

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΠΟΥ
ΠΡΟΕΡΧΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ
ΜΕΤΑΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ**

ΜΑΡΙΑ Σ. ΚΥΡΑΛΕΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ

ΑΘΗΝΑ 2019



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Περίληψη

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα ενώσεων των ερυθρών οίνων καθώς συμβάλλουν σημαντικά στην ποιότητά τους. Εξαιτίας της σημασίας των ενώσεων αυτών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων όπως το χρώμα, η στυπτικότητα και η πικράδα, γίνεται προσπάθεια διαχείρισής τους από τους αμπελουργούς και τους οινοπαραγωγούς, στο αμπέλι και στην οινοποίηση αντίστοιχα. Η σύσταση των φλοιών και των γιγάρτων των ραγών έχει σημαντική συνεισφορά, κυρίως στους ερυθρούς οίνους, καθώς από αυτά εκχυλίζονται τα φαινολικά συστατικά στο γλεύκος κατά τη διαδικασία της οινοποίησης. Στην παρούσα έρευνα έγινε συλλογή σταφυλιών των ποικιλιών Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά, Κοτσιφάλι, Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας για δύο συνεχόμενα έτη (2017 και 2018). Στα δείγματα εφαρμόστηκε σειρά αναλύσεων με σκοπό τον χαρακτηρισμό των ραγών και τον προσδιορισμό της περιεκτικότητάς τους σε φαινολικά συστατικά. Προσδιορίστηκε και αναλύθηκε το προφίλ των ανθοκυανών και το προφίλ της δομής των ταννινών με στόχο την κατανόηση της φαινολικής σύστασης της κάθε ποικιλίας και τον διαχωρισμό τους με βάση τα χαρακτηριστικά αυτά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι ποικιλίες διαφοροποιήθηκαν κυρίως με βάση τη σύσταση των φλοιών τους, και λιγότερο από τη σύσταση των γιγάρτων, με σημαντικότερη την επίδραση της ποικιλίας στο προφίλ των ανθοκυανών των ραγών.

Επιστημονικό πεδίο: Αμπελουργία, Οινολογία

Λέξεις κλειδιά: Φαινολικά συστατικά, Terroir, Ανθοκυάνες, Ταννίνες, Σταφύλια, Ελληνικές ποικιλίες, Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά, Κοτσιφάλι, Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	III
Περιεχόμενα	V
Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή	1
Κεφάλαιο 2^ο: Θεωρητικό υπόβαθρο	3
2.1 Ελληνικές Ποικιλίες.....	3
2.2 Φαινολικά συστατικά των σταφυλιών και οίνων	6
2.2.1 Φλαβανόλες.....	7
2.2.2 Ανθοκυάνες.....	9
2.3 Αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων	11
Κεφάλαιο 3^ο: Πειραματική Διαδικασία	15
3.1 Πειραματικό πλάνο.....	15
3.2 Χαρακτηρισμός της χημικής σύστασης της ράγας.....	16
3.3 Εκχύλιση και προσδιορισμός των ανθοκυανών των φλοιών	17
3.4 Εκχύλιση και προσδιορισμός των ταννινών των φλοιών και των γιγάρτων	17
3.5 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των φλοιών και των γιγάρτων.....	19
3.6 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	20
Κεφάλαιο 4^ο: Αποτελέσματα και Συζήτηση	21
4.1 Χαρακτηριστικά των ραγών	21
4.2 Ταννίνες των φλοιών και των γιγάρτων.....	23
4.3 Χαρακτηρισμός της δομής των ταννινών.....	26
4.4 Ανθοκυάνες των φλοιών.....	32

4.5 Προφίλ των Ανθοκυανών	34
4.6 Αντιοξειδωτική ικανότητα των ταννινών και των ανθοκυανών	38
Κεφάλαιο 5 ^ο : Συμπεράσματα.....	41
Βιβλιογραφία	46

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

Η παρούσα μεταδιδακτορική μελέτη με θέμα 'Προσδιορισμός της Φαινολικής σύστασης των σταφυλιών που προέρχονται από ελληνικές ερυθρές ποικιλίες της αμπέλου' έχει ως αντικείμενο τη φαινολική περιγραφή πέντε ελληνικών ερυθρών ποικιλιών που καλλιεργούνται στις πιο αντιπροσωπευτικές αμπελοοινικές περιοχές της Ελλάδας.

Οι ελληνικοί ερυθροί οίνοι παράγονται από γηγενείς αλλά και από τις αποκαλούμενες "διεθνείς" ποικιλίες, ορισμένες από τις οποίες είναι το Cabernet Sauvignon, το Merlot και το Syrah, γνωστές για την απόδοσή τους σε ποιοτικούς οίνους (Arnous, Makris, and Kefalas 2002; Kallithraka et al. 2014). Οι στόχοι της αμπελοργίας και της οινοποίησης χρειάζεται να προσαρμοστούν στις σύγχρονες προκλήσεις. Ο μεγάλος ανταγωνισμός στην αγορά κατευθύνει την παραγωγή οίνων με ξεχωριστά χαρακτηριστικά, δίνοντας έμφαση στην αποκλειστικότητα των ποικιλιών και του terroir.

Το περιεχόμενο σε ανθοκυάνες και σε φαινολικά συστατικά έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε πολλά φυτά αλλά και στο σταφύλι. Υπό το πρίσμα της ανάδειξης των ελληνικών ερυθρών ποικιλιών, η έρευνα της φαινολικής σύστασης των σταφυλιών τους είναι περιορισμένη (Kallithraka, A A A Mohdaly, et al. 2005; Kyraleou et al. 2015; Petropoulos et al. 2017) και πολλές από τις ιδιότητες που φέρουν παραμένουν απροσδιόριστες. Αντίθετα, στη βιβλιογραφία συναντώνται εκτενείς μελέτες αναφορικά με το φαινολικό δυναμικό των διεθνών ποικιλιών.

Η γνώση του φαινολικού περιεχομένου μιας ποικιλίας θεωρείται ικανή να παρέχει κατευθύνσεις ως προς τις καλλιεργητικές επεμβάσεις και τη φροντίδα του αμπελώνα αλλά και τις τεχνολογικές-οινοποιητικές τεχνικές που πρέπει να εφαρμοστούν, ώστε να εκμεταλλεύονται με βέλτιστο τρόπο τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της. Η επιμέρους μελέτη των φαινολικών ενώσεων των ραγών είναι καθοριστικής σημασίας για την φαινολική ωρίμανση του καρπού καθώς και την ποιότητα ενός οίνου και θα μπορούσε να αποτελέσει εργαλείο για τη συγκομιδή και οινοποίηση μιας δεδομένης ποικιλίας.

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην προσπάθεια για θεμελίωση μιας βάσης δεδομένων των ποικιλιών του ελλαδικού χώρου, η οποία θα αποτελέσει βοήθημα στον τρόπο διαχείρισης της πρώτης ύλης υπό το πρίσμα παραγωγής αξιόλογων οίνων.

Για να την περιγραφή των ποικιλιών έγινε χαρακτηρισμός των ραγών, προσδιορισμός των μονομερών ανθοκυανών, προσδιορισμός των φαινολικών που ενώνονται με πρωτεΐνες και συνεισφέρουν στην στυπτικότητα, αξιολόγηση της δομής των ταννινών καθώς και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν δείγματα ραγών στο στάδιο της

ωρίμανσης από πέντε ποικιλίες, Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά, Κοτσιφάλι, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο για δύο συνεχόμενες καλλιεργητικές περιόδους 2017 και 2018. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν σε συνεργασία με διάφορα οινοποιεία την ημέρα της συγκομιδής του κάθε αμπελοτεμαχίου και μεταφέρθηκαν στο χώρο του εργαστηρίου Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την διεξαγωγή των αναλύσεων.

Κεφάλαιο 2^ο: Θεωρητικό υπόβαθρο

2.1 Ελληνικές Ποικιλίες

Στις ελληνικές αμπελογραφικές συλλογές αναγράφονται περισσότερες από 550 ελληνικές ποικιλίες, συμπεριλαμβανομένων των συνωνύμων, των κλώνων και των παραλλαγών τους. Η Ελλάδα χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία κλίματος και εδαφικών συνθηκών (Σουφλερός, 2015). Ο συνδυασμός τους μάλιστα, έχει συνεισφέρει στην καλλιέργεια εγχώριων ποικιλιών σταφυλιών με ιδιαίτερους χαρακτήρες ποιότητας. Στη συγκεκριμένη διατριβή, μελετώνται πέντε γηγενείς ερυθρές ποικιλίες σταφυλιών οινοποίησης που προέρχονται από νησιωτικούς και ηπειρωτικούς αμπελώνες. Η κάθε ποικιλία αμπέλου χαρακτηρίζεται από έναν αριθμό σύμφωνα με τον Διεθνή Κατάλογο Ποικιλιών (Variety Number of Vitis International Variety Catalogue, VIVC)

Μαυροτράγανο (VIVC 40210)

Πρόκειται για εκλεκτή, άγνωστης προέλευσης ερυθρή ποικιλία οινοποίησης του κυκλαδίτικου αμπελώνα. Το όνομά της οφείλεται στο βαθύ, μαύρο χρώμα του φλοιού και την πολύ τραγανή, συνεκτική ράγα. Η καλλιέργειά της συνίσταται για τα νησιά Θήρα και Θηρασιά, αλλά επιτρέπεται στο σύνολο του Κυκλαδίτικου συμπλέγματος. Το γλεύκος της ποικιλίας χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, σχετικά υψηλή οξύτητα και pH μεταξύ 3,3-3,4. Θεωρείται πως το βέλτιστο των αρωμάτων και του χρώματος επιτυγχάνεται όταν οι ράγες συλλεχθούν λίγο μετά την πλήρη ωρίμανσή τους (10-20 Αυγούστου). Τις τελευταίες δεκαετίες η καλλιέργειά της έχει επεκταθεί στην ηπειρωτική Ελλάδα (Μακεδονία) λόγω του διακριτικού αρώματος, του ιδιαίτερου έντονου χρώματος και των προοπτικών παλαίωσης που χαρακτηρίζει τους οίνους (Σταυρακάκης Μ.,2010).



Εικόνα 2.1 Μαυροτράγανο

Μανδηλαριά (VIVC 7300)

Αμοργιανό, Παριανό, μαύρη Κουντούρα και Μαντηλάρι, είναι λίγα μόνο από τα ονόματα που φέρει η ποικιλία και που μαρτυρούν το βαθμό της εξάπλωσής της, ιδιαίτερα στη νησιωτική Ελλάδα. Συγκεκριμένα, η καλλιέργειά της καταλαμβάνει την πλειοψηφία των αμπελώνων της Πάρου αλλά και το 20% των εκτάσεων της Σαντορίνης. Ταυτόχρονα, συνίσταται για τα αμπελοτόπια της Αττικής, της Εύβοιας, της Κρήτης και των Δωδεκανήσων. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό της ποικιλίας αποτελεί το έντονο βαθύ χρώμα. Αναφέρεται πως το περιεχόμενο των σταφυλιών της σε ανθοκυάνες



Εικόνα 2.2 Μανδηλαριά. Πηγή: Ursula Brühl, Julius Kühn-Institut (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof - 76833 Siebeldingen, GERMANY.

χρονολογείται από τον 14^ο αιώνα, ενδείκνυται για την Κρήτη και επιτρέπεται στην Ικαρία και τις Κυκλάδες. Αποτελεί αρκετά παραγωγική ποικιλία, με πλήρη ωρίμανση στα τέλη Αυγούστου- αρχές Σεπτεμβρίου. Τα σταφύλια της ποικιλίας είναι αρκετά φτωχά σε ανθοκυάνες. Το γλεύκος τους χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και χαμηλή οξύτητα. Ο αλκοολικός τίτλος των παραγόμενων οίνων είναι υψηλός (αγγίζει μέχρι και τα 15%vol), με μικρή οξύτητα και ασταθές χρώμα. Για το λόγο αυτό, συνοινοποιείται κυρίως με Μανδηλαριά ή Syrah. χάρη. Μετά τις προσθήκες, οι οίνοι αποκτούν βαθύ χρωματισμό, με ισορροπημένη γεύση και ταννίνες που επιδέχονται παλαιώσης (Σταυρακάκης Μ., 2010).

Αγιωργίτικο (VIVC 102)

Το Αγιωργίτικο, αποτελεί μια από τις ευγενέστερες ερυθρές ποικιλίες αλλά και από τις παλαιότερες. Η καλλιέργειά του στην ευρύτερη περιοχή της Νεμέας χρονολογείται στην αρχαιότητα. Εκτός της Πελοποννήσου, η ποικιλία επιτρέπεται να καλλιεργηθεί στην Εύβοια αλλά και στη Μακεδονία. Από το Αγιωργίτικο μπορούν να παραχθούν ξηροί, γλυκοί και ημίγλυκοι οίνοι. Το γλεύκος των σταφυλιών φέρει υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και χαμηλή οξύτητα. Αποτελεί μια από τις πλουσιότερες ελληνικές ποικιλίες σε περιεχόμενο ανθοκυανών και φαινολών.

κυμαίνεται μεταξύ 900-1100 mg⁻¹kg ραγών, ενώ είναι αρκετά πλούσιες και σε φαινόλες. Το γλεύκος χαρακτηρίζεται από μέτρια περιεκτικότητα σακχάρων και pH. Πολύ συχνά συνοινοποιείται με διεθνείς (Syrah, Grenache) αλλά και ελληνικές ποικιλίες (Κοτσιφάλι, Λιάτικο) ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειας. Είναι αρκετά παραγωγική ποικιλία, με αντοχή στην ξηρασία, ενώ ο τρύγος της γίνεται μετά τα μέσα Σεπτεμβρίου (Σταυρακάκης Μ., 2010).

Κοτσιφάλι (VIVC 6446)

Αποτελεί την σπουδαιότερη γηγενή ερυθρή ποικιλία οινοποίησης του Κρητικού αμπελώνα. Η καλλιέργειά της, που



Εικόνα 2.3 Κοτσιφάλι. Πηγή: Ursula Brühl, Julius Kühn-Institut (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof - 76833 Siebeldingen, GERMANY.



Εικόνα 2.4 Αγιωργίτικο. Source: Ursula Brühl, Julius Kühn-Institut (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof - 76833 Siebeldingen, GERMANY.

Οι οίνοι του Αγιωργίτικου διακρίνονται από πλούσια και μαλακή γεύση, με ώριμες, «βελουδένιες» ταννίνες υψηλής ποιότητας (Kallithraka et al. 2011; Koussissi, Paterson, and Piggott 2003). Οι Kallithraka et al.(2011) σημειώνουν το υψηλό ανθοκυανικό περιεχόμενο και τη χαμηλή στυφάδα που διακρίνει τους ποικιλιακούς οίνους.

Η κυπελλοειδής μόρφωση του πρέμνου είναι η πιο συνηθισμένη.

Η ζώνη καλλιέργειας των οίνων ΟΠΑΠ «Νεμέα» χαρακτηρίζεται από μεσογειακό κλίμα, υψηλές θερμοκρασίες και ανεπάρκεια ύδατος κατά τους θερινούς μήνες (Petrooulos et al. 2017).

Ακόμη, παρατηρείται ετερογένεια ως προς τις κλιματικές και εδαφικές συνθήκες (μεγάλη υψομετρική διαφορά της περιοχής). Ο τρύγος ρυθμίζεται από το υψόμετρο και προγραμματίζεται προς το τέλος του Σεπτεμβρίου.

Ξινόμαυρο (VIVC 13284)

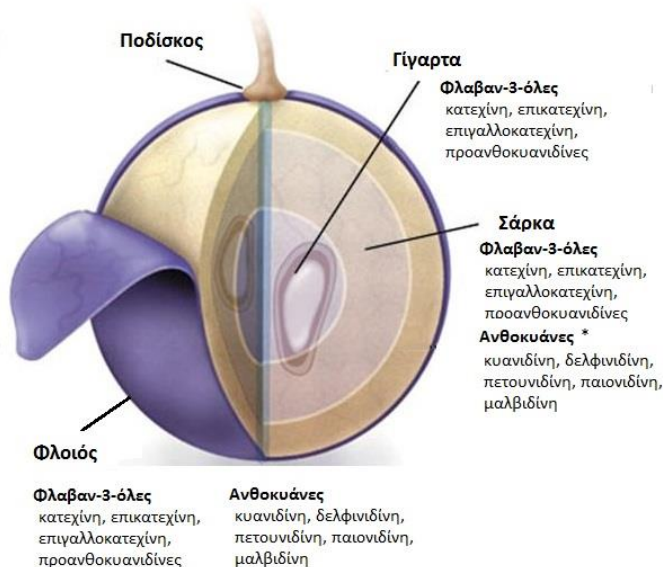
Το Ξινόμαυρο, όπως και το Αγιωργίτικο ανήκει στις ευγενείς ποικιλίες του ελλαδικού χώρου. Αποτελεί τη σημαντικότερη ποικιλία του αμπελώνα της Βόρειας Ελλάδας, με την καλλιέργειά του να εντείνεται στην περιοχή της Νάουσας, της Γουμένισσας και του Αμύνταιου. Η καλλιέργεια της ποικιλίας συνίσταται όμως και στην περιοχή της Θεσσαλίας αλλά και της κεντροδυτικής Μακεδονίας γενικότερα. Σχετικά με την καλλιεργητική της συμπεριφορά, χαρακτηρίζεται πολυδύναμη, αρκετά παραγωγική και με μεγάλη προσαρμοστικότητα σε διαφορετικά εδάφη. Το γλεύκος των σταφυλών χαρακτηρίζεται από υψηλή οξύτητα και ικανοποιητική ποσότητα σακχάρων. Οι περιεχόμενες ανθοκυάνες του Ξινόμαυρου είναι χαμηλές σε ποσότητα (Kyraleou et al. 2015). Τέλος, οι οίνοι της ποικιλίας φέρουν υψηλή οξύτητα, καλό χρώμα, πλούσιο σώμα και λεπτό άρωμα (Kallithraka et al. 2011).



Εικόνα 2.5 Ξινόμαυρο. Πηγή: Ursula Brühl, Julius Kühn-Institut (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof - 76833 Siebeldingen, GERMANY.

2.2 Φαινολικά συστατικά των σταφυλιών και οίνων

Τα φαινολικά συστατικά είναι μία από τις πιο σημαντικές ομάδες ενώσεων των σταφυλιών και κατ' επέκταση των οίνων. Εδώ και πολλά έτη αποτελούν πρωτεύον αντικείμενο μελέτης των οίνων καθώς επηρεάζουν τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες, το χρώμα τους, την αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή τους ικανότητα αλλά και τη δυνατότητα παλαίωσής τους. Οι φαινολικές ενώσεις διαθέτουν έναν βενζολικό δακτύλιο στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου



Εικόνα 2.6 Φαινολικά συστατικά που εντοπίζονται στα διάφορα μέρη της ράγας. Όπου * υπάρχουν μόνο στις βαφικές ποικιλίες.

κατά τη μακρά εκχύλιση που εφαρμόζεται μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης (F. L. Casassa et al. 2013). Τα φαινολικά που συναντώνται στα σταφύλια και στους οίνους μπορούν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες τα μη φλαβονοειδή (φαινολικά οξέα και στυλβένια) και τα φλαβονοειδή (φλαβονόλες, φλαβονονόλες, φλαβόνες, φλαβανόλες, ανθοκυάνες) (Cheynier 2005; Teixeira et al. 2013)

Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ένα βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα με βασικό τύπο C₆-C₃-C₆. Οι δύο υδροξυλιωμένοι βενζολικοί δακτύλιοι, A και B, ενώνονται με μια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα που είναι μέρος ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου C. Τα φλαβονοειδή εντοπίζονται στο φλοιό, στη σάρκα και στα γίγαρτα των ραγών (Εικόνα 2.1). Χωρίζονται σε υποομάδες, ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του πυρανικού δακτυλίου, που ονομάζονται φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβονονόλες, φλαβανόλες και ανθοκυάνες (Teixeira et al. 2013). Από αυτές, οι φλαβανόλες και οι ανθοκυάνες βρίσκονται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο σταφύλι και στον οίνο. Θεωρούνται δε πολύ σημαντικές καθώς επηρεάζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό την ποιότητα των οίνων.

