

Farklı Bölgelere Ait Ticari Şarapların Resveratrol İçerikleri

Ünal Rıza Yaman¹, Hatice Kalkan Yıldırım², Belkıs Adıgüzel¹, Ufuk Yücel¹

¹Ege Üniversitesi, Ege Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Programı, Bornova, İzmir

²Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir

Received (Geliş Tarihi): 17.11.2013, Accepted (Kabul Tarihi): 25.12.2013

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): unalrizayaman@gmail.com (U.R.Yaman)

☎ 0 232 311 1460 📠 0 232 512 86 16

ÖZET

Bu çalışmada, farklı üzüm çeşitlerinden üretilmiş ticari şaraplarda bulunan resveratrol konsantrasyonları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Şarapların üretildiği bölgelerin ekolojik koşulları (vejetasyon süresi, güneşlenme süresi, toplam etkili sıcaklık, yağış miktarı) açısından örnekler birbirleriyle karşılaştırılmış ve resveratrol miktarı ile üzüm çeşidi, meteorolojik koşullar ve abiyotik stres (UV ışığı) gibi parametreler arasındaki korelasyon araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Resveratrol, Şarap, Ekolojik koşullar

Resveratrol Concentrations of Commercial Wines Produced from Different Regions

ABSTRACT

In this study, trans-resveratrol concentrations of commercial wines produced from different grape varieties are determined by high performance liquid chromatography. The results are compared from the point of ecological conditions of wine regions (vegetation time, sunshine duration, total effective temperature, rainfall) and correlations between resveratrol amounts and grape variety, meteorological conditions and abiotic stress (UV light) are investigated.

Key Words: Resveratrol, Wine, Ecological conditions

GİRİŞ

Kırmızı şarabın en önemli bileşiklerinden biri de fenolik maddelerdir. Resveratrol doğada üzüm kabuğunda yüksek miktarda bulunan ve bitkiyi fungal enfeksiyonlardan koruyan polifenol yapıda antioksidan özellikli bir maddedir. Vitis cinsinde belirlenen ve sekonder bir metabolit olan bu bileşik sağlık yararları pek çok araştırmacı tarafından kanıtlanmış bir fitoalksindir [1-3]. Yapılan araştırmalar siyah üzümde beyaz üzüme göre daha fazla resveratrol bulunduğunu ve şarabın taze üzümde çok daha yüksek resveratrol içeriğinin olduğunu göstermiştir [4, 5]. Strese bağlı bir nedenle sentezlenen resveratrolün üzümdeki miktarı farklı koşullara bağlı olarak değişebilmektedir. Bunlar

fungal enfeksiyonlar, abiyotik stres, iklim koşulları gibi sıralanabilir. Bu nedenle bilinçli olarak stres altında tutulan asmalardan üretilen üzümlerin ve bu üzümlerden yapılan şarapların resveratrol miktarının oldukça yüksek olması beklenebilir. Bazı şarap üretim teknikleri de (uzun maserasyon süresi, malolaktik fermantasyon ve eskitme gibi işlemler) resveratrol içeriğine etki eder. En önemli faktör, şarabın üzüm kabuklarıyla temas süresidir. Çünkü resveratrol meyve etinde değil, kabuğunda bulunur. Şarapta cis ve trans-resveratrol formlarının her ikisi de tespit edilmiştir. Cis-resveratrol, üzüm tanelerinin doğal bir bileşimi değildir. Cis-resveratrol şarapta genellikle şarap yapım süreci sırasında trans formun bir kısmının fotokimyasal izomerizasyonu sonucu oluşmaktadır. Resveratrol potansiyel bir antikanserijen

bileşik olarak değerlendirilmekte, bunun yanı sıra söz konusu bileşiğin koroner kalp hastalıklarını önlemede etkili olduğu ifade edilmektedir. Söz konusu bileşiğin ayrıca iltihaplanmalara iyi geldiği, aynı zamanda Alzheimer ve diğer bunama hastalıklarını önleyici etkilerinin olduğu ortaya koyulmuştur [6].

