

## FARKLI VİNİFİKASYON TEKNİKLERİNİN KALECİK KARASI ŞARAPLARINDAKİ FENOLİK BİLEŞİK İÇERİKLERİNE ETKİSİ\*

Hande Tahmaz\*\*, Gökhan Söylemezoğlu

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / *Received*: 28.11.2013

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 05.02.2014

Kabul tarihi / *Accepted*: 08.03.2014

### Özet

Fenolik bileşikler şaraba duyuşsal özelliklerini katmakla beraber, insan sağlığı açısından yararları olduğu bilinen bileşiklerdir ve miktarları vinifikasyon tekniklerine göre değişiklik göstermektedir. Bu araştırmada Kalecik Karası üzüm çeşidinden termovinifikasyon ve soğuk maserasyon uygulamaları ile elde edilen şaraplarda toplam antosiyanin, toplam fenolik bileşik, antioksidan aktivite, kateşin, epikateşin, rutin, trans-resveratrol ve cis-resveratrol miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmanın bitkisel materyalini oluşturan Kalecik Karası üzüm çeşidi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kalecik Bağcılık Araştırma ve Uygulama İstasyonu'nda bulunan bağdan 1.100 dansitede hasat edilmiştir. Soğuk maserasyon ve termovinifikasyon uygulamaları öncesi üzümler şaraba işlenmeden önce 72 saat soğuk hava deposunda tutulmuşlar ve sırası ile 1.116 ve 1.115 dansitede şaraba işlenmişlerdir. Araştırma sonucunda soğuk maserasyon uygulamasının fenolik bileşik içeriklerinde düşüşe sebep olduğu, termovinifikasyon uygulamasının ise şaraplarda antioksidan aktivite, toplam fenolik bileşik, kateşin, rutin ve trans-resveratrol içeriklerini artırdığı tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Fenolik bileşik, antioksidan, Kalecik Karası, kırmızı şarap, HPLC-DAD.

## EFFECTS of DIFFERENT VINIFICATION TECHNIQUES on PHENOLIC COMPOUNDS in KALECİK KARASI WINES

### Abstract

Phenolic compounds give sensory properties to wine and also they have benefits for human health. Their quantities change according to vinification techniques. This research was conducted to determine the anthocyanin, total phenolic compounds, antioxidant activity, catechin, epicatechin, rutin, trans-resveratrol and cis-resveratrol levels in Kalecik Karası wines obtained by cold maceration and thermovinification techniques. Kalecik Karası, plant material of this research, harvested in 1.100 density in Ankara University Faculty of Agriculture Kalecik Viticultural Research and Experiment Station. Before the cold maceration and the thermovinification treatment, grapes are kept in cold storage for 72 hours and processed into wine 1.116 and 1.115 density respectively. As a result of this research, it was found that cold maceration decreased phenolic compounds in wine and thermovinification increased antioxidant activity, total phenolic compounds, catechin, rutin and trans resveratrol content in wines.

**Keywords:** Phenolic compound, antioxidants, Kalecik Karası, red wine, HPLC-DAD.

\* Bu çalışma birinci yazarın doktora tezinin bir bölümüdür.

\*\* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ tahmazhande@gmail.com,

☎ (+90) 312 596 1631,

☎ (+90) 312 317 9119

## GİRİŞ

Fenol asitleri grubu içerisinde yer alan trans-veratrol, tanenler grubu içerisinde yer alan kateşin ve epikateşin ile flavonoidler grubu içerisinde rutin in insan sağlığına olumlu etkilerinin tespit edilmesinden itibaren bu konu ile ilgili çalışmalar günümüzde giderek artmaya başlamıştır. Özellikle resveratrolün yaşlanmayı kontrol eden SIRT 1 enziminin etkinlik mekanizmasıyla ilgili son yıllarda *in vitro* ve *in vivo* olarak çok önemli çalışmalar yapılmıştır (1, 2). Antioksidan özellikteki fenolik bileşiklerin kardiyoprotektif (kalbi koruyucu) (3-5), vazorelaksasyon (damar açıcı) (4, 6), anti-inflamatuar (enfeksiyonu önleyici) (3- 8), reaktif oksijen yakalayıcı (9, 10) ve antikanserojen (11,12) özellik göstermesi yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Üzüm ve şaraplardaki fenolik bileşiklerin miktarları hastalık etmenleri (13-15), UV uygulaması (16, 17), kimyasal uygulamalar (18-24), çeşit ve anacın etkisi (25), doku farklılıkları (26-29), iklimin etkisi (30), budama ile terbiye şeklinin etkisi (31) ve vinifikasyon tekniklerine göre (32-34) büyük ölçüde değişiklik gösterebilmektedir. Bu çalışmada da ülkemizin en önemli kırmızı şaraplık üzüm çeşitlerinden olan Kalecik Karası üzüm çeşidinden farklı vinifikasyon teknikleri ile elde edilen şaraplarda fenolik bileşik içerikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

