



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**Μελέτη της αντιοξειδωτικής  
ικανότητας δειγμάτων μύρας και οίνου του εμπορίου  
μέσω των *in vitro* μεθόδων DPPH και ABTS**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΤΣΑΚΥΡΙΔΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2022**



**Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων μύρας  
και οίνου του εμπορίου μέσω των *in vitro* μεθόδων DPPH και  
ABTS**

**Study of the antioxidant capacity of commercial beer and  
wine samples through *in vitro* DPPH and ABTS methods**

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Κουρέτας Δημήτριος**, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας Μέλος της Παγκόσμιας Ακαδημίας Επιστημών Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2. Στάγκος Δημήτριος**, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών Πτυχίο Τμήματος Βιολογίας, Α.Π.Θ.
- 3. Βεσκούκης Αριστείδης**, Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Φυσικής Αγωγής, Αθλητισμού και Διαιτολογίας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μύρα και το κρασί αποτελούν δύο από τα δημοφιλέστερα ποτά σήμερα. Τα δύο αυτό ποτά έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ, ενώ παράλληλα τους έχουν αποδοθεί σημαντικές ευεργετικές ιδιότητες για τον οργανισμό. Οι ιδιότητες αυτές διαμεσολαβούνται από τα αντιοξειδωτικά που περιέχουν. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας 24 ποικιλιών κρασιού και 24 ποικιλιών μύρας, μέσω της αξιολόγησης της ικανότητας εξουδετέρωσης των σταθερών χημικών ριζών DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup>. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι μύρες έχουν ένα σταθερό σχετικά προφίλ αντιοξειδωτικής ικανότητας, ενώ αυτό ποικίλει σε πολύ μεγάλο βαθμό στις διάφορες ποικιλίες κρασιού. Συγκεκριμένα, τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζουν οι ποικιλίες κόκκινου κρασιού. Ακόμα, ένα σημαντικό εύρημα αποτελεί ότι η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ιδιότητας κάθε ποικιλίας μύρας και κρασιού έδωσε σημαντικά διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των δύο τεχνικών (DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup>). Συμπεραίνουμε ότι η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, άρα πιθανότερα και τα περισσότερα ευεργετικά οφέλη για την υγεία, φέρουν οι κόκκινες ποικιλίες κρασιού και ακολουθεί το λευκό κρασί και οι μύρες.

## **ABSTRACT**

Beer and wine are two of the most popular drinks today. Both drinks have a low alcohol content, while at the same time they have been attributed important beneficial properties for the human health. These properties are mediated by the antioxidants they contain. The purpose of this study was to measure the antioxidant capacity of 24 varieties of wine and 24 varieties of beer, by evaluating the ability to neutralize stable chemical radicals DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup>. The results show that beers have a relatively stable profile of antioxidant capacity, while this varies greatly to the different varieties of wine. In particular, the varieties of red wine have the greatest antioxidant capacity. Another important finding is that the evaluation of the antioxidant properties of each beer and wine variety yielded significantly different results between the two techniques (DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup>). We conclude that the greatest antioxidant capacity, and therefore most likely the most beneficial health benefits, have red wine varieties, followed by white wine and beers.

## Ευχαριστίες

*Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.*

*Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέπων καθηγητή μου, κύριο Δημήτριο Κουρέτα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις του, την επιμονή του, το αμείωτο ενδιαφέρον του, τη συμπαράστασή του, τη συνεχή του υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος. Είναι μεγάλη μου τιμή που με δέχτηκε στο εργαστήριο του.*

*Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Υποψήφιο Διδάκτωρ κ. Φώτη Τέκο, την Διδάκτωρ κ. Μακρή Σωτηρίνα καθώς και την Υποψήφια Διδάκτωρ κ. Πατούνα Αναστασία για την αμέριστη βοήθεια, την περισσή στήριξη και την υπομονή τους.*

*Επιπλέον, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Τριμελή Επιτροπή συγκεκριμένα τους καθηγητές κ. Στάγκο Δημήτριο και κ. Βεσκούκη Αριστείδα καθώς και σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις εποικοδομητικές τους υποδείξεις και την πολύτιμη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας αυτής.*

*Τέλος, θα ήθελα εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στα παιδιά μου Μάριο και Ναυσικά για όλη τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και στους θείους μου Θεοχάρη, Σοφία και Γεωργία για την συμπαράσταση τους σαν πραγματικοί γονείς μου.*

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1. Εισαγωγή .....	10
2. Ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτικά .....	12
2.1. Ελεύθερες ρίζες.....	12
2.1.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	12
2.2.2. Δραστικές μορφές αζώτου (RNS) .....	14
2.2. Πηγές ελεύθερων ριζών .....	16
2.2.1. Ενδογενείς πηγές ελεύθερων ριζών.....	16
2.2.2. Εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών .....	19
2.3. Βιολογικές δράσεις των ελεύθερων ριζών .....	19
2.3.1. Θετικές επιδράσεις .....	19
2.3.2. Επιβλαβείς επιδράσεις .....	20
2.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	24
2.4.1. Βιταμίνες.....	25
2.4.2. Βιοφλαβονοειδή .....	27
2.4.3. Καροτενοειδή .....	30
2.4.4. Υδροξυκιναμικά .....	30
3. Οίνος.....	32
3.1. Ιστορία οίνου .....	32
3.2. Οινοποίηση .....	34
3.3. Ονοματολογία και ταξινόμηση.....	36
3.4. Αντιοξειδωτική δράση οίνου.....	37
4. Μύρα .....	39
4.1. Ιστορία μύρας .....	39
4.2. Ζυθοποίηση .....	40
4.3. Ονοματολογία και ταξινόμηση.....	42
4.4. Αντιοξειδωτική δράση μύρας.....	44
5. Πειραματικό μέρος.....	46
5.1. Υλικά.....	46
5.2. Μέθοδοι.....	47
5.2.1. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της τεχνικής DPPH*.....	47
5.2.2. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της τεχνικής ABTS*+ .....	49



6. Αποτελέσματα.....	53
6.1. Ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών βάσει της τεχνικής DPPH* .....	53
6.2. Ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών βάσει της τεχνικής ABTS** .....	56
7. Συζήτηση .....	61
8. Συμπεράσματα .....	64
9. Βιβλιογραφία .....	65

## 1. Εισαγωγή

Το κρασί υπάρχει εδώ και σχεδόν 6000 χρόνια (Lietal, 2018) και η μύρα υπάρχει εδώ και πάνω από 5000 χρόνια (Wangetal, 2016). Και τα δύο ποτά έχουν τις ρίζες τους στην Αρχαία Αίγυπτο και τη Μεσοποταμία. Το κρασί χρησιμοποιήθηκε σε μια ποικιλία φαρμάκων και θεραπειών, ενώ η μύρα ήταν βασικό στοιχείο της διατροφής, αφού πρωτοεμφανίστηκε όταν οι άνθρωποι άρχισαν να καλλιεργούν. Ο τομέας της ζυθοποιίας συνδέεται στενότερα με τη Βόρεια Ευρώπη, όπου η επέκταση της αμπελοκαλλιέργειας παρεμποδίστηκε από το κρύο.

Και τα δύο αυτά ποτά έχουν πολλά διαφορετικά συστατικά, και εκτός από τη μακρά ιστορία τους, υπάρχουν πολλά διαφορετικά χαρακτηριστικά και παράμετροι που καθορίζουν την τελική τους ποιότητα, όπως η ποιότητα της πρώτης ύλης (βύνη και λυκίσκος για μύρα και σταφύλι για το κρασί), μαγιά, μέθοδοι αλκοολικής ζύμωσης, συνθήκες παλαίωσης κ.α. Εκτός από τη γεύση τους, η οποία επηρεάζει τη χρήση τους, το κρασί και η μύρα διακρίνονται για την υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ουσίες, όπως αντιοξειδωτικά, γεγονός που προκαλεί ενδιαφέρον για το διατροφικό τους προφίλ. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών και ανασκοπήσεων έχουν εξετάσει τις βιοδραστικές ενώσεις που μπορεί να ευθύνονται για τα πιθανά οφέλη για την υγεία της μέτριας κατανάλωσης κρασιού και μύρας, καθώς και τις διάφορες μεθόδους για την αύξηση των αντιοξειδωτικών ενώσεων σε αυτά τα δύο ποτά (Roerecke&Rehm, 2014;Castaldoetal, 2019; Martinez-Gomezetal, 2020; Habschiedetal, 2020; Horincaretal, 2020; Martínez-Giletal, 2020; Jeremicetal, 2020). Πολλές από αυτές τις έρευνες υποστηρίζουν την ιδέα ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοολούχων ποτών, όπως το κόκκινο κρασί και η μύρα, μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του κινδύνου καρδιακών παθήσεων (Roerecke&Rehm, 2014). Τα μη φλαβονοειδή (στιλβένια, υδροξυκιναμικό και υδροξυβενζοϊκό οξύ) έχουν επίσης θετική επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα (Chengetal, 2019). Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν βασικό ρόλο ως αντιοξειδωτικά στο κρασί και την μύρα και πολλές από αυτές, όπως τα φλαβονοειδή, έχουν επίδραση στις καρδιαγγειακές και χρόνιες εκφυλιστικές ασθένειες (Afrozetal, 2016; Mozaffarianetal, 2018). Επιπλέον, η κατανάλωση μύρας έχει συνδεθεί με καλύτερο επίπεδο προστασίας έναντι των στεφανιαίων παθήσεων σε σύγκριση με άλλα οينوπνευματώδη και η κατανάλωση μύρας έχει επίσης συνδεθεί με αυξημένη οστική πυκνότητα, καθώς και ανοσολογικά και καρδιαγγειακά οφέλη (De Gaetanoetal, 2016; Redondoetal, 2018; Chiva-Blanchetal, 2014). Ωστόσο, λόγω

των διαφορετικών πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή τους, υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις στο φαινολικό προφίλ και τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στο κρασί και την μύρα.

## 2. Ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτικά

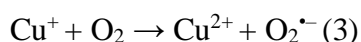
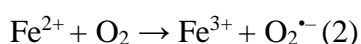
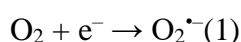
### 2.1. Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες προκύπτουν ως αποτελέσματα του τακτικού κυτταρικού μεταβολισμού. Μια ελεύθερη ρίζα είναι ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στη στοιβάδα σθένους ή στην εξωτερική τροχιά και με την ικανότητα να υπάρχει ανεξάρτητα. Ο περιττός αριθμός ηλεκτρονίων μιας ελεύθερης ρίζας την καθιστά ασταθή, βραχύβια και εξαιρετικά αντιδραστική. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να εξάγουν ηλεκτρόνια από άλλες ενώσεις για να επιτύχουν σταθερότητα λόγω της ισχυρής αντιδραστικότητάς τους. Ως αποτέλεσμα, το επιτιθέμενο μόριο χάνει ένα ηλεκτρόνιο και μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα, προκαλώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση που τελικά σκοτώνει το ζωντανό κύτταρο (Phaniendraetal, 2015). Οι ελεύθερες ρίζες και άλλα μη ραδιενεργά αντιδραστικά είδη αποτελούνται τόσο από δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactiveoxygenspecies, ROS) όσο και απόδραστικές μορφές αζώτου(Reactivenitrogenspecies,RNS)(Pham-Huyetal, 2008).

#### 2.1.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Τα ROS περιλαμβάνουν όχι μόνο ελεύθερες ρίζες οξυγόνου αλλά και μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, τα οποία εμπλέκονται στη δημιουργία ριζών οξυγόνου (Zorovetal, 2014). Η κύρια πηγή ROSείναι ο τακτικός αερόβιος μεταβολισμός στα μιτοχόνδρια. Η οξειδάσηNADPH, η οξειδάση της ξανθίνης και η οξειδάση του κυτοχρώματος P<sub>450</sub> παράγουν ROS στο κυτταρόπλασμα και στη πλασματική μεμβράνη. Τα μέταλλα μεταπτώσεως (χαλκός, σίδηρος κ.λπ.) έχουν την ικανότητα να προκαλούν βλάβες από ελεύθερες ρίζες (Sharmaetal, 2018).

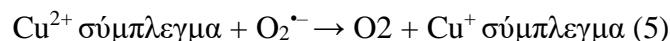
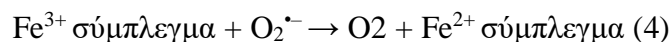
Λόγω δύο μη ζευγαρωμένων ηλεκτρονίων με παράλληλα spin, το μοριακό οξυγόνο είναι σχετικά μη αντιδραστικό. Η πρώτη φάση μονοσθενούς αναγωγής (δηλαδή ενεργοποίηση οξυγόνου) εξαρτάται από την ενέργεια, απαιτεί δωρεά ηλεκτρονίων και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ανιόντος ελεύθερης ρίζας υπεροξειδίου, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Εξίσωση 1). Το υπεροξειδίο μπορεί να παραχθεί μέσω της αυτοοξειδωσηςανηγμένων μετάλλων μετάπτωσης (Εξισώσεις 2 και 3)(Sharmaetal, 2018).



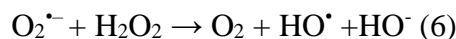
Τα ακόλουθα στάδια αναγωγής δεν απαιτούν ενέργεια και μπορούν να συμβούν αυθόρμητα, απαιτώντας δότες  $H^+/e^-$  και παράγοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το υπεροξειδίο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου: δύο μόρια υπεροξειδίου μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους για να παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου και οξυγόνο. Στα βιολογικά συστήματα, ως δότες ηλεκτρονίων μπορούν να λειτουργήσουν τα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (π.χ.  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , κ.λπ.) και οι ημικινόνες (Sharmaetal, 2018).

Τουλάχιστον δύο μέθοδοι παράγουν τη ρίζα υδροξυλίου, ένα από τα πιο αντιδραστικά και καταστροφικά είδη οξυγόνου σε βιολογικά συστήματα. Το πρώτο είναι με επαγόμενη από την ακτινοβολία ομολυτική σχάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (DietaI, 2016), και το δεύτερο μέσω της αντίδρασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (δηλαδή, η αντίδραση Fenton) (Dudaetal, 2016).

Το σύμπλεγμα  $Fe^{3+}/Cu^{2+}$  μπορεί να αναχθεί αποτελεσματικά από το  $O_2^{\bullet -}$  για να δημιουργηθεί μοριακό οξυγόνο και σύμπλοκο  $Fe^{2+}/Cu^+$  παρουσία ιχνών ποσοτήτων σιδήρου και χαλκού (Εξισώσεις 4 και 5), επιτρέποντας στην αντίδραση Fenton να κάνει κύκλο (Sharmaetal, 2018):



Με την αντίδραση Haber-Weiss, αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να συμβαίνουν επ' αόριστον, δίνοντας ρίζες υδροξυλίου (Εξίσωση 6). Η αντίδραση Haber-Weiss είναι μια μη καταλύομενη αντίδραση στην οποία το υπεροξειδίο αντιδρά απευθείας με το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Sharmaetal, 2018):

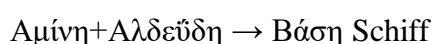
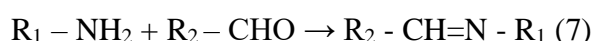


Λόγω της έλλειψης καταλυτικού σιδήρου και χαλκού, αυτή η αντίδραση χρειάζεται πολύ χρόνο για να ολοκληρωθεί. Για να περιοριστεί η διαθεσιμότητα του σιδήρου για συμμετοχή σε τέτοιες διεργασίες ελευθέρων ριζών, γίνεται άντληση σιδήρου από έναν αριθμό πρωτεϊνών (μεταφορείς και αιμοπηξίνη) κατά τη διέλευση, την πρόσληψη (υποδοχείς τρανσφερίνης), την εσωτερίκευση (ενδοσώματα) και την αποθήκευση (φερριτίνη και αιμοσιδερίνη). Στη βιοχημεία των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, το οξυγόνο, το υπεροξειδίο, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, τα ιόντα

μετάλλων μεταπτώσεως και οι ρίζες υδροξυλίου παίζουν όλα σημαντικούς ρόλους(Sharmaetal, 2018).

Το υπεροξειδίο είναι μια αναγωγική ουσία που χρησιμοποιείται κυρίως ως πηγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και ως αναγωγικό ιόντων μετάλλων μεταπτώσεως. Το υπεροξειδίο δεν είναι ένα σημαντικά αντιδραστικό είδος, ωστόσο, σε χαμηλό pH θα πρωτονιωθεί για να δημιουργήσει την υδροξυλική ρίζα HO<sub>2</sub><sup>•</sup> (ένα πιο δραστικό οξειδωτικό είδος), αλλά λιγότερο από το 1% του υπεροξειδίου θα φτάσει σε αυτή την κατάσταση σε φυσιολογικό pH. Η αλληλεπίδρασή του με το NO<sup>•</sup>, από την άλλη πλευρά, είναι σημαντική για τη φυσιολογία του οργανισμού. Ούτε το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι ένα σημαντικά αντιδραστικό είδος. Είναι ένας οξειδωτικός παράγοντας που είναι ιδιαίτερα χρήσιμος ως πηγή ρίζας υδροξυλίου όταν υπάρχουν δραστικά ιόντα μετάλλου μετάπτωσης. Το υπεροξειδίο και το υπεροξειδίο του υδρογόνου απομακρύνονται εύκολα και είναι ουσιαστικά αβλαβή απουσία μεταλλικών ιόντων (καταλυτών)(Sharmaetal, 2018).

Το πιο δραστικό είδος ελευθέρων ριζών, η ρίζα υδροξυλίου, έχει εξαιρετικά σύντομο χρόνο ημιζωής. Έχει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών συστατικών με τα οποία μπορεί να αντιδράσει. Για παράδειγμα, θα οξειδώσει υπολείμματα αμινοξέων για να σχηματίσει βάσεις Schiff (Εξίσωση 7), θα προκαλέσει χημικές αλλοιώσεις στις βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης του DNA και θα προκαλέσει σπάσιμο των κλώνων του DNA. Στοχεύει επίσης τα λιπίδια της μεμβράνης, προκαλώντας υπεροξειδωση λιπιδίων, μια αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών(Sharmaetal, 2018).



### 2.2.2. Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Το μονοξειδίο του αζώτου και οι ρίζες του διοξειδίου του αζώτου, καθώς και οι μη ρίζες όπως το HNO<sub>2</sub> και το N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, είναι παραδείγματα RNS. Αυτές δημιουργούνται όταν η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (NO<sup>•</sup>) αντιδρά με το οξυγόνο/υπεροξειδίο και μεσολαβεί στις αρνητικές επιπτώσεις του NO<sup>•</sup>. Το NO<sup>•</sup> έχει ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών δράσεων. Πολλά εξωγενή ερεθίσματα προκαλούν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών στα κύτταρα, οι οποίες μετατρέπουν την αργινίνη σε

κιτρουλίνημέσω μιας οξειδωτικής διαδικασίας πέντε ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό NO<sup>•</sup> (Wickramasinghe, 1989; Tiwarietal, 2017)

Ο TNF και άλλες κυτοκίνες που εκκρίνονται από φλεγμονώδη κύτταρα διεγείρουν μια επαγωγίμη συνθάση μονοξειδίου του αζώτου, iNOS, για τη δημιουργία NO<sup>•</sup> σε συνεχή βάση. Σε ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού, χρησιμεύει ως φονική χημική ουσία. Όταν το NO<sup>•</sup> αλληλεπιδρά με το υπεροξείδιο για να δημιουργήσει υπεροξυνιτρώδη, ONOO<sup>-</sup> (ένα πολύ ισχυρό οξειδωτικό) με ταχύτητα αντίδρασης περιορισμένης διάχυσης, η τοξικότητά του αυξάνεται (Leeetal, 2012). Το υπεροξυνιτρώδες μπορεί να δημιουργήσει νιτροτυροσίνη όταν αντιδρά με υπολείμματα αρωματικών αμινοξέων (π.χ. τυροσίνη), γεγονός που μπορεί να προκαλέσει αδρανοποίηση ενζύμων. Το υπεροξυνιτρώδες πρωτονιώνεται σε pKa 6,8 για να παραχθεί υπεροξυνιτρικό οξύ, το οποίο αποσυντίθεται αυθόρμητα για να παράγει ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου και NO<sub>2</sub><sup>•</sup> (Εξίσωση 8):



Πολλά βιολογικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των ανοσολογικών, νευρολογικών και καρδιαγγειακών ιστών, μπορεί να επηρεαστούν από το μονοξείδιο του αζώτου. Ο κύριος μηχανισμός μεταφοράς του NO<sup>•</sup> στην κυκλοφορία του αίματος γίνεται μέσω της αιμοσφαιρίνης. Στα βιολογικά συστήματα, έχουν αναγνωριστεί τρεις τύποι NOS: ένας επιθηλιακός/ενδοθηλιακός τύπος που ονομάζεται eNOS, ένας νευρωνικός τύπος που ονομάζεται nNOS και μια επαγωγίμη μορφή που ονομάζεται iNOS. Το iNOS βρίσκεται γενικά σε πολύ χαμηλά επίπεδα στον εγκέφαλο και εκφράζεται μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως όταν οι κυτοκίνες ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα ή όταν οι κυτταροτοξίνες και οι ενδοτοξίνες προκαλούν παθογόνες επαγωγές (Sharmaetal, 2018).

Το NO<sup>•</sup> ρυθμίζει μεταξύ άλλων το νευρολογικό σύστημα, την αρτηριακή πίεση, τη γαστρεντερική οδό, την αποτοξίνωση του ήπατος, το ανοσολογικό σύστημα και το μυοσκελετικό σύστημα. Έχει επιδράσεις στη συναπτική μετάδοση, τη μάθηση και την ικανότητα μνήμης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Επιπλέον, προωθεί τη διαστολή των αγγείων στα επιθηλιακά κύτταρα ρυθμίζοντας τη συσταλτικότητα των λείων μυών. Η συσσώρευση αιμοπεταλίων προκαλείται από NO<sup>•</sup> στο πλάσμα του αίματος (Sharmaetal, 2018).