Bu araştırmada farklı bölgelerde yetiştirilmiş siyah üzümlerden elde edilen ticari şarapların resveratrol içeriklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Araştırmada materyal olarak 21 adet ticari şarap kullanılmıştır. Şarap örnekleri çeşit ve bölge olarak Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Ticari şarapların üretildiği üzüm çeşitleri ve bölgeleri

No	Üzüm Cinsi	Bölge	Kısaltma
1	Cabernet Sauvignon	Denizli	CS-D
2	Öküzgözü	Denizli	O-D
3	Boğazkere	Denizli	BK-D
4	Kalecik Karası	Denizli	KK-D
5	Syrah	Denizli	S-D
6	Merlot	Denizli	M-D
7	Çal Karası	Denizli	CK-D
8	Merlot	Çanakkale	M-C1
9	Merlot	Çanakkale	M-C2
10	Cabernet Sauvignon	Çanakkale	CS-C1
11	Merlot	Tekirdağ	M-T
12	Cabernet Sauvignon	Tekirdağ	CS-T
13	Grenache	Çanakkale	G-C
14	Cabernet Sauvignon	Çanakkale	CS-C2
15	Cabernet Sauvignon	İzmir	CS-I
16	Alicante	İzmir	A-I
17	Cinsault	Tekirdağ	C-T
18	Syrah	İzmir	S-I
19	Boğazkere	Elazığ	B-E
20	Kalecik Karası	Ankara	KK-A
21	Öküzgözü	Elazığ	O-E

Analiz yöntemleri

Resveratrol analizi

Şarap örneklerinin içerdikleri resveratrol konsantrasyonlarının kantitatif analizleri için Shimadzu (Japonya, Tokyo) SCL-10 A VP HPLC cihazı UV-VIS detector (SPD-10A VP) ile kullanılmıştır. Sistem LC- 10 AT Liquid Chromatography (LC) pompası (kuarterner gradyan) ve degazer (DGU- 14A) ünitelerini içermektedir. Kolon LiChrospher RP 5µm (250X4 mm I.D.)'dir.

Trans-resveratrol (Katalog No: R5010) standardı, Sigma (St. Louis, MO, A.B.D.)'den alınmış ve kalibrasyon için kullanılmıştır. *Trans*-resveratrol; 0.0005 mg tartılıp 10 mL metanolde çözölmüştür. Standart konsantrasyon

aralığı tüm belirlenen değerleri içermektedir. Metanol ve asetonitril çözgenleri HPLC saflıkta olup, Carlo Erba (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

Şıra, şarap ve kalibrasyon standartları (20 µL) kolona doğrudan enjekte edilmiştir. *Trans*-resveratrolün elüsyonunda mobil faz olarak bidistile su (pompa A) ve asetonitril solventi (pompa B) 65:35 koşullarında 1 mm/dakika akış hızında kullanılmıştır. Örnekler 289 nm dalga boyunda UV-VIS dedektörü ile analiz edilmiştir [7]. Her bir örneğe üç ölçüm uygulanmış ve kalibrasyon standartları kullanılarak çizilen standart eğri formülünden analiz sonuçları litrede miligram cinsinden bulunmuştur.

Kromatogram üzerindeki pikler alıkonma sürelerine göre belirlenmiştir. Uygulanan analiz koşullarında *trans*-resveratrol için alıkonma süresi 6.5 dakikadır. HPLC cihazında kolon fırını bulunmadığından alıkonma süresi ortam koşullarına göre az da olsa değişiklik göstermiştir. Şıra ve şarap örneklerinde resveratrol miktarları kromatografik sistemde üçer kez, standartlar dörder kez tekrarlanarak belirlenmiştir.

