



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

Εργαστήριο Αμπελολογίας

Μελέτη των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτήρων των
σταφυλών και του γλεύκους γηγενών ποικιλιών αμπέλου
(*Vitis vinifera L.*) της ομάδας «Μαυρούδια»

Μεταπτυχιακή Διατριβή
ΓΕΡΟΓΙΑΝΝΗΣ Ν. ΟΡΕΣΤΗΣ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μπινιάρη Αικατερίνη

ΑΘΗΝΑ, 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

Εργαστήριο Αμπελολογίας

Μελέτη των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτήρων των
σταφυλών και του γλεύκους γηγενών ποικιλιών αμπέλου
(*Vitis vinifera L.*) της ομάδας «Μαυρούδια»

Μεταπτυχιακή Διατριβή
ΓΕΡΟΓΙΑΝΝΗΣ Ν. ΟΡΕΣΤΗΣ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΜΠΙΝΙΑΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΑΘΗΝΑ, 2017

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτήρων των σταφυλών και του γλεύκους γηγενών ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera L.*) της ομάδας «Μαυρούδια»

ΓΕΡΟΓΙΑΝΝΗΣ Ν. ΟΡΕΣΤΗΣ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΜΠΙΝΙΑΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής

ΜΠΙΝΙΑΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ, Επίκουρη Καθηγήτρια Εργ. Αμπελολογίας,
Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής Γεωπονικού Πανεπιστημίου
Αθηνών

ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ, Αναπληρώτρια 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

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.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στη διεκπεραίωσή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια Εργαστηρίου Αμπελολογίας κα Αικατερίνη Μπινιάρη, επιβλέπουσα της παρούσας μελέτης, για την ανάθεση του θέματος και την συμπαράστασή της καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης. Επίσης την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας και για την πολύτιμη καθοδήγηση της όλες τις φορές που της ζητήθηκε.

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο καθηγητή κ. Μ.Ν. Σταυρακάκη για την καθοδήγησή, τις συμβουλές και το ενδιαφέρον του καθώς και την κα Δ. Μπούζα μέλος ΕΔΙΠ του εργαστηρίου για τη βοήθεια και τις συμβουλές της κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μελέτης

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Κοτσερίδη και την κα Νίκη Προξενιά, μέλος ΕΔΙΠ του εργαστηρίου Οινολογίας, για τις γνώσεις που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια του προγράμματος.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα πρέπει να αποδοθούν στον υποψήφιο διδάκτορα, συνάδελφο και φίλο Δασκαλάκη Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθεια του και το εξαιρετικό πνεύμα συνεργασίας που επέδειξε όχι μόνο κατά την διεξαγωγή της παρούσας μελέτης, αλλά συνολικότερα κατά την διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την αμέριστη υποστήριξη που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αμπελουργίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το έτος 2016-2017.

Αντικείμενο της εργασίας είναι η μελέτη των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτήρων των σταφυλών και του γλεύκους των γηγενών οινοποιήσιμων ποικιλιών αμπέλου (*Vitisvinifera*L.) Κολλινιάτικο Μαύρο, Μπεκάρι, Μπακούρι, Κουντούρα Μαύρη, Δουμπραίνα Μαύρη, Θράψα και Μαύρο Σπετσών, που ανήκουν στην ομάδα «Μαυρούδια».

Σε κάθε ποικιλία, κατά το στάδιο της τεχνολογικής ωριμότητας προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα του χυμού των ραγών σε σάκχαρα με τη χρήση διαθλασιμέτρου, η ολική οξύτητα με τη χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) και η ενεργή οξύτητα(pH) με τη χρήση πεχαμέτρου.

Πραγματοποιήθηκε μηχανική ανάλυση σταφυλής για κάθε μια από τις υπό μελέτη ποικιλίες. Μετρήθηκαν το βάρος πενήντα (50) ραγών, ο μέσος όρος της δύναμης πρόσφυσης των ραγών και οι κατά μέσο όρο διαστάσεις των σταφυλών και των ραγών της κάθε ποικιλίας.

Προσδιορίστηκε ποσοτικά η περιεκτικότητα του χυμού στα αμινοξέα αργινίνη και προλίνη. Μετρήθηκαν στους φλοιούς των ραγών η περιεκτικότητα ολικές φαινολικές ενώσεις, ολικές φλαβονοειδείς ενώσεις, σε ολικές ανθοκυάνες, η περιεκτικότητα σε συμπυκνωμένες ταννίνες, η περιεκτικότητα σε ολικές φλαβονόλες, ολικές φλαβόνες και φλαβονόλες και προσδιορίστηκαν ποσοτικά με τη χρήση της HPLC οι κυριότερες ανθοκυάνες καθώς και άλλες μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις. Στα γίγαρτα έγιναν οι ίδιες μετρήσεις εκτός των ολικών ανθοκυανών και του προσδιορισμού των ανθοκυανών και των άλλων φαινολικών ενώσεων με την HPLC. Στους χυμούς μετρήθηκαν η περιεκτικότητα σε ολικές ανθοκυάνες, ολικές φαινολικές ενώσεις και σε συμπυκνωμένες ταννίνες.

Όλες οι ποικιλίες παρουσίασαν ικανοποιητική περιεκτικότητα σε σάκχαρα, αλλά πολύ χαμηλές τιμές ολικής οξύτητας. Σε όλες τις ποικιλίες καταγράφηκε αυξημένη περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες και φαινολικές ενώσεις, όμως παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Το Κολλινιάτικο Μαύρο παρουσίασε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες. Αρκετά μεγάλη περιεκτικότητα παρουσίασαν και οι Κουντούρα Μαύρη, Δουμπραίνα Μαύρη και Μπεκάρι. Στις ποικιλίες Μαύρο Σπετσών, Κουντούρα Μαύρη και Μπεκάρι καταγράφηκαν υψηλές τιμές περιεκτικότητας στις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις.

Επιστημονική περιοχή: Αμπελουργία

Λέξεις κλειδιά: Κολλινιάτικο Μαύρο, Μπεκάρι, Μπακούρι, Κουντούρα Μαύρη, Δουμπραίνα Μαύρη, Θράψα, Μαύρο Σπετσών, *Vitisvinifera*L, φαινολικές ενώσεις, ανθοκυάνες, ταννίνες, φλαβονοειδή, φλαβονόλες, φλαβονόλες, φλοιοί, γίγαρτα

Study of grape quantitative and qualitative characteristics of Greek native winemaking red *Vitis vinifera* L. cultivars.

Abstract

This present thesis was conducted in the Laboratory of Viticulture of the Agricultural University of Athens in the year 2016-2017.

The aim of this study was to investigate the grape quantitative and qualitative characteristics of Greek native winemaking red *Vitis vinifera* L. cultivars. The studied cultivars were Kolliniatiko Mavro Bekari, Bakouri, Koudoura Mavri, Doubraina Mavri, Thrapsa, Mavro Spetson.

In full maturity stage, the following were determined for all cultivars: the sugar content of the juice of the berries using a refractometer, the total acidity using a sodium hydroxide solution (NaOH) and the pH using a pH-meter. Mechanical analysis of the grape was performed for each of the cultivars studied. The following were measured: the weight of fifty (50) berries, the berry mean adhesion force and the average dimensions of the berries of each cultivar.

The content of the juice in the amino acids arginine and proline was quantitatively determined. The undermentioned 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. Total anthocyanins, total phenolic compounds and condensed tannins concentration was recorded in grape pulp too.

The samples of all cultivar performed an average sugar content. On the contrary, the total acidity ranged in low levels. Despite the fact that anthocyanins and phenolic compounds content was in high levels for all cultivars, statistically significant differences were recorded among them. The highest anthocyanins concentration was recorded in Kolliniatiko Mavro. Sufficient anthocyanins concentration was recorded in Koudoura Mavri, Doubraina Mavri and Bekari. The cultivars Mavro Spetson, Koudoura Mavri and Bekari performed high concentration of non-anthocyanin phenolic compounds.

Scientific field: Viticulture

Keywords: Kolliniatiko Mavro, Bekari, Bakouri, Koudoura Mavri, Doubraina Mavri, Thrapsa, Mavro Spetson, *Vitis vinifera* L, phenolic compounds, anthocyanins, tannins, flavonoids, flavanols, flavonols, skins, seeds

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ.....	1
1.1.1	Τα μέρη της ράγας.....	1
1.1.1.1	Φλοιός.....	1
1.1.1.2	Σάρκα	1
1.1.1.3	Γίγαρτα	2
1.1.2	Ανάπτυξη και ωρίμανση των ραγών	3
1.1.2.1	Στάδιο I – Στάδιο πράσινης ράγας	4
1.1.2.2	Στάδιο II – Περκασμός (γυάλισμα)	4
1.1.2.3	Στάδιο III – Στάδιο ωρίμανσης.....	5
1.2	ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ.....	6
1.2.1	Βιοσύνθεση και συγκέντρωση των αμινοξέων στην άμπελο	6
1.2.2	Η σύνθεση και ο ρόλος της αργινίνης και προλίνης στην άμπελο	7
1.2.3	Ο ρόλος των αμινοξέων στο γλεύκος και τον οίνο.....	9
1.3	ΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ	9
1.3.1	Δομή και κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων της ράγας	10
1.3.1.1	Φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις	11
1.3.1.1.1	Φλαβόνες-Φλαβονόλες.....	11
1.3.1.1.2	Φλαβανόλες-Ταννίνες	14
1.3.1.1.2.1	Κατανομή των φλαβανολών-ταννινών στη ράγα.....	15
1.3.1.1.2.2	Ο ρόλος κι εξέλιξη των φλαβανολών κατά την ωρίμανση.....	16
1.3.1.1.2.3	Οι ταννίνες στον οίνο	17
1.3.1.1.3	Ανθοκυάνες	18
1.3.1.1.3.1	Ο ρόλος κι εξέλιξη των ανθοκυανών κατά την ωρίμανση	20
1.3.1.1.3.2	Οι ανθοκυάνες στον οίνο.....	21
1.3.1.2	Μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις	22
1.3.1.2.1	Φαινολικά οξέα	22
1.3.1.2.1.1	Υδρόξυβενζοϊκά οξέα	23
1.3.1.2.1.2	Υδρόξυκινναμωμικά οξέα	23
1.3.1.2.2	Στιλβένια	24
1.3.2	Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των φαινολικών ενώσεων	26
1.3.3	Παράγοντες που επιδρούν στη βιοσύνθεση και στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων	30
1.3.3.1	Ποικιλία.....	30
1.3.3.2	Υποκείμενο.....	32
1.3.3.3	Περιβαλλοντικοί κι εδαφολογικοί παράγοντες	32
1.3.3.4	Υδατική κατάσταση.....	34
1.3.3.5	Λίπανση.....	36
1.3.3.6	Καλλιεργητικές τεχνικές	36

2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
2.1	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	38
2.2	ΑΜΠΕΛΩΝΑΣ.....	38
2.3	ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΡΑΓΩΝ.....	38
2.4	ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΤΑΦΥΛΗΣ ΚΑΙ ΡΑΓΑΣ.....	39
2.4.1	Βάρος σταφυλής.....	39
2.4.2	Μήκος και πλάτος σταφυλής.....	39
2.4.3	Μέσο βάρος ράγας	39
2.4.4	Μέσο μήκος και πλάτος ράγας.....	40
2.4.5	Δύναμη πρόσφυσης ράγας.....	40
2.5	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΓΛΕΥΚΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ.....	40
2.5.1	Μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας (°Brix) με χρήση διαθλασίμετρου.....	40
2.5.2	Μέτρηση ενεργής οξύτητας-pH.....	40
2.5.3	Ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής οξύτητας.....	42
2.5.3.1	Αρχή της μεθόδου	42
2.5.3.2	Αντιδραστήρια.....	42
2.5.3.3	Διαδικασία μέτρησης.....	42
2.5.3.4	Έκφραση αποτελεσμάτων.....	43
2.6	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΕ ΓΛΕΥΚΟΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ.....	43
2.6.1	Μέτρηση της αργινίνης στο γλεύκος.....	43
2.6.1.1	Αρχή της μεθόδου	43
2.6.1.2	Αντιδραστήρια.....	44
2.6.1.3	Προετοιμασία δειγμάτων.....	44
2.6.1.4	Διαδικασία μέτρησης.....	44
2.6.1.5	Υπολογισμός της αργινίνης.....	45
2.6.2	Μέτρηση της προλίνης στο γλεύκος.....	45
2.6.2.1	Αρχή της μεθόδου	45
2.6.2.2	Αντιδραστήρια.....	46
2.6.2.3	Προετοιμασία δειγμάτων.....	46
2.6.2.4	Διαδικασία μέτρησης.....	46
2.6.2.5	Υπολογισμός της προλίνης στο γλεύκος των ραγών.....	47
2.7	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΦΛΟΙΟΥΣ, ΣΤΑ ΓΙΓΑΡΤΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΓΛΕΥΚΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ.....	47
2.7.1	Προετοιμασία δειγμάτων.....	47
2.7.1.1	Εκχύλιση φλοιών.....	47
2.7.1.2	Εκχύλιση γιγάρτων.....	48
2.7.1.3	Αραίωση.....	50
2.7.2	Μέτρηση ολικών ανθοκυανών και φαινολικών με την μέθοδο Pand.....	50
2.7.2.1	Αρχή της μεθόδου	50
2.7.2.2	Αντιδραστήρια.....	51
2.7.2.3	Προετοιμασία δειγμάτων.....	51

2.7.2.4	Διαδικασία μέτρησης.....	51
2.7.2.5	Υπολογισμοί ολικών ανθοκυανών και ολικών φαινολικών ενώσεων	52
2.7.2.5.1	Ολικές ανθοκυάνες.....	52
2.7.2.5.2	Ολικές φαινολικές ενώσεις.....	53
2.7.3	Μέτρηση συμπεκνωμένων ταννινών με methyl cellulose.....	53
2.7.3.1	Αρχή της μεθόδου	53
2.7.3.2	Αντιδραστήρια.....	54
2.7.3.3	Προετοιμασία δειγμάτων.....	54
2.7.3.4	Διαδικασία μέτρησης.....	55
2.7.3.5	Υπολογισμοί συμπεκνωμένων ταννινών με methyl cellulose.....	55
2.7.4	Μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων με τη μέθοδο του Χλωριούχου Αργιλίου (AlCl ₃).....	56
2.7.4.1	Αρχή της μεθόδου	56
2.7.4.2	Αντιδραστήρια.....	56
2.7.4.3	Προετοιμασία δειγμάτων.....	57
2.7.4.4	Διαδικασία μέτρησης.....	57
2.7.4.5	Υπολογισμοί ολικών φλαβονοειδών ενώσεων	57
2.7.5	Μέτρηση των ολικών φλαβονολών με τη μέθοδο της 4-DMACA	58
2.7.5.1	Αρχή της μεθόδου	58
2.7.5.2	Αντιδραστήρια.....	58
2.7.5.3	Προετοιμασία δειγμάτων.....	59
2.7.5.4	Διαδικασία μέτρησης.....	59
2.7.5.5	Υπολογισμοί ολικών φλαβονολών	59
2.7.6	Μέτρηση των ολικών φλαβονών και φλαβονολών με τη μέθοδο του AlCl ₃	60
2.7.6.1	Αρχή της μεθόδου	60
2.7.6.2	Αντιδραστήρια.....	60
2.7.6.3	Προετοιμασία δειγμάτων.....	60
2.7.6.4	Διαδικασία μέτρησης.....	60
2.7.6.5	Υπολογισμοί ολικών φλαβονών και φλαβονολών	61
2.8	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC) ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ.....	62
2.8.1	Αρχή λειτουργίας του οργάνου	62
2.8.2	Μέτρηση μεμονωμένων ανθοκυανών	63
2.8.2.1	Αντιδραστήρια κι εξοπλισμός για την HPLC.....	63
2.8.2.2	Προετοιμασία δειγμάτων.....	64
2.8.2.3	Διαδικασία μέτρησης.....	65
2.8.2.4	Υπολογισμός μεμονωμένων ανθοκυανών	65
2.8.3	Μέτρηση υπόλοιπων μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων.....	66
2.8.3.1	Αντιδραστήρια κι εξοπλισμός για την HPLC.....	66
2.8.3.2	Προετοιμασία δειγμάτων.....	67
2.8.3.3	Διαδικασία μέτρησης.....	68
2.8.3.4	Υπολογισμός μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων	71
2.9	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	72

3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
3.1	ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΡΑΓΑΣ & ΣΤΑΦΥΛΗΣ	73
3.2	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΓΛΕΥΚΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ	75
3.3	Μετρήση ολικών φαινολικών ενώσεων & ολικών φλαβονοειδών ενώσεων	77
3.4	Μετρήση μεμονωμένων & ολικών ανθοκυανών	80
3.5	Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών	83
3.6	Μετρηση μεμονωμένων & ολικών φλαβανολών	84
3.7	Μέτρηση μεμονωμένων και ολικών φλαβονών & φλαβονολών	87
3.8	Μέτρηση υδροξυβενζοϊκών οξέων	90
3.9	Μέτρηση υδροξυκιναμωμικών οξέων	92
3.10	Μέτρηση Στιλβενίων & φαινολικών Αλδεΐδων	96
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	98
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	106
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	108

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ

1.1.1 Τα μέρη της ράγας

1.1.1.1 Φλοιός

Ο φλοιός της ράγας αποτελείται από την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και την υποδερμίδα και αποτελεί το 5-12% του συνολικού βάρους της ράγας (1).

Η εφυμενίδα βρίσκεται στο εξωτερικό μέρος του φλοιού και καλύπτεται από κηρώδεις ουσίες. Οι ουσίες αυτές εμποδίζουν την απώλεια ύδατος, συντελούν στην ταχεία απομάκρυνση της βροχής και συγκρατούν τους διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μεταφέρονται από τον αέρα και οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ζύμωση του γλεύκους (2). Η κηρώδης αυτή ουσία παρεμποδίζει την είσοδο του νερού της βροχής μέσα στη ράγα, προφυλάσσει μερικώς τις ράγες από τις προσβολές των εντόμων, συμβάλλει στον περιορισμό των μηχανικών ζημιών και των εγκαυμάτων των ραγών από τον ήλιο και έχει ρόλο στην αντίσταση του φυτού στις μυκητολογικές ασθένειες. Συγκρατεί τους ζυμομύκητες και περιέχει συστατικά με μεγάλη θρεπτική αξία για αυτούς (3).

Η επιδερμίδα αποτελείται από πολυγωνικά κύτταρα που διατάσσονται σε μία στιβάδα. Το πάχος των επιδερμικών κυττάρων συσχετίζεται θετικά με την αντοχή στις καταπονήσεις και στις προσβολές από εχθρούς και ασθένειες (4).

Η υποδερμίδα βρίσκεται εσωτερικά της επιδερμίδας και αποτελείται από στοιβάδες κυττάρων (6-10), ο αριθμός των οποίων διαφέρει σε κάθε ποικιλία (4). Από τις στοιβάδες αυτές, οι 2-3 πρώτες περιέχουν τις ανθοκυάνες, χρωστικές στις οποίες οφείλεται το χρώμα των ερυθρών σταφυλιών (5).

1.1.1.2 Σάρκα

Το μεσοκάρπιο (σάρκα) αποτελείται από 25-30 στιβάδες κυττάρων. Τα κύτταρα της σάρκας έχουν μεγάλα χυμοτόπια και περιέχουν τον κυτταρικό χυμό που αναλογεί στο 65-90% του βάρους των ώριμων ραγών - ανάλογα με την ποικιλία - (4). Η σάρκα περιέχει νερό (65-80%), σάκχαρα (10-30%) οργανικά οξέα, ανόργανα

συστατικά, αζωτούχες ουσίες, πηκτινικές ουσίες, αρωματικές ουσίες και φαινολικές ενώσεις. Στις «βάφτρες» ποικιλίες υπάρχουν και χρωστικές ουσίες εντός της σάρκας (3). Στο μεσοκάρπιο διακρίνονται δύο επιμέρους ζώνες, η εξωτερική και η εσωτερική. Η πρώτη αποτελείται από μικρό αριθμό κυτταρικών στιβάδων με πολύ μεγάλα, επιμήκη, κατά την έννοια της ακτίνας, κύτταρα. Η δεύτερη στιβάδα έχει μικρότερα σχετικά κύτταρα, μάλλον ακανόνιστα, με παχύτερα τοιχώματα.

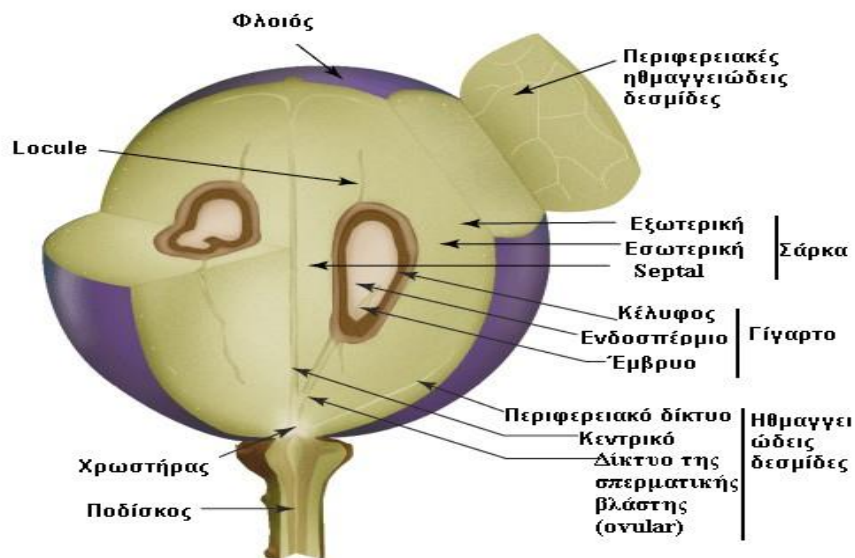
Το ενδοκάρπιο αποτελείται από την εσωτερική στιβάδα των κυττάρων της ζώνης του μεσοκαρπίου και διαχωρίζει τη σάρκα από τα γίγαρτα. Τα κύτταρα του ενδοκαρπίου είναι επιμήκη και διατάσσονται κάθετα προς την έννοια της ακτίνας της ράγας. Στην ώριμη ράγα η διάκριση του ενδοκαρπίου είναι δυσχερής (4).

1.1.1.3 Γίγαρτα

Τα γίγαρτα είναι τα όργανα αναπαραγωγής της αμπέλου. Προέρχονται από την γονιμοποίηση της σπερματικής βλάστης εντός του εμβρυοσακκού. Κάθε ράγα δύναται να περικλείει έως 4 γίγαρτα. Συνήθως απαντώνται 1-3, ενώ υπάρχουν και ράγες που δεν περικλείουν γίγαρτα. Ο αριθμός των γιγάρτων ανά ράγα επηρεάζεται από την ποικιλία και τις κλιματικές συνθήκες κατά την ανθοφορία. Οι περιπτώσεις στις οποίες έχουμε ανάπτυξη γιγάρτων ραγών ή ραγών με γίγαρτα τα οποία στερούνται εμβρύων οφείλονται στο φαινόμενο της εξερεθισμού παρθενοκαρπίας και στο φαινόμενο της στενοσπερμοκαρπίας, αντίστοιχα (4).

Τα γίγαρτα αποτελούν το 10% του βάρους των ραγών. Γενικά, είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά (ταννίνες και μονομερείς κατεχίνες) τα οποία συνεισφέρουν στις ταννίνες του κρασιού (5-8%). Επιπλέον περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ελαιωδών ουσιών (10%) και λιγότερες συγκεντρώσεις ρητινωδών συστατικών. Επίσης αποτελούν έδρα σχηματισμού φυτορρυθμιστικών ουσιών. Έχει σημειωθεί ότι οι εγγίγαρτες ποικιλίες περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις αζωτικών ουσιών και αμινοξέων σε σχέση με τις γίγαρτες. 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. Το γίγαρτο αποτελείται από τη

σάρκα, που προστατεύεται εξωτερικά από το κέλυφος ή επισπέρμιο και εμπεριέχει το έμβρυο (3).



Εικόνα1:Δομήτηςώριμηςράγας(Πηγή:Kennedy2002)

1.1.2 Ανάπτυξη και ωρίμανση των ραγών

Στιςεγγίγαρτεςποικιλίες,ορυθμόςανάπτυξηςτωνραγώνακολουθείμια διπλή σιγμοειδήκαμπύλη,δηλαδήορυθμός ανάπτυξηςτωνραγώνχωρίζεταισε τρειςφάσειςοιοποιείσκαθορίστηκανχρησιμοποιώντας ωςπαραμέτρους το βάρος,τηνδιάμετρο καιτομήκοςτωνραγών (6).Οιτρεις φάσειςπουπαρατηρούνται είναι οι εξής:

- ΣτάδιοI: περίοδοςταχύτατηςανάπτυξηςηοποίαχαρακτηρίζεταιαπόέντονη κυτταροδιαίρεση.
- ΣτάδιοII : περίοδοςεπίσχεσηςτουρυθμούανάπτυξης(lagphase)κατάτην οποίαμειώνεταιορυθμόςαύξησηςκαιανάπτυξηςτωνραγώνκαιαυξάνεταιο ρυθμόςανάπτυξηςτων γιγάρτων.
- ΣτάδιοIII : περίοδοςταχύτατηςανάπτυξηςόπουορυθμόςαύξησηςτωνραγών ακολουθεί ανοδική πορείαμέχριτην ωρίμανσηαυτών.

