φλοιό των οινοποιήσιμων ποικιλιών.

#### **1.1.10.2 Υποκείμενο**

Η ζωηρότητα του υποκειμένου μεταδίδεται στην ποικιλία-εμβόλιο καθορίζοντας με αυτό τον τρόπο τις μετέπειτα φυσιολογικές της δραστηριότητες. Σε αντίθεση με όσα αναφέρουν οι Cortell κ.α. (2005), οι Jogaiah κ.ά. (2007) σε μελέτη που πραγματοποίησαν μετρήσαν στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης την σύνθεση των φαινολικών σε ράγες και φύλλα της ποικιλίας Thompson Seedless που ήταν εμβολιασμένη σε πέντε υποκείμενα (110R, 99R, Dog ridge, St.George και 1103P).



Παρατήρησαν ότι ράγες που προήλθαν από ζωηρότερα υποκείμενα (110R, 1103P και Dog ridge) είχαν υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών σε σχέση με ράγες που προήλθαν από πρέμνα εμβολιασμένα σε μικρότερης ζωηρότητας υποκείμενα (St.George, 99R). Κατέληξαν έτσι στο συμπέρασμα ότι η σύσταση και η ποιότητα των αμπελοοινικών προϊόντων διαφοροποιείται ανάλογα με το υποκείμενο.

### 1.1.10.3 Περιβαλλοντικοί κι εδαφολογικοί παράγοντες

Η ένταση του φωτός και η θερμοκρασία επηρεάζουν τη σύνθεση των φαινολικών ουσιών ποσοτικά και ποιοτικά. Η ηλιακή ακτινοβολία εμπλέκεται καθοριστικά σε όλα τα στάδια ανάπτυξης και ωρίμανσης των ραγών (Jackson D.I., Lombard P.B., 1993). Το ηλιακό φως αποτελεί το απαραίτητο ερέθισμα για την ενεργοποίηση των ενζυμικών συστημάτων, τα οποία μέσα από μια πολύπλοκη διαδικασία, θα καταλήξουν στο σχηματισμό των φαινολικών ουσιών. Για τις ανθοκυάνες, το ερέθισμα προέρχεται κατά κύριο λόγο, από το ορατό φάσμα του φωτός, ενώ ο σχηματισμός των φλαβονολών επηρεάζεται κυρίως από την υπεριώδη ακτινοβολία. Αντίστοιχα σε συνθήκες σκιάς, όπως διαμορφώνονται σε ζωηρά πρέμνα με πλούσια βλάστηση, ο ρυθμός σχηματισμού των ανθοκυανών είναι αργός, με αποτέλεσμα τη χαμηλή συγκέντρωση χρωστικών στο φλοιό των ραγών.

Οι φλαβονόλες προστατεύουν τις ράγες έναντι της UV ακτινοβολίας. Σύμφωνα με τους Price κ.ά. (1995) τα επίπεδα των φλαβονολών κι ειδικά της κερκετίνης παρουσίασαν σημαντική αύξηση σε ράγες της ποικιλίας Pinot noir έπειτα από έκθεση τους στον ήλιο. Η βιοσύνθεση των φλαβονολών επάγεται από την έκθεση στο φως, συμπέρασμα το οποίο είναι σύμφωνο και με το ρόλο των φλαβονολών να προστατεύουν από την UV-ακτινοβολία. Η μέγιστη επίδραση της σκίασης στην βιοσύνθεση των φλαβονολών διαπιστώθηκε όταν αυτή εφαρμόστηκε μερικές εβδομάδες πριν την άνθιση, εμποδίζοντας σχεδόν καθολικά την βιοσύνθεση τους. Ενώ όταν η σκίαση εφαρμόστηκε μετά την άνθιση η ποσότητα των φλαβονολών στις ράγες ήταν 8-10 φορές χαμηλότερη από την αντίστοιχη ποσότητα των ραγών που εκτέθηκαν κανονικά στο φως.

Η δραστηριότητα των ενζυμικών συστημάτων που ευθύνονται για τη σύνθεση των φαινολικών ουσιών αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας όσο αυτή παραμένει σε τιμές λίγο χαμηλότερες από την άριστη θερμοκρασία ωρίμανσης των

σταφυλών. Σε θερμοκρασίες υψηλότερες της άριστης για την ενζυμική δραστηριότητα, η φαινολική ωριμότητα συχνά δεν επιτυγχάνεται πάρα μόνο σε πολύ χαμηλή οξύτητα και πολύ υψηλό pH. Αν και είναι δυσχερής ο ακριβής προσδιορισμός της άριστης θερμοκρασίας για τη σύνθεση των φαινολικών ουσιών φαίνεται ότι για την πλειονότητα των ερυθρών ποικιλιών αμπέλου κυμαίνεται μεταξύ 22-25°C, εφόσον βέβαια οι λοιποί παράγοντες δεν δρουν περιοριστικά.

Ειδικότερα ως προς τι ανθοκυάνες, η συγκέντρωση τους επηρεάζεται από τη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας και νύχτας. Ακραίες θερμοκρασίες (άνω των 35°C και κάτω των 15°C) και μεγάλες διαφορές θερμοκρασιών ημέρας/νύχτας μειώνουν τη συγκέντρωση των ανθοκυανών.

Αναφορικά με τις ταννίνες και τις προανθοκυανιδίνες, η επίδραση της θερμοκρασίας μελετήθηκε από τους Cohen κ.ά. (2008) από το στάδιο της πράσινης ράγας έως την ωρίμανση. Στον περκασμό, οι υψηλότερες θερμοκρασίες αυξήσαν την ποσότητα των προανθοκυανιδινών αλλά δεν είχαν επίδραση στον μέσο βαθμό πολυμερισμού τους (mDP). Αντιθέτως, οι δροσερές θερμοκρασίες ημέρας και η μείωση της διακύμανσης της ημερήσιας θερμοκρασίας μείωσαν την περιεκτικότητα των προανθοκυανιδινών. Η επίδραση των επεμβάσεων που εφαρμόστηκαν από τον περκασμό έως τον τρύγο δεν ήταν σημαντικές εκτός από την δροσερή θερμοκρασία ημέρας που προκάλεσε μείωση στη περιεκτικότητα των προανθοκυανιδινών.

Ο τύπος εδάφους επιδρά στη σύνθεση των φαινολικών ενώσεων. Η επίδραση αυτή έχει μελετηθεί σε οίνους που προέρχονται από δύο διαφορετικούς αμπελώνες που καλλιεργούταν η ποικιλία Grenache. Ο αμπελώνας που είχε το πιο γόνιμο έδαφος και την μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης ύδατος παρήγαγε οίνους με μικρότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά και μικρότερη ένταση χρώματος αλλά με υψηλότερη συγκέντρωση στυλβενίων.

#### **1.1.10.4 Υδατική κατάσταση**

Η εφαρμογή μέτριας ή ελεγχόμενης υδατικής καταπόνησης κατά το στάδιο της ωρίμανσης των ραγών βελτιώνει την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το υδατικό έλλειμμα ελέγχει την βλαστική ανάπτυξη των πρέμων και προλαμβάνει την υπερβολική σκίαση και οψίμιση της παραγωγής. Επίσης, η έλλειψη νερού μειώνει το μέγεθος των ραγών και έτσι αλλάζει η αναλογία βάρους του φλοιού της ράγας προς το ολικό βάρος της ράγας με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα των ανθοκυανών και ταννινών στις ράγες.

Η εφαρμογή διαφορετικού βαθμού υδατικής καταπόνησης σε πρέμνα της ποικιλίας Syrah κατά την καρπόδεση (έντονη), τον περκασμό (μέτρια) και στο στάδιο από τον περκασμό μέχρι και την πλήρη ωρίμανση (έντονη) επέδρασε διαφορετικά στη συγκέντρωση των διάφορων φαινολικών ενώσεων. Συνολικά, είχε θετική επίδραση με την αύξηση των ολικών φαινολικών, λόγω της μείωσης του μεγέθους των ραγών και επομένως της αύξησης της αναλογίας φλοιού προς σάρκα. Γενικά, η καλλιέργεια των πρέμων υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης χρησιμοποιείται ως καλλιεργητική τεχνική που αποσκοπεί στην βελτίωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων (Kyraleou M., Kotseridis Y., Koundouras S., Chira K., Teissedre P.L., Kallithraka S., 2016).

Η υδατική καταπόνηση επηρεάζει ισχυρά, έμμεσα και άμεσα, τη σύνθεση και συσσώρευση των ανθοκυανών στις ράγες ανάλογα με την ένταση και το χρόνο εφαρμογής της. Μελέτες αναφέρουν ότι υδατικό έλλειμα αυξάνει την περιεκτικότητα των ραγών σε ανθοκυάνες. Αντίθετα, η υπερβολική άρδευση οδηγεί στην ανάπτυξη πλούσιας κόμης με αποτέλεσμα να δημιουργείται σκίαση στα σταφύλια, διαταράσσοντας τη λειτουργία της βιοσύνθεσης των ανθοκυανών, με συνέπεια τη μείωση του χρώματος των ραγών. Εφαρμογή υπερβολικής άρδευσης λίγο πριν τον τρυγητό οδηγεί σε αραίωση των διαλυτών συστατικών (σάκχαρα, οξέα, ταννίνες, ανθοκυάνες) και σε σχίσμο του φλοιού της ράγας (Esteban M.A., Villanueva M.J., Lissarrague J.R., 2001).

Πρέπει βέβαια να αναφερθεί ότι, συχνά, υπάρχει δυσκολία στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων από τις μελέτες που αφορούν την άρδευση. Η αλλαγή στην υδατική κατάσταση μπορεί να τροποποιήσει τη φυσιολογία των φυτών της αμπέλου με διάφορους τρόπους και συχνά αλλάζει το μέγεθος της ράγας, το φορτίο, τη βλάστηση και την ανάπτυξη του ίδιου του πρέμνου που με τη σειρά του μεταβάλλει την έκθεση ή μη στο φως. Επιπρόσθετα, οι γενετικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών, εμπλέκονται στην αντίδραση τους στην υδατική καταπόνηση, ενισχύοντας την αβεβαιότητα ως προς το ποια φυσιολογική επίδραση επηρεάζει τη σύνθεση των ανθοκυανών.

#### **1.1.10.5 Λίπανση**

Με τη λίπανση εμπλουτίζεται το έδαφος με θρεπτικά στοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξη και παραγωγή των πρέμων. Η επάρκεια σε θρεπτικά

συστατικά ευνοεί τη σύνθεση των φαινολικών συστατικών στη ράγα. Τα τρία κύρια θρεπτικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται για την λίπανση της αμπέλου είναι το άζωτο, ο φώσφορος και το κάλιο. Η υπερβολική λίπανση με άζωτο N και κάλιο K οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση ανθοκυανών, επειδή θα αυξηθεί η ζωηρότητα του πρέμνου θα επηρεαστεί η ισορροπία βλάστησης προς καρποφορίας και έμμεσα το μικροκλίμα εξαιτίας των ζωηρών βλαστών (Jackson, 1998).

Σύμφωνα με τον Graham (1983), σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, η ισορροπία ανάμεσα στο πρωτογενές και το δευτερογενές μεταβολικό μονοπάτι μετατοπίζεται προς το μονοπάτι του σικιμικού οξέος, αυξάνοντας τη σύνθεση των πολυφαινολών (συμπεριλαμβανομένων των στιλβενίων). Επίσης, οι Bavaresco κ.ά. (2001,2007) σε έρευνες που πραγματοποιήσαν με πρέμνα που αναπτύσσονταν είτε σε γλάστρες είτε στο έδαφος βρήκε ότι οι μικρές ποσότητες εδαφικού αζώτου, σε σύγκριση με τις μεγάλες, αυξάνουν τη συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης στα σταφύλια.

#### **1.1.10.6 Καλλιεργητικές τεχνικές**

Το ετήσιο χειμερινό κλάδευμα καρποφορίας καθορίζει το φορτίο του πρέμνου και προσδιορίζει τη σχέση βλάστησης προς καρποφορία (Σταυρακάκης M.N., 2015). Αύξηση του φορτίου πέραν του κανονικού έχει ως συνέπεια την επιβράδυνση του χρόνου ωρίμανσης, μείωση και υποβάθμιση της ποιότητας της παραγωγής. Ξεκινώντας από το σύστημα μόρφωσης, το σχήμα που δίνεται στα πρέμνα, αξιολογεί κατά το καλύτερο δυνατό τρόπο κάποια φυσικά χαρακτηριστικά του φυλλώματος (γεωμετρικό σχήμα, ύψος και κατεύθυνση), τα οποία επηρεάζουν σημαντικά τη δημιουργία επιθυμητού μικροκλίματος εντός του φυλλώματος και στο επίπεδο των ραγών.

Με τα χλωρά κλαδέματα (κορφολόγημα, βλαστολόγημα, ξεφύλλισμα και αραίωμα φορτίου, χαραγή) επιδιώκεται η βελτιστοποίηση της παραγωγής ποιοτικά. Πιο συγκεκριμένα, το ξεφύλλισμα αποσκοπεί κυρίως στη βελτίωση των χαρακτήρων ποιότητας των ραγών και ιδιαιτέρως του χρώματος τους, αφού η εφαρμογή του συμβάλει στην καλύτερη έκθεση των ραγών στο φως (Ribereau-Gayon et al.,2006).

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1 ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ

Μελετήθηκαν εννέα γηγενείς, οινοποιήσιμες, ερυθρές ποικιλίες αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) που ανήκουν στην ομάδα «Μαυρούδια» του εργαστηρίου Αμπελολογίας και καλλιεργούνται στην Αμπελογραφική Συλλογή του Ινστιτούτου Αμπέλου Αθηνών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι εξής : Κοτσιφάλι, Λιάτικο, Μανδηλαριά, Βερτζαμί, Κρασάτο, Σκοπελίτικο, Μαυρούδι ψιλό Καλαβρύτων, Αηδάνι Μαύρο, Μαυροθήρικο. Οι ποικιλίες είναι εμβολιασμένες σε υποκείμενο 110 Richter.

### 2.2 ΑΜΠΕΛΩΝΑΣ

Ο αμπελώνας βρίσκεται στην περιοχή Λυκόβρυση Αττικής (38°04'11.46'' βόρεια, 23°46'33.99'') σε υψόμετρο 200 m. Τα πρέμνα των ποικιλιών είναι μορφωμένα σε γραμμικό σχήμα (αμφίπλευρο Royat), φυτεμένα σε αποστάσεις 2,0m x 1,6m και δέχονται τις συνήθεις αμπελοκομικές επεμβάσεις (λίπανση με 11-15-15 και δόση 250- 300 g/πρέμνο, βραχύ χειμερινό κλάδεμα, κεφαλές με 2 λανθάνοντες οφθαλμούς ανά παραγωγική μονάδα, εφαρμογή χλωρών κλαδεμάτων - βλαστολόγημα, κορυφολόγημα- και άρδευση). Η διεξαγωγή του πειράματος έλαβε χώρα τη καλλιεργητική περίοδο 2015-2016.

### 2.3 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΡΑΓΩΝ

Η δειγματοληψία των σταφυλιών πραγματοποιήθηκε κατά την τεχνολογική ωρίμαση των σταφυλιών, κάθε ποικιλίας. Η δειγματοληψία αντιπροσωπευτικού δείγματος σταφυλιών και ραγών έγινε πρωινές ώρες από διάφορα πρέμνα κάθε ποικιλίας. Συνολικά έγιναν 3 δειγματοληψίες και σε κάθε δειγματοληψία ληφθήκαν 3 σταφυλές από κύριους βλαστούς που βρίσκονταν σε διαφορετικές θέσεις (σκιασμένες ή μη σκιασμένες) και από διαφορετικές θέσεις επί των βλαστών (κορυφή, μέση, βάση).

Κάθε δειγματοληψία αποτέλεσε και μία επανάληψη (συνολικά 3) για κάθε επέμβαση (ποικιλία). Ακολούθησαν οι μηχανικές αναλύσεις των σταφυλιών και των ραγών όπως περιγράφεται παρακάτω και μετρήθηκε η ολική, η ενεργή οξύτητα των γλευκών και η σακχαροπεριεκτικότητά τους. Ακολούθησε διαχωρισμός των ραγών σε φλοιούς, γίγαρτα και σάρκα, για κάθε επανάληψη. Οι φλοιοί και τα γίγαρτα

αποξηράθηκαν με την διαδικασία της λυοφυλίσωσης και στη συνέχεια κονιορτοποιήθηκαν σε μύλο. Η σάρκα κάθε επανάληψης πολτοποιήθηκε ξεχωριστά. Στη συνέχεια όλα τα δείγματα (φλοιοί, γίγαρτα, γλεύκος) διατηρήθηκαν υπό βαθιά κατάψυξη στους -80 °C.

## **2.4 ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΑΦΥΛΗΣ ΚΑΙ ΡΑΓΑΣ**

### **2.4.1 Βάρος σταφυλής**

Από τα πρέμνα κάθε ποικιλίας ληφθήκαν τυχαία 3 ομάδες από 3 σταφυλές, όπως αναφέρθηκε, και μετρήθηκε το βάρος κάθε ομάδας με ζυγό ακριβείας. Υπολογίστηκε το μέσο βάρος σταφυλής διαιρώντας το βάρος κάθε ομάδας με τον αριθμό σταφυλών της ομάδας.

### **2.4.2 Μήκος και πλάτος σταφυλής**

Για τις ίδιες ομάδες, μετρήθηκε το μήκος και το πλάτος κάθε μίας σταφυλής με ακρίβεια χιλιοστού του μέτρου. Υπολογίστηκε το μέσο μήκος και πλάτος σταφυλής προσθέτοντας τις τιμές των σταφυλών της ομάδας και διαιρώντας το σύνολο με τον αριθμό σταφυλών της ομάδας.

### **2.4.3 Μέσο βάρος ράγας**

Λήφθηκαν τυχαία 3 ομάδες 50 ραγών από κάθε ομάδα των 3 σταφυλών και μετρήθηκε το βάρος κάθε ομάδας με ζυγό ακρίβειας. Αυτό το βάρος διαιρέθηκε με τον αριθμό των ραγών και έτσι υπολογίστηκε το μέσο βάρος ράγας σε γραμμάρια, για κάθε ομάδα.

### **2.4.4 Μέσο μήκος και πλάτος ράγας**

Από κάθε ομάδα ραγών ληφθήκαν 10 ράγες και μετρήθηκε το μήκος και το πλάτος κάθε ράγας με τη βοήθεια βερνιέρου και με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος του μήκους και του πλάτους ράγας για κάθε ομάδα.

## **2.4.5 Δύναμη πρόσφυσης ράγας**

Για κάθε ποικιλία, ληφθήκαν 5 ομάδες των 10 ραγών από τις παραπάνω σταφυλές, και μετρήθηκε η δύναμη πρόσφυσης της κάθε ομάδας με δυναμόμετρο.

## **2.5 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΓΛΕΥΚΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ**

### **2.5.1 Μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας (°Brix) με χρήση**

#### **διαθλασίμετρου**

Ο δείκτης διάθλασης του γλεύκους μετριέται με την βοήθεια διαθλασίμετρου και εάν η θερμοκρασία μέτρησης είναι διαφορετική των 20 °C η τιμή διορθώνεται μέσω πίνακα. Αρχικά το διαθλασίμετρο μηδενίζεται. Το μηδέν του οργάνου ρυθμίζεται με απεσταγμένο νερό και το όριο του διαχωρισμού των δύο ζωνών διαφορετικής φωτεινότητας, πρέπει να βρίσκεται στο μηδέν της κλίμακας. Στη συνέχεια τοποθετούνται δύο σταγόνες του προς εξέταση γλεύκους στην επιφάνεια του σταθερού πρίσματος, κατεβαίνει το κινητό πρίσμα και κατευθύνεται το όργανο προς μια πηγή φωτός. Επί της εν λόγω κλίμακας διακρίνεται μια διαχωριστική γραμμή μεταξύ μίας φωτεινής και μιας σκοτεινής ζώνης. Γίνεται ανάγνωση της ένδειξης εκεί όπου βρίσκεται η διαχωριστική γραμμή. Οι επιφάνειες του πρίσματος, μετά από κάθε μέτρηση, σκουπίζονται με ένα καθαρό πανί.

### **2.5.2 Μέτρηση ενεργής οξύτητας-pH**

Ως ενεργή οξύτητα ή pH καλείται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση και δίνουν  $H^+$ . Σε αντίθεση με την ολική οξύτητα η ενεργή οξύτητα εξαρτάται και από το είδος των οργανικών οξέων π.χ. ο οίνος που περιέχει μια ορισμένη ποσότητα τρυγικού οξέος είναι πιο όξινος από τον οίνο που περιέχει ισόποσο ηλεκτρικό οξύ λόγω του διαφορετικού βαθμού διάστασης των ελεύθερων καρβοξυλομάδων. Το pH των οίνων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως για παράδειγμα η αμπελοργική περιοχή, η ποικιλία της αμπέλου και η τιμή τους και κυμαίνεται από 2,8 μέχρι 4,2.

Βαθμονομείται το όργανο (pH-μετρο) με διαλύματα (buffer)γνωστού pH. Στη συνέχεια τοποθετείται το δείγμα, που πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία 20°C, σε

ποτήρι ζέσεως κι εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο. Λαμβάνεται η ένδειξη του οργάνου με δύο δεκαδικά ψηφία.



**Εικόνα 13:** Όργανο μέτρησης pH

### **2.5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής οξύτητας**

#### **2.5.3.1 Αρχή της μεθόδου**

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



σηματοδοτεί το τέλος της αντίδρασης, δηλαδή την πλήρη εξουδετέρωση των οξέων του διαλύματος από το NaOH, αλλάζοντας χρώμα σε pH 8,3-10,5.