Η παραγωγή NO<sup>•</sup> είναι μια απόκριση στο στρες που μπορεί να προκαλέσει βλάβη στους ιστούς ή μπορεί να είναι κυτταροπροστατευτική, που σημαίνει ότι μπορεί να αποτρέψει τη βλάβη των κυττάρων σκοτώνοντας παθογόνα μικρόβια όπως το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, το οποίο έχει συνδεθεί με έλκη στομάχου. Η ανοσοκαταστολή, η υψηλή αρτηριακή πίεση και η γαστρεντερική δυσλειτουργία είναι καταστάσεις που μπορούν να προκύψουν από έλλειψη NO<sup>•</sup> σε ένα βιολογικό σύστημα. Η βλάβη του DNA προκαλείται από το NO<sup>•</sup> και το υπεροξειδίο προϊόν του, ONOO<sup>-</sup> (Shirleyetal, 2014).

## **2.2. Πηγές ελεύθερων ριζών**

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προέρχονται είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές. Παράγονται ενδογενώς μέσα στο κύτταρο, δρουν μέσα στο κύτταρο και απελευθερώνονται στη γύρω περιοχή. Η ιονίζουσα ακτινοβολία είναι μια από τις πιο σημαντικές εξωτερικές πηγές ελεύθερων ριζών. Τα ιοντιζόμενα σωματίδια ιονίζουν το μόριο του νερού μεταφέροντας ενέργεια σε αυτό. Όταν ένα ιονισμένο μόριο νερού διασπάται, παράγει ελεύθερες ρίζες (Parks, 1989).

**Ενδογενείς πηγές:** Ένζυμα και μόρια μεταφοράς (π.χ. οξειδάσηξανθίνης, οξειδάση αλδεϋδης), αντιδράσεις αυτοοξειδωσης βιολογικών μορίων (π.χ. θειόλες, φλαβίνες, κατεχολαμίνες, φερρεδοξίνες, αιμοσφαιρίνη κ.λπ.), καθώς και ιόντα μετάλλων (Cu, Fe, Cd, As, Hg, Cr, Al και Ni) είναι όλα παραδείγματα ενδογενών πηγών (Parks, 1989).

**Εξωγενείς πηγές:** Οι εξωγενείς πηγές περιλαμβάνουν καυσαέρια αυτοκινήτων, φαρμακευτικά προϊόντα (ιδιαίτερα αντικαρκινικά φάρμακα), ιονίζουσες ακτινοβολίες, χημικούς ρύπους (π.χ. φυτοφάρμακα), ιούς, βακτήρια, παράσιτα και το κάπνισμα (τόσο ενεργό όσο και παθητικό). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν επίσης να σχηματιστούν ως αποτέλεσμα της υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ και των αγχωτικών καταστάσεων (Parks, 1989).

### **2.2.1. Ενδογενείς πηγές ελεύθερων ριζών**

Διαφορετικά κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξισώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου η κατανάλωση οξυγόνου είναι σημαντική, είναι ενδογενείς παραγωγοί ROS.



## **Μιτοχόνδρια**

Τα μιτοχονδριακά ROS αντιπροσωπεύουν την πλειοψηφία των ενδοκυτταρικών ROS. Το σύμπλοκο I (NADH αφυδρογονάση) και το σύμπλοκο III (ρίζες υπεροξειδίου) είναι οι δύο βασικές θέσεις στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων όπου σχηματίζονται οι ρίζες υπεροξειδίου (αναγωγή του κυτοχρώματος ουβικινόνης). Όταν τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το σύμπλοκο I ή II στο συνένζυμο Q ή την ουβικινόνη (Q), σχηματίζεται μια ανηγμένη εκδοχή του συνενζύμου Q (QH<sub>2</sub>). Στον κύκλο Q, η ανηγμένη μορφή QH<sub>2</sub> αναγεννά το συνένζυμο Q μέσω ενός ασταθούς ενδιάμεσου ανιόντος ημικινόνης (Q<sup>-</sup>). Το νεοπαραχθέν Q<sup>-</sup> μεταφέρει ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο, με αποτέλεσμα την παραγωγή της ρίζας υπεροξειδίου. Επειδή το υπεροξείδιο δεν παράγεται από ένζυμα, όσο υψηλότερος είναι ο μεταβολικός ρυθμός, τόσο μεγαλύτερη είναι η δημιουργία ROS (Finkel & Holbrook, 2000).

Η λειτουργία της μιτοχονδριακής υπεροξειδικής δισμουτάσης (mitochondrial superoxide dismutase, MnSOD) μετατρέπει το ανιόν υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η καταλάση (Catalase, CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GPx) μπορούν και οι δύο να αποτοξινώσουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Phaniendra et al, 2015).

Η μονοαμινοοξειδάση, η αφυδρογονάση της κετογλουταράς, η αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκερίνης και η p66Shc είναι περαιτέρω μιτοχονδριακά συστατικά που συμβάλλουν στη δημιουργία ROS (Starkov et al, 2008).

Η πρωτεΐνη p66Shc ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών ShcA, η οποία περιλαμβάνει επίσης τις πρωτεΐνες p46Shc και p52 Shc. Η ισομορφή 66-kDa της πρωτεΐνης προσαρμογέα αυξητικού παράγοντα που εμπλέκεται στην απόπτωση στα θηλαστικά είναι γνωστή ως p66Shc. Αυτή η πρωτεΐνη ελέγχει τη δημιουργία ROS στα μιτοχόνδρια. Η πλειονότητα της p66Shc βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, με μικρή ποσότητα στο μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό στρώμα. Όταν εκτίθεται σε οξειδωτικές στρες, η p66Shc μετατοπίζεται στον μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο, όπου αλληλεπιδρά με το κυτόχρωμα-c, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ROS (Giorgio et al, 2005).

### ***Υπεροξισώματα***

Η αναπνευστική οδός στα υπεροξισώματα περιλαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από διάφορους μεταβολίτες στο οξυγόνο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία  $H_2O_2$ , ωστόσο δεν συνδέεται με οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή ATP, αλλά απελευθερώνει ελεύθερη ενέργεια με τη μορφή θερμότητας. Το  $H_2O_2$ , το  $O_2^{\cdot}OH^{\cdot}$  και το  $NO^{\cdot}$  είναι μερικές από τις άλλες ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από υπεροξισώματα. Ο κύριος μεταβολικός μηχανισμός που παράγει  $H_2O_2$  στα υπεροξισώματα είναι η οξείδωση των λιπαρών οξέων. Διαφορετικά υπεροξισωματικά ένζυμα έχουν αποδειχθεί ότι δημιουργούν διαφορετικά ROS, συμπεριλαμβανομένων των οξειδασών του ακυλCoA, της οξειδάσης D-αμινοξέων, της L-υδροξυοξειδάσης, της ουρικής οξειδάσης, της οξειδάσης της ξανθίνης και της D-ασπαρτικής οξειδάσης (Schrader & Fahimi, 2006).

### ***Ενδοπλασματικό Δίκτυο***

Η δημιουργία ROS υποβοηθάται από ένζυμα του ενδοπλασματικού δικτύου όπως τα ένζυμα του κυτοχρώματος p-450 και b5, καθώς και από την οξείδωση της διαμίνης (Cheeseman KH, Slater, 1993). Το Ero1p, ένα άλλο βασικό ένζυμο θειολοοξειδάσης, καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από τις διθειόλες στο μοριακό οξυγόνο, παράγοντας  $H_2O_2$  (Grosset al, 2006).

### ***Άλλες ενδογενείς πηγές***

Η σύνθεση προσταγλανδινών, η αυτοοξείδωση της αδρεναλίνης, τα φαγοκυτταρικά κύτταρα, η μειωμένη ριβοφλαβίνη, το FMN $H_2$ , το FAD $H_2$ , το κυτόχρωμα P $_{450}$ , η ενεργοποίηση των ανοσολογικών κυττάρων, η φλεγμονή, το ψυχικό στρες, η υπερβολική άσκηση, η μόλυνση, ο καρκίνος, η γήρανση, η ισχαιμία και άλλα είναι όλα ενδογενείς πηγές ROS (Cheeseman KH, Slater, 1993).

### **2.2.2. Εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών**

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν σε βιολογικά συστήματα από μια ποικιλία εξωτερικών πηγών. Αυτές είναι:

- Ρύπανση αέρα & νερού
- Υπεριώδες φως
- Μαγείρεμα με αλκοόλ (καπνιστό κρέας, χρησιμοποιημένο λάδι, λίπος)
- Φάρμακα όπως αλοθένιο, παρακεταμόλη, βλεομυκίνη, δοξορουβικίνη, μετρενιδαζόλη,
- Αιθανόλη
- CCl<sub>4</sub>
- Καπνός τσιγάρου
- Μεταβατικά μέταλλα Cd, Hg, Pb, As
- Βαρέα μέταλλα Fe, Cu, Co, Cr
- Βιομηχανικοί διαλύτες
- Φυτοφάρμακα
- Υψηλή θερμοκρασία

### **2.3. Βιολογικές δράσεις των ελεύθερων ριζών**

#### **2.3.1. Θετικές επιδράσεις**

Η κυτταρική σηματοδότηση ή η μεταγωγή σήματος είναι μια βιολογική μέθοδος με την οποία τα κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους και ανταποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα (Polietai, 2004). Η διαδικασία της μεταγωγής σήματος επιτρέπει την αποστολή πληροφοριών από το εξωτερικό ενός κυττάρου σε πολλά λειτουργικά μέρη εντός του κυττάρου. Οι ορμόνες, οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες και οι νευροδιαβιβαστές είναι παραδείγματα εξωκυτταρικών σημάτων που προκαλούν μεταγωγή σήματος (Thannickal&Fanburg, 2000).

Τα σήματα που παρέχονται στο μηχανισμό μεταγραφής που είναι υπεύθυνος για την έκφραση γονιδίων μεταφέρονται γενικά στον κυτταρικό πυρήνα από μια συγκεκριμένη κατηγορία πρωτεϊνών, τους μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτά τα συστατικά ελέγχουν τη δραστηριότητα της RNAπολυμεράσηςII, η οποία συνδέεται σε ορισμένες αλληλουχίες DNA. Διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες, όπως η σύσπαση των μυών, η γονιδιακή έκφραση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η

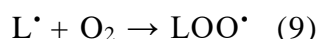
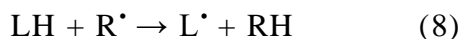
μετάδοση των νεύρων, μπορούν να προκληθούν επίσης από αντίστοιχες οδούς μεταγωγής σήματος (Thannickal&Fanburg, 2000). Ενώ τα ROS συνδέονται συχνότερα με την καταστροφή των κυττάρων, διαδραματίζουν επίσης σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση και τον έλεγχο αυτής (Droge, 2002). Η ικανότητα των κυττάρων να παράγουν ενδογενή και συστατικά ROS, τα οποία χρησιμοποιούνται για την επαγωγή και τη διατήρηση των οδών μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, είναι καλά αναγνωρισμένη.

Οι περισσότεροι τύποι κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν μια μικρή οξειδωτική έκρηξη που δημιουργεί χαμηλές συγκεντρώσεις ROS όταν διεγείρονται από κυτοκίνες, ιντερλευκίνη-1 (Interleukin, IL-1), IL-6, IL-3, παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (Tumornecrosisfactor,TNF-α), αγγειοτενσίνηII (Angiotensin II,ANGII), αυξητικό παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (Platelet-derivedgrowthfactor,PDGF), αυξητικό παράγοντα νεύρων (Nervegrowthfactor,NGF), αυξητικόπαράγοντα μετασχηματισμού-1 (Transforminggrowthfactor,TGF-1), παράγοντα διέγερση αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (Granulocyte-macrophagecolony-stimulatingfactor,GM-CSF) και αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (Fibroblastgrowthfactors,FGF) (Thannickal&Fanburg, 2000). Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι η δράση των ROS ως μορίων σηματοδότησης, τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν σε πολλά επίπεδα στον καταρράκτη μεταγωγής σήματος, απαιτείται για την έναρξη και/ή τη σωστή λειτουργία πολλών οδών μεταγωγής σήματος. Ως δευτερεύοντες αγγελιοφόροι, οιROS μπορούν επομένως να παίξουν έναν κρίσιμο φυσιολογικό ρόλο (Lowensteinetal, 1994;Storz, 2005).

### **2.3.2. Επιβλαβείς επιδράσεις**

Χρόνιες ασθένειες όπως ο καρκίνος, η στεφανιαία νόσος και η οστεοπόρωση συνδέονται με το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από ROS (Rao&Agarwal, 1999). Οι ελεύθερες ρίζες βλάπτουν όλες τις κύριες ομάδες βιομορίων, ιδιαίτερα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα(Polyunsaturatedfattyacids,PUFA)της κυτταρικής μεμβράνης. Επειδή είναι μια αυτο-δαιωνιζόμενη αλυσιδωτή αντίδραση, η οξειδωτική βλάβη PUFA, γνωστή και ως υπεροξείδωση λιπιδίων, είναι εξαιρετικά επιβλαβής (Parketal, 2009).

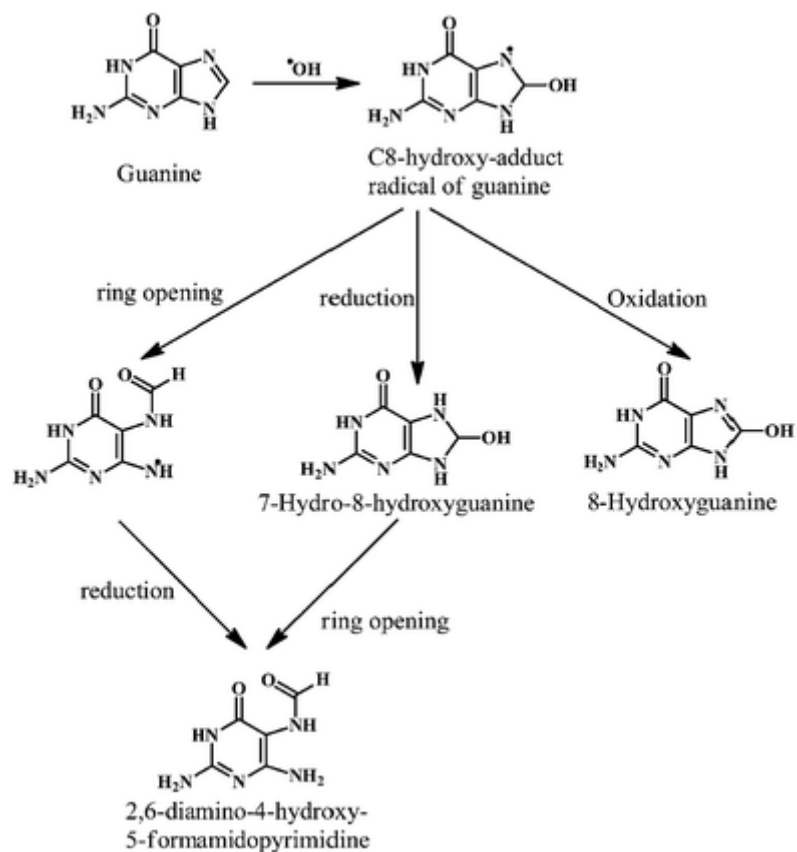
Η γενική διαδικασία της υπεροξειδωσής των λιπιδίων παρουσιάζεται στις Εξισώσεις 8-11, όπου το LH είναι ο στόχος PUFA και R<sup>•</sup> είναι η εναρκτήρια, οξειδωτική ρίζα. Όταν τα PUFA οξειδώνονται, μια ρίζα λιπαρού οξέος (L<sup>•</sup>) (Εξίσωση 8) σχηματίζεται, το οποίο λαμβάνει γρήγορα οξυγόνο προκειμένου να δημιουργήσει μια ρίζα υπεροξυλίου λιπαρού οξέος (LOO<sup>•</sup>, Εξίσωση 9) Οι φορείς των αλυσιδωτών αντιδράσεων είναι οι ρίζες υπεροξυλίου, LOOH) (Εξισώσεις 10 και 11) που μπορούν να αναλυθούν σε ακόμη πιο αντιδραστικά είδη ριζών (Esterbaueretal, 1990).



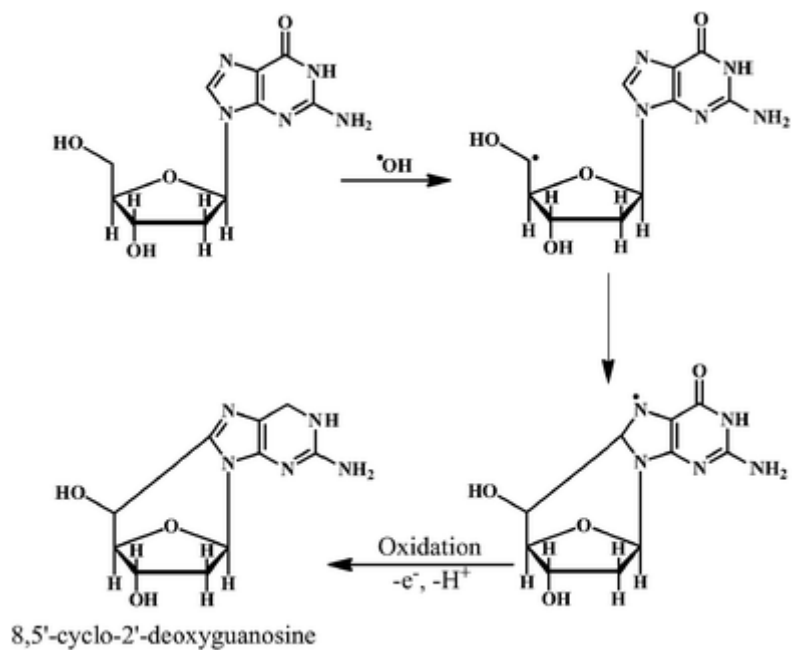
Οι αλδεϋδες σχηματίζονται συνήθως όταν διασπώνται τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων. Πολλές από αυτές τις αλδεϋδες είναι φυσιολογικά ενεργές χημικές ουσίες που μπορούν να διαδώσουν την επίθεση από το αρχικό σημείο της επίθεσης σε άλλες περιοχές του κυττάρου (Pryor&Porter, 1990; Devasagayametal, 2003). Η υπεροξειδωση των λιπιδίων έχει συνδεθεί με βλάβη των ιστών και ασθένειες εδώ και πολλά χρόνια (Esterbaueretal, 1991).

Το OH<sup>•</sup>, το O<sub>2</sub><sup>•</sup> και το μη ριζικό H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παράγονται κατά τον μεταβολισμό του οξυγόνου. Το OH<sup>•</sup> είναι ένα εξαιρετικά αντιδραστικό μόριο που αντιδρά με βιολογικά συστατικά όπως το DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, προκαλώντας χημικές αλλαγές. Η οξειδωτική βλάβη του DNA που προκαλείται από OH<sup>•</sup> έχει τεκμηριωθεί σε διάφορες μελέτες (Dizdarogluetal, 2002).

Με έναν αριθμό διεργασιών, το OH<sup>•</sup> αντιδρά με τα ζεύγη βάσεων του DNA, προκαλώντας οξειδωτική βλάβη στα ετεροκυκλικά και σακχαρώδη τμήματα τωνολιγονουκλεοτιδίων. Οι φυσιολογικές συνθήκες της μεταλλαξιόγένεσης, της καρκινογένεσης και της γήρανσης συνδέονται όλες με αυτή τη μορφή οξειδωτικής βλάβης του DNA (Breen&Murphy, 1995). Οι διαδικασίες προσθήκης παράγουν ρίζες OH<sup>•</sup> που προστίθενται σε βάσεις DNA (Εικόνα 1), ενώ οι αντιδράσεις αφαίρεσης παράγουν τη ρίζα αλλυλίου της θυμίνης και ρίζες σακχάρου με επίκεντρο τον άνθρακα (Εικόνα 2).



Εικόνα 1: Αντίδραση ρίζας υδροξυλίου με γουανίνη(Nimse&Pal, 2015).



Εικόνα 2: Αντίδραση της ρίζας υδροξυλίου με το σάκχαρο του DNA(Nimse&Pal, 2015).

Όπως υποδεικνύεται στην Εικόνα 1, το OH<sup>\*</sup> συνδυάζεται με τη γουανίνη στο DNA δημιουργώντας τη ρίζα C-8-υδροξυ-προσαγωγής της γουανίνης, η οποία στη συνέχεια ανάγεται και ο δακτύλιος ανοίγει για να σχηματίσει το 2,6-διαμινο-4-υδροξυ-5-φορμαμιδοπυριμιδίνη. Η ρίζα C-8-υδροξυ-προσαγωγής της γουανίνης, από την άλλη πλευρά, μετατρέπεται σε 8-υδροξυγουανίνη κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειδωσης. Οι ρίζες προσθήκης C5-OH και C6-OH σχηματίζονται όταν η ρίζα OH συνδυάζεται με το ετεροκυκλικό τμήμα της θυμίνης και της κυτοσίνης στις θέσεις C5- και C6, αντίστοιχα. Η παραγωγή κυτοσινογλυκόλης και θυμινογλυκόλης προκύπτει από την αντίδραση οξειδωσης αυτών των ριζών με προσθήκη νερού (ακολουθούμενη από αποπρωτονίωση) (Dizdaroglu&Jaruga, 2012). Συνολικά, οι αλληλεπιδράσεις OH<sup>\*</sup> με τις βάσεις DNA έχουν ως αποτέλεσμα το dsDNA που είναι εξασθενημένο.

Το OH<sup>\*</sup> αντιδρά με το τμήμα σακχάρου του DNA αφαιρώντας ένα άτομο H από το άτομο άνθρακα C5, όπως υποδεικνύεται στην Εικόνα 2. Η σύνδεση της ρίζας με τον κεντρικό C5' του τμήματος σακχάρου στο DNA στη θέση C8 στον δακτύλιο της πουρίνης στο ίδιο νουκλεοσίδιο (π.χ. γουανίνη) είναι μια μοναδική στο είδος της αντίδραση. Οι 8,5'-κυκλοπουρινο-2'-δεοξυνουκλεοσίτες σχηματίζονται ως αποτέλεσμα αυτής της ενδομοριακής κυκλοποίησης. Με διάφορους μηχανισμούς, οι αντιδράσεις των ριζών με το σάκχαρο του κεντρικού άνθρακα έχουν ως αποτέλεσμα θραύσεις του DNA και θέσεις χωρίς βάσεις (Nimse&Pal, 2015).