Bitkisel materyal olarak Ankara'nın Kalecik ilçesinde kurulmuş olan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kalecik Bağcılık Araştırma ve Uygulama İstasyonu'nda bulunan 5 BB anacı üzerine aşılanmış Kalecik Karası çeşidine ait 135 omca kullanılmıştır. Parseldeki omcalar 1995 yılında 2m x 3m sıra üzeri ve arası mesafelerle dikilmiş olup, 70 cm gövde yüksekliği ve çift kollu sabit kordon budama şekli verilmiş olan omcalar için 5 sıra telli çift T destek sistemi kullanılmıştır. Parselde gübreleme ve sulama damla sulama ile gerçekleştirilmektedir. Araştırmada bitkisel materyal olarak Kalecik Karası çeşidinin 2012 yılı hasadından elde edilen üzümler ve bu üzümlerden yapılan şaraplar kullanılmıştır.

### Yöntem

#### Kalecik Karası Üzümlerinin Şaraba İşlenmesi Klasik Maserasyon

1,100 dansitede hasat edilen üzümler klasik maserasyonla şaraba işlenmişlerdir. Sap ayırma ve tane çatlatma işlemi sırasında 60 mg/L potasyum

metabisülfite ile kükürtlenmiş ve 200 L'lik soğutma ceketli mikrovinifikasyon tankına alınmışlardır. Maserasyonun ilk günü 20 g/hL maya (Laffort FX10) ve 30 g/hL maya besini (Laffort Dynastart) ilave edilerek alkol fermantasyonu başlatılmıştır. Maserasyon 9 günde tamamlanmıştır. 7. günden itibaren dansite 1,000'in altına düşmüş ve şeker analizleri yapılmıştır. Maserasyonun 9. günü şeker 1.2 g/L olarak ölçülmüş ve presleme yapılmıştır. Presleme işlemi Enoventa marka pres ile gerçekleştirilmiştir. Presleme işleminin ardından 250 g/250 hL oranında bakteri (Laffort 450 Preac) ve 1250 g/250 hL oranında bakteri besini (Laffort PrePreac) ilavesi yapılarak malolaktik fermantasyon başlatılmış ve sıcaklık 20 °C de ( $\pm 1$  °C) tutulmuştur. Malolaktik fermantasyonun takibi için düzenli olarak kağıt kromatografisi ile malik asit ve damıtma yöntemi ile uçur asit takipleri yapılmıştır. Malolaktik fermantasyon boyunca uçur asit, sülfirik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) cinsinden 0.078 g/L ile 0.25 g/L arasında değişen değerler göstermiştir. Üçer günlük aralıklarla kağıt kromatografisi yöntemiyle tamamlanıp tamamlanmadığı belirlenen malolaktik fermantasyonun 25 gün süren ölçümler sonucunda tamamlandığı belirlenmiş, tanklar havalı bir şekilde damacanalara aktarılmış SO<sub>2</sub> oranı 60 mg/L olarak ayarlanmıştır.

#### Soğuk Maserasyon

Hasat edilen üzümler 72 saat 0 °C ( $\pm 1$  °C)'lik soğuk hava deposunda tutulduktan sonra 1,116 dansitede şaraba işlenmişlerdir. Klasik maserasyondan farklı olarak maserasyonun ilk 3 günü 13 °C de soğuk maserasyona tabi tutulmuştur. Maserasyonun 6. günü ise tanktaki cibreye 20 cm yükseklikten ve 1 saat boyunca 254 nm'lik UV-C uygulaması yapılmıştır. UV-C uygulaması sırasında her biri 36 W gücünde 4 adet lamba kullanılmıştır (Philips TUV PL-L).

#### Termovinifikasyon

Hasat edilen üzümler 72 saat 0 °C ( $\pm 1$  °C)'lik soğuk hava deposunda tutulduktan sonra 1,115 dansitede şaraba işlenmişlerdir. Klasik maserasyondan farklı olarak maserasyonun ilk günü sıcaklıkları hızlı bir şekilde 80 °C'ye çıkarılıp 24 °C'ye düşürülmüştür. Maserasyonun 6. günü ise tanktaki cibreye 20 cm yükseklikten ve 1 saat boyunca 254 nm'lik UV-C uygulaması yapılmıştır. UV-C uygulaması sırasında her biri 36 W gücünde 4 adet lamba kullanılmıştır (Philips TUV PL-L).

#### Üzümlerde Yapılan Analizler

Üzümlerde hasat sonrası toplam suda çözünebilir kuru madde, pH ve toplam asitlik (mg/g) analizleri yapılmıştır.

**Şaraplarda Yapılan Analizler**

Şaraplarda genel asitlik (mg/g), pH, indirgen şeker (g/L), alkol (%h/h), serbest SO<sub>2</sub> (mg/L), uçar asit (g/L) analizleri yapılmıştır.