### 2.5.3.2 Αντιδραστήρια

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

### 2.5.3.3 Διαδικασία μέτρησης

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

- Μεταφορά 10 ml διαχωρισμένο από τους φλοιούς γλεύκος
- Προσθήκη 10 ml απεσταγμένου νερού
- Προσθήκη 4–5 σταγονών διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης
- Σταδιακή τιτλοδότηση με προσθήκη NaOH 0,1 N μέχρι να αλλάξει χρώμα ο δείκτης φαινολοφθαλεΐνης (σε ερυθρές ποικιλίες από ερυθρό σε κεραμιδί)
- Σημειώνεται ο όγκος NaOH 0,1 N που χρειάστηκε για την πλήρη εξουδετέρωση των οξέων του δείγματος

### 2.5.3.4 Έκφραση αποτελεσμάτων

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

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

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

$$A' = 0,075 * A \text{ (gr/L σε τρυγικό οξύ)}$$

## 2.6 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΓΛΕΥΚΟΥΣ

### 2.6.1 Μέτρηση της αργινίνης στο γλεύκος

Η αργινίνη αποτελεί την κύρια μορφή αποταμίευσης αζώτου, αντιστοιχώντας στο 50-70% του διαλυτού αζώτου και στο 10-50% του ολικού αζώτου σε ρίζες, κορμό και κληματίδες πριν την έκπτυξη των οφθαλμών. Η αργινίνη είναι αυτή που τροφοδοτεί κυρίως το πρέμνο σε άζωτο κατά την βλαστική αύξηση την άνοιξη (Kliewer and Cook, 1971).

#### 2.6.1.1 Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της αργινίνης στο χυμό των ραγών κατά την πλήρη ωρίμανση παρέχει έναν εύκολο και σχετικά φθινό τρόπο προσδιορισμού των αναγκών των πρέμνων σε άζωτο (Ozturk L., Demir Y., 2002). Ο προσδιορισμός της αργινίνης με την αντίδραση Sakaguchi, όπως αυτή έχει τροποποιηθεί από τους Gilboe και Williams (1956), βασίζεται στη παραδοχή ότι το βασικό αμινοξύ αργινίνη, δίνει ένα κόκκινο-ιώδες παράγωγο όταν αντιδράσει με υποβρωμιώδες νάτριο σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση Sakaguchi) με μέγιστη απορρόφηση στα 500nm.

#### 2.6.1.2 Αντιδραστήρια

- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 10 % σε υδατικό διάλυμα (100 gr/l).
- 8-Υδροξυκινολίνη 0,02 %: 0,2 g υδροξυκινολίνη διαλυθήκαν σε 100 ml αιθυλική αλκοόλη 95%.
- Υποβρωμιώδες νάτριο 1 %: Προετοιμάζεται διαλύοντας 1 gr υγρού βρωμίου (ισοδύναμο με 0,34 ml υγρού βρωμίου) σε 100 ml 5 % υδροξείδιο του νατρίου. Το βρώμιο έχει υψηλή τοξικότητα και πτητικότητα, για αυτό πρέπει να χρησιμοποιείται προσιφώνιο καθώς και να προφυλάσσονται τα μάτια και το πρόσωπο κατά την παρασκευή του. Έπειτα το αντιδραστήριο θα πρέπει να φυλαχτεί σε σκοτάδι (καφέ φιάλη) και σε ψυχρό μέρος (ψυγείο). Είναι σταθερό για ένα μήνα.
- Ουρία 40 % σε απεσταγμένο νερό (400 gr/l).

### 2.6.1.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα γλεύκη αφέθηκαν να ξεπαγώσουν σε λεκάνη με νερό και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση τους με σκοπό την πλήρη ομογενοποίηση τους. Για κάθε ποικιλία έγινε αραιώση του γλεύκους 1:25 σε νερό καθαρότητας HPLC. Από αυτό το αραιωμένο γλεύκος έγινε ο προσδιορισμός της αργινίνης με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο.

### 2.6.1.4 Διαδικασία μέτρησης

Για κάθε ποικιλία έγιναν 5 επαναλήψεις του πρωτοκόλλου.

Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν:

- 5 ml αραιωμένου γλεύκους (4,8 ml απιονισμένου νερού και 0,2 ml γλεύκους)
- 1 mL 8-υδροξυκινολίνης 0,02%
- 1 mL NaOH 10%. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύτηκαν καλά και τοποθετήθηκαν για δύο λεπτά σε μπάνιο πάγου
- 0,2 mL NaBr (υποβρωμιώδες νάτριο) 1%. Οι σωλήνες αναδεύτηκαν πάλι, τοποθετήθηκαν ξανά στο μπάνιο του πάγου και πολύ γρήγορα προστέθηκε
- 1 mL ουρίας 40%. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύτηκαν καλά και τοποθετήθηκαν για ένα λεπτό σε μπάνιο πάγου.
- 5 mL απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε ανάδευση και παραμονή στο μπάνιο πάγου για πέντε λεπτά.

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για αραιωμένο γλεύκος προστέθηκαν 5mL απεσταγμένου νερού κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 500 nm για τους 3 σωλήνες (επαναλήψεις), που περιείχαν το δείγμα. Για κάθε επανάληψη έγιναν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα.

Χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη βρέθηκε η περιεκτικότητα του δείγματος σε αργινίνη. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η αργινίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

### 2.6.1.5 Υπολογισμός της αργινίνης

Η περιεκτικότητα της αργινίνης υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο και εκφράζεται σε mg αργινίνης / ml γλεύκους:  $(A_{500} - 0,0006) * 0,025 / 0,0132$



**Εικόνα 11:** Διαδικασία μέτρησης αργινίνης

## 2.6.2 Μέτρηση της προλίνης στο γλεύκος

### 2.6.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η προλίνη είναι το αμινοξύ που βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση σε πολλούς οίνους και γλεύκη. Στο χυμό αρκετών ραγών μάλιστα αντιπροσωπεύει το 80 - 90 % του ολικού αζώτου. Η προλίνη είναι μετά την αργινίνη το δεύτερο αμινοξύ σε συγκέντρωση στα σταφύλια κατά το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης. Στην πορεία οινοποίησης η προλίνη δεν μεταβολίζεται από τους ζυμομύκητες σε αναερόβιες συνθήκες συνεπώς δεν θεωρείται αφομοιώσιμη. Η μέθοδος Ough (1969) με αντίδραση με τη νινυδρίνη βασίζεται στο ότι η προλίνη σχηματίζει χαρακτηριστική

χρώση (πορτοκαλέρυθρο σύμπλοκο) με την νινυδρίνη έπειτα από θέρμανση , η νινυδρίνη είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με όλα τα α-αμινοξέα στην περιοχή pH 4-8 και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά με μέγιστη απορρόφηση στα 517 nm.

#### **2.6.2.2 Αντιδραστήρια**

- Μυρμηκικό οξύ
- Διάλυμα νινυδρίνης 3%. Προετοιμάζεται διαλύοντας 3 gr νινυδρίνη σε 97 ml αιθανόλης.
- Διάλυμα ισοπροπανόλης 1:1. Προετοιμάζεται διαλύοντας 100ml ισοπροπανόλης σε 100 ml απιονισμένο νερό.

#### **2.6.2.3 Προετοιμασία δειγμάτων**

Τα γλεύκη αφέθηκαν να ξεπαγώσουν σε λεκάνη με νερό και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση τους με σκοπό την πλήρη ομογενοποίηση τους. Για κάθε ποικιλία έγινε αραιώση του γλεύκους 1:12,5 σε νερό καθαρότητας HPLC. Από αυτό το αραιωμένο γλεύκος έγινε ο προσδιορισμός της προλίνης με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο.

#### **2.6.2.4 Διαδικασία μέτρησης**

Για κάθε ποικιλία έγιναν 5 επαναλήψεις του πρωτοκόλλου. Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν (γρήγορα):

- 0,5 ml χυμού (αραιωμένου)
- 0,25ml μυρμηκικό οξύ. Οι σωλήνες αναδεύτηκαν και προστέθηκε:
- 1ml διάλυμα νινυδρίνης 3%. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το μείγμα θερμαίνονται σε ζέον υδατόλουτρο 92<sup>0</sup>C για 15 λεπτά. Στην συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες ψυχθήκαν σε υδατόλουτρο στους 20<sup>0</sup>C για 5-10 λεπτά
- 5ml διάλυμα ισοπροπανόλης 1:1. Οι σωλήνες αναδεύτηκαν πάλι.

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για αραιωμένο γλεύκος προστέθηκαν 5mL απεσταγμένου νερού κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 517 nm για τους 3 σωλήνες (επανάληψεις), που περιείχαν το δείγμα. Για κάθε επανάληψη παρήχθησαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα.

Χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκε η περιεκτικότητα του δείγματος σε προλίνη. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η προλίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

#### **2.6.2.5 Υπολογισμός της προλίνης στο γλεύκος των ραγών**

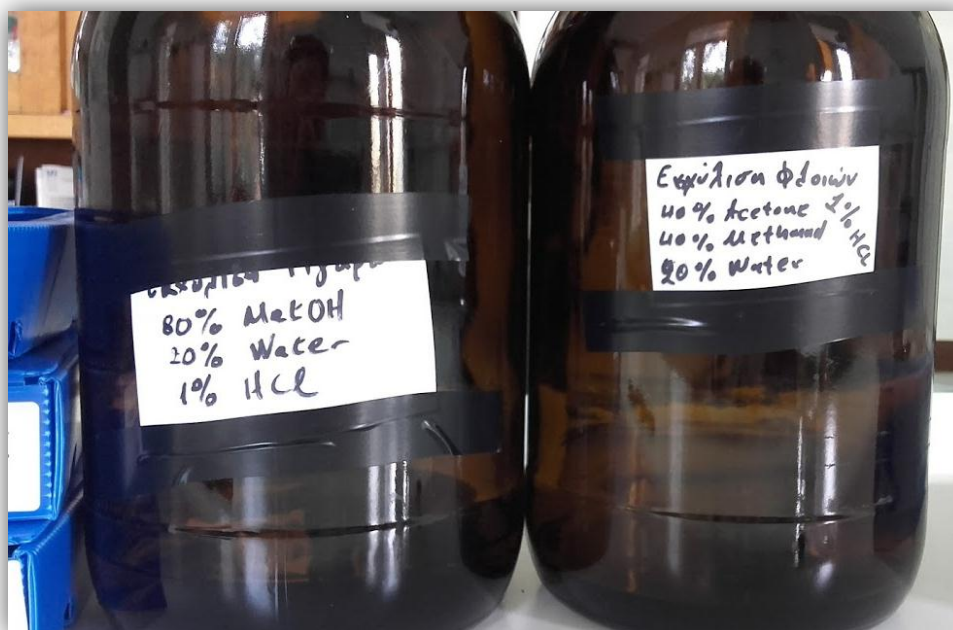
Η περιεκτικότητα της προλίνης υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο και εκφράζεται σε mg προλίνης / ml γλεύκους:  $(A_{517} - 0,0016) * 0,0125 / 0,0102$

## **2.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΦΛΟΙΟΥΣ, ΣΤΑ ΓΙΓΑΡΤΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΓΛΕΥΚΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ**

### **2.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων**

#### **2.7.1.1 Εκχύλιση φλοιών**

Για την εκχύλιση των φλοιών παρασκευάστηκε διάλυμα Ακετόνης, Μεθανόλης, Νερού (σε αναλογία 40:40:20), οξινισμένο με πυκνό διάλυμα HCl 12M, κατά 1% επί του τελικού όγκου του διαλύματος εκχύλισης. Τα διαλύματα και των τριών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας HPLC.



Εικόνα 12: Διαλύματα εκχύλισης

Στη συνέχεια:

- Ζυγίστηκαν 0,5gr φλοιού από κάθε επανάληψη σε ζυγό ακριβείας και αναμείχθηκαν σε 5 ml διαλύματος (αναλογία 1:10).
- Ανάδευση του διαλύματος σε συσκευή Turrax στις 8.000 στροφές για 10 δευτερόλεπτα.
- Το ομογενοποιημένο διάλυμα εκχυλίστηκε υπό ανάδευση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 25 °C
- Φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 5000 στροφές
- Λήψη του υπερκείμενου (4ml)
- **Επανάληψη της διαδικασίας -2<sup>η</sup> φορά-** για το ίζημα από την αρχή, δηλαδή από την προσθήκη 4 ml διαλύματος εκχύλισης
- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (4ml+4ml=8ml)
- **Επανάληψη της διαδικασίας -3<sup>η</sup> φορά-** για το ίζημα από την αρχή
- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (8ml+4ml=12ml)

- Απόρριψη του ιζήματος
- Τελικός όγκος εκχυλίσματος 12 ml (αναλογία ξηρού βάρους-εκχυλίσματος 1:40)

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

### 2.7.1.2 Εκχύλιση γιγάρτων

Τα γίγαρτα περιέχουν γιγαρτέλαιο το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 280 nm. Στο ίδιο μήκος κύματος απορροφούν και οι μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατο να διαχωρισθούν ικανοποιητικά οι ενώσεις στο όργανο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Για αυτό το λόγο πριν τη διαδικασία της εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων, έγινε αφαίρεση του γιγαρτέλαιου από τα κονιορτοποιημένα γίγαρτα με χρήση διαλύματος εξανίου καθαρότητας HPLC, για κάθε επανάληψη, ακολουθώντας την παρακάτω μέθοδο:

- Ζύγισμα 0,5 gr λυοφιλιωμένων και κονιορτοποιημένων γιγάρτων
- Προσθήκη 2 ml εξανίου και ανάδευση
- Φυγοκέντρηση κι απόρριψη υπερκείμενου



**Εικόνα 13:** Φυγόκεντρος



**Επανάληψη της διαδικασίας -2<sup>η</sup> φορά-** για το ίζημα. Για την εκχύλιση των γιγάρτων παρασκευάστηκε διάλυμα Μεθανόλης-Νερού, αναλογίας 80:20. Το διάλυμα αυτό οξινίστηκε με πυκνό διάλυμα HCl 12M, κατά 1% επί του τελικού όγκου του διαλύματος εκχύλισης. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων από το παραπάνω ίζημα, κάθε επανάληψης:

- Προσθήκη 5 ml διαλύματος εκχύλισης
- Ανάδευση σε συσκευή Turax στις 8.000 στροφές για μερικά δευτερόλεπτα
- Εκχύλιση του ομογενοποιημένου διαλύματος υπό ανάδευση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 25 °C
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 5000 στροφές
- Λήψη του υπερκείμενου (4ml)
- **Επανάληψη της διαδικασίας -2<sup>η</sup> φορά-** για το ίζημα από την αρχή, δηλαδή από την προσθήκη 5 ml διαλύματος εκχύλισης
- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (4ml+4ml=8ml)
- **Επανάληψη της διαδικασίας -3<sup>η</sup> φορά-** για το ίζημα από την αρχή
- Εκ νέου λήψη του υπερκείμενου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (8ml+4ml=12ml)
- Απόρριψη του υποκειμένου
- Τελικός όγκος εκχυλίσματος 12 ml (αναλογία ξηρού βάρους-εκχυλίσματος 1:30)

Ο σκοπός που η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται τρεις φορές συνολικά είναι για να εξασφαλίσουμε ότι στο τελικό διάλυμα θα έχει εκχυλιστεί όλη η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων. Για κάθε ομάδα-επανάληψη της κάθε ποικιλίας έγινε ξεχωριστή εκχύλιση. Κατά συνέπεια στο τέλος της διαδικασίας υπήρχαν για κάθε ποικιλία (επέμβαση) τρία διαφορετικά εκχυλίσματα (επανάληψη).

### **2.7.1.3 Αραίωση**

Εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στους φλοιούς και στα γιγάρτα αποφασίστηκε, κατόπιν δοκιμών, να πραγματοποιηθεί αραίωση των αρχικών εκχυλισμάτων. Η αραίωση που έγινε στους φλοιούς ήταν 1:30 σε τελικό

όγκο διαλύματος 10 ml, ενώ για τα γίγαρτα 1:40. Κατά συνέπεια για την παρασκευή του αραιωμένου διαλύματος γιγάρτων αραιώθηκαν 0,25 ml εκχυλίσματος σε 9,75 ml διαλύτη (μεθανόλη) και 0,33 ml πυκνού εκχυλίσματος φλοιών σε 9,67 ml διαλύτη (μεθανόλη). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη καθαρότητας HPLC.

## **2.7.2 Μέτρηση ολικών ανθοκυανών και φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο Pand**

### **2.7.2.1 Αρχή της μεθόδου**

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

### **2.7.2.2 Αντιδραστήρια**

- Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 50% v/v, pH=2. Για την παρασκευή 500 ml διαλύματος αναμιγνύονται 250 ml αιθανόλης με 250 ml απιονισμένου νερού. Η ρύθμιση του pH του διαλύματος γίνεται με HCl 1M.
- Διάλυμα HCl 1M. Για την παρασκευή του διαλύματος αραιώθηκε 1:12 πυκνό HCl 12 M σε απιονισμένο νερό.

### 2.7.2.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν αραιωμένα εκχυλίσματα 1:30. Για κάθε ποικιλία έγιναν 3 ξεχωριστές εκχυλίσεις (επαναλήψεις) με βάση την παρακάτω διαδικασία:

- Ανάδευση του γλεύκους
- Προσθήκη 1 ml γλεύκους σε πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρο
- Προσθήκη 10 ml διαλύματος 50% αιθανόλης pH=2
- Κλείσιμο του σωλήνα με παραφίλμ και κάλυψη του με αλουμινόχαρτο
- Ανάδευση κι εκχύλιση για 1 ώρα

### 2.7.2.4 Διαδικασία μέτρησης

Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τους φλοιούς και για τα γίγαρτα

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

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για δείγμα προστέθηκαν 0,5mL αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης (1:30 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC για φλοιούς και 1:40 για γίγαρτα αντίστοιχα). Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μηδενισμό του φωτόμετρου, αντίστοιχα.

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

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ανθοκυανών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η μαλβιδίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (6,25 – 200 ppm). Ενώ, για τις ολικές φαινολικές ενώσεις κατασκευάστηκαν δύο πρότυπες

καμπύλες, η μία με πρότυπη ένωση το γαλλικό οξύ σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (7,8125 – 500 ppm).

### 2.7.2.5 Υπολογισμοί ολικών ανθοκυανών και ολικών φαινολικών ενώσεων

#### 2.7.2.5.1 Ολικές ανθοκυάνες

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

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

$$(A_{520} * 30 * 12 * 0,001) / (0,001 * 0,4)$$

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

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

όπου %H= ποσοστό υγρασίας της ποικιλίας

#### 2.7.2.5.2 Ολικές φαινολικές ενώσεις

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

Έκφραση σε mg γαλλικού οξέος / gr νωπού ιστού

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

$$(A_{280} * 30 * 12 * 0,001) / (0,0023 * 0,4)$$

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

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

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

Έκφραση σε mg γαλλικού οξέος / gr νωπού ιστού

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

$$(A_{280} * 30 * 12 * 0,001) / (0,0023 * 0,4)$$

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

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

## **2.7.3 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose (μεθυλική κυτταρίνη)**

### **2.7.3.1 Αρχή της μεθόδου**

Η μέτρηση συγκέντρωσης συμπυκνωμένων ταννινών με Methyl cellulose είναι ένα μέσο μέτρησης της συγκέντρωσης ταννινών μετά από ομογενοποίηση και εκχύλιση στο κρασί και στα σταφύλια, αλλά και σε άλλα υδατικά διαλύματα (Sarneckis C., et al., 2006, Smith P.A., 2005). Η συγκεκριμένη μέθοδος μετράει το σύνολο των ταννινών του δείγματος οίνου ή ράγας. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με άλλα μόρια, όπως η methyl cellulose (μεθυλική κυτταρίνη) και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Το πολυμερές που χρησιμοποιείται είναι η methyl cellulose και ως εκ τούτου, η δοκιμασία μετρά τις ταννίνες που καθιζάνουν με την methyl cellulose, δηλαδή, μετρά την MCP - ταννίνη. Η δοκιμασία βασίζεται στην αφαίρεση των τιμών απορρόφησης στα 280nm (A280) των διαλυμάτων με και χωρίς καθίζηση που μετρήθηκαν με την χρήση φασματοφωτομέτρου. Η methyl cellulose δεν απορροφά στα 280nm, και συνεπώς δεν εμποδίζει τις μετρήσεις.

### **2.7.3.2 Αντιδραστήρια**

- Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 50% (όχι οξινισμένης). Η παρασκευή του διαλύματος γίνεται με προσθήκη 50 ml αιθανόλης σε ογκομετρική φιάλη και συμπλήρωση με απιονισμένο νερό μέχρι τα 100 ml.
- Κορεσμένο διάλυμα ammonium sulfate. Η παρασκευή του διαλύματος γίνεται με προσθήκη 300 ml απιονισμένου νερού σε ποτήρι ζέσεως των 500 ml και προστίθενται κρύσταλλοι θειικού αμμωνίου, υπό συνεχή ανάδευση, μέχρι να μην μπορεί να διαλυθεί άλλο. Συνεχίζεται η προσθήκη των κρυστάλλων μέχρι να υπάρχουν στον πάτο κρύσταλλοι θειικού αμμωνίου πάχους 1,5 cm περίπου.
- Διάλυμα methyl cellulose 0,04%. Η παρασκευή του διαλύματος γίνεται με θέρμανση περίπου 300 ml απιονισμένου νερού στους 80 °C και ψύξη περίπου 700 ml απιονισμένου νερού στους 0-5 °C. Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται τα 300 ml απιονισμένου νερού στους 80 °C και προστίθενται 0,4 gr methyl cellulose μέχρι να διαλυθεί τελείως με συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο 0-5 °C και προστίθεται σιγά σιγά το κρύο νερό, αναδεύοντας το για

20-40 λεπτά. Βγαίνει από το υδατόλουτρο κι αφήνεται υπό ανάδευση για 12 ώρες.