İstatistiksel Analizler

Farklı coğrafi bölgelerden gelen üzümlerden elde edilen şarapların resveratrol düzeyleri birbirleri ile en önemli farklar (LSD) testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Temel istatistiksel analizlerin dışında korelasyon analizleri de yapılmıştır. Çok değişkenli analiz teknikleri ile resveratrol konsantrasyonları analiz edilmiştir. Resveratrol verileri kullanılarak ağaç/küme analizi (CA) yapılmıştır. Değerlendirmede yakınlık şekli önem taşımış, ölçü birimi olarak 1-Pearson-r kullanılmıştır. Eksik veriler değerlendirme dışı bırakılmış, koordinat birimi (dlink/dmax) x 100 olarak verilmiştir.

Temel bileşenler analizinin (PCR) uygulama nedeni, verilerinin daha fazla bulunduğu yönleri belirleyerek, n-boyutlu uzayda şarapların orijinal düzeni görsel olarak vermektir. Veri matrisinden meydana gelen temel faktörler (çalışmada ilk 2 temel faktör alınmıştır) ile şaraplar arası farklılıkların ortaya konması ve hangi parametrelerin etkili olduğunu görmek mümkün olmuştur.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Vejetasyon süreleri ve meteorolojik koşulları saptanan farklı bölgelere ait farklı üzüm çeşitlerinin *trans*-resveratrol (3,5,4-trihidroksistilben) konsantrasyonları Tablo 2'de verilmiştir.

Yağış miktarı 3964 kg/m², güneşlenme süresi 1140 saat, toplam etkili sıcaklık 1647°C ve 131 gün vejetasyon süresine sahip C-T (Cinsaut üzümü/Tekirdağ) kodu ile gösterilen şarapların resveratrol değerlerinin oldukça yüksek olduğu (0.6820 mg/L) bulunmuştur. En düşük resveratrol değeri ise (0.1476 mg/L), yağış miktarı 1640 kg/m², güneşlenme süresi 1044 saat, toplam etkili sıcaklık 1363°C ve 93 gün vejetasyon süresine sahip

olan KK-D koduna sahip (Kalecik Karası/Denizli) örneklerde saptanmıştır.

2006 yılında yapılan bir çalışmada, kırmızı şaraplardaki resveratrol oranları 0.96-3.93 mg/L arasında bulunmuş olup en yüksek *trans*-resveratrol değerine Shiraz şaraplarında (3.93 mg/L) rastlanmıştır [6]. Yapılan bir başka çalışmada da Doğu Anadolu'da yetişen Öküzgözü üzümünden yapılan kırmızı şaraplarda yüksek resveratrol değerleri (6.47 mg/L) bulunmuştur [8]. Aynı çalışmada Ege Bölgesinde yetişen Emir üzümünden elde edilen beyaz şaraplarda da yüksek resveratrol içerikleri (0.703 mg/L) saptanmıştır. Başka bir çalışmaya göre de Yunan kırmızı şaraplarının

resveratrol içerikleri 0.38 ile 2.14 mg/L arasında değişmektedir [6].

Aynı bölgedeki resveratrol miktarlarının farklı çıkması, çalışmamızda gösterildiği gibi, üzüm çeşitleri, vejetasyon süresi, toplam efektif sıcaklık, güneşlenme süreleri ve yağışlar gibi farklı parametreler arasındaki etkileşimler ile açıklanabilir. Çalışmamızda kullanılan üzüm çeşitleri ile şarapların resveratrol seviyeleri arasında pozitif korelasyonlar saptanmıştır: $r=0.466$ ($p=0.033$); şarapların resveratrol seviyeleri ve üzümlerin coğrafik bölgeleri: $r=0.508$ ($p=0.019$); şarapların resveratrol seviyeleri ve toplam etkili sıcaklık: $r=0.536$ ($p=0.014$).

Tablo 2. Belirtilen olgunlaşma süreleri ve meteorolojik şartlarda farklı bölgelerde yetişen farklı üzüm çeşitlerinin resveratrol konsantrasyonları.