**Toplam Fenolik Bileşik Analizi**

Kalecik Karası üzüm çeşidinden elde edilen şaraplarda toplam fenolik bileşik analizleri Singleton ve Rossi 1965 (35)'e göre modifiye edilerek yapılmıştır. Örneklere ait toplam fenolik bileşik sonuçları gallik asit cinsinden verilmiştir. Bunun için 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600 mg/L (R<sup>2</sup>= 0.9948) konsantrasyonlarındaki gallik asitten, 500, 400, 300, 200, 100 mg/L (R<sup>2</sup>= 0.9986) konsantrasyonlarındaki gallik asitten ve 80, 50, 25,10 mg/L (R<sup>2</sup>= 0.9841) konsantrasyonlarındaki gallik asitten 3 adet gallik asit eğrisi çıkarılmıştır ve örneklerin konsantrasyonlarına uygun R<sup>2</sup> denklemi seçilerek sonuçların doğruluğunu artırmak amaçlı her okuma uygun denklemde hesaplanmıştır. Okumalar "Analitik Jena" marka "Specord 200" model spektrofotometre cihazı ile 765 nm'de yapılmış ve sonuçlar mg/L Gallik Asit cinsinden verilmiştir.

**Toplam Antosiyanin Analizi**

Kalecik Karası üzüm çeşidinden elde edilen şaraplarda toplam antosiyanin analizlerinde Giusti ve Wrolstad 2001 (36) tarafından geliştirilen pH diferansiyel metodu kullanılmıştır. Toplam antosiyanin miktarları üzümde baskın bulunan malvidin-3-glukozid cinsinden hesaplanmıştır. Okumalar "Analitik Jena" marka "Specord 200" model spektrofotometre cihazı ile 520 ve 700 nm'de yapılmış ve sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplanarak, mg/L olarak verilmiştir.

Toplam antosiyanin miktarı (mg/L) = [(A)x(MW)x(SF)x1000]/[ (ε)x(L)]

A: Absorbans farkı (pH 1.0 ve 4.5 değerlerinde ölçülen absorbans farkı)

MW: Baz olarak alınacak antosiyaninin molekül ağırlığı

SF: Seyreltme faktörü

e: Molar absorpsiyon katsayısı

L: Absorbans ölçüm küvetinin tabaka kalınlığı (cm)

**Antioksidan Aktivite Analizi**

Kalecik Karası üzüm çeşidine ait şaraplarda

antioksidan aktivite tayini TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity) yöntemi ile Re ve ark. 1999 (37)'a göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 2.45 mM potasyum persülfat içeren ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilenbenzotiazolin-6-sulfonik asit) diammonium salt) ≥98-Sigma A1888) çözeltisi hazırlanmıştır. Elde edilen radikal çözelti 12-16 saat karanlıkta bekletilmiştir ve en fazla 2 gün analizlerde kullanılmıştır. ABTS ve ekstraktların seyreltilmesi amacıyla 0.1 M pH'sı 7.4 olan PBS (Fosfat buffer tuzu) hazırlanmıştır. Okumalar PBS çözeltisine karşı yapılmıştır ve her analiz öncesi ABTS, 734 nm'de 0.700 (±10) absorbans verecek şekilde PBS ile seyreltilmiştir. Analiz 10 µL, 20 µL, 30 µL'lik örneklerle 6 dakika sonunda 3 farklı inhibisyon oranı elde edilecek şekilde yapılmıştır. Sonuçların hesaplanması için 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM'lik konsantrasyonlardaki trolox standardı (R-(+)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid %98-Aldrich 391913) kullanılarak elde edilen standart eğriden (R<sup>2</sup>= 0.9996) yararlanılmış ve sonuçlar µmol trolox/mL olarak verilmiştir.

**Fenolik Bileşiklerin Analizi****Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu**

Şaraplardan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu Waterhouse 2005 (38)'e göre modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Vakum manifoldu (Agilent SampliQ 12 spe Manifold) ile Seppak C18 kartuşlar (Waters Sep-Pak 1 cc C18 Cartridges) kullanılarak etil asetat, HCL'li metanol (%0.01) ve %0.01'lik HCl ile kartuş şartlandırma işlemi sonrası fenolik bileşik ekstraktları elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar 40 °C'lik sıcaklıkta azot gazı altında kurutulduktan sonra fenolik bileşikler %0.01'lik HCl ile ultrasonik banyo yardımıyla alınmışlardır. Son hacim 2 mL'ye tamamlanmış ve 0.45 µm'lik PVDF (Polyvinylidene Difluoride) filtrelerden geçirilerek koyu renkli viallere alınarak HPLC cihazına okuma için verilmişlerdir.

**HPLC Koşulları**

Kateşin, epikateşin, rutin, trans-resveratrol ve cis-resveratrol miktarlarının belirlenmesi için "Shimadzu" marka "LC 10 AT VP" model HPLC cihazı ve "DAD SPD M10 AVP" dedektör kullanılmıştır. HPLC' nin çalışma koşulları Çizelge 1'de verilmiştir. Fenolik bileşiklerin tanısı kullanılan standart

Çizelge 1. HPLC cihazının çalışma koşulları.

