



Kırmızı Şaraplarda Antioksidan Kapasite ile Toplam Fenolik Bileşik ve Toplam Monomerik Antosiyanin Düzeylerinin İlişkileri

Damla YÜKSEL KÜSKÜ^{1*}, Hande TAHMAZ KARAMAN²

¹Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Park ve Bahçe Bitkileri Bölümü, Bilecik, Türkiye, ²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0001-5398-1146>, ²<https://orcid.org/0000-0003-4842-6441>

✉: damla.yuksel@bilecik.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada üç farklı kırmızı şarabın toplam fenolik bileşik, toplam monomerik antosiyanin ve antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve birbirleri ile ilişkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada fermantasyonlarını tamamlamış Merlot, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon şaraplarının toplam fenolik bileşik, toplam monomerik antosiyanin ve ABTS, DPPH, FRAP ve ORAC yöntemleri ile antioksidan kapasiteleri belirlenmiş, sonuçların birbirleri ile korelasyonları incelenmiştir. Kırmızı şarapların toplam fenolik bileşik düzeyleri 2874 ile 3451 mg GAE L⁻¹, toplam monomerik antosiyanin düzeyleri 305-357 mg L⁻¹ aralıklarında değişen seviyelerde ölçülmüştür. Antioksidan kapasite düzeylerinin sırası ile ABTS, DPPH, ORAC ve FRAP yöntemlerine göre 32.74-35.83 µmol trolox mL⁻¹; 14.98-19.21 µmol trolox mL⁻¹; 25.93-29.07 µmol trolox mL⁻¹; 28.12-36.05 µmol trolox mL⁻¹ düzeylerinde olduğu tespit edilmiştir. ORAC yöntemi dışında incelenen bütün parametreler birbirleri ile ilişkili bulunmuştur. Araştırmada incelenen kırmızı şarapların fenolik bileşik ve antioksidan kapasiteleri yüksek olmakla birlikte, antioksidan kapasite tayini amaçlı ORAC yöntemi dışındaki yöntemlerin birbirleri ile değişebilir ve karşılaştırılabilir oldukları sonucuna varılmıştır.

Bahçe Bitkileri

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 05.04.2022

Kabul Tarihi : 02.03.2023

Anahtar Kelimeler

Antioksidan kapasite

Kırmızı şarap

Toplam fenolik bileşik

Toplam monomerik antosiyanin

Relationships between Antioxidant Capacity and Total Phenolic Compound and Total Monomeric Anthocyanin Levels in Red Wines

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the total phenolic compound, total monomeric anthocyanin and antioxidant capacities of three different red wines and to examine their relationship with each other. The total phenolic compounds, total monomeric anthocyanins and antioxidant capacities of Merlot, Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon wines that have completed their fermentation were determined by ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC methods, and the correlation levels of the results were estimated. The total phenolic compound levels of red wines were measured at levels ranging from 2874 to 3451 mg GAE L⁻¹, and total monomeric anthocyanin levels ranged between 305-357 mg L⁻¹. Antioxidant capacity levels were 32.74-35.83 µmol trolox mL⁻¹; 14.98-19.21 µmol trolox mL⁻¹; 25.93-29.07 µmol trolox mL⁻¹; 28.12-36.05 µmol trolox mL⁻¹ according to ABTS, DPPH, ORAC, and FRAP methods, respectively. All the parameters studied were related to each other except the ORAC method. In addition to the phenolic compound and antioxidant capacities of the red wines examined in our study are high, it has been concluded that the methods other than the ORAC method for determining antioxidant capacity are different and comparable with each other.

Horticulture

Research Article

Article History

Received : 05.04.2022

Accepted : 02.03.2023

Keywords

Antioxidant capacity

Red wine

Total phenolic content

Total monomeric anthocyanin

Atf Şekli:	Yüksel Küskü, D., & Tahmaz Karaman, H., (2023) Kırmızı Şaraplarda Antioksidan Kapasite ile Toplam Fenolik Bileşik ve Toplam Monomerik Antosiyanin Düzeylerinin İlişkileri. <i>KSÜ Tarım ve Doğa Derg</i> 26 (4), 743-753. https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1098837
To Cite:	Yüksel Küskü, D., & Tahmaz Karaman, H., (2023). Relationships between Antioxidant Capacity and Total Phenolic Compound and Total Monomeric Anthocyanin Levels in Red Wines. <i>KSU J. Agric Nat</i> 26 (4), 743-753. https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1098837