Kısaltma	Resveratrol Konsantrasyonu (mg/L)	Vejetasyon Süresi (gün)	Toplam Efektif Sıcaklık	Güneşlenme Süresi (h)	Yağış Miktarı (kg/m ²)
CS-D	0.1958	97	1410	1082	1692
O-D	0.1501	113	1579	1232	1904
BK-D	0.2075	126	1681	1355	2075
KK-D	0.1476	93	1363	1044	1640
S-D	0.2722	84	1255	960	1521
M-D	0.2367	85	1268	969	1534
CK-D	0.3090	144	1765	1524	2313
M-C1	0.1916	112	1483	1231	1863
M-C2	0.2371	103	1376	1151	1670
CS-C1	0.2877	130	1682	1391	3352
M-T	0.2426	103	1370	942	2850
CS-T	0.2632	137	1695	1170	4342
G-C	0.3578	141	1784	1489	3967
CS-C2	0.2298	123	1609	1329	2098
CS-I	0.1801	103	1624	1201	866
A-I	0.2984	98	1550	1151	755
C-T	0.6820	131	1647	1140	3964
S-I	0.3922	129	2199	1459	1471
B-E	0.4974	122	1875	1366	1068
KK-A	0.2743	144	1533	1387	3192
O-E	0.6247	122	1875	1366	1068

Asmanın gelişimi esnasındaki iklim şartları bitki metabolizmasında önemli bir etkiye sahiptir ve birçok parametre ile etkileşimler meydana getirmektedir [9, 10]. Çalışmamızda bu parametreler coğrafik bölge ($r=0.462$, $p=0.035$); vejetasyon süresi ($r=0.750$, $p=0$); güneşlenme süresi ($r=0.807$, $p=0$) ve ilgili parametrelere göre bitkideki resveratrol formasyonu arasındaki ilişkidir.

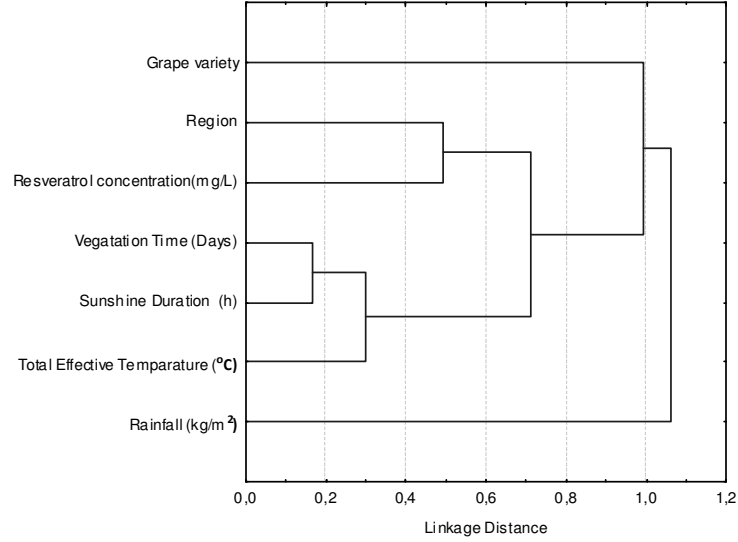
Vejetasyon süresi, TET ($r=0.701$, $p=0$), SD ($r=0.832$, $p=0$), RF ($r=0.614$, $p=0.003$) gibi bazı parametrelerden etkilenmektedir. Analiz edilen bütün parametrelerle yakın ilişkisi olduğundan bu korelasyonlar, vejetasyon süresinin bulunan resveratrol konsantrasyonları üzerinde çok önemli olduğunu göstermektedir. Resveratrol sonuçlarına bakıldığında en yüksek değerlerin, en uzun vejetasyon süresine (131 gün) sahip üzüm çeşidine ait şarap örneğinde olduğu görülmektedir.