Για κάθε ποικιλία έγιναν 3 ξεχωριστές εκχυλίσεις (επαναλήψεις) με βάση την παρακάτω διαδικασία:

- Προσθήκη 1gr ομογενοποιημένων ραγών σε πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου
- Προσθήκη 10 ml υδατικού διαλύματος αιθανόλης 50%.
- Κλείσιμο του σωλήνα με παραφίλμ και κάλυψη του με αλουμινόχαρτο
- Ανάδευση κι εκχύλιση για 1 ώρα

### 2.7.3.3 Διαδικασία μέτρησης

Για τους φλοιούς χρησιμοποιήθηκαν αραιωμένα εκχυλίσματα 1:20 ενώ για τα γίγαρτα 1:40. Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τα δύο μέρη της ράγας (φλοιοί, γίγαρτα)

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

Σε 2 άλλους πλαστικούς σωλήνες αντί για δείγμα προστέθηκε 1 ml αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης (1:20 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC για φλοιούς και 1:40 για γίγαρτα αντίστοιχα). Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μηδενισμό του φωτόμετρου.

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

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

#### 2.7.3.4 Υπολογισμοί συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose

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

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

$$(A_{280} * 30 * 12 * 0,001) / (0,011 * 0,4)$$

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

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

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

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

$$(A_{280} * 30 * 12 * 0,001) / (0,011 * 0,4)$$

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

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

#### 2.7.4 Μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων με τη μέθοδο του Χλωριούχου Αργιλίου (AlCl<sub>3</sub>)

##### 2.7.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου προσδιορισμού των ολικών φλαβονοειδών με το χλωριούχο αργίλιο βασίζεται στο ότι το AlCl<sub>3</sub> σχηματίζει σταθερά όξινα σύμπλοκα με την κετονομάδα στη θέση C4 και την υδροξυλική ομάδα είτε της θέσης C3 είτε της θέσης C5 των φλαβονών και φλαβονολών. Επιπρόσθετα, σχηματίζει όξινα, ασταθή, σύμπλοκα με της όρθο-υδροξυλομάδες των δακτυλίων A και B των φλαβονοειδών.

##### 2.7.4.2 Αντιδραστήρια

- Υδατικό διάλυμα NaNO<sub>2</sub> 5% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 5 gr NaNO<sub>2</sub> και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml απιονισμένου νερού.

- Υδατικό διάλυμα  $\text{AlCl}_3$  10% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 10 gr  $\text{AlCl}_3$  και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml απιονισμένου νερού, κάτω από απαγωγό.
- Διάλυμα  $\text{NaOH}$  1N

#### 2.7.4.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου.

#### 2.7.4.4 Διαδικασία μέτρησης

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

- ο Προσθήκη 2 ml απεσταγμένο νερό
- ο Προσθήκη 0,5 ml αραιωμένου εκχυλίσματος
- ο Ανάδευση με vortex και προσθήκη 0,15 ml  $\text{NaNO}_2$  5% w/v
- ο Ανάδευση με vortex και μετά από 5 λεπτά προσθήκη 0,15 ml  $\text{AlCl}_3$  10% w/v
- ο Ανάδευση με vortex και μετά από 6 λεπτά προσθήκη 1 ml  $\text{NaOH}$  1N
- ο Ανάδευση με vortex και μετά προσθήκη 1,2ml απεσταγμένο νερό
- ο Ανάδευση με vortex και μέτρηση των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 510 nm (πλαστική κυψελίδα, λάμπα αλογόνου)

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για αραιωμένο εκχύλισμα προστέθηκαν 0,5mL αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης (1:30 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη παρήχθησαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φλαβονοειδών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η κατεχίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (7,8125 – 500 ppm).

#### 2.7.4.5 Υπολογισμοί ολικών φλαβονοειδών ενώσεων

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

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



$$(A_{510} * 30 * 12 * 0,001) / (0,0024 * 0,4)$$

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

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

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

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

$$(A_{510} * 30 * 12 * 0,001) / (0,0024 * 0,4)$$

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

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

## **2.7.5 Μέτρηση των ολικών φλαβονολών με τη μέθοδο της 4-διμεθυλ-αμμινοκινναμωμική αλδεΐδη (4-DMACA)**

### **2.7.5.1 Αρχή της μεθόδου**

Οι αλδεΐδες αντιδρούν με τις μ-διφαινόλες προς σχηματισμό ενός έγχρωμου (βαθύ μπλε) ιόντος υπό όξινες συνθήκες. Η αντίδραση έχει αξιοποιηθεί για την εκτίμηση των φλαβονολών καθώς ο δακτύλιος A έχει λειτουργικότητα μ-διφαινόλης. Οι Thies και Fischer (1971) πρώτη φορά ανέφεραν το βαθύ μπλε χρωματισμό της 4-DMACA μετά από αντίδραση της με τις κατεχίνες. Μια άλλη ευρύτερα διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό των φλαβονολών είναι αυτή που ως αλδεΐδη χρησιμοποιείται η αρωματική ένωση βανιλίνη. Όμως, η μέθοδος 4-DMACA έχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της βανιλίνης καθώς παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια και δεν υπάρχει καμία παρεμβολή από τις ανθοκυάνες.

### **2.7.5.2 Αντιδραστήρια**

- Σκόνη 4-DMACA 100 mg
- Διάλυμα 25% v/v HCl 1N
- Μεθανόλη Καθαρότητας HPLC

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

### 2.7.5.3 Διαδικασία μέτρησης

Για τους φλοιούς χρησιμοποιήθηκαν αραιωμένα εκχυλίσματα 1:30 και για τα γίγαρτα 1:40, ενώ η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τους φλοιούς και για τα γίγαρτα. Σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:

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

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για αραιωμένο εκχύλισμα προστέθηκαν 200 μl αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης (1:30 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

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

### 2.7.5.4 Υπολογισμοί ολικών φλαβανολών

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

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

$$(A_{640} * 30 * 12 * 0,001) / (0,045 * 0,4)$$

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

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

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

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

$$(A_{640} * 60 * 12 * 0,001) / (0,045 * 0,4)$$

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

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

## 2.7.6 Μέτρηση των ολικών φλαβονών και φλαβονολών με τη μέθοδο του Χλωριούχου Αργιλίου ( $\text{AlCl}_3$ )

### 2.7.6.1 Αρχή της μεθόδου

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

### 2.7.6.2 Αντιδραστήρια

- Μεθανόλη Καθαρότητας HPLC
- Διάλυμα  $\text{AlCl}_3$  5% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 5 gr  $\text{AlCl}_3$  και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml μεθανόλης καθαρότητας HPLC, κάτω από απαγωγό.

### 2.7.6.3 Προετοιμασία δειγμάτων

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

### 2.7.6.4 Διαδικασία μέτρησης

Σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:

- Μεταφέρθηκαν 0,2 ml εκχυλίσματος
- Προσθήκη 2 ml μεθανόλης κι ακολουθεί ανάμιξη
- Προσθήκη 0,1 ml διάλυμα  $\text{AlCl}_3$  κι ακολουθεί ανάμιξη
- Προσθήκη 2,7 ml μεθανόλη κι ακολουθεί ανάμιξη
- Παραμονή του δείγματος για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ηρεμία
- Μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 425 nm

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για αραιωμένο εκχύλισμα προστέθηκαν 0,2 ml αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης (1:30 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη παρήχθησαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φλαβονών και φλαβονολών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η ρουτίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (7,8125 – 500 ppm).

#### 2.7.6.5 Υπολογισμοί ολικών φλαβονών και φλαβονολών

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

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

$$(A_{425} * 12 * 0,001) / (0,0013 * 0,4)$$

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

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

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

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

$$(A_{425} * 12 * 0,001) / (0,0013 * 0,4)$$

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

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

## 2.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ HPLC ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ

### 2.8.1 Αρχή λειτουργίας του οργάνου

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

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

Η HPLC έχει δύο μορφές, την HPLC κανονικής φάσης και την HPLC αντίστροφης φάσης που είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή. Σε αυτή, ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων (μη πολικά) σε υδρόφοβη (μη πολική) στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Το γεγονός ότι η στατική φάση δεν είναι πολική οφείλεται, στις μακριές αλυσίδες υδρογονάνθρακα που είναι προσδεμένες στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού. Τα μη πολικά μόρια στο διαχωριζόμενο δείγμα προσροφούνται ισχυρά στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα, ενώ τα πολικά μόρια

κινούνται ταχύτερα διαμέσου της στήλης και εκλούνται νωρίτερα. Παρακάτω συνοψίζονται τα στάδια της HPLC:

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

## **2.8.2 Μέτρηση μεμονομένων ανθοκυανών**

### **2.8.2.1 Αντιδραστήρια κι εξοπλισμός για την HPLC**

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

- αντλία Gradient, Shimadzu Nexera X2
- στήλη X-select της Waters C<sub>18</sub>, διαστάσεων 250 x 4,6 mm και διαμέτρου 4.6 μm,
- ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων UV-Vis (PDA)

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

- 95% διαλύτης A αρχικά (0 min)

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

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιηθήκαν ήταν:

- Μεθανόλη Καθαρότητας HPLC
- Νερό Καθαρότητας HPLC

#### **2.8.2.2 Προετοιμασία δειγμάτων**

Μετά από δοκιμές, παρατηρήθηκε ότι οι καταλληλότεροι διαλύτες του δείγματος, για το σκοπό της μελέτης, ήταν η μεθανόλη και το νερό. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι εκχυλίσματα των ανθοκυανών είχαν γίνει σε διάλυμα μεθανόλης, ακετόνης και νερού (40:40:20), έγινε εξάτμιση των αρχικών διαλυτών σε ροή αζώτου και λυοφιλίωση.



**Εικόνα 14:** Χώρος εξάτμισης

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής και εφαρμόστηκε συνολικά τρεις φορές, μία για κάθε επανάληψη:

- Μεταφορά 2 ml εκχυλίσματος σε πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρο των 50 ml
- Τοποθέτηση πλαστικού σωλήνα σε υδατόλουτρο στους 30 °C
- Εξάτμιση των διαλυτών με εμφύσηση αερίου αζώτου σε ήπια ένταση
- Λυοφιλίωση των στερεών υπολειμμάτων των ανθοκυανών για αποβολή πιθανής υγρασίας



### 2.8.2.3 Διαδικασία μέτρησης

Μετά την διαδικασία λυοφιλίωσης ακολούθησε η παρασκευή του διαλύματος για την HPLC:

- Προσθήκη 50 ml μεθανόλης καθαρότητας HPLC στο πλαστικό σωλήνα με το στερεό υπόλειμμα ανθοκυανών και ανάδευση με vortex (αραίωση 1:25 επί του αρχικού εκχυλίσματος)
- Λήψη 0,4 ml διαλύματος σε νέο πλαστικό σωλήνα
- Προσθήκη 0,8 ml νερό Καθαρότητας HPLC και ανάδευση (τελικός όγκος 1,2 ml / αραίωση 1:3)
- Φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος με φίλτρο 0,2μm και ταυτόχρονη μεταφορά του σε κατάλληλους περιέκτες για αυτόματο δειγματολήπτη
- Τοποθέτηση του περιέκτη στο όργανο της HPLC

Για κάθε επανάληψη έλαβε χώρα μία μέτρηση στην HPLC, καθώς το όργανο παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιώντας τις πρότυπες καμπύλες, βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων σε κάθε ανθοκυάνη ξεχωριστά. Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών, της κάθε ανθοκυάνης, παρασκευάστηκαν διαλύματα μεθανόλης-νερού, όπως και για τα δείγματα, στα οποία προστέθηκαν κλιμακούμενες συγκεντρώσεις των μονογλυκοζιτών-3 της κάθε ανθοκυάνης.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ταυτοποίηση των ανθοκυανών στα δείγματα βάση των πρότυπων ουσιών των ανθοκυανών, συγκρίνοντας τους χρόνους συγκράτησης ( $t_R$ ) και το φάσμα απορρόφησης. Οι ανθοκυάνες που ταυτοποιήθηκαν είναι η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη, η πετουινιδίνη, η παιονιδίνη κι η μαλβιδίνη.

### 2.8.2.4 Υπολογισμός μεμονωμένων ανθοκυανών

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

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

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

$$(Υψος*75*6*0,001) / (κλίση πρότυπης καμπύλης*0,4)$$

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

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

<b>Ανθοκυάνη</b>	<b>Κλίση πρότυπης καμπύλης</b>
Κυανιδίνη	5015,6
Δελφινιδίνη	5380,3
Πετουνιδίνη	4180
Παιονιδίνη	10298
Μαλβιδίνη	4050

### **2.8.3 Μέτρηση υπόλοιπων μεμονομένων φαινολικών ενώσεων**

#### **2.8.3.1 Αντιδραστήρια κι εξοπλισμός για την HPLC**

Όπως και στην περίπτωση της μέτρησης των μεμονωμένων ανθοκυανών, ο εξοπλισμός του οργάνου HPLC αποτελείται από:

- Αντλία Gradient, Shimadzu Nexera X2
- Στήλη x-select της Waters C<sub>18</sub>, διαστάσεων 250 x 4,6 mm και διαμέτρου 4.6 μm,
- Ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων UV-Vis (PDA)

Η κινητή φάση αποτελείται από τον διαλύτη A (υδατικό διάλυμα 1% v/v υπερχλωρικού οξέος) και τον διαλύτη B (μεθανόλη). Ο ρυθμός ροής είναι 0,5 mL/min με όγκο δείγματος 20μL (αυτόματη έγχυση), ανίχνευση στα 280nm και το πρόγραμμα έκλουσης είναι το εξής:

- 100% διαλύτης A αρχικά (0 min)
- 100% διαλύτης A στο 2 min
- 95% διαλύτης A στο 16 min
- 90% διαλύτης A στο 25 min
- 85% διαλύτης A στο 5 min
- 75% διαλύτης A στο 90 min
- 55% διαλύτης A στο 120 min
- 25% διαλύτης A στο 145 min

- 10% διαλύτης A στο 150 min
- 5% διαλύτης A στο 155 min
- 100% διαλύτη A στο 158 min όπου διατηρήθηκε ισοκρατικά για επιπλέον 8 min

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιηθήκαν ήταν:

- Οξικός αιθυλεστέρας
- Μεθανόλη Καθαρότητας HPLC
- Απιονισμένο νερό

### 2.8.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων ήταν ίδια και για τις τρεις επαναλήψεις (εκχυλίσεις) όλων των ποικιλιών.

Αρχικά, εφαρμόστηκε υγρή εκχύλιση “liquid-liquid extraction” στα πυκνά εκχυλίσματα. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε με σκοπό την πρόσληψη όλων των φαινολικών ενώσεων (εκτός των ανθοκυανών) από το εκχύλισμα. Για να γίνει αυτό χρησιμοποιήθηκε ο οξικός αιθυλεστέρας που είναι περισσότερο πολικός διαλύτης από την μεθανόλη και την ακετόνη που ήταν οι δύο βασικοί διαλύτες του εκχυλίσματος. Τα στάδια της μεθόδου είναι τα εξής:

- Μεταφορά 0,5 ml πυκνό εκχύλισμα σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου
- Προσθήκη 4 ml οξικού αιθυλεστέρα και ανάδευση με vortex
- Φυγοκέντρωση στις 5000 rpm για 10 λεπτά

Στη συνέχεια, ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία που αποσκοπούσε στην αφαίρεση των ανθοκυανών από το διάλυμα του οξικού αιθυλεστέρα. Η αρχή της μεθόδου αυτής έγκειται στο γεγονός ότι οι ανθοκυάνες είναι υδατοδιαλυτές, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις. Η αφαίρεση των ανθοκυανών ήταν απαραίτητη, διαφορετικά θα ήταν πολύ δύσκολος έως αδύνατος ο διαχωρισμός κι η ταυτοποίηση των υπόλοιπων φαινολικών ενώσεων στην HPLC. Τα στάδια της μεθόδου είναι τα εξής:

- Μεταφορά του υπερκείμενου από την παραπάνω φυγοκέντρωση σε ένα πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου
- Προσθήκη 1,5 ml απιονισμένου νερού και ανάδευση με vortex

- Φυγοκέντρωση στις 5000 rpm για δύο λεπτά με σκοπό να διαχωριστούν οι δύο φάσεις-διαλύτες (νερό με τις ανθοκυάνες κι οξικός αιθυλεστέρας με τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις)
- Υπερκείμενο στρώμα είναι ο οξικός αιθυλεστέρας, υποκείμενο στρώμα είναι το νερό
- Λήψη του υποκείμενου στρώματος νερού με μηχανική πιπέτα κι απόρριψη του
- **Επανάληψη της διαδικασίας -2<sup>η</sup> φορά-** για το υπερκείμενο στρώμα του οξικού αιθυλεστέρα από την αρχή, δηλαδή από την προσθήκη 1,5 ml διαλύματος νερού
- Εκ νέου απόρριψη του υποκείμενου μετά τη φυγοκέντρωση
- **Επανάληψη της διαδικασίας -3<sup>η</sup> φορά-** για το υπερκείμενο στρώμα του οξικού αιθυλεστέρα από την αρχή, δηλαδή από την προσθήκη 1,5 ml διαλύματος νερού
- Εκ νέου απόρριψη του υποκείμενου μετά τη φυγοκέντρωση

Τέλος, για να ολοκληρωθεί η προετοιμασία των δειγμάτων εφαρμόστηκε και σε αυτή τη μέτρηση η εξάτμιση του οξικού αιθυλεστέρα με τη μέθοδο του αέριου αζώτου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Μεταφορά του διαλύματος του οξικού αιθυλεστέρα με τις φαινολικές ενώσεις σε πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρο των 50 ml
- Τοποθέτηση πλαστικού σωλήνα σε υδατόλουτρο στους 25 °C
- Εξάτμιση των διαλυτών σε ροή αζώτου σε ήπια ένταση

Στην περίπτωση των φαινολικών ενώσεων δεν ακολούθησε λυοφιλίωση καθώς στο διάλυμα δεν υπήρχε νερό κι ο οξικός αιθυλεστέρας εξατμίστηκε εξ ολοκλήρου με το αέριο άζωτο.

### 2.8.3.3 Διαδικασία μέτρησης

Μετά την διαδικασία εξάτμισης ακολούθησε η παρασκευή του διαλύματος για την HPLC:

- Προσθήκη 0,5 ml μεθανόλης Καθαρότητας HPLC στο πλαστικό σωλήνα με το στερεό υπόλειμμα των φαινολικών ενώσεων και ανάδευση με vortex

- Προσθήκη 0,5 ml νερό Καθαρότητας HPLC και ανάδευση (τελικός όγκος 1 ml / αραίωση 1:2)
- Φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος με φίλτρο 0,2μm και ταυτόχρονη μεταφορά του σε κατάλληλους περιέκτες (vials 1.5 ml) για αυτόματο δειγματολήπτη
- Τοποθέτηση του περιέκτη στο όργανο της HPLC

Για κάθε επανάληψη έλαβε χώρα μία μέτρηση στην HPLC, καθώς το όργανο παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα, και χρησιμοποιώντας τις πρότυπες καμπύλες, βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων σε κάθε φαινολική ένωση ξεχωριστά. Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών, της κάθε φαινολικής ένωσης, παρασκευάστηκαν διαλύματα μεθανόλης-νερού, όπως και για τα δείγματα, στα οποία προστέθηκαν κλιμακούμενες συγκεντρώσεις των καθαρών μορίων των φαινολικών ενώσεων.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα βάση των πρότυπων ενώσεων τους, συγκρίνοντας τους χρόνους συγκράτησης ( $t_R$ ) του κάθε μορίου και το φάσμα απορρόφησης. Οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν είναι οι:

- *Φλαβανόλες*: κατεχίνη, επικατεχίνη, προκανιδίνη B1, προκυανιδίνη B2
- *Φλαβόνες & Φλαβονόλες*: κερκετίνη, ρουτίνη, λουτεολίνη
- *Υδροξυβενζοϊκά οξέα*: γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, βανιλλικό οξύ, συριγκικό οξύ
- *Υδροξυκινναμωμικά οξέα*: καφεϊκό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, μ-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, σιναπικό οξύ, καφταρικό οξύ, κουταρικό οξύ, φερταρικό οξύ
- *Στιλβένια*: ρεσβερατρόλη, ε-βινιφερίνη, piceid
- *Φαινολικές Αλδεΐδες*: βανιλίνη

#### 2.8.3.4 Υπολογισμός μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων

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

Ο υπολογισμός αυτός γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα τους εκφράζεται σε μg της φαινολικής ένωσης / gr νεπού ιστού:

- (A) Υπολογισμός μg φαινολικής ένωσης / gr ξηρού ιστού:  

$$(Υψος*2*12) / (κλίση\ πρότυπης\ καμπύλης*0,4)$$
- (B) Υπολογισμός μg φαινολικής ένωσης / gr νωπού ιστού:  

$$(A)-[0,7*(A)]$$

Ομάδα φαινολικών ενώσεων	Φαινολική ένωση	Κλίση πρότυπης καμπύλης
Φλαβανόλες	Κατεχίνη	826,27
	Επικατεχίνη	491,6
	Προκυανιδίνη B1	726,13
	Προκυανιδίνη B2	473,98
Φλαβόνες & Φλαβονόλες	Λουτεολίνη	3263
	Κερκετίνη	1941,6
	Ρουτίνη	887,15
Υδροξυβενζοϊκά οξέα	Γαλλικό οξύ	4739,6
	Πρωτοκατεχικό οξύ	6021,6
	Βανιλλικό οξύ	2443,1
	Συριγκικό οξύ	3542,4
	Καφεϊκό οξύ	4094
Υδροξυκινναμωμικά οξέα	π-Κουμαρικό οξύ	4443,3
	μ-Κουμαρικό οξύ	6904,8
	Φερουλικό οξύ	6963,8
	Σιναπικό οξύ	1703
	Καφταρικό οξύ	1106,9
	Κουταρικό οξύ	2220,9
	Φερταρικό οξύ	1559,8
	Ρεσβερατρόλη	3772,7
Στιλβένια	ε-Βινιφερίνη	2334,1
	Piceid	2104,2
Φαινολικές αλδεΐδες	Βανιλίνη	6205,4

## 2.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων έγινε με το πρόγραμμα Jump 8.0 (SAS Institute Inc). Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (ANOVA). Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Student's T test, σε επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0,05$ . Στην παράθεση των αποτελεσμάτων οι μέσοι όροι ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου υποδηλώνοντας την ύπαρξη ή μη στατιστικά σημαντικής διαφοράς και από το στατιστικό σφάλμα του μέσου.