Ο συνδυασμός δράσης ενεργοποιημένων ειδών οξυγόνου και ιόντων μετάλλων όπως Fe<sup>2+</sup> και Cu<sup>2+</sup> προκαλεί οξειδωτική βλάβη στις πρωτεΐνες. Η λυσίνη, η προλίνη, η ιστιδίνη και η αργινίνη είναι τα αμινοξέα που είναι πιο ευάλωτα στην οξειδωτική βλάβη. Σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα, μπορεί να συμβεί ένα ευρύ φάσμα αλλαγών υπολειμμάτων, συμπεριλαμβανομένης της δημιουργίας υπεροξειδίων (Giese et al, 2000) και καρβονυλίων (Stadtman, 1990). Ο σχηματισμός υπολειμμάτων καρβονυλίου στις πρωτεΐνες είναι ένας χρήσιμος δείκτης οξειδωτικής βλάβης. Ως αποτέλεσμα της οξειδωτικής βλάβης στον ιστό, υπάρχει αύξηση στην ποσότητα της οξειδωμένης πρωτεΐνης (Cooke et al, 2003).

Τα χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών έχουν συνδεθεί με καρδιακές παθήσεις και καρκίνο (Kris-Ethertonetal, 2002). Τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν από τη γήρανση, τις αλλεργίες, την αλγησία, την αρθρίτιδα, το άσθμα, την αθηροσκλήρωση, τις αυτοάνοσες ασθένειες, τη βρογχοπνευμονική δυσπεψία και τον καρκίνο, μεταξύ άλλων παθήσεων. Ο καταρράκτης, η εγκεφαλική ισχαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης, το έκζεμα, οι φλεγμονώδεις ασθένειες του γαστρεντερικού συστήματος και οι γενετικές διαταραχές είναι μερικές ακόμα παθολογικές καταστάσεις στις οποίες τα αντιοξειδωτικά παίζουν προστατευτικό ρόλο (Lissietal, 1995).

## 2.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Οι αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών ρυθμίζονται από δύο τύπους αντιοξειδωτικών: ενζυματικά αντιοξειδωτικά και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά. Το σώμα χρησιμοποιεί ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα για να αμυνθεί έναντι των ROS. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα μειώνουν τις ποσότητες του υδροϋπεροξειδίου των λιπιδίων και του  $H_2O_2$ , καθιστώντας τα ζωτικής σημασίας για την πρόληψη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και τη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης (Πίνακας 1) (Nimse&Pal, 2015).

Πίνακας 1: Ενζυματικά αντιοξειδωτικά, οι κυτταρικές τους θέσεις και οι αντιδράσεις που πραγματοποιούν (Nimse&Pal, 2015).

Ενζυματικό αντιοξειδωτικό	Κυτταρική τοποθεσία	Υπόστρωμα	Αντίδραση
Mn/Cu/Zn SOD	Μιτοχονδριακή μήτρα(Mn SOD) κυτταρόπλασμα (Cu/Zn SOD)	$O_2^{\cdot-}$	$O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2$
CAT	Κυτοσόλιουπεροξειδισωμάτων	$H_2O_2$	$2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$
GSHPx	Κυτοσόλιο	$H_2O_2$	$H_2O_2 + GSH \rightarrow GSSG + H_2O$
Prx-I	Κυτοσόλιο	$H_2O_2$	$H_2O_2 + TrxS_2 \rightarrow Trx(SH)_2 + H_2O$

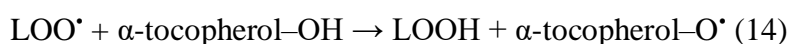
Παρουσία συμπαράγοντων μεταλλικών ιόντων όπως ο χαλκός (Cu), ο ψευδάργυρος (Zn) ή το μαγγάνιο(Mn), η υπεροξειδικήδισμουτάση(superoxidisedismutase,SOD) στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια μετατρέπουν καταλυτικά το  $O_2^{\cdot-}$  σε οξυγόνο και  $H_2O_2$ (Gough&Cotter, 2011). Το  $H_2O_2$  μετατρέπεται σε νερό και οξυγόνο από το



ένζυμο CAT, το οποίο βρίσκεται στο υπεροξειδίουσωμα(Zhanetal, 2004; Stone&Yang, 2006).GSHPx βρίσκονται σχεδόν σε κάθε ανθρώπινο ιστό, τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και εξωκυτταρικά. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μετατρέπεται σε νερό από GSHPx(Πίνακας 1). Τόσο τα υδροϋπεροξειδία του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> όσο και των λιπαρών οξέων αποικοδομούνται από το ένζυμο GSHPx(Arthur, 2001). Η αναγωγή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, των οργανικών υδροϋπεροξειδίων και των υπεροξυνιτροδών καταλύεται από το ένζυμο υπεροξυρεδοξίνη. Η ποικιλομορφία των προφίλ έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων, των υποκυτταρικών θέσεων και των υποστρωμάτων αποκαλύπτει την πολυπλοκότητα της βιολογίας των ROS. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, χωρίς αμφιβολία, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην πρόληψη της οξειδωτικής βλάβης.

#### 2.4.1. Βιταμίνες

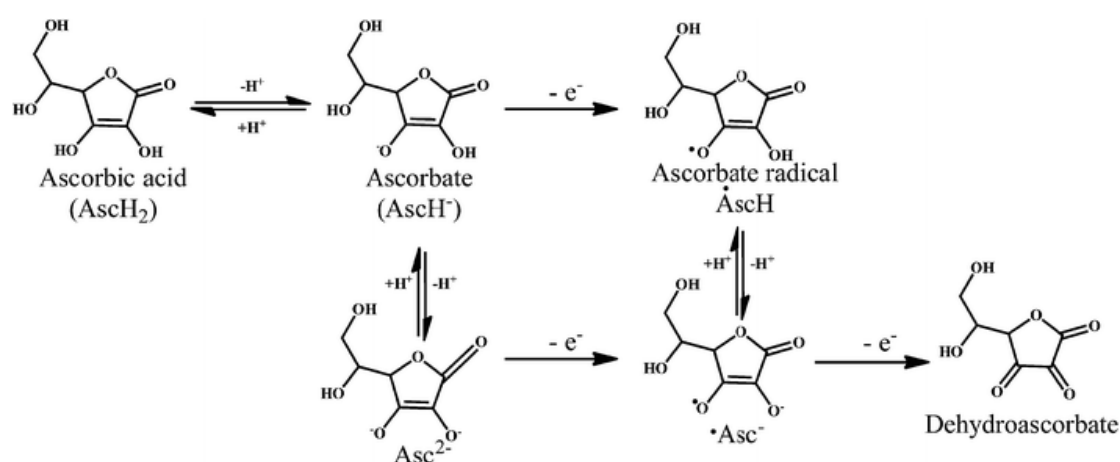
Οι βιταμίνες που έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες είναι η βιταμίνη E, η βιταμίνη C και η βιταμίνη A (Nimse&Pal, 2015). Η βιταμίνη E (τοκοφερόλη) είναι ένα ισχυρό λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που δρα ως «διαλύτης της αλυσίδας» κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες και άλλα λιπιδικά σωματίδια, όπως η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (low-densitylipoprotein, LDL). Ο ρόλος της είναι να αναχαιτίζει τις λιπιδικέςυπεροξυλικές ρίζες (LOO<sup>•</sup>) και να σταματάει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Εξίσωση 12).



Η ρίζα τοκοφεροξυλίου που προκύπτει είναι αρκετά σταθερή και, στις περισσότερες περιπτώσεις, ανεπαρκώς αντιδραστική για την έναρξη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, γεγονός που αποτελεί σημαντικό κριτήριο για ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό (Wittingetal, 1997; Morlièreetal, 2012; Stockeretal, 1991). Η βιταμίνη E δρα ως αντιοξειδωτικό τόσο σε συνθήκες *in vivo* όσο και σε συνθήκες *in vitro* δεσμεύοντας τις λιπιδικέςυπεροξυλικές ρίζες. Η βιταμίνη E, από την άλλη πλευρά, δεν είναι αποτελεσματικός καθαριστής του OH<sup>•</sup> και των ριζών αλκοξυλίου*in vivo* (Nikietal, 2014).

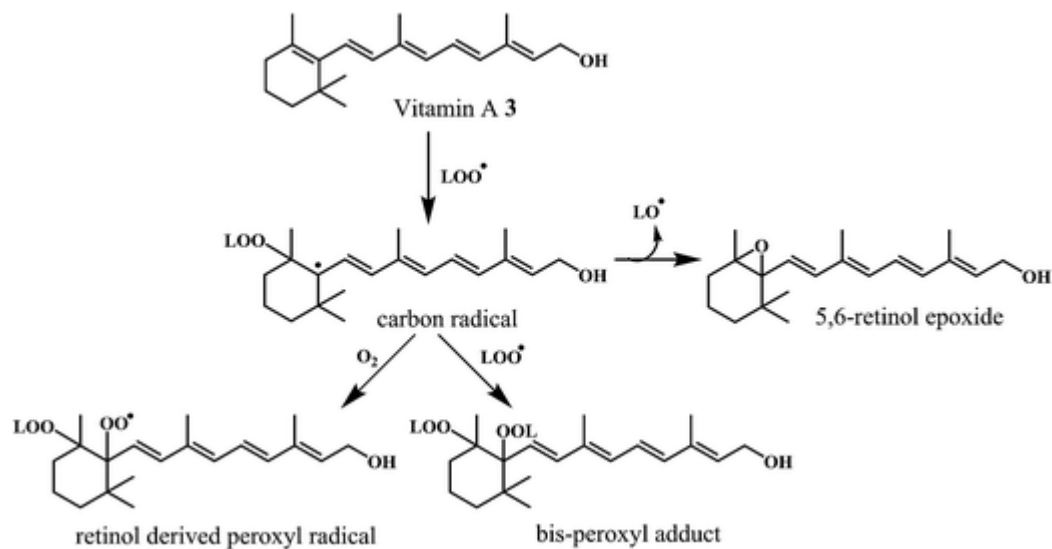
Το ασκορβικό οξύ, επίσης γνωστό ως βιταμίνη C, είναι ένας υδατοδιαλυτός καθαριστής ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, όταν συνδυάζεται με GSH ή άλλες χημικές ουσίες ικανές να παρέχουν αναγωγικά ισοδύναμα, αναγεννά τη βιταμίνη E στις κυτταρικές μεμβράνες. Για να σταματήσει την αλυσιδωτή αντίδραση

υπεροξειδωσιζτων λιπιδίων, η βιταμίνη C μετατρέπεται στην ασκορβική ρίζα (Εικόνα3) συνεισφέροντας ένα ηλεκτρόνιο στη λιπιδική ρίζα. Ένα μόριο ασκορβικού και ένα μόριο αφυδροασκορβικού παράγονται όταν τα ζεύγη ασκορβικών ριζών αντιδρούν γρήγορα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του αφυδροασκορβικού είναι μηδενική. Ως αποτέλεσμα, με την προσθήκη δύο ηλεκτρονίων, το αφυδροασκορβικό μετατρέπεται ξανά σε ασκορβικό. Το τελικό στάδιο της προσθήκης δύο ηλεκτρονίων του αφυδροασκορβικού προτείνεται ότι πραγματοποιείται μέσω οξειδοαναγωγής (Nimse&Pal, 2015).



Εικόνα 3: Μηχανισμός δράσης δέσμευσης ριζών ασκορβικού οξέος (Nimse&Pal, 2015).

Η βιταμίνης A υποστηρίζεται ότι έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς μπορεί να αποτρέψει τα λιπίδια από το τάγγισμα. Έχουν δημοσιευτεί αρκετές ανασκοπήσεις που περιγράφουν λεπτομερώς τα βασικά δομικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά της βιταμίνης A, καθώς και πληροφορίες σχετικά με την αντιοξειδωτική της ικανότητα σε σχέση με τις καρδιακές παθήσεις (Vieiraetal, 1995). Η βιταμίνη A είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό που προστατεύει την ανθρώπινη LDL από την οξείδωση που διεγείρεται από τον χαλκό (Livreaetal,1995;Tesoriereetal, 1997).



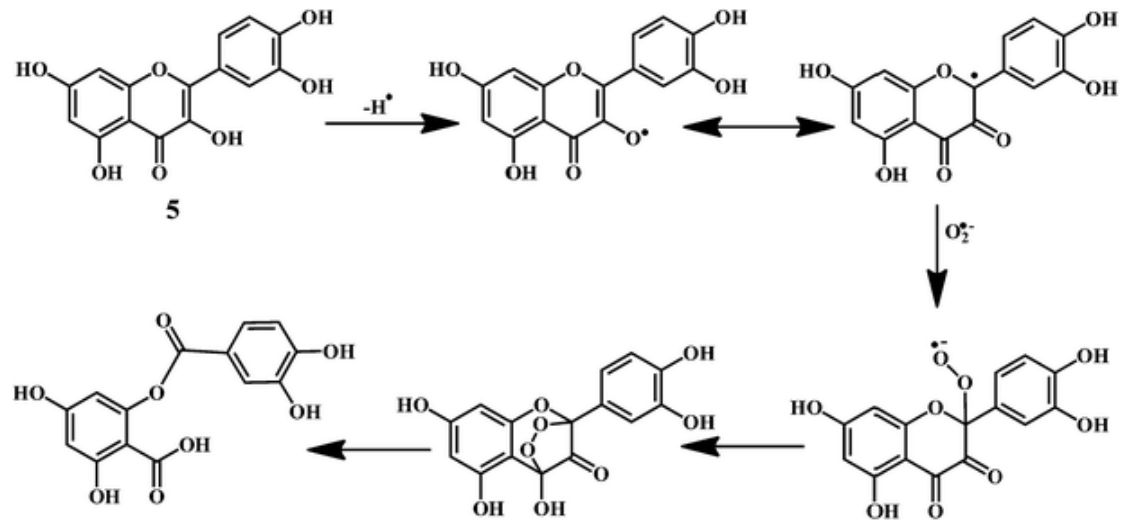
Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης καθαρισμού ριζών της βιταμίνης A (Nimse&Pal, 2015).

#### 2.4.2. Βιοφλαβονοειδή

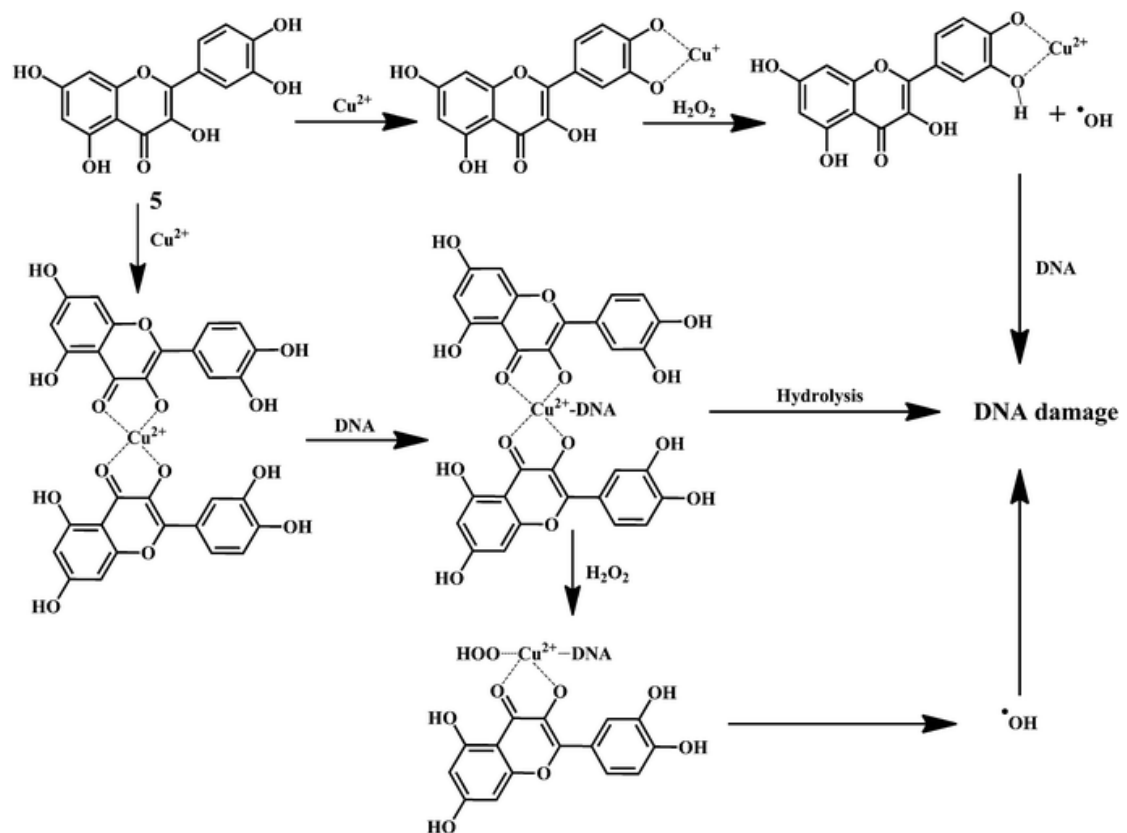
Τα βιοφλαβονοειδή είναι μια κατηγορία φυσικών παραγώγων βενζοπυρανίου που έχει ανακαλυφθεί ότι έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Pietta, 2000). Τα βιοφλαβονοειδή, τα οποία βρίσκονται σε μια ποικιλία φρούτων και λαχανικών, έχει αποδειχθεί ότι έχουν ποικίλες βιολογικές επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της δέσμευσης των ελεύθερων ριζών. Τα βιοφλαβονοειδή έχει αποδειχθεί ότι προστατεύουν το DNA από βλάβη που προκαλείται από τις ρίζες υδροξυλίου (Russoetal, 2000). Η συμμετοχή χηλικών ιόντων μετάλλων, όπως ο χαλκός ή ο σίδηρος, είναι ένας από τους μηχανισμούς που εξηγούν την προστατευτική δράση των φλαβονοειδών στο DNA. Τα φλαβονοειδή που συμπλέκονται με χαλκό ή σίδηρο καταστέλλουν την παραγωγή ROS (de Souza& De Giovani, 2004; Zhouetal, 2001).

Η κερκετίνη είναι μια φλαβονόλη που προστατεύει το DNA από οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από επιθέσεις OH•, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και O<sub>2</sub><sup>-</sup> σε ολιγονουκλεοτίδια DNA (Εικόνα 5)(Krishnamacharietal, 2002). Η κερκετίνη, από την άλλη πλευρά, έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη καρκίνου (Yen&Hsieh, 1994). Σύμφωνα με έρευνες, ανάλογα με τη συγκέντρωση του ιόντος χαλκού, η κερκετίνη έχει αντίθετα αποτελέσματα στη βλάβη του DNA που προκαλείται από το ιόν (Εικόνα6). Η κερκετίνη έχει προστατευτική δράση σε χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων χαλκού (<25 M), ενώ αυξάνει τη βλάβη στο DNA που προκαλείται από ROS σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ιόντων χαλκού (>25 M). Επομένως, κατά την ανάλυση των

προληπτικών ή εκφυλιστικών επιδράσεων της κερκετίνης και άλλων βιοφλαβονοειδών, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η συγκέντρωση ιόντων χηλικών μετάλλου όπως ο χαλκός ή ο σίδηρος (Nimse&Pal, 2015).

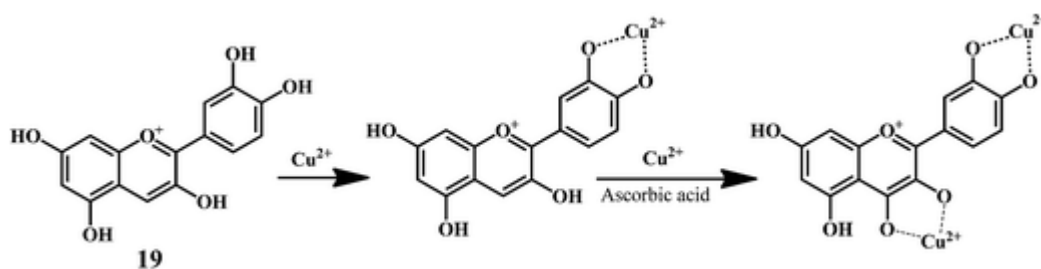


Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης δέσμευσης ριζών ανιόντων υπεροξειδίου της κερκετίνης(Nimse&Pal, 2015).

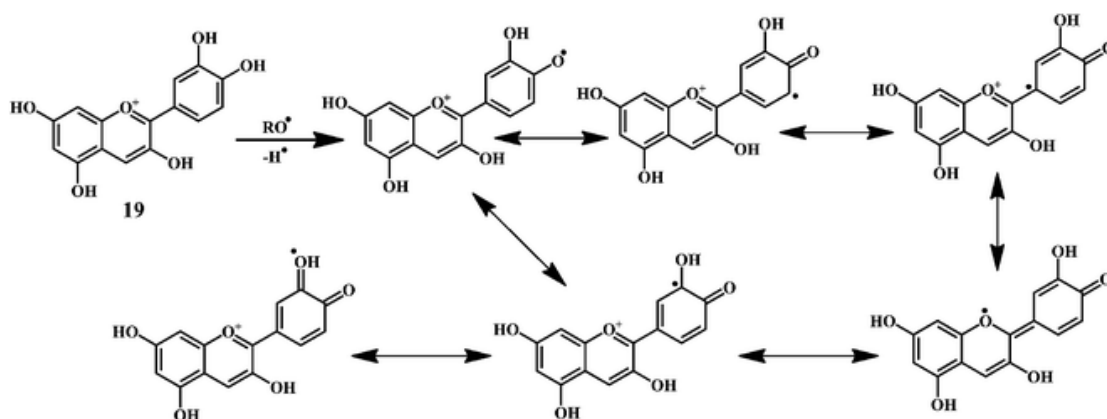


Εικόνα 6: Μηχανισμός βλάβης του DNA που προκαλείται από σύμπλοκο χαλκού κερκετίνης(Nimse&Pal, 2015).

Η ανθοκυνιδίνη, μια οικογένεια φλαβονοειδών, είναι ένα πιθανό αντιοξειδωτικό του οποίου η ικανότητα να καταστέλλει την οξείδωση των λιπιδίων συνδέεται με τη δράση της χηλικοποίησης ιόντων μετάλλων (Εικόνα7) και τη δράση δέσμησης ελεύθερων ριζών (Εικόνα8). Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 8, οι ανθοκυνιδίνες (κυνιδίνη 19) μπορούν να μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο (μαζί με έναν πυρήνα υδρογόνου) σε μια ελεύθερη ρίζα μέσω των ομάδων φαινολικών δακτυλίων –OH (Ramosetal, 2014; VanAckeretal, 1996). Η ελεύθερη ρίζα σταθεροποιείται και αδρανοποιείται από αυτό το ηλεκτρόνιο. Σε αυτόν τον μηχανισμό, ο πολυφαινολικός αναγωγικός παράγοντας μετατρέπεται σε μια ρίζα αροξυλίου, η οποία είναι πιο σταθερή από την ελεύθερη ρίζα που έχει αναχθεί λόγω συντονισμού. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ότι διακόπτονται οι επιβλαβείς οξειδωτικές αλυσιδωτές αντιδράσεις.