Στιςαγίγαρτεςποικιλίεςοιπαραπάνωφάσειςδενείναιευδιάκριτεςλόγωτης μικρήςδιάρκειαςτης φάσηςII (λόγω τηςαπουσίαςτων γιγάρτων) (7).

1.1.2.1 Στάδιο I – Στάδιο πράσινης ράγας

Το στάδιο I, της πρώτης ταχείας ανάπτυξης των γιγάρτων και του μεσοκαρπίου, διαρκεί 6-8 εβδομάδες περίπου, οφείλεται αρχικά στις έντονες κυτταροδιαϊρέσεις και στη συνέχεια στην αύξηση των διαστάσεων των κυττάρων (4). Οι ραγές είναι σφιχτές ενώ το χρώμα τους είναι πράσινο λόγω της παρουσίας της χλωροφύλλης (7). 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 ανάπτυξη 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 συσσώρευση οργανικών οξέων και έντονη αναπνευστική δραστηριότητα (8).

1.1.2.2 Στάδιο II – Περκασμός (γυάλισμα)

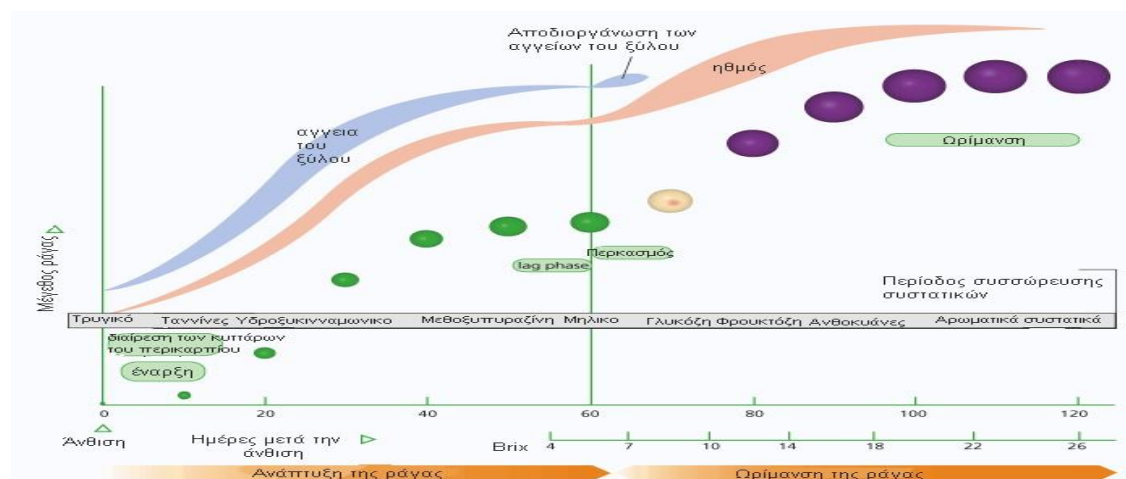
Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων παρεμποδιστών της αύξησης και μικρών συγκεντρώσεων υποκινητόν της αύξησης. Ξεκινάει 35-80 ημέρες μετά την άνθιση και διαρκεί 7-40 ημέρες. Η διάρκεια του ρυθμού επίσχεσης της ανάπτυξης των ραγών εξαρτάται από την ποικιλία (πρώιμη ή όψιμη,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

Κατά τη διάρκεια του σταδίου II 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 σκληρότητα της ενώ παράλληλα εμφανίζονται ιδιαίφορες χρωστικές επί του φλοιού. Η ράγα, στο στάδιο αυτό, λειτουργεί κυρίως ως αποθηκευτικό όργανο. Το πράσινο χρώμα των ραγών στις μενλευκές ποικιλίες περνάει στο κίτρινο, στις δε ερυθρές περνάει πρώτα στο ερυθρό ανοικτό και στη συνέχεια στο βαθύ ερυθρό. Αυτή η αλλαγή του χρώματος είναι πολύ απότομη, έτσι ώστε μια συγκεκριμένη ράγα να αλλάζει χρωματισμό σε διάστημα μίας ημέρας (2).

1.1.2.3 Στάδιο III – Στάδιο ωρίμανσης

Το στάδιο III διαρκεί 35-55 ημέρες και χαρακτηρίζεται από μια ταχεία αλλαγή της εμφάνισης και της δομής των ραγών(6). 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 (4).

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 (4).



Εικόνα 2: Η πορεία ανάπτυξης των ραγών. (Πηγή: Kennedy 2002).

1.2 ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ

1.2.1 Βιοσύνθεση και συγκέντρωση των αμινοξέων στην άμπελο

Το ριζικό σύστημα των πρέμων απορροφά το άζωτο από το εδαφικό διάλυμα με τη μορφή των νιτρικών ιόντων (NO_3^-) μέσω του φαινομένου της νιτροποίησης, της μετατροπής δηλαδή του κατιόντος αμμωνίου (NH_4^+) του εδάφους σε ιόντα NO_3^- με τη δράση των αζωτοβακτηρίων. Μετά την απορρόφησή τους από τη ρίζα, μέρος των NO_3^- ανάγεται σε νιτρώδη (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 NH_4^+ . Το αμμωνιακό άζωτο είτε χρησιμοποιείται επιτόπου 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 αμίδια. Το 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 (4).

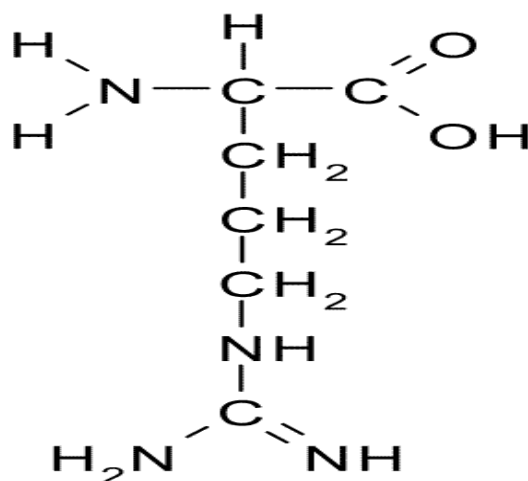
Κατά το στάδιο της πράσινης ράγας, η μεταφορά του N γίνεται τόσο από τα αγγεία του ξύλου όσο και του ηθμού, με τη μορφή είτε των νιτρικών είτε της γλουταμίνης, ενώ μετά την έναρξη ωρίμανσης γίνεται μόνο από τα αγγεία του ηθμού και κυρίως με τη μορφή της γλουταμίνης, η οποία, μόλις εισέλθει στη ράγα, 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 (9, 10, 11).

Από τα αμινοξέα το μεγαλύτερο ποσοστό καταλαμβάνουν η αλανίνη, η αργινίνη, το ασπαρτικό οξύ, το γ-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 (9).

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 (12).

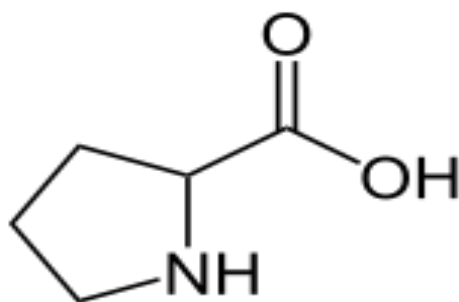
1.2.2 Η σύνθεση και ο ρόλος της αργινίνης και προλίνης στην άμπελο

Η αργινίνη στις ράγες θεωρείται ότι συντίθεται εξ' αρχής από NH_4^+ και δεν προϋπάρχει (13). Το NH_4^+ , το οποίο προέρχεται από την αναγωγή των νιτρικών ιόντων ενσωματώνεται, πρωτεύοντος, στο γλουταμικό οξύ με την βοήθεια του ενζύμου συνθετάση της γλουταμίνης προς σχηματισμό γλουταμίνης και δευτερευόντως στο α -κετογλουταρικό οξύ με τη δράση του ενζύμου γλουταμική αφυδρογονάση προς σχηματισμό του άλατος του γλουταμικού οξέος (12). 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 (14), μετατρέπεται σε κιτρουλλίνη, η οποία με τη σειρά της μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από τα ένζυμα συνθετάση και λύαση του αργινοηλεκτρικού οξέος(15), που δρουν μόνο στα φύλλα (16), μετατρέπεται σε αργινίνη (12, 17).



Εικόνα 3: Αργινίνη (πηγή Wikipedia)

Το αμινοξύ προλίνη συσσωρεύεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις ως αντίδραση σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως ξηρασία, αλατότητα, υψηλές θερμοκρασίες και υψηλή ένταση φωτός (18, 19, 20, 21, 22, 23). 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) (24). 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 ενδυνάμει δυναμικά κάτω από συνθήκες καταπόνησης και αποτελεί σημαντικό συστατικό των πρωτεϊνών στα κυτταρικά τοιχώματα.



Εικόνα 4: προλίνη(πηγή Wikipedia)

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 (αμπισικό οξύ) ή ανεξάρτητα από το ABA (25, 26, 27, 28, 29). 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 (30, 31).

Η προλίνη επίσης προστατεύει τις μεμβράνες από οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από υψηλή συγκέντρωση αλάτων (32, 33).

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 συγκέντρωση της ως απάντηση των πρέμων στην ξηρασία. Η υψηλή συγκέντρωση της προλίνης προσδίδει γλυκύτητα στο χυμό των

ώριμων ραγών, ενώ παράλληλα προστατεύει τα κύτταρα από ωσμωτική καταπόνηση που προκαλεί η αυξημένη συγκέντρωση των σακχάρων (34).

1.2.3 Ο ρόλος των αμινοξέων στο γλεύκος και τον οίνο

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 (35). Σε μούστους με χαμηλή περιεκτικότητα σε ολικό άζωτο παρατηρήθηκαν αργές ζυμώσεις, οι οποίες είχαν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ποιοτικά υποβαθμισμένου οίνου(36).

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 (37). 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 (35, 38).

1.3 ΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ

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 (7). Τα φαινολικά συστατικά της ράγας είναι είτε μονομερή είτε πολυμερή μόρια και βρίσκονται στο φλοιό, στα γίγαρτα και στη σάρκα. Η περιεκτικότητά τους στα σταφύλια εξαρτάται από την ποικιλία, επηρεάζεται όμως και από το περιβάλλον ανάπτυξης των πρέμνων, τις καλλιεργητικές τεχνικές και των στάδιο ωριμότητας των σταφυλιών (39).

Οι ενώσεις αυτές είναι υπεύθυνες για το χρώμα των σταφυλιών και κατά συνέπεια των οίνων, συμμετέχουν στη διαμόρφωση ορισμένων γευστικών

χαρακτηριστικών των οίνων όπως η στυφάδα και η τραχύτητα, προσφέρουν στους οίνους αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική προστασία και παίζουν σημαντικό ρόλο στην παλαίωση και στις διάφορες τεχνολογικές κατεργασίες των οίνων (5). Επιπλέον, συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των οίνων με βάση την παρουσία, την ένταση ή τις αναλογίες ορισμένων από αυτών (40).

Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες που επιδρούν θετικά στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού και είναι υπεύθυνες για το φαινόμενο του «Γαλλικού Παράδοξου» (41). Η διατροφή των Γάλλων αποτελεί παράδοξο, αφού με διατροφή υψηλή σε κορεσμένα λιπαρά, παρουσίαζαν χαμηλή θνησιμότητα από στεφανιαία καρδιακή νόσο. Το παράδοξο αυτό μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην υψηλή κατανάλωση ερυθρού οίνου (42), καθώς τα φαινολικά συστατικά που περιέχονται σε αυτόν παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες προστατεύοντας τον ανθρώπινο οργανισμό από καρδιαγγειακές ασθένειες (41).

1.3.1 Δομή και κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων της ράγας

Φαινόλες ονομάζονται τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων που περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια σε αντικατάσταση ισάριθμων υδρογόνων συνδεδεμένων με τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου (3). Επομένως το κοινό χαρακτηριστικό τους, είναι η παρουσία ενός αρωματικού δακτυλίου, με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες.

Οι φαινολικές ενώσεις διαιρούνται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των δακτυλίων φαινόλης που περιέχουν και τα δομικά στοιχεία που προσδένονται σε αυτούς τους δακτυλίους (43). Οι φαινολικές ενώσεις της ράγας χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τα διφαινυλπροπανοειδή (φλαβονοειδείς φαινόλες) και τις φαινυλπροπανοειδή (μη φλαβονοειδείς φαινόλες) (44).

Οι φλαβονοειδείς φαινόλες έχουν βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα (C₆-C₃-C₆) που είναι διατεταγμένοι σε τρεις δακτυλίους με σήμανση A, B και C (45), του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη (46). 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 (3). 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 (45). Στην κατηγορία αυτή υπάγονται κυρίως οι φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες (ή κατεχίνες) και οι ανθοκυάνες (47), καθώς και οι προανθοκυανιδίνες (ή προκυανιδίνες) που είναι ολιγομερή των φλαβανολών και οι ταννίνες που είναι πολυμερή των φλαβανολών.

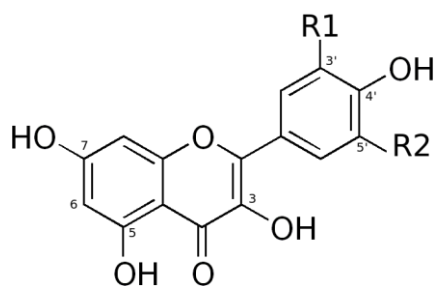
Οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες χαρακτηρίζονται από τον C6-C3 σκελετό (48) και απαρτίζονται από τα φαινολικά οξέα κι ειδικότερα τα παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος, των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ανθράκων του δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί με υδροξυλομάδες και μεθόξυ ομάδες, και τα στυλβένια (3). 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 το κρασί περιέχουν βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα. Οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται στα 100-200 g/L στους ερυθρούς οίνους και 10-20 g/L στους λευκούς (41).

1.3.1.1 Φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις

1.3.1.1.1 Φλαβόνες-Φλαβονόλες

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

Οι φλαβονόλες είναι κίτρινες χρωστικές ενώσεις και διαφοροποιούνται μεταξύ τους με βάση την διαφοροποίηση των υποκαταστατών του δακτυλίου C, σε κεμπφερόλη, κερκετίνη και μυρικετίνη (41). Μία ακόμα φλαβονόλη που συναντάται συχνά στις ράγες είναι ρουτίνη η οποία προκύπτει από ένωση της κερκετίνης με τον δισακχαρίτη ρουτινόζη (47, 49).



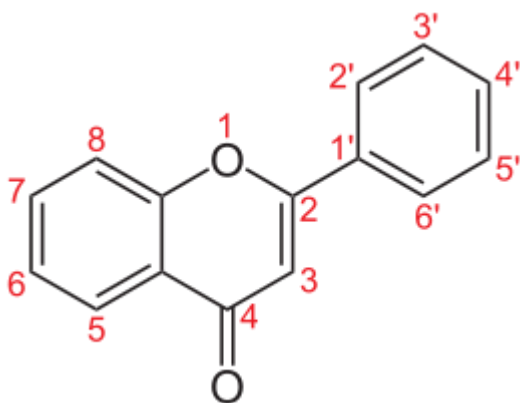
<i>R1</i>	<i>R2</i>	Φλαβονόλη
<i>H</i>	<i>H</i>	<i>Κεμπφερόλη</i>
<i>OH</i>	<i>H</i>	<i>Κερκετίνη</i>
<i>OH</i>	<i>OH</i>	<i>Μυρικετίνη</i>

Εικόνα 5: Το μόριο των φλαβονολών (πηγή WikimediaCommons)

Η περιεκτικότητα της ράγας σε κερκετίνη και μυρικετίνη εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την ποικιλία της αμπέλου (50), ενώ η κεμπφερόλη έχει πάντα μικρότερη περιεκτικότητα. Οι λευκές ποικιλίες αμπέλου περιέχουν ίχνη της μυρικετίνης (51). Κάθε ποικιλία παρουσιάζει χαρακτηριστική σύνθεση φλαβονολών (ποιοτικά και ποσοτικά), σε τέτοιο βαθμό που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση των ποικιλιών (52, 53). Σύμφωνα με τους Mattivi κ.ά. (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. Οι Rodriguez κ.ά. (2006) συμφωνούν ότι οι ερυθρές ποικιλίες περιέχουν περισσότερες φλαβονόλες, όμως κατέγραψαν υψηλότερες συγκεντρώσεις έως και 170 mg/kg ράγας για την ποικιλία Vioignier και 200mg/kg ράγας για το Shiraz.

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 (55). 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 (56).

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 (45). Η λουτεολίνη είναι η πιο κοινή φλαβονοειδής φαινόλη που περιέχεται στα φύλλα ελιάς, θυμαριού και σε άλλα φυτά (57). Σύμφωνα με τους Cheynier κ.ά. (1998) ο φλοιός της ράγας μεταξύ των άλλων φαινολικών ενώσεων περιέχει και φλαβόνες. Οι Wang και Huang (2004) προσδιόρισαν σε οίνους τις φλαβόνες λουτεολίνη και απιγενίνη με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) κι αυτή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης (CZE).

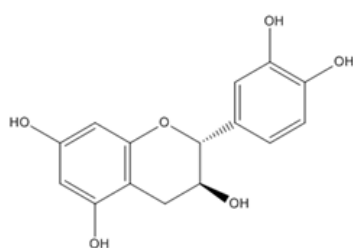


<i>Φλαβόνη</i>	<i>C3'</i>	<i>C4'</i>	<i>C5'</i>
<i>Απιγενίνη</i>	<i>H</i>	<i>OH</i>	<i>H</i>
<i>Λουτεολίνη</i>	<i>OH</i>	<i>OH</i>	<i>H</i>

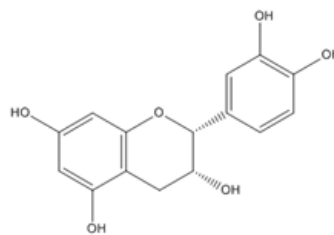
Εικόνα 6: Το μόριο των Φλαβονών (πηγή WikimediaCommons)

1.3.1.1.2 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 (60). 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 (61). Σε μικρότερο βαθμό απαντάται ο γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης [(-)-επικατεχίνη-3-gallate](61) και η γαλλοκατεχίνη (62).



Εικόνα 7: (+)-κατεχίνη



Εικόνα 8: (-)-επικατεχίνη

Οι ολιγομερείς και πολυμερείς ενώσεις των φλαβανολών αποκαλούνται προανθοκυανιδίνες (ή αλλιώς προκυανιδίνες) και 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. ΟΑ-τύπος προανθοκυανιδινών προκύπτει από την διπλή σύνδεση με δεσμούς C2-O-C7 ή C2-O-C5 συμπληρωματικά των δεσμών C4-C6 ή C4-C8 (55).

Το όνομα των ταννινών κατά μία εκδοχή πιθανολογείται ότι προέρχεται από την κελτική λέξη 'tan' που σημαίνει βελανιδιά, στα φύλλα της οποίας σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες των ουσιών αυτών (7), ενώ κατά μία άλλη οφείλεται στην ικανότητα τους να μαυρίζουν (47). 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 (55). Για να δώσουν σταθερές ενώσεις με τις πρωτεΐνες πρέπει να είναι ογκώδεις, αλλά όχι υπερβολικά διότι στην περίπτωση αυτή ενδέχεται να μη μπορούν

να ενωθούν με τις δραστικές θέσεις των πρωτεϊνών. Επίσης σταθερές ενώσεις μπορούν να δώσουν και με πολυσακχαρίτες (41).

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 (41). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες όταν θερμανθούν και υποστούν κατεργασία με ισχυρά οξέα υδρολύονται στις ερυθρές χρωστικές ανθοκυανιδίνες και γι' αυτό ονομάζονται προανθοκυανιδίνες από μερικούς ερευνητές (3,55). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αποτελούν ουσιαστικά το σώμα του οίνου. Αντιπροσωπεύουν το 30-60 % των ολικών φαινολικών παραγώγων και το ποσοστό τους αυξάνεται με την ηλικία του οίνου. Οι αλυσίδες τους σχηματίζουν ένα είδος σκελετού, στον οποίο προστίθενται και άλλα μόρια, όπως πολυσακχαρίτες, ανόργανα στοιχεία ή μόρια νερού (3).

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 (63).

1.3.1.1.2.1 Κατανομή των φλαβανολών-ταννινών στη ράγα

Περίπου τα δύο τρίτα της ποσότητας των κατεχινών και προκυανιδινών της σταφυλής συσσωρεύονται στα γίγαρτα (4). Σύμφωνα με τους Ribereau-Gayon κ.ά. (2006) από έρευνες που έγιναν σχετικά με την παρουσία των προκυανιδινών σε σταφύλια, διαπιστώθηκε ότι στα γίγαρτα υπήρχε η μεγαλύτερη περιεκτικότητα και κατά μέσο όρο αγγίζει το 56%. 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 μικρότερος του 10 κι ότι απαρτίζονται κυρίως από την (+)-κατεχίνη και την (-)-επικατεχίνη και λιγότερο από τον γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης (64, 65, 66). Ως

προς τις διμερείς προανθοκυανιδίνες, οι DiStefano και Flamini (2008) αναφέρουν ότι κυριαρχούν αυτές του τύπου B.

Στους φλοιούς κυριαρχούν οι πολυμερείς ενώσεις των φλαβονολών έναντι των ολιγομερών, ενώ οι μονομερείς κατεχίνες είναι ελάχιστες (67). Ανάμεσα στις προανθοκυανιδίνες του φλοιού κυρίαρχες είναι η (-)-επικατεχίνη και η (-)-επιγαλλοκατεχίνη (4, 66, 68) συγκριτικά με τογαλλικό εστέρα της επικατεχίνης και την (+)-κατεχίνη (66, 68), ενώ βρέθηκαν μικρές ποσότητες (+)-γαλλοκατεχίνης (65). Η αναλογία (-)-επιγαλλοκατεχίνης με την (-)-επικατεχίνη στους φλοιούς φαίνεται να εξαρτάται από την ποικιλία της αμπέλου (39). Επίσης, οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών διαφέρουν από εκείνες των γιγάρτων διότι έχουν χαμηλότερο ποσοστό γαλλικών εστέρων (69). Η σύνθεση και ο βαθμός πολυμερισμού των προανθοκυανιδινών συνδέονται άμεσα με την ένταση της πικρής γεύσης και την αίσθηση της στυφάδας (70).

Ως προς την σάρκα των ραγών των ποικιλιών της ευρωπαϊκής αμπέλου οι κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες απαντώνται μόνο σε ίχνη (4), όμως αποτελούν και τις κύριες πολυφαινόλες της σάρκας (39). Αντίθετα, στις «βαφικές ποικιλίες» η συγκέντρωση των παραπάνω ουσιών στα κύτταρα της σάρκας ανέρχεται περίπου στο 11% ή και περισσότερο (4).

1.3.1.1.2.2 Ο ρόλος κι εξέλιξη των φλαβονολών κατά την ωρίμανση

Εξαιτίας της στυπτικότητας τους οι κατεχίνες κι οι υπόλοιπες φλαβονόλες προσδίδουν αμυντικές ιδιότητες στα φυτά έναντι των επιβλαβών εντόμων (71) αλλά και πιθανών προσβολών από παθογόνους μύκητες (7). Στους φλοιούς των ραγών θεωρείται ότι προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία.

Η σύνθεση των φλαβονολών εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης, τις συνθήκες ανάπτυξης και διάφορους γενετικούς παράγοντες (65, 72). Έρευνες έχουν δείξει ότι ο γονότυπος της ποικιλίας επιδρά στη σύνθεση των προανθοκυανιδινών και στο βαθμό πολυμερισμού (mDP) των φλοιών και των γιγάρτων (73).

Η έκφραση των γονιδίων που επάγουν τη βιοσύνθεση των συμπτυκνωμένων ταννινών στα γίγαρτα γίνεται αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και την καρπόδεση. Ο σχηματισμός των φλαβονολών έχει αυξητική πορεία μέχρι και λίγο χρόνο μετά το γυάλισμα (74). Έπειτα, η συγκέντρωση των μονομερών φλαβονολών μειώνεται απότομα (65,75), ενώ παρατηρείται μικρή συσσώρευση ολιγομερών προανθοκυανιδινών (75). Κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των γιγάρτων αυξάνει ο

πολυμερισμός κι η οξείδωση των ταννινών, και προσδίδουν στα γίγαρτα το κίτρινο-καστανό χρώμα (74). Οι Romeyerk.ά. (1986) χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), μελέτησαν τις μεταβολές στα επίπεδα της κατεχίνης, επικατεχίνης, και διμερή προκυανιδίνης σε γίγαρτα σταφυλιού τεσσάρων ποικιλιών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Η κατεχίνη και επικατεχίνη έδειξαν κορυφές κοντά στον περκασμό, και τα διμερή προανθοκυανιδίνης παρουσίασαν αύξηση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των γιγάρτων.