## 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΡΑΓΑΣ & ΣΤΑΦΥΛΗΣ

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΜΗΚΟΣ ΡΑΓΩΝ (mm)	ΠΛΑΤΟΣ ΡΑΓΩΝ (mm)	ΒΑΡΟΣ 50 ΡΑΓΩΝ (gr)	ΔΥΝΑΜΗ ΠΡΟΣΦΗΣΗΣ (N)
Κοτσιφάλι	14,80 ± 0,26b	12,77 ± 0,12bc	81,66 ± 2,60b	1,00 ± 0,21bc
Λιάτικο	14,47 ± 0,31b	13,55 ± 0,15bc	81,33 ± 3,28b	0,90 ± 0,12c
Μανδηλαριά	16,77 ± 0,29a	16,95 ± 0,38a	155,33 ± 4,66a	1,44 ± 0,09ab
Βερτζαμί	11,04 ± 0,2c	11,26 ± 0,54cd	51,66 ± 3,84c	0,93 ± 0,03c
Κρασάτο	11,54 ± 0,35c	11,57 ± 0,47bcd	52,33 ± 1,20c	0,74 ± 0,03c
Σκοπελίτικο	14,01 ± 0,27b	12,98 ± 0,44bc	83,33 ± 3,84b	0,75 ± 0,03c
Μαυρούδι ψιλό Καλαβρύτων	10,93 ± 0,44c	10,18 ± 0,42d	39,66 ± 2,02c	0,63 ± 0,03c
Αηδάνι Μαύρο	11,28 ± 0,50c	12,42 ± 0,88bcd	72,00 ± 2,51b	0,78 ± 0,03c
Μαυροθήρικο	13,39 ± 0,38b	13,79 ± 0,40b	84,66 ± 1,45b	1,56 ± 0,12a

Οι δείκτες a,b,c,d,e στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )

**Πίνακας 3.1:** Μηχανικές αναλύσεις ράγας

Οι μετρήσεις του μήκους και πλάτους των ραγών πραγματοποιήθηκαν στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης. Οι διαστάσεις των ραγών παρουσίασαν σχετική αναλογία μεταξύ μήκους και πλάτους. Οι ράγες δηλαδή σχεδόν κατά πλειοψηφία με το μεγαλύτερο μήκος, εμφάνισαν και το μεγαλύτερο πλάτος. Στις ποικιλίες Λιάτικο,

Κοτσιφάλι, Σκοπελίτικο και Μαυρούδι ψιλό Καλαβρύτων παρατηρήθηκε ότι το μήκος ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με το πλάτος των ραγών. Εν αντιθέσει με τις Μανδηλαριά, Βερτζαμί, Κρασάτο, Αηδάνι μαύρο και Μαυροθήρικο όπου το πλάτος τους ήταν στατιστικά μεγαλύτερο από το μήκος τους. Το μήκος κυμάνθηκε από 10,93 mm μέχρι 16,77 mm, ενώ το πλάτος από 10,18 mm μέχρι 16,95 mm.

Συγκεκριμένα, τις **μεγαλύτερες διαστάσεις ραγών** τις παρουσίασε η **Μανδηλαριά**, με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες. Οι **μικρότερες διαστάσεις ραγών** μετρήθηκαν στην ποικιλία **Μαυρούδι ψιλό Καλαβρύτων**, με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες, επιβεβαιώνοντας την ετυμολογική της ερμηνεία.

Η ποικιλία **Μανδηλαριά** παρουσίασε το **μεγαλύτερο βάρος 50 ραγών** (155,33 gr) διαφέροντας στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Οι ποικιλίες Κοτσιφάλι (81,66 gr) Λιάτικο (81,33 gr) Σκοπελίτικο (83,33 gr) και Μαυροθήρικο (84,66 gr) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Οι ποικιλίες Βερτζαμί (51,66 gr) και Κρασάτο (52,33 gr) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Η ποικιλία Αηδάνι μαύρο (72 gr) διέφερε στατιστικά σημαντικά από όλες τις υπόλοιπες. Το **χαμηλότερο βάρος 50 ραγών** εμφανίστηκε στο **Μαυρούδι ψιλό Καλαβρύτων** (39,66 gr) με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες.

Τη **μεγαλύτερη δύναμη πρόσφυσης των ραγών** την παρουσίασαν οι ποικιλίες **Μαυροθήρικο** (1,56 N) κι ακολούθως η **Μανδηλαριά** (1,44 N). Το Κοτσιφάλι (1,00 N), το Λιάτικο (0,90 N) και το Βερτζαμί (0,93 N) δεν διέφεραν στατιστικά, σημαντικά μεταξύ τους. Αντιστοίχως τα Κρασάτο (0,74 N) Σκοπελίτικο (0,75 N) και Αηδάνι Μαύρο (0,78 N) δεν παρουσίασαν σημαντικές στατιστικές διαφορές δύναμης πρόσφυσης. Την **μικρότερη δύναμη πρόσφυσης** την παρουσίασε το **Μαυρούδι ψιλό Καλαβρύτων** (0,63 N) διαφέροντας στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες.



ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΜΗΚΟΣ ΣΤΑΦΥΛΗΣ (cm)	ΠΛΑΤΟΣ ΣΤΑΦΥΛΗΣ (cm)	ΒΑΡΟΣ ΣΤΑΦΥΛΗΣ (gr)
Κοτσιφάλι	13,33 ± 0,33bc	11 ± 0,57a	205,66 ± 12,78cd
Λιάτικο	15,50 ± 1,04bc	9,33 ± 0,44abc	140,66 ± 5,84ef
Μανδηλαριά	18,16 ± 0,60ab	14,16 ± 1,69a	589 ± 41,90a
Βερτζαμί	11,70 ± 1,67c	5,16 ± 0,72c	79 ± 1,15g
Κρασάτο	17,66 ± 0,33ab	8,83 ± 1,16bc	164,66 ± 10,86 <sup>de</sup>
Σκοπελίτικο	13,33 ± 1,58bc	6,66 ± 0,33bc	134,33 ± 2,90ef
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων	13,83 ± 0,92bc	8,66 ± 0,88bc	111,33 ± 2,84fg
Αηδάνι Μαύρο	22,00 ± 1a	9,16 ± 1,58abc	318,33 ± 7,88b
Μαυροθήρικο	15,33 ± 0,44bc	10,33 ± 1,01ab	229,66 ± 6,33c

**Πίνακας 3.2:** Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής

Οι δείκτες a,b,c,d στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )

Δεν καταγράφηκε αναλογία μεταξύ μήκους και πλάτους των σταφυλών. Το μεγαλύτερο μήκος σταφυλής μετρήθηκε στην ποικιλία Αηδάνι (22 cm) διαφέροντας στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες. Η ποικιλία Βερτζαμί ήταν η λιγότερο επιμήκης (15,8 cm). Αντίθετα, το μεγαλύτερο πλάτος σταφυλής μετρήθηκε στην ποικιλία Μανδηλαριά (14,16 cm) και το μικρότερο πλάτος μετρήθηκε πάλι στο Βερτζαμί (5,16 cm).

Οι ποικιλίες Μανδηλαριά (589 gr), το Αηδάνι Μαύρο (318,33gr) και Μαυροθήρικο (229,66 gr) παρουσίασαν το μεγαλύτερο βάρος σταφυλής διαφέροντας στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, ενώ το μικρότερο βάρος παρουσίασε το Βερτζαμί (79 gr).

### 3.2 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΓΛΕΥΚΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ

Η μεγαλύτερη **περιεκτικότητα σακχάρων** μετρήθηκε στην ποικιλία Λιάτικο (21,16 °Brix), ενώ η μικρότερη τιμή καταγράφηκε στην Μανδηλαριά (15,7 °Brix). Όλες οι ποικιλίες δεν παρουσίασαν μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά πλην της Μανδηλαριάς και του Ψιλού Καλαβρυτινού.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΣΑΚΧΑΡΑ (Brix)	pH	ΟΞΥΤΗΤΑ (g τρυγικού / lt)
Κοτσιφάλι	17,93 ± 0,06c	3,47 ± 0,01e	3,80 ± 0,33c
Λιάτικο	21,16 ± 0,03a	3,81 ± 0,01b	4,50 ± 0,28c
Μανδηλαριά	15,7 ± 0,05e	3,62 ± 0,04d	4,5 ± 0,33c
Βερτζαμί	20,00 ± 0,00b	3,66 ± 0,02cd	7,5 ± 0,00a
Κρασάτο	20,93 ± 0,06a	3,31 ± 0,01f	6,75 ± 0,33ab
Σκοπελίτικο	20,93 ± 0,06a	3,65 ± 0,02cd	6,37 ± 0,33ab
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων	17,03 ± 0,03d	3,56 ± 0,01de	6,00 ± 0,00b
Αηδάνι μαύρο	20,90 ± 0,05a	4,01 ± 0,01a	3,80 ± 0,33c
Μαυροθήρικο	20,06 ± 0,06b	3,75 ± 0,03bc	5,62 ± 0,33b

*Πίνακας 3.3: Μέτρηση γλευκογραφικών χαρακτηριστικών*

*Οι δείκτες a,b,c,d,e,f,g στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )*

Η ποικιλία στην οποία καταγράφηκε η χαμηλότερη ενεργή οξύτητα ήταν το Κρασάτο (pH 3,31), ενώ η ποικιλία που εμφάνισε την υψηλότερη τιμή ήταν το Αηδάνι Μαύρο (pH 4,01). Όλες οι ποικιλίες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 3.3).

Η μεγαλύτερη **ολική οξύτητα** καταγράφηκε στην ποικιλία Βερτζαμί (7,5 g τρυγικού οξέος/ L γλεύκους), ενώ η μικρότερη τιμή μετρήθηκε στο Κοτσιφάλι και στο Αηδάνι Μαύρο (3,80 g τρυγικού οξέος/ L γλεύκους). Οι υπόλοιπες ποικιλίες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορές μεταξύ τους, στα όρια όμως φυσιολογικών τιμών ολικής οξύτητας. Ενδιαφέρουσες τιμές οξύτητας εμφάνισαν

μετά το Βερτζαμί και το Κρασάτο (6,75 g τρυγικού οξέος/ L γλεύκους ), το Σκοπελίτικο (6,37 g τρυγικού οξέος/ L γλεύκους) και το Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων (6,0 g τρυγικού οξέος/ L γλεύκους).

<b>ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ</b>	<b>ΑΡΓΙΝΙΝΗ (mg/ml γλεύκους)</b>	<b>ΠΡΟΛΙΝΗ (mg/ml γλεύκους)</b>
Κοτσιφάλι	0,27± 0,004	0,17 ± 0,065
Λιάτικο	0,73 ±0,012	0,47± 0,007
Μανδηλαριά	0,50± 0,020	0,02 ± 0,004
Βερτζαμί	0,40 ± 0,025	0,79 ± 0,003
Κρασάτο	0,39 ± 0,007	0,96± 0,002
Σκοπελίτικο	0,31 ± 0,017	0,85± 0,006
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων	0,36 ± 0,013	0,22± 0,001
Αηδάνι Μαύρο	0,34 ± 0,026	0,27± 0,004
Μαυροθήρικο	0,21 ± 0,015	0,33 ± 0,023

*Πίνακας 3.4: Μέτρηση αμινοξέων*

Η μεγαλύτερη **περιεκτικότητα αργινίνης** μετρήθηκε στην ποικιλία Λιάτικο (0,73 mg / ml γλεύκους) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Μικρότερες τιμές καταγράφηκαν στη Δουμπραίνα Μαύρη (0,30 mg / ml γλεύκους) και στο Κοτσιφάλι (0,27 mg / ml γλεύκους ) και στο Μαυροθήρικο (0,21 mg / ml γλεύκους) χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Η υψηλότερη **περιεκτικότητα προλίνης** καταγράφηκε στο Κρασάτο (0,96 mg/ml γλεύκους) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Επίσης, το Σκοπελίτικο (0,85 mg/ml γλεύκους) και το Βερτζαμί (0,79 mg / ml γλεύκους) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι υπόλοιπες ποικιλίες δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, πέραν της Μανδηλαριάς που παρουσίασε την μικρότερη τιμή (0,02 mg / ml γλεύκους).

### 3.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ & ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Στον πίνακα 3.5 παρατίθενται οι μετρήσεις της περιεκτικότητας των φλοιών και των γιγάρτων των ποικιλιών σε ολικές φαινολικές ενώσεις. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα στους φλοιούς καταγράφηκε στο Βερτζαμί (19,48 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Ακολούθησε το Λιάτικο (9,80 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) ενώ οι χαμηλότερες τιμές καταγράφηκαν στις ποικιλίες Μανδηλαριά (4,86 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) και Κοτσιφάλι (3,71 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού), που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά με τις υπόλοιπες ποικιλίες.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΦΛΟΙΩΝ (mg γαλλικού οξέος/ g νωπού ιστού)	ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΓΙΓΑΡΤΩΝ (mg γαλλικού οξέος/ g νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	3,71 ± 0,35e	22,82 ± 0,34bc
Λιάτικο	9,80 ± 0,18b	28,74 ± 0,67a
Μανδηλαριά	4,86 ± 0,19 <sup>de</sup>	24,40 ± 1,01b
Βερτζαμί	19,48 ± 0,36a	23,23 ± 0,52bc
Κρασάτο	7,28 ± 0,43c	20,92 ± 1,47bc
Σκοπελίτικο	7,17 ± 0,10c	22,49 ± 0,31bc
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων	7,20 ± 0,80c	21,82 ± 0,49bc
Αηδάνι Μαύρο	6,44 ± 0,06cd	19,84 ± 0,38c
Μαυροθήρικο	7,58 ± 0,31c	22,97 ± 0,12bc

*Πίνακας 3.5: Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων*

*Οι δείκτες a,b,c,d,e στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test (P<0,05)*

Στα γίγαρτα οι μεγαλύτερες περιεκτικότητες ολικών φαινολικών ενώσεων μετρήθηκαν στις ποικιλίες Λιάτικο (28,74 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) και Μανδηλαριά (24,40 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από την πλειοψηφία των υπολοίπων. Η ποικιλία Αηδάνι

Μαύρο παρουσίασε την μικρότερη τιμή (19,84 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού), (Πίνακας 3.5).

Στον πίνακα 3.6 παρατίθενται οι μετρήσεις περιεκτικότητας των **ολικών φλαβονοειδών ενώσεων** στους φλοιούς και στα γίγαρτα των ραγών. Η ποικιλία με τη μεγαλύτερη τιμή επί των φλοιών ήταν το Βερτζαμί (23,39 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες. Μικρότερη περιεκτικότητα παρουσίασε το Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων (7,82 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού).

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΦΛΟΙΟΙ	ΓΙΓΑΡΤΑ
	(mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού)	(mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	8,97 ± 0,36 <sup>de</sup>	47,60 ± 2,12cd
Λιάτικο	9,49 ± 0,78cde	69,62 ± 0,62a
Μανδηλαριά	12,02 ± 0,44bcd	38,38 ± 1,44e
Βερτζαμί	23,39 ± 1,04a	54,10 ± 0,99b
Κρασάτο	13,32 ± 0,61b	51,65 ± 0,52bc
Σκοπελίτικο	12,33 ± 0,65bc	51,36 ± 0,52bc
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων	7,82 ± 0,47e	47,54 ± 1,74cd
Αηδάνι Μαύρο	11,57 ± 0,58bcd	44,74 ± 0,87d
Μαυροθήρικο	14,07 ± 0,59b	49,12 ± 1,44bcd

**Πίνακας 3.6:** Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών ενώσεων

*Οι δείκτες a,b,c,d στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test (P<0,05)*

Η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ολικών φλαβονοειδών** στο **γίγαρτα** ήταν το Λιάτικο (69,62 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από το αμέσως επόμενο Βερτζαμί (54,10 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού). Οι υπόλοιπες ποικιλίες δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, πλην της Μανδηλαριάς που σημείωσε την μικρότερη τιμή (38,38 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού).

### 3.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ & ΟΛΙΚΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	Κυανιδίνη (mg / gr νωπού ιστού)	Δελφινιδίνη (mg / gr νωπού ιστού)	Πετουνιδίνη (mg / gr νωπού ιστού)	Παιονιδίνη (mg / gr νωπού ιστού)	Μαλβιδίνη (mg / gr νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	0,07 ± 0,00b	0,02 ± 0,00f	0,03 ± 0,00g	0,13 ± 0,00b	0,20 ± 0,00de
Λιάτικο	0,01 ± 0,00ef	0,02 ± 0,00f	0,03 ± 0,00g	0,02 ± 0,00e	0,21 ± 0,00de
Μανδηλαριά	0,01 ± 0,00f	0,01 ± 0,00f	0,02 ± 0,00g	0,01 ± 0,00e	0,15 ± 0,02e
Βερτζαμί	0,05 ± 0,00f	0,26 ± 0,00a	0,39 ± 0,00a	0,09 ± 0,00c	1,76 ± 0,05a
Κρασάτο	0,01 ± 0,00f	0,05 ± 0,00e	0,09 ± 0,00e	0,02 ± 0,00e	0,82 ± 0,00b
Σκοπελίτικο	0,02 ± 0,00de	0,07 ± 0,00d	0,13 ± 0,00d	0,04 ± 0,00d	0,64 ± 0,02c
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων	0,22 ± 0,00a	0,16 ± 0,00b	0,16 ± 0,00c	0,21 ± 0,00a	0,36 ± 0,00d
Αηδάνι Μαύρο	0,01 ± 0,00f	0,04 ± 0,00e	0,06 ± 0,00f	0,01 ± 0,00e	0,57 ± 0,07c
Μαυροθήρικο	0,02 ± 0,00d	0,13 ± 0,00c	0,20 ± 0,00b	0,03 ± 0,00d	0,89 ± 0,03b

**Πίνακας 3.7:** Μέτρηση μεμονωμένων ανθοκυανών

Οι δείκτες a,b,c,d στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )

Στον πίνακα 3.7 παρατίθενται οι μετρήσεις περιεκτικότητας των **μεμονωμένων ανθοκυανών** στους **φλοιούς** των ποικιλιών. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **κυανιδίνης** μετρήθηκε στην ποικιλία Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων (0,22 mg / gr νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά από το αμέσως επόμενο Κοτσιφάλι (0,07 mg / gr νωπού ιστού). Μικρότερη περιεκτικότητα εμφάνισε το Λιάτικο (0,01 mg / gr νωπού ιστού) μη διαφέροντας στατιστικά από την Μανδηλαριά, το Κρασάτο και το Αηδάνι Μαύρο που εμφάνισαν την ίδια χαμηλή περιεκτικότητα.

Η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα **δελφινιδίνης** ήταν το Βερτζαμί (0,26 mg / gr νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Μικρότερη περιεκτικότητα εμφάνισαν οι ποικιλίες Μανδηλαριά (0,01 mg / gr νωπού ιστού), Κοτσιφάλι και Λιάτικο (0,02 mg / gr νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα **πετουνιδίνης** ήταν το Βερτζαμί (0,39 mg / gr νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από την επόμενη ποικιλία, το Μαυροθήρικο (0,20 mg / gr νωπού ιστού). Μικρότερες τιμές καταγράφηκαν στις ποικιλίες Μανδηλαριά (0,02 mg / gr νωπού ιστού), Κοτσιφάλι και Λιάτικο (0,03 mg / gr νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **παιονιδίνης** μετρήθηκε στο Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων (0,21 mg / gr νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από την επόμενη ποικιλία το Κοτσιφάλι (0,13 mg / gr νωπού ιστού). Οι υπόλοιπες ποικιλίες παρουσίασαν επίσης μικρές τιμές που όμως διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Οι μεγαλύτερες περιεκτικότητες **μαλβιδίνης** μετρήθηκαν στο Βερτζαμί (1,76 mg / gr νωπού ιστού) διαφέροντας στατιστικά σημαντικά από τις επόμενες Μαυροθήρικο (0,89 mg / gr νωπού ιστού) και Κρασάτο (0,82 mg / gr νωπού ιστού). Μικρότερη περιεκτικότητα σημειώθηκε στο Κοτσιφάλι (0,20 mg / gr νωπού ιστού).