Εικόνα 7: Χημική δράση ιόντων μετάλλου ( $\text{Cu}^{2+}$ ) της ανθοκυνιδίνης(Nimse&Pal, 2015).



Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης καθαρισμού ριζών της κυνιδίνης(Nimse&Pal, 2015).

### **2.4.3. Καροτενοειδή**

Τα καροτενοειδή είναι ένα από τα πιο συχνά φυτοθρεπτικά συστατικά που είναι λιποδιαλυτά. Μεταξύ των 600 διακριτών μορίων, τα πιο σημαντικά καροτενοειδή είναι το λυκοπένιο και το -καροτένιο. Τα καροτενοειδή είναι από καιρό γνωστό ότι καθαρίζουν τις ρίζες υπεροξυλίου πιο αποτελεσματικά από οποιοδήποτε άλλο ROS. Οι ρίζες υπεροξυλίου που παράγονται κατά τη διαδικασία υπεροξειδωσης των λιπιδίων μπορούν να βλάψουν τα λιπίδια στο κυτταρικό τοίχωμα. Ο καθαρισμός των ριζών υπεροξυλίου μπορεί να διαταράξει τον καταρράκτη αντιδράσεων και να προστατεύσει τα κυτταρικά λιπίδια από βλάβη. Τα καροτενοειδή είναι ιδιαίτερα λιπόφιλα λόγω των μακριών ακόρεστων αλκυλικών αλυσίδων τους. Λόγω της ικανότητας σάρωσης των ριζών υπεροξυλίου, τα καροτενοειδή είναι γνωστό ότι παίζουν κρίσιμο ρόλο στην προστασία των κυτταρικών μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών έναντι των ROS. Τα καροτενοειδή συνδυάζονται με ρίζες υπεροξυλίου για να δημιουργήσουν σταθεροποιημένες με συντονισμό ρίζες προσθήκης με επίκεντρο τον άνθρακα, τις οποίες και απενεργοποιούν (Stahl, & Sies, 2003).

Το λυκοπένιο, το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό, βρίσκεται σε μια ποικιλία φρούτων και λαχανικών. Το λυκοπένιο έχει μεγάλη ποσότητα συζευγμένων διπλών δεσμών, γεγονός που του δίνει την ικανότητα να απενεργοποιεί το μονήρες οξυγόνο. Σε σύγκριση με την τοκοφερόλη ή την καροτίνη, το λυκοπένιο έχει ισχυρή ικανότητα απόσβεσης μονήρους οξυγόνου. 80 Το καροτένιο είναι ένα καροτενοειδές πορτοκαλί χρώματος που εντοπίζεται σε αφθονία σε κίτρινα-πορτοκαλί φρούτα και σκούρα πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Λόγω της χημικής δομής και της αλληλεπίδρασής του με τις βιολογικές μεμβράνες, το καροτένιο έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Riccioni, 2009).

### **2.4.4. Υδροξυκινναμικά**

Τα διατροφικά αντιοξειδωτικά που προστατεύουν την LDL από την οξειδωση θεωρούνταν από καιρό ότι βοηθούν στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης και της στεφανιαίας νόσου. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, καθώς και τα συζυγή τους, προστατεύουν την LDL από την οξειδωτική βλάβη (Andreasenetal, 2001). Πειράματα *in vitro* που χρησιμοποιούν ανθρώπινη LDL ως οξειδωτικό υπόστρωμα αποκάλυψαν ότι τα υδροξυκινναμωμικά οξέα έχουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα

αντίστοιχα του υδροξυβενζοϊκού οξέος (Natellaetal, 1999). Τα σχήματα υδροξυλίωσης και μεθυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου συνδέονται σαφώς με την αντιοξειδωτική δράση των παραγώγων υδροξυκινναμικών. Λόγω της τάσης του να δίνει υδροξυλικό υδρογόνο και τη σταθεροποίηση συντονισμού των αντιοξειδωτικών ριζών που προκύπτουν, τα υδροξυκινναμωμικά οξέα έχουν συγκρίσιμο αντιοξειδωτικό μηχανισμό δέσμευσης ριζών με τα φλαβανοειδή. Η χηλίωση μεταλλικών ιόντων είναι επίσης δυνατή χάρη στους ο-διυδροξυποκαταστάτες, που είναι ανάλογα με τα φλαβανοειδή(Nimse&Pal, 2015).

## 3. Οίνος

### 3.1. Ιστορία οίνου

Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία «Οίνος ονομάζεται το ποτό που προέρχεται μόνο από ολική ή μερική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών ή γλεύκους νωπών σταφυλιών». Η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης δίνει τον ίδιο ορισμό με ορισμένες πρόσθετες διευκρινίσεις: «Κρασί ή οίνος είναι το προϊόν που παράγεται εξ ολοκλήρου από αλκοολική ζύμωση, πλήρη ή μερική, φρέσκων σταφυλιών, σπασμένων ή μούστο σταφυλιών» (Koutrakou, 1998).

Οι παλαιοντολόγοι εκτιμούν ότι ο αμπελώνας από τον οποίο παρασκευάζεται το κρασί υπάρχει εδώ και εκατομμύρια χρόνια. Η παλαιότερη επιστημονική απόδειξη της ηλικίας του αμπελιού είναι απολιθωμένα αμπέλια ηλικίας 60 εκατομμυρίων ετών. Το αμπέλι ευδοκίμησε στην αρκτική ζώνη ακόμη και πριν από την εποχή των παγετώνων, κυρίως στην Ισλανδία, τη Βόρεια Ευρώπη και τη βορειοδυτική Ασία. Οι παγετώνες επιβράδυναν σημαντικά την εξάπλωσή του, απομονώνοντας έτσι πολλές ποικιλίες, μερικές από τις οποίες τελικά εξελίχθηκαν σε ξεχωριστά είδη(houseofwine.gr).

Σύμφωνα με πρόσφατες ανακαλύψεις, το πρώτο δοχείο με υπολείμματα κρασιού ανακαλύφθηκε πριν από 9.000 χρόνια στην κινεζική επαρχία Henan, ενώ το προηγούμενο εύρημα στο HajjiFiruzTere του Ιράν ήταν 7.000 ετών και το προηγούμενο από την ίδια περιοχή ήταν 5.100 ετών(houseofwine.gr).

Η αγροτική επανάσταση και η μόνιμη εγκατάσταση πληθυσμών με σκοπό την καλλιέργεια πιστεύεται ότι είναι η απαρχή της αμπελουργίας, η οποία χρονολογείται περίπου στο 5.000 π.Χ. Οι αρχαίοι Πέρσες, οι Σημιτικοί λαοί και οι Ασσύριοι λέγεται ότι είναι από τους πρώτους γνωστούς αμπελουργούς. Αργότερα, η αμπελουργική και η γνώση της οινοποίησης μεταδόθηκε στους Αιγύπτιους, στους Φοινικικούς λαούς και στους λαούς της Μ. Ασίας και της Ελλάδας(houseofwine.gr).

Οι αρχαίοι Έλληνες έπιναν κρασί αραιώνοντάς το με νερό σε αναλογία ένα προς τρία (ένα μέρος κρασί προς τρία μέρη νερό). Ο όρος «κρασί» αναφέρεται στο κρασί που έχει αναμειχθεί με νερό, ενώ το «άκρατο» αναφέρεται στο καθαρό κρασί. Οι αρχαίοι Έλληνες είχαν και μοναδικά σκεύη τόσο για ανάμειξη όσο και για ψύξη (κρατήρες). Το ανόθευτο κρασί («άκρατο κρασί») θεωρούνταν βάρβαρο και το καταλάωναν μόνο οι άρρωστοι ή ως τονωτικό κατά τη διάρκεια των ταξιδιών. Συνηθιζόταν επίσης



η χρήση μπαχαρικών και η κατανάλωση κρασιού με μέλι. Η προσθήκη ασπέντιου στο κρασί, καθώς και η προσθήκη ρητίνης, ήταν μια πολύ γνωστή διαδικασία (που αποδίδεται στον Ιπποκράτη και αναφέρεται ως «Ιπποκράτειος Οίνος»)(houseofwine.gr).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή κρασιού στο παρελθόν δεν ήταν ανόμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται σήμερα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα βιβλία του Θεόφραστου, που περιέχουν πληροφορίες για τις μεθόδους καλλιέργειας, έχουν διασωθεί μέχρι σήμερα. Οι Έλληνες ήταν γνώστες της ωρίμανσης του κρασιού, την οποία κατάφερναν σε υπόγεια πιθάκια που ήταν σφραγισμένα με γύψο και ρετσίνα. Το κρασί εμφιαλώνονταν σε σάκους πασαλειμμένους με πίσσα ή σφραγισμένους πήλινους αμφορείς για να διατηρηθεί στεγανό(houseofwine.gr).

Μία από τις σημαντικότερες οικονομικές δραστηριότητες ήταν το εμπόριο ελληνικών κρασιών σε όλη τη Μεσόγειο, μέχρι την Ιβηρική Χερσόνησο και τη Μαύρη Θάλασσα. Σε πολλά μέρη υπήρχαν ειδικοί κανόνες για τη διατήρηση της ποιότητας του κρασιού, καθώς και για την προστασία από τον ανταγωνισμό και τις εισαγωγές. Η νομοθεσία της Θάσου, για παράδειγμα, ορίζει ότι τα πλοία που μεταφέρουν ξένο κρασί που πλησιάζουν στο νησί πρέπει να κατάσχονται(houseofwine.gr).

Οι Ρωμαίοι μύηθηκαν στο κρασί από Έλληνες αποίκους και γηγενείς Ετρούσκους, οι οποίοι ασκούσαν επίσης την αμπελοκαλλιέργεια. Με την πτώση της Ρώμης και την επακόλουθη έξοδο των λαών, η αμπελουργία παράκμασε και ορισμένες τοποθεσίες έχει εγκαταλειφθεί εδώ και χιλιετίες. Ο κλήρος και οι μοναχοί, που χρειάζονταν το κρασί για τελετουργικούς σκοπούς, έπαιξαν ζωτικό ρόλο στη σωτηρία της οινοποίησης. Η τέχνη του κρασιού άκμασε και πάλι κατά τη διάρκεια της βασιλείας του Καρλομάγνου και τον Μεσαίωνα(houseofwine.gr).

Στο Βυζάντιο, η πλειονότητα της γης ανήκε στην εκκλησιαστική επικράτεια και οι μοναχοί ήταν υπεύθυνοι τόσο για την αμπελοκαλλιέργεια όσο και για την παραγωγή κρασιού. Σε αυτό το διάστημα πρέπει να εγκαταλείφθηκε και η πρακτική του συνδυασμού του κρασιού με το νερό(houseofwine.gr).

Ταυτόχρονα, η τέχνη της οινοποίησης άνθισε στη Δύση. Τον 16ο αιώνα είχε εξαπλωθεί στην Ισπανία, καθώς και στη Γαλλία. Σήμερα έχουν γίνει αρκετές τεχνολογικές βελτιώσεις, όπως η χρήση γυάλινων φιαλών και φελλού, ενώ έχει

αναπτυχθεί και η διαδικασία παρασκευής αφρώδους οίνου (όπως η σαμπάνια, που αποδίδεται στον Γάλλο Βενεδικτίνο μοναχό Perinon)(houseofwine.gr).

### **3.2. Οινοποίηση**

Η συγκομιδή, η σύνθλιψη και η έκθλιψη, η ζύμωση, η διαύγαση και τέλος η παλαίωση και η εμφιάλωση είναι τα πέντε θεμελιώδη στάδια στην παραγωγή του κρασιού. Σε κάθε στάδιο υπάρχουν σήμερα αρκετές παραλλαγές, οι οποίες οδηγούν και στην παραγωγή διαφορετικών ποικιλιών οίνου.

Η συγκομιδή είναι το πρώτο βήμα στη διαδικασία οινοποίησης. Για την παραγωγή κρασιού ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται το σταφύλι, το οποίο περιέχει αρκετά σάκχαρα προκειμένου να μπορέσει να δώσει αρκετή αλκοόλη, καθώς και τα απαραίτητα οξέα, εστέρες και τανίνες για να παράγουν με συνέπεια φυσικό, σταθερό κρασί. Τα σταφύλια πρέπει να τρυγηθούν σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή, κατά προτίμηση όταν είναι φυσιολογικά ώριμα. Οι ημερομηνίες συγκομιδής καθορίζονται συνήθως χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό επιστήμης και παλιομοδίτικης γευσισιγνώσιας, με τη συμβολή συμβούλων, οινοποιών, διαχειριστών αμπελώνων και ιδιοκτητών. Η συγκομιδή μπορεί να γίνει είτε χειροκίνητα είτε μηχανικά. Πολλά κτήματα, ωστόσο, προτιμούν τον τρύγο με το χέρι γιατί οι μηχανικοί τρυγητές μπορεί να τραυματίσουν τα σταφύλια και τον αμπελώνα. Πριν συνθλίψουν τα σταφύλια, οι οινοποιοί ταξινομούν τα τσαμπιά σταφυλιών, απορρίπτοντας τυχόν σάπια ή υποώριμα φρούτα (Zhaoetal, 2019).

Το επόμενο βήμα στη διαδικασία οινοποίησης είναι συνήθως η σύνθλιψη πλήρων συστάδων από φρέσκα ώριμα σταφύλια. Η διαχρονική παράδοση του πατήματος των σταφυλιών σε αυτό που γενικά αναφέρεται ως μούστος πραγματοποιείται πλέον από μηχανές θραύσης. Η μηχανική έκθλιψη έχει αυξήσει την ποιότητα και τη διάρκεια ζωής του κρασιού, ενώ ελαχιστοποιεί την ανάγκη για συντηρητικά από την πλευρά του οινοποιού. Ωστόσο, δεν οδηγούνται όλα τα κρασιά απευθείας σε έναν θραυστήρα. Πριν πιέσουν τις μη θρυμματισμένες συστάδες, οι οινοπαραγωγοί μπορούν να επιλέξουν να επιτρέψουν την έναρξη της ζύμωσης μέσα σε μη θρυμματισμένες ολόκληρες συστάδες σταφυλιών, επιτρέποντας στις φλούδες των σταφυλιών να σπάσουν υπό το φυσικό βάρος των σταφυλιών και να ξεκινήσει έτση ζύμωση (Gaoetal, 2019).

Οι μέθοδοι για τη δημιουργία λευκού και κόκκινου κρασιού είναι γενικά οι ίδιες μέχρι τη σύνθλιψη και το πάτημα. Κατά την παρασκευή λευκού κρασιού, ωστόσο, ένας οινοποιός θα πιάσει αμέσως το μούστο μετά τη σύνθλιψη για να διαχωρίσει το χυμό από τις φλούδες, τους σπόρους και τα σωματίδια. Με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζεται το να περάσει το ανεπιθύμητο χρώμα (το οποίο προέρχεται από τη φλούδα του σταφυλιού και όχι από το χυμό) και οι τανίνες στο λευκό κρασί. Στην ουσία, το λευκό κρασί έχει πολύ λίγη επαφή με τη φλούδα, ενώ το κόκκινο κρασί μένει σε επαφή με τις φλούδες του κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να αποκτήσει χρώμα, γεύση και επιπλέον τανίνες (Radonjić et al., 2020).

Η αποτελεί το επόμενο στάδιο στη διαδικασία της οινοποίησης. Αν αφηθεί στην τύχη του, ο μούστος ή ο χυμός θα ζυμωθεί οργανικά σε 6-12 ώρες με τη βοήθεια άγριων ζυμών που βρίσκονται στον αέρα. Η φυσική ζύμωση είναι ένα ευπρόσδεκτο φαινόμενο σε εξαιρετικά καθαρά, εδραιωμένα οινοποιεία και αμπελώνες. Πολλοί οινοποιοί, ωστόσο, επιλέγουν να παρέμβουν σε αυτό το βήμα εμβολιάζοντας τον φυσικό μούστο για διάφορους λόγους. Αυτό σημαίνει ότι θα καταστρέψουν τις άγριες, συχνά απρόβλεπτες γηγενείς ζύμες και θα τις αντικαταστήσουν με ένα στέλεχος ζύμης της επιλογής τους, επιτρέποντάς τους να προβλέψουν το τελικό αποτέλεσμα με μεγαλύτερη ακρίβεια. Όποια διαδρομή και αν επιλεγεί, η ζύμωση συνήθως συνεχίζεται μέχρι να μετατραπεί όλη η ζάχαρη σε αλκοόλ και να σχηματιστεί ένα ξηρό κρασί. Ο χρόνος ζύμωσης μπορεί να κυμαίνεται από δέκα ημέρες έως ένα μήνα ή περισσότερο. Όταν η διαδικασία ζύμωσης σταματήσει πριν όλη η ζάχαρη μετατραπεί σε αλκοόλ, δημιουργείται γλυκό κρασί (Chambers & Pretorius, 2010).

Η διαδικασία διαύγασης ξεκινά μόλις ολοκληρωθεί η ζύμωση. Οι οινοπαραγωγοί μπορούν να επωάσουν τα κρασιά τους σε μια δεξαμενή ή βαρέλι προκειμένου τα ζύματα να παραμείνουν στον πυθμένα της δεξαμενής ζύμωσης. Φιλτράρισμα και φινίρισμα μπορεί να γίνει και σε αυτό το σημείο. Το φιλτράρισμα μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας μια ποικιλία μεθόδων, που κυμαίνονται από ένα χοντρό φίλτρο που συλλαμβάνει μόνο μεγάλα σωματίδια έως ένα αποστειρωμένο επίθεμα φίλτρου που αφαιρεί όλα τα σωματίδια από το κρασί. Το φινίρισμα είναι η διαδικασία προσθήκης χημικών ουσιών σε ένα κρασί με σκοπό τη διαύγασή του. Οι οινοποιοί προσθέτουν συχνά ασπράδια αυγών, άργιλο ή άλλες χημικές ουσίες στο κρασί για να βοηθήσουν στην κατακρήμνιση νεκρών κυττάρων ζύμης και άλλων

σωματιδίων. Αυτές οι ενώσεις κολλάνε στα ανεπιθύμητα στερεά και τα σπρώχνουν στον πυθμένα της δεξαμενής. Το διαυγασμένο κρασί στη συνέχεια τοποθετείται σε ένα νέο δοχείο, όπου μπορεί να εμφιαλωθεί ή να παλαιωθεί περαιτέρω (Maetal, 2020).

Η ωρίμανση και η εμφιάλωση του κρασιού είναι το τελευταίο βήμα στη διαδικασία οινοποίησης. Μετά από διευκρίνιση, ο οινοποιός έχει τη δυνατότητα να εμφιαλώσει το κρασί αμέσως, όπως συμβαίνει με το BeaujolaisNouveau, ή να το παλαιώσει περαιτέρω, όπως συμβαίνει με το GrandCruBordeaux και το NapaValleyCabernetSauvignon. Η παλαίωση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μπουκάλι, ανοξείδωτες ή κεραμικές δεξαμενές, τεράστια ξύλινα οβάλ ή μικρά βαρέλια (Carpenaetal, 2020).

### **3.3. Ονοματολογία και ταξινόμηση**

Τα κρασιά ονομάζονται από την ποικιλία σταφυλιού ή την τοποθεσία παραγωγής τους. Τα κρασιά που παράγονται στην Αυστραλία, τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και τη Γερμανία παραδοσιακά προσδιορίζονται κυρίως από την ποικιλία των σταφυλιών από τα οποία παρήχθησαν, ενώ τα κρασιά από τη Γαλλία, την Ισπανία, την Ιταλία και την Ελλάδα ονομάζονται συνήθως από τη γεωγραφική τους θέση.

Το χρώμα ενός κρασιού είναι ένα ακόμα σημαντικό χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται στην ταξινόμηση. Τα πιο κοινά είδη είναι τα λευκά, τα κόκκινα και τα ροζέ κρασιά. Η κοινή πεποίθηση ότι το χρώμα του σταφυλιού επηρεάζει το χρώμα του κρασιού είναι εσφαλμένη. Στην πραγματικότητα, οι χρωστικές στο σταφύλι βρίσκονται στα στερεά του τμήματα (στέμφυλα), επομένως το χρώμα του καρπού καθορίζει το χρώμα του κρασιού μόνο εάν τα στερεά μέρη του σταφυλιού εμπλέκονται στη διαδικασία ζύμωσης. Έτσι, το κόκκινο κρασί μπορεί να παραχθεί από ποικιλίες κόκκινου (ή μαύρου) σταφυλιού, εφόσον τα στερεά μέρη των σταφυλιών διαχωρίζονται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, αλλά τα λευκά κρασιά μπορούν να παρασκευαστούν από οποιαδήποτε ποικιλία, εφόσον τα στερεά μέρη του -τα σταφύλια- διαχωρίζονται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Τα ροζέ κρασιά παρασκευάζονται με τον ίδιο τρόπο όπως τα κόκκινα κρασιά, με την εξαίρεση ότι τα στερεά μέρη των σταφυλιών ζυμώνονται μόνο για σύντομο χρονικό διάστημα, συνήθως λιγότερο από μία ημέρα.

Το έτος τρύγου εξακολουθεί να χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των κρασιών (vintage). Συνήθως παρασκευάζονται με σταφύλια από συγκομιδή ενός έτους και παλαιώνονται ανάλογα. Υπάρχουν και άλλα εξειδικευμένα κρασιά, όπως ο αφρώδης οίνος, που περιλαμβάνουν διοξείδιο του άνθρακα («ανθρακικό») που δημιουργείται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Επειδή αυτή η μέθοδος είναι απαγορευμένη, δεν προστίθεται διοξείδιο του άνθρακα στο μπουκάλι εμφιάλωσης όπως συμβαίνει με τα αναψυκτικά. Για να παγιδευτεί το διοξείδιο του άνθρακα στη φιάλη, χρησιμοποιούνται πολλές διαδικασίες, όπως η εμφιάλωση του κρασιού πριν ολοκληρωθεί η ζύμωση ή η συνέχιση της ζύμωσης σε αεροστεγείς δεξαμενές. Η γαλλική σαμπάνια είναι ένα εξαιρετικό παράδειγμα αφρώδους οίνου.