και βρίσκονται κυρίως στον φλοιό και στα γίγαρτα των σταφυλιών. Κατά την οينوποίηση εκχυλίζονται στο γλεύκος και είναι υπεύθυνα για τη σταθεροποίηση του χρώματος και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων καθώς συμμετέχουν στην στυπτικότητα και την πικράδα αυτών (Chira et al. 2011; Quijada-Morín, Regueiro, Simal-ga, Toma, et al. 2012; Sun and Sa 2013). Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης τα φαινολικά που εκχυλίζονται αρχικά προέρχονται από τους φλοιούς, καθώς αυτά των γιγάρτων εκχυλίζονται με πιο αργό ρυθμό και κυρίως

2.2.1 Φλαβανόλες

Οι μονομερείς φλαβαν-3-όλες χαρακτηρίζονται από την παρουσία ομάδας υδροξυλίου στη θέση 3 του δακτυλίου C. Αντιπροσωπευτικές φλαβαν-3-όλες του σταφυλιού (Εικόνα 2.2) είναι η (+)-κατεχίνη και το ισομερές της η (-)-επικατεχίνη, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις συναντώνται ο γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης και η (-)-επιγαλλοκατεχίνη (Chira et al. 2009; Čurko et al. 2014; Monagas et al. 2003). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες είναι πολυμερή με δομικές μονάδες τις φλαβαν-3-όλες, και αποτελούν σημαντική κατηγορία των φαινολικών του σταφυλιού και των οίνων εξαιτίας των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών (Chira 2009; Kallithraka et al. 2014; Kyraleou, Kotseridis, et al. 2016; Quijada-Morín, Regueiro, Simal-ga, Toma, et al. 2012). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ολιγομερείς και πολυμερείς ενώσεις με περισσότερες από 40 υπομονάδες (Downey, Harvey, and Robinson 2003; Kennedy et al. 2001; Teixeira et al. 2013).

Οι προανθοκυανιδίνες βρίσκονται στο φλοιό και στα γίγαρτα των σταφυλιών και είναι υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση του χρώματος και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων καθώς συμμετέχουν στην στυπτικότητα και την πικράδα αυτών (Chira et al. 2009; Lorrain, Chira, and Teissedre 2011; Sun and Sa 2013). Η στυπτικότητα, η ικανότητα των προανθοκυανιδινών να ενώνονται με τις πρωτεΐνες του ανθρώπινου σιέλου (Kallithraka et al. 1996), έχει συσχετιστεί ισχυρά με τα ολικά φαινολικά των ραγών (Kyraleou, Kotseridis, et al. 2016; Quijada-Morín et al. 2014) ωστόσο, επηρεάζεται σημαντικά από το μέγεθος και τη δομή του μορίου των προανθοκυανιδινών (Chira, Jourdes, and Teissedre 2012; Quijada-Morín, Regueiro, Simal-ga, and Toma 2012).

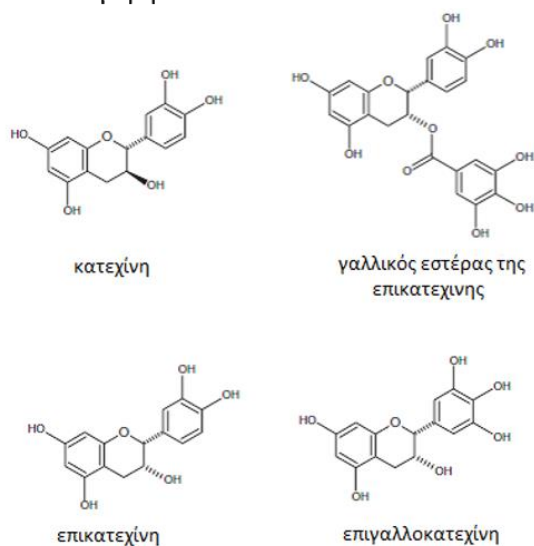
Το μοριακό μέγεθος των προανθοκυανιδινών χαρακτηρίζεται από το βαθμό πολυμερισμού (DP) του. Η στυπτικότητα έχει συσχετιστεί με την αύξηση του βαθμού πολυμερισμού έως ένα βαθμό (DP = 6) και στη συνέχεια μειώνεται (Brossaud, Cheynier, and Noble 2001; Chira et al. 2009; Sun and Sa 2013). Η μείωση αυτή μπορεί να οφείλεται είτε επειδή τα μόρια δεν είναι πλέον διαλυτά, είτε γιατί είναι υπερβολικά ογκώδη και παρεμποδίζεται στερεοχημικά η δέσμευσή τους από τις πρωτεΐνες (Sun and Sa 2013). Η τελευταία αυτή υπόθεση αμφισβητήθηκε από μελετητές, οι οποίοι παρατήρησαν ότι οι μεγάλοι μοριακού βάρους προανθοκυανιδίνες ήταν διαλυτές σε πρότυπο διάλυμα οίνου και εν συνεχεία ενώθηκαν με τις πρωτεΐνες του σιέλου (Vidal et al. 2003). Το μοριακό μέγεθος των προανθοκυανιδινών επηρεάζει και την πικράδα τους, δεδομένου ότι τα μονομερή είναι πιο πικρά από τα πολυμερή (Chira et al. 2009) ενώ η μέγιστη ένταση της πικράδας έχει αναφερθεί σε τετραμερείς προανθοκυανιδίνες (Sun et al. 2011).

Η σύνθεση των υπομονάδων των προανθοκυανιδινών επηρεάζει σημαντικά τη σύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών και των δραστικών τους θέσεων (Haslam 1974; Rinaldi et al. 2014). Η (-)-επικατεχίνη και ο (-)-γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης μπορούν να αυξήσουν με την παρουσία τους τη συσπικτικότητα των φλοιών, των γιγάρτων και των οίνων (Quijada-Morín, Regueiro, Simal-ga, Toma, et al. 2012). Η εστεροποίηση των προανθοκυανιδινών έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τις αλληλεπιδράσεις τους με διάφορες πρωτεΐνες, γεγονός που υποδηλώνει ότι θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για την αυξημένη αίσθηση της συσπικτικότητας (Ricardo-da Silva et al. 1991). Αντιθέτως, η παρουσία της (-)-επιγαλλοκατεχίνης έχει συσχετιστεί αρνητικά με τη συσπικτικότητα (Kyrleou et al. 2016; Quijada-Morín et al. 2012; Rinaldi et al. 2014, Vidal et al. 2003). Οι Peleg et al. (1999), υπογραμμίζουν πως ακόμα και τα ισομερή (+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη, παρουσιάζουν διαφορετική οργανοληπτική συμπεριφορά, με την επικατεχίνη να έχει μεγαλύτερη μέγιστη ένταση και διάρκεια ως προς την συσπικτικότητα και την πικράδα.

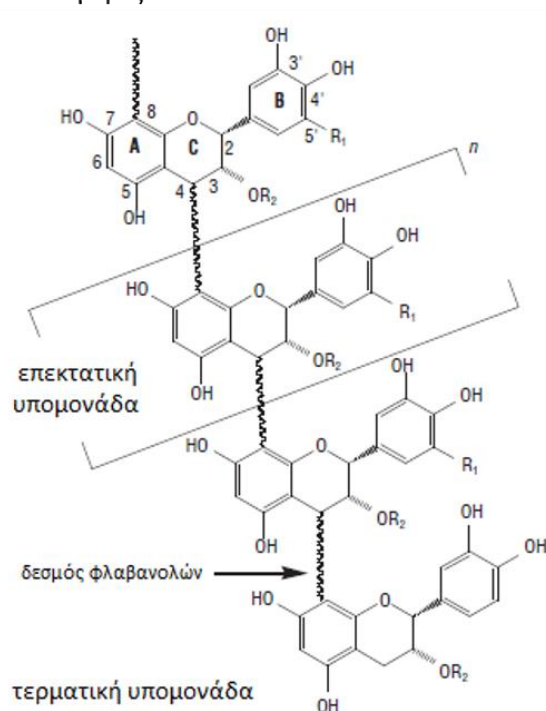
Σύμφωνα με μελέτες, οι ταννίνες των ραγών

ανάλογα με την προέλευσή τους – φλοιοί ή γιγάρτα – ποικίλουν σε μήκος, σύνθεση των υπομονάδων τους και οργανοληπτικές ιδιότητες (Brossaud et al. 2001; Chira et al. 2009; Peleg et al. 1999; Sun et al. 2013). Τα γιγάρτα είναι πλούσια σε χαμηλού μοριακού βάρους προανθοκυανιδίνες, οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά την πικράδα και με παρουσία εστεροποιημένων υπομονάδων που συνεισφέρουν στη συσπικτικότητα τους. Οι ταννίνες των φλοιών είναι συνήθως μεγαλύτερου μοριακού βάρους (Bordiga et al. 2011; Chira et al. 2009, 2011; Ćurko et al. 2014; Vidal et al. 2003), με

A. Μονομερή



B. Πολυμερές



Εικόνα 2.7 A. Μονομερή φλαβανολών και B. Πολυμερές προανθοκυανιδίνη με τερματική και επεκτατικές υπομονάδες (Πηγή: Downey et al., 2003).

υπομονάδες (-)-επιγαλλοκατεχίνης στη σύνθεσή τους ενώ οι αντιδράσεις εστεροποίησης λαμβάνουν χώρα σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα γίγαρτα (Lorrain et al. 2011; Monagas et al. 2003).

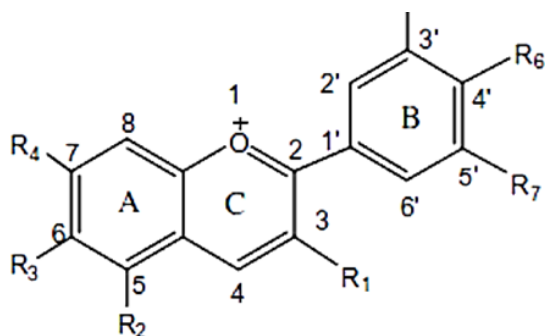
Η σύσταση των προανθοκυανιδινών των ραγών είναι πολύ σημαντική για την ποιότητα του σταφυλιού και τη φαινολική ωριμότητα, ενώ θα μπορούσε να αποτελέσει εργαλείο για τον προσδιορισμό της μέρας συγκομιδής και τον τρόπο οινοποίησης της κάθε ποικιλίας. Η σύνθεση των προανθοκυανιδινών λαμβάνει χώρα πριν από τον περκασμό και η εξέλιξή τους κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης εξαρτάται από την προέλευση και τη σύνθεσή τους (Downey et al. 2003; Ollé et al. 2011). Οι Downey et al. (2003) παρατήρησαν στα γίγαρτα μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβαν-3-ολών μία εβδομάδα μετά τον περκασμό την οποία ακολούθησε πτώση μέχρι τη συγκομιδή, ενώ στους φλοιούς η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε πριν από τον περκασμό και μειώθηκε μέχρι τη συγκομιδή.

Για τον προσδιορισμό των ταννινών των φλοιών και των γιγάρτων υπάρχουν χημικές μέθοδοι οι οποίες βασίζονται στην αντίδραση πρωτεϊνών ή πολυσακχαριτών με τις ταννίνες του δείγματος, όπως η μέθοδος με τη χρήση της αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin-BSA) (Harbertson, Picciotto, and Adams 2003). Ωστόσο, η κατάλληλη επιλογή της μεθόδου προσδιορισμού των ταννινών έγκειται στο σκοπό της εκάστοτε ανάλυσης, μιας και κάθε μέθοδος απομονώνει διαφορετικό κλάσμα ταννινών. Οι Kallithraka et al. (2011) προτείνουν πως όταν η στυπτικότητα είναι το αντικείμενο ανάλυσης να προτιμάται μέθοδος που περιλαμβάνει καταβύθιση ταννινών από πρωτεΐνες, διότι η στυπτικότητα γίνεται αντιληπτή με τον ίδιο μηχανισμό αντίδρασης.

2.2.2 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι φυσικές χρωστικές ενώσεις που συσσωρεύονται στους φλοιούς των σταφυλιών κατά την ωρίμανση, όπως και στη σάρκα των βαφικών ποικιλιών (Revilla et al. 2018) και υπεύθυνες είναι για το χρώμα των ροζέ και ερυθρών οίνων (Castañeda-Ovando et al. 2009; Kong et al. 2003). Η βασική δομή των ανθοκυανών είναι η ανθοκυανιδίνη. Η ανθοκυανιδίνη (ή άγλυκο τμήμα) αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο [A] συνδεδεμένο με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο [C] που περιέχει οξυγόνο, το οποίο είναι επίσης συνδεδεμένο με ένα δεσμό C-C σε ένα τρίτο αρωματικό δακτύλιο [B] (Εικόνα 2.3) (Castañeda-Ovando et al. 2009; Teixeira et al. 2013). Όταν οι ανθοκυανιδίνες είναι στη γλυκοζυλιωμένη μορφή (σύνδεση με ένα μόριο σακχάρου), τότε ονομάζονται ανθοκυάνες και είναι πιο σταθερές σε σχέση με τα άγλυκα μόρια. Στα σάκχαρα με τα οποία σχηματίζουν δεσμούς συμπεριλαμβάνονται η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ξυλόζη, η ραμνόζη και η αραβινόζη (Ribereau-Gayón et al. 1999). Τα πιο κοινά παράγωγα που συναντώνται στις ποικιλίες *V. Vinifera* είναι οι 3-μονογλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών (Εικόνα 2.3) και συγκεκριμένα της κυανιδίνης (Cy), της δελφινιδίνης (Dlp), της πετουνιδίνης (Pt), της παιονιδίνης (Pn) και της μαλβιδίνης (Mlv) (Castañeda-

Ovando et al. 2009; Kallithraka et al. 2005; Ribereau-Gayón et al. 1999). Η χημική τους δομή και ειδικότερα ο βαθμός υδροξυλίωσης, μεθυλίωσης ή/και γλυκοζυλίωσης είναι αυτή που καθορίζει τη συμπεριφορά των ενώσεων αυτών ως χρωστικές (Garrido and Borges 2013).



ΟΝΟΜΑ		ΧΡΩΜΑ
Μονογλυκοζίτης της		
ΚΥΑΝΙΔΙΝΗ	Cy	πορτοκαλί-κόκκινο
ΔΕΛΦΙΝΙΔΙΝΗ	Dlρ	μπλε-κόκκινο
ΠΕΤΟΥΝΙΔΙΝΗ	Pt	μπλε-κόκκινο
ΠΑΙΟΝΙΔΙΝΗ	Pn	πορτοκαλί
ΜΑΛΒΙΔΙΝΗ	Mlv	μπλε-κόκκινο

Εικόνα 2.8 Γενική μορφή ανθοκυανών και οι σημαντικότερες ανθοκυάνες που συναντώνται στα σταφύλια και τους οίνους (Πηγή: Castañeda-Ovando et al., 2009)

Η Mlv προσδιορίστηκε ως η κύρια ανθοκυάνη σε αρκετές Ελληνικές και διεθνής ποικιλίες (Castañeda - Ovando et al. 2009; Kallithraka et al. 2006; Ribéreau-Gayón et al. 1999), ενώ η Cyn είναι ανθοκυάνη που απουσιάζει (Kallithraka et al. 2005) ή προσδιορίστηκε σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στην ποικιλία Ξινόμαυρο. Η συνεισφορά της κάθε ανθοκυάνης στη συνολική συγκέντρωση των ανθοκυανών συνθέτει το προφίλ τους για μία ποικιλία και σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση των ανθοκυανών είναι χαρακτηριστικό για κάθε ποικιλία. Η ανάλυσή των χαρακτηριστικών αυτών σε μία δεδομένη ποικιλία σταφυλιών είναι στενά συνδεδεμένη με τη γενετική κληρονομικότητα ορισμένων χαρακτηριστικών

και μάλιστα έχει προταθεί ως χημειοταξινομική παράμετρος για την κατηγοριοποίηση των ερυθρών ποικιλιών του *V. vinifera* (Garrido and Borges 2013; Makris, Kallithraka, and Mamalos 2006; Zhao, Duan, and Wang 2010). Οι ποικιλίες *V. vinifera* περιέχουν μόνο τους μονογλυκοζίτες των ανθοκυανιδίων (Dlρ, Cy, Pt, Pn και Mlv) ενώ σε αυτές που ανήκουν στη *V. labrusca* και στη *V. rotundifolia* έχουν ανιχνευτεί και διγλυκοζίτες των ανθοκυανών. Οι Mazza & Francis (1995) υποστηρίζουν πως η αναλογία των εστέρων της μαλβιδίνης με οξικό και κουμαρικό οξύ ως προς τους ολικούς γλυκοζίτες της μαλβιδίνης είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση μιας ποικιλίας, καθώς θα μπορούσε να είναι χαρακτηριστικό αυτής και ανεξάρτητο από την τοποθεσία προέλευσης.

Οι ανθοκυάνες είναι υψίστης σημασίας για τους οίνους (Kallithraka et al. 2005) και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι των οργανοληπτικών γνωρισμάτων τους, γιατί τα επίπεδα συγκέντρωσής τους, οι διαφορετικές μορφές και τα παράγωγά τους σχετίζονται άμεσα με το χρώμα τους. Τα επιμέρους χαρακτηριστικά του χρώματος (απόχρωση και ένταση) ποικίλλουν ανάλογα με τη συνολική συγκέντρωση και δομή των περιεχόμενων ανθοκυανών (Childers, 1976; Ribéreau-Gayon, 1982). Κατά τους Haslam & Lilley, (1988), η αλληλεπίδραση των ανθοκυανών με άλλες φαινολικές

ενώσεις καθώς και με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες είναι εξίσου καθοριστική για τη διαμόρφωση των οργανοληπτικών και χημικών χαρακτηριστικών των οίνων.

Το είδος και οι συγκεντρώσεις των διάφορων ανθοκυανών στους φλοιούς των σταφυλιών καθορίζουν το χρώμα και την ποιότητα των παραγόμενων οίνων. Στις ανθοκυάνες οφείλονται οι αποχρώσεις μπλε, μοβ, κόκκινο και τα ενδιάμεσα χρώματα που υφίστανται ριζικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του οίνου. Το περιεχόμενο των ελεύθερων ανθοκυανών μειώνεται σταδιακά με την ωρίμανση του οίνου, κυρίως λόγω της συνένωσης με άλλα μόρια και τη δημιουργία πιο σταθερών χρωστικών (συγχρωματισμός) (Castañeda-Ovando et al. 2009; Davies and Mazza 1993; Teixeira et al. 2013; Versari, Boulton, and Parpinello 2007).

Ο συγχρωματισμός είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο οι χρωστικές ουσίες και οι υπόλοιπες άχρωμες οργανικές ενώσεις ή μεταλλικά ιόντα, σχηματίζουν μόρια ή σύνθετες ενώσεις, προκαλώντας αλλαγή ή αύξηση στην ένταση του χρώματος (Versari et al. 2007). Στην επιστήμη των τροφίμων, το φαινόμενο αυτό θεωρείται μεγάλης σημασίας, καθώς το χρώμα είναι ένας από τους κύριους παράγοντες ποιότητας (Eiro and Heinonen, 2002). Έρευνες δείχνουν ότι ο συγχρωματισμός των ανθοκυανών με άλλες ενώσεις είναι ο κύριος μηχανισμός της σταθεροποίησης του χρώματος στα φυτά αλλά και στους οίνους (Castañeda - Ovando et al., 2009; Teixeira et al., 2013).

2.3 Αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων

Η παρουσία των φαινολικών ενώσεων στους ερυθρούς οίνους έχει συσχετιστεί θετικά με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα από μεγάλο αριθμό ερευνητών (Arnous et al. 2002; Kyraleou et al. 2015; Van Leeuw et al. 2014; Psarra et al. 2002) ενώ έχει γίνει προσπάθεια να καθορίσουν τα δομικά τους χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην ικανότητα αυτή (Spranger et al. 2008; Velioglu et al. 1998). Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν την οξείδωση των λιπιδίων ή άλλων μορίων με αναστολή της έναρξης ή εξάπλωσης αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται κυρίως στις οξειδοαναγωγικές τους ιδιότητες καθώς δεσμεύει και εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται κυρίως στο είδος και τον αριθμό των υποκατάστατων τους παρά στο βασικό σκελετό τους. Στη χημική τους δομή οφείλεται η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τις βιταμίνες E και C (Rice-Evans 1996). Η πιο σημαντική παράμετρος αντιοξειδωτικής δράσης είναι ο αριθμός των ελεύθερων υδροξυλίων του B δακτυλίου (Εικόνα 2.3) (Rice-Evans 1996) γιατί μπορούν να λειτουργήσουν ως δότες κατιόντων υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες, ενώ μεθυλίωση ή γλυκοζυλίωση του υδροξυλίου στην 3-θέση αναστέλλει την αντιοξειδωτική δράση που οφείλεται σε αυτό (Rice-Evans 1996; Velioglu et al. 1998).

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σταφύλια και οίνους έχουν αναφερθεί διαφορετικές εκφράσεις αποτελεσμάτων και διαφορετικό αντιδραστήριο αναφοράς ανάλογα με τη μέθοδο που εφαρμόστηκε (Antoniolli et al. 2015). Έχουν χρησιμοποιηθεί οι μέθοδοι ORAC (oxygen radical absorbance capacity (Antoniolli et al. 2015; Van Leeuw et al. 2014), BRAI (Briggs-Rauscher Antioxidant Index) και TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Coletta et al. 2014), με έκφραση των αποτελεσμάτων με το αντιδραστήριο DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Van Leeuw et al., 2014; Coletta et al., 2014) και με το αντιδραστήριο ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Jordão and Correia 2012).