GİRİŞ

Üzüm ve şaraplarda bulunan polifenoller kimyasal açıdan bir veya daha fazla benzen halkası içeren geniş bir doğal bileşik ailesidir. Üzümlerin teknolojik ve fenolik parametreleri arasındaki denge, kaliteli kırmızı şaraplar elde etmek için kilit bir faktördür. Polifenollerin varlığı ile ilişkili olan fenolik olgunluk seviyesi üzümleri ve bu üzümlerden elde edilen şarapları kompleksleştirerek organoleptik kalitelerini doğrudan etkilemektedir (Merkytė ve ark., 2020). Son yıllardaki araştırmalar bazı polifenollerin antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri üzerine *in vitro* ya da *in vivo* olarak yoğunlaşmış durumdadır (Lee ve ark., 2020; Pertuzatti ve ark., 2020). Özellikle kırmızı şaraplardaki varlıkları üzümün yetiştirildiği teruar özellikleri, bağ hastalık durumu ve vinifikasyon teknikleri ile değişim gösteren (Price ve ark., 1995; McDonald ve ark., 1998; Atak & Göksel, 2019; Urvieta ve ark., 2021) fenolik bileşiklerin, insan sağlığı üzerindeki etkileriyle ilgili çok sayıda araştırma mevcuttur (Tufarelli ve ark., 2017; Cosme ve ark., 2018; Averilla ve ark., 2019; Leal ve ark., 2020).

Üzümlerdeki fenolik bileşiklerin büyük çoğunluğu antioksidan etkiye sahiptirler ve bu etki esasen aromatik hidroksil grubundaki bir hidrojen atomunun serbest radikale bağlanabilme kolaylığı ile fenolik bileşiğin elektronlarının π -elektron sistemi etrafındaki delokalizasyonuna bağlı olarak eşleşmemiş bir elektronu destekleme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (Manini ve ark., 2019). Bu durum antioksidanların sahip oldukları çok sayıda elektronun, serbest radikallere karşı kolay bir hedef olduğu anlamına gelmektedir. Böylelikle antioksidanlar, oksitleyici zincir reaksiyonların başlamasını ve yayılmasını inhibe ederek, diğer molekülleri korurlar. Oksidatif stres pro-oksidan ve antioksidan türler arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır. İnsan vücudundaki antioksidan eksikliğinden kaynaklı oksidatif stres oluşumu, kardiyovasküler hastalıklar, iltihaplanma, beyin fonksiyon bozuklukları gibi oksidatif hastalıkların patolojisine katkıda bulunmaktadır (Pisoschi ve ark., 2021).

Şarap esas olarak su, karbonhidratlar, organik asitler, mineraller, alkol, polifenoller ve aromatik bileşiklerden oluşmaktadır (Snopek ve ark., 2018). Şarap bileşenlerinin en önemli gruplarından birisini polifenoller oluşturmaktadır. Beyaz şaraplar kırmızı şaraplardan çok daha az polifenol içermektedirler. Toplam fenolik bileşik içeriği beyaz şaraplarda gallik asit eşdeğeri olarak litrede yüzlerle ifade edilirken,

kırmızı şaraplarda litrede binler seviyesine ulaşmaktadır (Singleton & Rossi, 1965). Fonksiyonel grup dağılımı ve sayısı ile molekül ağırlığı derecesi fenolik bileşiklerin antioksidan olarak etki etme yeteneklerini belirlemektedir (Radonjic ve ark., 2019). Çoğu polifenol yapısında aromatik halka üzerinde, yakınındaki moleküller üzerindeki serbest radikallere karşı büyük bir afiniteye sahip olan hidroksil gruplarına sahiptir. Bununla birlikte şarabın polifenol içeriği ile antioksidan kapasitesi arasındaki ilişki ile ilgili farklı görüşler mevcuttur. Örneğin Finotti ve Di Majo (2003) farklı fenolik bileşiklerin OCH_3 ve OH gruplarının ve halka sayılarının birbirinden farklı konumları sebebiyle antioksidan kapasitelerinin de farklı olacağını söylemişlerdir. Saint-Criqve ark. (1999) antioksidan aktivitenin polimerizasyon seviyesi ile arttığını, Arnous ve ark. (2002) antosiyaninlerin polimerik ve monomerik formlarının antioksidan kapasitelerinin farklı olduğunu, Di Majo (2008) ise şarapta bulunabilen farklı polifenoller ve radikal moleküller arasında olası bir antagonizm veya sinerjizm olabileceğini öne sürmüşlerdir. Antioksidan kapasitenin toplam fenolik bileşik içeriği ve toplam antosiyanin ile ilişkili olduğuna dair araştırmalar da literatürde yer almaktadır (Lachman ve ark., 2019).

Ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri sadece ekstrakt bileşimine değil, aynı zamanda kullanılan test koşullarına da bağlı olmaktadır (Dorman ve ark., 2003; Trouillas ve ark., 2003; Miliauskas ve ark., 2004). Antioksidan kapasitenin ölçülmesi temel olarak, hidrojen atomunun transferine (HAT) ve elektronun transferine (ET) dayalı olan yöntemlere dayanmaktadır. ORAC testi gibi hidrojen atomunun transferine (HAT) dayalı olan testler, antioksidan ve substratın termal olarak üretilen peroksil radikalleri için rekabet ettiği rekabetçi bir reaksiyon şeması uygulamaktadır. FRAP, ABTS ve DPPH testleri gibi elektron transferine (ET) dayalı olan testlerde ise antioksidan maddenin indirgenğinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir (Lopez-Alarcon & Lissi, 2005). Bu yöntemlerin tek başına kullanılması yeterli görülmemekte, antioksidanların farklı etkilerini dikkate almak amacıyla birden fazla test ile ölçümlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Prior & Cao, 1999; Huang ve ark., 2005). DPPH, ABTS ve ORAC testleri ile numunelerin serbest radikal temizleme kapasiteleri, FRAP testi ile demir indirgeme kapasiteleri belirlenmektedir.

Bütün bunlardan yola çıkarak bu çalışmada Merlot, Cabernet Franc ve Cabernet Sauvignon çeşitlerine ait kırmızı şarapların toplam fenolik bileşik, toplam monomerik antosiyanin ve antioksidan kapasite düzeyleri incelenmiş, sonrasında korelasyon analizi ile ilişkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Araştırmada antioksidan kapasite tayininde dört farklı yöntemle çalışılmış bu sayede sonuçların birbirleri ile tutarlılığı ve antioksidan kapasitenin net bir şekilde ifade edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Araştırmada materyal olarak 2003 yılında dikilmiş olan 140 Ru anacı üzerine aşılı 347 numaralı Merlot klonu, 41 B anacı üzerine aşılı 181 numaralı Cabernet Franc klonu ve 110 R anacı üzerine aşılı 169 numaralı Cabernet Sauvignon klonlarından (*Vitis vinifera* L.) 2020 yılında elde edilen kırmızı şaraplar kullanılmıştır. Tekirdağ'daki Chateau Kalpak (40°39'16.76"K, 27°03'18.74"D) firmasına ait bağlar 2.1 x 1.0 m sıra arası ve üzeri mesafeye sahip olup, kordon terbiye şeklindedirler. Üzümler teknolojik olgunluk dönemlerinde vinifikasyona alınmışlardır. Bu amaçla sap ayırma tane patlatma işlemi sonrası şarapların maserasyonları *Saccharomyces cerevisiae* maya (Laffort, Fransa) kullanarak başlatılmış olup alkol fermantasyonu tamamlandığında preslenmişlerdir. Daha sonra bakteri ilavesiz malolaktik fermantasyon (MLF) süreci gözlemlenmiş, MLF sona erdiğinde aktarılarak stok tanklarına alınmışlardır. Şaraplardan bu aşamada kükürtleme öncesi analizler için 3'er tekerrürlü 500 mL'lik örnekler alınarak Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ulaştırılmışlardır. Şarapları koruma amaçlı şişeleme sırasında azot gazı uygulanmıştır.