Τα ξηρά, γλυκά και ημίγλυκα κρασιά αποτελεί ένα ακόμα είδος ταξινόμησης των κρασιών. Η γλυκύτητα του κρασιού μπορεί να εκτιμηθεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας συγκομιδής, αλλά στην πράξη, για τον προσδιορισμό της κατηγορίας χρησιμοποιείται η ποσότητα ζάχαρης που μένει στο κρασί μετά τη ζύμωση. Ως αποτέλεσμα, το ξηρό κρασί δεν έχει υπολειμματικά σάκχαρα (Johnson&Robinson, 2001).

### **3.4. Αντιοξειδωτική δράση οίνου**

Το κρασί, όπως αναφέρεται παραπάνω, παρασκευάζεται από τη ζύμωση γλεύκους σταφυλιών και έχει πολύπλοκη σύνθεση. Η σύνθεση του κρασιού επηρεάζεται κυρίως από την ποιότητα και την ποικιλία των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία οινοποίησης (Sohaibetal, 2017; Markoskietal, 2016). Εν συνεχεία, η ποικιλότητα και τα επίπεδα πολυφαινόλης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία σταφυλιών (λευκό ή κόκκινο) και τη γεωγραφική προέλευση (Lietal, 2009). Τα κόκκινα κρασιά, συγκεκριμένα, περιλαμβάνουν περίπου 500 συστατικά, η πλειονότητα των οποίων είναι νερό, αλκοόλ (αιθανόλη) και πολυφαινόλες (φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή) (Sohaibetal, 2017; Stockleyetal, 2012; Suprunetal, 2021). Έχει ήδη διαπιστωθεί ότι το κόκκινο κρασί περιέχει 10 φορές περισσότερες πολυφαινόλες από το λευκό κρασί, λόγω των διαφορών στις τεχνικές οινοποίησης (Sohaibetal, 2017; Markoskietal, 2016). Η μόνη σημαντική διαφορά μεταξύ ερυθρών και λευκών κρασιών είναι ο βαθμός εμπλουτισμού με πολυφαινόλες.

Οι χημικές ουσίες που προέρχονται από φυτά με αντιοξειδωτικές ικανότητες περιλαμβάνουν φλαβονοειδή όπως φλαβόνες, φλαβανό-3-όλες, φλαβονόλες, ανθοκυανίνες και τανίνες (Grzegorzczak-Karolak et al., 2020). Αυτές αποτελούν περίπου το 85% των φαινολικών συστατικών των ερυθρών κρασιών, δίνοντάς τους το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα και τη γεύση τους, ενώ συνδέονται επίσης με ποικίλα οφέλη για την υγεία, συμπεριλαμβανομένης της καρδιαγγειακής προστασίας (Sohaib et al., 2017; Castaldo et al., 2019). Τα μη φλαβονοειδή, όπως τα στιλβένια, τα βενζοϊκά οξέα και τα κινναμωμικά οξέα, συμβάλλουν στα πιθανά βιοενεργά χαρακτηριστικά του κρασιού, ωστόσο αυτό είναι ακόμα προς συζήτηση (Castaldo et al., 2019). Από την άλλη, η ρεσβερατρόλη, ένα μη φλαβονοειδές μόριο που βρίσκεται κυρίως στα κόκκινα κρασιά, και τα παράγωγά της, όπως η γλυκοσίδη (Du et al., 2013) και τα ολιγομερή (Xue et al., 2014; Li et al., 2015), έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντική χημειοπροστατευτική δράση (Markoski et al., 2016; Kaure et al., 2009; Chikara et al., 2018; Kalliora et al., 2019) λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και κυτταροπροστατευτικών ιδιοτήτων της.

Οι Zurine et al. τονίζουν τις αντιοξειδωτικές, καρδιοπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιγηραντικές και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες των βιοδραστικών φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στα σταφύλια και τα κρασιά, καθώς και την ικανότητά τους να αντιμετωπίζουν τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 2 (Rasines-Perea & Teissedre, 2017). Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες της ρεσβερατρόλης και των πολυφαινολών που βρίσκονται στο κρασί έχουν συνδεθεί με ταυτόχρονες αυξήσεις στα αντιοξειδωτικά ένζυμα και μειωμένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου σε μοριακό επίπεδο (Chikara et al., 2018; Xia et al., 2017; Moore et al., 2018). Σε κλινικό επίπεδο, το «The French Paradox», μια έννοια που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στη Γαλλία τη δεκαετία του 1980, υποστήριξε ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοολούχων ποτών, ιδιαίτερα του κρασιού, θα μπορούσε να έχει προστατευτικές επιδράσεις έναντι καρδιαγγειακών παθήσεων (Castaldo et al., 2019; Biagi & Bertelli, 2015; Ferrière, 2004). Άλλες μελέτες έχουν συνδέσει την κατανάλωση κρασιού με την πρόληψη χρόνιων νευρολογικών διαταραχών (Αλτσχάιμερ και νόσο του Πάρκινσον), του διαβήτη και της γήρανσης, καθώς και με την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω των βιταμινών K, A και C (Vislocky & Fernandez, 2010; Fernandes et al., 2017).

## 4. Μύρα

### 4.1. Ιστορία μύρας

Η μύρα, όπως και το κρασί, έχει μια πλούσια ιστορία που ποτέ δεν θα μπορέσουμε να κατανοήσουμε πλήρως. Το πρώτο τεκμηριωμένο υπόλειμμα μύρας κριθαριού ανακαλύφθηκε σε ένα βάζο στην περιοχή ανασκαφής Γκοντίν Τεπέ στο σύγχρονο Ιράν, πιθανώς από τότε που κάποιος το ήπια για τελευταία φορά γύρω στο 3400 π.Χ. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι η πρώτη μύρα είχε εμφανιστεί χιλιετίες πριν από αυτό (Franz&Meussdoerffer, 2009).

Ενώ η ακριβής ημερομηνία ανακάλυψης της μύρας είναι άγνωστη, είναι γνωστό ότι η μύρα, όπως και το ψωμί, ευδοκίμοι σε αγροτικές κοινότητες με άφθονο σιτάρι και χρόνο για ζύμωση. Ένα πράγμα είναι βέβαιο: στον αρχαίο άνθρωπο άρεσε η μύρα όπως και σε εμάς: οι Βαβυλώνιοι είχαν περίπου 20 συνταγές μύρας, οι Αιγύπτιοι Φαραώ θάβονταν με τις δεξαμενές της και ακόμη και οι εργάτες που έχτισαν τις πυραμίδες πληρώνονταν πολλές φορές με μύρα. Μία από τις παλαιότερες γνωστές συνταγές μύρας προέρχεται από ένα ποίημα, ένα αφιέρωμα 3800 ετών που βρέθηκε χαραγμένο σε πήλινη πλάκα. Ο «Ύμνος στον Νινκάσι», ο οποίος ανακαλύφθηκε στο αρχαίο Σουμέρ (σημερινό Ιράκ), τιμά τη Σουμεριανή θεά της μύρας, ενώ περιγράφει επίσης τα βήματα παρασκευής (Η κάβα φιλτραρίσματος, που κάνει έναν ευχάριστο ήχο/ Τοποθετείτε κατάλληλα σε ένα μεγάλο κάδο συλλογής)(Franz&Meussdoerffer, 2009).

Όποια και αν είναι η προέλευσή της, η μύρα γρήγορα καθιερώθηκε ως ένα από τα πιο δημοφιλή -και ασφαλέστερα- ποτά του πολιτισμού. Το νερό δεν ήταν πάντα ασφαλές για κατανάλωση για τις περισσότερες κοινωνίες στο παρελθόν, επομένως τα αλκοολούχα ποτά όπως η μύρα (επίσης καθαρισμένη με θερμότητα) θα ήταν προτιμότερα. Φυσικά, όσο βελτιώνονταν οι τεχνικές παρασκευής, τόσο βελτιωνόταν και η εμφάνιση της μύρας. Οι Βαβυλώνιοι έπιναν την μύρα τους με καλαμάκι γιατί ήταν πιο πηχτή και πιο κοκκώδης. Ωστόσο, μέχρι τον 16ο αιώνα, ο γερμανικός κανονισμός για την καθαρότητα της μύρας "Reinheitsgebot" είχε ουσιαστικά εξαλείψει όλα τα υλικά ζυθοποιίας εκτός από νερό, λυκίσκο και κριθάρι (η μαγιάπροστέθηκε ξανά στη λίστα μερικούς αιώνες αργότερα)(Franz&Meussdoerffer, 2009).

Ακόμη και ο λυκίσκος δεν ήταν πάντα τόσο συνηθισμένος όσο είναι τώρα. Άγρια βότανα, χουρμάδες, ελαιόλαδο και λιβάδι είχαν χρησιμοποιηθεί για να σταθεροποιήσουν την αρχαία αιγυπτιακή μύρα. Για αιώνες, το σιρόπι, ένας συνδυασμός βοτάνων και μπαχαρικών, χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή μύρας σε όλη την Ευρώπη. Ο λυκίσκος χρησιμοποιήθηκε τακτικά στην μύρα μόνο μετά την αλλαγή της πρώτης χιλιετίας μ.Χ., με τη Γερμανία να εξάγει λυκίσκο για ζυθοποιία τον 13ο αιώνα (Franz&Meussdoerffer, 2009).

Η δημοτικότητα της μύρας αυξήθηκε και μειώθηκε κατά τη διάρκεια των αιώνων. Η απαγόρευση οδήγησε σε σπάνια κατανάλωση μύρας από τους Αμερικανούς, με αποτέλεσμα οι μύρες εκεί να έχουν διατηρήσει μέχρι σήμερα έναν πιο ήπιο γευστικό χαρακτήρα, ιδιαίτερα μεταξύ των μύρων που κυκλοφορούν μαζικά, λόγω του ότι ο πληθυσμός δεν έχει συνηθίσει σε πιο βαριές ποικιλίες. Ωστόσο, η χειροποίητη μύρα έχει κάνει σημαντικές εισβολές στην αγορά, με αποτέλεσμα να υπάρχει μια πρωτόγνωρη γκάμα ποικιλιών. Οι βιοτεχνίες ζυθοποιίας αναβιώνουν ακόμη και αρχαίες συνταγές: το 1990, ο Fritz Maytag του Anchor Steam έφτιαξε μια μύρα με βάση τη συνταγή του ποιήματος Ninkasi και η σειρά Dogfish Head's Ancient Ales περιλαμβάνει μύρες όπως "Ta Henket" ή αιγυπτιακή μύρα ψωμιού (Franz&Meussdoerffer, 2009).

## **4.2. Ζυθοποίηση**

Ζυθοποίησης ονομάζεται η διαδικασία παρασκευής μύρας. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί ζεστό νερό για την εξαγωγή φυσικών ζυμώσιμων σακχάρων από βυνοποιημένο κριθάρι (ή άλλους κόκκους). Η βυνοποίηση, η παρασκευή, η ωρίμανση, η ζύμωση, η διήθηση και η συσκευασία είναι οι έξι βασικές φάσεις της ζυθοποίησης (Pires&Brányik, 2015).

Η βυνοποίηση είναι το αρχικό στάδιο της παραγωγής μύρας και συνεπάγεται τη βλάστηση του κριθαριού για περίπου 5 ημέρες προκειμένου να δημιουργηθούν τα ένζυμα που απαιτούνται για το επόμενο στάδιο της ζυθοποιίας και να σπάσουν τα φυσικά τοιχώματα των κόκκων του αμύλου για να διευκολυνθεί η μετέπειτα επεξεργασία. Η διαβροχή, η βλάστηση και το ψήσιμο είναι οι τρεις διαδικασίες της βυνοποίησης (Pires&Brányik, 2015).



Η ζυθοποιία είναι το επόμενο βήμα της διαδικασίας, το οποίο υποδιαιρείται σε διάφορα στάδια: άλεση, ανάμειξη, φιλτράρισμα γλεύκους, βράσιμο και επεξεργασία του γλεύκους. Ένας μύλος χρησιμοποιείται για την άλεση της βύνης και ύστερα το αλεσμένο προϊόν βυθίζεται σε ζεστό νερό για να μετατραπεί το άμυλο σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Μετά από αυτό, το γλεύκος (που μπορεί να παρομοιαστεί με τον μούστο που παράγεται κατά την οινοποίηση) χωρίζεται από τις φλούδες, προστίθεται λυκίσκος και υπόκειται σε βρασμό. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας απελευθερώνονται τα αιθέρια έλαια λυκίσκου, τα οποία είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό άρωμα της μύρας, καθώς και ρητίνες και άλλα συστατικά που δίνουν στην μύρα την χαρακτηριστική της πικράδα, ενώ λειτουργούν και ως φυσικά συντηρητικά. Τέλος, γίνεται επεξεργασία του μούστου, η οποία περιλαμβάνει περιδίνηση για απομάκρυνση πρωτεϊνών, ψύξη, αερισμό και εμβολιασμό μαγιάς (Pires&Brányik, 2015).

Η προστιθέμενη μαγιά ζυμώνει τους υδατάνθρακες σε αλκοόλ, διοξείδιο του άνθρακα και άλλες χημικές ουσίες, οι οποίες δίνουν στην μύρα τη χαρακτηριστική γεύση και οσμή της (Pires&Brányik, 2015).

Αφού τελειώσει η ζύμωση, η μύρα αφήνεται να ωριμάσει. Η ζύμωση των σακχάρων που δεν είχαν υποστεί ζύμωση στο προηγούμενο βήμα ολοκληρώνεται σε αυτό το στάδιο, όπως και ο κορεσμός της μύρας με διοξείδιο του άνθρακα, η ανάπτυξη χημικών ουσιών που συμβάλλουν στις οργανοληπτικές ιδιότητες της μύρας και η έναρξη της διαδικασίας διαύγειας (Pires&Brányik, 2015).

Το επόμενο στάδιο, η διήθηση, ολοκληρώνει τη διαύγεια αφαιρώντας τη μαγιά και τις πρωτεΐνες που έχουν απομείνει. Αξίζει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι ορισμένες μύρες δεν φιλτράρονται (για παράδειγμα, η Weiss) και ως αποτέλεσμα, έχουν μια ευδιάκριτη θολότητα, καθώς η μαγιά και οι πρωτεΐνες που δεν έχουν αφαιρεθεί αιωρούνται στο διάλυμα (Pires&Brányik, 2015).

Η συσκευασία είναι το τελευταίο βήμα στη διαδικασία παρασκευής (εμφιάλωση). Επειδή το οξυγόνο μπορεί να βλάψει την μύρα, η εμφιάλωση γίνεται με ανθρακικό. Για να επιτευχθεί αυτό, το μπουκάλι αδειάζεται πρώτα από τον αέρα, στη συνέχεια γεμίζεται με ανθρακικό και τέλος με την παρασκευασμένη μύρα. Η παστερίωση ή η διήθηση αποστείρωσης χρησιμοποιείται ευρέως για την παράταση της διάρκειας ζωής της μύρας (Pires&Brányik, 2015).

### 4.3. Ονοματολογία και ταξινόμηση

Η μύρα ταξινομείται με βάση μια ποικιλία μεταβλητών, όπως ο τύπος των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται, η μαγιά που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της, η συγκέντρωση αλκοόλης, το χρώμα και οι θερμίδες.

Τα παραδοσιακά συστατικά της μύρας είναι η βύνη κριθαριού, ο λυκίσκος, η μαγιά και το νερό. Σε άλλες συνθήκες, όμως, ένα μέρος της βύνης κριθαριού αντικαθίσταται με άλλο βασικό υλικό. Προϋπόθεση για αυτό είναι η παρουσία αμύλου ή σακχάρων στην πρώτη ύλη. Ως αποτέλεσμα, στην παρασκευή διαφόρων μυρών έχουν χρησιμοποιηθεί ρύζι, ζάχαρη, καλαμπόκι, σιτάρι και άλλα συστατικά (Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών).

Υπάρχει ένας «νόμος για την καθαρότητα της μύρας» (Reinheitsgebot) στη Γερμανία που δηλώνει ότι οι μύρες lager μπορούν να παρασκευαστούν μόνο με βύνη από κριθάρι, λυκίσκο, νερό και μαγιά. Ο Ιούλιος Δ', Δούκας της Βαυαρίας, δημιούργησε αυτόν τον νόμο στο Ίνγκολσταντ της Βαυαρίας το 1516. Αυτός ο κανονισμός ίσχυε και στην Ελλάδα μέχρι πρόσφατα, όταν αναθεωρήθηκε με βάση τους ευρωπαϊκούς νόμους, και τώρα αναφέρεται ότι εναλλακτικές πηγές αμύλου και ζάχαρης, όπως ζάχαρη, σιρόπι μαλτόζης, σιρόπι γλυκόζης και βύνη σιταριού, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για τη δημιουργία μύρας. Άλλα συστατικά, όπως φρούτα, προστίθενται επίσης σε επιλεγμένα προϊόντα, προκειμένου να δώσουν στην παραγόμενη μύρα διακριτική οσμή και γεύση (Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών).

Σύμφωνα με αυτήν την ταξινόμηση, οι μύρες που παρασκευάζονται κυρίως από βύνη σίτου χαρακτηρίζονται στα ελληνικά ως σταρένιες και διεθνώς ως μύρες Wheat/Weizenbier, Weißbier ή λευκές. Το Hefe-Weizen, που σημαίνει αφιλτράριστη μύρα σίτου και περιέχει ίζημα μαγιάς, είναι ένας υποτύπος αυτών (Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών).

Οι μύρες Lager, οι μύρες Ale και οι μύρες Lambic είναι οι τρεις βασικοί τύποι μύρας με βάση τη μαγιά που χρησιμοποιείται. Οι μύρες ταξινομούνται σε αυτές τις κατηγορίες με βάση το είδος της ζύμης ή της μαγιάς που χρησιμοποιείται, και κυρίως τις ζύμες που χρησιμοποιούνται στη δημιουργία τους. Το είδος Lager είναι το πιο ευρέως καταναλωμένο. Επειδή η μαγιά που χρησιμοποιείται σε αυτή την ποικιλία έχει το χαρακτηριστικό να βυθίζεται στον πυθμένα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης,

αναφέρεται ως βυθοζύμωτημπύραή μύραβυθοζύμης στα ελληνικά. Η ζύμωση αυτών των μύρας λαμβάνει χώρα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, συνήθως μεταξύ 6-12°C, και η διαδικασία ωρίμανσης μετά τη ζύμωση διαρκεί περισσότερο. Ως αποτέλεσμα, η μύρα που τελικά παρασκευάζεται αποθηκεύεται σε αποθήκες, από το οποίο προέκυψε και ο όρος“lager”, που σημαίνει αποθήκη στα γερμανικά. Οι μύρες Ale είναι ένας άλλος τύπος μύρας στην οποία η μαγιά που χρησιμοποιείται για ζύμωση έχει την ικανότητα να ανέρχεται στην επιφάνεια μόλις ολοκληρωθεί η ζύμωση. Είναι επίσης γνωστή ως αφροζύμωτη μύρα ή μύρα αφροζύμηστα ελληνικά. Αυτό το είδος μύρας ζυμώνεται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες 15-20°C, και η περίοδοςμετά τη ζύμωση είναι σύντομη. Σε αυτές τις θερμοκρασίες, η μαγιά παράγει μια σημαντική ποσότητα εστέρων και άλλων παραπροϊόντων και έτσι αυτές οι μύρες μπορεί να έχουν φρουτώδη αρώματα και γεύσεις, όπως μήλο, αγλάδι, ανανάς, μπανάνα και δαμάσκηνο. Τέλος, οι μύρες που παρασκευάζονται με φυσική ζύμωση, δηλαδή οι μπίρες που ζυμώνονται σε ανοιχτά δοχεία με τη βοήθεια άγριων ζυμών και χωρίς προσθήκη μαγιάς, ταξινομούνται στην κατηγορίαLambic. Οι μύρες αυτής της κατηγορίαςπροσομοιάζουνπερισσότεροτις μύρες της κατηγορίαςAles. Οι μπίρες Lambic είναι βελγικές μύρες που ζυμώνονται φυσικά από άγριες ζύμες και όχι από μαγιές που παρέχονται εξωτερικά, όπως συμβαίνει με τις άλλες ποικιλίες, με αποτέλεσμα ένα ξεχωριστό άρωμα και γεύση. Στις μύρες Lambic περιέχουν ζυμομύκητες όπως οι *Brettanomycesbruxellensis* και *Brettanomyceslambicus*, καθώς και μικροοργανισμοί όπως οι γαλακτοβάκιλλοι, οι οποίοι δημιουργούν οξέα και προσδίδουν στη μύρα τη χαρακτηριστική όξινη γεύση της (Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών).

Ένας άλλος τρόπος ταξινόμησης της μύρας είναι η περιεκτικότητά της σε αλκοόλ. Βάσει αυτής της ταξινόμησης, η μύρα μπορεί να χαρακτηριστεί ως δυνατή (περιεκτικότητα σε αλκοόλ 8%), μέτρια (περιεκτικότητα σε αλκοόλ 3,5-7%), ελαφριά (περιεκτικότητα σε αλκοόλ 1,5-3,5%) ή χαμηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλ (περιεκτικότητα σε αλκοόλ 0,7-1,5%). Τα τελευταία χρόνια, οι λεγόμενες «μη αλκοολούχες μύρες», οι οποίες περιέχουν λιγότερο από 0,7%, έχουν γίνει επίσης δημοφιλείς (Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών).

Οι μύρες, όπως και το κρασί, μπορούν να ταξινομηθούν βάσει του χρώματος, ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να αναγνωρίσει ο καθένας. Το χρώμα καθορίζεται από τη βύνη που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη. Η μύρα διατίθεται σε διάφορα χρώματα,

όπως ανοιχτό ξανθό, χρυσό, χάλκινο, κόκκινο, καφέ και κεχριμπαρένιο. Το τελικό χρώμα καθορίζεται συνδυάζοντας κατάλληλα μείγματα βύνης (Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών).

Τέλος, οι μύρες μπορούν να χωριστούν σε κατηγορίες με βάση την περιεκτικότητά τους σε θερμίδες. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει μια κατηγορία που ονομάζεται Lightbeers, οι οποίες έχουν 30-40% περισσότερες θερμίδες από τις κανονικές μύρες (Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών).