Σε μελέτες που έχουν γίνει έχει αποδειχτεί η επίδραση της ποικιλίας και του συστήματος διαμόρφωσης στην αντιοξειδωτική ικανότητα των οίνων (Coletta et al. 2014; Palliotti, Gatti, and Poni 2011). Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τα ολικά φαινολικά, κυρίως αυτών που προσδιορίζονται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Kefalas et al. 2003; Rockenbach et al. 2011) και τις συγκεντρώσεις των φλαβαν-3-όλων (Coletta et al. 2014; Jordão and Correia, 2012). Επιπλέον, έχει προσδιοριστεί η μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε φλοιούς και γίγαρτα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης χωρίς ωστόσο να έχει παρατηρηθεί συγκεκριμένο μοτίβο αλλά αναφέρονται διαφορές ανάλογα με την ποικιλία (Jordão and Correia, 2012).

Οι αναφορές σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα των ανθοκυανών έρχονται σε αντιπαράθεση. Η αντιοξειδωτική τους ιδιότητα έχει αποδοθεί στο άγλυκο μέρος του μορίου τους, κι αυτό έχει διαπιστωθεί για την κυανιδίνη αλλά και για κάποιους γλυκοζίτες της (Wang et al. 1999). Ο αριθμός των υποκατάστατων στην θέση 3 του μορίου (Εικόνα 2.3), ο βαθμός οξειδωσης του C δακτυλίου, ο βαθμός υδροξυλίωσης και η εστεροποίηση με φαινολικά οξέα, θεωρούνται καθοριστικοί παράγοντες για την εκδήλωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ανθοκυανών (Kähkönen and Heinonen, 2003; Lapidot et al. 1999; Wang et al. 1999). Ωστόσο, αναφέρεται ότι η γλυκοζυλίωση της θέσης 3 των ανθοκυανιδινών μειώνει την αντιοξειδωτική δράση του μορίου (Rice- Evans et al. 1996).

Οι Jordão and Correia (2012) μελέτησαν τη συσχέτιση μεταξύ των επιμέρους ανθοκυανών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φλοιών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης σταφυλιών. Παρατήρησαν ότι υπήρχε αρνητική σχέση μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν ανεξάρτητα της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των ποικιλιών που μελετήθηκαν, υποδηλώνοντας ότι οι ανθοκυάνες δεν είναι ο πιο ισχυρός αμυντικός μηχανισμός που αναπτύσσεται στους φλοιούς των σταφυλιών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης. Παράλληλα υποστήριξαν ότι οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας που προσδιορίστηκαν στους φλοιούς οφείλονται κυρίως σε άλλες ενώσεις όπως προανθοκυανιδίνες, φλαβονόλες και φαινολικά οξέα που έχουν πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Burda and Oleszek 2001; Rice- Evans et al. 1996). Οι Meyer et al. (1997) κατέληξαν στο ότι οι ανθοκυάνες των εκχυλισμάτων των σταφυλιών έχουν

μέτρια συσχέτιση με την αναστολή της οξείδωσης της LDL, η οποία έχει αποδοθεί κυρίως στην συνολική περιεκτικότητα σε φαιολικές ενώσεις. Οι Kallithraka et al. (2005) παρατήρησαν σε δείγματα ελληνικών ποικιλιών κατά τη συγκομιδή, χαμηλή συσχέτιση της συνολικής περιεκτικότητα των ανθοκυανών των φλοιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων τους. Τέλος, σύμφωνα με τον Orak (2007), η αντιοξειδωτική ικανότητα των ερυθρών σταφυλιών δεν έχει πάντα σχέση με την περιεκτικότητά τους σε ανθοκυάνες.

Κεφάλαιο 3^ο: Πειραματική Διαδικασία

3.1 Πειραματικό πλάνο

Για την παρούσα έρευνα συλλέχθηκαν δείγματα από πέντε ποικιλίες που καλλιεργούνται στον ελλαδικό χώρο και είναι οι εξής: Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά, Κοτσιφάλι, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο (Εικόνα 3.1). Η συλλογή των σταφυλιών έγινε στο στάδιο της ωρίμανσης και για δύο συνεχόμενες καλλιεργητικές περιόδους 2017 και 2018. Αναλυτικά η περιοχή και η μέρα συγκομιδής των δειγμάτων εμφανίζονται στον Πίνακα 3.1.



Εικόνα 3.1 Προέλευση δειγμάτων

Συλλογή, επεξεργασία και ανάλυση των σταφυλιών

Τα δείγματα των ραγών προήλθαν από τα αμπελοτεμάχια που επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή της παρούσας έρευνας, στην ημερομηνία του τρύγου για κάθε περιοχή και κάθε ποικιλία. Δείγματα από 500 ράγες συλλέχθηκαν τυχαία από το κάθε αμπελοτεμάχιο και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -20°C μέχρι τις αναλύσεις.

3.2 Χαρακτηρισμός της χημικής σύστασης της ράγας

Για τον χαρακτηρισμό της σύστασης της ράγας συλλέχθηκαν 100 ράγες οι οποίες ζυγίστηκαν και συμπιέστηκαν. Στο γλεύκος που προέκυψε, μετρήθηκαν τα ολικά διαλυτά στερεά με διαθλασιμετρία (TSS - °Brix) και η ολική οξύτητα (TA) (επίσημη μέθοδος της ΕΕ). Σε ένα δεύτερο δείγμα 100 ραγών έγινε ζύγιση, διαχωρισμός φλοιών και γιγάρτων και προσδιορίστηκαν το μέσο βάρος της ράγας (g), τα ποσοστά συμμετοχής των φλοιών ($100 \cdot \text{βάρος φλοιών} / \text{βάρος ράγας}$) και των γιγάρτων ($100 \cdot \text{βάρος γιγάρτων} / \text{βάρος ράγα}$) και η αναλογία φλοιού/σάρκα. Στη συνέχεια οι φλοιοί και τα γιγάρτα λυοφυλίωθηκαν για 24 ώρες και με τη βοήθεια μύλου μετατράπηκαν σε σκόνη.

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκες αποτελούνταν από:

Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης: το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις των απορροφήσεων στα διάφορα μήκη κύματος ήταν διπλής δέσμης Jasco V-530 UV/VIS και υποστηριζόταν από το λογισμικό Jasco Spectra Manager for Windows 95/NT.

Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High-performance liquid chromatography – HPLC): Ο εξοπλισμός της HPLC αποτελείται από έναν αυτόματο δειγματολήπτη Jasco AS-1555 Intelligent Sampler, αντλία Jasco PU 2089 Plus Quaternary Gradient Pump, ανιχνευτή Jasco MD-910 Multiwavelength Detector, αντάπτορα Jasco LC-Net II / ADC, το Software του υπολογιστή Jasco ChromPass Chromatography Data System Version 1.7.403.1. Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαφορετικές ανάλογα με τη μέθοδο που εφαρμόστηκε.

Σύστημα υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών (Liquid Chromatography Mass Spectrometry – LCMS): Το LC-MS που χρησιμοποιήθηκε ήταν Shimadzu LC/MS 2010A με δυαδική αντλία (LC-10ADnr), σύστημα απαέρωσης DGU-14A, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADnr, ανιχνευτή σειράς φωτοδίοδων SPD-M10Avr, εκλεκτικό τετράπολο αναλυτή μαζών (MSD) και πηγή ηλεκτροψεκασμού για τον ιονισμό των αναλυόμενων μορίων. Οι συνθήκες του ανιχνευτή ήταν στη λειτουργία θετικών ιόντων προκειμένου να ευνοείται ο σχηματισμός $[M-H]^+$.

3.3 Εκχύλιση και προσδιορισμός των ανθοκυανών των φλοιών

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (Kallithraka, et al., 2005; Kyraleou, et al., 2016a). Ποσότητα σκόνης φλοιών βάρους 0,5g μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρου με καπάκι και προστίθενται 20mL μεθανόλης οξινισμένης με 0,1% (v/v) HCl. Ο σωλήνας, αφού καλυφτεί με αλουμινόχαρτο για να προστατεύεται από το φως, μεταφέρεται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο, στους 20°C, όπου παραμένει για εκχύλιση για 4 ώρες με ταχύτητα ανακίνησης 60rpm. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 15 λεπτά, στις 9000rpm, στους 20°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε περιέκτη. Ακολουθούν διαδοχικές εκχυλίσεις με 10mL του ίδιου διαλύτη για 18 και 24 ώρες. Τα εκχυλίσματα που προκύπτουν συλλέγονται και ενώνονται. Μικρή ποσότητα από το εκχύλισμα φιλτράρεται με φίλτρο πορότητας 0,2μm και ακολουθεί η ανάλυση των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η ανάλυση εκτελείται με ρυθμό ροής 1,5 mL/min, όγκο δείγματος 10μL, ανιχνευτής UV-vis στα 520 nm. Τα χαρακτηριστικά του προγράμματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.2 Πρόγραμμα έκλυσης διαλυτών για τον προσδιορισμό μονομερών ανθοκυανών όπου διαλύτης A: Υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 10% και διαλύτης B: Μεθανόλη

Προσδιορισμός Μονομερών Ανθοκυανών				
min	0	22	30	35
% διαλύτης A	95	50	5	95
% διαλύτης B	5	50	95	5

Η ποσοτική έκφραση των 3-Ο-μονογλυκοζιτών της δελφινιδίνης, κυανιδίνης, πετουινιδίνης, παιονιδίνης, και μαλβιδίνης, καθώς και των οξικών και κουμαρικών εστέρων των ανθοκυανιδίων έγινε σε ισοδύναμα μαλβιδίνης.

3.4 Εκχύλιση και προσδιορισμός των ταννινών των φλοιών και των γιγάρτων

Η μέθοδος εκχύλισης των ταννινών από τους φλοιούς και τα γιγάρτα βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (Chira, et al., 2009; Kyraleou, et al., 2017).

Οι εκχυλίσεις βασίστηκαν σε προηγούμενη μέθοδο με κάποιες τροποποιήσεις (Kyraleou, et al., 2017). Σε σωλήνα φυγοκέντρου μεταφέρονται 2g σκόνης γιγάρτων ή φλοιών και 20ml υδατικού διαλύματος ακετόνης 80%. Το μείγμα παραμένει 3 ώρες για εκχύλιση σε αναδευτήρα στις 70rpm στους 25°C. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 8000 στροφές και το υπερκείμενο συλλέγεται σε περιέκτη. Στο ίζημα γίνεται διαδοχική εκχύλιση με 10ml υδατικού διαλύματος 60% μεθανόλης και το μείγμα παραμένει για 2 ώρες σε αναδευτήρα στις 70rpm στους 25 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις παραπάνω συνθήκες και το υπερκείμενο συλλέγεται στον ίδιο περιέκτη. Μετά την ανάμιξη το εκχύλισμα που συγκεντρώθηκε συμπυκνώνεται υπό κενό μέχρι να απομακρυνθούν οι διαλύτες. Στη συνέχεια παραμένει στην κατάψυξη για μια μέρα και λυοφιλιώνεται για 48ώρες.

Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν προσδιορίστηκαν οι ταννίνες που έχουν τη δυνατότητα να ενωθούν με πρωτεΐνες (Harbertson et al., 2003), η αντιοξειδωτική ικανότητα με το αντιδραστήριο DPPH (Brand-Williams et al., 1994) και η δομή των προανθοκυανιδινών.

Προσδιορισμός ταννινών με τη μέθοδο BSA

Η συγκέντρωση των ταννινών που καταβυθίζονται με πρωτεΐνες (protein precipitable tannins, PPT) στους φλοιούς και στα γιγάρτα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της καταβύθισης με αλβουμίνη (BSA), κατά τον Harbertson *et al.* (2003). Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές (Harbertson & Downey, 2009; Kyraleou *et al.*, 2016a) τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής συσχετίζονται ισχυρά με τη στυπτικότητα, καθώς καταβυθίζονται κυρίως προανθοκυανιδίνες με βαθμό πολυμερισμού που κυμαίνεται από 4 έως 8. Συγκεκριμένα, βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με πρωτεϊνικά μόρια (Bovine Serum Albumin-BSA) και τη δημιουργία αδιάλυτων υπόλευκων συμπλόκων τα οποία καταβυθίζονται. Γίνεται επαναδιάλυση με αλκαλικό διάλυμα και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ταννινών κατόπιν αντίδρασής τους με χλωριούχο σίδηρο. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 510nm. Η συγκέντρωση των ταννινών στα σύμπλοκά τους με τις πρωτεΐνες είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα.

Η πειραματική πορεία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα. Το εκχύλισμα φλοιών ή γιγάρτων σε μεθανόλη αραιώνεται με πρότυπο διάλυμα οίνου (υδατικό διάλυμα με 10% αιθανόλη, 5 g L⁻¹ τρυγικό οξύ και διόρθωση του pH στο 3,5 με NaOH 1N). Το ποσοστό της αραιώσης που θα ακολουθηθεί προσδιορίζεται πειραματικά και αναλόγως με τη συγκέντρωση των ταννινών του δείγματος. Σε ένα erpendorf των 2mL τοποθετούνται 500 μL αραιωμένου δείγματος και 1 mL πρωτεϊνικού δείγματος BSA. Ακολουθεί ήπια ανάδευση (120rpm) για 15 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 13000 rpm. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, προστίθενται στο ίζημα 250μL μη πρωτεϊνικού διαλύματος (διάλυμα Α). Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Στο ίζημα προστίθενται 875μL διαλύματος TEA-SDS (Triethanolamine με 5% w/v Sodium Dodecyl Sulfate). Το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί ανάδευσή του σε vortex για διάλυση του ιζήματος. Λαμβάνεται η απορρόφησή του δείγματος στα 510nm(A1) με κυψελίδα στένωσης. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται διάλυμα TEA-SDS. Κατόπιν, προστίθενται 125μL διαλύματος FeCl₃ και με την παρέλευση 10 min σε ηρεμία, λαμβάνεται η απορρόφηση στα 512nm (A2). Υπολογίζεται η διαφορά A₅₁₀=A2-A1 και από την κατασκευή πρότυπης καμπύλης κατεχίνης με γνωστές συγκεντρώσεις, μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα ταννινών του δείγματος ως mg ισοδυνάμων κατεχίνης/mL.

Προσδιορισμός της δομής των προανθοκυανιδινών με τη μέθοδο της φλωρογλουκινόλης

Για τον χαρακτηρισμό της δομής των προανθοκυανιδινών με τη μέθοδο της φλωρογλουκινόλης εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται σε προηγούμενες μελέτες με κάποιες παραλλαγές (Chira, et al., 2009; Kyraleou, et al., 2017). Για τον προσδιορισμό της δομής των προανθοκυανιδινών χρησιμοποιήθηκε το συνολικό κλάσμα των ολιγομερών και των πολυμερών που προέκυψε από την εκχύλιση των φλοιών και γιγάρτων. Σε 100μL του εκχυλίσματος των γιγάρτων ή των φλοιών (10gL^{-1}) προστίθενται 100μL διαλύματος φλωρογλουκινόλης (20mL μεθανόλη, 1g φλωρογλουκινόλη, 0,2g ασκορβικό οξύ, 0,17mL HCl 37%) και παραμένουν για 30 λεπτά σε επωαστικό θάλαμο ή υδατόλουτρο στους 50°C . Με το πέρας των 30 λεπτών προστίθεται 1mL υδατικού διαλύματος CH_3COONa 40mmol L^{-1} , ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Πριν την έγχυση στην HPLC, τα δείγματα διηθούνται με φίλτρο $0,2\mu\text{m}$ και στη συνέχεια αναλύονται ώστε να προσδιοριστούν οι επεκτατικές και τερματικές μονάδες των προανθοκυανιδινών. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη Xterra RP 18 ($100 \times 4.6\text{mm}$, $3.5\mu\text{m}$), η ροή των διαλυτών ορίστηκε σε 1mL min^{-1} , με ανιχνευτή UV-Vis σε μήκος κύματος 280nm . Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε φαίνεται στον Πίνακα 3.2. Οι επεκτατικές υπομονάδες των προανθοκυανιδινών που προσδιορίστηκαν ήταν: (-)-επιγαλλοκατεχίνη-φλωρογλουκινόλη, EGCe-P; (+)-κατεχίνη-φλωρογλουκινόλη, Ce-P; (-)-επικατεχίνη-φλωρογλουκινόλη, ECe-P, (-)-γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης - φλωρογλουκινόλη, ECGe ενώ ως τερματικές μονάδες των προανθοκυανιδινών ήταν οι (+)-κατεχίνη, Ct; (-)-επικατεχίνη, ECt; και (-)-γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης, ECGt.

Πίνακας 3.3 Πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών για τον προσδιορισμό της δομής των ταννινών σε φλοιούς και γίγαρτα με HPLC όπου διαλύτης A: Υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.1% και διαλύτης B: Μεθανόλη

Προσδιορισμός της δομής των προανθοκυανιδινών								
min	0	1	7	8	15	16	19	23
% διαλύτη A	95	84	78	65	58	0	0	95
% διαλύτη B	5	16	22	35	42	100	100	5

3.5 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των φλοιών και των γιγάρτων

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε χρησιμοποιεί την ελεύθερη ρίζα 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), η οποία έχει χαρακτηριστικό φάσμα UV-vis με μέγιστη απορρόφηση στα 515nm (Makris et al., 2008; Brand-Williams et al., 1994). Είναι σταθερή, εμπορικά διαθέσιμη και ευρέως χρησιμοποιούμενη για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας στον ευρύτερο τομέα των τροφίμων.

Σύμφωνα με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε, σε $25\mu\text{L}$ αραιωμένου εκχυλίσματος προστίθενται $975\mu\text{L}$ διαλύματος DPPH (23.6mg L^{-1}). Μετά από ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα λαμβάνεται η απορρόφηση $\text{OD}_{t=0}$ σε μήκος κύματος 515nm ($t=0$). Το δείγμα επιστρέφεται στον περιέκτη του και

μετά από 30 λεπτά λαμβάνεται η απορρόφηση $OD_{t=30}$ ($t=30$). Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου γίνεται με μεθανόλη. Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως (mM trolox): $AC = AC_1 * D$ όπου AC_1 η αντιοξειδωτική ικανότητα σε mM trolox (υπολογίζεται από καμπύλη αναφοράς) που αντιστοιχεί στο % ΔΑ (515) = $\frac{OD_{t=0} - OD_{t=30}}{OD_{t=0}} * 100$ και D η αραίωση.