Yüksek resveratrol konsantrasyonu ile örneklerin güneşlenme süreleri ve toplam etkili sıcaklık değerleri arasında endirekt bir ilişki saptanmıştır. Yapılan bir

çalışmaya göre güneşlenme süresi dünya yüzeyine gelen UV ışınlarından etkilenmektedir [11]. UV ışınları ozon tabakasından geçerken absorpsiyona uğrarlar ve absorpsiyon dalga boyuna bağlı olarak farklılık gösterir. Ozon tabakası çok az miktarda UV A (320-400 nm), çok daha fazla UV B (320-400 nm) absorbe eder, ancak UV C (<280 nm) stratosferik ozon tarafından tamamen absorbe edilir, Dünya yüzeyine ulaşamaz. Sadece UV C resveratrol sentezini önemli oranlarda uyarır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada şarapların maksimum resveratrol konsantrasyonunu günlük ortalama sıcaklığın 29°C olduğu Ege Bölgesi üzümünde saptanmıştır (2.710 mg/L) ve bu değerler günlük ortalama sıcaklığın 20°C olduğu Marmara Bölgesi üzümünde bulunan değerlere (1.854 mg/L) yakın değerlerdir [12]. Daha yoğun UV ışınına maruz kalmış üzümlerden üretilen şarapların resveratrol konsantrasyonu 0.0143 mg/L olarak bulunmuştur ve bu analizin kontrol örneğinin resveratrol konsantrasyonu ise 0.0124 mg/L dir [13].

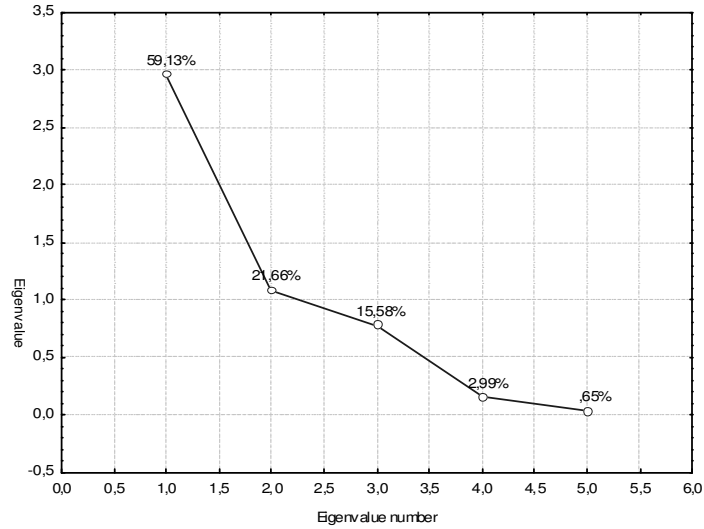
Yağış miktarı (kg/m^2) resveratrol konsantrasyonunu dolaylı, vejetasyon süresini ($r=0.615$, $p=0.003$) ise doğrudan etkilemektedir. Çizelge 2'den de görülebildiği gibi, yüksek resveratrol konsantrasyonu, belirlenen periyotlar boyunca nispeten yüksek yağış alan örneklerde çıkmış olup, aynı zamanda diğer örneklerin (CS-T, G-C) resveratrol değerleri çok yüksek çıkmamıştır. Bu durum, parametreler arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır.

Küme analizinin sonuçları Şekil 1'de verilmiştir. Küme analizinin sonuçlarına göre resveratrol konsantrasyonu (mg/L) üzüm çeşidinin bölgesi ile doğrudan ilişkilidir, dolaylı olarak da vejetasyon süresi (gün) ve güneşlenme süresiyle (saat) ilişkilidir. Bu ikisi ise toplam etkili sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) ve yağış miktarı (kg/m^2) ile çok yakından alakalıdır.