#### **4.4. Αντιοξειδωτική δράση μύρας**

Η μύρα τα τελευταία χρόνια έχει ξεπεράσει το κρασί ως το πιο δημοφιλές αλκοολούχο ποτό στην Ευρώπη, αντιπροσωπεύοντας το 40% του συνόλου των αλκοολούχων ποτών που καταναλώνονται (World Health Organization, 2018). Η μύρα είναι ένα αλκοολούχο ποτό που έχει υποστεί ζύμωση και έτσι περιέχει φαινολικές χημικές ουσίες που είναι ειδικές για αυτήν. Οι φαινολικές χημικές ουσίες στην μύρα προέρχονται από τον λυκίσκο (30%), τη βύνη κριθαριού (70%) και τους χημικούς μετασχηματισμούς που πραγματοποιούν αυτές οι ενώσεις κατά τη διαδικασία παρασκευής (Jerkonice et al., 2005). Οι αλλαγές στο είδος και το ποσοστό κάθε συστατικού επηρεάζουν το περιεχόμενο φαινολών, το οποίο καθορίζει τις ποιοτικές παραμέτρους της προκύπτουσας μύρας (για παράδειγμα, γεύση, σταθερότητα γεύσης, χρώμα και διαύγεια) και οδηγεί σε ποικίλα τύπων (Wannenmacher et al., 2018). Η μύρα έχει ελαφρώς μεγαλύτερη ολική συγκέντρωση φαινολών από το λευκό κρασί και ελαφρώς χαμηλότερη ολική περιεκτικότητα σε φαινολικά από το κόκκινο κρασί (Neveu et al., 2010), ωστόσο αυτό ποικίλλει ανάλογα με την πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται και τις συνθήκες της διαδικασίας παρασκευής (Wannenmacher et al., 2018). Ταυτόχρονα, έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλ από άλλα δημοφιλή αλκοολούχα ποτά. Ως αποτέλεσμα της χαμηλής συγκέντρωσης αλκοόλ και της φαινολικής της σύστασης, η μύρα μπορεί να είναι μια πιθανή πηγή ευεργετικών επιπτώσεων στην υγεία, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις αρνητικές συνέπειες της πρόσληψης αλκοόλ (Boronat et al., 2020).

Τα φαινολικά οξέα, τα πρενυλιωμένα φλαβονοειδή και τα α- και ισο-α-οξέα είναι τα πιο συχνά φαινολικά συστατικά της μύρας και έχει μελετηθεί η πιθανή βιολογική τους δράση. Αυτά τα φαινολικά μόρια έχουν συνδεθεί με βιολογικές δραστηριότητες

όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιδιαβητικές και οιστρογονικές επιδράσεις (Osorio-Pazetal, 2019). Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ωστόσο, η μπίρα μπορεί να είναι πηγή χημικών ουσιών με πιθανές επιβλαβείς και προκαρκινογόνες ιδιότητες, όπως ενώσεις καρβονυλίου και παράγωγα φουρανίου(Hernandesetal, 2019).

Τα στοιχεία υποστηρίζουν μια συσχέτιση καμπύλης σχήματος J μεταξύ της πρόσληψης αλκοόλ και της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνησιμότητας, υπονοώντας ότι όσοι καταναλώνουν μέτρια ποσότητα μπίρας διατρέχουν χαμηλότερο κίνδυνο από εκείνους που απέχουν από την κατανάλωσή της ή καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες αλκοόλ (Polietal, 2013). Άλλες μελέτες διαπίστωσαν ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοολούχων ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση και περιέχουν φαινολικές χημικές ουσίες, όπως το κρασί ή η μπίρα, παρέχει καρδιαγγειακή προστασία. Παρόλα αυτά, η προστατευτική επίδραση της μέτριας χρήσης αλκοόλ δεν παρατηρήθηκε (Costanzoetal, 2011;de Gaetanoetal, 2016). Η χαμηλή έως μέτρια κατανάλωση μπίρας (έως ένα ποτό την ημέρα για τις γυναίκες και δύο ποτά την ημέρα για τους άνδρες) μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και δεν έχει αρνητικές επιπτώσεις σε μείζονες χρόνιες ασθένειες (Costanzoetal, 2011;de Gaetanoetal, 2016). Οι ευνοϊκές επιπτώσεις της μπίρας στην υγεία πιστεύεται ότι οφείλονται σε μια αθροιστική επίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης αλκοόλης και των φαινολικών χημικών ουσιών στην μπίρα (Chiva-Blanchetal, 2013).

## 5. Πειραματικό μέρος

### 5.1. Υλικά

Στις πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζύλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) (Sigma, D9132-1G)  
2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ [(2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid), ABTS]
- Διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% w/v)
- Methanol ME03362500 (D9132-1G)
- HRP (Sigma, 125K7415)

Η φασματοφωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στο φασματοφωτόμετρο UV-1600PC της εταιρείας VWR. Ακόμα, για τις πειραματικές διαδικασίες έγινε χρήση πιπετών Gilson, τυχωρητικότητας 200 μκαι 1000 μκαι falcon χωρητικότητας 15ml και 50 ml.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναλύθηκαν 24 δείγματα μύρας και 24 δείγματα οίνου που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2:

Πίνακας 2: Ποικιλίες οίνου και κρασιού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (Με **μπορντό** γράμματα σημειώνονται οι ερυθροί οίνοι, με μαύρα οι λευκοί και με **μωβ** οι ροζέ).

Οίνοι	Μπύρες
Δείγμα 1	Δείγμα 1
Δείγμα 2	Δείγμα 2
<b>Δείγμα 3</b>	Δείγμα 3
<b>Δείγμα 4</b>	Δείγμα 4
<b>Δείγμα 5</b>	Δείγμα 5
<b>Δείγμα 6</b>	Δείγμα 6
Δείγμα 7	Δείγμα 7
Δείγμα 8	Δείγμα 8
Δείγμα 9	Δείγμα 9
Δείγμα 10	Δείγμα 10
<b>Δείγμα 11</b>	Δείγμα 11
<b>Δείγμα 12</b>	Δείγμα 12
Δείγμα 13	Δείγμα 13
Δείγμα 14	Δείγμα 14
<b>Δείγμα 15</b>	Δείγμα 15

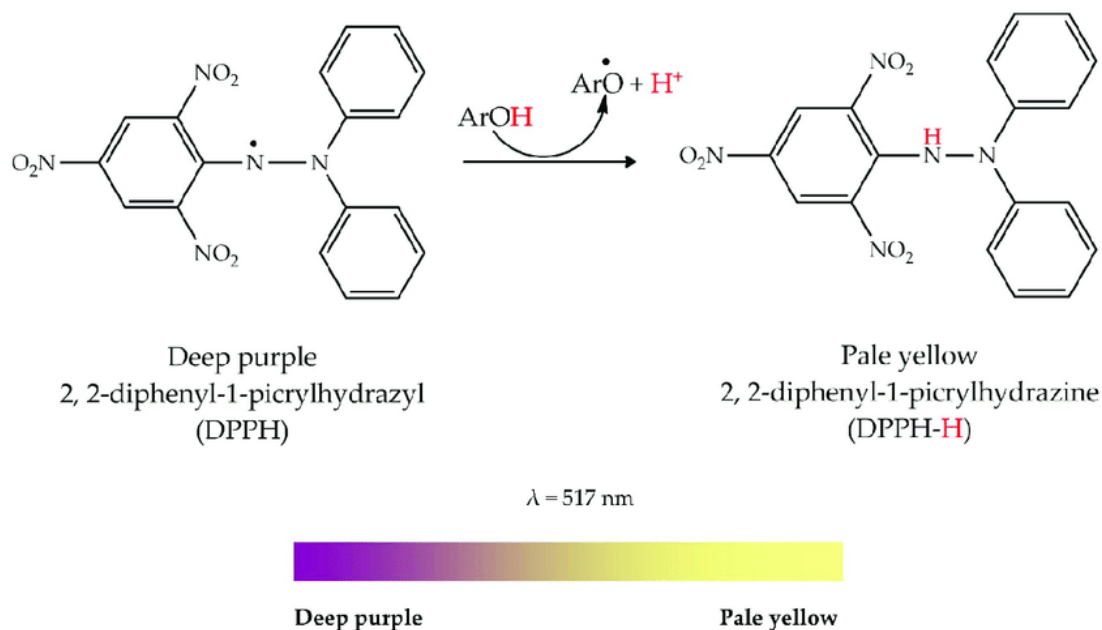
Δείγμα 16	Δείγμα 16
Δείγμα 17	Δείγμα 17
Δείγμα 18	Δείγμα 18
Δείγμα 19	Δείγμα 19
Δείγμα 20	Δείγμα 20
Δείγμα 21	Δείγμα 21
Δείγμα 22	Δείγμα 22
Δείγμα 23	Δείγμα 23
Δείγμα 24	Δείγμα 24

## 5.2. Μέθοδοι

### 5.2.1. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της τεχνικής DPPH'

Ο πρώτος που χρησιμοποίησε τη μέθοδο δέσμευσης σταθερής ρίζας DPPH' για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ήταν ο Brand-Williams και οι συνεργάτες του (Brand-Williams et al., 1995). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής είναι μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο κοινές και απλές μεθόδους για τον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού δυναμικού αντιοξειδωτικών μορίων ή εκχυλισμάτων πλούσιων σε αντιοξειδωτικές χημικές ουσίες. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιείται αλληλεπίδραση των υπό δοκιμή ενώσεων με τη σταθερή οργανική ρίζα αζώτου DPPH'. Η ρίζα αυτή έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm (Prior et al., 2005). Όταν ένα υλικό με αντιοξειδωτική δράση προστίθεται σε ένα ριζικό διάλυμα, το DPPH' ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H, που έχει κίτρινο χρώμα και χαμηλότερη οπτική απορρόφηση (Εικόνα 9)).

Για την παρασκευή του stock διαλύματος DPPH' 2mM, σε ποτήρι ζέσεως γίνεται προσθήκη 25,4 ml μεθανόλης και 20mg DPPH'. Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο για αυτό και φυλάσσεται καλυμμένο σε αλουμινόχαρτο. Η διατήρηση του διαλύματος γίνεται στους 4°C για έως και 3 ημέρες. Η ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας γίνεται σε αντίδραση σε Eppendorf χωρητικότητας 1,5ml σε τελικό όγκο 1 ml, όπου περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης), 100 μM ρίζας DPPH• και το δείγμα προς ανάλυση σε αυξανόμενες αναλογίες. Οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.



Εικόνα 9: Ο μηχανισμός αντίδρασης του  $\text{DPPH}^\bullet$  (BibiSadeeretal, 2020).

Πίνακας 3: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της τεχνικής  $\text{DPPH}^\bullet$ .

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
<b>Δείγμα</b>	-	-	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
<b>Μεθανόλη</b>	1000 $\mu\text{l}$	950 $\mu\text{l}$	900 $\mu\text{l}$	900 $\mu\text{l}$	900 $\mu\text{l}$	900 $\mu\text{l}$	900 $\mu\text{l}$
<b><math>\text{DPPH}^\bullet</math></b>	-	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
<b><math>V_{\text{τελ}}</math></b>	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης, τα δείγματα ανακινούνται και αφήνονται προς επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Ως έλεγχος σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μεθανόλης και  $\text{DPPH}^\bullet$  100 M. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γινόταν με 1 ml μεθανόλης. Επιπλέον, έγινε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης κάθε δείγματος στα 517 nm για να επιβεβαιωθεί ότι το δείγμα δεν απορροφά σε αυτό το μήκος κύματος, άρα δεν επηρεάζει τη μέτρηση που γίνεται (Πίνακας 4). Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα όπου έγιναν τουλάχιστον τρεις μετρήσεις.



Πίνακας 4: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη.

	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>
<b>Δείγμα</b>	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
<b>Μεθανόλη</b>	950 μl	950 μl	950 μl	950 μl	950 μl
<b>V<sub>τελ</sub></b>	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος υπολογίζεται ως η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH<sup>•</sup> η οποία υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_s) / A_0 * 100$$

όπου, A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517 nm και A<sub>s</sub>: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm.

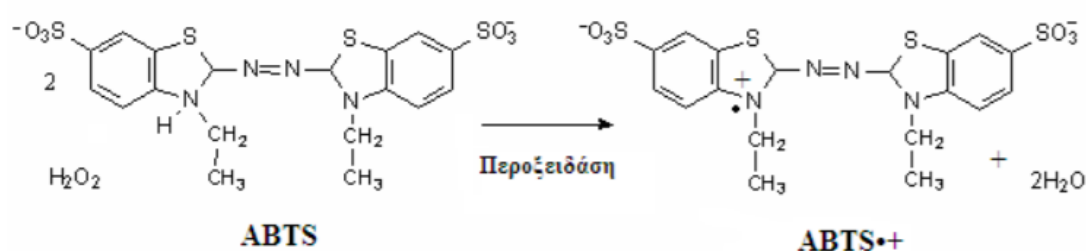
### 5.2.2. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της τεχνικής ABTS<sup>•+</sup>

Η μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας με βάση την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup> (κατιόν) αναπτύχθηκε από τον Miller και τους συνεργάτες του (Miller et al., 1993). Η αντίδραση προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup> προσομοιάζει αυτή της μεθόδου όπου χρησιμοποιείται ρίζα DPPH<sup>•</sup>, η οποία μπορεί να απενεργοποιηθεί με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου ή ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005). Ωστόσο, επειδή η ρίζα ABTS<sup>•+</sup> δεν είναι σταθερή όπως η ρίζα DPPH<sup>•</sup>, η ρίζα ABTS<sup>•+</sup> δημιουργείται μέσω οξείδωσης του ABTS. Έτσι, για να εκτιμήσουμε το αντιοξειδωτικό δυναμικό μιας ουσίας, αρχικά δημιουργούμε τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup> και στη συνέχεια προσθέτουμε την προς εξέταση ουσία. Ωστόσο, στη διαδικασία αυτή εμπεριέχεται ο κίνδυνος αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών με τις οξειδωτικές χημικές ουσίες που απαιτούνται για την οξείδωση του ABTS, και για την αποφυγή αυτού του αντιοξειδωτικού προστίθεται αφού παραχθεί η ρίζα ABTS<sup>•+</sup>.

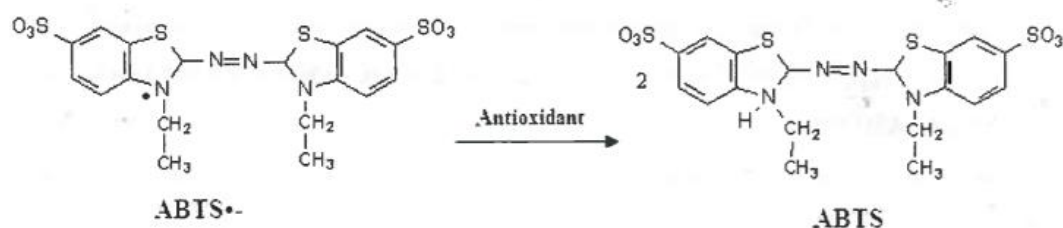
Για την οξείδωση του ABTS χρησιμοποιούνται χημικές αντιδράσεις με διάφορα αντιδραστήρια ή ένζυμα όπως οι υπεροξειδάσες (Arnao et al., 2001). Από τη στιγμή

που παράγεται, η ρίζα  $ABTS^{•+}$  είναι σταθερή, έχει πράσινη απόχρωση και απορροφάται στα 730 nm. Όταν μια αντιοξειδωτική ουσία προστίθεται στο διάλυμα της αντίδρασης, η ρίζα  $ABTS^{•+}$  ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου), με αποτέλεσμα χαμηλότερη οπτική απορρόφηση.

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, η οξείδωση ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυματικά παρουσία  $H_2O_2$  με την περοξειδάση HRP (Εικόνα 10). Η αντίδραση της ρίζας  $ABTS^{•+}$  με το υπό εξέταση δείγμα παρουσιάζεται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 10: Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικού ( $ABTS^{•+}$ ) μέσω της δράσης της περοξειδάσης.



Εικόνα 11: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικής ουσίας με τη ρίζα του  $ABTS^{•+}$ .

Στη συνέχεια περιγράφεται ο τρόπος παρασκευής καθενός από τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο αυτή.

- **ABTS:** Η επιθυμητή συγκέντρωση ABTS στο τελικό διάλυμα είναι 1 mM. Καθότι σε τελικό όγκο 1 ml προστίθενται 500 μl διαλύματος ABTS, παρασκευάζεται stock διάλυμα συγκέντρωσης 2 mM. Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος ζυγίζονται 10,97 mg ABTS και συμπληρώνεται  $H_2O$  μέχρι

τελικό όγκο 10 ml. Επειδή το διάλυμα είναι ευαίσθητο παρασκευάζεται την ημέρα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, καλύπτεται με αλουμινόχαρτο λόγω φωτοευαισθησίας και διατηρείται στον πάγο.

- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Στο τελικό διάλυμα αντίδρασης προστίθενται 50 μl διαλύματος H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, η επιθυμητή συγκέντρωση του οποίου είναι 30 μM. Έτσι, το stock διάλυμα παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 600 μM. Για το διάλυμα αυτό γίνεται αραιώση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 8.8 M σε H<sub>2</sub>O προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση. Επειδή το διάλυμα είναι ευαίσθητο λίγο πριν χρησιμοποιηθεί, καλύπτεται με αλουμινόχαρτο λόγω φωτοευαισθησίας και διατηρείται στον πάγο.
- **HRP:** Το stock διάλυμα παρασκευάζεται με αραιώση 1 mg ενζύμου HRP σε 10 ml αποστειρωμένο νερό. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στους 4°C για έως και 2 μήνες ή στους -80°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Για την αντίδραση χρησιμοποιείται διάλυμα αραιώσης 1/20 σε H<sub>2</sub>O. Επειδή το διάλυμα είναι ευαίσθητο παρασκευάζεται την ημέρα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, καλύπτεται με αλουμινόχαρτο λόγω φωτοευαισθησίας και διατηρείται στον πάγο. Από το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται καμπύλη με διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου.

Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε Eppendorf χωρητικότητας 1,5 ml σε τελικό όγκο 1 ml. Αρχικά γίνεται η αντίδραση παρασκευής της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>, όπου προστίθενται ABTS 1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 μM και HRP 6 μM (Πίνακας 5). Τα διαλύματα αναδεύονται και στη συνέχεια επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Μετά την παρασκευή της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>, σε κάθε διάλυμα αντίδρασης προστίθεται το υπό εξέταση δείγμα σε διάφορες συγκεντρώσεις, γίνεται ανάδευση και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm.

Πίνακας 5: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων.

	<b>Τυφλό</b>	<b>Control</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	450 μl	400 μl	400 μl	400 μl	400 μl
<b>ABTS</b>	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
<b>HRP</b>	-	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
<b>V<sub>τελ</sub></b>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
<b>Δείγμα</b>	-	-	50 µl	50 µl	50 µl

Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γινόταν με ABTS 1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 µM και H<sub>2</sub>O (Τυφλό). Επιπλέον, έγινε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης κάθε δείγματος στα 730nm για να επιβεβαιωθεί ότι το δείγμα δεν απορροφά σε αυτό το μήκος κύματος, άρα δεν επηρεάζει τη μέτρηση που γίνεται (Πίνακας 6). Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα όπου έγιναν τουλάχιστον τρεις μετρήσεις.

Πίνακας 6: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης στα 730 nm.

	<b>Τυφλό</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	450 µl	450 µl	450 µl	450 µl
<b>ABTS</b>	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
<b>V<sub>τελ</sub></b>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
<b>Δείγμα</b>	-	50 µl	50 µl	50 µl

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος υπολογίζεται ως η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> οποία υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_\delta) / A_0 * 100$$

όπου, A<sub>0</sub>: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730nm και A<sub>δ</sub>: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730nm.

## 6. Αποτελέσματα

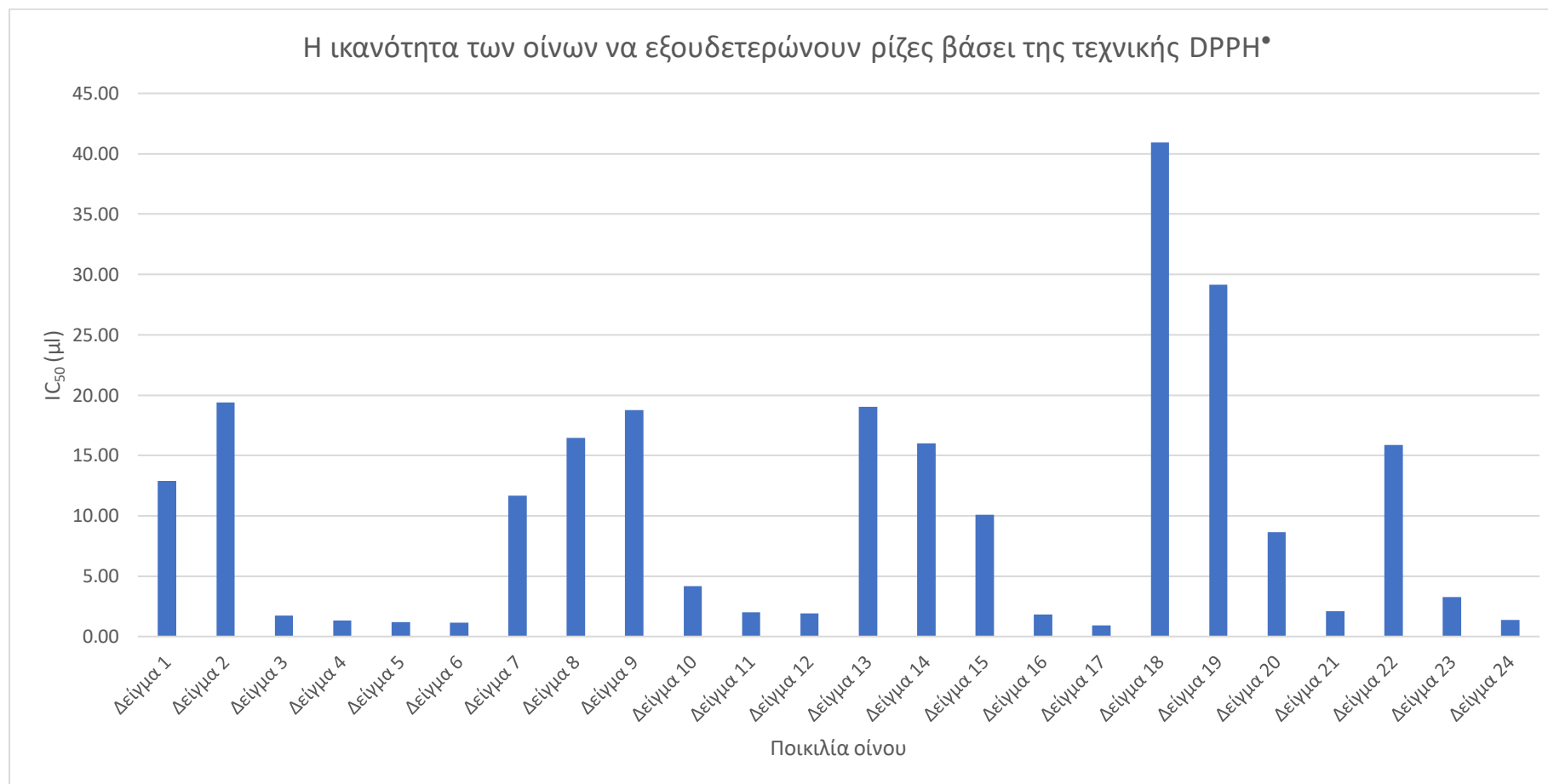
### 6.1. Ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών βάσει της τεχνικής DPPH'

Για κάθε δείγμα οίνου και μύρας υπολογίστηκε το  $IC_{50}$ , δηλαδή η συγκέντρωση του δείγματος που έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Ο υπολογισμός αυτός έγινε για κάθε πείραμα και στα Γραφήματα 1 και 2 παρουσιάζεται ο μέσος όρος αυτών για τις διάφορες ποικιλίες οίνου και μύρας, αντίστοιχα. Η ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών είναι αντιστρόφως ανάλογη της τιμής  $IC_{50}$ , δηλαδή όσο λιγότερη ποσότητα δείγματος χρειάζεται για την εξουδετέρωση των ριζών, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτού.