3.6 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με την ανάλυση της διακύμανσης (analysis of variance-ANOVA) του προγράμματος Statistica V.7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK). Το Tukey's HSD (honest significant difference) test χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των δειγμάτων, όταν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μετά τη εφαρμογή ANOVA ($p < 0.05$) στα αποτελέσματα των αναλύσεων. Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια αναγράφεται η τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων ως \pm του μέσου όρου αυτών ή ως μπάρες όταν τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε γράφημα. Με a, b, c χαρακτηρίζεται η στατιστική διαφορά των δειγμάτων (σε επίπεδο 0.05%), ενώ δείγματα με ίδιο γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

Κεφάλαιο 4^ο: Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Χαρακτηριστικά των ραγών

Η μέρα συγκομιδής για κάθε δείγμα διαφοροποιήθηκε ανάλογα με την περιοχή και την ποικιλία και επιλέχθηκε με βάση την ωρίμανση των ραγών. Τα σταφύλια από την ποικιλία Μαυροτράγναο έφτασαν στον μεγαλύτερο βαθμό ωρίμανσης (24,3 Brix και 23,6 Brix), ενώ η Μανδηλαριά είχε τον μικρότερο (20,8 Brix και 18,6 Brix). Οι ποικιλίες Κοτσιφάλι, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο συγκομίστηκαν σε τεχνολογική ωρίμανση με μέσο βαθμό 22,2 Brix για το 2017 ενώ το 2018 τα σταφύλια της ποικιλίας Κοτσιφάλι είχαν μεγαλύτερο βαθμό ωρίμανσης και στα ίδια επίπεδα με το Μαυροτράγναο (Πίνακας 4.1). Η ολική οξύτητα των ραγών (TA) προσδιορίστηκε σε ένα εύρος μεταξύ 2,9 και 6,1 g τρυγικού οξέος/ L και για τα δύο έτη, με τις τιμές να είναι λίγο μεγαλύτερες το 2017. Η χαμηλότερη τιμή pH και η μεγαλύτερη ολική οξύτητα παρατηρήθηκε στην ποικιλία Ξινόμαυρο, για το 2017 pH 3,3 και TA 6,1 g τρυγικού οξέος/ L και για το 2018 pH 3,5 και TA 5,9 g τρυγικού οξέος/ L), κάτι που ήταν αναμενόμενο καθώς είναι το κύριο χαρακτηριστικό της ποικιλίας και το όνομά του προέρχεται από τις λέξεις ξινό και μαύρο. Το 2017, η χαμηλότερη ολική οξύτητα προσδιορίστηκε στην ποικιλία Αγιωργίτικο (3,5 g τρυγικού οξέος/ L), και ακολούθως στο Μαυροτράγναο (3,8 g τρυγικού οξέος/ L) και στη Μανδηλαριά (4 g τρυγικού οξέος/ L). Παρόλο που το Κοτσιφάλι είχε τη δεύτερη μεγαλύτερη ολική οξύτητα (4,6 g τρυγικού οξέος/ L), δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά στις τιμές του pH με τις προηγούμενες τρεις ποικιλίες (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1 Χαρακτηρισμός της σύστασης των ραγών της κάθε ποικιλίας στο στο στάδιο της ωρίμανσης για τα έτη 2017 και 2018. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Έτος	Ποικιλία	Brix	Ολική Οξύτητα	pH	βάρος ράγας	% γίγαρτα / ράγα	% φλοιοί / ράγα	% σάρκα / ράγα	φλοιοί / σάρκα
2017	Μαυροτράγναο	24.3±0.2a	3.8±0.2bc	3.7±0.1a	1.6±0.1c	6.4±0.5a	5.4±0.4d	88.2±1.0b	0.062±0.01c
	Μανδηλαριά	20.8±0.3c	4.0±0.3bc	3.6±0.1a	2.3±0.2ab	4.9±0.5b	6.6±0.5c	88.5±1.0b	0.074±0.01c
	Κοτσιφάλι	22.1±0.9abc	4.6±0.5b	3.6±0.1a	2.4±0.1a	2.7±0.1d	6.3±0.3c	90.9±0.3a	0.070±0.01c
	Αγιωργίτικο	22.1±0.2bc	3.5±0.2c	3.8±0.1a	2.0±0.1b	3.8±0.2c	10.6±0.9a	85.6±1.1c	0.124±0.01a
	Ξινόμαυρο	22.2±0.3bc	6.1±0.2a	3.3±0.0b	1.9±0.1b	2.7±0.1d	8.7±0.5b	88.7±0.6b	0.098±0.01b
2018	Μαυροτράγναο	23.6±0.5a	3.1±0.3b	4.1±0.2a	1.8±0.4b	5.8±0.5a	15.1±0.7a	79.1±1.2b	0.191±0.03a
	Μανδηλαριά	18.6±0.7c	2.9±0.7b	3.8±0.3ab	2.3±0.2a	5.3±0.7a	9.9±0.3a	84.8±1.1a	0.117±0.02c
	Κοτσιφάλι	23.5±0.8a	3.2±0.3b	3.9±0.1ab	2.3±0.2a	3.0±0.8c	11.6±0.6a	85.4±1.4a	0.136±0.01b
	Αγιωργίτικο	20.2±0.8bc	4.3±0.5a	3.9±0.3ab	2.1±0.3a	3.7±0.5b	11.7±0.4a	84.6±0.9a	0.138±0.01b
	Ξινόμαυρο	21.3±0.6b	1.9±0.8c	3.5±0.2b	2.3±0.3a	2.7±0.6c	11.5±2.3a	85.8±2.9a	0.134±0.02b

Το 2018, οι ποικιλίες Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά και Κοτσιφάλι είχαν τις χαμηλότερες τιμές οξύτητας Η ολική οξύτητα και η τιμή του pH μπορεί να είναι χαρακτηριστικά μιας ποικιλία, εξαρτάται όμως και το στάδιο ωρίμανση κατά τη συγκομιδή, ενώ επηρεάζει τη διαδικασία της οινοποίησης, την αποθήκευση του οίνου και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά καθώς, εκτός από τη γεύση του όξινου που προσδίδει, επηρεάζει την αίσθηση της στυπτικότητας και έχει συσχετιστεί σημαντικά με αυτή (Kallithraka, Bakker, and Clifford 1997).

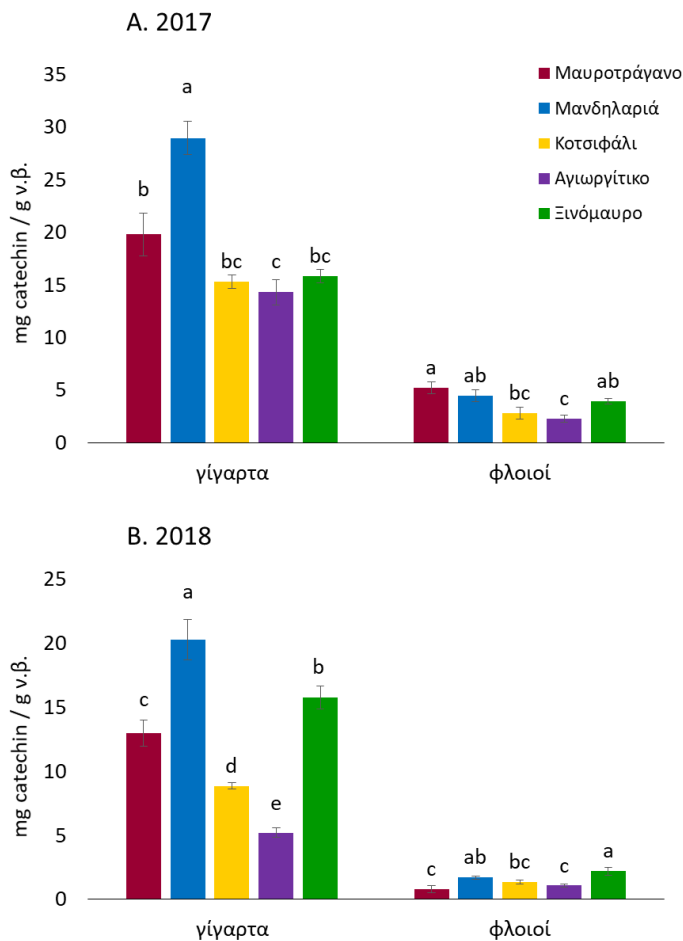
Τα αποτελέσματα του μεγέθους των ραγών παρουσιάζονται και αυτά στον Πίνακα 4.1. Το Μαυροτράγανο είχε τις μικρότερες ράγες και για τα δύο έτη, ενώ το Κοτσιφάλι και η Μανδηλαριά τις μεγαλύτερες, με τις διαφορές να είναι πιο έντονες για το 2017 (Πίνακας 4.1). Η κατανομή των συστατικών της ράγας (γίγαρτα, φλοιοί και σάρκα) στις ράγες κατά την ωρίμανση παρουσίασε διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποικιλιών. Αυτά τα χαρακτηριστικά της ράγας σχετίζονται με την ποικιλία (Bordiga et al. 2011; Shellie 2011), παράλληλα όμως υπάρχουν και άλλοι παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, καθώς το πάχος του φλοιού μπορεί να είναι ευαίσθητο σε υψηλές θερμοκρασίες που οδηγούν σε διαίρεση των κυττάρων και μεγαλύτερο πάχος φλοιού με αποτέλεσμα την αύξηση της αναλογίας φλοιού προς σάρκα (Pallioti et al. 2011) ή την υδατική κατάσταση του φυτού, καθώς η υδατική καταπόνηση μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα ποσοστά φλοιού και χαμηλότερα ποσοστά σάρκας (Kyraleou, Koundouras, et al. 2016). Στο Μαυροτράγανο παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη συμμετοχή των γιγάρτων στη συνολική μάζα της ράγας, ενώ το Κοτσιφάλι και το Ξινόμαυρο είχαν τη χαμηλότερη και για τα δύο έτη του πειράματος, ενώ οι δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ετών (Πίνακας 4.1).

Το 2017, η μεγαλύτερη συμμετοχή των φλοιών βρέθηκε για την ποικιλία Αγιωργίτικο (10,6%), με δεύτερη την ποικιλία Ξινόμαυρο (8.7%), ενώ η χαμηλότερη προσδιορίστηκε στο Μαυροτράγανο (5,4%). Το 2018, το Μαυροτράγανο είχε την πιο αυξημένη αναλογία φλοιών ανά ράγα με εμφανή την επίδραση της χρονιάς, συγκριτικά με τα γίγαρτα όπου οι τιμές κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα. Η αναλογία των φλοιών με τη σάρκα των ραγών είναι ένας σημαντικός παράγοντας της ποιότητας και του οργανοληπτικού χαρακτήρα του οίνου. Οι φλοιοί είναι πλούσιοι σε φαινολικές και αρωματικές ενώσεις που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά του αρώματος, της γεύσης και του χρώματος των ραγών και κατ' επέκταση των οίνων. Αυτές οι ενώσεις εκχυλίζονται στο γλεύκος κατά τη διάρκεια της οινοποίησης και η συμβολή τους στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου είναι πιο σημαντική όταν αυξάνεται ο λόγος των φλοιών προς τη σάρκα. Για το 2017, στις ποικιλίες Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες τιμές της αναλογίας φλοιού/σάρκα με τιμές 0,128 και 0,098 αντίστοιχα, και οι χαμηλότερες στις υπόλοιπες τρεις ποικιλίες Κοτσιφάλι (0,070), Μανδηλαριά (0,074) και Μαυροτράγανο (0,062), ενώ το 2018 τα ποσοστά αυτά ήταν αυξημένα σε όλες τις ποικιλίες όπως παρατηρήθηκε και για την αναλογία των φλοιών. Συγκεκριμένα, το δεύτερο έτος

μεγαλύτερη αναλογία προσδιορίστηκε στην ποικιλία Μαυροτράγανο, ενώ η μικρότερη στην ποικιλία Κοτσιφάλι. Τα χαρακτηριστικά των ραγών, %γίγαρτα/ράγα, %φλοιοί/ράγα, %σάρκα/ράγα και φλοιοί/σάρκα δεν συσχετίστηκαν με το βάρος της ράγας ($p > 0.01$) και τις διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ποικιλιών και επηρεάστηκαν από το έτος συγκομιδής. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση ($r = -0,845$, $p < 0,01$) μεταξύ της συμμετοχής των φλοιών/ράγα και της σάρκας/ράγα.

4.2 Ταννίνες των φλοιών και των γιγάρτων

Τα αποτελέσματα των ολικών ταννινών (ή προανθοκυανιδινών) παρουσιάζονται στα Γραφήματα 4.1 και 4.2 και εκφράστηκαν ως συγκέντρωση νωπού βάρους των γιγάρτων και των φλοιών αντίστοιχα



Γράφημα 4.1 Συγκεντρώσεις των ταννινών (PPTfw) σε φλοιούς και σε γίγαρτα εκφρασμένες σε mg κατεχίνης /g νωπού βάρους. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

PPTfw (mg κατεχίνης/ g ν.β.), ως περιεκτικότητα ανά ράγα, PPTb (mg κατεχίνης/ ράγα) και ως συγκέντρωση ανά γραμμάριο ράγας PPTbg (mg κατεχίνης / g ράγας). Όπως προαναφέρθηκε, σε όλες τις ποικιλίες και στα δύο έτη, με εξαίρεση το Μαυροτράγανο για το 2017, η κατανομή των γιγάρτων στη συνολική μάζα της ράγας ήταν μικρότερη συγκριτικά με αυτή των φλοιών (Πίνακας 4.1), ωστόσο οι συγκεντρώσεις PPTfw στα γίγαρτα (Γράφημα 4.1) ήταν μεγαλύτερες από αυτές των φλοιών όπως αναφέρεται και από άλλους ερευνητές για αρκετές ποικιλίες (Bonada et al. 2015; Kyraleou et al. 2017). Αναφορικά με τις ταννίνες των φλοιών, θεωρείται ότι εκχυλίζονται ευκολότερα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αλλά αυτές που εκχυλίζονται έχουν μικρότερη ικανότητα κατακρίμνησης των

πρωτεϊνών της σιέλου σε σχέση με την περιεκτικότητά τους στους φλοιούς και ο βαθμός εκχύλισής μπορεί να μειωθεί από 50-78% ανάλογα με τη μέθοδο που θα εφαρμοστεί (Rinaldi et al. 2015). Οι

ταννίνες των γιγάρτων μπορούν να εκχυλιστούν μετά από αυξημένης διάρκειας συμπαράμονή του γλεύκος με τα στέμφυλα και την παρουσία της αλκοόλης, συμμετέχοντας στο συνολικό προφίλ των ταννινών του οίνου και σε μερικές περιπτώσεις προσδίδοντας υπερβολική στυπτικότητα (Monagas et al. 2003).

Σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των PPTfw (Γράφημα 4.1) στα γίγαρτα και στους φλοιούς παρατηρήθηκαν μεταξύ των ποικιλιών. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε καθορίζει κυρίως τις συμπυκνωμένες τριμερείς έως οκταμερείς ταννίνες (Harbertson et al. 2014) οι οποίες συμβάλλουν στην στυπτικότητα και όχι μονομερείς και διμερείς φλαβαν-3-όλες, δηλαδή χαμηλού μοριακού μεγέθους, που συμβάλλουν κυρίως στην πικράδα (Casassa et al. 2013). Επιπλέον, η μέθοδος κατακρήμνισης των πρωτεϊνών από το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε (BSA) έχει συσχετιστεί έντονα με τη στυπτικότητα και έχει προταθεί ως ένα χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση της επίδρασης των διαφορετικών δομών των ταννινών στην αντίληψή της (Kennedy et al. 2006).

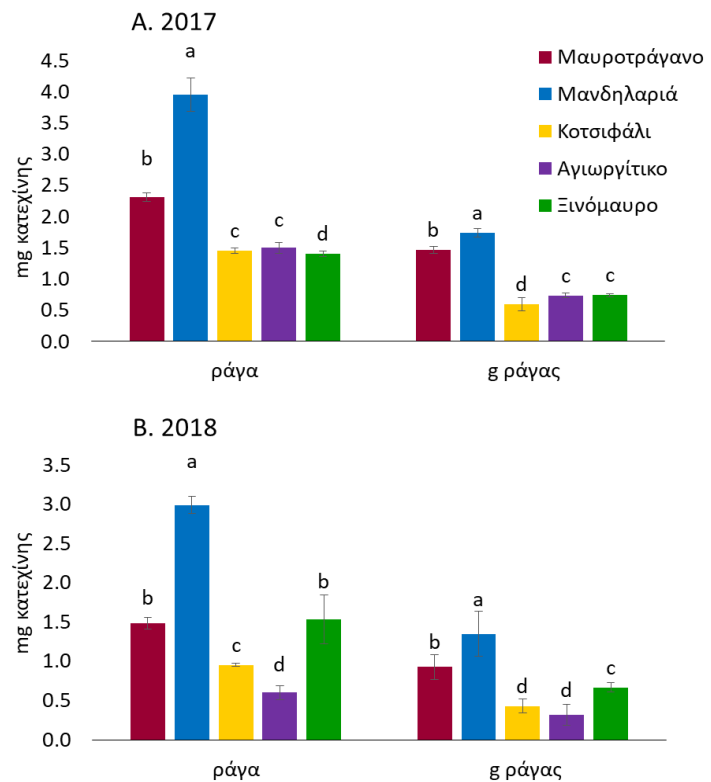
Το έτος 2017, η Μανδηλαριά είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση PPTfw στα γίγαρτα (28,9 mg κατεχίνη/g v.β.), και υψηλότερη από τις υπόλοιπες ποικιλίες κατά 31,6% από το Μαυροτράγανο, 47,1% από το Κοτσιφάλι, 50,6% από το Αγιωργίτικο και κατά 45,2% από το Ξινόμαυρο. Η υψηλές συγκεντρώσεις των ταννινών στην ποικιλία Μανδηλαριά δεν αποδίδονται στο χαμηλότερο βαθμό ωρίμανσης σε σχέση με τις άλλες ποικιλίες, καθώς η δεύτερη μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών των γιγάρτων (19,8 mg κατεχίνη/g v.β.) αλλά και η μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών των φλοιών (19,8 mg/g f.w.) παρατηρήθηκε στο Μαυροτράγανο που είχε τον υψηλότερο βαθμό ωρίμανσης (Πίνακας 4.1). Το 2018 οι συγκεντρώσεις των ταννινών προσδιορίστηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το 2017, με υψηλότερη συγκέντρωση στην ποικιλία Μανδηλαριά και χαμηλότερη στην ποικιλία Αγιωργίτικο. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το Ξινόμαυρο ήταν η μοναδική ποικιλία που η συγκέντρωση των ταννινών κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα και για τις δύο χρονιές. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι η περιεκτικότητα σε ταννίνες εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία και η ωρίμανση των σταφυλιών επηρεάζει κυρίως την εκχύλιση των ταννινών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οινοποίησης (Casassa et al. 2013). Μελέτη επικεντρωμένη στον τρόπο συμπεριφοράς των ταννινών κατά τη διάρκεια της συμπαράμονής των στεμφύλων με το γλεύκος έδειξε ότι οι ταννίνες των φλοιών εκχυλίζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και πιο γρήγορα από αυτές των γιγάρτων (Cerra-Calderon and Kennedy 2008). Ωστόσο, μετά από 10 ημέρες συμπαράμονής οι ταννίνες των γιγάρτων εκχυλίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό λόγω του σπασίματος των ραγών και της επαφής τους με το γλεύκος αλλά ταυτόχρονα λόγω της σταδιακά αυξημένης συγκέντρωσης της αλκοόλης που επιταχύνει τη διεργασία. Παρατηρήθηκε ότι τελικά μόνο το 30% των συνολικών ταννινών των φλοιών εξαγονται κατά τη μέγιστη συμπαράμονή των στεμφύλων με το γλεύκος (Cerra-Calderon and Kennedy 2008).

Η ποικιλία Αγιωργίτικο είχε τις μικρότερες συγκεντρώσεις των ταννινών στα γίγαρτα και για τις δύο χρονιές. Η περιεκτικότητα των ταννινών στα γίγαρτα θα μπορούσε να αποτελέσει χαρακτηριστικό της ποικιλίας καθώς μικρές διακυμάνσεις παρατηρούνται κατά την περίοδο της ωρίμανσης των σταφυλιών, εν αντιθέσει με τις ταννίνες των φλοιών, οι οποίες μειώνονται από τον περκασμό στην ωρίμανση (Kyraleou et al. 2017). Αυτό οφείλεται στην ικανότητά των ταννινών να συνδέονται με διάφορα κυτταρικά συστατικά, όπως λιγνίνες, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος (Downey et al. 2003) και επίσης την αλλαγή της υφής του φλοιού της ράγας κατά την ωρίμανση, η οποία καθιστά τις ταννίνες λιγότερο εκχυλίσιμες (Bordiga et al. 2011). Σε προηγούμενες μελέτες η συσσώρευση και η

περιεκτικότητα των ταννινών στις ράγες μπορεί να αλλάξει κάτω από διαφορετικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των περιβαλλοντικών συνθηκών (Koundouras et al. 2006) και τις αμπελουργικές πρακτικές (Kyraleou et al. 2015, 2017), ωστόσο υπάρχουν στοιχεία ότι η ανταπόκριση στις αμπελουργικές πρακτικές, όπως η υδατική παροχή, εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία (Niculaua et al. 2017).

Οι ολικές ταννίνες εκφράστηκαν ως περιεκτικότητα (PPTb) και ως συγκέντρωση (PPTbg) της ράγας (Γράφημα 4.2), έτσι ώστε να παρατηρηθεί η επίδραση του

μέγεθος της ράγας αλλά και να εκτιμηθεί η επίδραση της ποικιλίας. Η Μανδηλαριά ήταν η πιο πλούσια σε ταννίνες ποικιλία με περιεκτικότητα PPTb στα 3,9 mg κατεχίνη/ ράγα και 2,9 mg κατεχίνη/ ράγα για το 2017 και το 2018, αντίστοιχα (Γράφημα 4.2). Η χαμηλότερη PPTb παρατηρήθηκε στην ποικιλία Ξινόμαυρο 1,4 mg κατεχίνη/ ράγα το έτος 2017 και στην ποικιλία Αγιωργίτικο το έτος 2018. Όταν οι ταννίνες εκφράστηκαν ως συγκέντρωση σε mg κατεχίνη/ g ράγας, η PPTbg της Μανδηλαριά ήταν μεγαλύτερη και στα δύο έτη του πειράματος. Συγκεκριμένα το έτος 2017 εκτιμήθηκε στα 1,7 mg κατεχίνη/ g ράγας και ήταν μεγαλύτερη από τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων ποικιλιών κατά 15,8%,



Γράφημα 4.2 Συγκεντρώσεις των ταννινών (PPTb και PPTbg) σε φλοιούς και σε γίγαρτα εφρασμένες ως άθροισμα σε mg κατεχίνης /ράγα και mg κατεχίνης /g ράγας. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

65,5%, 57,8% and 57,4% Μαυροτράγανο, Κοτσιφάλι, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο, αντίστοιχα. Οι ποικιλίες Κοτσιφάλι, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο παρουσίασαν τις μικρότερες συγκεντρώσεις των ολικών ταννινών, PPTb και PPTgb (Γράφημα 4.2). Τα αποτελέσματα αυτά σχετίζονται με προηγούμενης έρευνας, στην οποία οίνοι της ποικιλία Μανδηλαριάς εμφανίζονται πιο συυπτικοί σε σχέση με αυτούς που προέρχονται από τις ποικιλίες Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο (Kallithraka et al. 2011). Επιπλέον, οι διαφορές των συγκριτικών αποτελεσμάτων όταν οι ολικές ταννίνες εκφράζονται ως περιεκτικότητα ή ως συγκέντρωση των ραγών υποδεικνύουν τη σημασία του μεγέθους των ραγών κατά τη συγκομιδή και τη μεγάλη επίδραση αυτής της παραμέτρου στις αποφάσεις της διαδικασίας οινοποίησης που πρέπει να ακολουθήσει ένας οινολόγος.