Table 1. HPLC conditions

HPLC kolonu <i>HPLC Column</i>	Phenomenex Gemini 260x4.60 mm C <sub>18</sub>
Enjekte edilen miktar <i>Injected volume</i>	30 µL
Taşıyıcı faz <i>Solvent</i>	A = Su/ Formik asit (99/1: h/h) B= Asetonitril (100/100: h/h) A = Water/ Formic acid (99/1: h/h) B= Asetonitrile (100/100: h/h)
Akış hızı <i>Flow rate</i>	0.7 mL/dakika 0.7 mL/minute

maddelerin alıkonma zamanları ve spektrumlarından yararlanılarak yapılmıştır. Standart madde olarak kateşin, epikateşin, rutin ve trans-resveratrol (Sigma) kullanılmıştır. Cis-resveratrolü belirlemek için ticari olarak standart bulunmadığından hazırlanan trans-resveratrol standardı 254 nm dalga boyundaki UV-C ışığına yarım saat maruz bırakılarak trans formun cis forma dönüşümü sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Miktar tayininde her bir standart için 7 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanarak HPLC'ye enjekte edilmiş ve her bir standart için kalibrasyon eğrileri oluşturularak bu eğrilerden fenolik bileşiklerin miktarları belirlenmiştir.

#### İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar ANOVA ile değerlendirilmiş ve önemli bulunan farklılıklar için Duncan testi yapılmıştır.

### ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

#### Üzümlerde Yapılan Analiz Sonuçları

Üzümlerde hasat sonrası gerçekleştirilen toplam suda çözünebilir kuru madde (%), pH ve toplam asitlik (mg/g) sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir.

#### Şaraplarda Yapılan Analiz Sonuçları

Şaraplarda yapılan analiz sonuçları Çizelge 3'te verilmiştir.

#### Toplam Fenolik Bileşik, Toplam Antosiyanin ve Antioksidan Aktivite (TEAC) Analiz Sonuçları

Çizelge 4'ten de anlaşıldığı üzere termovinifikasyon uygulaması şaraplardaki antioksidan aktivite ve toplam fenolik bileşik içeriğini artırırken, toplam antosiyanin içeriğinde azalışa sebep olmuştur.

Yapılan bir çalışmada, Kalecik Karası şaraplarındaki toplam fenolik bileşik içerikleri 1070 ile 1837 mg/L arasında değişen değerler göstermiştir (39, 40).

Bu çalışmada ise kontrol grubunun toplam fenolik bileşik içeriği 3150 mg/L iken termovinifikasyon uygulaması ile bu değer 6574 mg/L'ye çıkarılmıştır. 2010 yılında yapılan bir diğer çalışmada soğuk maserasyon uygulaması sonucu Syrah kırmızı şaraplarında toplam antosiyanin içeriği 271.11 mg/L ve toplam fenolik bileşik içeriği ise 2841.57 mg/L olarak belirlenmiştir (41). Antosiyanin içeriğinin çalışmamızda daha düşük miktarda saptanması çeşit farklılığı ile ilgilidir.

#### Fenolik Bileşik Analiz Sonuçları

HPLC cihazı ile şaraplardaki kateşin, epikateşin, rutin, trans-resveratrol ve cis-resveratrol miktarlarını saptama amaçlı Çizelge 5'te görüldüğü üzere kateşin, epikateşin ve cis-resveratrol için 280 nm, rutin için 365 nm ve trans resveratrol için 306 nm'de HPLC-DAD okumaları gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda fenolik bileşiklerin alıkonma zamanları, kalibrasyon denklemleri, R<sup>2</sup> değerleri, dedeksiyon ve kuantifikasyon limitleri ile geri kazanım oranlarının verildiği kalibrasyon parametreleri Çizelge 5'te verilmiştir.

Termovinifikasyon uygulaması kateşin, rutin ve trans-resveratrol içeriklerinde artışa sebep olmuştur (Çizelge 6). Kalecik Karası şaraplarında yapılan bir araştırma sonucu kateşin içeriği 14.69 mg/L, epikateşin içeriği 8.99 mg/L, rutin içeriği 14.92 mg/L olarak saptanmıştır (42). Kateşin ve epikateşin içeriği çalışmamızın kontrol grubunda daha yüksekken, rutin içeriği daha düşük değerde

Çizelge 2. Hasat sonrası üzüm şıralarında gerçekleştirilen olgunluk analiz sonuçları.

Table 2. Post harvest maturity analysis results in grape must.

Toplam suda çözünebilir kuru madde (%) Total soluble solids content	pH pH	Toplam asitlik (g/L)* Total acidity
26.12	2.81	5.47

\*Tartarik asit cinsinden \*In terms of tartaric acid

Çizelge 3. Şaraplarda yapılan genel analiz sonuçları.

Table 3. Results of general wine analysis.