Στους φλοιούς, η σύνθεση των φλαβονολών γίνεται -κυρίως- μερικές βδομάδες μετά την άνθιση (65, 72). Η συσσώρευση των προανθοκυανιδινών φαίνεται ότι ολοκληρώνεται πριν το γυάλισμα (76) και στη συνέχεια η συγκέντρωσή τους μειώνεται (65). 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 (76). Τέλος, σύμφωνα με τους Kennedy κ.ά. (2000) μετά τον περκασμό έχουμε αύξηση του πολυμερισμού των προανθοκυανιδινών και του μέσου μοριακού βάρους τους.

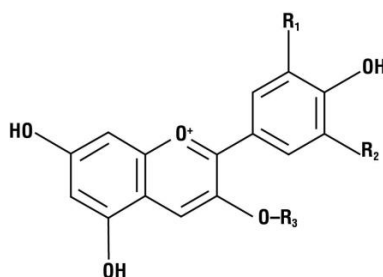
1.3.1.1.2.3 Οι ταννίνες στον οίνο

Οι φλαβανόλες είναι τα κυριότερα φαινολικά συστατικά στους ερυθρούς οίνους κι η περιεκτικότητά τους μπορεί να φτάνει σε χιλιάδες mg/L (77). Συνεισφέρουν στη γεύση -προσδίδουν πικράδα-, στην αίσθηση της στυπτικότητας κι εμπλέκονται στο οξειδωτικό καφέτιασμα, στο θόλωμα και στο ίζημα που μπορεί να αναπτυχθεί στους ερυθρούς οίνους (55). Παρόλο που ο φυσικοχημικός μηχανισμός της αίσθησης της στυπτικότητας δεν έχει πλήρως διερευνηθεί, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η αίσθηση της στυπτικότητας προέρχεται από την αλληλεπίδραση των ταννινών με τις πρωτεΐνες του σάλιου με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκου ταννίνης-πρωτεΐνης στη στοματική κοιλότητα (78, 79). Η αίσθηση της στυπτικότητας των ταννινών γίνεται εντονότερη όσο αυξάνεται ο πολυμερισμός τους και ο βαθμός εστεροποίησης τους με το γαλλικό οξύ (80). Όμως 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 (81).

Οι ταννίνες επιδρούν και στο χρώμα των ερυθρών οίνων μέσω του φαινομένου του «συγκρωματισμού» με τις ανθοκυάνες. Μέσω του φαινομένου αυτού προσδίδουν σταθερότητα στο χρώμα του οίνου κατά την διάρκεια της παλαίωσης των οίνων (82).

1.3.1.1.3 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες αποτελούν ίσως τη σημαντικότερη κατηγορία των φαινολικών συστατικών της σταφυλής, καθώς είναι οι ερυθρές χρωστικές στις οποίες οφείλουν το πορφυρό, ερυθρό, πορτοκαλί, κυανό ή ιώδες χρώμα τους (3). Τα σταφύλια περιέχουν 30-750 mg/100gr (41). Στη ράγα τις εντοπίζουμε στο φλοιό. Εξαιρέση αποτελούν οι «βαφικές» ποικιλίες στις οποίες ανθοκυάνες εντοπίζονται και στη σάρκα.



<i>R₁</i>	<i>R₂</i>	<i>Ανθοκυανιδίνη</i>
<i>OH</i>	<i>H</i>	<i>Κυανιδίνη</i>
<i>OH</i>	<i>OH</i>	<i>Δελφινιδίνη</i>
<i>OCH₃</i>	<i>H</i>	<i>Παιονιδίνη</i>
<i>OH</i>	<i>OCH₃</i>	<i>Πετουνιδίνη</i>
<i>OCH₃</i>	<i>OCH₃</i>	<i>Μαλβιδίνη</i>

<i>R₃</i>	<i>Μορφή</i>
<i>H</i>	<i>Ανθοκυανιδίνη</i>
<i>Γλυκόζη</i>	<i>3-Ο-μονογλυκοζίτης</i>
<i>Γλυκόζη + Οξύ</i>	<i>3-Ο-ακυλομονογλυκοζίτης</i>

Εικόνα 9: Η δομή των ανθοκυανιδινών κι οι μορφές των ανθοκυανών (πηγή:

ACSchemistryoflife)

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' (3, 83). Οι κυριότερες ανθοκυανιδίνες που έχουν εντοπισθεί στην άμπελο είναι οι δελφινιδίνη, κυανιδίνη, πετουινιδίνη, πεονιδίνη και μαλβιδίνη. Οι διαφορές μεταξύ τους περιορίζονται στον αριθμό των -OH και -OCH₃ των θέσεων R1 και R2, ο οποίος επηρεάζει τη σταθερότητα και το χρώμα της ανθοκυανίνης (3). Με την αύξηση των ελεύθερων υδροξυλομάδων αυξάνεται το μπλε χρώμα, ενώ το κόκκινο ενισχύεται ανάλογα με την αύξηση του βαθμού μεθυλίωσης (48). Από τις ανθοκυανιδίνες των σταφυλιών και των οίνων η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη είναι οι πιο ασταθής, λόγω των φαινολικών -OH σε ο-θέση. Αυτές οι δύο είναι και οι πρόδρομοι ανθοκυανιδινών σταθερότερων μορφών, όπως η παιονιδίνη και η μαλβιδίνη, που δεν έχουν -OH σε ο-θέση (3, 48).

Οι ανθοκυανίνες που έχουν ταυτοποιηθεί στο φλοιό των σταφυλών και στους οίνους του είδους *Vitisvinifera* είναι οι 3-O-μονογλυκοζίτες και οι 3-O-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 (71). Οι Alcalde-Eon κ.ά. (2006) αναφέρουν την ύπαρξη ακυλιομένου μορίου ανθοκυανίνης με γαλακτικό οξύ σε οίνο που προήλθε από σταφυλές του είδους *Vitisvinifera*. Η χρήση αναλυτικών τεχνικών επιβεβαίωσε και την ύπαρξη 3,5-διγλυκοζιτών των ανθοκυανιδινών στους φλοιούς των ραγών ακόμα και σε ποικιλίες *Vitisvinifera* (85,86, 87), καθώς μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι οι ανθοκυανίνες με μορφή διγλυκοζίτη υπάρχουν μόνο στα «άγρια» είδη του γένους *Vitis*.

Οι Vidal κ.ά. (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 (88,89,90). 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 ακυλιομένων ανθοκυανών καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από την ποικιλία και για παράδειγμα μπορεί να απουσιάζουν τελείως από ορισμένες ποικιλίες όπως το Pinot noir(41). Η αναλογία των ανθοκυανιδινών, η αναλογία των διαφόρων μορφών των ανθοκυανών, η περιεκτικότητα της κάθε μίας αλλά και του συνόλου τους είναι χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ταξινομικά κριτήρια των ποικιλιών (91,92).

1.3.1.1.3.1 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 (93). 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 (94).

Η σύνθεση των ανθοκυανών εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και ακολουθεί η συσσώρευση τους στο χυμοτόπιο των κυττάρων του φλοιού των ερυθρών ποικιλιών αμπέλου. Η πρώτη ανθοκυανή που σχηματίζεται στους φλοιούς των ερυθρών σταφυλιών είναι η κυανιδίνη, κατά τον περκασμό της ράγας. Στην αρχή αυξάνεται η συγκέντρωσή της στη συνέχεια όμως, λόγω της ασταθούς δομής μετασχηματίζεται ταχέως μέσω ενζυμικών αντιδράσεων στις ανθοκυάνες της δελφινιδίνης και της πετουνιδίνης, οι οποίες με τη σειρά τους ως ασταθείς ενώσεις, μετατρέπονται τελικά στην ανθοκυανή 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 οινολιγικές 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 (4).

Υποστηρίζεται ότι η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την σύνθεση των ανθοκυανών ενισχύεται από την παρουσία του ABA, ενώ παρεμποδίζεται από συνθήκες σκίασης (95). 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 (96). 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 (4).

1.3.1.1.3.2 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) (97). 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 Σουφλερός(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 οξείδωση των ανθοκυανών, αντιδρασή τους με τον θειώδη ανυδρίτη που προστίθεται στους οίνους αλλά και με ένωση τους με άλλες φαινολικές ενώσεις όπως οι ταννίνες.

1.3.1.2 Μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις

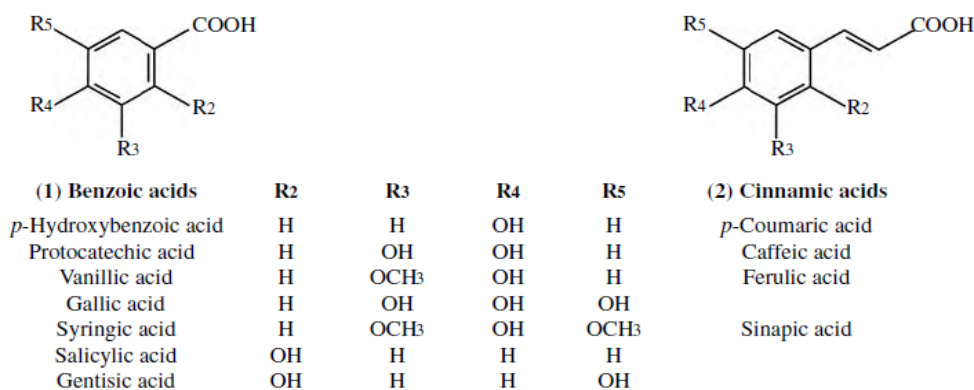
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες που έχουν βρεθεί στα σταφύλια της αμπέλου είναι τα φαινολικά οξέα και ειδικότερα τα παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος, των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ανθράκων του δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί με υδροξυλομάδες και μεθόξυ ομάδες, και τα στιλβένια (3). Τις ενώσεις αυτές τις εντοπίζουμε και στους οίνους λόγω της εκχύλισης τους από τους φλοιούς και τη σάρκα των σταφυλιών, αλλά και από το ξύλο των βαρελιών, όπου γίνεται η παλαίωση (41).

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 (98).

1.3.1.2.1 Φαινολικά οξέα

Η συγκέντρωση των φαινολοξέων 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 (4). 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 (2).

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 (99). 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(41).



Εικόνα 10: Φαινολικά οξέα (Πηγή:Handbook of Enology)

1.3.1.2.1.1 Υδροξυβενζοϊκά οξέα

Η δομή των υδροξυβενζοϊκών 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*-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ το συρινγικό οξύ, το σαλικυλικό οξύ και το βανιλικό οξύ (99, 100). Η διαφοροποίηση μεταξύ τους οφείλεται στους διαφορετικούς υποκατάστατες που έχει ο βενζοϊκός δακτύλιος.

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 (61, 63). 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. (99, 100). Το γαλλικό οξύ είναι αυτό που βρίσκεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (98), ενώ το σαλικυλικό και το γεντισικό οξύ βρίσκονται σε ίχνη (41).

Η περιεκτικότητα των υδροξυβενζοϊκών οξέων στους οίνους παρουσιάζει μεγάλη παραλλακτικότητα καθώς εξαρτάται από την ποικιλία και τις συνθήκες ανάπτυξης του πρέμνου (98).

1.3.1.2.1.2 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 transμορφή τους. Οι trans μορφή, όμως, είναι πιο σταθερή και για αυτό απαντάται συχνότερα (41).

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 (41).
- και εστέρων του τρυγικού οξέος με το καφεϊκό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ (41, 61). Τα εστεροποιημένα οξέα που προκύπτουν από αυτή την ένωση είναι το καφταρικό (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 (101, 102).

Στις ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου οι διαφορές των υδροξυκιναμωμικών οξέων στον χυμό της ράγας είναι κυρίως ποσοτικές. Το καφταρικό οξύ κυριαρχεί ποσοτικά έναντι του κουταρικού και φερταρικού οξέος (39), καθώς η περιεκτικότητα του μπορεί να φτάνει έως και 50% της συνολικής περιεκτικότητας των υδροξυκιναμωμικών οξέων (102). Παρομοίως, στο φλοιό της ράγας κυριαρχεί το καφταρικό οξύ, αλλά και το κουταρικό, ενώ το φερταρικό οξύ απαντάται σε μικρές ποσότητες (39). Η περιεκτικότητα των παραγώγων των υδροξυκιναμωμικών οξέων καθορίζονται από αρκετούς παράγοντες όπως η καλλιεργούμενη ποικιλία, οι κλιματικές συνθήκες κ.α (98). Οι εστέρες αυτοί είναι ιδιαίτερα ευοξειδωτά συστατικά του γλεύκους και ευθύνονται για το καφέτιασμα των λευκών γλευκών (41).

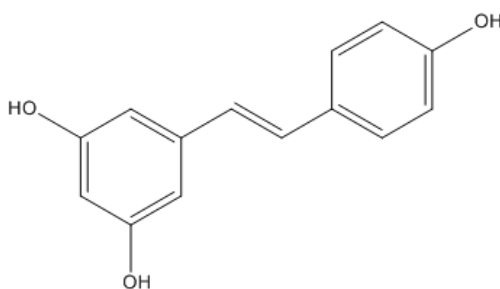
1.3.1.2.2 Στιλβένια

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 (103). Υπάρχουν σε διάφορα είδη φυτών, όμως τα σταφύλια και ο οίνος θεωρούνται η σημαντικότερη πηγή στιλβενίων για τη διατροφή

του ανθρώπου (104), στην οποία μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς έχουν αντιοξειδωτικές κι αντικαρκινικές ιδιότητες (105).

Τα στυλβένια ανήκουν στην ομάδα των φυτοαλεξινών οι οποίες αποτελούν μηχανισμό ανοχής των φυτών σε ασθένειες, κυρίως μυκητολογικές και λιγότερο βακτηριολογικές (106). Εκτός από τις μυκητολογικές και βακτηριολογικές προσβολές, η περιεκτικότητα των στυλβενίων στις ράγες εξαρτάται από διάφορους άλλους παράγοντες όπως οι κλιματικές συνθήκες, η καλλιεργούμενη ποικιλία (107, 108), η UV ακτινοβολία και η ύπαρξη ιόντων βαρέων μετάλλων (109). Η συγκέντρωση των φυτοαλεξινών μειώνεται μετά την έναρξη της ωρίμανσης, καθώς αυξάνει η συγκέντρωση των ανθοκυανών (4). Αναφέρεται σχετικά ότι σε ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου υπάρχει πολύ μικρός βαθμός συσχέτισης της περιεκτικότητας των ολικών ανθοκυανών με τις φυτοαλεξίνες (110).

Η ρεσβερατρόλη ή αλλιώς το 3,5,4'-τριυδροξυστυλβένιο 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 πρέμνων, όπως, για παράδειγμα, σε προσβολές από διάφορα παθογόνα (κυρίως *Botrytis cinerea*) ή στην έντονη ξηρασία (4). 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* (98).



Εικόνα 11: Ρεσβερατρόλη

Οι oligομερείς και πολυμερείς ενώσεις των στυλβενίων αποκαλούνται βινιφερίνες και προκύπτουν από οξειδωτικό πολυμερισμό της μονομερούς ρεσβερατρόλης μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (111). Στα σταφύλια και στου οίνους έχουν ταυτοποιηθεί διάφορες πολυμερείς ενώσεις των στυλβενίων.

Τέτοιες είναι τα δύο διυδροδιμερή της ρεσβερατρόλης ε-βινιφερίνη (112) και δ-βινιφερίνη (113), η παλλιδόλη που είναι διμερής ένωση της ρεσβερατρόλης (114), η α-βινιφερίνη που είναι τριμερής ένωση της ρεσβερατρόλης (115) και η τετραμερής της ένωση *hocephanol* (104).

1.3.2 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 (140).

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-Ρ-ερυθρόζης, που είναι ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου της Ρ-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 (6).

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 (116). Σε αυτά τα μεταβολικά μονοπάτια, η αμμωνιακή λύαση της φαινυλαλανίνης (PAL) είναι το ένζυμο που εξαλείφοντας τις NH₃ 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 περκασμού (6). Υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της PAL και στην ένταση του χρώματος της ράγας (117).

Η πρώτη φλαβονοειδής φαινόλη που παράγεται είναι η χαλκόνη και το ένζυμο που εμπλέκεται είναι η συνθάση της χαλκόνης (CHS) (116). 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 (6).

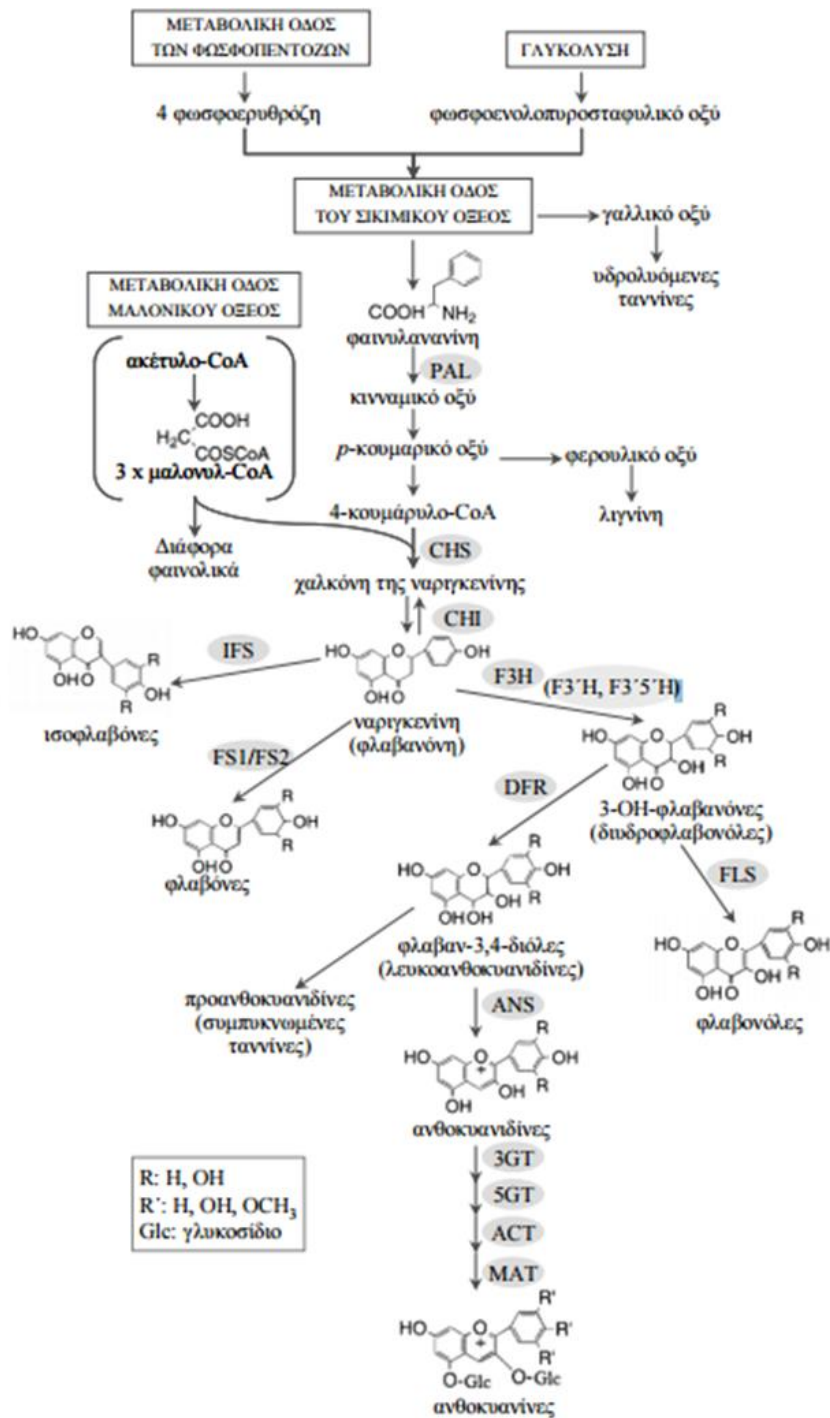
Στη συνέχεια οι χαλκόνες μέσω της δράσης της ισομεράσης της χαλκόνης (CHI) -που καταλύει το κλείσιμο του δακτυλίου- μετατρέπονται σε φλαβανόνες(118). Αυτό το στάδιο μπορεί να συμβεί και αυθόρμητα αλλά με πιο αργό ρυθμό από όταν καταλύεται από το ένζυμο CHI (119) . Στη συνέχεια, μέσω της δράσης της 3-υδροξυλάσης της φλαβανόνης (F3H) έχουμε υδροξυλίωση της φλαβανόνης προς σχηματισμό διυδροφλαβονόλης (120). Από τις διυδροφλαβονόλες μπορούν να προκύψουν:

- Φλαβονόλες (116)
- Λευκοανθοκυανιδίνες μέσω της δράσης του ενζύμου διυδροφλαβονόλη 4-ρεδουκτάση (DFR) (121).

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

- Είτε συμπυκνωμένων ταννινών,
- Είτε ανθοκυανιδινών (116).

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 (6).



Εικόνα 12: Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των φαινολικών ενώσεων (Πηγή: <http://nemertes.lis.upatras.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(122). Εάν αυτό μπορεί να συμβαίνει *in vivo*, 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 (116). 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 (123).

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 (124) 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 (116).

Άλλες τροποποιήσεις των ανθοκυανών περιλαμβάνουν μεθυλίωση, ακυλίωση και γλυκοζυλίωση (116). 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:

- στη θέση 3' του Β-δακτυλίου της κυανιδίνης για να παραχθεί πεονιδίνη,
- στη θέση 3' του Β-δακτυλίου της δελφινιδίνης προς παραγωγή πετουνιδίνης,
- στη θέση 3' και 5' του Β-δακτυλίου της δελφινιδίνης προς παραγωγή μαλβιδίνης (116).

Η ακυλίωση των ανθοκυανών στα σταφύλια γίνεται με την προσθήκη μιας αλειφατικής ομάδας ακέτυλου ή μιας ομάδας αρωματικού p-κουμαρόνυλ (ή περιστασιακά καφεόυλ) στη θέση C6 του 3-O-γλυκοζίτη(125). Φαίνεται ότι αυτές οι τροποποιήσεις αυξάνουν την σταθερότητα του μορίου της ανθοκυάνης κι αλλάζουν την διαλυτότητα τους στο νερό (126).

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 (127). Αυτό πιθανά να συμβαίνει γιατί οι ανθοκυάνες είναι τοξικές στο κυτταρόπλασμα (116). Ενώ η δεύτερη υποδεικνύει ότι το ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) δρα ως πρωτεΐνη μεταφορέας στην οποία προσδέονται οι ανθοκυάνες και τις συνοδεύει στον κατάλληλο μεταφορέα για μεταφορά στο χυμοτόπιο (128).

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 (6).

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 (129).

1.3.3 Παράγοντες που επιδρούν στη βιοσύνθεση και στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων

1.3.3.1 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 Bossk.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 (131). Το ανθοκυανικό και προανθοκυανιδινικό προφίλ χρησιμοποιείται στη διάκριση των ποικιλιών (132).

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 (33).

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 (3).

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 (134, 135, 136), ενώ σε άλλες δεν επιβεβαιώνεται (137, 138). Όπως και για τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις, οι ερυθρές ποικιλίες έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα στιλβενίων από με τις λευκές (139). 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) (139). Οι Lik 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.

1.3.3.2 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 Jogaiahκ.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.

1.3.3.3 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 (143). 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 (4).

Οι φλαβονόλες προστατεύουν τις ράγες έναντι της UVακτινοβολίας (144). Σύμφωνα με τους Priceκ.ά. (1995) τα επίπεδα των φλαβονολών κι ειδικά της κερκετίνης παρουσίασαν σημαντική αύξηση σε ράγες της ποικιλίας Pinotnoir έπειτα από έκθεση τους στον ήλιο. Η σκίαση της σταφυλής επέδρασε αρνητικά στη συσσώρευση φλαβονολών στις ποικιλίες Merlot (146) και Syrah (147), ενώ η θερμοκρασία λίγο έως καθόλου. Αυτό υποδεικνύει ότι 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 (146,

147, 148). 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 (147, 148).

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 (4). 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 (7).

Ειδικότερα ως προς τι ανθοκυάνες, η συγκέντρωσή 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 (143, 6). Οι Mori κ.ά. (2005) μελετήσαν την επίδραση διάφορων θερμοκρασιών νύχτας στο μεταβολικό μονοπάτι των ανθοκυανών. Βρήκαν ότι οι υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της νύχτας οδήγησαν σε μείωση της συσσώρευσης τους στην επιτραπέζια ποικιλία Darkridge.

Προς επιβεβαίωση των παραπάνω, οι Yamanek κ.ά. (2006) μελετήσαν την έκφραση των δομικών γονιδίων των ανθοκυανών και το γονίδιο VvMYBA1 στην επιτραπέζια ποικιλία AkiQueen εκθέτοντας τη σε διαφορετικές θερμοκρασίες κατά την ανάπτυξη των πρέμων. Σε αυτά τα πειράματα οι συγγραφείς εξέθεσαν πρέμνα τα οποία αναπτύσσονταν σε γλάστρες σε θερμοκρασίες 20°C ή 30°C, 24 ώρες την ημέρα για δύο εβδομάδες σε τέσσερα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Οι μόνες επεμβάσεις που έδειξαν σημαντική διαφορά στα επίπεδα ανθοκυανών στις ράγες κατά τον τρύγο είναι αυτές που διεξήχθησαν αμέσως μετά τον περκασμό. Η επέμβαση των 20°C είχε σημαντικά περισσότερες ανθοκυάνες από το μάρτυρα κι η επέμβαση των 30°C είχε σημαντικά λιγότερες ανθοκυάνες από τον μάρτυρα (96). Η έκφραση των δομικών γονιδίων στο μεταβολικό μονοπάτι των ανθοκυανών ήταν υψηλότερη στα δείγματα που είχαν εκτεθεί στους 20°C παρά στους φλοιούς των ραγών από τα πρέμνα που

είχαν εκτεθεί στην υψηλότερη θερμοκρασία. Παρόλα αυτά, τα δείγματα που είχαν εκτεθεί στους 30°C συνέχιζαν να συσσωρεύουν ανιχνεύσιμες ποσότητες mRNA από τα γονίδια του μεταβολικού μονοπατιού των ανθοκυανών, παρόλο που υπήρχε σχεδόν καθολική αναστολή της συσσώρευσης ανθοκυανών. Αυτό οδήγησε τους συγγραφείς στην υπόθεση ότι η μείωση των ανθοκυανών μπορεί να οφείλεται στην αναστολή των ενζύμων, στην απώλεια ή μείωση του υποστρώματος παρά στη μεταγραφική ικανότητα (96).