4.3 Χαρακτηρισμός της δομή των ταννινών

Στην παρούσα έρευνα οι υπομονάδες της δομής των ταννινών και ο μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) των φλοιών και των γιγάρτων των πέντε ποικιλιών που μελετήθηκαν έγινε στο σύνολο των ταννινών, μονομερείς, ολιγομερείς και πολυμερείς. Οι τιμές του μέσου βαθμού πολυμερισμού των ταννινών που προσδιορίστηκαν στις ποικιλίες κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για τις ποικιλίες Ξινόμαυρο (Kyraleou et al. 2015) και Αγιωργίτικο (Petrooulos et al. 2017), ωστόσο ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες που προσδιορίστηκαν σε διεθνείς ποικιλίες όπως το Merlot (Chira et al. 2009), το Cabernet Sauvignon (Bordiga et al. 2011) και το Syrah (Kyraleou et al. 2017).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν διαφορές μεταξύ των τιμών του mDP μεταξύ των ποικιλιών. Στα δύο έτη του πειράματος το Κοτσιφάλι είχε τις πιο πολυμερισμένες ταννίνες φλοιών και το Αγιωργίτικο τις μικρότερες σε μέγεθος. Το Μαυροτράγανο χαρακτηρίζεται με μεγάλο mDP, ενώ η Μανδηλαριά και το Ξινόμαυρο δεν παρουσίασαν στατιστικές διαφορές μεταξύ τους (Πίνακας 4.2). Σε προηγούμενη έρευνα παρατηρήθηκε ότι οι φλοιοί και τα γίγαρτα του Ξινόμαυρου εμπριέχουν ταννίνες με παρόμοιο mDP (Kyraleou et al. 2015) στα κλάσματα των ολιγομερών και των πολυμερών. Ωστόσο, αν συνυπολογιστεί το ολικό mDP των ταννινών, χωρίς να γίνει διαχωρισμός των κλασμάτων, παρατηρείται ότι οι φλοιοί έχουν πιο πολυμερισμένες ταννίνες από τα γίγαρτα. Όπως προαναφέρθηκε οι τιμές του mDP που αναφέρονται στην παρούσα έρευνα αναφέρονται στο σύνολο των ταννινών καθώς δεν έγινε κλασματοποίηση σύμφωνα με το μέγεθός τους. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι πολυμερείς PAs αντιπροσωπεύουν κατά μέσο όρο το 76% του συνόλου των PAs που προέρχονται από τα γίγαρτα, ενώ στους φλοιούς το ποσοστό αυτό είναι υψηλότερο και φτάνει το 96% (Kyraleou et al. 2017; Monagas et al. 2003). Η ποικιλία Ξινόμαυρο χαρακτηρίστηκε από φλοιούς με μεγαλύτερες τιμές mDP σε σχέση με αυτές του Αγιωργίτικου, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες έρευνες αναφορικά με τις ποικιλίες αυτές (Kyraleou et al. 2015; Petrooulos et al. 2017). Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι για πρώτη φορά γίνεται προσδιορισμός

των χαρακτηριστικών της δομής των ταννινών των ποικιλιών Μανδηλαριά, Κοτσιφάλι και Μαυροτράγανο.

Οι ταννίνες των γιγάρτων στις ποικιλίες Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά, Κοτσιφάλι και Ξινόμαυρο δεν παρουσίασαν διαφορά στις τιμές του mDP, ενώ το Αγιωργίτικο είχε τις χαμηλότερες τιμές σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες για το 2017 (Πίνακας 4.2). Ωστόσο, το 2018 παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές του mDP των γιγάρτων και διαφοροποίηση στη μεταξύ των ποικιλιών σύγκριση, με το Μαυροτράγανο να έχει τις μικρότερες πολυμερισμένες ταννίνες. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να οφείλονται στις συνθήκες ωρίμανσης των σταφυλιών, καθώς οι δύο χρονιές παρουσίασαν

Πίνακας 4.2 Μέσος βαθμός πολυμερισμού των ταννινών σε φλοιούς και γίγαρτα της κάθε ποικιλίας στο στο στάδιο της ωρίμανσης για τα έτη 2017 και 2018. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

		Ποικιλία				
		Μαυροτράγανο	Μανδηλαριά	Κοτσιφάλι	Αγιωργίτικο	Ξινόμαυρο
Φλοιοί	2017	10,5 ± 0,2b	9,1 ± 0,5b	12,7 ± 0,7a	6,8 ± 0,3c	9,2 ± 0,4b
	2018	12,3 ± 0,7b	10,6 ± 0,9c	14,5 ± 1,1a	9,6 ± 0,7c	11,2 ± 0,5b
Γίγαρτα	2017	3,3 ± 0,2a	3,4 ± 0,6a	3,3 ± 0,6a	2,9 ± 0,8b	3,1 ± 0,5ab
	2018	5,5 ± 0,4b	7,1 ± 0,7a	6,9 ± 0,6a	6,8 ± 0,3a	6,2 ± 0,2ab

διαφορετικές κλιματικές παραμέτρους μεταξύ τους. Το μέγεθος των ταννινών των γιγάρτων είναι σημαντικό για την ποιότητα του οίνου που παράγεται καθώς συνεισφέρουν οργανοληπτικά σε αυτό.

Οι μικρού μοριακού μεγέθους ταννίνες εκχυλίζονται πιο εύκολα κατά την οινοποίηση (Downey and Hanlin 2010) σε σχέση με τις μεγαλύτερες ταννίνες. Η συγκέντρωσή τους όμως μπορεί να επηρεαστεί από πολλές παραμέτρους όπως το στάδιο ωρίμανσης των σταφυλιών και τη διαδικασία που ακολουθείται κατά την παραμονή των στεμφύλων με το γλεύκος. Κατά την παραμονή των στεμφύλων με το γλεύκος διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, χρόνου και τρόπου εκχύλισης (ήπιες ή έντονες αναδεύσεις) μπορούν να διαφοροποιηθούν ανάλογα με το μέγεθος των ταννινών και να επηρεάσουν το τελικό προϊόν, καθώς αυτές είναι οι κύριες υπεύθυνες για τη στυπτικότητα, αλλά και την πολυπλοκότητα της γεύσης των οίνων. Οι τιμές του μέσου βαθμού πολυμερισμού του συνόλου των ταννινών των φλοιών, των γιγάρτων ή των οίνων παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία, όπως παρουσιάζεται από πολλές έρευνες (Ćurko et al. 2014; Petropoulos et al. 2017) και κατ'επέκταση είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διαφοροποίησης μεταξύ των ποικιλιών ή δείκτες αξιολόγησης της στυπτικότητας. Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι ο βαθμός πολυμερισμού και η δομή των ταννινών στους φλοιούς και στα γίγαρτα μπορεί να επηρεάσει το

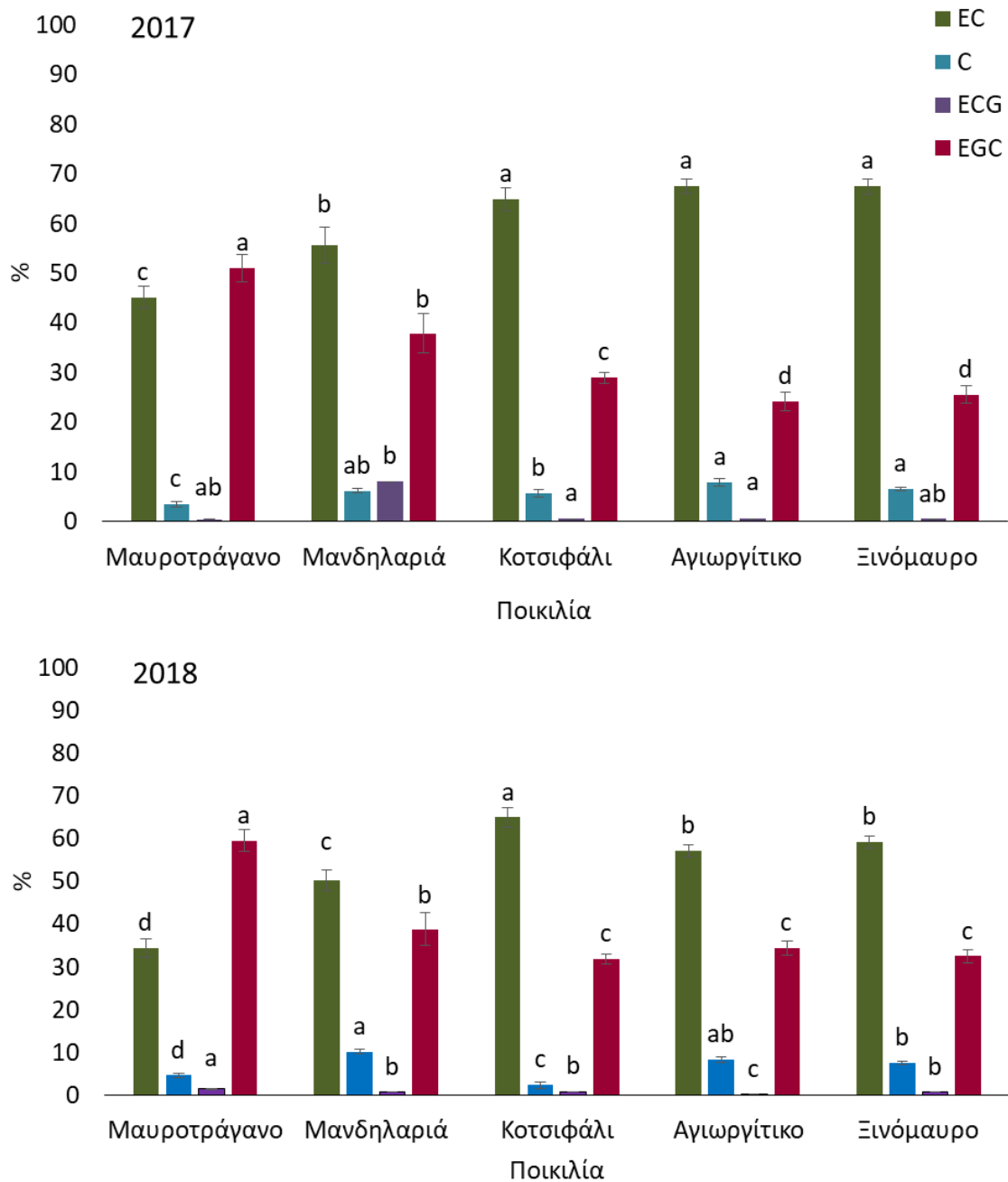
μέγεθος και τη δομή των ταννινών που υπάρχουν στους οίνους επιδρώντας σημαντικά στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Ερευνητές αναφέρουν ότι το μοριακό μέγεθος των ταννινών των οίνων ήταν παρόμοιο με αυτό που προσδιορίστηκε στα γίγαρτα (βαθμός πολυμερισμού 4 έως 17) και όχι με αυτό των φλοιών (βαθμός πολυμερισμού έως 40 ή μεγαλύτερο), ενώ η δομή τους είχε μεγαλύτερη συσχέτιση με αυτή των φλοιών, κυρίως λόγω της παρουσίας της EGC (Hanlin et al. 2011). Το αποτέλεσμα αυτό βασίζεται στο ότι οι μεγάλοι πολυμερισμού ταννίνες (> 20 υπομονάδες), που βρίσκονται στους φλοιούς, είναι δύσκολο να εκχυλιστούν στο γλεύκος κατά την οινοποίηση.

Για να αξιολογηθεί η ποσότητα των ταννινών που εκχυλίζεται στον οίνο θα πρέπει παράλληλα με τη συγκέντρωσή τους να προσδιορίζεται το μέγεθος και η δομή τους, τα οποία επηρεάζουν τη δυνατότητα εκχύλισής τους από το σταφύλι, ενώ θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι τεχνικές που εφαρμόζονται κατά την συμπαραμονή στεμφύλων και γλεύκους. Ο προσδιορισμός του μέσου βαθμού πολυμερισμού και της δομής των ταννινών θα μπορούσε να είναι ένα σημαντικό εργαλείο για τον οινοποιό καθώς δίνει την πρώτη ένδειξη της σύστασης των σταφυλιών σε ταννίνες και μπορεί να τον καθοδηγήσει στον τρόπο οινοποίησης που θα ακολουθήσει ώστε να έχει το επιθυμητό προϊόν.

Στα Γραφήματα 4.3 και 4.4 παρουσιάζεται η δομή των ταννινών των φλοιών και των γιγάρτων στις πέντε ποικιλίες που μελετήθηκαν. Στα εκχυλίσματα φλοιών η EC προσδιορίστηκε ως η κύρια υπομονάδα των ποικιλιών Μανδηλαριά, Κοτσιφάλι, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%, ενώ στην ποικιλία Μαυροτράγανο η κύρια προανθοκυανιδίνη ήταν η EGC. Οι φλοιοί των ποικιλιών Κοτσιφάλι, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο περιέχουν μεγαλύτερα ποσοστά του συνόλου της EC και της C συγκριτικά με τις άλλες δύο ποικιλίες (Μαυροτράγανο και Μανδηλαριά) και τα δύο έτη του πειράματος. Η μεγαλύτερη συμμετοχή της EGC σε φλοιούς προσδιορίστηκε στην ποικιλία Μαυροτράγανο και για τις δύο χρονιές, με μεγαλύτερο ποσοστό στο 2018 σε σχέση με το 2017. Προηγούμενες έρευνες έχουν συσχετίσει τα υψηλά ποσοστά υπομονάδων EC των PAs με υψηλή στυπτικότητα των εκχυλισμάτων φλοιών και γιγάρτων (Kyraleou, Kotseridis, et al. 2016; Quijada-Morín, Regueiro, Simal-ga, Toma, et al. 2012) ενώ η παρουσία EGC ως υπομονάδα των PAs έχει συσχετιστεί ισχυρά με τη μειωμένη στυπτικότητα (Quijada-Morín, Regueiro, Simal-ga, Toma, et al. 2012; Rinaldi et al. 2014), πιθανόν λόγω της αυξημένης υδροξυλίωσης του Β δακτυλίου (Vidal et al. 2002).

Στους φλοιούς της ποικιλίας Αγιωργίτικο η C προσδιορίστηκε μόνο ως τερματική υπομονάδα ενώ στις υπόλοιπες ποικιλίες ανιχνεύτηκε και στις δύο θέσεις, τερματική και επεκτατική. Επιπλέον, η ECG προσδιορίστηκε μόνο ως επεκτατική υπομονάδα και τα ποσοστά της ήταν πολύ χαμηλά (< 0,5%) κυρίως για το 2017 ενώ το 2018 ήταν πιο αυξημένα (Γράφημα 4.3). Οι εστεροποιημένες με γαλλικό οξύ υπομονάδες, όπως η ECG, μπορούν να αυξήσουν την δέσμευση των ταννινών από τις πρωτεΐνες και τα ποσοστά παρουσία τους στην αλυσίδα των ταννινών έχουν συσχετιστεί θετικά με τη

στυπτικότητα σε σταφύλια και οίνους (Lorrain et al. 2011; Rinaldi et al. 2014; Vidal et al. 2003). Ωστόσο, έχει αναφερθεί και απουσία συσχέτισης μεταξύ της ECG και της έντασης της στυπτικότητας (Κυγαλεου, Kotseridis, et al. 2016), το οποίο πιθανόν να οφείλεται στα χαμηλά ποσοστά παρουσία της στα δείγματα που μελετήθηκαν.



Γράφημα 4.3 Ποσοστά των υπομονάδων για τον χαρακτηρισμό της δομής των φλοιών για τα έτη 2017 και 2018. Υπομονάδες: EC: (-)-επικατεχίνη, C: (+)-κατεχίνη, ECG: γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης και EGC: (-) -επιγαλλοκατεχίνη. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστική διαφορά μεταξύ των ποικιλιών (Tukey's test, $p < 0.05$)

Στα γίγαρτα η EC προσδιορίστηκε ως κύρια υπομονάδα και σε αυξημένα ποσοστά σε όλες τις ποικιλίες ενώ η EGC απουσίαζε από όλα τα δείγματα όπως έχει παρατηρηθεί σε αρκετές ποικιλίες

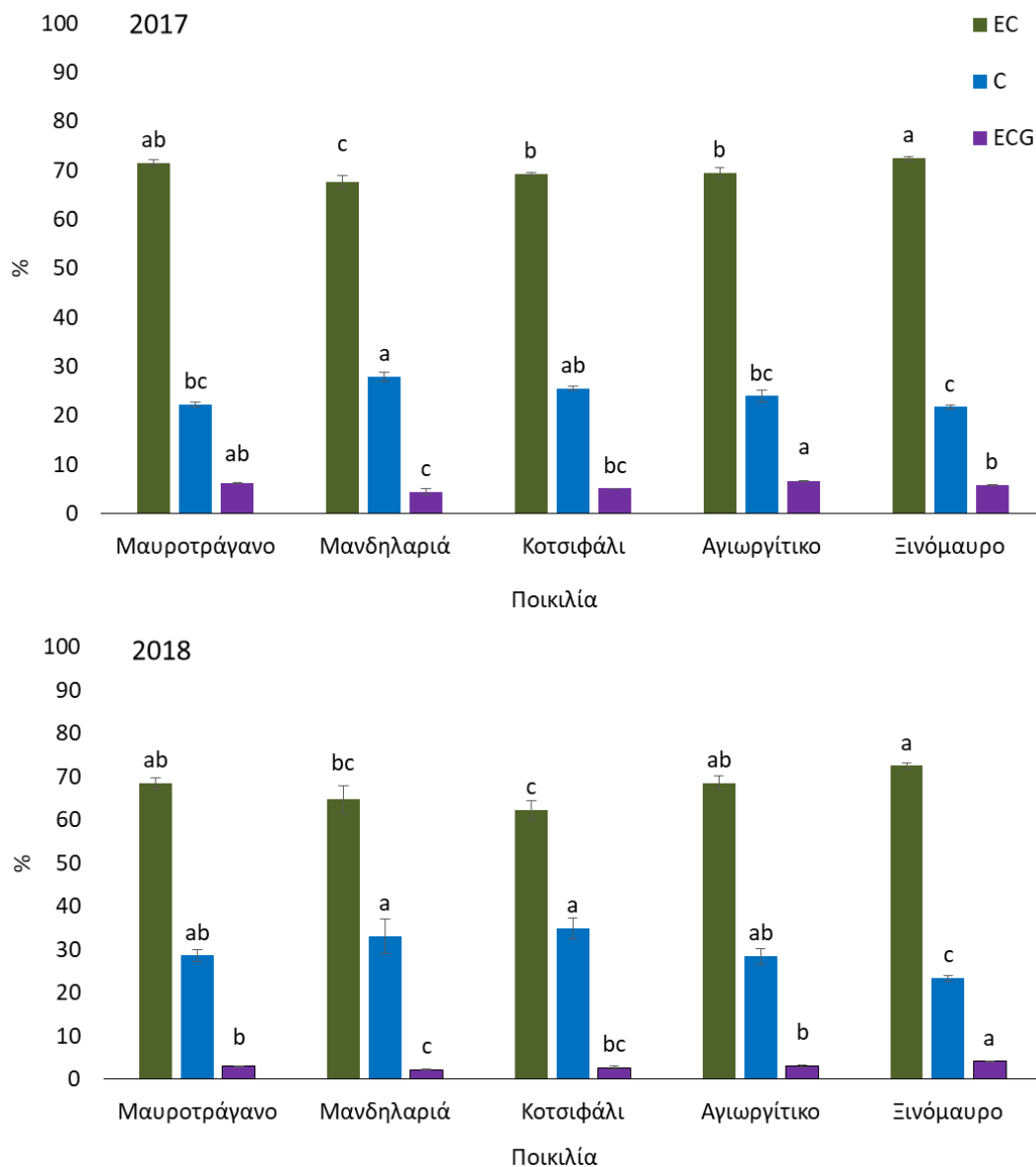
(Hanlin et al. 2011; Kyraleou et al. 2017; Rinaldi et al. 2014). Το προφίλ των ταννινών των γιγάρτων διαφοροποιήθηκε σε μικρότερο βαθμό μεταξύ των ποικιλιών, εν αντιθέσει με αυτό των ταννινών των φλοιών (Γράφημα 4.4). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ποσοστά της EC, της C, και της ECG το 2017 κυμάνθηκαν μεταξύ 67-73%, 21-28% και 4-7%, αντίστοιχα, ενώ για το 2018 οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 62-72%, 23-34% και 2-4% αντίστοιχα (Γράφημα 4.4). Τα ποσοστά συμμετοχής της C, ως υπομονάδα, ήταν αυξημένα το 2018 σε σχέση με το 2017, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε για τα ποσοστά της ECG. Το %ECG προσδιορίστηκε στα γίγαρτα σε τιμές κατά πολύ μεγαλύτερες συγκριτικά με αυτό των φλοιών. Το Ξινόμαυρο είχε τα μεγαλύτερα ποσοστά EC, και στα δύο έτη του πειράματος, ενώ το χαμηλότερο ποσοστό παρατηρήθηκε στα γίγαρτα της ποικιλίας Μανδηλαριά για το 2017 και της ποικιλίας Κοτσιφάλι για το 2018.