Üzüm ve şarap genel analizleri ile şarap kalite analizleri

Üzümlerin hasat edildikleri gün briks (%), tartarik asit cinsinden toplam asitlik (mg L^{-1}) pH ve dansite değerleri belirlenmiştir (OIV, 2015). Şarap örneklerinin ise pH, tartarik asit cinsinden toplam asitlik, alkol (%), şeker, uçur asit, serbest SO_2 ve toplam SO_2 analizlerine ilaveten (OIV, 2015), Mercurio ve ark. (2007)'na göre kimyasal yaş 1 ve kimyasal yaş 2, antosiyanin iyonizasyonu (%), toplam antosiyanin (mgL^{-1}), renk yoğunluğu (Absorbans birimi: AB), renk tonu, SO_2 dayanıklı pigment (AB) analizleri, Mercurio ve Smith (2008)'e göre bisülfid ağartma yöntemi ile antosiyanin (mgL^{-1}), Ribéreau-Gayon ve ark. (2006)'na göre asit hidroliz yöntemi ile tanen (gL^{-1}), Cliff ve ark. (2007)'na göre renk yoğunluğu ve tonu ve yine Cliff ve ark. (2007)'na göre kopigmente olmuş antosiyanin, monomerik antosiyanin, polimerik antosiyanin, toplam antosiyanin (AB) analizleri gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrenin kullanıldığı bütün analizler Shimadzu marka UV-1208 model UV-VIS spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Analiz öncesi şaraplar 0.45 μm 'lık PVDF (Sartorius, Germany) filtrelerden geçirilmişlerdir.

Toplam fenolik bileşik analizi

Şarapların toplam fenolik bileşik miktarlarının belirlenmesi amacıyla Singleton ve Rossi (1965)'nin folin ciocalteau yöntemi kullanılmıştır. Önce %20'lik sodyum karbonat çözeltisi hazırlanmış, sonrasında 10 mL'lik cam tüplere sırasıyla 7.5 mL ultra saf su, 100 μL şarap ve 500 μL Folin Ciocalteu (Sigma) eklenmiş, 3 dakika sonunda 1 mL sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek son hacim saf suyla tamamlanmıştır. 1 saat süreyle karanlıkta bekletilen şarapların okumaları 765 nm dalga boyunda yapılmış ve sonuçlar mg Gallik Asit Eşdeğeri (GAE) L^{-1} olarak ifade edilmiştir. Sonuçların hesaplanmasında gallik asit eğrisinden ($R^2=0.9989$) yararlanılmıştır.

Toplam monomerik antosiyanin analizi

Şaraplardaki toplam monomerik antosiyanin miktarı Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından geliştirilen pH differansiyel metodu ile belirlenmiştir. pH'sı 1.0 olan 0.025 M potasyum klorür tampon çözeltisi ve pH'sı 4.5 olan 0.4 M sodyum asetat tampon çözeltisi hazırlanarak, şarapların bu çözeltiler ile spektrofotometrenin linear sınırları (0.4-0.6) içerisinde kalacak şekilde seyreltilmesiyle 520 ve 700 nm dalga boylarında ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar mg L^{-1} olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam monomerik antosiyanin (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{[(A) \times (MW) \times (SF) \times 1000]}{(e) \times (L)} \quad (1)$$

Eşitlikte, A: Absorbans farkı (pH 1.0 ve 4.5 değerlerinde ölçülen absorbans farkı), MW: Baz olarak alınacak antosiyaninin molekül ağırlığı (493,5), SF: Seyreltme faktörü, e: Molar absorpsiyon katsayısı (28000), L: Absorbans ölçüm kuvvetinin tabaka kalınlığı (cm).

Antioksidan kapasite analizleri

Şarapların antioksidan kapasite düzeyleri ABTS, DPPH, ORAC, FRAP yöntemleri olmak üzere dört farklı yöntemle belirlenmiştir. Sonuçların birbirleri ile karşılaştırılabilirliğini kolaylaştırması açısından troloks eşdeğeri olarak ($\mu\text{mol troloks mL}^{-1}$) ifade edilmiştir.

ABTS yöntemi

ABTS [2,2'-azinobis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)] yöntemi Re ve ark. (1999)'na göre gerçekleştirilmiş ve inhibisyon oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon oranı (\%)} = \frac{(\text{Başlangıç absorbansı} - \text{Son absorbans})}{\text{Başlangıç absorbansı}} \quad (2)$$

Elde edilen ortalama yüzde inhibisyon değerleri örnek hacimlerine (10, 20 ve 30 μl) karşı bir grafiğe aktarılmış ve bu verilere doğrusal regresyon analizi

uygulanarak örneğe ilişkin eğriye ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır.

DPPH yöntemi

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) yöntemi ile antioksidan aktivite Katalinic ve ark. (2004)' na göre gerçekleştirilmiştir. DPPH serbest radikalleri % 96 etanol içinde çözülerek bu çözeltinin 3 mL' si 0.2 mL numune ile karıştırılmıştır. 15 dakika sonra 517 nm dalga boyunda şahide karşı (saf su) okuma gerçekleştirilmiştir.