<b>ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ</b>	<b>ΦΛΟΙΟΙ</b> (mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	4,90 ± 0,03e
Λιάτικο	1,77 ± 0,05f
Μανδηλαριά	9,04 ± 0,00c
Βερτζαμί	13,66 ± 0,19a
Κρασάτο	6,32 ± 0,03d
Σκοπελίτικο	6,37 ± 0,43d
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων	10,12 ± 0,02b
Αηδάνι Μαύρο	4,81 ± 0,07e
Μαυροθήρικο	6,88 ± 0,31d

**Πίνακας 3.8:** Μέτρηση ολικών ανθοκυανών

*Οι δείκτες a,b,c,d,e στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test (P<0,05)*

Την μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ολικών ανθοκυανών** στους **φλοιούς** την εμφάνισε το Βερτζαμί (13,66 mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Σημαντική διαφορά είχε και το Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων (10,12 mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού) και η Μανδηλαριά (9,04 mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού). Μικρότερη τιμή, με στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσίασε το Λιάτικο (1,77 mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού).

### 3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΩΝ ΤΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΦΛΟΙΟΙ (mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού)	ΓΙΓΑΡΤΑ (mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	20,85 ± 0,15c	116,92 ± 4,80a
Λιάτικο	31,91 ± 0,17b	108,43 ± 4,61ab
Μανδηλαριά	16,14 ± 0,33d	88,75 ± 0,96bc
Βερτζαμί	39,41 ± 0,90a	77,46 ± 2,79c
Κρασάτο	13,74 ± 0,21e	108,26 ± 2,46ab
Σκοπελίτικο	12,23 ± 0,13e	85,78 ± 5,73c
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων	13,12 ± 0,02e	90,19 ± 4,16bc
Αηδάνι Μαύρο	9,34 ± 0,56f	93,84 ± 0,19bc
Μαυροθήρικο	21,32 ± 0,19c	94,77 ± 6,02bc

*Πίνακας 3.9: Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών*

*Οι δείκτες a,b,c,d στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test (P<0,05)*

Στους **φλοιούς** οι ποικιλίες με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε **συμπυκνωμένες ταννίνες** ήταν το Βερτζαμί (39,41 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και το Λιάτικο (31,91 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) ενώ ακολούθησε με στατιστικά σημαντική διαφορά το Μαυροθήρικο (21,32 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και το Κοτσιφάλι (20,85 mg κατεχίνης / mg νωπού ιστού). Η μικρότερη τιμή καταγράφηκε στο Αηδάνι Μαύρο (9,34 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού).νωπού ιστού) και στο Μπακούρι (17,96 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού).

Στα **γίγαρτα** οι υψηλότερες περιεκτικότητες σε **συμπυκνωμένες ταννίνες** μετρήθηκαν στις ποικιλίες Κοτσιφάλι (116,92 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και ακολούθησαν το Λιάτικο (108,43 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και Κρασάτο (108,26 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Μικρότερες τιμές, χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, παρουσίασαν το Σκοπελίτικο (85,78 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και η Μανδηλαριά (88,75 mg κατεχίνης /g νωπού ιστού).



### 3.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ & ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΑΝΟΛΩΝ

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	Κατεχίνη ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)	Επικατεχίνη ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)	Προκυανιδίνη B1 ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)	Προκυανιδίνη B2 ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	34,66 $\pm$ 1,87fg	4,88 $\pm$ 0,05c	5,88 $\pm$ 0,40c	10,66 $\pm$ 0,79a
Λιάτικο	45,19 $\pm$ 0,55f	11,79 $\pm$ 0,40bc	2,06 $\pm$ 0,04d	3,52 $\pm$ 0,14d
Μανδηλαριά	76,21 $\pm$ 1,62d	16,67 $\pm$ 1,50b	6,31 $\pm$ 0,85bc	2,83 $\pm$ 0,23d
Βερτζαμί	178,76 $\pm$ 5,96a	30,70 $\pm$ 5,63a	25,71 $\pm$ 0,49a	6,46 $\pm$ 0,19b
Κρασάτο	58,39 $\pm$ 1,26e	14,06 $\pm$ 1,04bc	4,77 $\pm$ 0,37cd	3,24 $\pm$ 0,01d
Σκοπελίτικο	72,63 $\pm$ 0,71d	9,96 $\pm$ 0,40bc	4,03 $\pm$ 0,32cd	2,38 $\pm$ 0,20d
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρυτινό	25,73 $\pm$ 0,45g	6,25 $\pm$ 0,76c	4,68 $\pm$ 0,12cd	6,51 $\pm$ 0,16b
Αηδάνι Μαύρο	128,93 $\pm$ 2,43b	16,64 $\pm$ 0,08b	9,42 $\pm$ 1,63b	3,95 $\pm$ 0,32cd
Μαυροθήρικο	108,64 $\pm$ 3,06c	13,23 $\pm$ 0,32bc	7,04 $\pm$ 0,57bc	5,67 $\pm$ 0,65bc

**Πίνακας 3.10:** Μέτρηση μεμονωμένων φλαβανολών

Οι δείκτες a,b,c,d στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )

Από τη μέτρηση των μεμονωμένων φλαβανολών στους φλοιούς διαπιστώθηκε ότι η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κατεχίνη ήταν το Βερτζαμί (178,76  $\mu\text{g}$  κατεχίνης / g νωπού ιστού) και διέφερε στατιστικά σημαντικά. Οι ποικιλίες Αηδάνι Μαύρο (128,93  $\mu\text{g}$  κατεχίνης / g νωπού ιστού) και Μαυροθήρικο (108,64  $\mu\text{g}$  κατεχίνης / g νωπού ιστού) ακολούθησαν με υψηλές περιεκτικότητες, διαφέροντας στατιστικά σημαντικά από τις επόμενες. Η ποικιλία Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων παρουσίασε τη μικρότερη τιμή (25,73  $\mu\text{g}$  κατεχίνης / g νωπού ιστού).

Οι μεγαλύτερες περιεκτικότητες επικατεχίνης μετρήθηκαν στις ποικιλίες Μανδηλαριά (16,67  $\mu\text{g}$  κατεχίνης / g νωπού ιστού), και Αηδάνι Μαύρο (16,64  $\mu\text{g}$  επικατεχίνης / g νωπού ιστού) χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Μικρότερες περιεκτικότητες παρουσίασαν οι ποικιλίες Μαυρούδι Ψιλό

Καλαβρύτων (6,25 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού) και Κοτσιφάλι (4,88 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού).

Η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα **προκυανιδίνης B1** ήταν το Βερτζαμί (25,71 μg προκυανιδίνης B1 / g νωπού ιστού), με σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Μικρότερη τιμή εμφάνισε το Λιάτικο (2,06 μg προκυανιδίνης B1 / g νωπού ιστού), ενώ οι υπόλοιπες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **προκυανιδίνης B2** μετρήθηκε στην ποικιλία Κοτσιφάλι (10,66 μg προκυανιδίνης B2 / g νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις επόμενες. Ακολούθησε το Βερτζαμί (6,46 μg προκυανιδίνης B2 / g νωπού ιστού) και τέλος οι μικρότερες τιμές καταγράφηκαν στη Μανδηλαριά (2,83 μg προκυανιδίνης B2 / g νωπού ιστού) και στο Σκοπελίτικο (2,38 μg προκυανιδίνης B2 / g νωπού ιστού) που δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΦΛΟΙΟΙ	ΓΙΓΑΡΤΑ
	(mg κατεχίνης/ gr νωπού ιστού)	(mg κατεχίνης/ gr νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	1,8 ± 0,23d	38,7 ± 0,11c
Λιάτικο	4,79 ± 0,38a	39,9 ± 0,32b
Μανδηλαριά	2,87 ± 0,07bc	41,91 ± 0,44a
Βερτζαμί	5,58 ± 0,03a	41,18 ± 0,34a
Κρασάτο	3,50 ± 0,16b	38,36 ± 0,07c
Σκοπελίτικο	2,12 ± 0,12cd	34,04 ± 0,08de
Μαυρούδι Ψιλό	2 ± 0,13cd	30,20 ± 0,01f
Καλαβρύτων		
Αηδάνι Μαύρο	3,39 ± 0,24b	33,00 ± 0,08e
Μαυροθήρικο	2,9 ± 0,16bc	34,59 ± 0,24d

**Πίνακας 3.11:** Μέτρηση ολικών φλαβανολών

Οι δείκτες a,b,c,d στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )

Η ποικιλία στην οποία μετρήθηκε η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ολικών φλαβανολών** στους **φλοιούς** ήταν το Βερτζαμί (5,58 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και το Λιάτικο (4,79 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού). Μικρότερες τιμές

καταγράφηκαν στο Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρυτινό (2 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και στο Κοτσιφάλο (1,8 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) που δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Στα **γίγαρτα** τις μεγαλύτερες περιεκτικότητες σε **ολικές φλαβονόλες** τις εμφάνισαν η Μανδηλαριά (41,91 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και το Βερτζαμί (41,18 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ από τις υπόλοιπες. Μικρότερη τιμή καταγράφηκε στην ποικιλία Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρυτινό (30,82 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), έχοντας στατιστικά σημαντική διαφορά από όλες τις παραπάνω.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗ (μg / gr νωπού ιστού)	ΚΕΡΚΕΤΙΝΗ (μg / gr νωπού ιστού)	ΡΟΥΤΙΝΗ (μg / gr νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	27,17 ± 1,35b	24,50 ± 1,35bc	915,55 ± 20,71d
Λιάτικο	0,83 ± 0,07d	8,94 ± 0,28e	948,74 ± 4,48c
Μανδηλαριά	66,54 ± 3,48a	26,31 ± 1,84b	141,19 ± 3,03i
Βερτζαμί	33,00 ± 1,21b	83,36 ± 1,94a	1259,27 ± 20,13a
Κρασάτο	59,87 ± 1,15a	14,11 ± 1,38 <sup>de</sup>	177,68 ± 0,69h
Σκοπελίτικο	12,37 ± 0,14c	28,08 ± 1,50b	227,97 ± 3,15g
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων	15,09 ± 1,65c	14,44 ± 0,88 <sup>de</sup>	1146,72 ± 5,09b
Αηδάνι Μαύρο	3,16 ± 0,00d	28,90 ± 1,62b	400,34 ± 11,931e
Μαυροθήρικο	0,55 ± 0,09d	17,58 ± 1,97cd	331,27 ± 2,45f

**Πίνακας 3.12:** Μέτρηση μεμονωμένων φλαβονών & φλαβονολών

Οι δείκτες a,b,c,d,e στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )

Από τη μέτρηση των **μεμονωμένων φλαβονών και φλαβονολών** στους **φλοιούς** διαπιστώθηκε ότι η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε **λουτεολίνη** ήταν η Μανδηλαριά (66,54 μg / g νωπού ιστού) και το Κρασάτο (59,87 μg / mg νωπού ιστού) εμφάνιζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά. Μικρότερη περιεκτικότητα εμφάνισαν το Λιάτικο (0,83 μg / g νωπού ιστού) και το Μαυροθήρικο (0,55 μg / g νωπού ιστού), χωρίς όμως να παρουσιάσουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **κερκετίνης** μετρήθηκε στην ποικιλία Βερτζαμί (83,36  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και ακολούθησαν με στατιστικά σημαντική διαφορά το Αηδάνι Μαύρο (28,90  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), το Σκοπελίτικο (28,08  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και η Μανδηλαριά (26,31  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού). Τη μικρότερη τιμή εμφάνισε το Λιάτικο (8,94  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά.

Η ποικιλία με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ρουτίνης** ήταν το Βερτζαμί (1259,27  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και ακολούθησε η ποικιλία Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρυτινό (1146,72  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού). Μικρότερη περιεκτικότητα παρουσίασε η Μανδηλαριά (141,19  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) που διέφερε στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΦΛΟΙΟΙ (mg ρουτίνης/ gr νωπού ιστού)	ΓΙΓΑΡΤΑ (mg ρουτίνης/ gr νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	1,68 $\pm$ 0,04ef	0,30 $\pm$ 0,00b
Λιάτικο	1,73 $\pm$ 0,11ef	0,45 $\pm$ 0,02a
Μανδηλαριά	1,44 $\pm$ 0,10f	0,22 $\pm$ 0,01bc
Βερτζαμί	4,55 $\pm$ 0,12a	0,23 $\pm$ 0bc
Κρασάτο	2,22 $\pm$ 0,05cd	0,23 $\pm$ 0,05bc
Σκοπελίτικο	2,5 $\pm$ 0,08bc	0,21 $\pm$ 0,00bc
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρυτινό	2,64 $\pm$ 0,02b	0,28 $\pm$ 0,00bc
Αηδάνι Μαύρο	1,57 $\pm$ 0,06f	0,2 $\pm$ 0,01c
Μαυροθήρικο	2,04 $\pm$ 0,00de	0,27 $\pm$ 0,00bc

**Πίνακας 3.13:** Μέτρηση ολικών φλαβονών & φλαβονολών

*Οι δείκτες a,b,c,d στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )*

Οι ποικιλίες με τις μεγαλύτερες περιεκτικότητες **ολικών φλαβονών και φλαβονολών** στους **φλοιούς** ήταν το Βερτζαμί (4,55 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ οι υπόλοιπες ποικιλίες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Μικρότερη τιμή παρουσίασαν οι ποικιλίες Αηδάνι Μαύρο (1,57 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) και Μανδηλαριά (1,44 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ολικών φλαβονών και φλαβονολών** στα **γίγαρτα** την παρουσίασε το Λιάτικο (0,45 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) και διέφερε στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες, εκτός από το αμέσως επόμενο Κοτσιφάλι (0,30 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού). Το Αηδάνι Μαύρο εμφάνισε την μικρότερη τιμή (0,20 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) χωρίς να διαφέρει σημαντικά από το σύνολο των ποικιλιών.

### 3.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΓΑΛΛΙΚΟ ΟΞΥ (μg / gr νωπού ιστού)	ΠΡΩΤΟΚΑΤΕΧΙΚΟ ΟΞΥ (μg / gr νωπού ιστού)	ΒΑΝΙΛΛΙΚΟ ΟΞΥ (μg / gr νωπού ιστού)	ΣΥΡΙΓΚΙΚΟ ΟΞΥ (μg / gr νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	0,51 ± 0,00d	0,23 ± 0,02bc	2,18 ± 0,12a	1,84 ± 0,14d
Λιάτικο	1,02 ± 0,01bcd	0,27 ± 0,03bc	1,00 ± 0,04bc	1,20 ± 0,07e
Μανδηλαριά	0,95 ± 0,07bcd	0,17 ± 0,03bc	0,38 ± 0,10 <sup>de</sup>	2,24 ± 0,06d
Βερτζαμί	1,93 ± 0,21a	0,29 ± 0,00bc	0,99 ± 0,06bc	7,91 ± 0,14a
Κρασάτο	0,78 ± 0,02cd	0,13 ± 0,04c	0,29 ± 0,11e	4,15 ± 0,20b
Σκοπελίτικο	1,04 ± 0,02bcd	0,6 ± 0,10a	0,73 ± 0,06cd	4,17 ± 0,15b
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρυτινό	1,38 ± 0,07b	0,27 ± 0,00bc	1,39 ± 0,11b	2,33 ± 0,06d
Αηδάνι Μαύρο	1,11 ± 0,20bc	0,34 ± 0,05abc	0,78 ± 0,02cd	3,34 ± 0,12c
Μαυροθήρικο	0,62 ± 0,04cd	0,47 ± 0,11ab	0,86 ± 0,05c	3,36 ± 0,02c

**Πίνακας 3.14:** Μέτρηση υδροξυβενζοϊκών οξέων

Οι δείκτες a,b,c,d,e στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )

Από τη μέτρηση των **μεμονωμένων υδρόξυβενζοϊκών οξέων** στους **φλοιούς** διαπιστώθηκε ότι οι ποικιλίες με τις μεγαλύτερες περιεκτικότητες σε **γαλλικό οξύ** ήταν το Βερτζαμί (1,93 μg / g νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Μικρότερη τιμή εμφάνισαν το Μαυροθήρικο (0,62 μg / g νωπού ιστού) και το Κοτσιφάλι (0,51 μg / g νωπού ιστού), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους .

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **πρωτοκατεχικού οξέος** μετρήθηκε στη ποικιλία Σκοπελίτικο (0,6 μg / g νωπού ιστού) και ακολούθησαν το Μαυροθήρικο (0,47 μg / g νωπού ιστού) και το Αηδάνι Μαύρο (0,34 μg / g νωπού ιστού). Στη

Μανδηλαριά(0,17  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και στο Κρασάτο (0,13  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) καταγράφηκαν οι μικρότερες τιμές .

Οι ποικιλίες Κοτσιφάλι (2,18  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρυτινό (1,39 $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) παρουσίασαν τις μεγαλύτερες περιεκτικότητες **βανιλλικού οξέος**, με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, ενώ το Κρασάτο (0,29  $\mu\text{g} / \text{mg}$  νωπού ιστού) εμφάνισε την μικρότερη.

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **συριγγικού οξέος** μετρήθηκε στην ποικιλία Βερτζαμί (7,91  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Μικρότερη περιεκτικότητα παρουσίασαν το Κοτσιφάλι (1,84  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και το Λιάτικο (1,20  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

### 3.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΥΔΡΟΞΥΚΙΝΝΑΜΩΜΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΣΙΝΑΠΙΚΟ ΟΞΥ ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)	ΚΑΦΕΪΚΟ ΟΞΥ ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)	Π-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)	Μ-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)	ΦΕΡΟΥΛΙΚΟ ΟΞΥ ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	31,33 $\pm$ 0,88b	2,95 $\pm$ 0,14 <sup>de</sup>	17,92 $\pm$ 0,12d	5,11 $\pm$ 0,15b	7,27 $\pm$ 0,23bc
Λιάτικο	8,55 $\pm$ 0,61d	1,51 $\pm$ 0,10ef	10,89 $\pm$ 0,45f	1,19 $\pm$ 0,05e	3,32 $\pm$ 0,17e
Μανδηλαριά	14,82 $\pm$ 0,10c	1,03 $\pm$ 0,17f	11,4 $\pm$ 0,23ef	1,18 $\pm$ 0,00e	2,18 $\pm$ 0,00e
Βερτζαμί	67,00 $\pm$ 0,90a	17,47 $\pm$ 0,93b	24,25 $\pm$ 0,59b	11,35 $\pm$ 0,20a	15,27 $\pm$ 0,32a
Κρασάτο	18,32 $\pm$ 1,41c	0,9 $\pm$ 0,00f	25,98 $\pm$ 0,53a	1,73 $\pm$ 0,17 <sup>de</sup>	2,86 $\pm$ 0,27e
Σκοπελίτικο	31,52 $\pm$ 0,34b	8,34 $\pm$ 0,25c	12,59 $\pm$ 0,02e	3,07 $\pm$ 0,30c	4,9 $\pm$ 0,53d
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων	10,78 $\pm$ 0,19d	3,46 $\pm$ 0,11d	22,57 $\pm$ 0,12c	2,22 $\pm$ 0,02cde	7,95 $\pm$ 0,28b
Αηδάνι Μαύρο	18,27 $\pm$ 1,22c	3,42 $\pm$ 0,03d	11,72 $\pm$ 0,28ef	2,07 $\pm$ 0,09cde	3,16 $\pm$ 0,09e
Μαυροθήρικο	28,32 $\pm$ 0,27b	24,18 $\pm$ 0,45a	12,23 $\pm$ 0,11ef	2,68 $\pm$ 0,53cd	6,23 $\pm$ 0,20cd

*Πίνακας 3.15: Μέτρηση υδροξυκινναμωμικών οξέων*

*Οι δείκτες a,b,c,d,e στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )*

Από τη μέτρηση των **μεμονωμένων υδρόξυκινναμωμικών οξέων** στους **φλοιούς** διαπιστώθηκε ότι η ποικιλία με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε **σιναπικό οξύ** ήταν το Βερτζαμί (67  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Ακολούθησε το Σκοπελίτικο (31,52  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και το Κοτσιφάλι (31,33  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού). Το Λιάτικο παρουσίασε τη μικρότερη τιμή (8,55  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), διαφέροντας στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες .

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **καφεϊκού οξέος** μετρήθηκε στην ποικιλία Μαυροθήρικο (24,18  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ ακολούθησε το Βερτζαμί (17,47  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού). Τις χαμηλότερες περιεκτικότητες εμφάνισαν το Λιάτικο (1,51  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και η Μανδηλαριά (1,03  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, με όμως στατιστικά σημαντική διαφορά με τις υπόλοιπες ποικιλίες.

Την υψηλότερη περιεκτικότητα **π-κουμαρικού οξέος** εμφάνισε το Κρασάτο (25,98  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), το Βερτζαμί (24,25  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και το Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρυτινό (22,57 /  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού). Οι υπόλοιπες ποικιλίες μεταξύ τους δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα **μ-κουμαρικού οξέος** ήταν το Βερτζαμί (11,35  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Το Λιάτικο (1,19  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και η Μανδηλαριά (1,18  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Η υψηλότερη περιεκτικότητα **φερουλικού οξέος** καταγράφηκε στο Βερτζαμί (15,27  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά. Στις ποικιλίες Λιάτικο (3,32  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), Αηδάνι Μαύρο (3,16  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και Μανδηλαριά (2,18  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) παρουσιάστηκαν οι μικρότερες τιμές χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

<b>ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ</b>	<b>ΚΑΦΤΑΡΙΚΟ ΟΞΥ</b> ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)	<b>ΚΟΥΤΑΡΙΚΟ ΟΞΥ</b> ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)	<b>ΦΕΡΤΑΡΙΚΟ ΟΞΥ</b> ( $\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	40,13 $\pm$ 0,28d	1,25 $\pm$ 0,10 <sup>de</sup>	3,87 $\pm$ 0,35g
Λιάτικο	6,81 $\pm$ 0,59e	2,76 $\pm$ 0,00ab	27,34 $\pm$ 0,65a
Μανδηλαριά	8,54 $\pm$ 0,01e	0,71 $\pm$ 0,19 <sup>de</sup>	10,70 $\pm$ 0,02ef
Βερτζαμί	176,11 $\pm$ 7,97b	3,61 $\pm$ 0,30a	20,15 $\pm$ 0,57b
Κρασάτο	6,07 $\pm$ 0,33e	0,53 $\pm$ 0,17e	8,97 $\pm$ 0,53f
Σκοπελίτικο	88,42 $\pm$ 5,56c	1,46 $\pm$ 0,29cd	12,84 $\pm$ 0,12de
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρυτινό	69,78 $\pm$ 0,44c	0,65 $\pm$ 0,00de	10,01 $\pm$ 0,28f
Αηδάνι Μαύρο	22,87 $\pm$ 0,69 <sup>de</sup>	1,22 $\pm$ 0,00de	15,97 $\pm$ 0,06c
Μαυροθήρικο	240,52 $\pm$ 12,44a	2,23 $\pm$ 0,19bc	13,21 $\pm$ 0,81d

**Πίνακας 3.16:** Μέτρηση εστέρων υδροξυκινναμωμικών οξέων με τρυγικό οξύ

Οι δείκτες a,b,c στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )

Οι μεγαλύτερες περιεκτικότητες **καφταρικού οξέος** μετρήθηκαν στις ποικιλίες Μαυροθήρικο (240,52  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού) και Βερτζαμί (176,11  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες αλλά και μεταξύ τους. Μικρότερες τιμές, χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους καταγράφηκαν στο Λιάτικο (6,81 $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού) και στο Κρασάτο (6,07  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού).