Şekil 1. Kullanılan parametrelerin küme analizleri (üzüm çeşidi, bölge, resveratrol konsantrasyonu, vejetasyon süresi, güneşlenme süresi, toplam etkili sıcaklık ve yağış miktarı)

PCA analizinin sonuçları Şekil 2'de verilmiştir. "Eigenvalue" değeri analizi ilk bileşen için %59.13 ve ikinci bileşen için %21.66 olarak hesaplanan analiz güvenilirliğini göstermiştir. İlk iki bileşenin toplam değeri (%80.79) analiz devamlılığı açısından oldukça yeterlidir.



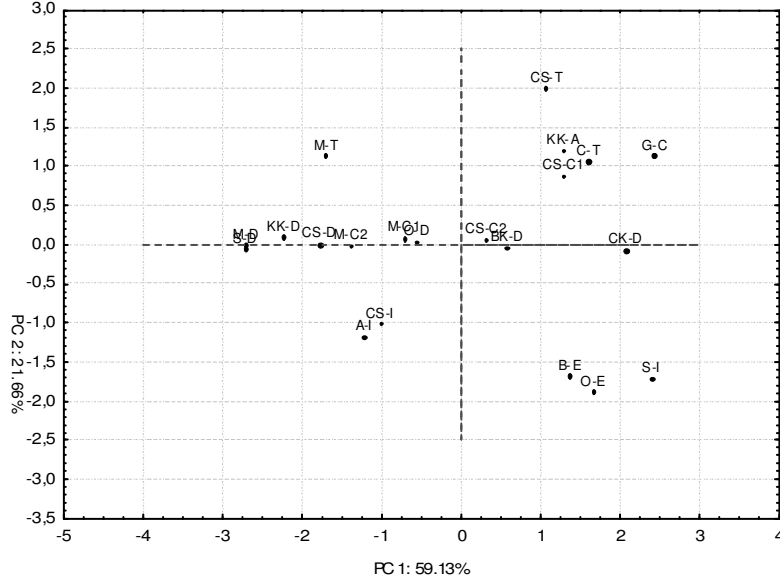
Şekil 2. Yapılan analizlerin "eigenvalue" değeri

Şarapların dağılımı, üzüm çeşidinin bölgeleri, iklim parametreleri ve resveratrol sonuçları PCA analizi açısından değerlendirilmiştir.

Şekil 3'de şarapların dağılımı ile üzüm bölgelerinin ilişkisi verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre 5 ana grup elde edilmiştir. İlk grup Kalecik Karası, Grenache, Cinsaut ve Cabernet Sauvignon şaraplarından oluşmaktadır. İkinci grupta ise Syrah, Boğazkere ve

Öküzgözü yer almaktadır. Üçüncü grupta Cabernet Sauvignon ve Alicante bouchet lokalize olmuştur. Merlot şarapları bu gruplardan ayrılmıştır. Geri kalanlar ise

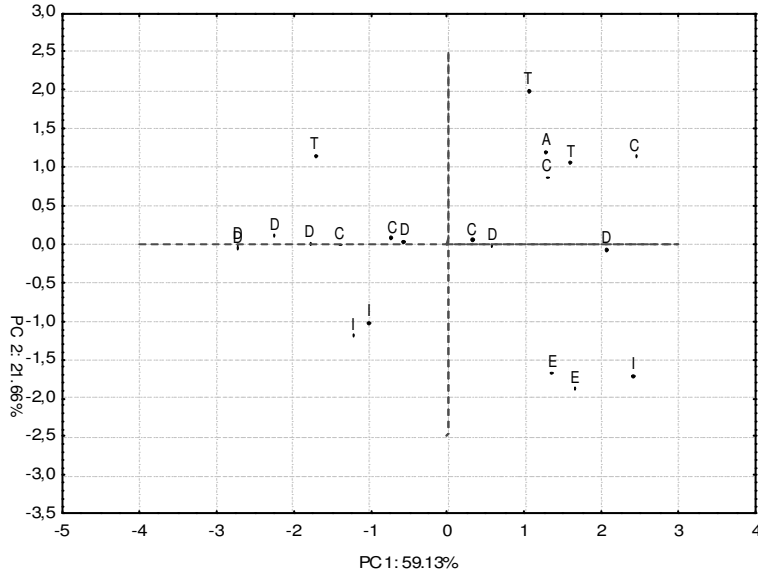
spesifik bir dağılım göstermemiş, yatay bir çizgi göstermiştir.