FRAP yöntemi

FRAP (ferric reducing antioxidant power) yöntemi ise Benzie ve Strain (1996)' e göre yapılmıştır. Bu amaçla pH 3.6 olan 300 mM sodyum asetat, 40 mM hidroklorik asit içinde seyreltilmiş 10 mM TPTZ (2,4,6-tripirydyl-s-triazine) ve 20 mM FeCl₃ × 6H₂O sırasıyla 10:1:1 oranında karıştırılmış ve 37 °C' ye ısıtılmıştır. Ayrıca, 3 mL FRAP standardı 0.2 L numune (şahit için saf su) ile karıştırılmıştır. 15 dakika sonra absorbans değerleri 593 nm' de ölçülmüştür.

ORAC yöntemi

ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) yöntemi ile antioksidan kapasitenin belirlenebilmesi amacıyla AAPH [2,2-azobis(2-amidinopropane) dihidroklorid] 75 mM' lık 10 mL fosfat çözeltisinde eritilerek pH 7.4 olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmış ve son hacim 153 mM olarak ayarlanmıştır. Daha sonra 75 mM'lık floresein stok solüsyonu (4 x 10⁻³ mM) hazırlanmıştır. Stok solüsyon 1:1000 olacak şekilde fosfat solüsyonuyla seyreltilmiştir. Küvetlere 150 µL

floresein çözeltisi, 25 µL fosfat solüsyonu, 25 µL troluks ve 25 µL şarap örneği eklenmiş ve reaksiyon kaydedilmiştir (Huang ve ark., 2002).

Veri analizi

İstatistiksel analizler tesadüf parselleri deneme desenine göre yapılmış, veriler Minitab18 bilgisayar paket programında varyans analizine tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey testine göre gruplandırılarak ifade edilmiştir. Pearson's korelasyon katsayılarını hesaplama amaçlı Windows Microsoft Excel 2007 kullanılmıştır. Her analiz 3 tekrür olarak yapılmış sonuçlar ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Araştırmaya ait literatür ile karşılaştırmalı sonuçlar aşağıdaki başlıklar altında sunulmuştur.

Genel üzüm analiz sonuçları

Üzümlerin hasat günü gerçekleştirilen °briks, tartarik asit cinsinden toplam asitlik (mg L⁻¹), pH ve dansite ölçüm sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Briks değerleri 25.2° ile 26° arasında, toplam asitlik değerleri 5.25 ile 6.51 arasında, pH değerleri 3.32 ile 3.50 arasında ve dansite değerleri 1.111 ile 1.115 arasındaki değerlerde ölçülmüştür. Merlot, Cabernet Franc ve Cabernet Sauvignon üzüm çeşitlerinde hasat zamanı yapılan analiz sonuçlarının kırmızı şaraplık üzüm çeşitleri için beklenen değerlerde olduğu belirlenmiştir. (Obreque-Slier ve ark., 2012; Sartor ve ark., 2017).

Çizelge 1 Genel üzüm analiz sonuçları

Table 1 Results of general grape analysis

Üzüm çeşitleri <i>Grape varieties</i>	Briks % <i>(Brix)</i>	Toplam asitlik (mg mL ⁻¹)* <i>(Total acidity)</i>	pH <i>(pH)</i>	Dansite <i>(Density)</i>
Merlot	25.2±0.3 ^b	5.25±0.01 ^b	3.44±0.02 ^a	1.112±0.6 ^{ab}
Cabernet Franc	26.0±0.1 ^a	4.66±0.04 ^c	3.50±0.02 ^a	1.111±1.0 ^b
Cabernet Sauvignon	26.0±0.2 ^a	6.51±0.06 ^a	3.32±0.02 ^b	1.115±1.0 ^a

^{a,b,c}Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen değerler Tukey testine göre P<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir.
^{*}Tartarik asit cinsinden.

Genel şarap analiz sonuçları

Şarapların genel analiz sonuçları Çizelge 2' de verilmiştir. Buna göre pH, toplam asitlik, alkol, şeker, uçur asit, serbest SO₂ ve toplam SO₂ düzeyleri sırasıyla 3.45-3.64, 6.33-6.86 mg mL⁻¹, %15.0-15.5, 2.5-3.1 gL⁻¹, 0.41-0.48 g L⁻¹, 25-29 mg L⁻¹, 39-46 mg L⁻¹ aralıklarında ölçülmüş ve önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Di Profio ve ark., 2011).