Όλες οι υπομονάδες των ταννινών των γιγάρτων κατείχαν και τις δυο θέσεις, τερματική και επεκτατική, στις αλυσίδες των ταννινών. Η EC προσδιορίστηκε κυρίως ως επεκτατική υπομονάδα σε ποσοστά μεγαλύτερα του 50% (από τα 67-73%), ενώ η ECG κυρίως ως τερματική υπομονάδα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3% (από το 3-7%). Αναφορικά με τα ποσοστά της C, αυτή προσδιορίστηκε σε παρόμοια ποσοστά και στις δύο θέσεις των ταννινών των γιγάρτων στις ποικιλίες Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά και Κοτσιφάλι, ενώ στις ποικιλίες Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο προσδιορίστηκε κυρίως ως τερματική υπομονάδα.

Η θέση στην οποία προσδιορίζεται κάθε υπομονάδα θα μπορούσε να αποτελέσει χαρακτηριστικό της ποικιλίας καθώς δείχνει πώς δημιουργείται μια αλυσίδα ταννινών και τη συχνότητα εμφάνισης των ενώσεων στη θέση αυτή κατά την ωρίμανση. Είναι πιθανό ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των ενώσεων κατά την ωρίμανση που θα αποτελέσουν τις υπομονάδες των ταννινών σε συνδυασμό με την τάση να συνδέονται με συγκεκριμένο μοτίβο να μας βοηθήσει να προβλέψουμε τον τρόπο σύνθεσή τους και να παρέμβουμε στην τελική σύσταση στους φλοιούς και στα γίγαρτα.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε προηγούμενες έρευνες στηρίζουν την υπόθεση ότι οι ταννίνες των φλοιών έχουν μεγαλύτερη συμμετοχή στις ταννίνες του οίνου σε σχέση με αυτές των γιγάρτων, κυρίως λόγω της παρουσίας των προδελφινιδινών, ενώσεις που εμπεριέχουν υπομονάδες επιγαλλοκατεχίνης ή γαλλοκατεχίνης στη δομή τους (Petrooulos et al. 2017; Quijada-Morín, Regueiro, Simal-ga, Toma, et al. 2012). Οι Petrooulos et al. (2017) παρατήρησαν ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στο προφίλ των ταννινών των φλοιών και το προφίλ των ταννινών που προσδιορίστηκαν στους οίνου, ενώ παρατηρήθηκε ότι οι ταννίνες των γιγάρτων δεν επηρέασαν σημαντικά τη σύσταση των οίνων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη συμπαραμονή των στεμφύλων με το γλεύκος οι φλοιοί έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής σε σχέση με τα γίγαρτα και συνεπώς μεγαλύτερο ποσοστό μπορεί να εκχυλιστεί από αυτά, κυρίως κατά τις πρώτες μέρες της εκχύλισης. Επίσης, η δομή των κυττάρων των φλοιών επιτρέπουν την ευκολότερη εκχύλιση των συστατικών τους

σε σχέση με των γιγάρτων, η οποία επιπρόσθετα εμποδίζεται από την παρουσία μεμβράνης σε αυτά. Είναι πιθανόν, για το ίδιο χρονικό διάστημα οι φλοιοί να εκχυλίζουν μεγαλύτερη ποσότητα και μεγαλύτερου μοριακού βάρους ταννίνες σε σχέση με αυτή των γιγάρτων. Επιπλέον, ακόμα και αν εκχυλίζονται ταννίνες του ίδιου μοριακού βάρους αυτές να διαφέρουν στη δομή τους και συνεπώς να επηρεάσουν διαφορετικά τον οργανοληπτικό χαρακτήρα των οίνων. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τη σύσταση των ολιγομερών ταννινών των φλοιών και των γιγάρτων για να προβλέψουμε τη δομή των αντίστοιχων ταννινών των οίνων καθώς αυτές είναι που εκχυλίζονται πρώτες κατά την οινοποίηση. Συγκεκριμένα, οι ολιγομερείς ταννίνες αντιπροσωπεύουν μεγαλύτερο ποσοστό που θα εκχυλιστεί, συμμετέχουν οργανοληπτικά στις ιδιότητες των οίνων και είναι αυτές που ενώνονται

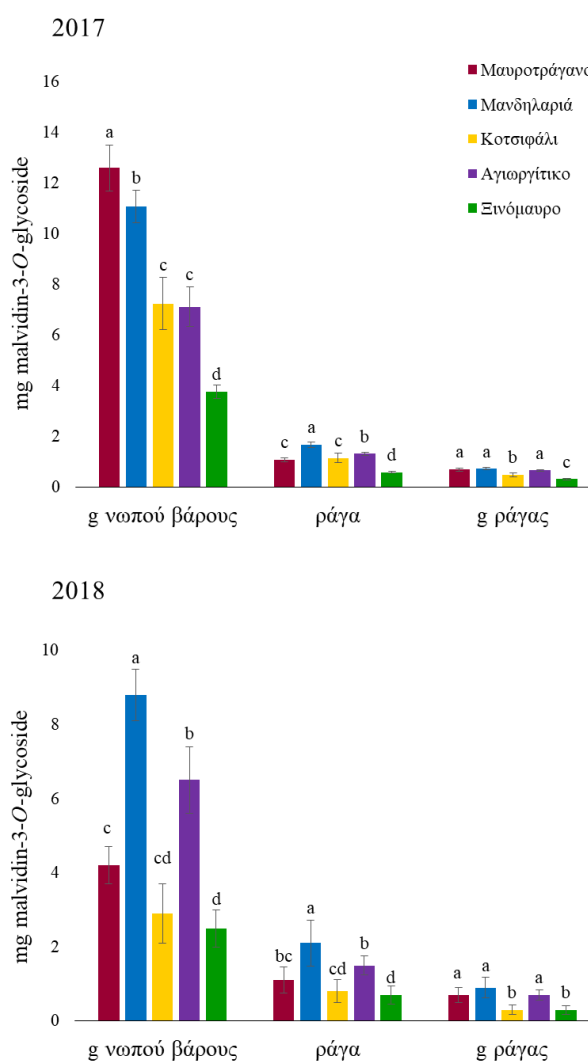


Γράφημα 4.4 Ποσοστά των υπομονάδων για τον χαρακτηρισμό της δομής των γιγάρτων για τα έτη 2017 και 2018. Υπομονάδες: EC: (-)-επικατεχίνη, C: (+)-κατεχίνη, και ECG: γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστική διαφορά μεταξύ των ποικιλιών (Tukey's test, $p < 0.05$)

ισχυρά με τις πρωτεΐνες της σιέλου καθώς οι μεγάλοι μοριακού βάρους ταννίνες είτε καταβυθίζονται είτε δεν έχουν την ιδιότητα να ενωθούν με τις πρωτεΐνες αυτές. Επιπλέον, είναι πιθανόν η θέση των υπομονάδων σε ένα μόριο να επηρεάσει τον τρόπο δέσμευσης με τις πρωτεΐνες και άρα τη στυπτικότητα. Ο προσδιορισμός της δομής του συνόλου των ταννινών μπορεί να συνεισφέρει κυρίως στη διαφοροποίηση των ποικιλιών καθώς έχει τονιστεί σε προηγούμενες έρευνες ότι η ποικιλία των σταφυλιών επηρεάζει σημαντικά την αναλογία και τη σύσταση των φλοιών και των γιγάρτων των σταφυλιών. Ωστόσο, για να υπάρχει μια συνολική εικόνα της στυπτικότητα που προκύπτει σε ένα οίνο πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν και άλλα χαρακτηριστικά της σύστασης όπως η συγκέντρωση των ανθοκυανών, η οξύτητα και η διαδικασία παλαίωσης του οίνου.

4.4 Ανθοκυάνες των φλοιών

Στη φαινολική σύσταση των ραγών εκτός από τις ταννίνες συμμετέχουν και οι ανθοκυάνες. Στις πέντε ποικιλίες που μελετήθηκαν εντοπίστηκαν μόνο στους φλοιούς και εκφράζονται ως ολικές ανθοκυάνες (TAnth) σε mg Mlv/ g νωπού βάρους (ν.β.) φλοιών, σε mg Mlv/ ράγα, η περιεκτικότητα της ράγας, και σε mg Mlv/ g ράγας, η συγκέντρωση ενός γραμμαρίου της ράγας. Οι TAnth στους φλοιούς κυμάνθηκαν από 3,7 – 12,6 mg Mlv/ g ν.β., ανάλογα με την ποικιλία για το έτος 2017, ενώ κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα το 2018, όπως παρατηρήθηκε και στις συγκεντρώσεις των ταννινών. Η ποικιλία Ξινόμαυρο είχε τη χαμηλότερη συγκέντρωση στους φλοιούς ενώ οι ποικιλίες Μαυροτράγανο και Μανδηλαριά τις μεγαλύτερες για τα έτη 2017 και 2018, αντίστοιχα (Γράφημα 4.5).



Γράφημα 4.5 Συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανών που προσδιορίστηκαν στους φλοιούς κάθε ποικιλίας για τα έτη 2017 και 2018. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστική διαφορά μεταξύ των ποικιλιών (Tukey's test, $p < 0.05$)

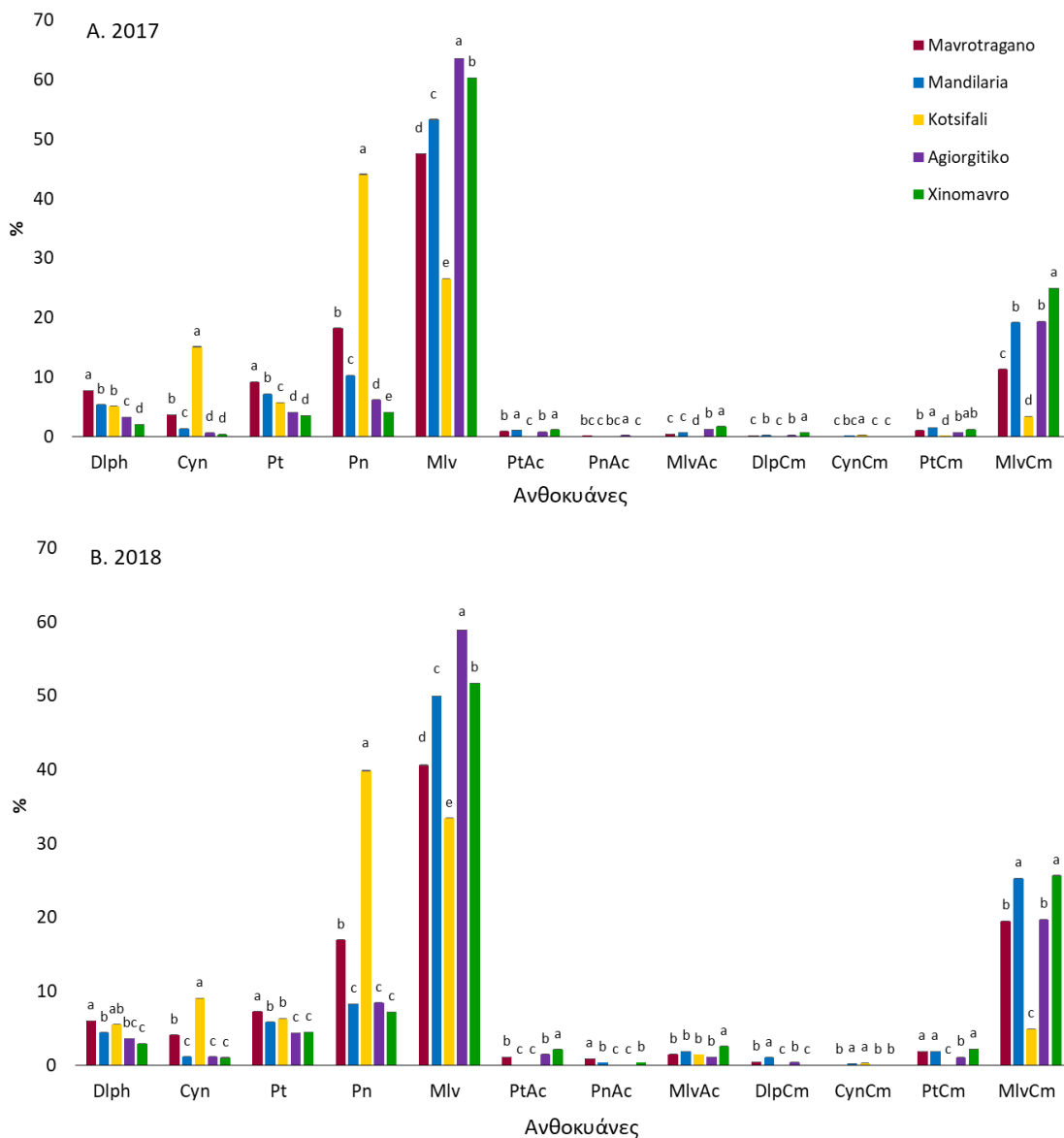
Ωστόσο, όταν οι TAnth εκφράστηκαν ως περιεκτικότητα της ράγας η μεγαλύτερη τιμή παρατηρήθηκε στην ποικιλία Μανδηλαριά (1.6 mg Mlv/ ράγα και 1,9 mg Mlv/ ράγα), και σε ποσοστό 35%-50% μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες του Μαυροτράγανου, συνέπεια του μικρότερου μεγέθους ράγας της ποικιλίας (Πίνακας 4.1). Το έτος 2017, οι τιμές των TAnth από τις ποικιλίες Αγιωργίτικο και Κοτσιφάλι δεν παρουσίασαν στατιστικές διαφορές όταν αυτές εκφράστηκαν σε νωπό βάρος φλοιών, ωστόσο η περιεκτικότητα της ράγας στο Κοτσιφάλι ήταν μικρότερη. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των TAnth ανά g ράγας για τις ποικιλίες Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά και Αγιωργίτικο. Η ποικιλία Ξινόμαυρο είχε τις χαμηλότερες τιμές σε σχέση με τις υπόλοιπες, σε όλες τις εκφράσεις των ανθοκυανών και τα δύο έτη του πειράματος. Σε μελέτη ελληνικών ποικιλιών έχει αναφερθεί ότι το Ξινόμαυρο είναι φτωχότερο σε ανθοκυάνες συγκριτικά με τις ποικιλίες Μανδηλαριά (Kallithraka et al. 2009; Kallithraka, A. A Mohdaly, et al. 2005) και Αγιωργίτικο (Kallithraka et al. 2009).

Σε προηγούμενη έρευνα οι οίνοι από τα σταφύλια της ποικιλίας Αγιωργίτικο εκτιμήθηκαν ως πιο ήπιοι στη γεύση με χαμηλότερη στυπτικότητα, ενώ οι οίνοι της ποικιλίας Ξινόμαυρο χαρακτηρίστηκαν ως πιο στυπτικοί (Kallithraka et al. 2011; Koussissi et al. 2003). Στην παρούσα μελέτη, το Αγιωργίτικο είχε τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις ταννινών στα γίγαρτα και στους φλοιούς συγκριτικά με τα σταφύλια της ποικιλίας Ξινόμαυρο, ενώ δεν υπήρχαν στατιστικές διαφορές όταν οι συγκεντρώσεις αυτές εκφράστηκαν ανά g ράγας. Όπως προαναφέρθηκε, τα σταφύλια του Ξινόμαυρου είχαν υψηλότερη οξύτητα και χαμηλότερη περιεκτικότητα ολικών ανθοκυανών, χαρακτηριστικά που επηρεάζουν τις διαδικασίες οινοποίησης, κυρίως το χρόνο συμπαραμονής των στεμφύλων με το γλεύκος επηρεάζοντας την εκχύλιση όλων των φαινολικών ενώσεων και συμβάλλουν στον οργανοληπτικό χαρακτήρα ενός οίνου.

Επιπλέον, η αυξημένη παρουσία των ανθοκυανών σε μία ποικιλία μπορεί να δημιουργήσει αντιδράσεις μεταξύ των ανθοκυανών και των ταννινών, επηρεάζοντας περαιτέρω τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ταννινών και πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για τη στυπτικότητα (Kallithraka et al. 2011). Έχει παρατηρηθεί αρνητική συσχέτιση μεταξύ του περιεχομένου ολικών ανθοκυανών ενός οίνου και της στυπτικότητάς του (Vidal et al., 2003; Chira et al., 2011; Kallithraka et al., 2011) και έχει θεωρηθεί πως οι ανθοκυάνες είτε δεν συνεισφέρουν είτε μειώνουν την στυπτικότητα. Σε αυτό μπορεί να προστεθεί και η επίδραση του συγχρωτισμού, που εξαιτίας των συμπλόκων που προκύπτουν καθυστερεί η ανάπτυξη της στυπτικότητας, πιθανόν λόγω της αύξησης του ιξώδους ή της μείωσης της διαθεσιμότητας των κατεξοχόν στυφών ουσιών. Ωστόσο, σε ποικιλίες που είναι πλούσιες σε ανθοκυάνες, όπως η Μανδηλαριά, και έχει αναφερθεί ότι παράγουν ιδιαίτερα στυπτικούς οίνους, σημαντικό ρόλο πιθανόν να έχει η συγκεντρώση των ολικών ταννινών αλλά και η δομή τους και χρειάζεται επιπλέον μελέτη για να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα.

4.5 Προφίλ των Ανθοκυανών

Διαφορές παρατηρήθηκαν στο προφίλ των ανθοκυανών μεταξύ των ποικιλιών. Η κύρια ανθοκυάνη για τις ποικιλίες Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο ήταν η ΜΙν, όπως έχει αναφερθεί για μεγάλο αριθμό ποικιλιών μεταξύ των οποίων και αρκετές Ελληνικές ποικιλίες (García-Beneytez, Revilla, and Cabello 2002; Han, Li, and Xu 2015; Petropoulos et al. 2017; Theodorou et al. 2019) ενώ στο Κοτσιφάλι ήταν η Ρη, με αμέσως επόμενη την ΜΙν και για τα δύο έτη (Γράφημα 4.6). Σύμφωνα με μια προηγούμενη μελέτη, η Ρη έχει προσδιοριστεί ως η κύρια ανθοκυάνη σε δείγματα της ισπανικής ποικιλίας Garnacha Tintorera (García-Beneytez et al. 2002) και σε παρόμοια επίπεδα με την ΜΙν στην πορτογαλική ποικιλία Alvarilhão (Costa et al. 2014).



Γράφημα 4.6 Προφίλ των ανθοκυανών που προσδιορίστηκαν στους φλοιούς κάθε ποικιλίας για τα έτη 2017 και 2018. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστική διαφορά μεταξύ των ποικιλιών (Tukey’s test, $p < 0.05$)

Η σύσταση των φλοιών σε ανθοκυάνες έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την ένταση του χρώματος του οίνου (González-Manzano et al. 2008; He et al. 2010). Όπως προαναφέρθηκε η ποικιλία Κοτσιφάλι έχει την ίδια συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών στους φλοιούς με την ποικιλία Αγιωργίτικο. Ωστόσο, οι οίνοι που προέρχονται από τις δύο αυτές ποικιλίες δεν έχουν την ίδια ένταση χρώματος και η πιθανή εξήγηση είναι το διαφορετικό προφίλ των ανθοκυανών τους, καθώς η κάθε ανθοκυάνη και ο τρόπος που ενώνεται με τα διάφορα συστατικά του οίνου προσδίδουν διαφορετικό χρώμα.