Analizler Analysis	Klasik maserasyon Classical maceration	Soğuk maserasyon Cold maceration	Termovinifikasyon Thermovinification
Genel asitlik (g/L)* Total acidity	5.157	5.337	5.838
pH pH	3.70	3.62	3.53
İndirgen şeker (g/L) Residual sugar	1.2	1.1	1.3
Alkol (% h/h) Alcohol	15.77	14.80	16.38
Serbest SO <sub>2</sub> (mg/L) Free SO <sub>2</sub>	27.33	28.67	27.67
Uçar asit (g/L)** Volatile acid	0.25	0.32	0.21
Uçar asit (g/L)*** Volatile acid	0.30	0.39	0.26
Dansite (g/cm <sup>3</sup> , 20°C) Density	0.9878	0.9883	0.9881

\* Tartarik asit cinsinden, \*\*Sülfirik asit cinsinden, \*\*\*Asetik asit cinsinden

\*In terms of tartaric acid, \*\*In terms of sulphuric acid, \*\*\*In terms of acetic acid.

Çizelge 4. Şaraplara ait antioksidan aktivite (TEAC), toplam antosiyanin ve toplam fenolik bileşik analiz sonuçları.  
Table 4. Results of antioxidant activity (TEAC), total anthocyanin and total phenolic compounds of wines.

	Antioksidan Aktivite (TEAC) ( $\mu\text{mol Trolox/mL}$ ) Antioxidant Activity (TEAC)	Toplam Antosiyanin (mg/L) Total Anthocyanin	Toplam Fenolik Bileşik (mg/L) Total Phenolic Compounds
Klasik maserasyon <i>Classical maceration</i>	9.5 $\pm$ 0.05C	69.0 $\pm$ 3.00	3150.0 $\pm$ 28.00B
Soğuk maserasyon <i>Cold maceration</i>	12.7 $\pm$ 0.77B	74.5 $\pm$ 0.50	2758.0 $\pm$ 48.00C
Termovinifikasyon <i>Thermovinification</i>	21.0 $\pm$ 0.01A	60 $\pm$ 2.00	6574.5 $\pm$ 98.50A

*P*<0.05: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan testine göre önemlidir.  
*Different superscripts in the same column indicate statistical differences at the P<0.05 level.*

bulunmuştur. 2010 yılında Syrah kırmızı şaraplarında soğuk maserasyonun etkisinin incelendiği bir çalışmada kateşin 55.03 mg/L, epikateşin 76.14 mg/L olarak bulunmuştur (41). Bizim değerlerimizin daha düşük miktarlarda bulunmasında, ekstraksiyon sırasında HPLC kromatogramlarında fenolik bileşik piklerinin ayrımının sağlanması için kullanılan C18 Seppak kartuşların etkisi olduğu düşünülmektedir.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Fenolik bileşik içerikleri şarap elde edilen üzüm çeşidine ve yetiştiricilik koşullarına göre değişiklik gösterdiği gibi, şarap yapımı sırasında kullanılan maya, enzim, durultma ajanları, fermantasyon sıcaklığı, fermantasyon süresi, farklı maserasyon teknikleri, olgunlaştırma gibi vinifikasyon tekniklerine göre de önemli farklılıklar göstermektedir. Üzümlerde stilbenlerin sentezi fungal enfeksiyon, yaralama, UV ışını uygulamaları

gibi (43-51) stres faktörleriyle artış göstermektedir. Ayrıca fenolik bileşiklerin tamamı için geçerli olan üzüm çeşidi, toprak yapısı ve vinifikasyon farklılıkları da şaraptaki trans resveratrol düzeyini etkilemektedir (52-60). Cis resveratrol ise *Vitis vinifera* tanelerinde çok nadir saptanır. Cis resveratrol; cis glukozid formunun hidrolize olması (60) ya da trans formun UV ışını altında izomerasyonu ile oluşmaktadır (61). Üzümlerdeki trans resveratrol sentezi stilben sentaz (STS) enzimi ile p-kumaril-CoA ve malonil-CoA'nın substrat olarak kullanılması ile gerçekleşir (62). Aynı substratlar kalkon üretiminde kalkon sentaz (CHS) içinde flavonoidlerin sentezinde rol oynar (63). UV ışını uygulaması üzümde resveratrol sentezini artırır (46) bunun sebebi CHS ve STS enzimlerinin aynı substratlardan etkilenmesi ve UV ışınlarının STS indüksiyonunda etkili olmasıdır (64). Soğuk maserasyon ve termovinifikasyon uygulamalarının şaraplardaki fenolik bileşik

Çizelge 5. Fenolik bileşik miktarlarının belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon parametreleri.  
Table 5. Calibration parameters used in determination of phenolic compounds quantities.