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 αύξησαν την ποσότητα των προανθοκυανιδινών αλλά δεν είχαν επίδραση στον μέσο βαθμό πολυμερισμού τους (mDP). Αντιθέτως, οι δροσερές θερμοκρασίες ημέρας και η μείωση της διακύμανσης της ημερήσιας θερμοκρασίας μείωσαν την περιεκτικότητα των προανθοκυανιδινών. 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 καλλιεργούνταν 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 (151).

1.3.3.4 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 (7). 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 (76).

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 (152).

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 (7). ΟιCastellarink.ά. (2007) μελέτησαν την επίδραση της μειωμένης άρδευσης, τέτοιας που να προκαλέσει υδατική καταπόνηση, σε πρέμνα της ποικιλίας Merlot και συγκρίναν τη βιοσύνθεση των ανθοκυανών στα πρέμνα των επεμβάσεων και σε αυτά του μάρτυρα για δύο χρονιές. Και στις δύο χρονιές τα αμπέλια που είχαν υποβληθεί σε υδατική καταπόνηση είχαν σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά ανθοκυανών στους φλοιούς των σταφυλιών σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι η υδατική καταπόνηση είχε επίδραση και στο είδος των ανθοκυανιδινών που βιοσυντίθονταν. Το ένζυμο F3'5'H εκφραζόταν σε μεγαλύτερο βαθμό στα πρέμνα υπό υδατικό στρες, κι αυτό αντανακλούνταν σε μια αύξηση των τρι-υδροξυλιομένων ανθοκυανών (δελφινιδίνη). Στο δεύτερο έτος της μελέτης, η συσσώρευση των μεθυλιομένων ανθοκυανών (πετουνιδίνη, παιονιδίνη, μαλβιδίνη) αυξήθηκε περισσότερο στα σταφύλια από τα πρέμνα που είχαν υποστεί υδατική καταπόνηση και αυτό σχετιζόταν με μια αύξηση στην έκφραση ενός MT γονιδίου που φέρεται να εμπλέκεται στη μετατροπή των ανθοκυανών (153).

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 (154, 155). Εφαρμογή υπερβολικής άρδευσης λίγο πριν τον τρυγητό οδηγεί σε αραίωση των διαλυτών συστατικών (σάκχαρα, οξέα, ταννίνες, ανθοκυάνες) και σε σχίσσιμο του φλοιού της ράγας (156).

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 (116).

1.3.3.5 Λίπανση

Με τη λίπανση εμπλουτίζεται το έδαφος με θρεπτικά στοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξη και παραγωγή των πρέμνων. Η επάρκεια σε θρεπτικά συστατικά ευνοεί τη σύνθεση των φαινολικών συστατικών στη ράγα (157, 158). 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 (143). Για παράδειγμα, σύμφωνα με τον Ribereau-Gayon κ.ά. (2006) η ετήσια αζωτούχος λίπανση δεν πρέπει να ξεπερνά τα 30 kg/ha, που είναι επαρκής για την κάλυψη των αναγκών των φυτών. Πάνω από αυτή την ποσότητα, το άζωτο ασκεί μια αξιοσημείωτη επίδραση στη ζωηρότητα του πρέμνου, και η υπερβολική ανάπτυξη της βλάστησης σταματά την πρόοδο της ωρίμανσης. Σε αυτή την περίπτωση, η σοδιά είναι πλούσια, αλλά η συγκέντρωση των σακχάρων και των φαινολικών ενώσεων είναι χαμηλή και τα σταφύλια είναι πλούσια από οξέα και ενώσεις σε ενώσεις αζώτου.

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 πραγματοποίησαν 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.

1.3.3.6 Καλλιεργητικές τεχνικές

Το ετήσιο χειμερινό κλάδευμα καρποφορίας καθορίζει το φορτίο του πρέμνου και προσδιορίζει τη σχέση βλάστησης προς καρποφορία. 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, αξιοποιεί 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 (4).

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 (7).

Όσον αφορά τη φυτοπροστασία, επεμβάσεις ψεκάσμου με χαλκό εναντίον μυκητολογικών προσβολών αυξήσαν τα επίπεδα των στιλβενίων στα σταφύλια και στους οίνους σε σύγκριση με αγέκαστα φυτά (162).

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ

Μελετήθηκαν επτά (7) 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 ποικιλίες: Κολλινιατικό Μαύρο, Μπεκάρι, Μπακούρι, Κουντούρα Μαύρη, Δουμπραίνα Μαύρη, Θράψα, Μαύρο Σπετσών. Οι ποικιλίες ήταν εμβολιασμένες σε υποκείμενο 110 Richter. Σύμφωνα με τον Κριμπάς(1943) το Κολλινιατικό Μαύρο καλλιεργείται στους νομούς Μεσσηνίας και Αρκαδίας και η προέλευση του είναι από την κοινότητα Κολλίνες Αρκαδίας. Η ποικιλία Μπεκάρι καλλιεργείται στο νομό Ιωαννίνων και ιδιαίτερα στη περιοχή της Ζίτσας. Οι ποικιλίες Κουντούρα Μαύρη και Δουμπραίνα Μαύρη αναφέρονται ως συνώνυμες της Μανδηλαριάς (164, 165). Η Κουντούρα Μαύρη έχει ως κέντρο καλλιέργειας τον νομό Εύβοιας και η Δουμπραίνα Μαύρη το νομό Αττικής (165). Η Νεοφύτου(2005) σε αμπελογραφική μελέτη που πραγματοποίησε βρήκε ότι το Μαύρο Σπετσών έχει μικρό δείκτη ανομοιότητας ($d=1,03$) με την Μανδηλαριά.

2.2 ΑΜΠΕΛΩΝΑΣ

Ο αμπελώνας βρίσκεται στην περιοχή Λυκόβρηση Αττικής (συντεταγμένες: $38^{\circ}04'11.46''$ βόρεια, $23^{\circ}46'33.99''$) σε υψόμετρο 195-200m. 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 τυχαία από διάφορα πρέμνα κάθε ποικιλίας. Συνολικά έγιναν 3 δειγματοληψίες και στην κάθε δειγματοληψία ληφθήκαν 3

σταφυλές. Οι σταφυλές συλλέχθηκαν από τους κύριους βλαστούς που βρίσκονταν σε διαφορετικές θέσεις (σκιασμένες ή μη σκιασμένες) και από διαφορετικές θέσεις της κάθε σταφυλής (κορυφή, μέση, βάση). Η δειγματοληψία έλαβε χώρα κατά τις πρωινές ώρες (08.00-10.00).

Κάθε δειγματοληψία αποτέλεσε και μία επανάληψη (συνολικά 3) για κάθε επέμβαση (ποικιλία). Ακολούθησαν οι μηχανικές αναλύσεις των σταφυλών και των ραγών όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.4 και μετρήθηκε η ολική και η ενεργή οξύτητα των γλευκών, όπως περιγράφεται στις ενότητες 2.5.2 και 2.5.3. 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 τη 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 μιας 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 αμπελουργική περιοχή, η ποικιλία της αμπέλου και η τιμή τους και κυμαίνεται από 2,8 μέχρι 4,2.

Βαθμονομείται το όργανο (pH-μετρο) (εικόνα 13) με διαλύματα γνωστού pH. Στη συνέχεια τοποθετείται το δείγμα, που πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία $20^{\circ}C$, σε ποτήρι ζέσεως κι εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο. Λαμβάνεται η ένδειξη του οργάνου με δύο δεκαδικά ψηφία.



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 (συνήθως NaOH 0,1N) που καταναλώνεται από τα οξέα του γλεύκους μέχρι το pH του δείγματος να φτάσει στην τιμή 7 της κλίμακας του pH. Ως δείκτης για τον καθορισμό του σημείου εξουδετέρωσης χρησιμοποιείται η φαινολοφθαλείνη. 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 διάλυμα φαινολοφθαλείνης 10gr/l (1%). Για την παρασκευή του διαλύματος διαλύονται 10 γραμμάρια φαινολοφθαλείνης 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 10ml γλεύκους
- Προσθήκη 10ml απεσταγμένου νερού
- Προσθήκη 4-5 σταγονών διαλύματος φαινολοφθαλείνης
- Σταδιακή τιτλοδότηση με προσθήκη NaOH 0,1N μέχρι να αλλάξει χρώμα ο δείκτης φαινολοφθαλείνης (στις λευκές ποικιλίες από λευκό σε ελαφρώς ερυθρό και στις ερυθρές ποικιλίες από ερυθρό σε κεραμιδί) (εικόνα 14)
- Σημειώνεται ο όγκος NaOH 0,1 N που χρειάστηκε για την πλήρη εξουδετέρωση των οξέων του δείγματος



Εικόνα 14: Προσδιορισμός ολικής οξύτητας

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 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΕ ΓΛΕΥΚΟΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ

2.6.1 Μέτρηση της αργινίνης στο γλεύκος

2.6.1.1 Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της αργινίνης στο χυμό των ραγών κατά την πλήρη ωρίμανση παρέχει έναν εύκολο και σχετικά φθηνό τρόπο προσδιορισμού των αναγκών των πρέμνων σε άζωτο (22). 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/lit).
- 8-Υδροξυκινολίνη 0,02% : 0,2g υδροξυκινολίνη διαλυθήκαν σε 100 ml αιθυλική αλκοόλη 95%.
- Υποβρωμιώδες νάτριο 1 % : Προετοιμάζεται διαλύοντας 1 g 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 (400gr/lit).

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
- 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 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 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:

$$(A_{500} - 0,0006) * 0,025 / 0,0132$$

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 92⁰C για 15 λεπτά. Στην συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες ψυχθήκαν σε υδατόλουτρο στους 20⁰C 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 (επαναλήψεις), 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 40:40:19), 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. Στη συνέχεια:

- Ζυγίστηκαν (εικόνα 15) 0,4gr φλοιού από κάθε επανάληψη σε ζυγό ακριβείας και αναμείχθηκαν σε 4 ml διαλύματος (αναλογία 1:10).



Εικόνα 15: Ζυγός ακριβείας

- Ανάδευση (εικόνα 16) του διαλύματος σε συσκευή Turrax στις 8.000 στροφές για 10 δευτερόλεπτα



Εικόνα 16: Ανάδευση με Turrax

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

Ο σκοπός που η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται τρεις φορές συνολικά είναι για να εξασφαλίσουμε ότι στο τελικό διάλυμα θα έχει εκχυλιστεί όλη η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων. 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 γιγάρτα περιέχουν γιγαρτέλαιο (168,169), το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 280 nm. Στο ίδιο μήκος κύματος απορροφούν και οι μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να μη καθίστατο δυνατό να διαχωρισθούν ικανοποιητικά οι ενώσεις στο όργανο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Για αυτό

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

- Ζύγισμα 0,4 gr λυοφιλιωμένων και κονιορτοποιημένων γιγάρτων
- Προσθήκη 2 ml εξανίου και ανάδευση
- Φυγοκέντρηση (εικόνα 17) κι απόρριψη υπερκείμενου



Εικόνα 17: Φυγόκεντρος

- **Επανάληψη της διαδικασίας -2^η φορά-** για το ίζημα

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

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

- Προσθήκη του υπερκείμενου στο προηγούμενο (8ml+4ml=12ml)
- Απόρριψη του υποκειμένου
- Τελικός όγκος εκχυλίσματος 12 ml (αναλογία ξηρού βάρους-εκχυλίσματος 1:30)

Ο σκοπός που η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται τρεις φορές συνολικά είναι για να εξασφαλίσουμε ότι στο τελικό διάλυμα θα έχει εκχυλιστεί όλη η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων. 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 γίγαρτα αποφασίστηκε, κατόπιν δοκιμών, να πραγματοποιηθεί αραίωση των αρχικών εκχυλισμάτων. Η αραίωση που έγινε ήταν 1:30 σε τελικό όγκο διαλύματος 10 ml. Κατά συνέπεια για την παρασκευή του αραιωμένου διαλύματος αραιώθηκαν 0,33 ml εκχυλίσματος σε 9,67 ml διαλύτη (μεθανόλη). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη καθαρότητας HPLC. Για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα σε όλες τις μεθόδους εκτός από την μέθοδο προσδιορισμού των Ολικών Φλαβονών & Φλαβονολών. Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε το αρχικό εκχύλισμα. Στα γλέυκη δεν έγινε καμία αραίωση.

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, γίγαρτα και γλέυκη των ραγών αρχικά πρέπει να γίνει εκχύλιση. Μετά την εκχύλιση μέτρηση των ανθοκυανών γίνεται φασματοφωτομετρικά με μέγιστη απορρόφηση στα 520nm. Όταν στα 700nm η τιμή είναι μεγαλύτερη του 0,01 (700nm > 0,01), τότε το αποτέλεσμα δεν είναι έγκυρο. Αν μετρηθεί επίσημα 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).

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 τα αραιωμένα εκχυλίσματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για τα γλεύκη έγινε εκχύλιση. Για κάθε ποικιλία έγιναν 3 ξεχωριστές εκχυλίσεις (επαναλήψεις) του γλεύκους με βάση την παρακάτω διαδικασία:

- Ανάδευση του γλεύκους
- Προσθήκη 1 ml γλεύκους σε πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου
- 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 τα τρία μέρη της ράγας (φλοιοί, γίγαρτα, γλεύκη)

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 4000rpm για 10 λεπτά
- Μεταφορά 0,5 ml από το υπερκείμενο σε δοκιμαστικούς σωλήνες
- Προσθήκη 10 ml HCl 1M
- Ανάδευση με vortex
- Παραμονή σε ηρεμία στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες
- Φωτομέτρηση 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 γίγαρτα, αντίστοιχα) ή 0,5 ml διαλύματος αιθανόλης καθαρότητας HPLC 50% pH=2 (για γλεύκη) κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μηδενισμό του φωτόμετρου, αντίστοιχα.

Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 520nm για τις ανθοκυάνες (πλαστική κυψελίδα, λάμπα αλογόνου) -σε φλοιούς και γλεύκη- και στα 280nm για τις ολικές φαινολικές ενώσεις (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου) -σε φλοιούς, γίγαρτα και γλεύκη-. 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 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

Ο υπολογισμός αυτός για τα **γλεύκη** γίνεται σε ένα βήμα κι η περιεκτικότητα των ανθοκυανών εκφράζεται σε mg μαλβιδίνης / ml γλεύκους:

$$\text{Ολικές Ανθοκυάνες} = (A_{520} * 11 * 0.001) / 0.001$$

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:

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

Ο υπολογισμός αυτός για τα **γλεύκη** γίνεται σε ένα βήμα και η περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων εκφράζεται είτε σε γαλλικό οξύ

Έκφραση σε mg γαλλικού οξέος / ml γλεύκους:

$$\text{Ολικές φαινολικές ενώσεις} = (A_{280} * 11 * 0,001) / 0,0023$$

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 (170, 171, 172). 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 ammoniumsulfate. 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 g 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.

2.7.3.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για τα γλεύκη έγινε εκχύλιση. Για κάθε ποικιλία έγιναν 3 ξεχωριστές εκχυλίσεις (επαναλήψεις) του γλεύκους με βάση την παρακάτω διαδικασία:

- Ανάδευση του γλεύκους
- Προσθήκη 1 ml γλεύκους 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

2.7.3.4 Διαδικασία μέτρησης

Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τα τρία μέρη της ράγας (φλοιοί, γίγαρτα, γλεύκη)

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

Σε 2 άλλους πλαστικούς σωλήνες αντί για δείγμα προστέθηκε 1 ml αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης (1:30 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) (για φλοιούς και γίγαρτα, αντίστοιχα) ή 1 ml αιθανόλης καθαρότητας HPLC (για γλεύκη) κι ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μηδενισμό του φωτόμετρου, αντίστοιχα.

Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου). Για κάθε επανάληψη παρήχθησαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους για τα controlsample και για τα treatmentsample. 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).

2.7.3.5 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 **γίγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των συμπυκνωμένων ταννινών εκφράζεται σε mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού

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

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

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

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

Ο υπολογισμός αυτός για τα **γλεύκη** γίνεται σε ένα βήμα και η περιεκτικότητα των συμπυκνωμένων ταννινών εκφράζεται σε mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού

$$\text{Συμπυκνωμένες ταννίνες} = (A_{280} * 11 * 0,001) / 0,011$$

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

2.7.4.1 Αρχή της μεθοδού

Η αρχή της μεθόδου προσδιορισμού των ολικών φλαβονοειδών με το χλωριούχο αργίλιο βασίζεται στο ότι το AlCl_3 σχηματίζει σταθερά όξινα σύμπλοκα με την κετονομάδα στη θέση C4 και την υδροξυλική ομάδα είτε της θέσης C3 είτε της θέσης C5 των φλαβονών και φλαβονολών. Επιπρόσθετα, σχηματίζει όξινα, ασταθή, σύμπλοκα με της όρθο-υδροξυλομάδες των δακτυλίων A και B των φλαβονοειδών (173).

2.7.4.2 Αντιδραστήρια

- Υδατικό διάλυμα NaNO_2 5% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 5 gr NaNO_2 και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml απιονισμένου νερού.

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

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 NaNO_2 5% w/v
- ο Ανάδευση με vortex και μετά από 5 λεπτά προσθήκη 0,15 ml AlCl_3 10% w/v
- ο Ανάδευση με vortex και μετά από 6 λεπτά προσθήκη 1 ml 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) (174)

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 (175). 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 (177).

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 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τους φλοιούς και τα γιγάρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου. Όμως, επειδή στα γιγάρτα η συγκέντρωση των φλαβονολών είναι αρκετά μεγαλύτερη από τους φλοιούς έγινε μία επιπλέον αραιώση στο ήδη αραιωμένο εκχύλισμα των γιγάρτων, με μεθανόλη καθαρότητας HPLC, σε αναλογία 1:2. Επομένως, η τελική αραιώση των γιγάρτων που χρησιμοποιήθηκε στη μέτρηση αυτή ήταν 1:60.

2.7.5.4 Διαδικασία μέτρησης

Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τους φλοιούς και για τα γιγάρτα. 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 παρήχθηκαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φλαβονολών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η κατεχίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (7,8125 – 62,5 ppm).

2.7.5.5 Υπολογισμοί ολικών φλαβονολών

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

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

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

- (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 (AlCl₃)

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 AlCl₃ 5% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 5 gr AlCl₃ 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 $AlCl_3$ 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) 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 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 **γύγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονών και φλαβονολών εκφράζεται σε mg ρουτίνης / gr νωπού ιστού

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

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

- (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 (178).

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 (178).

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 (178). 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 (178).

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 xselect της WatersC₁₈, διαστάσεων 250 x 4,6 mm και διαμέτρου 4.6 μm,
- ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων UV-Vis (PDA)

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

- 95% διαλύτης A αρχικά (0 min)

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

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 εκχυλίσεις των ανθοκυανών είχαν γίνει σε διάλυμα μεθανόλης, ακετόνης και νερού (40:40:20), έγινε εξάτμιση (εικόνα 18) των αρχικών διαλυτών σε ροή αζώτου και λυοφιλίωση.



Εικόνα 18: 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 φυγόκεντρου 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 50ml 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 πάρθηκε μία μέτρηση στην HPLC, καθώς το όργανο παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιώντας τις πρότυπες καμπύλες, βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων σε κάθε ανθοκυάνη ξεχωριστά. Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών, της κάθε ανθοκυάνης, παρασκευάστηκαν 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 ηκυανιδίνη, 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 μεμονομένων εκφράζεται σε mg ανθοκυάνης/γνωπού 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:

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

Ανθοκυάνη	Κλίση πρότυπης καμπύλης
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 xselect της WatersC₁₈, διαστάσεων 250 x 4,6 mm και διαμέτρου 4.6 μm,
- Ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων UV-Vis (PDA)

Η κινητή φάση αποτελείται από τον διαλύτη A (υδατικό διάλυμα 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^η 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^η 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:

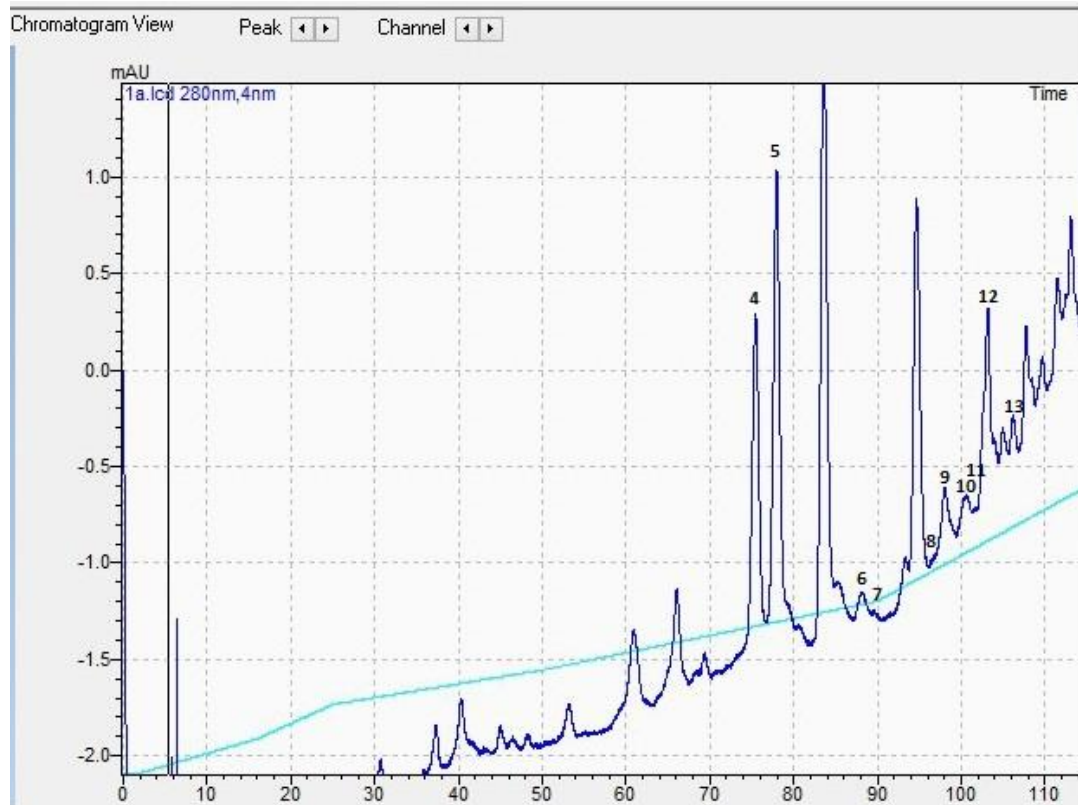
- Προσθήκη 0,5 ml μεθανόλης Καθαρότητας HPLC στο πλαστικό σωλήνα με το στερεό υπόλειμμα των φαινολικών ενώσεων και ανάδευση με vortex
- Προσθήκη 0,5 ml νερό Καθαρότητας HPLC και ανάδευση (τελικός όγκος 1 ml / αραιώση 1:2)

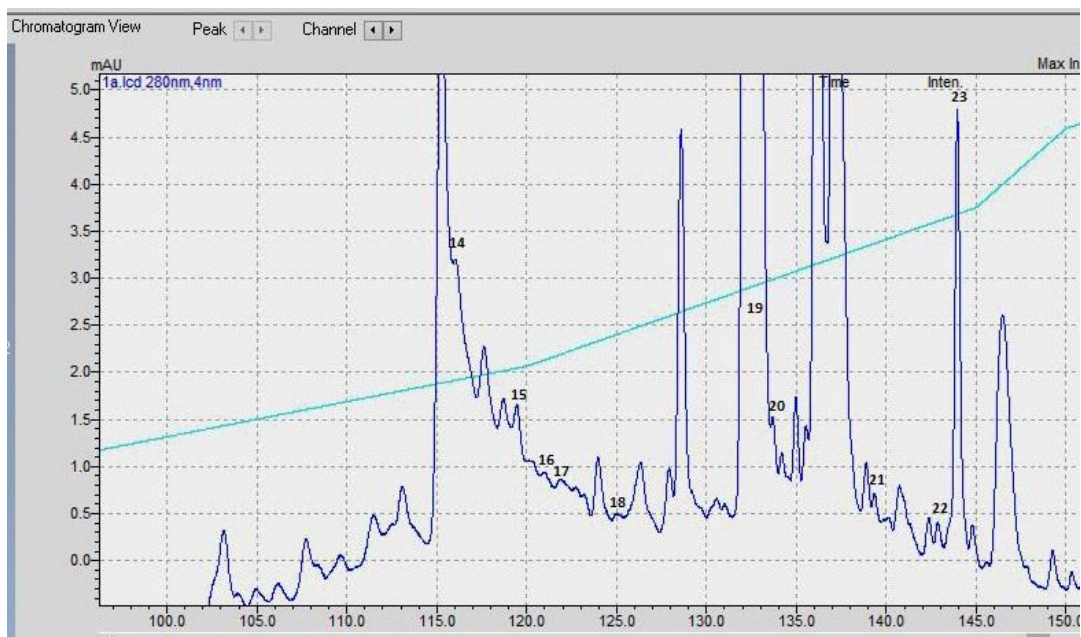
- Φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος με φίλτρο 0,2μm και ταυτόχρονη μεταφορά του σε κατάλληλους περιέκτες (vials 1.5 ml) για αυτόματο δειγματολήπτη
- Τοποθέτηση του περιέκτη στο όργανο της HPLC