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **κουταρικού οξέος** καταγράφηκε στο Λιάτικο (2,76  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες, εκτός από το Μαυροθήρικο (2,23  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού). Ενώ οι ποικιλίες Μανδηλαριά (0,71  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού), Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων (0,65  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού) και το Κρασάτο (0,53  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού) δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές.

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **φερταρικού οξέος** μετρήθηκε στην ποικιλία Λιάτικο (27,34  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά. Στατιστικά σημαντική διαφορά εμφάνισε και το Βερτζαμί (20,15  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού). Οι υπόλοιπες ποικιλίες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, εκτός από το Κοτσιφάλι που παρουσίασε τη χαμηλότερη τιμή (3,87  $\mu\text{g/g}$  νωπού ιστού).

### 3.9 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ & ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΑΛΔΕΥΔΩΝ

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ			ΦΑΙΝΟΛΙΚΗ ΑΛΔΕΥΔΗ
	Ρεσβερατρόλη ( $\mu\text{g/gr}$ νωπού ιστού)	$\epsilon$ -Βινιφερίνη ( $\mu\text{g/gr}$ νωπού ιστού)	Piceid ( $\mu\text{g/gr}$ νωπού ιστού)	Βανιλίνη ( $\mu\text{g/gr}$ νωπού ιστού)
Κοτσιφάλι	80,96 $\pm$ 3,48b	26,08 $\pm$ 1,17 <sup>de</sup>	23,92 $\pm$ 0,11bc	0,53 $\pm$ 0,01bc
Λιάτικο	15,13 $\pm$ 0,33g	13,25 $\pm$ 1,47f	10,79 $\pm$ 1,26ef	0,17 $\pm$ 0,00d
Μανδηλαριά	17,71 $\pm$ 0,44fg	22,11 $\pm$ 0,57e	7,71 $\pm$ 0,28f	0,45 $\pm$ 0,07cd
Βερτζαμί	425,08 $\pm$ 9,66a	138,27 $\pm$ 3,75a	88,21 $\pm$ 0,19a	2,13 $\pm$ 0,08a
Κρασάτο	35,62 $\pm$ 1,82ef	35,83 $\pm$ 1,40c	13,02 $\pm$ 1,33e	0,60 $\pm$ 0,05bc
Σκοπελίτικο	46,75 $\pm$ 0,34 <sup>de</sup>	81,12 $\pm$ 1,15b	27,13 $\pm$ 0,50b	0,77 $\pm$ 0,02b
Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρυτινό	50,88 $\pm$ 2,47cde	26,13 $\pm$ 1,23 <sup>de</sup>	16,71 $\pm$ 0,08d	0,58 $\pm$ 0,03bc
Αηδάνι Μαύρο	57,06 $\pm$ 5,93cd	28,68 $\pm$ 1,30cde	11,07 $\pm$ 0,81ef	0,7 $\pm$ 0,04b
Μαυροθήρικο	70,89 $\pm$ 0,05bc	31,04 $\pm$ 0,48cd	21,48 $\pm$ 0,23c	0,48 $\pm$ 0,12bc

*Πίνακας 3.17: Μέτρηση στιλβενίων & φαινολικών αλδευδών*



Οι δείκτες *a, b, c, d* στην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student's T-test ( $P < 0,05$ )

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ρεσβερατρόλης** μετρήθηκε στην ποικιλία Βερτζαμί (425,08  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Ακολούθησε το Κοτσιφάλι (80,96  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και το Μαυροθηρικό (70,89  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) τα οποία δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Το Λιάτικο (15,13  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) και η Μανδηλαριά (17,71  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές, όμως δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Η ποικιλία με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα  **$\epsilon$ -βινιφερίνης** ήταν το Βερτζαμί (138,27  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), με στατιστική σημαντική διαφορά. Το Σκοπελίτικο ακολούθησε (81,12  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), ενώ την χαμηλότερη τιμή παρουσίασε το Λιάτικο (13,25  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού).

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **picoid** μετρήθηκε στην ποικιλία Βερτζαμί (88,21  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από όλες τις υπόλοιπες που μεταξύ τους δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά, εκτός από την Μανδηλαριά με την μικρότερη τιμή (7,71  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού) .

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **βανιλίνης** μετρήθηκε στο Βερτζαμί (2,13  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από όλες τις ποικιλίες που μεταξύ τους δεν εμφάνισαν σημαντικές στατιστικές διαφορές. Το Λιάτικο όμως παρουσίασε την μικρότερη τιμή (0,17  $\mu\text{g} / \text{g}$  νωπού ιστού).

### 3.9.1.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί το γεγονός ότι οι ποικιλίες που μελετήθηκαν είναι σπάνιες γηγενείς ποικιλίες οι μισές εκ των οποίων δεν χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τυποποιημένων οίνων. Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τις ποικιλίες αυτές είναι ελάχιστες και κατά συνέπεια η έρευνα βρίσκεται σε πρωταρχικό στάδιο. Ένα ακόμα στοιχείο που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι ότι το φαινολικό προφίλ και η περιεκτικότητα των αμινοξέων της κάθε ποικιλίας επηρεάζονται και μεταβάλλονται από μία σειρά μεταβλητών παραγόντων όπως το υποκείμενο εμβολιασμού της ποικιλίας, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες της καλλιέργειας της

αμπέλου, οι καλλιεργητικές τεχνικές κ.α. Για τους λόγους αυτούς, στα πλαίσια συζήτησης και σύγκρισης των αποτελεσμάτων καθώς και διεξαγωγής συμπερασμάτων από τη μελέτη αυτή, θα γίνει βιβλιογραφική αναφορά και σε οινοποιήσιμες ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera* που χρησιμοποιούνται συστηματικά στην Ελλάδα για την παραγωγή οίνων ποιότητας με μεγάλο φαινολικό δυναμικό. Οι ποικιλίες αυτές είναι οι ελληνικές Μανδηλαριά, Κουντούρα Μαύρη - «βιότυπος Μανδηλαριάς» λόγω υψηλού βαθμού γενετικής ομοιότητας (Stavrakaki and Biniari, 2017) - , Ξινόμαυρο και Αγιωργίτικο και οι διεθνείς Syrah και Cabernet Sauvignon.

Από τις μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών βρέθηκε ότι οι ποικιλίες με τη μεγαλύτερη **περιεκτικότητα σακχάρων** ήταν το Λιάτικο και το Κρασάτο (21,16 και 20,93 °Brix αντίστοιχα), οι οποίες με βάση όσα αναφέρουν οι Ribereau-Gayon κ.ά. (2006), διαπιστώνουμε ότι είναι στο μέσο όρο περιεκτικότητας σακχάρων (16-24 °Brix). Επίσης και οι υπόλοιπες ποικιλίες κυμάνθηκαν στην αναμενόμενη περιεκτικότητα σακχάρων που αναφέρεται παραπάνω. Συγκρίνοντας τις μετρήσεις της **ολικής οξύτητας** των ποικιλιών που μελετήθηκαν με τον μέσο όρο ολικής οξύτητας που αναφέρει ο Σταυρακάκης (2013) (3,8 - 7,5 gr τρυγικού οξέος/ L γλεύκους) διαπιστώνουμε ότι όλες οι υπό μελέτη ποικιλίες είχαν ικανή έως υψηλή περιεκτικότητα οργανικών οξέων, με εξαίρεση δύο ποικιλίες που παρουσίασαν τις χαμηλότερες οξύτητες. Η **ενεργή οξύτητα-pH** είναι σε τιμές φυσιολογικές, πλην ελαχίστων ποικιλιών που δεν είναι ανάλογο της ολικής οξύτητας και θα μπορούσε να κριθεί υψηλό.

Σε σχετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν η περιεκτικότητα των **φλοιών** των ραγών σε **ολικές φαινολικές ενώσεις** καταγράφηκε στα **19,48** mg γαλλικού οξέος (γ.ο)/gr νωπού ιστού (ν.ι) για το **Βερτζαμί**, ενώ **26,40** mg γ.ο. / gr ν.ι για το **Syrah** (Kyraleou M., Kotseridis Y., Koundouras S., Chira K., Teissedre P.L., Kallithraka S., 2016). Στα **γίγαρτα** οι τιμές ήταν **28,74** mg γ.ο/gr ν.ι για το **Λιάτικο** και **19,48** mg γαλλικού οξέος/ gr νωπού ιστού στους φλοιούς στο **Βερτζαμί** και στο **Syrah 63,0** mg γ.ο./gr ν.ι (Kyraleou M., Kotseridis Y., Koundouras S., Chira K., Teissedre P.L., Kallithraka S., 2016).

**Συγκρίνοντας την περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων των υπό μελέτη ποικιλιών με τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών διαπιστώνουμε ότι και οι εννέα ποικιλίες που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσίασαν ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα ολικών φαινολικών ενώσεων κυρίως στους φλοιούς και χαμηλότερα στα γίγαρτα της ράγας. Το Βερτζαμί είχε την**

υψηλότερη περιεκτικότητα στους φλοιούς (19,48 mg γ.ο/gr v.i) με σημαντική διαφορά και την μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα γίγαρτα είχε το Λιάτικο (28,74 mg γ.ο/gr v.i) με μικρή διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες που κυμάνθηκαν επίσης με υψηλές συγκεντρώσεις.

Οι Ivanova κ.ά. (2010) σε μελέτη που πραγματοποίησαν στην ποικιλία Cabernet sauvignon μετρήσαν την περιεκτικότητα των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων. Η τιμή που καταγράφηκε στους φλοιούς ήταν 23,3 mg κατεχίνης/g v.i και στα γίγαρτα 7,35 mg κατεχίνης/g v.i., ενώ στην Κουντούρα Μαύρη οι Katerina Biniari, Orestis Gerogiannis, Ioannis Daskalakis, Despoina Bouza, Maritina Stavrakaki(2016) μέτρησαν σε φλοιούς 9,16 mg γ.ο./mg v. i. και στα γίγαρτα 40,30 mg γ.ο./mg v.i. Η ποικιλία με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα στους φλοιούς ήταν το Βερτζαμί με 23,29 mg κατεχίνης/g v.i και στα γίγαρτα της ράγας ήταν το Λιάτικο με 69,62 mg κατεχίνης/g v.i. Με βάση τα παραπάνω φαίνεται πως οι υπό μελέτη ποικιλίες παρουσίασαν υψηλή περιεκτικότητα ολικών φλαβονοειδών ενώσεων στους φλοιούς και στα γίγαρτα. Από τις μετρήσεις όλων των ποικιλιών είναι φανερό ότι τα γίγαρτα έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα φλαβονοειδών ενώσεων από τους φλοιούς, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης των Butkhuip κ.ά. (2010).

Όλες οι υπό μελέτη ποικιλίες περιείχαν τις πέντε βασικές ανθοκυάνες (μαλβιδίνη, παιονιδίνη, πετουνιδίνη, δελφινιδίνη, κυανιδίνη). Η μαλβιδίνη ήταν η κυρίαρχη ανθοκυάνη (0,150-1,760 mg/g v.i), το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τους Σταυρακάκης (2013) και Boss και Davies (2009), που οφείλεται στο ότι καθώς ωριμάζει η ράγα οι δελφινιδίνη και κυανιδίνη μετατρέπονται στην πιο σταθερή μαλβιδίνη. Πολύ υψηλή περιεκτικότητα και των πέντε ανθοκυανών εμφάνισε το Βερτζαμί ( 0,050-1,760 mg/g v.i).

Παρακάτω παρουσιάζεται η περιεκτικότητα ολικών ανθοκυανών που μετρήθηκε σε σχετικές μελέτες. Στους φλοιούς οι τιμές που καταγράφηκαν για το Cabernet sauvignon ήταν 5,67 mg Mveq μαλβινιδίνης /g v.i και 705,9 mg/kg v.i, για το Αγιωργίτικο 148,6-310,8 mg/100g v.i. και για το Ξινόμαυρο, τη Μανδηλαριά ήταν 545,8 mg/kg v.i, 1470,8 mg/kg v.i και 697 mg/kg v.i, αντίστοιχα. Στην Κουντούρα Μαύρη βρέθηκε 10,02 mg Mveq μαλβινιδίνης/g v.i. Με βάση τα παραπάνω φαίνεται πως σχεδόν όλες οι υπό μελέτη ποικιλίες εμφανίζουν αυξημένη περιεκτικότητα ολικών ανθοκυανών, με εξαίρεση το Λιάτικο. Πολύ

μεγάλη περιεκτικότητα ολικών ανθοκυανών εμφανίζει το **Βερτζαμί** (13,66 mg Mveq/g v.i) με διαφορά από τις υπόλοιπες υπό εξέταση ποικιλίες, αλλά και από τις περισσότερες που αναφέρονται βιβλιογραφικά. Ακολούθως, αυξημένη περιεκτικότητα ανθοκυανών έχουν και οι ποικιλίες **Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων** (10,12 mg Mveq/g v.i) και η **Μανδηλαριά** (9,04 mg Mveq/g v.i).

Σε σχετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μετρήθηκε η περιεκτικότητα των παρακάτω ποικιλιών σε **συμπυκνωμένες ταννίνες**. Οι φλοιοί της ποικιλίας **Syrah** εμφάνισαν περιεκτικότητα 31.2 mg κατεχίνης/ gr v.i (MYLONA A.E., BIMPILAS A., TSIMOGIANNIS D., OREOPOULOU V., 2013), του **Αγιωργίτικου** 23,92-44,76 mg κατεχίνης/ gr v.i (CHIOU A., PANAGOPOULOU E.A., GATZALI F., DE MARCHI S., KARATHANOS V.T., 2014), ενώ στην **Κουντούρα Μαύρη** οι Biniari, Gerogiannis, Daskalakis, Bouza, Stavrakaki(2016) μέτρησαν σε φλοιούς 31,04 mg Mveq κατεχίνης /g v.i. και στα γίγαρτα 151,96 mg κατεχίνης Mveq/g v.i. Στα **γίγαρτα** οι τιμές που καταγράφηκαν για το **Syrah** ήταν 52.2 mg κατεχίνης/ gr v.i (MYLONA A.E., BIMPILAS A., TSIMOGIANNIS D., OREOPOULOU V., 2013), για το **Αγιωργίτικο** 47,279 έως 65,721 mg κατεχίνης/ gr v.i. Τις μεγαλύτερες τιμές στους φλοιούς τις παρουσίασαν το **Βερτζαμί** (39,41 mg Mveq/g v.i) και το **Λιάτικο** (31,91 mg Mveq/g v.i). Οι ποικιλίες **Κοτσιφάλι** (116,92 mg Mveq/g v.i), **Λιάτικο** (108,43 mg Mveq/g v.i) και **Κρασάτο** παρουσίασαν τις μεγαλύτερες τιμές στα γίγαρτα. **Με βάση τα παραπάνω φαίνεται πως όλες οι ποικιλίες που μελετήθηκαν παρουσίασαν μεγάλη περιεκτικότητα συμπυκνωμένων ταννινών στους φλοιούς και ιδίως στα γίγαρτα.**

Σε σχετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν ερευνήθηκε η περιεκτικότητα των φλοιών σε **μεμονωμένες φλαβανόλες**. Στο **Αγιωργίτικο** ο Τσαπάρας (2013) μέτρησε την **κατεχίνη και επικατεχίνη** μαζί και η τιμή που βρήκαν ήταν 0,0185-0,0548 mg/g v.i. ενώ στις **προκυανιδίνες B1+ B2 + B3** μαζί η τιμή ήταν 0,0234-0,0652 mg/g v.i. Στην **Κουντούρα Μαύρη** οι Biniari, Gerogiannis, Daskalakis, Bouza, Stavrakaki(2016) μέτρησαν 51,52 μg κατεχίνης / g νωπού ιστού, 17,04 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού, 1,72 μg προκυανιδίνης B1 / g νωπού ιστού και 1,36 μg προκυανιδίνης B2 / g νωπού ιστού.

Συγκρίνοντας τις μετρήσεις της παρούσας μελέτης με τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα φαίνεται πως όλες οι υπό μελέτη ποικιλίες είχαν πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε **μεμονωμένες φλαβανόλες** και ιδιαίτερα της κατεχίνης. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα όσα αναφέρουν οι Pastor del Rio και

**Kennedy (2006) και Souquet κ.ά. (1996) ότι στους φλοιούς η κυρίαρχη φλαβανόλη είναι η επικατεχίνη και η κατεχίνη υπολείπεται. Από τις εννέα ποικιλίες το Βερτζαμί (178,76 μg κατεχίνης / g νωπού ιστού και 30,70 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού) έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα με διαφορά από τις υπόλοιπες. όπως επίσης συγκριτικά μεγάλη περιεκτικότητα είχε και το Μαύρο Αηδάνι και το Μαυροθηρικό.**

Παρακάτω παρουσιάζεται η περιεκτικότητα ολικών φλαβανολών που μετρήθηκε σε σχετικές μελέτες. Στο Syrah οι τιμές κυμάνθηκαν από 2,39-7,48 mg/g v.i (MYLONA A.E., BIMPILAS A., TSIMOGLIANNIS D., OREOPOULOU V., 2013). Στο Αγιωργίτικο η περιεκτικότητα που μετρήθηκε ήταν 19,708-38,121 mg κατεχίνης/g v.i (LUIS RODRIGUES S., MAFALDA Q., 2016). Στα γίγαρτα οι τιμές που καταγράφηκαν για το Cabernet sauvignon ήταν 17,2 mg κατεχίνης/g v.i. (KYRALEOU M., KOTSERIDIS Y., KOUNDOURAS S., CHIRA K., TEISSEGRE P.L., KALLITHRAKA S., 2016). Στην ποικιλία Syrah οι τιμές κυμάνθηκαν από 16,94-29,68 mg/g v.i. (MYLONA A.E., BIMPILAS A., TSIMOGLIANNIS D., OREOPOULOU V., 2013). Οι Guendez κ.ά. (2005) σε μελέτη που πραγματοποίησαν υπολόγισαν το άθροισμα των επιμέρους φλαβανολών στα γίγαρτα. Στο Cabernet sauvignon το άθροισμα ήταν 365,21 mg/100 g v.i, στο Αγιωργίτικο 542,1 mg/100 g v.i, στο Ξινόμαυρο 54,45 mg/100 g v.i και στη Μανδηλαριά 953,5 mg/100 g v.i. Στη Κουντούρα Μαύρη η τιμή των ολικών φλαβανολών φλοιών καταγράφηκε σε 6,01 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού και γιγάρτων 37,66 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού (Biniari, Gerogiannis, Daskalakis, Bouza, Stavrakaki, 2016). Την μεγαλύτερη περιεκτικότητα στους φλοιούς την είχε το Βερτζαμί, 5,58 και 41,18 mg κατεχίνης/g v.i σε φλοιούς και γίγαρτα αντίστοιχα, γεγονός που βρίσκεται σε αντιστοιχία με τις μετρήσεις των μεμονομένων φλαβανολών. Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι οι ποικιλίες που μελετήθηκαν παρουσιάζουν αυξημένη περιεκτικότητα σε ολικές φλαβανόλες και στους φλοιούς και στα γίγαρτα. Επιβεβαιώνεται ότι τα γίγαρτα έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα φλαβανολών σε σχέση με τους φλοιούς καθώς τα αποτελέσματα των μετρήσεων συμφωνούν με τα όσα αναφέρουν ο Σταυρακάκης (2013) και οι Ribereau-Gayon κ.ά. (2006).

Συγκρίνοντας τις υπό εξέταση ποικιλίες με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας φαίνεται πως όλες έχουν μικρή περιεκτικότητα σε κερκετίνη και λουτεολίνη ενώ υψηλή σε ρουτίνη με το Βερτζαμί, το Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων, το Λιάτικο και

το Κοτσιφάλι να παρουσιάζουν τις υψηλότερες. Επίσης, εξετάζοντας τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι η περιεκτικότητα τους είναι μεγαλύτερη στους φλοιούς από τα γίγαρτα. Η κατανομή αυτή στα μέρη της ράγας είναι αντίστροφη από τις φλαβανόλες.

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι όλες οι υπό μελέτη ποικιλίες έχουν μέτρια περιεκτικότητα γαλλικού οξέος στους φλοιούς τους, με υψηλότερη εκείνη στο Βερτζαμί (1,93 μg/g v.i) καθώς και στο Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρυτινό (1,38 μg/g v.i.).