Fenolik Bileşikler <i>Phenolic Compounds</i>	Alıkönme Zamanı <i>Retention Time</i>	$\lambda_{\text{vis}}$ nm	Kalibrasyon Denklemi <i>Calibration Curve</i>	R <sup>2</sup>	Dedeksiyon Limiti <i>Limit of Detection</i>	Kuantifikasyon Limiti <i>Limit of Quantification</i>	Geri Kazanım Oranı (%) <i>Recovery</i>
Kateşin <i>Catechin</i>	28.6	280	y= 15323x-160.89	0.9997	0.96	2.91	89.76
Epikateşin <i>Epicatechin</i>	33.7	280	y= 33977x-7173	0.9999	0.69	2.09	88.81
Rutin <i>Rutin</i>	43.2	365	y= 74629x-24943	0.9999	0.45	1.37	88.92
Trans resveratrol <i>Trans resveratrol</i>	54.9	306	y= 403404x-78716	0.9998	0.28	0.86	89.72
Cis resveratrol <i>Cis resveratrol</i>	55.2	280	y=132264x+22.462	0.9981	0.009	0.026	-

Çizelge 6. Şaraplara ait fenolik bileşik miktarları.  
Table 6. Phenolic compound quantities of wines

	Klasik Maserasyon <i>Classical maceration</i>	Soğuk maserasyon <i>Cold maceration</i>	Termovinifikasyon <i>Thermovinification</i>
Kateşin (mg/L) <i>Catechin</i>	17.7 $\pm$ 0.36A	9.00 $\pm$ 0.09B	18.40 $\pm$ 0.74A
Epikateşin (mg/L) <i>Epicatechin</i>	10.02 $\pm$ 0.12A	4.08 $\pm$ 0.14C	8.35 $\pm$ 0.39B
Rutin(mg/L) <i>Rutin</i>	0.92 $\pm$ 0.01B	0.88 $\pm$ 0.01B	2.46 $\pm$ 0.02A
Trans resveratrol(mg/L) <i>Trans resveratrol</i>	0.56 $\pm$ 0.00B	0.49 $\pm$ 0.01C	0.71 $\pm$ 0.02A
Cis resveratrol (mg/L) <i>Cis resveratrol</i>	0.32 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.00

*P*<0.05: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan testine göre önemlidir.  
*Different superscripts in the same row indicate statistical differences at the P<0.05 level.*

içeriklerine olan etkisi bilinmekle birlikte, bu çalışma, soğuk maserasyon ve termovinifikasyon uygulamalarına ek olarak şaraplara uygulanan UV-C uygulaması alanında ilk çalışma olması yönünden önem taşımaktadır. Araştırma sonuçlarına göre 80°C'de gerçekleştirilen termovinifikasyon ve UV-C uygulamasının, şaraplarda kateşin, rutin ve trans resveratrol miktarlarında artışa sebep olduğu, ayrıca antioksidan aktivite ile toplam fenolik bileşik miktarlarını da 2 kat kadar artırdığı saptanmıştır. Soğuk maserasyon ve UV-C uygulaması ise fenolik bileşik miktarlarında düşüşe sebep olurken, antioksidan aktivite ve toplam antosiyanin miktarlarını artırmıştır. Söz konusu çalışmanın farklı çeşitlerde de denemesi vinifikasyon tekniklerinin fenolik bileşikler üzerine etkisinin daha ayrıntılı olarak ortaya konulmasını sağlayacaktır.

#### TEŞEKKÜR

"13L4347001" kod numaralı ve "Kalecik Karası (*Vitis vinifera* L. Cv.) ve Boğazkere (*Vitis vinifera* L. Cv.) Üzüm Çeşitlerinde Farklı Yetiştiricilik, Depolama, UV Uygulaması ve Vinifikasyon Tekniklerinin Bazı Fenolik Bileşikler Üzerine Etkileri" ve "11B4347003" kod numaralı ve "Ülkemizde Yetiştirilen Asma Tür ve Çeşitlerinde Antioksidan, Resveratrol ve Diğer Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesi Üzerinde Bir Araştırma" konulu projelere sağladığı destek için Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'ne şükranlarımızı sunarız.

#### KAYNAKLAR

1. Borra MT, Smith BC, Denu JM. 2005. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem*, 280, 17187-17195.
2. Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, Napper A, Curtis R, DiStefano PS, Fields S, Bedalov A, Kennedy BK. 2005. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem*, 280, 17038-17045.
3. Das DK, Maulik N. 2006. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv*, 6, 36-47.
4. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. 1993. Endothelium-Dependent Vasorelaxing Activity Of Wine Or Other Grape Products. *Am J Physiol*, 265, H774-H748.
5. Klinge CM, Risinger KE, Watts MB, Beck V, Eder R, Jungbauer A. 2003. Estrogenic activity in white and red wine extracts. *J Agri Food Chem*, 51, 1850-1857.

6. Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV. 1999. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism of the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 419-426.
7. Wang Z, Huang Y, Zou J, Cao K. 2002. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Mol Med*, 9, 77-9.
8. Pendurthi UR, Rao LV. 2002. Resveratrol suppresses agonist-induced monocyte adhesion to cultured human endothelial cells. *Thromb Res*, 106, 243-8.
9. Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad MCV. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr*, 81, 277S-283S.
10. Sener G, Tugtepe H, Yuksel M. 2006. Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Med Res Rev*, 37, 822-829.
11. Chao C. 2007. Associations between beer, wine, and liquor consumption and lung cancer risk: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 16:2436-2447.
12. Han XT, Zheng FM, Foss S Ma TR, Holford P, Boyle B, Lead-erer P, Zhao M Dai, Y Zhang. 2010. Alcohol consumption and non-Hodgkin lymphoma survival. *J Cancer Surviv*, 4:101-109.
13. Langcake P, Pryce RJ. 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol*, 9, 77-86.
14. Bavaresco L, Petegolli D, Cantu E, Fregoni C, Chiusa G. And Trevisan M. 1997. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 36 (2), 77-83.
15. Romero-Pérez AI, Lamuela-Raventós RM, Andrés-Lacueva C. And De La Torre-Boronat MC. 2001. Method of the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *J Agric Food Chem*, 49, 210-215.
16. Langcake P, Pryce RJ. 1977. The production of resveratrol and viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Photochem*, 16, 1193-1196.
17. Melzoch K, Hanzlikova I, Filip V, Buckiova D and Smidrkal J. 2001. Resveratrol in parts of vine and wine originating from Bohemian and Moravian vineyard regions. *Agric Conspec Sci*, 66(1), 53-57.

18. Adrian M, Jeandet P, Bessis R. And Joubert MJ. 1996. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with Aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>). *J Agric Food Chem*, 44,1979-1981.
19. Coulomb C, Lizzi Y, Coulomb PJ, Roggero JP, Coulomb PO and Agullon O. 1999. Can copper be an elicitor? *Phytomorphology*, 512, 41-46.
20. Ban T, Shiozaki S, Ogata T and Horiuchi S. 2000. Effects of abscisic acid and shading treatments on the levels of anthocyanin and resveratrol in skin of Kyoho grape berry. *Acta Horticulturae*, 514, 83-89.
21. Bavaresco L and Fregoni C. 2001. Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds.. In: Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine. Ed. Roubelakis-Angelakis, K. A., Ed.: *Kluwer Acad Publ Netherlands*, P: 153-182
22. Tinttunen S, Lehtonen P. 2001. Distinguishing organic wines from normal wines on the basis of concentrations of phenolic compounds and spectral data. *Euro Food*, 212(3), 390-394.
23. Artés-Hernandez F, Artés F, Tomás-Baerberán FA. 2003. Quality and enhancement of bioactive phenolics in cv. Napoleon table grapes exposed to different postharvest gaseous treatments, *J Agric Food Chem*, 51, 5290-5295.
24. Bavaresco L, Vezzulli S, Battilani P, Giorni P, Pietri A. And Bertuzzi T. 2003. Effect of ochratoxin A-producing Aspergilli on stilbenic phytoalexin synthesis in grapes. *J Agric Food Chem*, 51, 6151-6157.
25. Göktürk Baydar N. 2006. Organic Acids, Tocopherols and Phenolic Compositions of Some Turkish Grape Cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*, 42, 2, 156-159.
26. Souquet JM, Labarbe B, Le Guerneve C, Cheyneir V, Moutounet M. 2000. Phenolics Composition of Grape Stems. *J Agric Food Chem*, 48, 1076-1080.
27. Monagas M, Garrido I, Bartolome B, Gomez Cordovez C. 2006. Chemical Characterization of Commercial Dietary Ingredients from *Vitis vinifera* L. *Anal Chim Acta*, 563, 401-410.
28. Poudel RP, Tamura H, Kataoka I, Mochioka R. 2008. Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Skins and Seeds of Five Wild Grapes and Two Hybrids Native to Japan. *J Food Compos Anal*, 21, 622-625.
29. Özden M, Vardin H. 2009. Şanlıurfa Koşullarında Yetiştirilen Bazı Şaraplık Üzüm Çeşitlerinin Kalite ve Fitokimyasal Özellikleri. *HRÜZF Dergisi*, 13(2):21-27.
30. Melzoch K, Hanzlikova I, Filip V, Buckiova D. And Smidrkal J. 2001. Resveratrol in parts of vine and wine originating from Bohemian and Moravian vineyard regions. *Agric Consp Sci*, 66(1), 53-57.
31. Prajitna A, Dami E I, Steiner E T, Ferree C D, Scheerens C J, Schwartz JS. 2007. Influence of Cluster Thinning on Phenolic Composition, Resveratrol, and Antioksidant Capacity in Chambourcin Wine. *Am J Enol Vitic*, 58,3.
32. Pezet R, Cuenat P. 1996. Resveratrol İn Wine: Extraction from Skin During Fermentation and Post-Fermentation Standing of Must From Gamay Grapes. *Enol Vitic*, Vol. 47, No:3.
33. Anlı E. 2004. Farklı Şarap İşleme Yöntemlerinin Kalecik Karası Şarabının Fenol Bileşimi Ve Antioksidan Kapasitesi Üzerine Etkisi. *Gıda*, 29 (6):451-455.
34. Leblanc M. R. 2006. Cultivar, juice extraction, ultra violet irradiation and storage influence the stilbene content of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.).Ph.D. Louisiana State University. Louisiana. 120 p.
35. Singleton VL, Rossi JJA. 1965. Colorimetric of totalphenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16(3): 144-158.
36. Giusti M, Wrolstad R. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1-F1.2.13
37. Re R, Pellegrini, N, Proteggente A, Pannala A, Yang M. And Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Biol Med*, 26, 1231-1237.
38. Waterhouse AL. 2005. Determination of total fenolics, in *Handbook of Food Analytical Chemistry*, ed. By Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM, Sporns P. John Wiley & Sons Inc; New Jersey, p. 463-470.
39. Anli R E, Vural N. 2009. Antioxidant Phenolic Substances of Turkish Red Wines from Different Wine Regions. *Molecules*, 14, 289-297.
40. Porgalı E, Büyüktünel E. 2012. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Res Int*, 45 (2012) 145–154.
41. Heredia FJ, Escudero-Gilete ML, Hernanz D, Gordillo B, Melendez-Martinez AJ, Vicario IM, Gonzalez-Miret ML. 2010. Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of Syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chem*, 118, 377-383.