Για κάθε επανάληψη πάρθηκε 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 αποτυπώνονται στα παρακάτω χρωματογραφήματα (εικόνα 19) είναι οι:

- Φλαβανόλες: κατεχίνη: 5, επικατεχίνη: 13, προκανιδίνη B1: 3, προκουανιδίνη B2: 6
- Φλαβόνες & Φλαβονόλες: κερκετίνη: 22, ρουτίνη: 19, λουτεολίνη: 23
- Υδροξυβενζοϊκά οξέα: γαλλικό οξύ: 1, πρωτοκατεχικό οξύ: 2, βανιλλικό οξύ: 7, συριγκικό οξύ: 11
- Υδροξυκινναμωμικά οξέα: καφεϊκό οξύ: 8, π-κουμαρικό οξύ: 14, μ-κουμαρικό οξύ: 18, φερουλικό οξύ: 16, σιναπικό οξύ: 17, καφταρικό οξύ: 4, κουταρικό οξύ: 9, φερταρικό οξύ: 12
- Στιλβένια: ρεσβερατρόλη: 20, ε-βινιφερίνη: 21, piceid: 15
- Φαινολικές Αλδεΐδες: βανιλίνη: 10





Εικόνα 19:Χρωματογραφήματα μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων (με τους αριθμούς 1-23 αποτυπώνονται οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν)

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 /grνωπού 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
Φλαβονόλες	Κατεχίνη	826,27
	Επικατεχίνη	491,6
	Προκυανιδίνη B1	726,13
	Προκυανιδίνη B2	473,98

	Λουτεολίνη	3263
<i>Φλαβόνες & Φλαβονόλες</i>	Κερκετίνη	1941,6
	Ρουτίνη	887,15
	Γαλλικό οξύ	4739,6
<i>Υδροξυβενζοϊκά οξέα</i>	Πρωτοκατεχικό οξύ	6021,6
	Βανιλλικό οξύ	2443,1
	Συριγκικό οξύ	3542,4
	Καφεϊκό οξύ	4094
<i>Υδροξυκινναμωμικά οξέα</i>	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
<i>Στιλβένια</i>	ε-Βινιφερίνη	2334,1
	Piceid	2104,2
	Φαινολικές αλδεϋδες	6205,4
	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 (Analysis of Variance). 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

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, με το μεγαλύτερο μήκος εμφάνισαν και το μεγαλύτερο πλάτος. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το μήκος ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με το πλάτος των ραγών. Εξαιρεση αποτελούν οι ποικιλίες Μπεκάρι και Μπακούρι που το πλάτος τους ήταν μεγαλύτερο από το μήκος τους. Το μήκος κυμάνθηκε από 11,07 mm μέχρι 15,67 mm, ενώ το πλάτος από 11,50 mm μέχρι 16,51 mm. Συγκεκριμένα, τις μεγαλύτερες διαστάσεις τις παρουσίασε η Δουμπραίνα Μαύρη, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Ενώ οι μικρότερες διαστάσεις ραγών μετρήθηκαν στην ποικιλία Κουντούρα Μαύρη, με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες, εκτός από το πλάτος της ποικιλίας Μπακούρι (πίνακας 1).

Πίνακας 1: Μηχανικές αναλύσεις ράγας

	Μήκος Ράγας (mm)	Πλάτος Ράγας (mm)	Βάρος 50 ραγών (gr)	Δύναμη Πρόσφυσης (N)
Κολλινιατικό Μαύρο	14,07b±0,22	14,56b±0,24	104b±2,31	1,25c±0,11
Μπεκάρι	13,77b±0,28	12,97c±0,19	82c±2,31	0,74d±0,09
Μπακούρι	13,95b±0,27	12,49cd±0,30	68d±2,31	0,57d±0,04
Κουντούρα Μαύρη	11,07d±0,21	11,50d±0,19	44e±2,31	1,13c±0,03
Δουμπραίνα Μαύρη	15,67a±0,54	16,51a±0,70	137a±2,31	1,58a±0,06
Θράψα	14,54b±0,10	15,20b±0,16	100b±2,31	1,54ab±0,15
Μαύρο Σπετσών	12,27c±0,12	13,16c±0,23	78c±2,31	1,29bc±0,12

Οι δείκτες a,b,c,d,εσθην 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 Δουμπραίνα Μαύρη εμφάνισε το μεγαλύτερο **βάρος 50 ραγών** (137 gr) διαφέροντας στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Οι ποικιλίες Κολλινιατικό Μαύρο (104 gr) και Θράψα (100 gr) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, διαφέραν όμως στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Οι ποικιλίες Μπεκάρι (82 gr) και Μαύρο Σπετσών (78 gr), δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, διαφέραν όμως στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Η ποικιλία Μπακούρι (68 gr) διέφερε στατιστικά σημαντικά από όλες τις υπόλοιπες. Το μικρότερο βάρος ραγών το παρουσίασε η Κουντούρα Μαύρη (44 gr) διαφέροντας στατιστικά σημαντικά (πίνακας 1).

Τη μεγαλύτερη **δύναμη πρόσφυσης των ραγών** την παρουσίασαν οι ποικιλίες Δουμπραίνα Μαύρη (1,58 N) κι η Θράψα (1,54 N), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η Θράψα δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ούτε με το Μαύρο Σπετσών (1,29 N). Τη μικρότερη δύναμη πρόσφυσης την παρουσίασαν οι ποικιλίες Μπεκάρι (0,74 N) και Μπακούρι (0,57 N) χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (πίνακας 1).

Δεν καταγράφηκε αναλογία μεταξύ **μήκους και πλάτους των σταφυλών**. Το μεγαλύτερο μήκος σταφυλής μετρήθηκε στην ποικιλία Μπεκάρι (23 cm) διαφέροντας στατιστικά σημαντικά. Όλες οι υπόλοιπες ποικιλίες δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους ως προς το μήκος. Η ποικιλία Μαύρο Σπετσών ήταν η λιγότερο επιμήκης (15,8 cm). Αντίθετα, το μεγαλύτερο πλάτος σταφυλής μετρήθηκε στις ποικιλίες Θράψα (14,3 cm) και Δουμπραίνα Μαύρη (12,3 cm) που δεν διαφέραν

στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Ενώ, το μικρότερο πλάτος μετρήθηκε στο Μπεκάρι (8,8 cm) και στο Κολλινιατικό Μαύρο (8,2 cm) που δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (πίνακας 2).

Πίνακας 2: Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής

	Μήκος Σταφυλής (cm)	Πλάτος Σταφυλής (cm)	Βάρος Σταφυλής (gr)
Κολλινιατικό Μαύρο	16,2b±0,4	8,2d±0,3	120,0c±10,0
Μπεκάρι	23a±1,7	8,8d±0,7	216,0bc±48,8
Μπακούρι	16,5b±0,9	11,5bc±0,9	274,7b±21,7
Κουντούρα Μαύρη	17,3b±0,3	11,7bc±0,3	227,0bc±5,1
Δουμπραίνα Μαύρη	16,5b±0,9	12,3ab±0,4	309,7ab±29,2
Θράψα	17,3b±1,8	14,3a±0,6	425,3a±89,4
Μαύρο Σπετσών	15,8b±2,1	9,5cd±1,3	221,3bc±37,1

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 ποικιλίες Θράψα (425,3 gr) και Δουμπραίνα Μαύρη (309,7 gr) παρουσίασαν το μεγαλύτερο βάρος σταφυλής, χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η Δουμπραίνα Μαύρη δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε με τις ποικιλίες Μπακούρι (274,7 gr), Κουντούρα Μαύρη (227,0 gr), Μαύρο Σπετσών (221,3 gr) και Μπεκάρι (216,0 gr). Οι τρεις τελευταίες δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά ούτε με το Κολλινιατικό Μαύρο (120,0 gr) που εμφάνισε και τη μικρότερη τιμή από όλες (πίνακας 2).

3.2 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΓΛΕΥΚΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σακχάρων μετρήθηκε στην ποικιλία Κολλινιατικό Μαύρο (23,1 °Brix), ενώ η μικρότερη τιμή καταγράφηκε στο Μαύρο Σπετσών (13,8 °Brix). Όλες οι ποικιλίες παρουσίασαν μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά (πίνακας 3).

Πίνακας 3: Μέτρηση γλυκογραφικών χαρακτηριστικών

	Περιεκτικότητα Σακχάρων (*Brix)	Ενεργή Οξύτητα (pH)	Ολική Οξύτητα (g τρυγικού οξέος/ L γλεύκους)
Κολλινιάτικο Μαύρο	23,1a±0,06	3,86a±0,003	0,7c±0,029
Μπεκάρι	21,3b±0,03	3,83b±0,006	0,5e±0,017
Μπακούρι	18,6c±0,06	3,63c±0,003	0,8b±0,012
Κουντούρα Μαύρη	15,6e±0,06	3,11g±0,006	1a±0,029
Δουμπραίνα Μαύρη	16,0d±0,00	3,47e±0,000	0,6d±0,017
Θράψα	14,9f±0,06	3,39f±0,008	0,7c±0,023
Μαύρο Σπετσών	13,8g±0,03	3,59d±0,003	0,5e±0,023

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 η Κουντούρα Μαύρη (pH 3,11), ενώ η ποικιλία που εμφάνισε την υψηλότερη τιμή ήταν το Κολλινιάτικο Μαύρο (pH 3,86). Όλες οι ποικιλίες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά (πίνακας 3).

Η μεγαλύτερη ολική οξύτητα καταγράφηκε στην Κουντούρα Μαύρη (1 g τρυγικού οξέος/ L γλεύκους), ενώ η μικρότερη τιμή μετρήθηκε στο Μαύρο Σπετσών και στο Μπεκάρι (0,5 g τρυγικού οξέος/ L γλεύκους). Οι ποικιλίες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά, εκτός από το Μαύρο Σπετσών με το Μπεκάρι και το Κολλινιάτικο Μαύρο με τη Θράψα (0,7 g τρυγικού οξέος/ L γλεύκους), που δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (πίνακας 3).

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα αργινίνης μετρήθηκε στην ποικιλία Μπακούρι (0,72 mg / ml γλεύκους) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Το Κολλινιάτικο Μαύρο (0,56 mg / ml γλεύκους) και το Μαύρο Σπετσών (0,51 mg / ml γλεύκους) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από το Μπεκάρι (0,42 mg / ml γλεύκους). Μικρότερες τιμές καταγράφηκαν στη Δουμπραίνα Μαύρη (0,30 mg / ml γλεύκους) και στην Κουντούρα Μαύρη (0,27 mg / ml γλεύκους) χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η ποικιλία που εμφάνισε τη μικρότερη τιμή ήταν η Θράψα (0,22 mg / ml γλεύκους) παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά (πίνακας 4).

Πίνακας 4: Μέτρηση αμινοξέων

	Αργινίνη (mg / ml γλεύκους)	Προλίνη (mg / ml γλεύκους)
Κολλινιάτικο Μαύρο	0,56b±0,004	0,38b±0,065
Μπεκάρι	0,42c±0,012	0,77a±0,006
Μπακούρι	0,72a±0,020	0,34b±0,023
Κουντούρα Μαύρη	0,27d±0,026	0,02c±0,004
Δουμπραίνα Μαύρη	0,30d±0,007	0,03c±0,002
Θράψα	0,22e±0,017	0,01c±0,001
Μαύρο Σπετσών	0,51b±0,013	0,02c±0,004

Οι δείκτες a,b,c,d,εστην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student'sT-test ($P < 0,05$)

Η υψηλότερη **περιεκτικότητα προλίνης** καταγράφηκε στο Μπεκάρι (0,77 mg/ml γλεύκους) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Επίσης, το Μπακούρι (0,34 mg/ml γλεύκους) παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι υπόλοιπες ποικιλίες δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η μικρότερη τιμή καταγράφηκε στη Θράψα (0,01 mg / ml γλεύκους) (πίνακας 4).

3.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ & ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Στον πίνακα 5 παρατίθενται οι μετρήσεις της περιεκτικότητας των φλοιών των γιγάρτων και των γλευκών των ποικιλιών σε **ολικές φαινολικές** ενώσεις. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα στους **φλοιούς** καταγράφηκε στο Μαύρο Σπετσών (16,19 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Το Μπεκάρι (10,72 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) και η Κουντούρα Μαύρη (9,16 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η Κουντούρα Μαύρη δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ούτε από τις ποικιλίες Θράψα και Κολλινιάτικο Μαύρο που παρουσίασαν μικρότερη τιμή (7,83 και 7,38 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού, αντίστοιχα). Οι μικρότερες τιμες, χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, καταγράφηκαν στις ποικιλίες Μπακούρι (4,97 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) και Δουμπραίνα Μαύρη (4,40 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού), παρουσίασαν όμως στατιστικά σημαντική διαφορά με τις υπόλοιπες ποικιλίες.

Πίνακας 5: Μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων

	Φλοιοί (mg γαλλικού οξέος / gr νωπού ιστού)	Γίγαρτα (mg γαλλικού οξέος / gr νωπού ιστού)	Γλεύκος (mg γαλλικού οξέος / ml γλεύκου)
Κολλινιάτικο Μαύρο	7,38c±0,720	23,86d±1,835	0,49a±0,011
Μπεκάρι	10,72b±0,652	23,53d±2,240	0,42ab±0,029
Μπακούρι	4,97d±0,299	26,36cd±1,568	0,26de±0,033
Κουντούρα Μαύρη	9,16bc±0,732	40,30a±1,348	0,36bc±0,025
Δουμπραίνα Μαύρη	4,40d±0,475	27,76cd±1,197	0,18e±0,007
Θράψα	7,83c±1,029	31,99bc±1,873	0,32cd±0,034
Μαύρο Σπετσών	16,19a±0,724	39,23ab±5,054	0,31cd±0,022

Οι δείκτες a,b,c,d,εστην 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 Κουντούρα Μαύρη (40,30 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) και Μαύρο Σπετσών (39,23 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η ποικιλία Θράψα παρουσίασε μικρότερη τιμή (31,99 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) διαφέροντας στατιστικά σημαντικά από την Κουντούρα Μαύρη, όχι όμως κι από το Μαύρο Σπετσών. Επίσης, δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά κι από την Δουμπραίνα Μαύρη και το Μπακούρι (27,76 και 26,36 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού, αντίστοιχα). Τέλος, τις μικρότερες τιμές τις εμφάνισαν οι ποικιλίες Κολλινιάτικο Μαύρο (23,86 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) και Μπεκάρι (23,53 mg γαλλικού οξέος / g νωπού ιστού) που δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά ούτε και με την Δουμπραίνα Μαύρη και το Μπακούρι (πίνακας 5).

Οι ποικιλίες που παρουσίασαν τις μεγαλύτερες περιεκτικότητες **ολικών φαινολικών** ενώσεων στα **γλεύκητα** το Κολλινιάτικο Μαύρο (0,49 mg γαλλικού οξέος / ml γλεύκου) και το Μπεκάρι (0,42 mg γαλλικού οξέος / ml γλεύκου), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η Κουντούρα Μαύρη εμφάνισε περιεκτικότητα 0,36 mg γαλλικού οξέος / ml γλεύκου, χωρίς να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το Μπεκάρι, αλλά ούτε και από τη Θράψα και το Μαύρο Σπετσών που παρουσίασαν μικρότερες τιμές (0,32 και 0,31 mg γαλλικού οξέος / ml γλεύκου, αντίστοιχα). Το Μπακούρι είχε μικρότερη περιεκτικότητα (0,26 mg γαλλικού οξέος /

ml γλεύκους), όμως χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από τη Θράψα και το Μαύρο Σπετσών. Τέλος, η ποικιλία με την μικρότερη τιμή ήταν η Δουμπραίνα Μαύρη (0,18 mg γαλλικού οξέος / ml γλεύκους), που διέφερε στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες, εκτός από το Μπεκάρι (πίνακας 5).

Στον πίνακα παρατίθενται οι μετρήσεις περιεκτικότητας των **ολικών φλαβονοειδών ενώσεων** στους φλοιούς και στα γίγαρτα των ραγών. Η ποικιλία με τη μεγαλύτερη τιμή ήταν το Μαύρο Σπετσών (20,98 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες, εκτός από την Κουντούρα Μαύρη (17,45 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού). Η Κουντούρα Μαύρη δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ούτε από τη Θράψα (15,13 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού), το Μπεκάρι (14,56 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού) και τη Δουμπραίνα Μαύρη (13,08 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού). Μικρότερη περιεκτικότητα παρουσίασε το Κολλιινιάτικο Μαύρο (10,66 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού), που δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τη Θράψα, το Μπεκάρι και τη Δουμπραίνα Μαύρη. Το Κολλιινιάτικο Μαύρο και η Δουμπραίνα Μαύρη δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ούτε από το Μπακούρι που εμφάνισε την μικρότερη περιεκτικότητα (8,64 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού).

Πίνακας 6: Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών ενώσεων

	Φλοιοί (mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού)	Γίγαρτα (mg κατεχίνης / ml γλεύκους)
Κολλιινιάτικο Μαύρο	10,66cd±0,414	44,48d±0,890
Μπεκάρι	14,56bc±0,184	46,46d±3,407
Μπακούρι	8,64d±0,288	50,11d±1,746
Κουντούρα Μαύρη	17,45ab±3,172	88,70a±1,387
Δουμπραίνα Μαύρη	13,08bcd±0,279	63,03c±3,040
Θράψα	15,13bc±0,933	66,19c±0,278
Μαύρο Σπετσών	20,98a±2,901	74,07b±1,288

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 στογίγαρτα** ήταν η Κουντούρα Μαύρη (88,70 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά. Στατιστικά σημαντική διαφορά είχε και το Μαύρο Σπετσών που εμφάνισε περιεκτικότητα 74,07 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού. Η Θράψα και η Δουμπραίνα Μαύρη με περιεκτικότητα 66,19 και 63,03 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού, αντίστοιχα, δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τέλος το Μπακούρι (50,11 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού), το Μπεκάρι (46,46 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού) και το Κολλινιάτικο Μαύρο (44,48 mg κατεχίνης/g νωπού ιστού) δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, είχαν όμως στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες (πίνακας 6).

3.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ & ΟΛΙΚΩΝ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ

Στον πίνακα 7 παρατίθενται οι μετρήσεις περιεκτικότητας των **μεμονομένων ανθοκυανών** στους φλοιούς καθώς και των **ολικών ανθοκυανών** στους φλοιούς και στα γλεύκη των ποικιλιών. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **κυανιδίνης** μετρήθηκε στην ποικιλία Κολλινιάτικο Μαύρο (0,051 mg / gr νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Μικρότερη περιεκτικότητα εμφάνισε το Μπεκάρι (0,042mg / gr νωπού ιστού), διαφέροντας στατιστικά σημαντικά. Η Θράψα με τιμή 0,013mg / gr νωπού ιστού, δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τις ποικιλίες Μπακούρι (0,007mg / gr νωπού ιστού), Δουμπραίνα Μαύρη (0,007mg / gr νωπού ιστού) και Κουντούρα Μαύρη (0,007mg / gr νωπού ιστού). Την μικρότερη περιεκτικότητα την εμφάνισε το Μαύρο Σπετσών (0,007mg / gr νωπού ιστού), που διέφερε στατιστικά σημαντικά από τη Θράψα, όχι όμως κι από το Μπακούρι, την Δουμπραίνα Μαύρη και Κουντούρα Μαύρη.

Η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα **δελφινιδίνης** ήταν το Κολλινιάτικο Μαύρο (0,386mg / gr νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Μικρότερη περιεκτικότητα εμφάνισαν οι ποικιλίες Μπεκάρι (0,064mg / gr νωπού ιστού), Κουντούρα Μαύρη (0,063mg / gr νωπού ιστού) και Δουμπραίνα Μαύρη (0,059mg / gr νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Είχαν, όμως, στατιστικά σημαντική διαφορά από το Μπακούρι (0,029mg / gr νωπού ιστού), το Μαύρο Σπετσών (0,023mg / gr νωπού ιστού) και τη Θράψα (0,019mg / gr νωπού ιστού) (πίνακας 7).

Πίνακας 7: Μέτρηση μεμονωμένων ανθοκυανών

	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)
Κολλινιάτικο Μαύρο	0,051a±0,002	0,386a±0,017	0,377a±0,017	0,045b±0,002	0,890a±0,042
Μπεκάρι	0,042b±0,002	0,064b±0,004	0,095b±0,005	0,095a±0,004	0,604bc±0,025
Μπακούρι	0,007cd±0,002	0,029c±0,006	0,045c±0,007	0,029bc±0,009	0,591c±0,112
Κουντούρα Μαύρη	0,007cd±0,001	0,063b±0,004	0,096b±0,006	0,035bc±0,002	0,893a±0,042
Δουμπραίνα Μαύρη	0,007cd±0,001	0,059b±0,004	0,094b±0,006	0,029bc±0,002	0,841ab±0,041
Θράψα	0,013c±0,001	0,019c±0,002	0,032c±0,003	0,023c±0,001	0,379c±0,033
Μαύρο Σπετσών	0,007d±0,005	0,023c±0,008	0,038c±0,010	0,020c±0,011	0,479c±0,168

Οι δείκτες a,b,c,δστην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student'sT-test ($P < 0,05$)

Η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα **πετουνιδίνης** ήταν το Κολλινιάτικο Μαύρο (0,377mg / gr νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά. Μικρότερες τιμές καταγράφηκαν στις ποικιλίες Κουντούρα Μαύρη (0,096mg / gr νωπού ιστού), Μπεκάρι (0,095mg / gr νωπού ιστού) και Δουμπραίνα Μαύρη (0,094mg / gr νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Είχαν, όμως, στατιστικά σημαντική διαφορά από το Μπακούρι (0,045mg / gr νωπού ιστού), το Μαύρο Σπετσών (0,038mg / gr νωπού ιστού) και τη Θράψα (0,032mg / gr νωπού ιστού) (πίνακας 7).

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **παιονιδίνης** μετρήθηκε στο Μπεκάρι (0,095mg / gr νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά. Το Κολλινιάτικο Μαύρο εμφάνισε τιμή 0,045mg / gr νωπού ιστού και δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τις ποικιλίες Κουντούρα Μαύρη (0,035mg / gr νωπού ιστού), Μπακούρι (0,029mg / gr νωπού ιστού) και Δουμπραίνα Μαύρη (0,029mg / gr νωπού ιστού). Τις μικρότερες τιμές τις παρουσίασαν η Θράψα (0,023mg / gr νωπού ιστού) και το Μαύρο Σπετσών (0,020mg / gr νωπού ιστού), που διαφέραν στατιστικά σημαντικά από το Κολλινιάτικο Μαύρο, όχι όμως κι από την Κουντούρα Μαύρη, το Μπακούρι και την Δουμπραίνα Μαύρη (πίνακας 7).

Οι μεγαλύτερες περιεκτικότητες **μαλβιδίνης** μετρήθηκαν στην Κουντούρα Μαύρη (0,893 mg / gr νωπού ιστού) και το Κολλινιάτικο Μαύρο (0,890mg / gr νωπού ιστού) χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ούτε από τη Δουμπραίνα Μαύρη που παρουσίασε την αμέσως μικρότερη τιμή (0,841mg / gr νωπού ιστού). Η Δουμπραίνα Μαύρη δεν διέφερε

στατιστικά σημαντικά ούτε από το Μπεκάρι με περιεκτικότητα 0,604mg / gr νωπού ιστού. Μικρότερες περιεκτικότητες από το Μπεκάρι καταγράφηκαν στο Μπακούρι (0,591mg / gr νωπού ιστού), στο Μαύρο Σπετσών (0,479mg / gr νωπού ιστού) και στη Θράψα (0,379mg / gr νωπού ιστού), όμως δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά με το Μπεκάρι (πίνακας 7).

Την μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ολικώνανθοκυανών** στους **φλοιούς** την εμφάνισε το Κολλινιατικό Μαύρο (15,54 mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Σημαντική διαφορά είχε και το Μπεκάρι, με τιμή 11,85 mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού. Οι ποικιλίες Μπακούρι (10,11 mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού), Κουντούρα Μαύρη (10,02 mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού) και Δουμπραίνα Μαύρη (9,90 mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού), δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Μικρότερη τιμή, με στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσίασε η Θράψα (7,95 mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού). Τέλος η μικρότερη περιεκτικότητα, με στατιστικά σημαντική διαφορά, μετρήθηκε στο Μαύρο Σπετσών (4,23 mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού) (πίνακας 8).