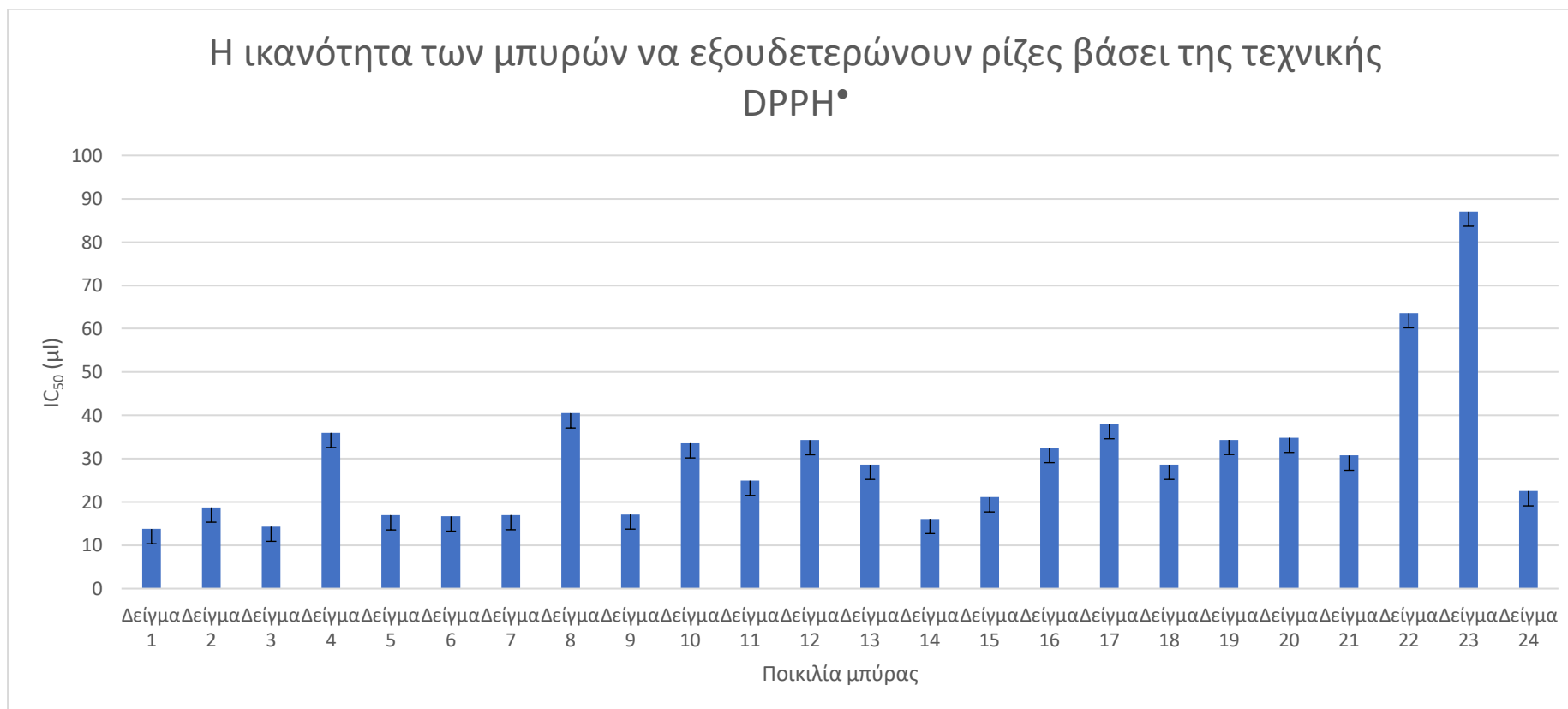
Παρατηρείται ότι για τους οίνους, τη μικρότερη τιμή  $IC_{50}$  (άρα και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα) έχει το Δείγμα 17 με τιμή 0,92μl, ενώ τη μεγαλύτερη τιμή  $IC_{50}$  (άρα και τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα) έχει το Δείγμα 18 με τιμή 40,95μl(Γράφημα 1). Θα μπορούσε επίσης κανείς να παρατηρήσει ότι οι ποικιλίες σχηματίζουν δύο διακριτές ομάδες (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Οι δύο διακριτές ομάδες οίνων βάσει της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας σύμφωνα με την τεχνική DPPH' (Με **μπορντό** γράμματα σημειώνονται οι ερυθροί οίνοι, με μαύρα οι λευκοί και με **μωβ** οι ροζέ).

$IC_{50} < 5$	$IC_{50} > 8$
Δείγμα 3	Δείγμα 1
Δείγμα 4	Δείγμα 2
Δείγμα 5	Δείγμα 7
Δείγμα 6	Δείγμα 8
Δείγμα 10	Δείγμα 9
Δείγμα 11	Δείγμα 13
Δείγμα 12	Δείγμα 14
Δείγμα 16	Δείγμα 15
Δείγμα 17	Δείγμα 18
Δείγμα 21	Δείγμα 19
Δείγμα 23	Δείγμα 20
Δείγμα 24	Δείγμα 22



Γράφημα1: Οι τιμές IC<sub>50</sub> (μl) για τους οίνους όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζυλίου (DPPH\*).



Γράφημα 2: Οι τιμές IC<sub>50</sub> (μl) για τις μύρες όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH•).

Από τον Πίνακα 7 παρατηρείται ότι όλοι οι ερυθροί οίνοι κατατάσσονται στην ομάδα μεγαλύτερης αντιοξειδωτικής ικανότητας ( $IC_{50} < 5$ ) και μόλις 2 ποικιλίες λευκών οίνων κατατάσσονται σε αυτή την κατηγορία, τα Δείγματα 10 και 16, *Νεμέα 2018*. Οι υπόλοιποι λευκοί οίνοι, καθώς και η ποικιλία ροζέ οίνου Δείγμα 15, κατατάσσονται στην κατηγορία μικρότερης αντιοξειδωτικής ικανότητας ( $IC_{50} > 8$ ).

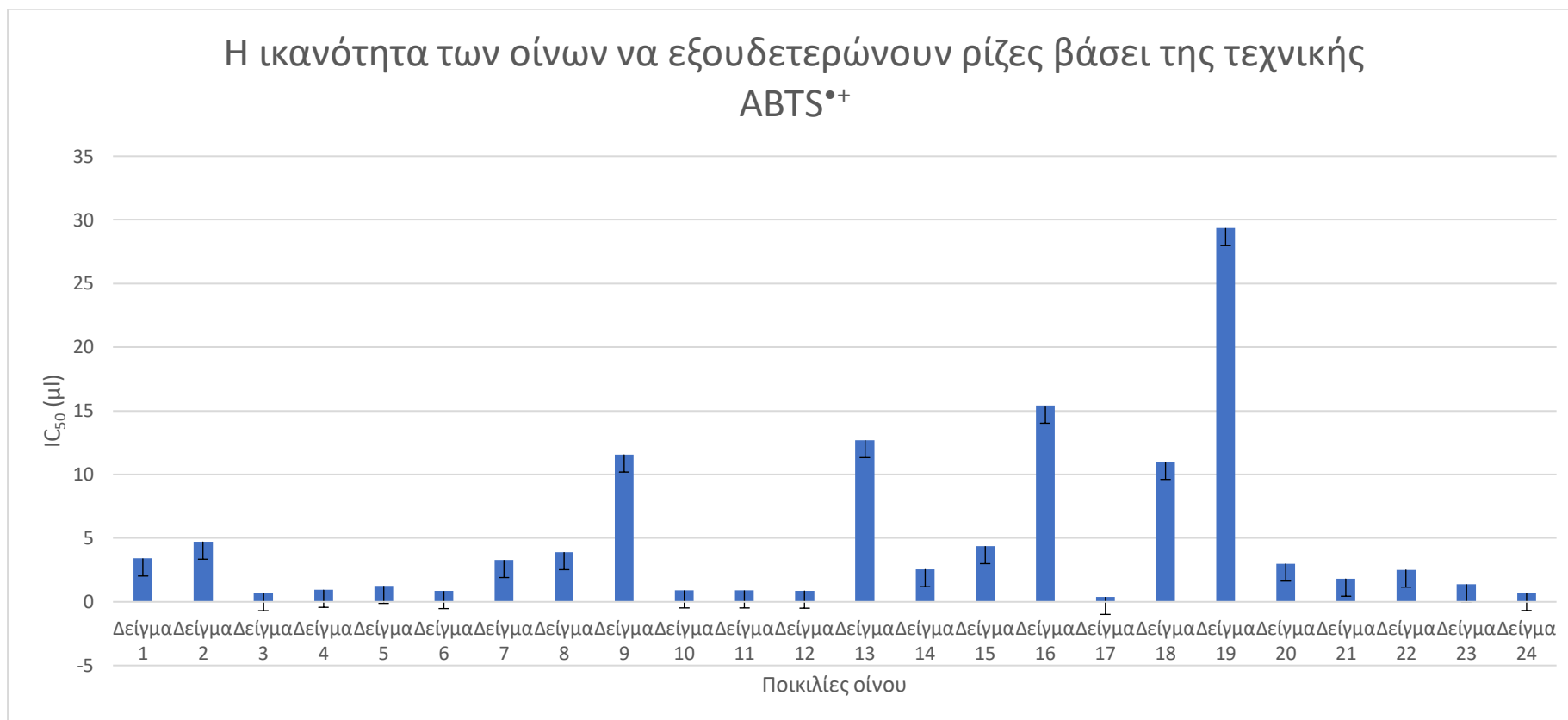
Όσον αφορά τις ποικιλίες μύρες που ελέγχθηκαν, τη μικρότερη τιμή  $IC_{50}$  (άρα και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα) έχει το Δείγμα 1 με τιμή 13,76μl, ενώ τη μεγαλύτερη τιμή  $IC_{50}$  (άρα και τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα) έχει το Δείγμα 23 με τιμή 87,03μl (Γράφημα 2).

Συγκρίνοντας τα δύο γραφήματα (Γράφημα 1 και 2), οι μύρες παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα στην αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα στις ποικιλίες οίνου παρουσιάζουν ένα σημαντικά μεγαλύτερο εύρος. Επιπλέον, σε σχέση με τις ποικιλίες οίνου, οι ποικιλίες μύρας παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές  $IC_{50}$  και κατ' επέκταση μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Μάλιστα, η ελάχιστη  $IC_{50}$  που εντοπίστηκε στις ποικιλίες μύρας (13,76μl) είναι σχεδόν 15 φορές μεγαλύτερη από την ελάχιστη  $IC_{50}$  που παρατηρήθηκε στις ποικιλίες οίνου. Η μέγιστη τιμή  $IC_{50}$  στις μύρες (87,03μl) είναι δύο φορές μεγαλύτερη από τη μέγιστη τιμή στους οίνους (40,95μl).

## **6.2. Ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών βάσει της τεχνικής ABTS<sup>•+</sup>**

Αντίστοιχα, από τις μετρήσεις που λήφθηκαν εφαρμόζοντας την τεχνική ABTS<sup>•+</sup> υπολογίστηκε το  $IC_{50}$  για κάθε δείγμα προς μελέτη. Ο υπολογισμός αυτός έγινε για κάθε πείραμα και στα Γραφήματα 3 και 4 παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων για τις διάφορες ποικιλίες οίνου και μύρας, αντίστοιχα.





Γράφημα 3: Οι τιμές IC<sub>50</sub> (μl) για τους οίνους όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6- σουλφονικού οξέος (ABTS<sup>•+</sup>).

## Η ικανότητα των μυρών να εξουδετερώνουν ρίζες βάσει της τεχνικής ABTS<sup>•+</sup>



Γράφημα 4: Οι τιμές IC<sub>50</sub> (μl) για τις μύρες όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6- σουλφονικού οξέος (ABTS<sup>•+</sup>).

Όσον αφορά τους οίνους, τη μικρότερη τιμή IC<sub>50</sub> (άρα και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα) έχει το Δείγμα 17 με τιμή 0,39μl, ενώ τη μεγαλύτερη τιμή IC<sub>50</sub> (άρα και τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα) έχει το Δείγμα 19 με τιμή 29,35μl (Γράφημα 3). Και από τα αποτελέσματα αυτής της τεχνικής προκύπτουν δύο διακριτές ομάδες ποικιλιών οίνου βάσει της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, οι οποίες ωστόσο διαφέρουν από αυτές που παρατηρήθηκαν με την τεχνική DPPH<sup>•</sup>, με περισσότερες ποικιλίες να κατατάσσονται στην ομάδα μεγαλύτερης αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC<sub>50</sub><5) (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Οι δύο διακριτές ομάδες οίνων βάσει της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας σύμφωνα με την τεχνική ABTS<sup>•+</sup> (Με **μπορντό** γράμματα σημειώνονται οι ερυθροί οίνοι, με **μαύρα** οι λευκοί και με **μωβ** οι ροζέ).

IC <sub>50</sub> < 5	IC <sub>50</sub> > 10
Δείγμα 1	Δείγμα 9
Δείγμα 2	Δείγμα 13
<b>Δείγμα 3</b>	Δείγμα 16
<b>Δείγμα 4</b>	Δείγμα 18
<b>Δείγμα 5</b>	Δείγμα 19
<b>Δείγμα 6</b>	
Δείγμα 7	
Δείγμα 8	
Δείγμα 10	
<b>Δείγμα 11</b>	
<b>Δείγμα 12</b>	
Δείγμα 14	
<b>Δείγμα 15</b>	
<b>Δείγμα 17</b>	
Δείγμα 20	
<b>Δείγμα 21</b>	
Δείγμα 22	
<b>Δείγμα 23</b>	
<b>Δείγμα 24</b>	

Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται ότι όλες οι ερυθρές ποικιλίες οίνου κατατάσσονται στην ομάδα μεγαλύτερης αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC<sub>50</sub>< 5), ωστόσο παρατηρείται σημαντική ανακατάταξη των υπόλοιπων ποικιλιών οίνων. Συγκεκριμένα, η ροζέ ποικιλία οίνου, Δείγμα 15, βάσει της τεχνικής

ABTS<sup>+</sup> κατατάσσεται στην ομάδα μεγαλύτερης αντιοξειδωτικής ικανότητας, ενώ το Δείγμα 16 που βάσει της τεχνικής DPPH<sup>•</sup> είχε IC<sub>50</sub> 1,82μl και έτσι κατατάχθηκε στις ποικιλίες χαμηλής αντιοξειδωτικής ικανότητας, από την τεχνική ABTS<sup>•+</sup> προέκυψε IC<sub>50</sub> 16,40μl, αποτελώντας τη δεύτερη υψηλότερη τιμή IC<sub>50</sub> μετά το Δείγμα 19 (Πίνακας 8).

Όσον αφορά τις ποικιλίες μύρες που ελέγχθηκαν, τη μικρότερη τιμή IC<sub>50</sub> (άρα και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα) έχει το Δείγμα 3 με τιμή 3,05μl, ενώ τη μεγαλύτερη τιμή IC<sub>50</sub> (άρα και τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα) έχει το Δείγμα 23 με τιμή 26,29 (Γράφημα 2).

Και με αυτή την τεχνική οι μύρες παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιομορφία στην αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τις ποικιλίες οίνου (Γράφημα 1 και 2), ενώ οι τιμές IC<sub>50</sub> που υπολογίστηκαν για τις διάφορες ποικιλίες οίνου είναι σημαντικά μεγαλύτερες από τις τιμές που υπολογίστηκαν για τους οίνους. Ωστόσο, σε αυτή την τεχνική δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των μεγίστων IC<sub>50</sub> των ποικιλιών μύρας και κρασιού όπως παρατηρήθηκε στην τεχνική DPPH<sup>•</sup>, με τη μεγαλύτερη τιμή IC<sub>50</sub> να παρατηρείται παραδόξως στο Δείγμα 39 οίνου (29,35μl) και όχι σε ποικιλία μύρας.

## 7. Συζήτηση

Η μύρα και το κρασί είναι δύο από τα αλκοολούχα ποτά που καταναλώνονται συχνότερα, ειδικά στη χώρα μας. Και τα δύο αυτά ποτά, εκτός από τη μακρά ιστορία τους, έχουν σημαντικές ιδιότητες που τα καθιστούν ως τα πιο ευρέως καταναλώμενα αλκοολούχα ποτά σήμερα. Αρχικά, ο τρόπος παρασκευής τους περιλαμβάνει πολλά διαφορετικά χαρακτηριστικά και παραμέτρους που καθορίζουν την τελική τους ποιότητα, όπως η ποιότητα της πρώτης ύλης (βύνη και λυκίσκος για μύρα και σταφύλι για το κρασί), μαγιά, μέθοδοι αλκοολικής ζύμωσης, συνθήκες παλαίωσης και ούτω καθεξής, που οδηγούν στην παραγωγή μεγάλης ποικιλίας που μπορεί να ευχαριστήσει όλα τα γούστα. Εκτός από τη γεύση τους, η οποία επηρεάζει τη χρήση τους, το κρασί και η μύρα διακρίνονται για την υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ουσίες, όπως αντιοξειδωτικά. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών και ανασκοπήσεων έχουν εξετάσει τις βιοδραστικές ενώσεις που μπορεί να ευθύνονται για τα πιθανά οφέλη για την υγεία της μέτριας κατανάλωσης κρασιού και μύρας, καθώς και τις διάφορες μεθόδους για την αύξηση των αντιοξειδωτικών ενώσεων σε αυτά τα δύο ποτά (Roerecke&Rehm, 2014;Castaldoetal, 2019; Martinez-Gomezetal, 2020; Habschiedetal, 2020; Horincaretal, 2020; Martínez-Giletal, 2020; Jeremicetal, 2020).

Στην παρούσα μελέτη έγινε *invitro*προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας 24 ποικιλιών οίνου και 24 ποικιλιών μύρας. Η αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές μεθόδους που βασίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup>.

Οι ποικιλίες οίνων παρουσίασαν σημαντικό εύρος διακύμανσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, με τις τιμές IC<sub>50</sub> να κυμαίνονται μεταξύ 0,92-40,95 μβάσει της τεχνικής DPPH<sup>•</sup> και μεταξύ 0,39-27,43 μβάσει της τεχνικής ABTS<sup>•+</sup>. Από τα γραφήματα που προέκυψαν δημιουργήθηκαν δύο υποομάδες οίνων, θέτοντας ως κατώφλι το IC<sub>50</sub>=5. Στη μέθοδο DPPH<sup>•</sup> στην ομάδα IC<sub>50</sub>< 5 η πλειοψηφία των ποικιλιών ήταν ερυθροί οίνοι και μόλις 2 ποικιλίες λευκών οίνων (Δείγματα 10 και 16) κατατάχθηκαν σε αυτή την κατηγορία. Στη μέθοδο ABTS<sup>•+</sup> οι ερυθροί οίνοι επίσης κατατάχθηκαν στην ομάδα IC<sub>50</sub>< 5, αλλά επιπλέον ταξινομήθηκαν και 8 ποικιλίες λευκών οίνων σε αυτή (Δείγματα 1, 2, 7, 8, 10, 14, 20 και 22) Ακόμα, το Δείγμα 16 στην τεχνική DPPH<sup>•</sup> παρουσίασε τιμή IC<sub>50</sub>1,82μl, παρουσιάζοντας υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ

στην τεχνική ABTS<sup>+</sup> παρουσίασε τιμή IC<sub>50</sub>15,40μl, δηλαδή χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητας.

Σε γενικές γραμμές παρατηρήθηκε ότι οι ερυθρές ποικιλίες οίνου παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των λευκών ποικιλιών. Αντίστοιχες παρατηρήσεις αναφέρονται και σε προηγούμενες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία (Stratil et al, 2008; Šrakovská et al, 2012), σύμφωνα με τις οποίες οι ερυθροί οίνοι εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>+</sup>. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ερυθρών οίνων οφείλεται κυρίως στην περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες, οι οποίες έχουν την ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών (Singhetal, 2014). Οι Šrakovská et al (2012) στη μελέτη τους αναφέρουν ότι οι λευκές ποικιλίες οίνου έχουν χαμηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο από τις ερυθρές, μια διαφορά που είναι αναμενόμενη λόγω του διαφορετικού τρόπου παρασκευής αυτών. Συγκεκριμένα, κατά την παρασκευή του ερυθρού οίνου τα σταφύλια υφίστανται διάσπαση των στερεών μερών τους, με αποτέλεσμα να μεταφέρονται οι πολυφαινόλες από αυτά στον παραγόμενο οίνο. Εν συνεχεία υπάρχει και ένα στάδιο ζύμωσης κατά το οποίο διασφαλίζεται η μεταφορά των πολυφαινολών στον ερυθρό οίνο. Από την άλλη, κατά την παρασκευή των λευκών ποικιλιών οίνων, δε γίνεται αποσύνθεση των στερεών τμημάτων των σταφυλιών, αλλά αυτά απλά συμπιέζονται μηχανικά, με αποτέλεσμα να μην εισάγονται κατά το στάδιο της ζύμωσης. Έτσι, ένα σημαντικό μικρότερο ποσοστό πολυφαινολών από τα σταφύλια περνάνε στο λευκό οίνο σε σχέση με τον ερυθρό (Radonjićetal, 2020). Σύμφωνα με αυτό, η παρατήρηση μεγαλύτερης αντιοξειδωτικής ικανότητας στις ερυθρές ποικιλίες οίνου ήταν αναμενόμενη.