Στους φλοιούς της ποικιλίας Μαυροτράγανο οι πιο σημαντικές ανθοκυάνες είναι οι Mln >Pn >MlCm, με σειρά αφθονίας. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ποικιλίες, η Pn ήταν η δεύτερη μεγαλύτερη ανθοκυάνη το 2017 και κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα με την MlnCm για το 2018 (Kallithraka et al. 2009; Kyraleou et al. 2015). Τα ποσοστά της Dlp και της Pt στο Μαυροτράγανο ήταν αφθονότερα σε σχέση με αυτά που προσδιορίστηκαν στις υπόλοιπες τέσσερις ποικιλίες, 7,7% και 9,2%, για το 2017, 6,0 και 7,2% για το 2018, αντίστοιχα, ενώ και τα ποσοστά της Cyn ήταν ικανοποιητικά 3,6% (2017) και 4,1% (2018). Η Μανδηλαριά ήταν η πλουσιότερη ποικιλία σε Mln με το ποσοστό της να φτάνει σε μέσο όρο το 51,6% και για τα δύο έτη. Σε μεγάλη αφθονία στο προφίλ των ανθοκυανών της Μανδηλαριάς είχε και η MlnCm (19,2% το 2017 και 25,3% το 2018), όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη έρευνα (Kallithraka et al. 2009).

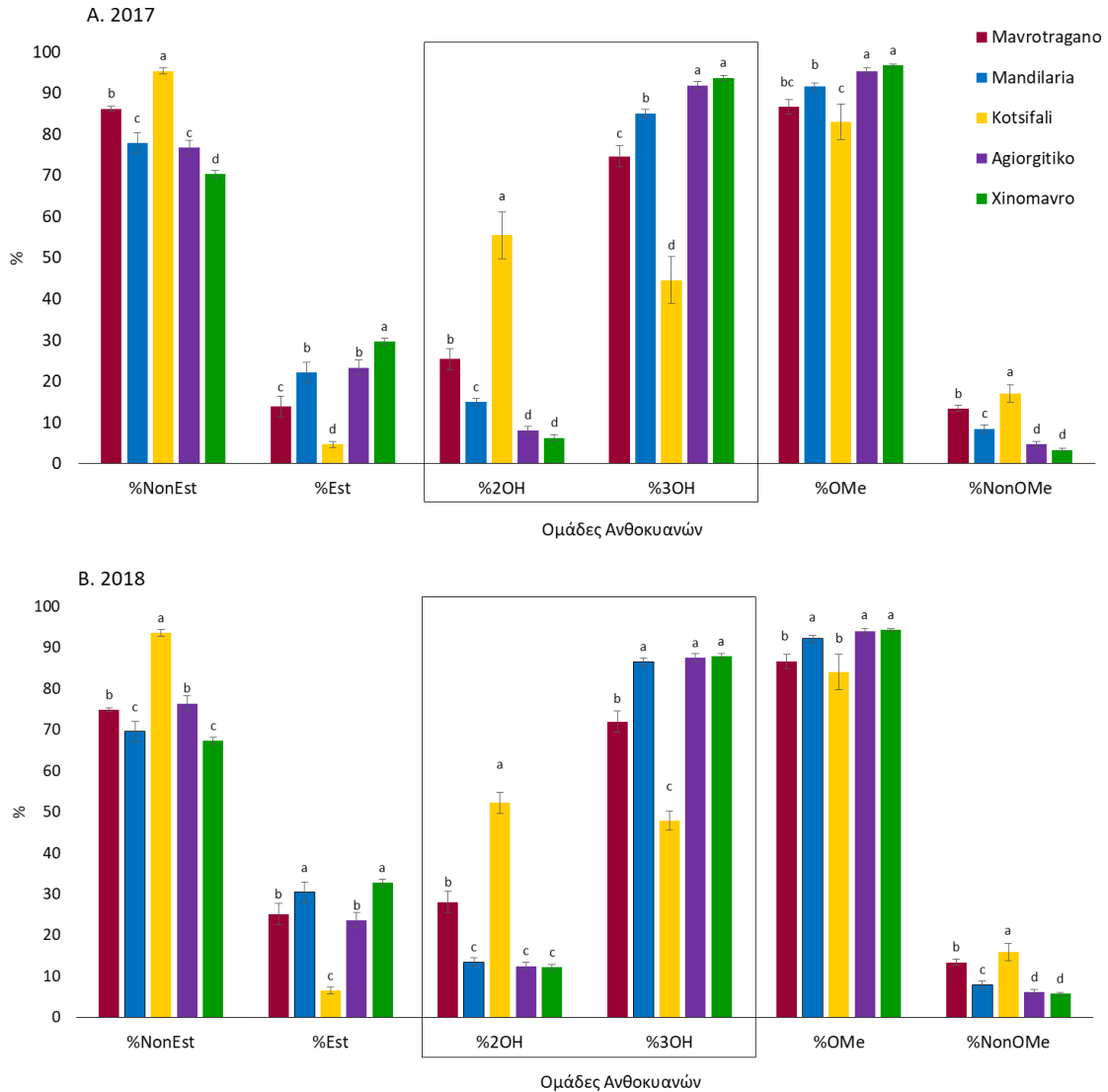
Το Κοτσιφάλι είχε το μικρότερο ποσοστό σε Mln (26,6% το 2017 και 33,4% το 2018), και τα υψηλότερα ποσοστά σε Pn (44,1% το 2017 και 39,9% το 2018) και Cyn (15,2% το 2017 και 9,1% το 2018). Εντούτοις, αναμένεται στους οίνους της ποικιλίας Κοτσιφάλι οι συγκεντρώσεις της Pn και Cy να είναι χαμηλότερες σε σχέση με αυτές των ραγών, λόγω αντιδράσεων αποδόμησης των μονομερών, καθώς και ο κύριος μονογλυκοζίτης να είναι η Mln (García-Beynetez et al., 2002). Αν και η Mln εκχυλίζεται άμεσα από τους φλοιούς, οι ποσότητες της καθορίζονται από τη συμπεριφορά των υπόλοιπων μονομερών κατά την οινοποίηση, όπως αναφέρεται στην ίδια έρευνα. Από τον Di Stefano et al. (1994), έχει αναφερθεί πως ποικιλίες με υψηλές συγκεντρώσεις των μονομερών Pn και Cy παράγουν οίνους με χαμηλή σταθερότητα χρώματος, λόγω της οξειδωσης των συγκεκριμένων μονομερών από ένζυμα κατά τη ζύμωση. Ιδιαιτερότητα της ποικιλίας αποτελεί ότι δεν προσδιορίστηκαν οξικοί εστέρες των ανθοκυανών στο προφίλ της για το 2017, ενώ για το 2018 προσδιορίστηκε μόνο η MlnAc σε χαμηλό ποσοστό. Οι κουμαρικοί εστέρες των ανθοκυανών είχαν εξίσου χαμηλή συμμετοχή σε σχέση με αυτούς των άλλων ποικιλιών και στα δύο έτη του πειράματος, με συγκριτικά μικρότερη τη MlnCm που κυμάνθηκε σε ποσοστά 3,3-4,9%, ενώ στις άλλες ποικιλίες το ποσοστό της ήταν μεγαλύτερο από 12% (Γράφημα 4.6). Δεδομένης της σημασίας του MlnCm στο χρώμα ενός οίνου λόγω αύξημένης απορρόφησης του φωτός (Goto, 1987), η ελλειμματική παρουσία της θα μπορούσε

να μειώσει δραστικά την ένταση και τη σταθεροποίηση του παραγόμενου οίνου. Ωστόσο, η CynCm απουσίαζε από το προφίλ όλων των ποικιλιών με εξαίρεση την ποικιλία Κοτσιφάλι το 2017.

Ομοιότητες παρατηρήθηκαν στο προφίλ των ανθοκυανών μεταξύ του Αγιωργίτικου και του Ξινόμαυρου, με την κύρια ανθοκυάνη, Mln, να προσδιορίζεται σε τιμές 63% και 61%, αντίστοιχα για το 2017 και 59% και 52% αντίστοιχα για το 2018, ενώ οι ανθοκυάνες Dlp, Cyn, Pt και Pn συνεισφέρουν σε χαμηλότερα ποσοστά σε σχέση με τις υπόλοιπες (Γράφημα 4.6). Κύρια διαφορά στο προφίλ των δύο αυτών ποικιλιών είναι τα μεγαλύτερα ποσοστά των κουμαρικών εστέρων των ανθοκυανών και τα μικρότερα ποσοστά γλυκοσιλιωμένων ανθοκυανών στην ποικιλία Ξινόμαυρο σε σχέση με την ποικιλία Αγιωργίτικο. Όσον αφορά στο Ξινόμαυρο, η Cyn πιθανώς αποτελεί μια μεταβλητή της ποικιλίας λόγω του μεγάλου αριθμού των κλώνων που καλλιεργούνται στις διάφορες περιοχές, διότι στην παρούσα μελέτη ανιχνεύτηκε στο 30% των δειγμάτων που αναλύθηκαν ενώ έχει σημειωθεί σε προηγούμενες ελέτες τόσο η απουσία της (Kallithraka et al., 2005), όσο και μεγαλύτερη αναλογία της ανά ράγα (Kyraleou et al., 2015). Επίσης, σε ορισμένα δείγματα ραγών παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση της Pt σε σχέση με την Pn, κάτι που δεν συμφωνεί με τη μέση σειρά αφθονίας των ανθοκυανών της ποικιλίας Ξινόμαυρο.

Για να περιγράψουμε καλύτερα τις διακυμάνσεις στο προφίλ των ανθοκυανών μεταξύ των πέντε ποικιλιών, οι ανθοκυάνες ομαδοποιήθηκαν με βάση τα παρόμοια χημικά τους χαρακτηριστικά. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ένταση του χρώματος του οίνου είναι η συμβολή των μη εστεροποιημένων (Cyn, Dlp, Pt, Pn, Mln) και των εστεροποιημένων ανθοκυανών (οξικοί και κουμαρικοί). Οι μη εστεροποιημένες ανθοκυάνες, είναι πιο ευαίσθητες στις αντιδράσεις οξειδωσης των ραγών και των οίνων (He et al. 2010), ενώ οι εστεροποιημένες αντιπροσωπεύουν τις πιο σταθερές μορφές των ανθοκυανών (Rinaldi et al. 2015) καθώς είναι πιο ανθεκτικές σε οξειδώσεις που μπορεί να προκληθούν από την έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία ή υψηλές θερμοκρασίες (Downey, Harvey, and Robinson 2004). Στην παρούσα μελέτη οι μη εστεροποιημένες ανθοκυάνες είναι το κλάσμα που βρίσκεται σε αφθονία και στις πέντε ποικιλίες (Γράφημα 4.7). Τα υψηλότερα ποσοστά μη-εστεροποιημένων ανθοκυανών παρατηρήθηκαν και για τα δύο έτη στους φλοιούς από την ποικιλία Κοτσιφάλι (95,3% και 93,5% αντίστοιχα), ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά στο Ξινόμαυρο (70,5% και 67,2% αντίστοιχα), τιμές που έχουν αναφερθεί για το Ξινόμαυρο και σε προηγούμενη έρευνα (Theodorou et al. 2019). Στο Αγιωργίτικο τα επίπεδα των μη εστεροποιημένων και εστεροποιημένων ανθοκυανών στις ράγες ήταν 77% και 23% αντίστοιχα και για τα δύο έτη (Γράφημα 4.7).

Στις ποικιλίες Μαυροτράγανο και Μανδηλαριά παρατηρήθηκε επίδραση του έτους στα ποσοστά των μη εστεροποιημένων και εστεροποιημένων ανθοκυανών. Στην περίπτωση των φλοιών της ποικιλία Μαυροτράγανο οι τιμές αυτές ήταν για το 2017 86,2% και 13,8% και για το 2018 74,8% και 15,2%,



Γράφημα 4.7 Ομάδοποίηση των ανθοκυανών που προσδιορίστηκαν στους φλοιούς κάθε ποικιλίας για τα έτη 2017 και 2018. %NonEs: Dlp, Cyn, Pt, Pn, Mln, %Est: οξικοί και κουμαρικοί εστέρες των ανθοκυανών, %2OH: Cyn, Pn, %3OH: Dlp, Pt, Mln, %OMe: Pn, Pt, Mln, %NonOMe: Dlp, Cyn. Τιμές με διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστική διαφορά μεταξύ των ποικιλιών (Tukey's test, $p < 0.05$)

ενώ στην Μανδηλαριά τα ποσοστά αυτά ήταν 77,8% και 22,2% (το 2017) και 69,5 και 30,5% (το 2018). Οι διαφορές αυτές εντοπίστηκαν κυρίως στην μετατροπή της Mln σε MlnCoum, καθώς το 2018 και για τις δύο ποικιλίες μειώθηκε το ποσοστό της Mln και αυξήθηκε της MlnCoum συνεισφέροντας έτσι στη μείωση του ποσοστού του συνόλου των μη εστεροποιημένων και στην αύξηση του ποσοστού του συνόλου των εστεροποιημένων ανθοκυανών.

Σύμφωνα με τον αριθμό και το τρόπο υποκατάστασης των υδροξυ και μεθοξυ ομάδων στον Β-δακτύλιο, οι μονογλυκοζίτες των ανθοκυανών μπορούν να χαρακτηριστούν ως δι-υδροξυλιωμένες, (3', 4'-OH) οι Cyn, Pn και τρι-υδροξυλιωμένες (3', 4', 5'-OH) οι Dlp, Pt, Mln ή ως μεθοξυλιωμένες (Pn, Pt, Mln) και μη μεθοξυλιωμένες ανθοκυανές (Dlp, Cyn) (Γράφημα 4.7). Παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των κυανών παραγώγων 3', 4', 5'-OH (%3OH) ήταν υψηλότερο από αυτά των ερυθρών παραγώγων

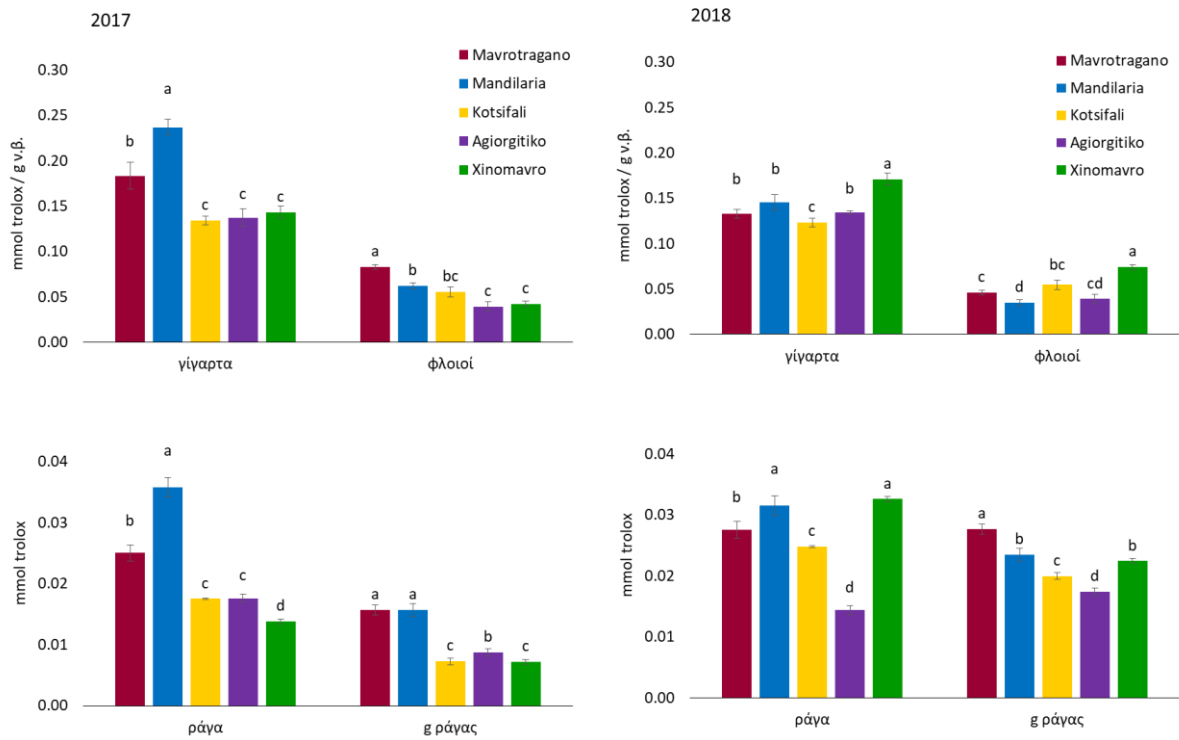
3', 4'-OH (% 2OH) για τις ποικιλίες Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο ενώ το αντίθετο στις ράγες της ποικιλίας Κοτσιφάλι (Γράφημα 4.7). Στα εκχυλίσματα των φλοιών της τελευταία ποικιλίας το %3OH ήταν χαμηλότερο από το %2OH κατά 10,9% και 4,4% για τα έτη 2017 και 2018, αντίστοιχα. Επιπλέον, το %3OH ήταν υψηλότερο στις ποικιλίες Ξινόμαυρο (96,6%) και Αγιωργίτικο (95,3%) το 2017, με δεύτερη τη Μανδηλαριά (91,5%). Ωστόσο, το 2018 οι παραπάνω τρεις ποικιλίες περιείχαν παρόμοια ποσοστά μεταξύ 92% και 94% . Επιπλέον, τα εκχυλίσματα φλοιών των ποικιλιών Μαυροτράγανο και Μανδηλαριά περιείχαν τα χαμηλότερα ποσοστά %OMe κατά τη διάρκεια και των δύο ετών του πειράματος κατά μέσο όρο 86% και 83% αντίστοιχα (Γράφημα 4,7). Το Αγιωργίτικο και το Ξινόμαυρο περιείχαν τα χαμηλότερα ποσοστά των ανθοκυανινών NonOMe κατά τη διάρκεια των δύο ετών και των υψηλότερων τιμών σε %OMe (Γράφημα 4.7), τα οποία είναι σε παρόμοια επίπεδα με αυτά που έχουν προσδιοριστεί στις ποικιλίες Pinot gris και Pinot noir (Castellarin and Di Gaspero 2007).

4.6 Αντιοξειδωτική ικανότητα των ταννινών και των ανθοκυανών

Η αντιοξειδωτική ικανότητα (AC) των γιγάρτων και των φλοιών για το 2017 κυμάνθηκε από 0,14 to 0,24 mmol Trolox /g v.β. και 0,04 to 0,08 mmol Trolox /g v.β., αντίστοιχα ενώ το δεύτερο έτος του πειράματος οι τιμές ήταν χαμηλότερες για τα γίγαρτα ενώ στους φλοιούς κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα(Γράφημα 4.8).

Τα γίγαρτα και οι φλοιοί είναι σημαντικές πηγές ταννινών με σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα γίγαρτα έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τους φλοιούς, το οποίο σχετίζεται κυρίως με τις αυξημένες συγκεντρώσεις των ταννινών αλλά και τη διαφορετική σύστασή τους ανάμεσα σε γίγαρτα και φλοιούς (Kyraleou et al. 2017). Έρευνες αναφέρουν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα συσχετίζεται με τη συγκέντρωση των ταννινών και με το μέγεθος των μορίων, δηλαδή ότι μικρότερου μοριακού βάρους μόρια έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (Bordiga et al. 2011). Επίσης, η αυξημένη παρουσία των εστεροποιημένων με γαλλικό οξύ υπομονάδων στα γίγαρτα (Kyraleou et al. 2017), φαίνεται να συνεισφέρει σημαντικά στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Plumb et al. 1998), ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι φλοιοί με πιο σκούρο χρώμα έχουν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με αυτούς που είναι πιο ανοιχτόχρωμοι (Yilmaz and Toledo, 2004). Οι υψηλότερες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας προσδιορίστηκαν για το 2017 στα γίγαρτα της ποικιλίας Μανδηλαριά και στους φλοιούς της ποικιλίας Αγιωργίτικο (Γράφημα 4.8) ενώ το 2018 στα γίγαρτα και στους φλοιούς της ποικιλίας Ξινόμαυρο. Οι τιμές που προσδιορίστηκαν στην παρούσα έρευνα ήταν μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, το οποίο μπορεί να οφείλεται τόσο στις ποικιλίες, όσο και στη μέθοδο εκχύλισης που χρησιμοποιείται σε κάθε έρευνα (Yilmaz et al., 2015).

Όταν οι τιμές εκφράστηκαν ως περιεκτικότητα των ραγών τα αποτελέσματα διαφοροποιήθηκαν ανάλογα με το έτος και την ποικιλία. Ωστόσο, χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσίασαν οι ράγες από τις ποικιλίες Αγιωργίτικο, Κοτσιφάλι και για τα δύο έτη, ενώ το Ξινόμαυρο για το έτος 2018 (Γράφημα 4.8)



Γράφημα 4.8 Αντιοξειδωτική ικανότητα των φλοιών και των γιγάρτων στο στάδιο της ωρίμανσης και το άθροισμά τους εκφρασμένο ανά ράγα και ανά γραμμάριο ράγας για τα έτη 2017 και 2018.