Πίνακας 8: Μέτρηση ολικών ανθοκυανών

	Φλοιοί (mg μαλβιδίνης / gr νωπού ιστού)	Γλεύκος (mg μαλβιδίνης / ml γλεύκους)
Κολλινιατικό Μαύρο	15,54a±0,981	0,39a±0,029
Μπεκάρι	11,85b±0,159	0,35a±0,013
Μπακούρι	10,11c±0,417	0,13c±0,007
Κουντούρα Μαύρη	10,02c±0,520	0,28b±0,007
Δουμπραίνα Μαύρη	9,90c±0,275	0,05d±0,004
Θράψα	7,95d±0,523	0,13c±0,016
Μαύρο Σπετσών	4,23e±0,104	0,04d±0,004

Οι δείκτες a,b,c,d,εστην 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 Κολλινιάτικο Μαύρο και Μπεκάρι εμφάνισαν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ολικών ανθοκυανών** (0,39 και 0,35 mg μαλβιδίνης / ml γλεύκους, αντίστοιχα) στα **γλεύκη**, χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η Κουντούρα Μαύρη παρουσίασε περιεκτικότητα 0,28 mg μαλβιδίνης / ml γλεύκους που διέφερε στατιστικά σημαντικά. Η Θράψα και το Μπακούρι εμφάνισαν περιεκτικότητα 0,13 mg μαλβιδίνης / ml γλεύκους, χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Είχαν, όμως, στατιστικά σημαντική διαφορά από τη Δουμπραίνα Μαύρη και το Μαύρο Σπετσών με τιμές 0,05 και 0,04 mg μαλβιδίνης / ml γλεύκους, αντίστοιχα, που δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (πίνακας 8).

3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΩΝ ΤΑΝΝΙΝΩΝ

Στους **φλοιούς** οι ποικιλίες με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε **συμπυκνωμένες ταννίνες** ήταν το Μαύρο Σπετσών (45,30mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και το Μπεκάρι (41,70mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η Θράψα (31,69mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και η Κουντούρα Μαύρη (31,04mg κατεχίνης / mg νωπού ιστού) δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, αλλά παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Οι μικρότερες τιμές καταγράφηκαν στο Κολλινιάτικο Μαύρο (19,23mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), στη Δουμπραίνα Μαύρη (18,16mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και στο Μπακούρι (17,96mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (πίνακας 9).

Στα **γίγαρτα** οι υψηλότερες περιεκτικότητες σε **συμπυκνωμένες ταννίνες** μετρήθηκαν στις ποικιλίες Κουντούρα Μαύρη (151,96mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και Μαύρο Σπετσών (145,85mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Μικρότερες τιμές, χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ τους, παρουσίασαν το Μπεκάρι (112,73mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), η Θράψα (109,39mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), το Μπακούρι (98,89mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και η Δουμπραίνα Μαύρη (97,68mg κατεχίνης / g νωπού ιστού). Την μικρότερη περιεκτικότητα την εμφάνισε το Κολλινιάτικο Μαύρο (72,74mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), διαφέροντας στατιστικά σημαντικά (πίνακας 9).

Πίνακας 9: Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών

	Φλοιοί (mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού)	Γίγαρτα (mg κατεχίνης / gr νωπού ιστού)	Γλεύκος (mg κατεχίνης / ml γλεύκους)
Κολλινιάτικο Μαύρο	19,23c±1,606	72,74c±1,242	1,95a±0,037
Μπεκάρι	41,70a±1,016	112,73b±3,692	2,15a±0,313
Μπακούρι	17,96c±0,496	98,89b±3,417	1,05bc±0,049
Κουντούρα Μαύρη	31,04b±0,655	151,96a±3,573	1,24bc±0,214
Δουμπραίνα Μαύρη	18,16c±1,039	97,68b±4,136	0,58d±0,029
Θράψα	31,69b±3,930	109,39b±10,226	0,90cd±0,030
Μαύρο Σπετσών	45,30a±2,363	145,85a±3,858	1,48b±0,009

Οι δείκτες a,b,c,δ 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 την μεγαλύτερη τιμή στα γλεύκη ήταν το Μπεκάρι (2,15mg κατεχίνης / ml γλεύκους) και το Κολλινιάτικο Μαύρο (1,95mg κατεχίνης / ml γλεύκους) χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Το Μαύρο Σπετσών (1,48mg κατεχίνης / ml γλεύκους), η Κουντούρα Μαύρη (1,24mg κατεχίνης / ml γλεύκους) και το Μπακούρι (1,05mg κατεχίνης / ml γλεύκους) δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η Κουντούρα Μαύρη και το Μπακούρι δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε με την Θράψα (0,90mg κατεχίνης / ml γλεύκους). Η Θράψα δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από τη Δουμπραίνα Μαύρη που παρουσίασε και την μικρότερη τιμή (0,58mg κατεχίνης / ml γλεύκους) (πίνακας 9).

3.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ & ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΑΝΟΛΩΝ

Από τη μέτρηση των μεμονωμένων φλαβανολών στους φλοιούς διαπιστώθηκε ότι η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κατεχίνη ήταν το Μαύρο Σπετσών (159,40 μg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και διέφερε στατιστικά σημαντικά. Οι ποικιλίες Δουμπραίνα Μαύρη (69,28 μg κατεχίνης / g νωπού ιστού), Μπεκάρι (68,04 μg κατεχίνης / g νωπού ιστού), Θράψα (62,44 μg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και Μπακούρι (52,92 μg κατεχίνης / g νωπού ιστού) δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η ποικιλία Κουντούρα Μαύρη που παρουσίασε μικρότερη τιμή (51,52 μg κατεχίνης / g νωπού ιστού), δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τις ποικιλίες Μπεκάρι, Θράψα και Μπακούρι. Επίσης, δεν διέφερε στατιστικά

σημαντικά από το Κολλινιατικό Μαύρο που εμφάνισε την μικρότερη περιεκτικότητα από όλες τις ποικιλίες (43,42 μg κατεχίνης / g νωπού ιστού). Το Κολλινιατικό Μαύρο διέφερε στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες εκτός από το Μπακούρι και την Κουντούρα Μαύρη (πίνακας 10).

Οι μεγαλύτερες περιεκτικότητες **επικατεχίνης** μετρήθηκαν στις ποικιλίες Δουμπραίνα Μαύρη (46,68 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού) και Μαύρο Σπετσών (40,98 μg κατεχίνης / g νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Μικρότερες περιεκτικότητες παρουσίασαν οι ποικιλίες Μπεκάρι (24,68 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού), Κολλινιατικό Μαύρο (23,60 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού), Μπακούρι (21,68 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού), Θράψα (17,36 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού), Κουντούρα Μαύρη (17,04 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού), οι οποίες δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, αλλά είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά με την Δουμπραίνα Μαύρη και το Μαύρο Σπετσών (πίνακας 10).

Πίνακας 10: Μέτρηση μεμονωμένων φλαβονολών

	<i>Κατεχίνη (μg / gr νωπού ιστού)</i>	<i>Επικατεχίνη (μg / gr νωπού ιστού)</i>	<i>Προκυανιδίνη B1 (μg / gr νωπού ιστού)</i>	<i>Προκυανιδίνη B2 (μg / gr νωπού ιστού)</i>
Κολλινιατικό Μαύρο	43,42d±3,752	23,60b±2,712	4,20bc±1,784	2,60cd±0,76
Μπεκάρι	68,04bc±2,452	24,68b±1,396	4,10bc±0,244	5,24c±2,42
Μπακούρι	52,92bcd±3,208	21,68b±0,212	6,10bc±0,200	8,92b±0,72
Κουντούρα Μαύρη	51,52cd±3,388	17,04b±0,762	1,72c±0,578	1,36d±0,16
Δουμπραίνα Μαύρη	69,28b±4,258	46,68a±5,422	9,40b±1,594	15,24a±1,22
Θράψα	62,44bc±4,988	17,36b±1,508	3,88c±1,466	1,44d±0,16
Μαύρο Σπετσών	159,40a±11,352	40,98a±4,044	21,60a±3,812	1,50d±0,40

Οι δείκτες a,b,c,δστην 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 **προκυανιδίνης B1** ήταν το Μαύρο Σπετσών (21,60 μg προκυανιδίνης B1 / g νωπού ιστού), με σημαντική

διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Μικρότερες τιμές εμφάνισαν οι ποικιλίες Δουμπραίνα Μαύρη (9,40 μg προκυανιδίνης B1 / g νωπού ιστού), Μπακούρι (6,10 μg προκυανιδίνης B1 / g νωπού ιστού), Κολλιινιάτικο Μαύρο (4,20 μg προκυανιδίνης B1 / g νωπού ιστού), Μπεκάρι (4,10 μg προκυανιδίνης B1 / g νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Επίσης, οι ποικιλίες Θράψα και Κουντούρα Μαύρη που παρουσίασαν και τις μικρότερες περιεκτικότητες (3,88 και 1,72 μg προκυανιδίνης B1 / g νωπού ιστού, αντίστοιχα) δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά ούτε και με τις ποικιλίες Μπακούρι, Κολλιινιάτικο Μαύρο και Μπεκάρι (πίνακας 10).

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **προκυανιδίνης B2** μετρήθηκε στην ποικιλία Δουμπραίνα Μαύρη (15,24 μg προκυανιδίνης B2 / g νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά. Το Μπακούρι με περιεκτικότητα 8,92 μg προκυανιδίνης B2 / g νωπού ιστού διέφερε στατιστικά σημαντικά. Μικρότερες τιμές εμφάνισαν οι ποικιλίες Μπεκάρι (5,24 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού) και Κολλιινιάτικο Μαύρο (2,60 μg επικατεχίνης / g νωπού ιστού), οι οποίες δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Τέλος, τις μικρότερες τιμές καταγράφηκαν στο Μαύρο Σπετσών (1,50 μg προκυανιδίνης B2 / g νωπού ιστού), στη Θράψα (1,44 μg προκυανιδίνης B2 / g νωπού ιστού) και στην Κουντούρα Μαύρη (1,36 μg προκυανιδίνης B2 / g νωπού ιστού). Οι τρεις αυτές ποικιλίες και το Κολλιινιάτικο Μαύρο δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, διέφεραν όμως στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες (πίνακας 10).

Η ποικιλία στην οποία μετρήθηκε η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ολικών φλαβονολών** στους **φλοιούς** ήταν το Μαύρο Σπετσών (9,84 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά. Μικρότερες τιμές καταγράφηκαν στη Θράψα (6,43 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), στη Κουντούρα Μαύρη (6,01 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και στη Δουμπραίνα Μαύρη (5,86 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) που δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Επίσης, το Μπεκάρι που παρουσίασε περιεκτικότητα 5,59 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού, δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από την Κουντούρα Μαύρη και τη Δουμπραίνα Μαύρη. Διέφερε, όμως, στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Τις μικρότερες τιμές τις εμφάνισαν οι ποικιλίες Κολλιινιάτικο Μαύρο (3,76 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και Μπακούρι (3,15 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) που δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, όμως παρουσίασαν στατιστική σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες (πίνακας 11).

Πίνακας 11: Μέτρηση ολικών φλαβονολών

	Φλοιοί (mg κατεχίνης/ g νωπού ιστού)	Γίγαρτα (mg κατεχίνης/ g νωπού ιστού)
Κολλινιατικό Μαύρο	3,76d±0,061	19,60d±0,590
Μπεκάρι	5,59c±0,064	20,89cd±1,329
Μπακούρι	3,15d±0,057	43,48a±4,198
Κουντούρα Μαύρη	6,01bc±0,405	37,66a±0,845
Δουμπραίνα Μαύρη	5,86bc±0,262	29,09b±1,226
Θράψα	6,43b±0,293	30,82b±1,697
Μαύρο Σπετσών	9,84a±0,275	25,48bc±1,011

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 ($P < 0,05$)

Στα **γίγαρτα** τις μεγαλύτερες περιεκτικότητες σε **ολικές φλαβανόλες** τις εμφάνισαν το Μπακούρι (43,48 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και η Κουντούρα Μαύρη (37,66 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, με στατιστικά σημαντική διαφορά όμως από τις υπόλοιπες. Μικρότερες τιμές καταγράφηκαν στις ποικιλίες Θράψα (30,82 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), Δουμπραίνα Μαύρη (29,09 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) και Μαύρο Σπετσών (25,48 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Επίσης, το Μπεκάρι παρουσίασε μικρότερη τιμή (20,89mg κατεχίνης / g νωπού ιστού), η οποία δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από το Μαύρο Σπετσών, όμως εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά από τη Θράψα και τη Δουμπραίνα Μαύρη. Τέλος, η μικρότερη περιεκτικότητα καταγράφηκε στο Κολλινιατικό Μαύρο (19,60 mg κατεχίνης / g νωπού ιστού) που διέφερε στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες, εκτός από το Μπεκάρι (πίνακας 11).

3.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΟΛΙΚΩΝ ΦΛΑΒΟΝΩΝ & ΦΛΑΒΟΝΟΛΩΝ

Από τη μέτρηση των **μεμονωμένων φλαβονών και φλαβονολών** στους **φλοιούς** διαπιστώθηκε ότι η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε

λουτεολίνη ήταν η Δουμπραίνα Μαύρη (1979,94 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά. Το Μπεκάρι (1290,96 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και η Κουντούρα Μαύρη (1081,92 $\mu\text{g} / \text{mg}$ νωπού ιστού) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Μικρότερη περιεκτικότητα εμφάνισαν το Μπακούρι (1059,66 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), η Θράψα (1003,28 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και το Μαύρο Σπετσών (879,64 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), χωρίς όμως να παρουσιάσουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τη Κουντούρα Μαύρη και μεταξύ τους. Επίσης, δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά από το Κολλινιατικό Μαύρο που εμφάνισε την μικρότερη τιμή από όλες τις ποικιλίες (843,62 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) (πίνακας 12).

Πίνακας 12: Μέτρηση μεμονωμένων φλαβονών & φλαβονολών

	Λουτεολίνη ($\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)	Κερκετίνη ($\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)	Ρουτίνη ($\mu\text{g} / \text{gr}$ νωπού ιστού)
Κολλινιατικό Μαύρο	843,62d \pm 157,672	29,90bcd \pm 3,846	705,02c \pm 84,548
Μπεκάρι	1290,96b \pm 9,450	40,70bc \pm 5,096	1328,24a \pm 8,598
Μπακούρι	1059,66cd \pm 2,162	25,22cd \pm 0,064	612,54cd \pm 6,606
Κουντούρα Μαύρη	1081,92bc \pm 13,356	23,48d \pm 0,332	361,54e \pm 5,544
Δουμπραίνα Μαύρη	1979,94a \pm 34,166	42,02ab \pm 0,718	901,3b \pm 25,466
Θράψα	1003,28cd \pm 96,498	21,92d \pm 0,316	512,44d \pm 37,926
Μαύρο Σπετσών	879,64cd \pm 38,760	56,92a \pm 12,184	632,42cd \pm 46,806

Οι δείκτες a,b,c,d,εστην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student'sT-test ($P < 0,05$)

Οι μεγαλύτερες περιεκτικότητες **κερκετίνης** μετρήθηκαν στις ποικιλίες Μαύρο Σπετσών (56,92 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και Δουμπραίνα Μαύρη (42,02 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), οι οποίες δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Οι ποικιλίες Μπεκάρι και Κολλινιατικό Μαύρο παρουσίασαν μικρότερες τιμές (40,70 και 29,90

μg / g νωπού ιστού, αντίστοιχα) όμως δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τη Δουμπραίνα Μαύρη, αλλά ούτε και μεταξύ τους. Επίσης, δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά από το Μπακούρι στο οποίο καταγράφηκε περιεκτικότητα 25,22 μg / g νωπού ιστού. Τέλος, τις μικρότερες τιμές τις εμφάνισαν οι ποικιλίες Κουντούρα Μαύρη (23,48 μg / g νωπού ιστού) και Θράψα (21,92 μg / g νωπού ιστού), που δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά ούτε και με το Κολλινιάτικο Μαύρο και το Μπακούρι (πίνακας 12).

Η ποικιλία με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ρουτίνης** ήταν το Μπεκάρι (1328,24 μg / g νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Στατιστικά σημαντική διαφορά εμφάνισε και η Δουμπραίνα Μαύρη με τιμή 901,3 μg / g νωπού ιστού. Οι ποικιλίες Κολλινιάτικο Μαύρο (705,02 μg / g νωπού ιστού), Μαύρο Σπετσών (632,42 μg / mg νωπού ιστού) και Μπακούρι (612,54 μg / g νωπού ιστού), δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Μικρότερη περιεκτικότητα παρουσίασε η Θράψα (512,44 μg / g νωπού ιστού) που δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από το Μαύρο Σπετσών και το Μπακούρι. Τέλος, την μικρότερη τιμή την εμφάνισε η Κουντούρα Μαύρη (361,54 μg / g νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά (πίνακας 12).

Οι ποικιλίες με τις μεγαλύτερες περιεκτικότητες **ολικών φλαβονών και φλαβονολών** στους **φλοιούς** ήταν το Μπεκάρι (3,20 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) και το Κολλινιάτικο Μαύρο (2,97 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Μικρότερη τιμή παρουσίασαν οι ποικιλίες Δουμπραίνα Μαύρη (2,26 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού), Κουντούρα Μαύρη (2,17 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) και Μπακούρι (2,17 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Οι μικρότερες περιεκτικότητες μετρήθηκαν στη Θράψα (1,82 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) και στο Μαύρο Σπετσών (1,68 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) που δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά είχαν από τις υπόλοιπες ποικιλίες (πίνακας 13).

Πίνακας 13: Μέτρηση ολικών φλαβονών & φλαβονολών

	Φλοιοί (mg ρουτίνης/ gr νωπού ιστού)	Γίγαρτα (mg ρουτίνης/ gr νωπού ιστού)
Κολλινιάτικο Μαύρο	2,97a±0,106	0,44d±0,004
Μπεκάρι	3,20a±0,070	0,58b±0,011
Μπακούρι	2,17b±0,036	0,62ab±0,044
Κουντούρα Μαύρη	2,17b±0,170	0,67a±0,028
Δουμπραίνα Μαύρη	2,26b±0,062	0,56bc±0,017
Θράψα	1,82c±0,106	0,49cd±0,025
Μαύρο Σπετσών	1,68c±0,129	0,61ab±0,035

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 ($P < 0,05$)

Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ολικών φλαβονών και φλαβονολών** στα **γίγαρτα** την παρουσίασε η Κουντούρα Μαύρη (0,67 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) και διέφερε στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες, εκτός από το Μπακούρι (0,62 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) και το Μαύρο Σπετσών (0,61 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού). Το Μπεκάρι με τιμή 0,58 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού και η Δουμπραίνα Μαύρη με 0,56 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού που δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από το Μπακούρι, το Μαύρο Σπετσών, αλλά ούτε και μεταξύ τους. Στη Θράψα καταγράφηκε περιεκτικότητα 0,49 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από το Μαύρο Σπετσών, αλλά ούτε από το Κολλινιάτικο Μαύρο που εμφάνισε την μικρότερη τιμή (0,44 mg ρουτίνης / g νωπού ιστού) (πίνακας 13).

3.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Από τη μέτρηση των **μεμονωμένων υδρόξυβενζοϊκών οξέων** στους φλοιούς διαπιστώθηκε ότι οι ποικιλίες με τις μεγαλύτερες περιεκτικότητες σε **γαλλικό οξύ** ήταν η Δουμπραίνα Μαύρη (2,48 μg / g νωπού ιστού) και το Κολλινιάτικο Μαύρο (2,02 μg / g νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, είχαν όμως στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Μικρότερη τιμή εμφάνισαν το Μπεκάρι (0,34 μg / g νωπού ιστού), η Κουντούρα Μαύρη (0,20 μg

/ g νωπού ιστού), το Μπακούρι (0,20 μg / g νωπού ιστού) και η Θράψα (0,20 μg / g νωπού ιστού), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (πίνακας 14).

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **πρωτοκατεχικού οξέος** μετρήθηκε στη Θράψα (0,22 μg / g νωπού ιστού), η οποία δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά από την Δουμπραίνα Μαύρη (0,20 μg / g νωπού ιστού), το Μπεκάρι (0,18 μg / g νωπού ιστού) και την Κουντούρα Μαύρη (0,14 μg / g νωπού ιστού). Οι τρεις αυτές ποικιλίες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε από το Κολλινιατικό Μαύρο (0,12 μg / g νωπού ιστού), το Μπακούρι (0,12 μg / g νωπού ιστού) και το Μαύρο Σπετσών που καταγράφηκαν μικρότερες τιμές (πίνακας 14).

Πίνακας 14: Μέτρηση υδροξυβενζοϊκών οξέων

	Γαλλικό οξύ (μg / g νωπού ιστού)	Πρωτοκατεχικό οξύ (μg / g νωπού ιστού)	Βανιλικό οξύ (μg / g νωπού ιστού)	Συριγγικό οξύ (μg / g νωπού ιστού)
Κολλινιατικό Μαύρο	2,02a \pm 0,720	0,12b \pm 0,006	0,44cde \pm 0,214	4,22cd \pm 0,40
Μπεκάρι	0,34b \pm 0,062	0,18ab \pm 0,004	1,28abc \pm 0,588	4,16d \pm 0,60
Μπακούρι	0,20b \pm 0,050	0,12b \pm 0,006	2,16a \pm 0,144	8,68a \pm 0,16
Κουντούρα Μαύρη	0,20b \pm 0,074	0,14ab \pm 0,054	1,10bcd \pm 0,414	4,92bcd \pm 0,44
Δουμπραίνα Μαύρη	2,48a \pm 0,604	0,20ab \pm 0,018	1,52ab \pm 0,070	6,28b \pm 0,50
Θράψα	0,20b \pm 0,040	0,22a \pm 0,064	0,38de \pm 0,082	4,30cd \pm 0,22
Μαύρο Σπετσών	0,16b \pm 0,048	0,12b \pm 0,022	0,18e \pm 0,022	5,70bc \pm 0,84

Οι δείκτες a,b,c,d,εστην 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 Μπακούρι (2,16 μg / g νωπού ιστού), Δουμπραίνα Μαύρη (1,52 μg / g νωπού ιστού) και Μπεκάρι (1,28 μg / g νωπού ιστού) παρουσίασαν τις

μεγαλύτερες περιεκτικότητες **βανιλλικού οξέος**, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Η Κουντούρα Μαύρη, με τιμή 1,10 $\mu\text{g} / \text{mg}$ νωπού ιστού, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά από τη Δουμπραίνα Μαύρη και το Μπεκάρι, αλλά ούτε και από το Κολλινιάτικο Μαύρο και τη Θράψα που εμφάνισαν μικρότερες περιεκτικότητες (0,44 και 0,38 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού, αντίστοιχα). Τέλος, η μικρότερη τιμή καταγράφηκε στο Μαύρο Σπετσών (0,18 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από το Κολλινιάτικο Μαύρο και τη Θράψα (πίνακας 14).

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **συριγγικού οξέος** μετρήθηκε στην ποικιλία Μπακούρι (8,68 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Μικρότερη περιεκτικότητα παρουσίασαν η Δουμπραίνα Μαύρη (6,28 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), το Μαύρο Σπετσών (5,70 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) κι η Κουντούρα Μαύρη (4,92 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Οι ποικιλίες Θράψα (4,30 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και Κολλινιάτικο Μαύρο (4,22 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά ούτε και με το Μαύρο Σπετσών και την Κουντούρα Μαύρη. Τέλος, η μικρότερη τιμή καταγράφηκε στο Μπεκάρι (4,16 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από την Κουντούρα Μαύρη, τη Θράψα και το Κολλινιάτικο Μαύρο (πίνακας 14).

3.9 ΜΕΤΡΗΣΗ ΥΔΡΟΞΥΚΙΝΝΑΜΩΜΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Από τη μέτρηση των **μεμονωμένων υδρόξυκινναμωμικών οξέων** στους **φλοιούς** διαπιστώθηκε ότι η ποικιλία με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε **σιναιπικό οξύ** ήταν το Μπεκάρι (56,16 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες εκτός από το Μαύρο Σπετσών (44,68 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), το Κολλινιάτικο Μαύρο (39,48 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και τη Δουμπραίνα Μαύρη (37,24 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού). Το Μπακούρι εμφάνισε τιμή 25,68 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού, με στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο από το Μπεκάρι. Η Θράψα παρουσίασε τη μικρότερη τιμή (18,32 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), διαφέροντας στατιστικά σημαντικά από το Μπεκάρι και το Μαύρο Σπετσών (πίνακας 15).