Οι Butkhuρ κ.ά. (2010) μελέτησαν το **Syrah** και βρήκαν την περιεκτικότητα καφεϊκού οξέος στους φλοιούς 1,58 mg/100g ξ.ι και φερουλικού οξέος 4,20. Οι Anastasiadi κ.ά. (2010), σε παρόμοια μελέτη, βρήκαν ότι οι φλοιοί ραγών Μανδηλαριάς είχαν περιεκτικότητα **trans-καφταρικού οξέος** 1,20 mg/100g ξ.ι.

Από τα παραπάνω φαίνεται πως η περιεκτικότητα των υπό μελέτη ποικιλιών σε φερουλικό οξύ κυμαίνεται σε κανονικά επίπεδα. Όλες οι ποικιλίες παρουσίασαν υψηλή περιεκτικότητα καφταρικού οξέος, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με όσα αναφέρουν οι Di Stefano και Flamini (2008) ότι το καφταρικό οξύ υπερτερεί του κουταρικού και του φερταρικού.

Οι Iacopini κ.α. (2008) μελέτησαν την ποικιλία **Cabernet sauvignon** και μέτρησαν την περιεκτικότητα της **ρεσβερατρόλης** 25,5 mg/100g ξ.ι. Οι Butkhuρ κ.ά. (2010) μέτρησαν την περιεκτικότητα της **trans-ρεσβερατρόλης** και της **ε-βινιφερίνης** σε φλοιούς της ποικιλίας **Syrah** και βρήκαν 0,93 mg/100g ξ.ι και 6,53 mg/100g ξ.ι, αντίστοιχα. Τέλος, οι Anastasiadi κ.ά. (2010) βρήκαν ότι οι φλοιοί ραγών Μανδηλαριάς είχαν περιεκτικότητα **trans-ρεσβερατρόλης** 3,60 mg/100g ξ.ι.

Συγκρίνοντας της υπό μελέτη ποικιλίες με τις βιβλιογραφικές αναφορές φαίνεται ότι όλες οι ποικιλίες έχουν υψηλή περιεκτικότητα κυρίως ρεσβερατρόλης και λιγότερο ε-βινιφερίνης. Τέλος, φαίνεται ότι την μεγαλύτερη περιεκτικότητα και στα τρία στιλβένια που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη την είχε το Βερτζαμί. Ακολούθησε σε συγκέντρωση ρεσβερατρόλης το Κοτσιφάλι και έπειτα το Μαυροθήρικο.

## 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να μελετηθεί το φαινολικό δυναμικό των σπάνιων γηγενών οινοποιήσιμων ερυθρών ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera*) Κοτσιφάλι, Λιάτικο, Μανδηλαριά, Βερτζαμί, Κρασάτο, Σκοπελίτικο, Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων, Αηδάνι Μαύρο και Μαυροθήρικο. Με βάση τα αποτελέσματα και τη συζήτηση φαίνεται ότι και οι εννέα αυτές ποικιλίες έχουν αυξημένη περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες και φαινολικές ενώσεις, έχουν ικανοποιητικές προς υψηλές ολικές οξύτητες, ενώ ως προς την περιεκτικότητα των σακχάρων βρίσκονται σε φυσιολογικά επίπεδα.

Όσον αφορά τις χρωστικές ενώσεις το Βερτζαμί είχε πολύ μεγάλη περιεκτικότητα ανθοκυανών με μεγάλη διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Αρκετά μεγάλη περιεκτικότητα παρουσίασαν και η Μανδηλαριά μαζί με το Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων και έπειτα το Μαυροθήρικο. Μεγάλη περιεκτικότητα φλαβονολών στους φλοιούς είχε ξανά το Βερτζαμί και ακολούθησε τόσο στους φλοιούς όσο και στα γίγαρτα το Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων, ενώ πρώτο σε συγκέντρωση φλαβονολών στα γίγαρτα ήταν το Λιάτικο. Τις μικρότερες περιεκτικότητες χρωστικών είχε το Λιάτικο, με μεγάλη στατιστική διαφορά από το επόμενο Κοτσιφάλι.

Όσον αφορά τις μη χρωστικές φαινολικές ενώσεις τις μεγαλύτερες περιεκτικότητες συμπυκνωμένων ταννινών και φλαβανολών των φλοιών επέδειξαν το Βερτζαμί και το Λιάτικο, ενώ ακολούθησαν το Μαυροθήρικο και το Κοτσιφάλι. Στις μετρήσεις που αφορούσαν τις συμπυκνωμένες ταννίνες των γιγάρτων το Κοτσιφάλι, το Κρασάτο, το Λιάτικο και το Μαυροθήρικο είχαν μικρή διαφορά υψηλότερης συγκέντρωσης, αφού στο σύνολό τους όλες οι ποικιλίες έδειξαν αυξημένες συγκεντρώσεις, με τελευταίο όμως το Βερτζαμί. Επίσης, σημαντικό στοιχείο επίσης είναι πως όλες οι ποικιλίες είχαν μικρή περιεκτικότητα γαλλικού οξέος. Καθώς αυτό είναι το φαινολικό οξύ που συμμετέχει σε πάρα πολλές ενώσεις με τις ανθοκυάνες και τις φλαβονοειδείς φαινόλες κατά την διάρκεια της οινοποίησης και της παλαίωσης των οίνων.

Ακόμα πρέπει να αναφερθεί ότι οι ποικιλίες με τα μικρότερα μεγέθη ράγας ήταν το Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων, το Βερτζαμί και το Κρασάτο, κατά συνέπεια θα έχουν και μεγαλύτερη αναλογία φλοιού προς σάρκα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω διεξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Όλες οι υπό μελέτη ποικιλίες πιθανά να μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε συνυποποίηση με άλλες ερυθρές ποικιλίες για την παραγωγή οίνων υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβανόλες.
- Το Βερτζαμί, το Μαυρούδι Ψιλό Καλαβρύτων και η Μανδηλαριά φαίνεται να είναι οι ποικιλίες με τη μεγαλύτερη δυνατότητα να εκχυλίσουν πολύ έντονο χρώμα στους παραγόμενους οίνους. Πέραν όμως του ανθοκυανικού προφίλ των ραγών, μεγάλη επίδραση έχουν διάφοροι οινοποιητικοί παράγοντες στο τελικό χρώμα.
- Οι ποικιλίες Βερτζαμί, Λιάτικο και Κρασάτο με το δυναμικό συμπτκνωμένων ταννινών που επέδειξαν είναι ικανές για την παραγωγή οίνων μακράς παλαίωσης.
- Η Μανδηλαριά, το Βερτζαμί, το Κοτσιφάλι και το Λιάτικο κρίνοντας από την σύγκριση των φαινολικών ενώσεων γιγάρτων έναντι φλοιών λόγω μεγέθους και βαθμού πολυμερισμού(Chira et al., 2015), πιθανόν να χαρακτηριστούν οργανοληπτικά οι πιο στυπτικές ποικιλίες από τις εξεταζόμενες.
- Το Αηδάνι Μαύρο και το Λιάτικο φαίνεται να είναι οι ποικιλίες με τη μικρότερη δυνατότητα να οδηγήσουν σε παραγωγή οίνου με μεγάλη περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες και αντίστοιχα σε βαθύ χρωματισμό.
- Επιπλέον το Λιάτικο πέραν του φτωχού ανθοκυανικού περιεχομένου σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση φλαβονών και φλαβονολών γιγάρτων, είναι πιθανή η ταχύτερη οξειδωση και υποβάθμιση της απόχρωσης των οίνων του.
- Το Βερτζαμί ξεχώρισε από τις υπόλοιπες ποικιλίες και έδειξε δυνατότητα παραγωγής ερυθρού οίνου ποιότητας, με φαινολικό πλούτο και αξιόλογα γλευκογραφικά χαρακτηριστικά.
- Επίσης ενδιαφέρον είναι το γεγονός υψηλής συγκέντρωσης ρεσβερατρόλης από τις ποικιλίες Βερτζαμί και Κοτσιφάλι.

Σε κάθε περίπτωση τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα της μελέτης αυτής αφορούν μία μόνο καλλιεργητική περίοδο σε ένα συγκεκριμένο αμπελότοπο με δεδομένες εδαφοκλιματικές συνθήκες. Γεγονός που καθιστά αναγκαία την επανάληψη μιας τέτοιας μελέτης για τις ποικιλίες αυτές σε διαφορετικές



καλλιεργητικές περιόδους πιθανά όμως και σε διαφορετικούς αμπελότοπους, για τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, με βάση και την επίδραση των εδαφοκλιματικών παραγόντων. Επίσης, προτείνεται η διεξαγωγή της ίδιας μελέτης σε επόμενη περίοδο από τον ίδιο αμπελότοπο με την προσθήκη των γηγενών και διεθνών ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* sp.) Μανδηλαριά, Αγιωργίτικο, Cabernet Sauvignon και Syrah.

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- 1) [http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Pollaplasiastiko\\_Yliko/nomothesia\\_pollaplasiastiko\\_yliko/kya39694\\_fek684\\_091192.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Pollaplasiastiko_Yliko/nomothesia_pollaplasiastiko_yliko/kya39694_fek684_091192.pdf)
- 2) ΚΟΥΡΑΚΟΥ - ΔΡΑΓΩΝΑ Σ., 1998. Θέματα Οινολογίας. Εκδ: Τροχαλία, Αθήνα, σελ. 10-25
- 3) ALLEWELDT G., ENGEL M., GEBBING H., 1981. Historical investigations with grapevine berries. *Vitis* 20:1-7
- 4) ΚΟΤΣΕΡΙΑΔΗΣ Γ., 2005a. Σημειώσεις /Εργαστηριακές Ασκήσεις Οινολογίας Ι, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, στο 7 σελ 6-10
- 5) ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ Μ.Ν. 2013. Αμπελουργία. Εκδ. Τροπή, Αθήνα, 118-121, 209, 211, 228-235, 243
- 6) ΣΟΥΦΛΕΡΟΣ Ε. ΗΡ., 1997. Οινολογία. Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τόμος Ι. Θεσσαλονίκη, 66, 191, 205
- 7) RIBERAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONECHE B., LONVAUD A., 2006. Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications. Ed: 2<sup>nd</sup> John Wiley & Sons, Ltd, 43, 66, 243, 244 255, 256
- 8) ΖΑΧΑΡΟΠΟΥΛΟΣ Χ., 2016. Επίδραση του υποκειμένου στην διακύμανση της συγκέντρωσης των αμινοξέων και φαινολικών συστατικών των ποικιλιών Σαββατιανό και Ασύρτικο – Μελέτη αμινοξέων και φαινολικού δυναμικού ορισμένων ελληνικών ποικιλιών οινοποιίας αμπέλου (*Vitis vinifera* L.). Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 8, 9, 37, 40, 41, 42
- 9) MULLINS M.G., BOUQUET A., WILLIAMS L.E., 1992. Biology of Horticultural crops. Biology of the grapevine. Press Syndicate of the University of Cambridge, στο 7 σελ. 9
- 10) KLIEWER W.M., 1970. Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes. *J. Food Sci.*, 35: 17-21
- 11) ROUBELAKIS-ANGELAKIS A.K., 1991. Amino acid and protein metabolism in *Vitis* spp., στο International symposium on nitrogen in grapes and wine. Ed: Am. Soc. Enol. Vitic., 52-61

- 12) KLIOWER W.M. 1991. Methods for determining the nitrogen status of vineyard, στο International symposium on nitrogen in grapes and wine. Ed: Am. Soc. Enol. Vitic., 133-147
- 13) KRUEGER R., KLIOWER W.M., 1995. Arginine synthesis in grapevine leaves and berries: Diurnal and seasonal patterns, environmental and physiological influences. Am. J. Enol. Vitic., 46(1): 37-42
- 14) WINKLER A.J., COOK J.A., KLIOWER W.M., LIDER, L.A., 1974. General Viticulture. Ed: 2<sup>nd</sup>, University of California press, Berkeley, στο 7 σελ 22
- 15) ROUBELAKIS-ANGELAKIS A.K., KLIOWER W.M., 1978a. Changes in the activities of ornithine transcarbamylase and arginase, and concentration of nitrogenous substances during germination and seedling development of *Vitis vinifera* L. Vitis, 17: 370-385
- 16) LOVATT C.J., CHENG A.H., 1984. Application of commercial enzymes to measure the activity of the arginine pathway-urea cycle in intact cells. Anal. Biochem., 142: 305- 311
- 17) ROUBELAKIS-ANGELAKIS A.K., KLIOWER W.M., 1978B. Enzymes of Krebs - Henseleit cycle in *Vitis vinifera* L. II. Arginosuccinate synthetase and lyase. Plant Physiol., 62: 340-343
- 18) ΔΙΑΜΑΝΤΙΔΗΣ Χ.Γ., 1994a. Ο κύκλος του αζώτου, στο 7 σελ. 22
- 19) RAINS D.W., 1989. Plant tissue and protoplast culture: application to stress physiology and biochemistry, στο 7 σελ. 20
- 20) ALI G., SRIVASTAVA P.S., IQDAL M., 1999. Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in regenerates grown under NaCl stress. Biol. Plantarum, 42: 89- 95
- 21) RHODES D., VERSLUES P.E., SHARP R.E., 1999. Role of amino acids in abiotic stress resistance, στο 7 σελ. 20
- 22) OZTURK L., DEMIR Y., 2002. In vivo and in vitro protective role of proline. Plant Growth Reg., 38: 259-264
- 23) HSU S.Y., HSU Y.T., KAO C.H. 2003. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. Biol. Plant. 46: 73-78.
- 24) KISHOR P.B.K., SANGAM S., AMRUTHA R.N., SRI LAXMI P., NAIDU K.R., RAO K.R.S.S., RAO S., REDDY K.J., THERIAPPAN P., SREENIVASULU N., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance, στο 7 σελ. 20
- 25) DELAUNEY A. J., VERMA D. P. S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant J., 4: 215–223
- 26) CHIANG H.-H., DANDEKAR A. M., 1995. Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L) during development and in response to desiccation, στο 7 σελ. 21
- 27) SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. Plant Physiol., 115: 327–334

- 28) HARE P.D., CRESS W.A., VAN STADEN J., 1999. Proline synthesis and degradation: a model for elucidating stress- related signal transduction, στο 7 σελ. 21
- 29) ZHU J. K., 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4: 401–406
- 30) ZHU J. K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 247–273.
- 31) THOMASHOW M.F., 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms, στο 7 σελ. 21
- 32) KAVI-KISHOR P.B., SANGAMI S., AMRUTHA R.N., SRI LAXMI P., NAIDU K.R., RAO K.R.S.S., SREENATH RAO, REDDY K.J., THERIAPPAN P., SREENIVASULU N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance, στο 7 σελ. 21
- 33) YAN H., GANG L.Z., ZHAO C.Y., GUO W.Y., 2000. Effects of exogenous proline on the physiology of soybean plantlets regenerated from embryos in vitro and on the ultrastructure of their mitochondria under NaCl stress, στο 7 σελ. 21
- 34) HUA B., GUO W.Y., 2002. Effect of exogenous proline on SOD and POD activity of soybean callus under salt stress, στο 7 σελ. 21
- 35) VAN HEESWIJCK R., STINES A.P., GRUBB J., SKRUMSAGER MOLLER I., HOJ P.B., 2001. Molecular biology and biochemistry of proline accumulation in developing grape berries, στο 7 σελ. 22
- 36) BELL A.A., OUGH C.S., KIEWER W.M., 1979. Effects on must and wine composition, rates of fermentation, and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson seedless grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30(2): 124-129
- 37) OUGH C.S., 1964. Fermentation rates of grape juice. I. Effects of temperature and composition on white juice fermentation rates. *Am. J. Enol. Vitic.*, 15: 167-177
- 38) BISSON F.L., 1991. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes, στο International symposium on nitrogen in grapes and wine. Ed: Am. Soc. Enol. Vitic., Davis, C.A., 78-89
- 39) OUGH, C.S., STASHAK, R.M., 1974. Further studies on proline concentration in grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 25: 7-12
- 40) DI STEFANO R., FLAMINI R., 2008. *Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry*. CRA, Viticulture Research Center, Conegliano Veneto, Italy, 33
- 41) 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
- 42) RIBERAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONECHE B., LONVAUD A., 2006. *Handbook of Enology, Volume 2, The chemistry of wine stabilization and treatments*. Ed: 2<sup>nd</sup> John Wiley & Sons, Ltd, 141, 142

- 43) RENAUD S., DE LORGERIL M., 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339(8808), 1523
- 44) 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
- 45) GOMEZ-ALONSO S., GARCIA-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.
- 46) PIETTA P.G., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042
- 47) ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ Α., 2016. Μελέτη της χημικής σύστασης ερυθρών οίνων κατά την οξειδωτική τους ωρίμαση. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 56,57
- 48) KALLITHRAKA S., TSOUSOURAS E., TZOUROU E., LANARIDIS P., 2006. Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry*, 99: 784–793
- 49) JACKSON, R. S., 2008. Wine science: principles and applications. Amsterdam: Elsevier, στο 46 σελ. 27,28
- 50) IACOPINI P., BALDI M., STORCHI P., SEBASTIANI L., 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 589– 598.
- 51) SQUADRITO M., CORONA O., ANSALDI G., DI STEFANO R., 2007. Relazioni fra i percorsi biosintetici degli HCTA, dei flavonoli e degli antociani nella buccia dell’uva, στο 39 σελ 37
- 52) BORSA, D., CARNIEL, D., ASPROUDI, A., MONTICELLI, L., CRESPIAN, M., COSTACURTA, A., 2005. Caratterizzazione di uve Malvasia attraverso lo studio dei metaboliti secondari, στο 39 σελ. 37
- 53) MASA A., VILANOVA M., POMAR F., 2007. Varietal differences among the flavonoid profile of white grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1164: 291–297
- 54) MATTIVI F., GUZZON R., VRHOVSEK U., STEFANINI M., VELASCO R., 2006. Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 7692–7702
- 55) RODRIGUEZ MONTEALEGRE R., ROMERO PECES R., CHACON VOZMEDIANO J. L., MARTINEZ GASCUENA J., GARCIA ROMERO E., 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in warm climates. *J. Food Compos. Anal.*, 19: 687–693.
- 56) TERRIER N., PONCET-LEGRAND C., CHEYNIER V., 2009. Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. *Wine Chemistry and Biochemistry*, Chapter 9B. Ed: Moreno-Arribas M.V.-Polo M.C., 465,473
- 57) DOWNEY M., HARVEY J., ROBINSON S., 2003. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of

- Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Austr. J Grape Wine Res.*, 9: 110–121
- 58) KOMES D., BELSCAK-CVITANOVIC A., HORZIC D., RUSAK G., LIKIC S., BERENDIKA M., 2010. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Some Traditionally Used Medicinal Plants Affected by the Extraction Time and Hydrolysis. *Phytochem. Anal.*, 22: 172–180
- 59) CHEYNIER V., MOUTOUNET M., SARNI-MANCHADO P., 1998. Les composés phénolique Lavoisier press, *Enologie*, 123–162
- 60) WANG S.P., HUANG K.J., 2004. Determination of flavonoids by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 1032: 273–279
- 61) SU C., SINGLETON V., 1969. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry*, 8: 1553–1558
- 62) ΚΑΝΕΛΛΟΠΟΥΛΟΥ Ι.Α., 2015. Μελέτη του μέσου βαθμού πολυμερισμού ταννινών σε φλοιούς και γίγαρτα της ποικιλίας Αγιωργίτικο από τέσσερις υποζώνες της περιοχής Νεμέας για τα έτη 2012-2013-2014. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 13
- 63) CZOCHANSKA, Z., FOO L.Y., NEWMAN R.H., PORTER L.J., THOMAS W.A., JONES W.T., 1979. Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins, στο 55 σελ. 465
- 64) ΣΟΥΦΛΕΡΟΣ Ε.Η., 2000 Οινολογία: επιστήμη και τεχνολογία. Θεσσαλονίκη, στο 7 σελ. 38
- 65) KENNEDY J.A., JONES G.P., 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.*, 49(4): 1740–1746
- 66) DOWNEY M.O., HARVEY J.S., ROBINSON S.P., 2003. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust J. of Grape and Wine Research*, 9(1): 15–27
- 67) PASTOR DEL RIO J.L., KENNEDY J.A., 2006. Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera*, L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57(2): 125–132
- 68) MATEUS N., MAQUES S., GONÇALVES A.C., MACHADO J.M., DE FREITAS V., 2001. Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro valley during ripening: influence of cultivation altitude. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52(2): 151–121
- 69) SOUQUET J.M., CHEYNIER V., BROSSAUD F., MOUTOUNET M., 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43(2): 509–512
- 70) 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
- 71) 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
- 72) MAZZA G., MINIATI E., 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Ed: CRC, Boca Raton
- 73) 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. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 5348–5355
- 74) COSME F., RICARDO-DA SILVA J.M., LAUREANO O., 2009. Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry*, 112: 197-204
- 75) KENNEDY J.A., MATTHEWS M.A., WATERHOUSE A.L., 2000. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55: 77-85
- 76) ROMEYER F., MACHEIX J.J., SAPIS J.C., 1986. Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds, στο 55 σελ. 472
- 77) DOWNEY M.O., DOKOOZLIAN N.K., KRSTIC M.P., 2006. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* 57: 257-268.
- 78) SANTOS-BUELGA C., SCALBERT A., 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 80: 1094–1117
- 79) HASLAM E., 1998. Taste, bitterness and astringency, στο 80 σελ. 551
- 80) DE WIJK R.A., PRINZ, J.F., 2005. The role of friction in perceived oral texture, στο 80 σελ 551
- 81) VIDAL S., FRANCIS L., GUYOT S., MARNET N., KWIATKOWSKI M., GAWEL R., CHEYNIER V., WATERS E.J., 2003. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.*, 83: 564–573
- 82) ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ Σ., 2016. Χημεία Οίνου, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 83) SANTOS-BUELGA C., DE FREITAS V., 2009. Influence of Phenolics on Wine Organoleptic Properties. *Wine Chemistry and Biochemistry*, Chapter 9D. Ed: Moreno-Arribas M.V.-Polo M.C., 531-540
- 84) BROUILLARD R., CHSSAING S., FOUGEROUSSE A., 2003. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is that red wine color lasts so long? *Phytochemistry*, 64: 1179-1186
- 85) ALCALDE-EON C., ESCRIBANO-BAILON M.T., SANTOS-BUELGA C., RIVAS-GONZALO J.C., 2006. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. *Anal. Chim. Acta* 563: 238–254
- 86) BALDI A., ROMANI A., MULINACCI N., VINCIERI F., CASETA B., 1995. HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 2104–2109
- 87) VIDAL S., MEUDEC E., CHEYNIER V., SKOUROUMOUNIS G., HAYASAKA Y., 2004. Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7144–7151