Şekil 3. PCA tarafından gerçekleştirilen n-boyutlu uzaydaki şarapların dağılımı

Şekil 4'te şarap üretimi için kullanılan üzümlerin coğrafik bölge dağılımları verilmiştir. Ankara, Çanakkale ve Tekirdağ ilk grubu oluşturmuştur. İkinci grupta ise Elazığ ve İzmir bulunmaktadır. Bir sonraki grup İzmir ve Tekirdağ'dan oluşmaktadır.

Parametrelerin değerlendirilmesi Şekil 5'te verilmektedir. Sol alt koordinat olarak resveratrol konsantrasyonu, güneşlenme süresi ve toplam etkili sıcaklık bulunmuştur. Aynı bir grup olarak da vejetasyon süresi ve yağış miktarı belirlenmiştir.



Şekil 4. PCA tarafından gerçekleştirilen n-boyutlu uzaydaki bölgelerin (Denizli-D, Çanakkale-C, Tekirdağ-T, İzmir-I, Ankara-A, Elazığ-E) dağılımı.

Farklı amaçlarla yapılan PCA analizlerine göre ilk iki bileşen aynı yüzdeye sahiptir. Bu noktada en önemli sonuç resveratrol konsantrasyonunun gösterildiği sağ alt koordinatta görülen, analiz edilen parametrelerden olan güneşlenme süresi ve toplam etkili sıcaklıktır. Bunun

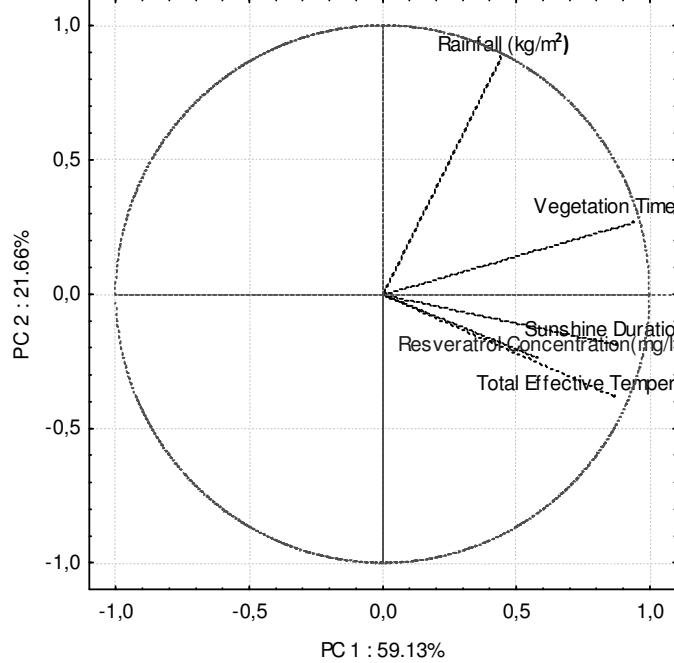
dışında söz konusu bölgede bulunan şaraplar Boğazkere, Syrah ve Öküzgözü'dür. Baskın olan coğrafik bölge Elazığ ve İzmir'dir. Sonuçlar incelendiğinde belirtilen şaraplarda bulunan resveratrol konsantrasyonları üzerinde en etkili parametrelerin

güneşlenme süresi ve toplam etkili sıcaklık olduğu açıkça görülmektedir.