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **καφεϊκού οξέος** μετρήθηκε στην ποικιλία Κολλινιάτικο Μαύρο (14,12 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά. Το Μπακούρι (8,96 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και η Δουμπραίνα Μαύρη (7,84 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Το Μπακούρι εμφάνισε

στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Η Δουμπραίνα Μαύρη με το Μπεκάρι (με τιμή 4,94 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μικρότερες περιεκτικότητες μετρήθηκαν στις ποικιλίες Μαύρο Σπετσών (3,08 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), Θράψα (1,56 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και Κουντούρα Μαύρη (1,40 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Εμφάνισαν, όμως, στατιστικά σημαντική διαφορά με τις υπόλοιπες ποικιλίες, εκτός από το Μαύρο Σπετσών που δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από το Μπεκάρι (πίνακας 15).

Πίνακας 15: Μέτρηση υδροξυκινναμωμικών οξέων

	Σιναπικό οξύ ($\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού)	Καφεϊκό οξύ ($\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού)	π -Κουμαρικό οξύ ($\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού)	μ -Κουμαρικό οξύ ($\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού)	Φερουλικό οξύ ($\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού)
Κολλινιατικό Μαύρο	39,48abc \pm 12,590	14,12a \pm 2,538	50,38a \pm 1,380	9,90ab \pm 2,514	15,00a \pm 3,272
Μπεκάρι	56,16a \pm 5,54	4,94cd \pm 0,050	49,54a \pm 3,358	13,02a \pm 1,034	14,44a \pm 2,126
Μπακούρι	25,68bc \pm 7,548	8,96b \pm 0,008	43,34a \pm 5,464	4,08cd \pm 0,064	10,40a \pm 2,640
Κουντούρα Μαύρη	31,40bc \pm 4,502	1,40e \pm 0,036	48,40a \pm 7,638	1,80d \pm 0,118	11,12a \pm 2,288
Δουμπραίνα Μαύρη	37,24abc \pm 0,964	7,84bc \pm 0,188	6,98b \pm 1,116	9,48ab \pm 0,492	12,22a \pm 0,032
Θράψα	18,32c \pm 0,714	1,56e \pm 0,122	2,42b \pm 0,142	1,92d \pm 0,266	3,46b \pm 0,156
Μαύρο Σπετσών	44,68ab \pm 12,702	3,08de \pm 0,510	53,76a \pm 5,542	6,38bc \pm 2,598	13,00a \pm 2,532

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

Οι περισσότερες ποικιλίες δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους για την περιεκτικότητα του π -κουμαρικού οξέος. Το Μαύρο Σπετσών (53,76 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), το Κολλινιατικό Μαύρο (50,38 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), το Μπεκάρι (49,54 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), η Κουντούρα Μαύρη (48,40 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και το Μπακούρι (43,34 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Διαφέραν στατιστικά σημαντικά από τη Δουμπραίνα Μαύρη (6,98 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και τη Θράψα (2,42 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), οι οποίες μεταξύ τους δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά (πίνακας 15).

Η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα μ -κουμαρικού οξέος ήταν το Μπεκάρι (13,02 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες εκτός από το Κολλινιατικό Μαύρο (9,90 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και τη Δουμπραίνα Μαύρη (9,48 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού). Οι δύο αυτές ποικιλίες δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε από το Μαύρο Σπετσών που

παρουσίασε περιεκτικότητα 6,38 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού. Το Μπακούρι (4,08 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά από το Μαύρο Σπετσών, αλλά ούτε και από τη Θράψα (1,92 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και τη Κουντούρα Μαύρη (1,80 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) που παρουσίασαν τη μικρότερη τιμή από όλες τις ποικιλίες (πίνακας 15).

Στον πίνακα 15 καταγράφεται ότι η περιεκτικότητα του **φερουλικού οξέος**. Στις ποικιλίες Κολλινιάτικο Μαύρο (15,00 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), Μπεκάρι (14,44 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), Μαύρο Σπετσών (13,00 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), Δουμπραίνα Μαύρη (12,22 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), Κουντούρα Μαύρη (11,12 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και Μπακούρι (10,40 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά. Η μόνη ποικιλία με στατιστικά σημαντική διαφορά ήταν η Θράψα που παρουσίασε και τη μικρότερη τιμή (3,46 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) (πίνακας 15).

Οι μεγαλύτερες περιεκτικότητες **καφταρικού οξέος** μετρήθηκαν στις ποικιλίες Κολλινιάτικο Μαύρο (56,58 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και Δουμπραίνα Μαύρη (52,74 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Μικρότερες τιμές, χωρίς να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους καταγράφηκαν στο Μπεκάρι (25,70 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), στο Μπακούρι (16,90 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), στην Κουντούρα Μαύρη (15,08 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και στο Μαύρο Σπετσών (13,14 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού). Οι τρεις τελευταίες ποικιλίες δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ούτε από τη Θράψα που παρουσίασε τη μικρότερη τιμή από όλες (11,38 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) (πίνακας 16).

***Πίνακας 16:** Μέτρηση εστέρων υδροξυκινναμωμικών οξέων με τρυγικό οξύ*

	<i>Καφταρικό οξύ (μg / gr νωπού ιστού)</i>	<i>Κουταρικό οξύ (μg / gr νωπού ιστού)</i>	<i>Φερταρικό οξύ (μg / gr νωπού ιστού)</i>
Κολλινιάτικο Μαύρο	56,58a±10,320	1,92ab±0,992	14,9c±2,242
Μπεκάρι	25,70b±0,930	0,66b±0,084	18,40c±1,072
Μπακούρι	16,90bc±0,140	0,82b±0,202	18,40c±0,692
Κουντούρα Μαύρη	15,08bc±0,494	0,80b±0,174	18,72c±1,404
Δουμπραίνα Μαύρη	52,74a±4,092	3,48a±1,076	33,90b±0,558
Θράψα	11,38c±1,778	0,52b±0,260	19,42c±1,558
Μαύρο Σπετσών	13,14bc±2,066	2,50ab±0,856	41,32a±3,720

Οι δείκτες a,b,cστην ίδια γραμμή υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή των μετρήσεων μεταξύ των ποικιλιών, σύμφωνα με το Student'sT-test (P<0,05)

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **κουταρικού οξέος** καταγράφηκε στη Δουμπραίνα Μαύρη (3,48 μg /g νωπού ιστού) με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες, εκτός από το Μαύρο Σπετσών (2,50 μg /g νωπού ιστού) και το Κολλινιάτικο Μαύρο (1,92 μg /g νωπού ιστού). Οι ποικιλίες Μπακούρι (0,82 μg /g νωπού ιστού), Κουντούρα Μαύρη (0,80 μg /g νωπού ιστού), Μπεκάρι (0,66 μg /g νωπού ιστού) και Θράψα (0,52 μg /g νωπού ιστού) δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά από το Μαύρο Σπετσών και το Κολλινιάτικο Μαύρο (πίνακας 16).

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **φερταρικού οξέος** μετρήθηκε στην ποικιλία Μαύρο Σπετσών (41,32 μgg νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά. Στατιστικά σημαντική διαφορά εμφάνισε και η Δουμπραίνα Μαύρη με τιμή 33,90 μg /g νωπού ιστού. Οι υπόλοιπες ποικιλίες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Αυτές είναι η Θράψα (19,42 μg /g νωπού ιστού), η Κουντούρα Μαύρη (18,72 μg /g νωπού ιστού), το Μπεκάρι (18,40 μg /g νωπού ιστού), το Μπακούρι (18,40 μg /g νωπού ιστού) και το Κολλινιάτικο Μαύρο (14,90 μg /g νωπού ιστού)(πίνακας 16).

3.10 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ & ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΑΛΔΕΪΔΩΝ

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ρεσβερατρόλης** μετρήθηκε στην ποικιλία Κολλινιατικό Μαύρο (187,82 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες εκτός από το Μπεκάρι (157,24 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), το οποίο δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε από το Μπακούρι (138,52 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού). Η Δουμπραίνα Μαύρη (107,92 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες, εκτός από το Μπακούρι. Τέλος, το Μαύρο Σπετσών (67,14 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), η Θράψα (57,26 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και η Κουντούρα Μαύρη (45,00 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (πίνακας 17).

Η ποικιλία με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα **ε-βινιφερίνης** ήταν το Κολλινιατικό Μαύρο (142,48 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), με στατιστική σημαντική διαφορά. Η Δουμπραίνα Μαύρη και το Μπεκάρι με τιμές 107,28 και 88,58 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού, αντίστοιχα, δεν διαφέραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Το Μπεκάρι δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά και από τις υπόλοιπες ποικιλίες: Θράψα (64,44 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), Μαύρο Σπετσών (58,52 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), Κουντούρα Μαύρη (58,66 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και Μπακούρι (56,68 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) (πίνακας 17).

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα **picoid** μετρήθηκε στην ποικιλία Μπεκάρι (86,14 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά, εκτός από το Κολλινιατικό Μαύρο (68,84 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού). Το Κολλινιατικό Μαύρο δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε από το Μαύρο Σπετσών (55,28 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) ούτε από την Κουντούρα Μαύρη (47,40 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού). Το Μπακούρι παρουσίασε τιμή 25,64 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού, χωρίς να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την Κουντούρα Μαύρη. Επίσης, δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά από τη Δουμπραίνα Μαύρη (20,72 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) και τη Θράψα (3,70 $\mu\text{g} / \text{g}$ νωπού ιστού) (πίνακας 17).

Πίνακας 17: Μέτρηση σιλβενίων & φαινολικών αλδεϋδών

	ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ			ΦΑΙΝΟΛΙΚΗ ΑΛΔΕΥΔΗ
	Ρεσβερατρόλη (μg/gr νωπού ιστού)	ε-Βινιφερίνη (μg/gr νωπού ιστού)	Piceid (μg/gr νωπού ιστού)	Βανιλίνη (μg/gr νωπού ιστού)
Κολλινιατικό Μαύρο	187,82a±22,318	142,48a±26,680	68,84ab±11,568	0,96bc±0,548
Μπεκάρι	157,24ab±3,528	88,58bc±5,440	86,14a±8,638	0,96bc±0,400
Μπακούρι	138,52bc±1,678	56,68c±1,064	25,64cd±13,148	0,58bc±0,024
Κουντούρα Μαύρη	45,00d±2,170	58,66c±1,184	47,40bc±0,346	0,38bc±0,180
Δουμπραίνα Μαύρη	107,92c±3,168	107,28b±2,824	20,72d±2,326	2,64a±0,356
Θράψα	57,26d±2,568	64,44c±3,372	3,70d±1,496	0,34c±0,052
Μαύρο Σπετσών	67,14d±14,350	58,52c±11,460	55,28b±6,782	1,36b±0,354

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 ($P < 0,05$)

Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα βανιλίνης μετρήθηκε στη Δουμπραίνα Μαύρη (2,64 μg / g νωπού ιστού), με στατιστικά σημαντική διαφορά από όλες τις ποικιλίες. Το Μαύρο Σπετσών (1,36 μg / g νωπού ιστού), το Κολλινιατικό Μαύρο (0,96 μg / g νωπού ιστού), το Μπεκάρι (0,96 μg / g νωπού ιστού), το Μπακούρι (0,58 μg / g νωπού ιστού) και η Κουντούρα Μαύρη δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος, η Θράψα με τιμή 0,34 μg / g νωπού ιστού δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ποικιλίες, εκτός από το Μαύρο Σπετσών (πίνακας 17).

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί το γεγονός ότι οι ποικιλίες που μελετήθηκαν είναι σπάνιες γηγενείς ποικιλίες εκ των οποίων οι περισσότερες χρησιμοποιούνται ελάχιστα στην παραγωγή τυποποιημένων οίνων. Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τις ποικιλίες αυτές είναι ελάχιστες και κατά συνέπεια η έρευνα βρίσκεται σε εμβρυακό 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 *Vitisvinifera* που χρησιμοποιούνται συστηματικά στην Ελλάδα για την παραγωγή οίνων ποιότητας με μεγάλο φαινολικό δυναμικό. Οι ποικιλίες αυτές είναι οι ελληνικές Μανδηλαριά, Ξινόμαυρο και Αγιωργίτικο και οι διεθνείς Cabernetsauvignon και Syrah.

Από τις μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών (πίνακας 3) βρέθηκε ότι οι ποικιλίες με τη μεγαλύτερη **περιεκτικότητα σακχάρων** ήταν το Κολλινιατικό Μαύρο και το Μπεκάρι (23,1 και 21,3 °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). Αντίθετα, οι ποικιλίες Μαύρο Σπετσών και Θράσα είχαν περιοκτικότητα σακχάρων 13,8 και 14,9 °Brix, τιμές μικρότερες από το μέσο όρο που αναφέρεται παραπάνω. Συγκρίνοντας τις μετρήσεις της **ολικής οξύτητας** των ποικιλιών που μελετήθηκαν με τον μέσο όρο ολικής οξύτητας που αναφέρει ο Σταυρακάκης(2013) (5-10 gr τρυγικού οξέος/ L γλεύκους) διαπιστώνουμε ότι όλες οι υπό μελέτη ποικιλίες είχαν πολύ μικρή περιεκτικότητα οργανικών οξέων. Η **ενεργή οξύτητα** δεν είναι ανάλογη της ολικής οξύτητας.

Σε σχετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν η περιεκτικότητα των **φλοιών** των ραγών σε **ολικές φαινολικές ενώσεις** καταγράφηκε στα 1,686 mg γαλλικού οξέος (γ.ο)/gr νωπού ιστού (v.i) για την Κουντούρα Μαύρη(179), 26,4 mg γ.ο. / gr v.i για το Syrah(180) και 31.5 mg γ.ο. / gr v.i για το Cabernetsauvignon (181). Στα **γίγαρτα** οι τιμές ήταν 4,969 mg γ.ο/gr v.i για την Κουντούρα Μαύρη (179), 383 mg γ.ο./gr ξηρού

ιστού (ξ.ι) (182) και 143 mg γ.ο./100 gr γιγάρτων (183) για το Ξινόμαυρο. Στο Cabernetsauvignon μετρήθηκαν 869 mg γ.ο./100 gr γιγάρτων (183) και 113 mg γ.ο./gr v.ι (181), στη Μανδηλαριά 2228 mg γ.α./100 gr γιγάρτων (183), στο Αγιωργίτικο 1126 mg γ.α./ 100 gr γιγάρτων (183) και 216-500 mg/100 gr γιγάρτων (184), στο Syrah 63,0 mg γ.ο./gr v.ι (180). Τέλος, οι Ivanovak.ά. (2010) κατέγραψαν 1,65 mg γ.ο./gr v.ι σε χυμό από Cabernetsauvignon.

Συγκρίνοντας την περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων των υπό μελέτη ποικιλιών (πίνακας 5) με τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών διαπιστώνουμε ότι και οι επτά ποικιλίες που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσίασαν ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα ολικών φαινολικών ενώσεων και στα τρία μέρη της ράγας. Το Μαύρο Σπετσών είχε την υψηλότερη περιεκτικότητα στους φλοιούς (16,19 mg γ.ο./gr v.ι) με σημαντική διαφορά και την δεύτερη μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα γίγαρτα (39,23 mg γ.ο./gr v.ι) με μικρή διαφορά από την Κουντούρα Μαύρη.

Οι Ivanovak.ά. (2010) σε μελέτη που πραγματοποίησαν στην ποικιλία Cabernetsauvignon μετρήσαν την περιεκτικότητα των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων. Η τιμή που καταγράφηκε στους φλοιούς ήταν 23,3 mg κατεχίνης/g v.ι και στα γίγαρτα 7,35 mg κατεχίνης/g v.ι. Οι Butkhup κ.ά. (2010) μελέτησαν την ποικιλία Syrah και βρήκαν 147,12 mg κατεχίνης/g ξ.ι στους φλοιούς και 258,69 mg κατεχίνης/g ξ.ι στα γίγαρτα.

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται πως οι υπό μελέτη ποικιλίες παρουσίασαν μέτρια έως χαμηλή περιεκτικότητα ολικών φλαβονοειδών ενώσεων και στους φλοιούς και στα γίγαρτα (πίνακας 6). Οι ποικιλίες με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα και στα δύο μέρη της ράγας ήταν το Μαύρο Σπετσών και η Κουντούρα Μαύρη. 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 Butkhup κ.ά. (2010).

Σε σχετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν ερευνήθηκε η περιεκτικότητα των φλοιών σε μεμονωμένες ανθοκυάνες. Η περιεκτικότητα σε κυανιδίνη στην ποικιλία Cabernetsauvignon εμφάνισε τιμές 0,3-0,5 mg ισοδύναμα Malvidin-3-glycosite (Mveq)/100gr ράγας (186), 0,092-0,365 mg Mveq/g ξ.ι (187), 7,3 mg/kg v.ι (110). Στο Syrah ήταν 19,1 mg/kg ράγας (188). Στο Αγιωργίτικο οι τιμές κυμάνθηκαν 0,132-0,428 mg Mveq/g v.ι (189). Στο Ξινόμαυρο οι Kallithraka κ.ά. (2005) δεν βρήκαν

καθόλου κυανιδίνη, ενώ στη Μανδηλαριά και στη Θράψα κατέγραψαν 6,9 mg/kg v.i και 4,2 mg/kg v.i, αντίστοιχα. Οι τιμές της **δελφινιδίνης** που μετρήθηκαν στο Cabernetsauvignon ήταν 4,2-5,8mgMveq/100γράγας (186), 0,956-2,222 mgMveq/g ξ.i (187), 43,9 mg/kg v.i (110), στο Syrah 160,0 mg/kg ράγας (188), στο Αγιωργίτικο 5,4-8,4 mg/ 100g v.i (184) και 1,007-2,460 mgMveq/g v.i (189) και στην Κουντούρα Μαύρη 8,0 mgMveq/kg v.i (179). Οι τιμές που βρήκαν οι Kallithraka κ.ά. (2005) στο Ξινόμαυρο ήταν 9,2 mg/kg v.i, στη Μανδηλαριά 29,9 mg/kg v.i και στη Θράψα 15,7 mg/kg v.i. Η **πετουνιδίνη** παρουσίασε τις παρακάτω περιεκτικότητες στο Cabernetsauvignon 3,2-5,0 mgMveq/100γράγας (186), 0,871-1,678 mgMveq/g ξ.i (187) και 36,2 mg/kg v.i (110), ενώ στο Syrah οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν 216,3 mg/kg ράγας (188). Στο Αγιωργίτικο παρατηρήθηκαν 3,1-20,2 mg/ 100g v.i (184) και 1,204-2,486 mgMveq/g v.i (189), στην Κουντούρα Μαύρη 12,0 mgMveq/kg v.i (179). Οι τιμές που βρήκαν οι Kallithraka κ.ά. (2005) στο Ξινόμαυρο ήταν 14,6 mg/kg v.i, στη Μανδηλαριά 43,6 mg/kg v.i και στη Θράψα 22,0 mg/kg v.i.

Η περιεκτικότητα σε **παιονιδίνη** στο Cabernetsauvignon ήταν 2,2-3,8 mgMveq/100γράγας (186), 0,468-1,020 mgMveq/g ξ.i (187) και 58,3 mg/kg v.i (110), ενώ στο Syrah οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν 183,1 mg/kg ράγας (188). Στο Αγιωργίτικο παρατηρήθηκαν 2,8-23,0 mg/ 100g v.i (184) και 0,949-2,056 mgmgMveq/gv.i (189), στην Κουντούρα Μαύρη 12,9 mgMveq/kg v.i (179). Οι τιμές που βρήκαν οι Kallithraka κ.ά. (2005) στο Ξινόμαυρο ήταν 30,7 mg/kg v.i, στη Μανδηλαριά 137,5 mg/kg v.i και στη Θράψα 67,2 mg/kg v.i. Η **μαλβιδίνη** παρουσίασε τις παρακάτω περιεκτικότητες στο Cabernetsauvignon 37,9-77,8 mgMveq/100γράγας (186), 5,599-8,946 mgMveq/g ξ.i (187) και 552,5 mg/kg v.i (110), ενώ στο Syrah οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν 1223,6 mg/kg ράγας (188). Στο Αγιωργίτικο παρατηρήθηκαν 148,6-310,8 mg/ 100g v.i (184) και 14,005-21,771 mgMveq/g v.i (189), στην Κουντούρα Μαύρη 169,2 mgMveq/kg v.i (179). Οι τιμές που βρήκαν οι Kallithraka κ.ά. (2005) στο Ξινόμαυρο ήταν 399,3 mg/kg v.i, στη Μανδηλαριά 943,5 mg/kg v.i και στη Θράψα 470,5 mg/kg v.i.

Όλες οι υπό μελέτη ποικιλίες περιείχαν τις πέντε βασικές ανθοκυάνες (μαλβιδίνη, παιονιδίνη, πετουνιδίνη, δελφινιδίνη, κυανιδίνη). Επίπρόθετα, με βάση τα παραπάνω φαίνεται πως η περιεκτικότητα τους σε **ανθοκυάνες** ήταν αυξημένη εκτός από τη Θράψα και το Μαύρο Σπετσών, που παρέμεναν σε ικανοποιητικά επίπεδα (πίνακας 7). Η μαλβιδίνη ήταν η κυρίαρχη ανθοκυάνη (0,379-0,893mg/g v.i), το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία τα αποτελέσματα της

μελέτης των 190 αλλά και με όσα αναφέρει ο Σταυρακάκης (2013) και οι Boss και Davies (2009) και οφείλεται στο γεγονός ότι καθώς ωριμάζει η ράγα οι δελφινιδίνη και κυανιδίνη μετατρέπονται στην πιο σταθερή μαλβιδίνη. Πολύ υψηλή περιεκτικότητα όλων των ανθοκυανών εμφάνισε το Κολλινιατικό Μαύρο (0,045-0,890 mg/g v.i). Αρκετά υψηλές ήταν και οι περιεκτικότητες που εμφάνισαν η Κουντούρα Μαύρη (0,007-0,893 mg/g v.i), η Δουμπραίνα Μαύρη (0,007-0,0,841) και το Μπεκάρι (0,042-0,604 mg/g v.i).

Παρακάτω παρουσιάζεται η περιεκτικότητα ολικών ανθοκυανών που μετρήθηκε σε σχετικές μελέτες. Στους φλοιούς οι τιμές που καταγράφηκαν για το *Cabernetsauvignon* ήταν 5,67 mg Mveq/g v.i (181) και 705,9 mg/kg v.i (110), για το *Αγιωργίτικο* 148,6-310,8 mg/100g v.i (184), για την *Κουντούρα Μαύρη* 394 ppm (179) και για το *Ξινόμαυρο*, τη *Μανδηλαριά* και τη *Θράψα* ήταν 545,8 mg/kg v.i, 1470,8 mg/kg v.i και 697 mg/kg v.i, αντίστοιχα (110). Σε χυμό *Cabernetsauvignon* οι Kyraleou κ.α. (2016) μέτρησαν 0,02 mg Mveq/L και οι Revilla κ.α. (1998) 990,8 mg Mveq/kg νωπής ράγας. Σε γλεύκος από ολόκληρες ράγες της ποικιλίας *Syrah* καταγράφηκε τιμή 2297,6 mg/kg v. ράγας (188), σε *Αγιωργίτικο* 0,467-0,936 mg/g ράγας (189).

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται πως όλες οι υπό μελέτη ποικιλίες εμφανίζουν αυξημένη περιεκτικότητα ολικών ανθοκυανών (πίνακας 8). Πολύ μεγάλη περιεκτικότητα ολικών ανθοκυανών εμφανίζει το Κολλινιατικό Μαύρο. Κατά συνέπεια, λαμβάνοντας υπόψη τις μετρήσεις των μεμονομένων ανθοκυανών και των ολικών ανθοκυανών φαίνεται πως το Κολλινιατικό Μαύρο έχει πολύ μεγάλη περιεκτικότητα ανθοκυανών με διαφορά από τις υπόλοιπες υπό εξέταση ποικιλίες, αλλά και από τις περισσότερες που αναφέρονται βιβλιογραφικά. Ακολούθως, αυξημένη περιεκτικότητα ανθοκυανών έχουν και οι ποικιλίες Κουντούρα Μαύρη, Μπεκάρι, Δουμπραίνα Μαύρη και Μπακούρι. Οι ποικιλίες Θράψα και Μαύρο Σπετσών υπολείπονται ως προς την περιεκτικότητα σε ανθοκυανές από τις υπόλοιπες υπό εξέταση ποικιλίες, όχι όμως κι από τις ποικιλίες που αναφέρονται βιβλιογραφικά.

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 (180), του *Αγιωργίτικου* 23,925-44,764 mg κατεχίνης/ gr v.i (189), της *Κουντούρας Μαύρης* 21 ppm (179) και στο *Ξινόμαυρο* 87,05-95,50 mg κατεχίνης/ g ξηρού ιστού (191). Στα γίγαρτα οι τιμές

που καταγράφηκαν για το *Syrah* ήταν 52.2 mg κατεχίνης/ gr v.i (180), για το *Αγιωργίτικο* 47,279 έως 65,721 mg κατεχίνης/ gr v.i (189), για την *Κουντούρα Μαύρη* 3,775 ppm (179) και για το *Ξινόμαυρο* 37,5-149,1 mg κατεχίνης/ g ξηρού ιστού (192) και 65,22-78,19 mg κατεχίνης/ g ξηρού ιστού (191). Στο χυμό της *Κουντούρα Μαύρη* ήταν 31 ppm (179).