Μελετώντας την αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων ποικιλιών μύρας, παρατηρήθηκαν τιμές IC<sub>50</sub> μεταξύ 13,76-87,03 μl βάσει της τεχνικής DPPH<sup>•</sup> και μεταξύ 3,05-26.29 μl βάσει της τεχνικής ABTS<sup>+</sup>. Ωστόσο θα πρέπει να αναφερθεί ότι και στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε μύρες οι τιμές IC<sub>50</sub> που προέκυψαν από τις δύο τεχνικές (DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>+</sup>) διαφέρουν σημαντικά. Σε γενικές γραμμές, ωστόσο, η αντιοξειδωτική ικανότητα της μύρας είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στην πλειοψηφία των ποικιλιών οίνων. Λόγω των διαφορετικών πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή τους, υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις στο φαινολικό προφίλ και τη συγκέντρωση των φαινολών στο κρασί και την μύρα. Ορισμένες ομάδες πολυφαινολών (χαλκόνες και

φλαβανόνες) εντοπίζονται μόνο στην μύρα, ενώ άλλες (στιλβένια, προανθοκυανιδίνες) εντοπίζονται μόνο στο κρασί (Radonjicetal, 2020). Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της πλειοψηφίας των αναλυτικών τεχνικών, οι μύρες έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες από ότι το κρασί (Pietro&Bamforth, 2011), γεγονός που δικαιολογεί και τα παρατηρούμενα αποτελέσματα.

Οι ρίζες DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> εξουδετερώνονται με τον ίδιο μηχανισμό. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν σημαντικά μεγάλες διαφοροποιήσεις στην αντιοξειδωτική ικανότητα που υπολογίστηκε για κάθε ποικιλία οίνου και μύρας στις δύο τεχνικές, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Αρχικά, οι δύο ρίζες να μεν εξουδετερώνονται με τον ίδιο μηχανισμό, αλλά οι ενώσεις τους διαφέρουν σημαντικά ως προς τη φύση και τη χημική δομή τους. Ακόμα, η αντιοξειδωτική ικανότητα των οίνων και των μυρών, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οφείλεται ως επί το πλείστον στις πολυφαινόλες που περιέχονται σε αυτά (Afrozetal, 2016; Mozaffarianetal, 2018). Οι πολυφαινόλες επίσης μπορεί να ποικίλουν σημαντικά ως προς τη δομή και τη χημική σύσταση (Coryetal, 2018), με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν ίσως διαφορετική ειδικότητα εξουδετέρωσης για καθεμία από τις ενώσεις. Έτσι, η ίδια σύσταση πολυφαινολών σε μια ποικιλία οίνου ή μύρας μπορεί να παρουσιάζει μικρή αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι της ρίζας DPPH<sup>•</sup>, αλλά μεγάλη έναντι της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>, λόγω μεγαλύτερης συγγένειας προς αυτήν. Τέλος, δεν πρέπει να αποκλείεται και το ενδεχόμενο πειραματικού σφάλματος, του οποίου, ωστόσο, έγινε προσπάθεια μείωσης εφαρμόζοντας περισσότερες από μια μετρήσεις για κάθε ποικιλία και κάθε συγκέντρωση.

## **8. Συμπεράσματα**

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά, άρα κατ' επέκταση και τα μεγαλύτερη οφέλη για την υγεία, έχουν οι ερυθροί οίνοι, εν συνεχεία οι λευκοί και τέλος οι μπύρες. Όπως αναφέρεται, όμως, κάθε ποικιλία περιέχει και διαφορετική σύσταση σε πολυφαινόλες, καθεμία από τις οποίες έχει και διαφορετικές ευεργετικές ιδιότητες για τον οργανισμό και έτσι δεν μπορεί κανείς να είναι απόλυτος ως προς το ποιο από τα τρία είδη είναι πιο ωφέλιμο για την υγεία. Ακόμη, παρατηρείται σημαντική ετερογένεια στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες μεταξύ διαφόρων ποικιλιών, επομένως θα μπορούσε κανείς να απολαμβάνει μια ποικιλία μπύρας με μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από ορισμένες ποικιλίες οίνου. Σε κάθε περίπτωση, ωστόσο, θα πρέπει να θυμόμαστε ότι και ο οίνος και η μπύρα περιέχουν αλκοόλ που έχει και σημαντικές αρνητικές επιδράσεις για τον οργανισμό και για αυτό θα πρέπει να καταναλώνονται όλα με μέτρο.

Μια ακόμα σημαντική παρατήρηση που προκύπτει από την παρούσα εργασία είναι ότι διαφορετικές τεχνικές επιφέρουν διαφορετικά αποτελέσματα ως προς τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός δείγματος, και μάλιστα με σημαντικά μεγάλη απόκλιση. Αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ειδικά όταν θέλει κανείς να συγκρίνει την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφόρων δειγμάτων με αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες ή πειράματα, ώστε να χρησιμοποιείται αυστηρά η ίδια τεχνική και μεθοδολογία.



## 9. Βιβλιογραφία

- Afroz R., Tanvir E., Little P. Honey-derived flavonoids: Natural products for the prevention of atherosclerosis and cardiovascular diseases. *Clin. Exp. Pharmacol.* 2016;6:1–4. doi: 10.4172/2161-1459.1000208.
- Andreasen, M. F., Landbo, A.-K., Christensen, L. P., Hansen, Å., & Meyer, A. S. (2001). Antioxidant Effects of Phenolic Rye (*Secale cereale*L.) Extracts, Monomeric Hydroxycinnamates, and Ferulic Acid Dehydrodimers on Human Low-Density Lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4090–4096.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239–244.
- Arthur, J. R. (2001). The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(13), 1825–1835.
- Biagi, M., & Bertelli, A. A. E. (2015). Wine, alcohol and pills: What future for the French paradox? *Life Sciences*, 131, 19–22.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
- Boronat, A., Soldevila-Domenech, N., Rodríguez-Morató, J., Martínez-Huélamo, M., Lamuela-Raventós, R. M., & de la Torre, R. (2020). Beer Phenolic Composition of Simple Phenols, Prenylated Flavonoids and Alkylresorcinols. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(11), 2582.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Breen, A. P., & Murphy, J. A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(6), 1033–1077.
- Carpena, M., Pereira, A. G., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Wine Aging Technology: Fundamental Role of Wood Barrels. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(9), 1160.
- Castaldo, L., Narváez, A., Izzo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Minno, G. D., & Ritieni, A. (2019). Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(19), 3626.
- Chambers, P. J., & Pretorius, I. S. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO reports*, 11(12), 914–920.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993;49(3):481–493.
- Cheng, C. K., Luo, J. Y., Lau, C. W., Chen, Z. Y., Tian, X. Y., & Huang, Y. (2020). Pharmacological basis and new insights of resveratrol action in the cardiovascular system. *British journal of pharmacology*, 177(6), 1258–1277.
- Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., & Singhal, S. S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, 413, 122–134.

Chiva-Blanch, G., Arranz, S., Lamuela-Raventos, R. M., & Estruch, R. (2013). Effects of Wine, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease Risk Factors: Evidences from Human Studies. *Alcohol and Alcoholism*, 48(3), 270–277.

Chiva-Blanch, G., Magraner, E., Condines, X., Valderas-Martínez, P., Roth, I., Arranz, S., ... Estruch, R. (2015). Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: A randomized feeding trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 25(1), 36–45.

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214.

Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in nutrition*, 5, 87.

Costanzo, S., Di Castelnuovo, A., Donati, M. B., Iacoviello, L., & de Gaetano, G. (2011). Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis. *European Journal of Epidemiology*, 26(11), 833–850.

De Gaetano, G., Costanzo, S., Di Castelnuovo, A., Badimon, L., Bejko, D., Alkerwi, A., ... Iacoviello, L. (2016). Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 26(6), 443–467.

De Souza, R. F. V., & De Giovanni, W. F. (2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, 9(2), 97–104.

Devasagayam, T. P., Bloor, K. K., Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J BiochemBiophys.*, 40(5), 300-8.

Dizdaroglu, M., & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46(4), 382–419.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement 1,2 1This article is part of a series of reviews on “Oxidative DNA Damage and Repair.” *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102–1115.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell “ function. *Physiol. Rev.*, 82, 47–95.

Du, Q.-H., Peng, C., & Zhang, H. (2013). Polydatin: A review of pharmacology and pharmacokinetics. *Pharmaceutical Biology*, 51(11), 1347–1354.

Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., Striegl, G., & Juergens, G. (1990). Biochemical structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chemical Research in Toxicology*, 3(2), 77–92.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 81–128.

- Fernandes, I., Pérez-Gregorio, R., Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2017). Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(2), 292.
- Ferrières J. (2004). The French paradox: lessons for other countries. *Heart (British Cardiac Society)*, 90(1), 107–111.
- Franz, G., Meussdoerffer, A. (2009). *Comprehensive History of Beer Brewing Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. Edited by H. M. Eßlinger.
- Gao, Y., Zietsman, A., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2019). Deconstructing Wine Grape Cell Walls with Enzymes During Winemaking: New Insights from Glycan Microarray Technology. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(1), 165.
- Gieseg, S., Duggan, S., & Gebicki, J. M. (2000). Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals. *Biochemical Journal*, 350(1), 215–218.
- Gough, D., Cotter, T. (2011). Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis* 2, e213.
- Gross, E., Sevier, C. S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C. A., Thorpe, C., & Fass, D. (2006). Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(2), 299–304.
- Grzegorzczak-Karolak, I., Krzemińska, M., Kiss, A. K., Olszewska, M. A., & Owczarek, A. (2020). Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of Aerial and Underground Parts of *Salvia bulleyana* Diels. *Plants. Metabolites*, 10(12), 497.
- Habschied, K., Lončarić, A., & Mastanjević, K. (2020). Screening of Polyphenols and Antioxidative Activity in Industrial Beers. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(2), 238.
- Hernandes, K. C., Souza-Silva, É. A., Assumpção, C. F., Zini, C. A., & Welke, J. E. (2019). Validation of an analytical method using HS-SPME-GC/MS-SIM to assess the exposure risk to carbonyl compounds and furan derivatives through beer consumption. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1–14.
- Horincar, G., Enachi, E., Bolea, C., Râpeanu, G., & Aprodu, I. (2020). Value-Added Lager Beer Enriched with Eggplant (*Solanum melongena* L.) Peel Extract. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(3), 731.
- Hua, L., Hua, W., Huanmei, L., Goodman, S., van der Lee, P., Zhimin, X., ... Ping, Y. (2018). The Worlds of Wine: Old, New and Ancient. *Wine Economics and Policy*, 7(2), 178-182.
- Jeremic, J., Vongluangam, I., Ricci, A., Parpinello, G. P., & Versari, A. (2020). The Oxygen Consumption Kinetics of Commercial Oenological Tannins in Model Wine Solution and Chianti Red Wine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(5), 1215.
- Jerkovic, V., Callemien, D., & Collin, S. (2005). Determination of Stilbenes in Hop Pellets from Different Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4202–4206.
- Johnson H., Robinson J. (2001). The World Atlas of Wine. *Mitchell Beazley*, 44- 45.

- Kalliora, C., Kyriazis, I. D., Oka, S. I., Lieu, M. J., Yue, Y., Area-Gomez, E., Pol, C. J., Tian, Y., Mizushima, W., Chin, A., Scerbo, D., Schulze, P. C., Civelek, M., Sadoshima, J., Madesh, M., Goldberg, I. J., & Drosatos, K. (2019). Dual peroxisome-proliferator-activated-receptor- $\alpha/\gamma$  activation inhibits SIRT1-PGC1 $\alpha$  axis and causes cardiac dysfunction. *JCI insight*, 5(17), e129556.
- Kaur, M., Agarwal, C., & Agarwal, R. (2009). Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. *The Journal of nutrition*, 139(9), 1806S–12S.
- Kourakou-Dragona S. (1998). *Inology Issues*, Trohalia Publications, Athens.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., ... Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113(9), 71–88.
- Krishnamachari, V., Levine, L. H., & Paré, P. W. (2002). Flavonoid Oxidation by the Radical Generator AIBN: A Unified Mechanism for Quercetin Radical Scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4357–4363.
- Li, C., Xu, X., Tao, Z., Wang, X. J., & Pan, Y. (2015). Resveratrol dimers, nutritional components in grape wine, are selective ROS scavengers and weak Nrf2 activators. *Food Chemistry*, 173, 218–223.
- Li, H., Wang, X., Li, Y., Li, P., & Wang, H. (2009). Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112(2), 454–460.
- Lissi, E. (1995). Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), 153–158.
- Livrea, M. A., Tesoriere, L., Bongiorno, A., Pintaudi, A. M., Ciaccio, M., & Riccio, A. (1995). Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(3), 401–409.
- Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., & Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide—A physiological messenger. *Ann. Intern. Med.*, 120, 227–237.
- Ma, T. Z., Gong, P. F., Lu, R. R., Zhang, B., Morata, A., & Han, S. Y. (2020). Effect of Different Clarification Treatments on the Volatile Composition and Aromatic Attributes of 'Italian Riesling' Icewine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(11), 2657.
- Markoski, M. M., Garavaglia, J., Oliveira, A., Olivaes, J., & Marcadenti, A. (2016). Molecular Properties of Red Wine Compounds and Cardiometabolic Benefits. *Nutrition and metabolic insights*, 9, 51–57.
- Martínez-Gil, A., Del Alamo-Sanza, M., Sánchez-Gómez, R., & Nevares, I. (2020). Alternative Woods in Enology: Characterization of Tannin and Low Molecular Weight Phenol Compounds with Respect to Traditional Oak Woods. A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(6), 1474.
- Martinez-Gomez, A., Caballero, I., & Blanco, C. A. (2020). Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules*, 10(3), 400.

- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407–412.
- Moore, A., Beidler, J., & Hong, M. Y. (2018). Resveratrol and Depression in Animal Models: A Systematic Review of the Biological Mechanisms. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(9), 2197.
- Morlière, P., Patterson, L. K., Santos, C. M. M., Silva, A. M. S., Mazière, J.-C., Filipe, P., ... Santus, R. (2012). The dependence of  $\alpha$ -tocopheroxyl radical reduction by hydroxy-2,3-diarylxanthenes on structure and micro-environment. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10(10), 2068.
- Mozaffarian, D., Rosenberg, I., & Uauy, R. (2018). History of modern nutrition science-implications for current research, dietary guidelines, and food policy. s. *BMJ (Clinical research ed.)*, 361, k2392.
- Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., & Scaccini, C. (1999). Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants: Structure–Activity Relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1453–1459.
- Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., & Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database : the journal of biological databases and curation*, 2010, bap024.
- Niki, E. (2014). Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 3–12.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006.
- Osorio-Paz, I., Brunauer, R., & Alavez, S. (2019). Beer and its non-alcoholic compounds in health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–14.
- Park, Y., Nam, S., Yi, H.-J., Hong, H.-J., & Lee, M. (2009). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids increase oxidative stress in rats with intracerebral hemorrhagic stroke. *Nutrition Research*, 29(11), 812–818.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89–96.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*, 30(1), 11–26.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*, 30(1), 11–26.
- Pietro, M. B., & Bamforth, C. W. (2011). A Comparison of the Antioxidant Potential of Wine and Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(4), 547–555.
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042.

- Pires, E., &Brányik, T. (2015). An Overview of the Brewing Process. *Biochemistry of Beer Fermentation*, 1–9.
- Poli, A., Marangoni, F., Avogaro, A., Barba, G., Bellentani, S., Bucci, M., ... Visioli, F. (2013). Moderate alcohol use and health: A consensus document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(6), 487–504.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., &Chiarpotto, E. (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1163–1182.
- Prior, R.L. & Cao, G., (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free radical biology & medicine*, 27(11–12), 1173–1181.
- Pryor, W. A., & Porter, N. A. (1990). Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(6), 541–543.
- Radonjić, S., Maraš, V., Raičević, J., &Košmerl, T. (2020). Wine or Beer? Comparison, Changes and Improvement of Polyphenolic Compounds during Technological Phases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(21), 4960.
- Ramos, C. G., Sousa, S. A., Grilo, A. M., Feliciano, J. R., &Leitão, J. H. (2014). Retraction for Ramos et al., The second RNA chaperone, Hfq2, is also required for survival under stress and full virulence of Burkholderiacenocepacia J2315. *Journal of bacteriology*, 196(22), 3980.
- Rao, A. V., & Agarwal, S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutrition Research*, 19(2), 305–323.
- Rasines-Perea, Z., &Teissedre, P. L. (2017). Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(1), 68.
- Riccioni, G. (2009). Carotenoids and cardiovascular disease. *CurrAtheroscler Rep* 11, 434–439.
- Roerecke, M., & Rehm, J. (2014). Alcohol consumption, drinking patterns, and ischemic heart disease: a narrative review of meta-analyses and a systematic review and meta-analysis of the impact of heavy drinking occasions on risk for moderate drinkers. *BMC medicine*, 12, 182.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., ... Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology*, 16(2), 91–98.
- Schrader, M., &Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1755–1766.
- Sharma, G. N., Gupta, G., & Sharma, P. (2018). A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 28(2), 139–154.
- Singh, M., Kaur, M., &Silakari, O. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 206–239.

- Stadtman, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(4), 315–325.
- Stadtman, E. R., Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.*, 2000, 899:191–208.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345–351.
- Starkov A. A. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 37–52.
- Stocker, R., Bowry, V. W., & Frei, B. (1991). Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5), 1646–1650.
- Stockley, C., Teissedre, P.-L., Boban, M., Di Lorenzo, C., & Restani, P. (2012). Bioavailability of wine-derived phenolic compounds in humans: a review. *Food & Function*, 3(10), 995.
- Stone, J. R., & Yang, S. (2006). Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(3-4), 243–270.
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.*, 10, 1881–1896.
- Stratil, P., Klejdus, B., Kubáň, V. (2007). Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71, 1741–1751.
- Suprun, A. R., Dubrovina, A. S., Tyunin, A. P., & Kiselev, K. V. (2021). Profile of Stilbenes and Other Phenolics in Fanagoria White and Red Russian Wines. *Metabolites*, 11(4), 231.
- Swami S. B., Thakor N.J. and Divate A.D. (2014). Fruit Wine Production: A Review. *Journal of Food Research and Technology*, 2(3), 93-100.
- Tesoriere, L., D'arpa, D., Re, R., & Livrea, M. A. (1997). Antioxidant Reactions of all-transRetinol in Phospholipid Bilayers: Effect of Oxygen Partial Pressure, Radical Fluxes, and Retinol Concentration. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 343(1), 13–18.
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 279, L1005–L1028.
- Tiwari, J., Gupta, G., Dahiya, R., Pabreja, K., Kumar Sharma, R., Mishra, A., & Dua, K. (2017). Recent update on biological activities and pharmacological actions of liraglutide. *EXCLI journal*, 16, 742–747.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., & Bast, A. (1996). Structural aspects of

- antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331–342.
- Vieira, A. V., Schneider, W. J., & Vieira, P. M. (1995). Retinoids: transport, metabolism, and mechanisms of action. *Journal of Endocrinology*, 146(2), 201–207.
- Vislocky, L. M., & Fernandez, M. L. (2010). Biomedical effects of grape products. *Nutrition Reviews*, 68(11), 656–670.
- Wang, J., Liu, L., Ball, T., Yu, L., Li, Y., & Xing, F. (2016). Revealing a 5,000-y-old beer recipe in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(23), 6444–6448.
- Wannenmacher, J., Gastl, M., & Becker, T. (2018). Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(4), 953–988.
- Wickramasinghe S. N. (1989). Role of superoxide anion radicals in ethanol metabolism by blood monocyte-derived human macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 169(3), 755–763.
- Witting, P. K., Upston, J. M., & Stocker, R. (1997). Role of  $\alpha$ -Tocopheroxyl Radical in the Initiation of Lipid Peroxidation in Human Low-Density Lipoprotein Exposed to Horse Radish Peroxidase†. *Biochemistry*, 36(6), 1251–1258.
- World Health Organization (2018). *Global Status Report on Alcohol and Health 2018*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U., & Li, H. (2017). Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British journal of pharmacology*, 174(12), 1633–1646.
- Xue, Y. Q., Di, J. M., Luo, Y., Cheng, K. J., Wei, X., & Shi, Z. (2014). Resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 765832.
- Yen, G. C., & Hsieh, P. P. (1994). Possible mechanisms of antimutagenic effect of Maillard reaction products prepared from xylose and lysine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(1), 133–137.
- Yla-Herttuala, S. (1999). Oxidized LDL and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.*, 874, 134–137.
- Zhan, C.-D., Sindhu, R. K., Pang, J., Ehdaie, A., & Vaziri, N. D. (2004). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Journal of Hypertension*, 22(10), 2025–2033.
- Zhao, T., Wu, J., Meng, J., Shi, P., Fang, Y., Zhang, Z., & Sun, X. (2019). Harvesting at the Right Time: Maturity and Its Effects on the Aromatic Characteristics of Cabernet Sauvignon Wine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15), 2777.
- Zhou, J., Wang, L., Wang, J., & Tang, N. (2001). Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal(II) complexes. *TransitionMetalChemistry*, 26(1/2), 57–63.



Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών. Τύπου. Διαθέσιμο στο:  
[https://www.ellinikienosizithopoion.gr/?page\\_id=74](https://www.ellinikienosizithopoion.gr/?page_id=74) Τελευταία πρόσβαση:  
15/01/2022

Ιστορία του Οίνου [online] houseofwine.gr. Διαθέσιμο στο:  
<https://www.houseofwine.gr/how/wine/about-wine/wine-basics/wine-history.html>  
Τελευταία πρόσβαση: 15/01/2022