- 88) MONAGAS M., BARTOLOME B., 2009. Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Compounds. Wine Chemistry and Biochemistry, Chapter 9A. Ed: Moreno-Arribas M.V.- Polo M.C.
- 89) ROGGERO J.P., COEN S., LARICE J.L., 1986. Etude comparative de la composition anthocyanique des cepages, στο 85 σελ 440
- 90) GONZALEZ-SAN JOSE M., SANTA MARIA G., DIEZ C., 1990. Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region and wine-making methods. J. Food Comp. Anal., 3: 54–66
- 91) VIVAS N.G., NONIER M.F., GUERRA C., VIVAS N., 2001. Anthocyanin in grape skins during maturation of *Vitis vinifera* L. cv. Caberent Sauvignon and Merlot Noir from different Bordeaux terroirs. J. Int. Sci. Vigne Vin 35: 149–156
- 92) ROGGERO J.P., COEN S., RAGONET B., 1986. High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in reopening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. Am. J. Enol. Vitic. 37: 77–83
- 93) ORTEGA MEDER M.D., RIVAS GONZALO J.C., VICENTE J.L., SANTOS BUELGA C., 1994. Differentiation of grapes according to the skin anthocyanin composition, στο 85 σελ. 441
- 94) KELLER, M., HRAZDINA, G. 1998. Interaction of Nitrogen Availability During Bloom and Light Intensity During Veraison. II. Effects on Anthocyanin and Phenolic Development During Grape Ripening. Am. J. Enol. V. 49 (3): 341-349
- 95) PEPPI M.C., FIDELIBUS M.W., DOKOOZLIAN N., 2006. Absisic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation and color of “Flame Seedless” grapes, στο 4 σελ. 231
- 96) JEONG S.T., GOTO-YAMAMOTO N., KOBAYASHI S., ESAKA M., 2004. Effects of plants hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins, στο 4 σελ. 233
- 97) YAMANE T., JEONG S.T., GOTO-YAMAMOTO N., KOSHITA Y., KOBAYASHI S., 2006. Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. Am. J. Enol. Vitic. 57(1): 54-59
- 98) BROUILLARD R., 1982. Chemical structure of anthocyanins, στο 85 σελ. 441
- 99) RENTZSCH M., WILKENS A., WINTERHALTER P., 2009. Non-flavonoid Phenolic Compounds. Wine Chemistry and Biochemistry, Chapter 9C. Editors: Moreno-Arribas M.V.-Polo M.C., 509-511,516
- 100) MONAGAS M., BARTOLOME B., GOMEZ-CORDOVES C., 2005. Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45: 85 – 118
- 101) POZO-BAYON M.A., HERNANDEZ M.T., MARTIN-ALVAREZ P.J., POLO M.C., 2003. Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. J. Agric. Food Chem., 51: 2089–2095

- 102) SINGLETON V.L., TIMBERLAKE C.F., LEA A.G.H., 1978. The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *J. Sci. Food Agric.*, 29: 403–410
- 103) SOMERS T., VERETTE E., POCOCK K., 1987. Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.*, 40: 67–78
- 104) LANGCAKE P., 1981. *Physiol. Plant Pathol.*, 18, 213 στο 41 σελ.144
- 105) GUEBAILIA H.A., CHIRA K., RICHARD T., MABROUK T., FURIGA A., VITRAC X., MONTI, J.P., DELAUNAY J.C., MERILLON J.M. 2006. Hopeaphenol: The first resveratrol tetramer in wines from North Africa. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 9559–9564
- 106) BUIARELLI F., COCCIOLI F., JASIONOWSKA R., MEROLLE M., TERRACCIANO A., 2007. Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rap. Commun. Mass Spectrom.*, 21: 2955–2964
- 107) TZAMOΣ E., 2007. Φυτοπαθολογία, Βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής: Φυτοαλεξίνες. Εκδ: Σταμούλης, 389
- 108) PERRONE G., NICOLETTI I., PASCALE M., DE ROSSI A., DE GIROLAMO A., VISCONTI A., 2007. Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol-related compounds in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 6807–6812
- 109) JEANDET P., BESSIS R., MAUME B.F., MEUNIER P., PEYRON D., TROLLAT P., 1995. Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 316-319
- 110) PUSSA T., FLOREN J., KULDEPP P., RAAL A., 2006. Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 7488–7494
- 111) KALLITHRAKA S., MOHDALY 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
- 112) JEAN-DENIS J.B., PEZET R., TABACCHI R., 2006. Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Photoionisation Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1112: 263–268
- 113) LANDRAULT N., LARRONDE F., DELAUNAY J.C., CASTAGNINO C., VERCAUTEREN J., MERILLON J.M., GASC F., CROS G., TEISSEDRE P.L., 2002. Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during Noble Rot development. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 2046–2052
- 114) VITRAC X., BORNET A., VANDERLINDE R., VALLS J., RICHARD T., DELAUNAY J.C., MERILLON, J.M., TEISSEDRE P.L., 2005. Determination of stilbenes ( $\delta$ -viniferin, trans-astringin, transpiceid, cis- and trans-resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin) in Brazilian wines. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5664–5669



- 115) VITRAC X., CASTAGNINO C., WAFFO-TEGUO P., DELAUNAY J.-C., VERCAUTEREN J., MONTI J.-P., DEFFIEUX G., MERILLON, J.M., 2001. Polyphenols newly extracted in red wine from Southwestern France by centrifugal partition chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 5934–5938
- 116) PRYCE R.J., LANGCAKE P., 1977.  $\alpha$ -Viniferin: An antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry*, 16: 1452–1454
- 117) BOSS P.K., DAVIES C., 2009. Molecular biology of anthocyanin accumulation in grape berries, *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Ed: Roubelakis-Angelakis K.A., 265-268
- 118) HRAZDINA G., PARSONS G.F., MATTICK L.R., 1984. Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, 35: 220–227
- 119) MOUSTAFA E, WONG E., 1967. Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed. *Phytochemistry*, 6: 625-632
- 120) KUHN B., FORKMANN G., SEYFFERT W., 1978. Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in *Callistephus chinensis*. *Planta*, 138: 199-203
- 121) FORKMANN G., HELLER W., GRISEBACH H., 1980. Anthocyanin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana*: flavanone 3- and flavonoid 3'-hydroxylases. *Z Naturforsch*, 35C: 691-695
- 122) STAFFORD H.A., LESTER H.H., 1982. Enzymic and nonenzymic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3,4-diol. *Plant Physiol* 70: 695-698
- 123) SAITO K., KOBAYASHI M., GONG Z., TANAKA Y., YAMAZAKI M., 1999. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase:molecular cloning and functional expression of cDNA from a red form of *Perilla frutescens*. *Plant J.*, 17: 181-189
- 124) LARSON R.L., COE E.H., 1977. Gene-dependent flavonoid glucosyltransferase in maize. *Biochem. Genet.*, 15: 153-156
- 125) MENTING J.G.T., SCOPES R.K., STEVENSON T.W., 1994. Characterization of flavonoid 3',5'-hydroxylase in microsomal membrane fraction of *Petunia hybrida* flowers. *Plant. Physio.*, 106: 633-642
- 126) MAZZUCA P., FERRANTI P., PICARIELLO E., CHIANESE G.L., ADDEO F., 2005. Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J. Mass Spect.*, 40: 83-90
- 127) STRACK D., WRAY V., 1994. The anthocyanins. In: Harborne JB (ed) *The Flavonoids*. Chapman & Hall/CRC Press, Washington DC
- 128) MARRS K.A., 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 127-158
- 129) MUELLER L.A., GOODMAN C.D., SILADY R.A., WALBOT V., 2000. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.*, 123: 1561-1570

- 130) WICKS A.S., KLIEWER W.M., 1983. Further investigations into relationships between anthocyanins, phenolics and soluble carbohydrates in grape berry skins. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34: 114
- 131) BOSS P.K., DAVIES C., ROBINSON S.R., 1996. Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry color skin color. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2: 163-170
- 132) POMAR F., NOVO M., MASA A., 2005. Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by HPLC. *Journal of chromatography*, 11 1094 (1-2) : 34-41
- 133) CALO A., TOMASI D., CRAVERO M.C., DI STEFANO R., 1994. Contributo alla caratterizzazione e classificazione varietale (*Vitis* sp.), attraverso la determinazione degli antociani e degli acidi idrossicinnamoiltartarici della buccia di varietà a bacca rossa. *Riv. Vitic. Enol.*, 3: 13-25
- 134) CORTELL J.M., HALBLEIB M., GALLAGHER A.V., RIGHETTI T.L., KENNEDY L.A., 2005. Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5798-5808
- 135) CREASY L.L., COFFEE M., 1988. Phytoalexin production potential of grape berries. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 113:230-234
- 136) JEANDET P., BESSIS R., GAUTHERON B., 1991. The production of resveratrol (3,5,4' - trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42: 41-46
- 137) BAVARESCO L., PETEGOLLI D., CANTÙ E., FREGONI M., CHIUSA G., TREVISAN M., 1997. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 36: 77-83
- 138) SOLEAS G.J., GOLDBERG D.M., DIAMANDIS E.P., KARUMANCHIRI A., YAN J., NG E., 1995. A derivatized gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46: 346-352
- 139) SOLEAS G.J., GOLDBERG D.M., KARUMANCHIRI A., DIAMANDIS E.P., NG E., 1995. Influences of viticultural and oenological factors on changes in cis- and trans-resveratrol in commercial wines. *J. Wine Res.*, 6: 107-121
- 140) BAVARESCO L., FREGONI C., VAN ZELLER DE MACEDO BASTO GONCALVES M.I., VEZZULLI S., 2009. Physiology & molecular biology of grapevine stilbenes: An Update. *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Ed: Roubelakis-Angelakis K.A.
- 141) ROMERO-PÉREZ A.I., IBERN-GÓMEZ M., LAMUELA RAVENTOS R.M., DE LA TORRE-BORONAT M.C., 1999. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1533-1536

- 142) LI X, WU B, WANG L, LI S., 2006. Extractable amounts of trans-resveratrol in seed and berry skin in *Vitis* evaluated at the germplasm level. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 8804-8811
- 143) JOGAI AH S., POOJA D., PANDURANG G., 2007. Influence of Rootstocks on Changing the Pattern of Phenolic Compounds in Thompson Seedless Grapes and Its Relationship to the Incidence of Powdery Mildew. *NRC for Grapes*, 3.
- 144) JACKSON D.I., LOMBARD P.B., 1993. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44: 409-430
- 145) PEREIRA G. E., GAUDILLERE J.P., PIERI P., HILBERT G., MAUCOURT M., DEBORDE C., MOING A., ROLIN, D., 2006. Microclimate Influence on Mineral and Metabolic Profiles of Grape Berries. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 6765–6775
- 146) PRICE S.F., BREEN P.J., VALLADO M., WATSON B.T., 1995. Cluster sun exposure and quercetin in pinot noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46: 187–194
- 147) SPAYD S., TARARA J., MEE D., FERGUSON J., 2002. Separation of Sunlight and Temperature effects on the Composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53: 171–182
- 148) DOWNEY M.O., HARVEY J.S., ROBINSON S.P., 2004. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 10: 55–73
- 149) CORTELL J., KENNEDY J.A., 2006. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot Noir fruit and extraction in a model system. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 8510–8520
- 150) MORI K., SUGAYA S., GEMMA H., 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci, Horticult.*, 105: 319-330
- 151) COHEN S.D., TARARA J.M., KENNEDY J.A., 2008. Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism. *Anal. Chim. Acta*, 621: 57-67
- 152) ANDRÉS-DE PRADO R., YUSTE-ROJAS M., SORT X., ANDRÉS-LACUEVA C., TORRES M., LAMUELA-RAVENTÓS R.M., 2007. Effect of soil type on wines produced from *Vitis vinifera* L cv Grenache in commercial vineyards. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 779-786
- 153) COOMBE B.G., DRY P.R., 1992. *Viticulture. Volume 2. Practices. Winetitles. Adelaide*, 376
- 154) CASTELLARIN S.D., PFEIFFER A., SIVILOTTI P., DEGAN M., PETERLUNGER E., DI GASPERO G., 2007. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell Environ.*, 30: 1381-1399
- 155) 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: 409-420
- 156) OJEDA H., ANDARY C., KRAEVA E., CARBONNEAU A., DELOIRE A., 2002. Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53(4): 261-267
- 157) CONDE C., SILVA P., FONTES N., DIAS A.C.P., TAVARES R.M., SOUSA M.J., AGASSE A., DELROT S., GEROS H., 2007. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1(1): 1-22
- 158) KELLER M., 2005. Grape ripening and determination of grape maturity. 33rd Annual New York Wine, Industry Workshop, 119-123
- 159) TANDONNET J.P., SOYER J.P., GAUDILLERE J.P., DECROOCQ S., BORDENAVE L., OLLAT N., 2008. Long term effects of nitrogen and water supply on conferred vigor and yield by SO4 and Riparia Gloire de Montpellier rootstocks. *Journal international des Sciences de la Vigne et du Vin.*, 42(2): 89-98
- 160) GRAHAM R.D., 1983. Effects of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. *Adv. Bot. Res.* 10: 221-276
- 161) BAVARESCO L., PEZZUTTO S., RAGGA A., FERRARI F., TREVISAN M., 2001. Effect of nitrogen supply on trans-resveratrol concentration in berries of *V. vinifera* L cv Cabernet Sauvignon. *Vitis*, 40: 229-230
- 162) BAVARESCO L., PEZZUTTO S., GATTI M., MATTIVI F. 2007. Role of the variety and some environmental factors in grape stilbenes. *Vitis*, 46: 57-61
- 163) COULOMB C., LIZZI, Y., COULOMB P.J., ROGGERO J.P., COULOMB P.O., AGULHON O., 1999. Le cuivre a-t-il un effet éliciteur? *Phytoma.*, 512: 41-46
- 164) ΚΡΙΜΠΙΑΣ Β.Δ., 1943. Ελληνική Αμπελογραφία, τόμος Ι. σελ 137, 161-162
- 165) ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ Μ.Ν., 2015. Αμπελογραφία. Εκδ: Τροπή, σελ. 155
- 166) ΝΙΚΟΛΑΟΥ Ν.Α., 2012. Αμπελογραφία. Εκδ: Σύγχρονη Παιδεία, σελ 228-229
- 167) ΝΕΟΦΥΤΟΥ Σ., 2005. Αμπελογραφική περιγραφή ορισμένων ελληνικών ποικιλιών της αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) με τον κώδικα αμπελογραφικής περιγραφής του Ο.Ι.Β. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Σελ. 107
- 168) OUGH C.S., 1969. Rapid determination of proline in grapes and wine. *J. Food Sci.*, 34: 228-30
- 169) ROCKENBACH I.I., GONZAGA L.V., RIZELIO V.M., DE SOUZA SCHMIDT GONÇALVES A.E., GENOVESE M.I., FETT R., 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, 44: 897-901

- 170) RISTIC R., ILAND P.G., 2005. Relationships between seed and berry development of *Vitis Vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 43–58
- 171) SARNECKIS C., DAMBERGS R.G., JONES P., MERCURIO M., HERDERICH M.J., SMITH P., 2006. Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimized tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(1): 39-49
- 172) SMITH P.A., 2005. Precipitation of tannin with methyl cellulose allows tannin quantification in grape and wine samples. *Technical Review*. The Australian Wine Research Institute, Adelaide, Australia, 158: 3-7
- 173) MERCURIO M., SMITH P.A., 2006. New formats for the methyl cellulose precipitable (MCP) tannin assay allow high throughput measurement of grape and wine tannin by industry. *Technical Review*, 164: 1-10
- 174) BHAIGYABATI TH., GRIHANJALI D.P., BAG G.C., 2014. Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Aqueous Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(5): 970-976
- 175) ARNOUS A., MAKRIS D.P., KEFALAS P., 2002. Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. *Journal of food composition and analysis* 15: 655–665
- 176) SCALBERT A., 1992. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. *Plant Polyphenols (Basic Life Sciences,)*. Ed: Hemingway RW & Laks P.E., 59: 259-280
- 177) THIES M., FISCHER R., 1971. A new colour reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4- dimethylaminocinnamaldehyde. Στο *J. Chromatogr.*, 467: 185-193
- 178) LI Y.G., TANNER G., LARKIN P., 1996. The DMACA–HCl Protocol and the Threshold Proanthocyanidin Content for Bloat Safety in Forage Legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(1): 89 – 101
- 179) ΚΑΡΚΑΛΟΥΣΟΣ Π., ΓΕΩΡΓΙΟΥ Ζ., ΚΡΟΥΠΗΣ Χ., ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΟΥ Α., ΠΛΑΓΕΡΑΣ Π., ΣΠΥΡΟΠΟΥΛΟΣ Β., ΤΣΟΤΣΟΥ Γ., ΦΟΥΝΤΖΟΥΛΑ Χ., 2015. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα. Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 8: 219-257
- 180) MYLONA A.E., BIMPILAS A., TSIMOGIANNIS D., OREOPOULOU V., 2013. Characteristic Phenolic Composition of the Greek Variety Mavrokountoura Grape and Wine. *Food Science and Biotechnology*, 22(6): 1515-1522
- 181) KYRALEOU M., KOTSERIDIS Y., KOUNDOURAS S., CHIRA K., TEISSEDE P.L., KALLITHRAKA S., 2016. Effect of irrigation regime on perceived astringency and proanthocyanidin composition of skins and seeds of

- Vitis vinifera* L. cv. Syrah grapes under semiarid conditions. *Food Chemistry*, 203: 292–300
- 182) IVANOVA V., STEFOVA M., CHINNICI F., 2010. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *Journal of the Serbian chemical society*, 75(1): 45–59
- 183) APOSTOLOU A., STAGOS D., GALITSIOU E., SPYROU A., HAROUTOUNIAN S., PORTESIS N., TRIZOGLIOU I., HAYES A.W., TSATSAKIS A.M., KOURETAS D., 2013. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 61: 60–68
- 184) GUENDEZ R., KALLITHRAKA S., P. 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: 1–9
- 185) KOUNDOURAS S., KANAKIS I., DROSSOU E., KALLITHRAKA S., KOTSERIDIS Y., 2013. Effects of post-veraison water regime on the phenolic composition of grapes and wines of cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 47(1): 115-128
- 186) BUTKHUP L., CHOWTIVANNAKUL S., GAENSAKOO R., PRATHEPHA P., SAMAPPITO S., 2010. Study of the Phenolic Composition of Shiraz Red Grape Cultivar (*Vitis vinifera* L.) Cultivated in North-eastern Thailand and its Antioxidant and Antimicrobial Activity. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 31(2): 89-98
- 187) REVILLA E., RYAN J.M., MARTIN-ORTEGA G., 1998. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4592-4597
- 188) LORRAIN B., CHIRA K., TEISSEDRE P.L., 2011. Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chemistry*, 126: 1991–1999
- 189) LUÍS RODRIGUES S., MAFALDA Q., 2016. Bioactive compounds of red grapes from Dão region (Portugal): Evaluation of phenolic and organic profile. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(4): 315–321
- 190) ΤΣΑΠΙΑΡΑΣ Δ.Ι., 2013. Μελέτη της επίδρασης της λίπανσης καλίου στα φαινολικά συστατικά των ραγών της ποικιλίας Αγιωργίτικο για το έτος 2010. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. 82,85
- 191) CHIOU A., PANAGOPOULOU E.A., GATZALI F., DE MARCHI S., KARATHANOS V.T., 2014. Anthocyanins content and antioxidant capacity of Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena). *Food Chemistry*, 146: 157–165
- 192) KYRALEOU M., KALLITHRAKA S., KOUNDOURAS S., CHIRA K., HAROUTOUNIAN S., SPINTHIROPOULOU H., KOTSERIDIS Y., 2015.

- Effect of vine training system on the phenolic composition of red grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Xinomavro). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 49: 71-84
- 193) 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
- 194) ANASTASIADI M., PRATSINIS H., KLETSAS D., SKALTSOUNIS A.L., HAROUTOUNIAN S., 2010. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*, 43: 805–813
- 195) Καννελοπούλου Ι.Α. Μελέτη του μέσου βαθμού πολυμερισμού ταννινών σε φλοιούς και γίγαρτα της ποικιλίας Αγιωργίτικο, 2015.
- 196) Jeandet et al., 1995; Bourhis et al., 1996
- 197) Watson, B. 2003. Evaluation of winegrape maturity. p. 235-245.
- 198) Henrique Luis Silva de Noronha. The effect of high-temperature on sugar transport in grape cells, 2010. Universidade do Minho
- 199) Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols, F. BROSSAUD, VERONIQUE CHEYNIER and ANN C. NOBLE, 2001, UC DAVIS.
- 200) Bernatova I, Pechanova O, Babal P, Kysela S, Stvrtina S, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002