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται πως όλες οι ποικιλίες που μελετήθηκαν παρουσίασαν μεγάλη περιεκτικότητα συμπυκνωμένων ταννινών (πίνακας 9) στους φλοιούς και στα γύγαρτα. Οι ποικιλίες Κουντούρα Μαύρη, Μαύρο Σπετσών, και Μπεκάρι παρουσίασαν τις μεγαλύτερες τιμές στα γύγαρτα. Τις μεγαλύτερες τιμές στους φλοιούς τις παρουσίασαν το Μαύρο Σπετσών και το Μπεκάρι.

Σε σχετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν ερευνήθηκε η περιεκτικότητα των φλοιών σε μεμονωμένες φλαβανόλες. Η περιεκτικότητα σε κατεχίνη στην ποικιλία *Cabernetsauvignon* εμφάνισε τιμές 0,008-0,033 mg/g ξ.ι (187). Στο *Ξινόμαυρο* ήταν 0,041-0,117 mg/g ξ.ι (191), ενώ στη *Μανδηλαριά* δεν ήταν ανιχνεύσιμη (193). Οι τιμές της επικατεχίνης που μετρήθηκαν στο *Cabernetsauvignon* ήταν 0,003-0,013 mg/g ξ.ι (187). Στο *Ξινόμαυρο* διακυμάνθηκε σε 0,008-0,056 mg/g ξ.ι (191), ενώ στη *Μανδηλαριά* δεν ήταν ανιχνεύσιμη (193). 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. Η προκυανιδίνη B1 στο *Cabernetsauvignon* διακυμάνθηκε σε 0,001-0,015 mg/g ξ.ι (187) Στο *Ξινόμαυρο* ήταν 0,012-0,042 mg/g ξ.ι (191), ενώ στη *Μανδηλαριά* δεν ήταν ανιχνεύσιμη (193). Η προκυανιδίνη B2 δεν ήταν ανιχνεύσιμη στο *Cabernetsauvignon* (187) και στη *Μανδηλαριά* (193). Στο *Ξινόμαυρο* παρουσίασε περιεκτικότητα 0,010-0,037 mg/g ξ.ι (191). Τέλος, στο *Αγιωργίτικο* ο Τσαπάρας (2013) μέτρησε τις προκυανιδίνες B1+ B2 + B3 μαζί και η τιμή που βρήκαν ήταν 0,0234-0,0652 mg/g v.i.

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 (πίνακας 10) και ιδιαίτερα της κατεχίνης. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα όσα αναφέρουν οι PastordelRio και Kennedy (2006) και Souquet κ.ά. (1996) ότι στους φλοιούς η κυρίαρχη φλαβανόλη είναι η επικατεχίνη και η κατεχίνη υπολείπεται. Από τις 7 ποικιλίες το Μαύρο Σπετσών έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα με διαφορά

από τις υπόλοιπες. όπως επίσης συγκριτικά μεγάλη περιεκτικότητα είχε και η Δουμπραίνα Μαύρη

Παρακάτω παρουσιάζεται η περιεκτικότητα **ολικών φλαβονολών** που μετρήθηκε σε σχετικές μελέτες. Στους **φλοιούση** περιεκτικότητα του Cabernetsauvignon 2,62 mg κατεχίνης/g v.i (181) και 252 mg κατεχίνης/100 g ξ.ι (168). Στο Syrah οι τιμές κυμάνθηκαν από 2,39-7,48 mg/g v.i (180). Στο Αγιωργίτικο η περιεκτικότητα που μετρήθηκε ήταν 19,708-38,121 mg κατεχίνης/g v.i (189). Στα **γίγαρτα** οι τιμές που καταγράφηκαν για το Cabernetsauvignon ήταν 17,2 mg κατεχίνης/g v.i. (181) και 5312 mg κατεχίνης/100 g ξ.ι (168). Στην ποικιλία Syrah οι τιμές κυμάνθηκαν από 16,94-29,68 mg/g v.i. (180) και στο Αγιωργίτικο 40,596-49,523 mg κατεχίνης/g v.i. (189). και σε Ξινόμαυρο 0,385-0,545 mg/ g v. ράγας (191). Οι Guendez κ.ά. (2005) σε μελέτη που πραγματοποίησαν υπολόγισαν το άθροισμα των επιμέρους φλαβονολών στα **γίγαρτα**. Στο Cabernetsauvignon 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 Μανδηλαριάς 953,5 mg/100 g v.i. Επίσης, στη Μανδηλαριά οι Anastasiadi κ.ά. (2010) υπολόγισαν το άθροισμα σε 1276,21 mg/100 g ξ.ι.

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι οι ποικιλίες που μελετήθηκαν παρουσιάζουν αυξημένη περιεκτικότητα σε ολικές φλαβονόλες (πίνακας 11) και στους φλοιούς και στα γίγαρτα. Επιβεβαιώνεται ότι τα γίγαρτα έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα φλαβονολών 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). Την μεγαλύτερη περιεκτικότητα στους φλοιούς την είχε το Μαύρο Σπετσών (9,84 mg κατεχίνης/g v.i) γεγονός που βρίσκεται σε αντιστοιχία με τις μετρήσεις των μεμονομένων φλαβονολών.

Σε σχετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν ερευνήθηκε η περιεκτικότητα των φλοιών σε μεμονωμένες φλαβόνες και φλαβονόλες. Η περιεκτικότητα σε **κερκετίνη** στην ποικιλία Cabernetsauvignon εμφάνισε τιμές 0,60 mg/100g ξ.ι (49), στο Syrah 0,50 mg/100g ξ.ι (185) και στη Μανδηλαριάς 21,28 mg/100g ξ.ι (193). Οι τιμές της **ρουτίνης** που μετρήθηκαν στο Cabernetsauvignon ήταν 88,6 mg/100g ξ.ι (49) και 25,91 mg/100g ξ.ι (168). Το Syrah εμφάνισε τιμή 40,05 mg/100g ξ.ι (185). Τέλος, η περιεκτικότητα της **λουτεολίνης** ήταν 0,14 mg/100g ξ.ι (185).

Συγκρίνοντας τις υπό εξέταση ποικιλίες με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας φαίνεται πως όλες έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε φλαβόνες και φλαβονόλες (πίνακας 12), ιδιαίτερα λουτεολίνη και ρουτίνη. Η Δουμπραίνα

Μαύρη και το Μπεκάρι είναι οι ποικιλίες που έχουν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λουτεολίνη (1979,94 και 1290,96 µg/g ν.ι, αντίστοιχα) και ρουτίνη (901,3 και 1328,24 µg/g ν.ι, αντίστοιχα). Επίσης, εξετάζοντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων των ολικών φλαβονών και φλαβονολών διαπιστώνεται ότι η περιεκτικότητά τους είναι μεγαλύτερη στους φλοιούς από τα γίγαρτα. Η κατανομή αυτή στα μέρη της ράγας είναι αντίστροφη από τις φλαβανόλες.

Οι Butkhurk.ά. (2010) σε σχετική μελέτη βρήκαν την περιεκτικότητα γαλλικού οξέος στους φλοιούς της ποικιλίας *Syrah* 16,45 mg/100g ξ.ι. Στο *Αγιωργίτικο* ο Γσαπάρας (2013) βρήκε 0,0064-0,0129 mg γ.ο./g ν.ι στους φλοιούς. Οι Anastasiadik.ά. (2010) βρήκαν στους φλοιούς *Μανδηλαριάς* 0,17 mg γ.ο./100g ξ.ι.

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι όλες οι υπό μελέτη ποικιλίες έχουν μικρή περιεκτικότητα γαλλικού οξέος (πίνακας 14) στους φλοιούς τους. Πολύ χαμηλή περιεκτικότητα είχαν το Μαύρο Σπετσών (0,16 µg/g ν.ι) καθώς και το Μπακούρι, η Κουντούρα Μαύρη και η Θράσα που είχαν περιεκτικότητα 0,20 µg/g ν.ι.

Οι Butkhurk.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 Anastasiadik.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 καφεϊκό οξύ και σε φερουλικό οξύ (πίνακας 15) κυμαίνεται σε κανονικά επίπεδα με εξαίρεση τη Θράσα που είχε πολύ χαμηλή περιεκτικότητα φερουλικού οξέος (3,46 µg/g ν.ι, αντίστοιχα). Όλες οι ποικιλίες παρουσίασαν υψηλή περιεκτικότητα καφταρικού οξέος (πίνακας 16), γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με όσα αναφέρουν οι DiStefano και Flamini (2008) ότι το καφταρικό οξύ υπερτερεί του κουταρικού και του φερταρικού.

Οι Iacopinik.a. (2008) μελετήσαν την ποικιλία *Cabernetsauvignon* και μέτρησαν την περιεκτικότητα της **ρεσβερατρόλης** 25,5 mg/100g ξ.ι. Οι Butkhurk.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 Anastasiadik.ά. (2010) βρήκαν ότι οι φλοιοί ραγών *Μανδηλαριάς* είχαν περιεκτικότητα **trans-ρεσβερατρόλης** 3,60 mg/100g ξ.ι.

Συγκρίνοντας της υπό μελέτη ποικιλίες (πινακας 17) με τις βιβλιογραφικές αναφορές φαίνεται ότι όλες οι ποικιλίες έχουν υψηλή περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης και ε-βινιφερίνης. Τέλος, φαίνεται ότι την μεγαλύτερη περιεκτικότητα και στα τρία στιλβένια που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη την είχαν το Κολλινιάτικο Μαύρο και το Μπεκάρι.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να μελετηθεί το φαινολικό και ανθοκυανικό δυναμικό των σπάνιων γηγενών οινοποιήσιμων ερυθρών ποικιλιών αμπέλου (*Vitisvinifera*) Κολλιιάτικο Μαύρο, Μπεκάρι, Μπακούρι, Κουντούρα Μαύρη, Δουμπραίνα Μαύρη, Θράψα και Μαύρο Σπετσών. Με βάση τα αποτελέσματα και τη συζήτηση φαίνεται ότι και οι επτά αυτές ποικιλίες έχουν αυξημένη περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες και φαινολικές ενώσεις. Όμως όλες έχουν πολύ χαμηλή ολική οξύτητα. Ένω ως προς την περιεκτικότητα των σακχάρων βρίσκονται σε ικανοποιητικά επίπεδα.

Όσον αφορά τις χρωστικές ενώσεις το Κολλιιάτικο Μαύρο είχε πολύ μεγάλη περιεκτικότητα ανθοκυανών με μεγάλη διαφορά από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Αρκετά μεγάλη περιεκτικότητα παρουσίασαν και οι Κουντούρα Μαύρη, Δουμπραίνα Μαύρη και Μπεκάρι. Μεγάλη περιεκτικότητα φλαβονολών στους φλοιούς είχε το Μπεκάρι και στα γίγαρτα η Κουντούρα Μαύρη. Ενώ μικρότερες περιεκτικότητες χρωστικών είχαν η Θράψα και το Μαύρο Σπετσών.

Όσον αφορά τις μη χρωστικές φαινολικές ενώσεις τις μεγαλύτερες περιεκτικότητες σε όλες τις μετρήσεις που έγιναν και αφορούσαν τις φλαβανόλες και τις συμπυκνωμένες ταννίνες είχε το Μαύρο Σπετσών και ακολούθως η Κουντούρα Μαύρη και το Μπεκάρι. Ενώ μικρότερες τιμές είχαν το Κολλιιάτικο Μαύρο και το Μπακούρι. 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 η Κουντούρα Μαύρη και το Μαύρο Σπετσών και 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 συνοινοποίηση με άλλες ερυθρές ποικιλίες για την παραγωγή οίνων με έντονο χρώμα και υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβανόλες.
- Το Κολλιιάτικο Μαύρο φαίνεται να είναι η ποικιλία με τη μεγαλύτερη δυνατότητα να οδηγήσει στην παραγωγή οίνου με πολύ έντονο χρώμα.

- Το Μαύρο Σπετσών φαίνεται να είναι η ποικιλία με τη μεγαλύτερη δυνατότητα να οδηγήσει σε παραγωγή οίνου με μεγάλη περιεκτικότητα σε φλαβανόλες.
- Η Κουντούρα Μαύρη και το Μπεκάρι είναι πιθανά οι δύο ποικιλίες από αυτές που μελετήθηκαν που δίνουν τον καλύτερο συνδυασμό σε έντονο χρώμα και περιεκτικότητα σε φλαβανόλες.
- Είναι πιθανό πως οι ποικιλίες, Κουντούρα Μαύρη, Μπεκάρι,Κολλινιατικό Μαύρο και Μαύρο Σπετσών έχουν το φαιολικό και ανθοκυανικό δυναμικό για την παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας και αντοχής στην παλαίωση με την προϋπόθεση να συνοινοποιηθούν με κάποια ερυθρή ποικιλία η οποία θα έχει υψηλή ολική οξύτητα.

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 (*Vitisvinifera*) Μανδηλαριά, Αγιωργίτικο, Cabernetsauvignon και Syrah.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) ALLEWELDT G., ENGEL M., GEBBING H., 1981. Historical investigations with grapevine berries. *Vitis* 20:1-7
- 2) ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ Γ., 2005α. Σημειώσεις /Εργαστηριακές Ασκήσεις Οινολογίας Ι, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, στο 7 σελ 6-10
- 3) ΚΟΥΡΑΚΟΥ - ΔΡΑΓΩΝΑ Σ., 1998. Θέματα Οινολογίας. Εκδ: Τροχαλία, Αθήνα, στο 7 σελ. 6-9,37, στο 47 σελ. 14, 16, 26-28
- 4) ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ Μ.Ν. 2013. Αμπελουργία. Εκδ. Τροπή, Αθήνα, 118-121, 209, 211, 228-235, 243
- 5) ΣΟΥΦΛΕΡΟΣΕ.ΗΡ., 1997. Οινολογία. Επιστήμη και Τεχνολογία, Τόμος Ι. Θεσσαλονίκη, 66, 191, 205
- 6) RIBERAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONECHE B., LONVAUD A., 2006. Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications. Ed: 2nd John Wiley & Sons, Ltd, 43, 66, 243, 244 255, 256
- 7) 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 (*Vitisvinifera*L.).Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 8, 9, 37, 40, 41, 42
- 8) 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
- 9) KLIEWER W.M., 1970. Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes. *J. Food Sci.*, 35: 17-21
- 10) 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
- 11) KLIEWER 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
- 12) KRUEGER R., KLIEWER 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
- 13) WINKLER A.J., COOK J.A., KLIEWER W.M., LIDER, L.A., 1974. General Viticulture. Ed: 2nd, University of California press, Berkeley, στο 7 σελ 22
- 14) ROUBELAKIS-ANGELAKIS A.K., KLIEWER 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
- 15) 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

- 16) ROUBELAKIS-ANGELAKISA.K., KLIEWER W.M., 1978B. Enzymes of Krebs - Henseleit cycle in *Vitis vinifera* L. II. Arginosuccinate synthetase and lyase. *Plant Physiol.*, 62: 340-343
- 17) ΔΙΑΜΑΝΤΙΔΗΣΧ.Γ., 1994a. Ο κύκλος του αζώτου, στο 7 σελ. 22
- 18) RAINS D.W., 1989. Plant tissue and protoplast culture: application to stress physiology and biochemistry, στο 7 σελ. 20
- 19) 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
- 20) RHODES D., VERSLUES P.E., SHARP R.E., 1999. Role of amino acids in abiotic stress resistance, στο 7 σελ. 20
- 21) OZTURK L., DEMIR Y., 2002. In vivo and in vitro protective role of proline. *Plant Growth Reg.*, 38: 259-264
- 22) 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.
- 23) 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
- 24) DELAUNEY A. J., VERMA D. P. S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*, 4: 215–223
- 25) 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
- 26) SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.*, 115: 327–334
- 27) 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
- 28) ZHU J. K., 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4: 401–406
- 29) ZHU J. K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 247–273.
- 30) THOMASHOW M.F., 1999. Plant cold acclimation:freezing tolerance genes and regulatory mechanisms, στο 7 σελ. 21
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
 - 34) 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
 - 35) BELLA.A., OUGH.C.S., KLIEWER 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
 - 36) 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
 - 37) 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
 - 38) OUGH, C.S., STASHAK, R.M., 1974. Further studies on proline concentration in grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 25: 7-12
 - 39) DI STEFANO R., FLAMINI R., 2008. *Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry*. CRA, Viticulture Research Center, Conegliano Veneto, Italy, 33
 - 40) 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
 - 41) RIBERAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONECHE B., LONVAUD A., 2006. *Handbook of Enology, Volume 2, The chemistry of wine stabilization and treatments*. Ed: 2nd John Wiley & Sons, Ltd, 141, 142
 - 42) RENAUD S., DE LORGERIL M., 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339(8808), 1523
 - 43) 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
 - 44) GOMEZ-ALONSO S., GARCIA-ROMERO E., HERMOSÍN-GUTIÉRREZI., 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.
 - 45) PIETTA P.G., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042
 - 46) ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ Α., 2016. Μελέτη της χημικής σύστασης ερυθρών οίνων κατά την οξειδωτική τους ωρίμαση. *Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών*, 56,57

- 47) KALLITHRAKA S., TSOUTSOURAS E., TZOUROU E., LANARIDIS P., 2006. Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry*, 99: 784–793
- 48) JACKSON, R. S., 2008. *Wine science: principles and applications*. Amsterdam: Elsevier, στο 46 σελ. 27,28
- 49) 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.
- 50) 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
- 51) 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
- 52) 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
- 53) 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
- 54) 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.
- 55) TERRIERN., PONCET-LEGRAND C., CHEYNIER V., 2009. Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. *Wine Chemistry and Biochemistry*, Chapter 9B. Ed: Moreno-Arribas M.V.-Polo M.C., 465,473
- 56) 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
- 57) KOMESD., BELSCAK-CVITANOVICA., 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
- 58) CHEYNIER V., MOUTOUNET M., SARNI-MANCHADO P., 1998. *Les composés phénolique* Lavoisier press, Enologie, 123–162
- 59) WANGS.P., HUANGK.J., 2004. Determination of flavonoids by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 1032: 273–279
- 60) SU C., SINGLETON V., 1969. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry*, 8: 1553–1558

- 61) 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
- 62) 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
- 63) ΣΟΥΦΛΕΡΟΣ Ε.Η., 2000 Οινολογία: επιστήμη και τεχνολογία. Θεσσαλονίκη, στο 7 σελ. 38
- 64) 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
- 65) 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
- 66) PASTORDEL RIOJ.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
- 67) 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
- 68) SOUQUET J.M., CHEYNIER V., BROSSAUD F., MOUTOUNET M., 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. Phytochemistry, 43(2): 509–512
- 69) 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
- 70) 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
- 71) MAZZA G., MINIATI E., 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Ed: CRC, Boca Raton
- 72) 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
- 73) 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
- 74) KENNEDY J.A., MATTHEWS M.A., WATERHOUSE A.L., 2000. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. Phytochemistry, 55:77-85

- 75) ROMEYERF., MACHEIX J.J., SAPIS J.C., 1986. Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds, στο 55 σελ. 472
- 76) 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.
- 77) 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
- 78) HASLAM E., 1998. Taste, bitterness and astringency, στο 80 σελ. 551
- 79) DE WIJK R.A., PRINZ, J.F., 2005. The role of friction in perceived oral texture, στο 80 σελ 551
- 80) 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
- 81) ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ Σ., 2016. Χημεία Οίνου, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 82) 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
- 83) 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
- 84) 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
- 85) 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
- 86) 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
- 87) MONAGAS M., BARTOLOME B., 2009. Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Compounds. *Wine Chemistry and Biochemistry*, Chapter 9A. Ed: Moreno-Arribas M.V.- Polo M.C.
- 88) ROGGERO J.P., COEN S., LARICE J.L., 1986. Etude comparative de la composition anthocyanique des cepages, στο 85 σελ 440
- 89) 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
- 90) 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

- 91) 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
- 92) ORTEGA MEDER M.D., RIVAS GONZALO J.C., VICENTE J.L., SANTOSBUELGA C., 1994. Differentiation of grapes according to the skin anthocyanin composition, στο 85 σελ. 441
- 93) 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
- 94) 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
- 95) 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
- 96) 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
- 97) BROUILLARD R., 1982. Chemical structure of anthocyanins, στο 85 σελ. 441
- 98) RENTZSCHM., 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
- 99) 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
- 100) 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
- 101) 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
- 102) 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
- 103) LANGCAKE P., 1981. *Physiol. Plant Pathol.*, 18, 213 στο 41 σελ. 144
- 104) 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
- 105) 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
- 106) TZAMOΞE., 2007. Φυτοπαθολογία, Βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής: Φυτοαλεξίνες. Εκδ: Σταμούλης, 389
- 107) PERRONE G., NICOLETTI L., 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
- 108) 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
- 109) 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
- 110) 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
- 111) 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
- 112) LANDRAULT N., LARRONDEF., 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
- 113) VITRAC X., BORNET A., VANDERLINDE R., VALLS J., RICHARD T., DELAUNAY J.C., MERILLON, J.M., TEISSEDRE P.L., 2005. Determination of stilbenes (δ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5664–5669
- 114) 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
- 115) PRYCE R.J., LANGCAKE P., 1977. α -Viniferin: An antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry*, 16: 1452–1454
- 116) BOSSP.K., DAVIES C., 2009. Molecular biology of anthocyanin accumulation in grape berries, *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Ed: Roubelakis-Angelakis K.A., 265-268
- 117) 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

- 118) MOUSTAFA E, WONG E., 1967. Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed. *Phytochemistry*, 6:625-632
- 119) KUHN B., FORKMANN G., SEYFFERT W., 1978. Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in *Callistephus chinensis*. *Planta*, 138:199-203
- 120) 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
- 121) STAFFORD H.A., LESTER H.H., 1982. Enzymic and nonenzymic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3,4-diol. *Plant Physiol* 70:695-698
- 122) 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
- 123) LARSON R.L., COE E.H., 1977. Gene-dependent flavonoid glucosyltransferase in maize. *Biochem. Genet.*, 15:153-156
- 124) 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
- 125) 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
- 126) STRACK D., WRAY V., 1994. The anthocyanins. In: Harborne JB (ed) *The Flavonoids*. Chapman & Hall/CRC Press, Washington DC
- 127) MARRS K.A., 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47:127-158
- 128) 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
- 129) 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
- 130) 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
- 131) 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
- 132) 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
- 133) 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
- 134) CREASY L.L., COFFEE M., 1988. Phytoalexin production potential of grape berries. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 113:230-234
- 135) 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
- 136) 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
- 137) 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
- 138) 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
- 139) 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.
- 140) 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
- 141) 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
- 142) JOGAI A.H.S., POOJAD., PANDURANGG., 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.
- 143) 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
- 144) 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

- 145) 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
- 146) 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
- 147) 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
- 148) 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
- 149) MORI K., SUGAYA S., GEMMA H., 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci, Horticult.*, 105:319-330
- 150) 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
- 151) 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
- 152) COOMBE B.G., DRY P.R., 1992. *Viticulture. Volume 2. Practices. Winetitles.* Adelaide, 376
- 153) 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
- 154) 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
- 155) OJEDA H., ANDARYC., 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
- 156) 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
- 157) KELLER M., 2005. Grape ripening and determination of grape maturity. 33rd Annual New York Wine, Industry Workshop, 119-123
- 158) 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
- 159) 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
- 160) 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
- 161) BAVARESCO L., PEZZUTTO S., GATTI M., MATTIVI F. 2007. Role of the variety and some environmental factors in grape stilbenes. *Vitis*, 46:57-61
- 162) 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
- 163) ΚΡΙΜΠΙΑΣΒ.Δ., 1943. Ελληνική Αμπελογραφία, τόμος Ι. σελ 137, 161-162
- 164) ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣΜ.Ν., 2015. Αμπελογραφία. Εκδ: Τροπή, σελ. 155
- 165) ΝΙΚΟΛΑΟΥΝ.Α., 2012. Αμπελογραφία. Εκδ: Σύγχρονη Παιδεία, σελ 228-229
- 166) ΝΕΟΦΥΤΟΥΣ., 2005. Αμπελογραφική περιγραφή ορισμένων ελληνικών ποικιλιών της αμπέλου (*Vitisvinifera*L.) με τον κώδικα αμπελογραφικής περιγραφής του Ο.Ι.Β. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Σελ. 107
- 167) OUGH C.S., 1969. Rapid determination of proline in grapes and wine. *J. Food Sci.*, 34:228-30
- 168) 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
- 169) 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
- 170) 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
- 171) 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
- 172) 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

- 173) 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
- 174) 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
- 175) 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
- 176) THIES M., FISCHER R., 1971. A new colour reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4- dimethylaminocinnamaldehyde. *Στο J. Chromatogr.*, 467: 185-193
- 177) 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
- 178) 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
- 179) 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
- 180) 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
- 181) 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
- 182) APOSTOLOU A., STAGOS D., GALITSIU E., SPYROU A., HAROUTOUNIAN S., PORTESIS N., TRIZOGLU 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
- 183) 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

- 184) 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
- 185) BUTKHUPL., CHOWTIVANNAKULS., GAENSAKOOR., PRATHEPHAP., SAMAPPITOS., 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
- 186) 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
- 187) LORRAIN B., CHIRA K., TEISSEGRE 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
- 188) 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
- 189) ΤΣΑΠΑΡΑΣ 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
- 190) 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
- 191) KYRALEOU M., KALLITHRAKA S., KOUNDOURAS S., CHIRA K., HAROUTOUNIANS., 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
- 192) 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
- 193) ANASTASIADIM., 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