Κεφάλαιο 5^ο: Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκαν τα χαρακτηριστικά των ραγών και η φαινολική συγκέντρωση και σύσταση πέντε γιγενών ποικιλιών της αμπέλου από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας για δύο συνεχόμενα έτη 2017 και 2018. Στις ποικιλίες που μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά των ραγων επηρεάστηκαν από το έτος συγκομιδής και από την ποικιλία. Η ολική οξύτητα συσχετίστηκε κυρίως με την ποικιλία και λιγότερο με τη συγκέντρωση των σακχάρων στη ράγα. Η Μανδηλαριά παρουσίασε τα χαμηλότερα επίπεδα ωρίμανση μεταξύ των ποικιλιών με την ολική οξύτητα να κυμαίνεται σε μέτρια επίπεδα, σε αντίθεση με την ολική οξύτητα της ποικιλίας Ξινόμαυρο που είχε αυξημένες τιμές σε ράγες με αβξημένο βαθμό ωρίμανσης. Η κατανομή των συστατικών της ράγας (ποσοστα γιγάρτων και φλοιών) διακυμάνθηκε μεταξύ των ετών, ανεξάρτητα απο το βάρος της. Τα ποσοστά συμμετοχής των φλοιών μεταβλήθηκαν μεταξύ των ετών ενώ η συμμετοχή των γιγάρτων παρέμεινε στα ίδια επίπεδα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι ελληνικές ποικιλίες είναι πλούσιες σε ταννίνες και ανθοκυάνες και παρουσιάζουν διαφορές στην περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών και στο προφίλ που συνθέτουν οι ενώσεις αυτές για κάθε μία ξεχωριστά. Παράλληλα η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλοιών και των γιγάρτων ήταν αρκετά αυξημένη, σε σχέση με τις τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για άλλες διεθνής ποικιλίες, το οποίο θα μπορούσε να οφείλεται στην ποικιλία αλλά και στη διαδικασία εκχύλισης των φαινολικών. Τα γίγαρτα της ποικιλίας Μανδηλαριά και οι φλοιοί της ποικιλίας Μαυροτράγανο ήταν τα πιο πλούσια σε ολικές ταννίνες χωρίς ωστόσο οι τιμές αυτές να συσχετίζονται με το βαθμό ωρίμανσης (περιεκτικότητα σε σάκχαρα) των ραγών.

Σημαντικές διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στα δομικά χαρακτηριστικά των ταννινών των φλοιών μεταξύ των ποικιλιών, καθώς το προφίλ των υπομονάδων και η θέση τους στα πολυμερή μόρια των ταννινών φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από την ποικιλία. Η EC προσδιορίστηκε ως η κύρια υπομονάδα των ποικιλιών Μανδηλαριά, Κοτσιφάλι, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο, ενώ στην ποικιλία Μαυροτράγανο η κύρια προανθοκυανιδίνη ήταν η EGC. Επιπλέον, στο Αγιωργίτικο η C προσδιορίστηκε μόνο ως τερματική υπομονάδα ενώ στις υπόλοιπες ποικιλίες ανιχνεύτηκε και στις δύο θέσεις (τερματική και επεκτατική) ενώ η ECG προσδιορίστηκε μόνο ως επεκτατική υπομονάδα. Στα γίγαρτα το προφίλ των υπομονάδων των ταννινών δεν παρουσίασε μεγάλες αποκλίσεις, παρά μόνο μικρές μεταβολές στα ποσοστά της κάθε υπομονάδας.

Όσον αφορά την περιεκτικότητα των ποικιλιών σε ανθοκυάνες, το Ξινόμαυρο είχε τη χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών ενώ το Μαυροτράγανο ήταν πλουσιότερο σε ολικές ανθοκυάνες το 2017 και η Μανδηλαριά το 2018 όταν τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg/g νωπού βάρους φλοιών. Ωστόσο, όταν οι ολικές ανθοκυάνες εκφράστηκαν σε mg/ ράγα, η Μανδηλαριά ήταν η πιο

πλούσια σε ανθοκυάνες ποικιλία. Οι κλιματικές παράμετροι που διαμορφώνουν το μικροκλίμα ενός αμπελώνα επηρέασαν τη φαινολική σύσταση, καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις οι διακυμάνσεις στην περιεκτικότητα των ανθοκυανών σε μια ποικιλία μεταξύ των δύο ετών ήταν πολύ μεγαλύτερες από αυτές που παρουσίασαν οι διαφορετικές ποικιλίες την ίδια χρονιά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, η ανθοκυανική σύσταση των ραγών είναι χαρακτηριστική της ποικιλίας και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την διαφοροποίηση των ποικιλιών και την αυθεντικότητά τους σε συνδιασμό με την περιεκτικότητά τους στη ράγα. Η Mln αποτέλεσε κατά μέσο όρο τον αφθονότερο μονογλυκοζίτη, ενώ ήταν η κυριότερη ανθοκυάνη για 4 από τις 5 ποικιλίες που μελετήθηκαν, με εξαίρεση την ποικιλία Κοτσιφάλι της οποίας αφθονότερη ανθοκυάνη ήταν η Pn. Η ποικιλία Κοτσιφάλι παρουσιάζει τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες, ενώ το ιδιαίτερο προφίλ των ανθοκυανών της ποικιλίας με αυξημένα τα ποσοστά της Pn και της Cyn, σε συνδιασμό με την ιδιαίτερα χαμηλή παρουσία της MlnCoutm, αποτελούν σημαντικές παραμέτρους της έντασης και της σταθεροποίησης του χρώματος των οίνων που προκύπτουν από αυτή. Στην ποικιλία Μαυροτράγανο προσδιορίστηκαν μεγάλα ποσοστά της Pn, (ήταν η δεύτερη αφθονότερη ανθοκυάνη) και τα μεγαλύτερα ποσοστά των μονογλυκοζιτών της Dlp και της Pt μεταξύ των ποικιλιών.

Η Μανδηλαριά και το Αγιωργίτικο παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις Mln στο σύνολο των ποικιλιών, ενώ το προφίλ της ποικιλίας Ξινόμαυρο είχε αρκετές ομοιότητες με αυτό του Αγιωργίτικου. Οι κουμαρικοί και οξικοί εστέρες των ανθοκυανών διαφοροποιήθηκαν μεταξύ των ποικιλιών, με εμφανή όμως την επίδραση της χρονιάς σε ορισμένες περιπτώσεις ενώ η ομαδοποίηση των ανθοκυανών ανάλογα με το βαθμό εστεροποίησης ή με το βαθμό μεθοξυλίωσης, φαίνεται να αποτελεί χαρακτηριστικό της ποικιλίας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι μια προσπάθεια να προσδιοριστεί η φαινολική σύσταση πέντε γιγενών ποικιλιών της αμπέλου στον Ελλαδικό χώρο, δεδομένου ότι οι παράμετροι αυτές έχουν μεγάλη σημασία για τη βιομηχανία οίνου, στην οποία η βελτιστοποίηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου παραμένει προτεραιότητα. Τα στοιχεία που παρουσιάζονται θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλείο επιλογής των πλέον κατάλληλων ποικιλιών αμπέλου, σε συνδυασμό πάντα με τις κλιματικές συνθήκες ενός τόπου και τα αμπελουργικά χαρακτηριστικά των ποικιλιών, για την παραγωγή εκλεκτού τύπου προϊόντος. Οι γνώσεις που διοχετεύονται με αυτή την έρευνα μπορούν να βοηθήσουν στην απόφαση του χρόνου συγκομιδής και στην επιλογή των τεχνολογικών εφαρμογών κατά την οινοποίηση, όπως η διαβροχή, ο χρόνος συμπαραμονής στεμφύλων με το γλέυκος, η διαδικασία ζύμωσης, για την παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας. Η έρευνα αυτή είναι μόνο η αρχή μιας ευρύτερης περιγραφικής μελέτης των σταφυλιών των Ελληνικών ποικιλιών που θα συμπληρώσει τις αμπελογραφικές συλλογές που

υπάρχουν, ενώ απαιτείται περαιτέρω συλλογή πληροφοριών που θα αφορά το αρωματικό προφίλ των σταφυλιών και το οργανοληπτικό προφίλ των οίνων ώστε να μπορεί να ερμηνευτεί με βάση τα στοιχεία αυτά ο τρόπος επίδρασης της ποικιλίας στους αντίστοιχους οίνους.

Βιβλιογραφία

- Antoniolli, A., Fontana, A.R., Piccoli, P., Bottini, R., 2015. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chem.* 178, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.082>
- Arnous, A., Makris, D.P., Kefalas, P., 2002. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Compos. Anal.* 15, 655–665. <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1070>
- Bonada, M., Jeffery, D.W., Petrie, P.R., Moran, M.A., Sadras, V.O., 2015. Impact of elevated temperature and water deficit on the chemical and sensory profiles of Barossa Shiraz grapes and wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 21, 240–253. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12142>
- Bordiga, M., Travaglia, F., Locatelli, M., Coisson, J.D., Arlorio, M., 2011. Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chem.* 127, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.141>
- Brossaud, F., Cheynier, V., Noble, A.C., 2001. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7, 33–39. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00191.x>
- Casassa, F. L., Beaver, C.W., Mireles, M.S., Harbertson, J.F., 2013. Effect of extended maceration and ethanol concentration on the extraction and evolution of phenolics, colour components and sensory attributes of Merlot wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19, 25–39. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12009>
- Casassa, Federico L., Larsen, R.C., Beaver, C.W., Mireles, M.S., Keller, M., Riley, W.R., Smithyman, R., Harbertson, J.F., 2013. Impact of extended maceration and regulated deficit irrigation (RDI) in cabernet sauvignon wines: Characterization of proanthocyanidin distribution, anthocyanin extraction, and chromatic properties. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6446–6457. <https://doi.org/10.1021/jf400733u>
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., Galán-Vidal, C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 113, 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Castellarin, S.D., Di Gaspero, G., 2007. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biol.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-46>
- Cerpa-Calderon, F.K., Kennedy, J.A., 2008. Berry Integrity and Extraction of Skin and Seed Proanthocyanidins during Red Wine Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9006–9014. <https://doi.org/10.1021/jf801384v>

Cheynier, V., 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Am. J. Clin. Nutr. 81, 223s-229s. <https://doi.org/81/1/223S> [pii]

Chira, K., 2009. Structures moléculaires et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet-Sauvignon, Merlot) du bordelais Doctorat.

Chira, K., Jourdes, M., Teissedre, P.L., 2012. Cabernet sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *Eur. Food Res. Technol.* 234, 253–261. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1627-1>

Chira, K., Lorrain, B., Ky, I., Teissedre, P.L., 2011. Tannin composition of cabernet-sauvignon and merlot grapes from the bordeaux area for different vintages (2006 to 2009) and comparison to tannin profile of five 2009 vintage mediterranean grapes varieties. *Molecules* 16, 1519–1532. <https://doi.org/10.3390/molecules16021519>

Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., Teissedre, P.L., 2009. Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (cabernet Sauvignon and merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *J. Agric. Food Chem.* 57, 545–553. <https://doi.org/10.1021/jf802301g>

Costa, E., Cosme, F., Jordão, A.M., Mendes-Faia, A., 2014. Anthocyanin profile and antioxidant activity from 24 grape varieties cultivated in two Portuguese wine regions. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* 48, 51–62.

Ćurko, N., Kovačević Ganić, K., Gracin, L., Dapić, 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 Chem.* 145, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.131>

Davies, A.J., Mazza, G., 1993. Copigmentation of Simple and Acylated Anthocyanins with Colorless Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 41, 716–720. <https://doi.org/10.1021/jf00029a007>

Downey, M.O., Hanlin, R.L., 2010. Comparison of ethanol and acetone mixtures for extraction of condensed tannin from grape skin. *South African J. Enol. Vitic.* 31, 154–159.

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.

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. Grape Wine Res.* 9, 15–27. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2003.tb00228.x>

- García-Beneytez, E., Revilla, E., Cabello, F., 2002. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *Eur. Food Res. Technol.* 215, 32–37. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0526-x>
- Garrido, J., Borges, F., 2013. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Res. Int.* 54, 1844–1858. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>
- González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, T., 2008. Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 483–490. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0560-9>
- Han, F.L., Li, Z., Xu, Y., 2015. Contribution of monomeric anthocyanins to the color of young red wine: Statistical and experimental approaches. *J. Food Sci.* 80, C2751–C2758. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13155>
- Hanlin, R.L., Kelm, M.A., Wilkinson, K.L., Downey, M.O., 2011. Detailed characterization of proanthocyanidins in skin, seeds, and wine of Shiraz and Cabernet Sauvignon wine grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* 59, 13265–13276. <https://doi.org/10.1021/jf203466u>
- Harbertson, J.F., Kilmister, R.L., Kelm, M.A., Downey, M.O., 2014. Impact of condensed tannin size as individual and mixed polymers on bovine serum albumin precipitation. *Food Chem.* 160, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.026>
- Harbertson, J.F., Picciotto, E.A., Adams, D.O., 2003. Measurement of Polymeric Pigments in Grape Berry Extracts and Wines Using a Protein Precipitation Assay Combined with Bisulfite Bleaching. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 301–306. <https://doi.org/10.1097/ANC.0000000000000164>
- Haslam, E. kaka, 1974. Polyphenol-protein interactions. *Biochem. J.* 139, 285–288. <https://doi.org/10.1042/bj1390285>
- He, F., Mu, L., Yan, G.L., Liang, N.N., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.-Q., 2010. Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes. *Molecules* 15, 9057–9091. <https://doi.org/10.3390/molecules15129057>
- Jordão, A.M., Correia, A.C., 2012. Relationship between antioxidant capacity, proanthocyanidin and anthocyanin content during grape maturation of Touriga Nacional and Tinta Roriz grape varieties. *South African J. Enol. Vitic.* 33, 214–224. <https://doi.org/10.21548/33-2-1121>
- Kallithraka, S., Aliaj, L., Makris, D.P., Kefalas, P., 2009. Anthocyanin profiles of major red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Greece and their relationship with in vitro antioxidant characteristics. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 2385–2393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01869.x>

- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M.N., 1997. Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution. *J. Sens. Stud.* 12, 25–37.
- Kallithraka, S., Kim, D., Tsakiris, A., Paraskevopoulos, I., Soleas, G., 2011. Sensory assessment and chemical measurement of astringency of Greek wines: Correlations with analytical polyphenolic composition. *Food Chem.* 126, 1953–1958. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.045>
- Kallithraka, S., Kotseridis, Y., Kyraleou, M., Proxenia, N., Tsakiris, A., Karapetrou, G., 2014. Analytical phenolic composition and sensory assessment of selected rare Greek cultivars after extended bottle ageing. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1638–1647. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6865>
- Kallithraka, S., Mohdaly, A.A.A., Makris, D.P., Kefalas, P., 2005a. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): Association with antiradical activity. *J. Food Compos. Anal.* 18, 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.02.010>
- Kallithraka, S., Mohdaly, A.A.A., Makris, D.P., Kefalas, P., 2005b. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): Association with antiradical activity. *J. Food Compos. Anal.* 18, 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.02.010>
- Kennedy, J.A., Ferrier, J., Harbertson, J.F., Peyrot, C., 2006. Analysis of Tannins in Red Wine Using Multiple Methods: Correlation with Perceived Astringency 4, 481–485.
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf010758h>
- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64, 923–933. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2)
- Koundouras, S., Marinos, V., Gkoulioti, A., Kotseridis, Y., Van Leeuwen, C., 2006. Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5077–5086. <https://doi.org/10.1021/jf0605446>
- Koussissi, E., Paterson, A., Piggott, J.R., 2003. Sensory flavour discrimination of Greek dry red wines. *J. Sci. Food Agric.* 83, 797–808. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1414>
- Kyraleou, M., Kallithraka, S., Koundouras, S., Chira, K., Haroutounian, S., Spinthiropoulou, H., Kotseridis, Y., 2015. Effect of vine training system on the phenolic composition of red grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Xinomavro). *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* 49, 71–84. <https://doi.org/10.20870/oenone.2015.49.2.92>

- Kyrleou, M., Kallithraka, S., Theodorou, N., Teissedre, P.-L., Kotseridis, Y., Koundouras, S., 2017. Changes in tannin composition of Syrah grape skins and seeds during fruit ripening under contrasting water conditions. *Molecules* 22, 1453. <https://doi.org/10.3390/molecules22091453>
- Kyrleou, M., Kotseridis, Y., Teissedre, P.-L., Koundouras, S., Chira, K., 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 Chem.* 203, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.052>
- Lorrain, B., Chira, K., Teissedre, P.L., 2011. Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem.* 126, 1991–1999. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.062>
- Makris, D.P., Kallithraka, S., Mamalos, A., 2006. Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents. *Talanta* 70, 1143–1152. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.024>
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., Ricardo Da Silva, J.M., 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6475–6481. <https://doi.org/10.1021/jf030325+>
- Niculaua, M., Tudose-Sandu-Ville, Ș., Cotea, V. V., Luchian, C.E., Tudose-Sandu-Ville, O.F., 2017. Phenolic compounds content in Merlot wines obtained through different thermomaceration techniques. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 45, 548–552. <https://doi.org/10.15835/nbha45210883>
- Ollé, D., Guiraud, J.L., Souquet, J.M., Terrier, N., Ageorges, A., Cheynier, V., Verries, C., 2011. Effect of pre- and post-veraison water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17, 90–100. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2010.00121.x>
- Pallioti, A., Gatti, M., Poni, S., 2011. Early Leaf Removal to Improve Vineyard Efficiency : Gas Exchange , Source-to-Sink Balance , and Reserve Storage Responses 2. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10094>
- Petropoulos, S., Kanellopoulou, A., Paraskevopoulos, I., Kotseridis, Y., Kallithraka, S., 2017. Characterization of grape and wine proanthocyanidins of Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L. cv.) cultivar grown in different regions of Nemea. *J. Food Compos. Anal.* 63, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.038>

- Psarra, E., Makris, D.P., Kallithraka, S., Kefalas, P., 2002. Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: Correlation with polyphenolic composition. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1014–1020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1124>
- Quijada-Morín, N., Regueiro, J., Simal-ga, J., Toma, E., 2012a. Relationship between the Sensory-Determined Astringency and the.
- Quijada-Morín, N., Regueiro, J., Simal-ga, J., Toma, E., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T., 2012b. Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 60, 12355–12361.
- Quijada-Morín, N., Williams, P., Rivas-Gonzalo, J.C., Doco, T., Escribano-Bailón, M.T., 2014. Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chem.* 154, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.101>
- Rice-Evans, 1996. Review Article. *Struct. Act. relationships flavonoïds phenolic acid* 20, 933–956. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.91.075109>
- Rinaldi, A., Iturmendi, N., Jourdes, M., Teissedre, P.L., Moio, L., 2015. Transfer of tannin characteristics from grape skins or seeds to wine-like solutions and their impact on potential astringency. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 667–676. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.037>
- 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 Chem.* 164, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.050>
- Spranger, I., Sun, B., Mateus, A.M., Freitas, V. de, Ricardo-da-Silva, J.M., 2008. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chem.* 108, 519–532. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.004>
- Sun, B., Neves, A.C., Fernandes, T.A., Fernandes, A.L., Mateus, N., De Freitas, V., Leandro, C., Spranger, M.I., 2011. Evolution of phenolic composition of red wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6550–6557. <https://doi.org/10.1021/jf201383e>
- Sun, B., Sa, M. De, 2013. Reactivity of Polymeric Proanthocyanidins toward Salivary Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 61, 939–946. <https://doi.org/10.1021/jf303704u>
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S.D., Gerós, H., 2013. Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 18711–18739. <https://doi.org/10.3390/ijms140918711>

- Theodorou, N., Nikolaou, N., Zioziou, E., Kyraleou, M., Kallithraka, S., Kotseridis, Y., Koundouras, S., 2019. Anthocyanin content and composition in four red winegrape cultivars (*Vitis vinifera* L .) under variable irrigation. *OENO one* 53, 39–51.
- Van Leeuw, R., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommès, J., 2014. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *J. Food Compos. Anal.* 36, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.07.001>
- Versari, A., Boulton, R.B., Parpinello, G.P., 2007. Analysis of SO₂-resistant polymeric pigments in red wines by high-performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 523–525.
- Vidal, S., Cartalade, D., Souquet, J.M., Fulcrand, H., Cheynier, V., 2002. Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2261–2266.
- 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. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1394>
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain product. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4113–4117.
- Zhao, Q., Duan, C.Q., Wang, J., 2010. Anthocyanins profile of grape berries of *Vitis amurensis*, its hybrids and their wines. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2212–2218. <https://doi.org/10.3390/ijms11052212>