42. Özkan G, Göktürk Baydar N. 2006. A Direct RP-HPLC Determination of Phenolic Compounds in Turkish Red Wines. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (2), 229-234.
43. Langcake P, Pryce R J. 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 77-86.
44. Langcake P, McCarthy W V. 1979. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 18, 244-253.
45. Creasy L L, Coffee M. 1988. Phytoalexin production potential of grape berries. *J Am Soc Hortic Sci*, 113, 230-234.
46. Jeandet P, Bessis R, Gautheron B. 1991. The production of resveratrol (3, 5, 4 $\epsilon$  trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am J Enol Vitic*, 42, 41-46.
47. Liswidowati M F, Hohmann F, Burkhardt S, Kindl H. 1991. Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells. *Planta*, 183, 307-314.
48. Jeandet P, Bessis R, Sbaghi M, Meunier P. 1995. Production of the phytoalexin resveratrol by grape as a response to *Botrytis cinerea* attacks under natural conditions. *J Phytopathol*, 143, 135-139.
49. Adrian M, Jeandet A C, Douillet-Breuil L, Bessis R. 2000. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J Agric Food Chem*, 48, 6103-6105.
50. Bais A J, Murphy P J, Dry I B. 2000. The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Aust J Plant Physiol*, 27, 425-433.
51. Cantos E, Garcí'a-Viguera C, Pascual-Teresa S, Tomá's-Barberá'n F A. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J Agric Food Chem*, 48, 4606-4612.
52. Siemann E H, Creasy L L. 1992. Concentration of the phytoalexyn resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic*, 43, 49-52. (17).
53. Jeandet P, Bessis R, Maume B F, Sbaghi M. 1993. Analysis of resveratrol in Burgundy wines. *J. Wine Res*, 4, 79-85.
54. Goldberg D M, Yan J, Ng E, Diamandis E P, Karumanchiri A, Soleas G J, Waterhouse A L. 1995. A global survey of trans-resveratrol concentrations in commercial wines. *Am J Enol Vitic*, 46, 159- 165.
55. Mattivi F, Reniero F, Korhammer S. 1995. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J Agric Food Chem*, 43, 1820-1823.
56. Goldberg D M, Ng E, Karumanchiri A, Diamandis E P, Soleas G J. 1996. Resveratrol glucosides are important components of commercial wines. *Am J Enol Vitic*, 47, 415-420.
57. Pezet R, Cuneat Ph. 1996. Resveratrol in wine: extraction from skin during fermentation and post-fermentation standing of must from Gamay grapes. *Am J Enol Vitic*, 47, 287-290.
58. Romero-Pe´rez A I, Lamuela-Ravento´s R M, Waterhouse A L, de la Torre-Boronat M C. 1996. Levels of cis and trans-resveratrol and their glucosides in white and rose´ *Vitis vinifera* wines from Spain. *J Agric Food Chem*, 44, 2124-2128.
59. Vrhovsek U, Wendelin S, Eder R. 1997. Effects of various vinification techniques on the concentrations of cis- and trans-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine. *Am J Enol Vitic*, 48, 214-219.
60. Threlfall R T, Morris J R, Mauromoustakos A. 1999. Effect of variety, ultraviolet light exposure, and enological methods on the trans-resveratrol level of wine. *Am J Enol Vitic*, 50, 57-64.
61. Roggero J P, Garcia-Parrilla C. 1995. Effects of ultraviolet irradiation on resveratrol and changes in resveratrol and various of its derivatives in the skins of ripening grapes. *Sci Aliments*, 15, 411-422.
62. Fritzemeier K H, Kindl H. 1981. Coordinate induction by UV light of stilbene synthase phenylalanine ammonialyase and cinnamate 4-hydroxylyase in leaves of *Vitaceae*. *Planta*, 151, 48-52.
63. Melchior F, Kindl H. 1990. Grapevine stilbene synthase cDNA only slightly differing from chalcone synthase cDNA is expressed in *Escherichia coli* into a catalytically active enzyme. *FEBS Lett*, 268, 17-20.
64. Versari A, Parpinello G, Tornielli G, Ferrarini R, Giulivo C. 2001. Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *J Agric Food Chem*, 49, 5531-5536.