İkinci önemli sonuç vejetasyon süresi ile yağış miktarı parametrelerinin resveratrol konsantrasyonu ile doğrudan bir ilişki içinde olmamasıdır. Bu sonuç Ankara,

Çanakkale ve Tekirdağ gibi bölgeler için önemli olup sık karşılaşılmaktadır.

İzmir bölgesine ilişkin Cabernet Sauvignon ve Alicante Bouchet şaraplarının parametrelerinin bağımsızlığı üçüncü sonuçta görülmektedir. Aynı varsayım Tekirdağ bölgesinden alınan Merlot şarabı için de söylenebilir.



Şekil 5. PCA ile analizi yapılan tüm verilerin değerlendirilmesi

SONUÇ

Şarap ve üzüm çeşidinin resveratrol seviyeleri, coğrafik bölge ve toplam etkin sıcaklık arasında pozitif korelasyon belirlenmiştir. Belirlenen resveratrol miktarlarının küme (cluster) ve PCA sonuçları doğrudan üzüm çeşitlerinin bölgesi ile dolaylı olarak da vejetasyon süresi (gün) ve güneşlenme süresiyle (saat) (her ikisi de toplam etkili sıcaklık (C) ve yağmur miktarı (kg/m²) ile çok yakın ilişkili olan) ilişkili bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Siemann, E.H., and Creasy, L.L., 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* (43): 49-52.
- [2] Kaul, N., Siveski-Illickovic, N., Hill, M., Slezak, J., Singal, P.K., 1993. Free radicals and the hearth. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* (30): 55-67.
- [3] Olson, O.R., Naugle, J.E., Zhang, X., Bomser, J.A., Meszaros, 2005. Inhibition of cardiac fibroblast poliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am. J. Physio. I Heart Circ.* (3): 288-290.
- [4] Bravo, M.N., Silva, S., Coelho, A.V., Boas, L.V., Bronze, M.R. 2006. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta* (56): 84-92.

- [5] Gürbüz, O., Göçmen, D., Dağdelen, F., Gürsoy, M., Aydın, S., Şahin, İ., Büyükuysal, L., Usta, M., 2007. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chem.* 100: 518-525.
- [6] Anlı, E., Vural, N., Demiray, S., Özkan, M., 2006. Trans-resveratrol and other phenolic compounds in Turkish red wines with HPLC. *J. Wine Res.* 17(2): 117-125.
- [7] Denzer, H., 1991. Resistenz von rebsorten gegen *Plasmopara viticola*. Justus- Liebig Universität Giessen, Germany, Inaugural-Dissertation, 133.
- [8] Adıgüzel, B., Çetinkaya, N., Yücel, U., 2010. Sauvignon ve Merlot şaraplarının resveratrol düzeyleri ve ekolojik koşulların etkileri. *Gıda* 35(1): 27-32.
- [9] Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., Trollat, P. 1995. Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 46(1): 1-3.
- [10] Soleas, G.J., Goldberg, D.M., NG, E., Karumanchiri, A., Tsang, E., Diamandis, E.P., 1997. Comparative evaluation of four methods for assay of *cis*- and *trans*-resveratrol. *Am. J. Enol. Vitic.* 48(2): 169-176.
- [11] Li, X.D., Wu, B.H., Wang, L.J. 2009. Changes in trans-resveratrol and phenolic compounds in grape skin and seeds under low temperature storage after

- post-harvest UV-Irradiation. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 84(2): 113-118.
- [12] Adıgüzel, B., Yücel, U., Çetinkaya, N., 2009. Farklı bölgelerin üzümlerinden üretilen Türk şaraplarında resveratrol düzeyleri. *Gıda* 34(6): 381-386
- [13] Threlfall, R.T., Morris, J.R., Mauromoustakos, A., 1999. Effect of variety, ultraviolet light exposure, and enological methods on the *trans*-resveratrol of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(1):57-64.
-