Genel şarap kalite analiz sonuçları

Şarapların genel karakteri hakkında fikir vermesi ve pratik yapılabilirlikleri sebebiyle sıklıkla kullanılmakta olan genel kalite analizlerine ait sonuçlar Çizelge 3' te verilmiştir. Renk tonu,

antosiyenin iyonizasyonu, antosiyenin absorbans birimi parametreleri hariç değerlendirilen bütün parametrelerde Cabernet Sauvignon şarabı öne çıkmıştır. Modifiye somers yöntemine göre kimyasal yaş (1) 0.516-0.685; kimyasal yaş (2) 0.050-0.077; toplam antosiyenin 1002-1084 mg L⁻¹; renk yoğunluğu 10.38-15.15 AB; SO₂ düzeltilmiş renk yoğunluğu 9.53-11.13 AB; renk tonu 0.639-0.718 AB; SO₂ dayanıklı pigmentler 2.86-4.20 AB ve antosiyenin iyonizasyonu %7.00-12.34 aralıklarında değişen düzeylerde saptanmıştır.

Kimyasal yaş ilk kez Somers (1977) tarafından kullanılan bir kavram olmakla birlikte monomerik-polimerik antosiyenin değişimlerinin ne ölçüde

gerçekleştiğini tanımlamaktadır. Kimyasal yaş 1 ve 2 parametreleri iki spektral orandan türetilmektedir. Her ikisi de pigmentlerin pH değişikliklerine ve SO₂ ağartmasına ne ölçüde dayanıklı hale geldiğini ve serbest antosiyaninlerin daha az kararlı olarak daha duyarlı oldukları değişiklikleri ifade etmektedir (Basalekou ve ark., 2017). Araştırma sonuçlarına göre Cabernet Sauvignon şarabını sırasıyla Cabernet Franc

ve daha açık bir renge sahip Merlot şarabı takip etmiştir. Şarapların yaşı şarap kalitesiyle bağlantılı olan önemli bir parametre olmakla birlikte, şarap yaşını ölçmenin doğrudan bir yolu yoktur. Yaşlanmayla birlikte şarapların renk, gövde, aroma, uçucu fenolikler gibi organoleptik parametreleri değişmektedir.

Çizelge 2 Genel şarap analiz sonuçları
Table 2 Results of general wine analysis

Şaraplar (Wines)	pH (pH)	Toplam asitlik (mg mL ⁻¹)* (Total acidity)	Alkol (% h h ⁻¹) (Alcohol)	Şeker (g L ⁻¹) (Residual sugar)	Uçar asit (g L ⁻¹)** (Volatile acid)	Serbest SO ₂ (mg L ⁻¹) (Free SO ₂)	ToplamSO ₂ (mg L ⁻¹) (TotalSO ₂)
Merlot	3.64±0.01 ^a	6.50±0.02 ^b	15.5±0.0 ^a	3.1±0.1 ^a	0.41±0.02 ^b	25±0.4 ^b	42±1.3 ^b
C. Franc	3.50±0.02 ^b	6.33±0.02 ^c	15.1±0.1 ^b	2.5±0.1 ^b	0.48±0.02 ^a	26±0.7 ^b	39±1.2 ^c
C. Sauvignon	3.45±0.02 ^b	6.86±0.03 ^a	15.0±0.2 ^b	2.6±0.2 ^b	0.43±0.04 ^{ab}	29±1.1 ^a	46±1.4 ^a

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen değerler Tukey testine göre P<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir. *Tartarik asit cinsinden, **Sülfürik asit cinsinden.

Çizelge 3 Genel şarap kalitesi analiz sonuçları
Table 3 Results of general wine quality analysis

Spektrofotometrik Analizler (Spectrophotometric Analysis)	Şaraplar (Wines)			
	Merlot	Cabernet Franc	Cabernet Sauvignon	
Modifiye somers yöntemi	Kimyasal yaş 1	0.516±0.007 ^b	0.522±0.001 ^b	0.685±0.005 ^a
	Kimyasal yaş 2	0.050±0.001 ^c	0.058±0.001 ^b	0.077±0.002 ^a
	Toplam antosiyanin (mgL ⁻¹)	1002±1.5 ^c	1020±1.5 ^b	1084±1.0 ^a
	Renk yoğunluğu (AB)	11.18±0.06 ^b	10.38±0.05 ^c	15.15±0.04 ^a
	Renk yoğunluğu-SO ₂ düzeltilmiş (AB)	9.53±0.05 ^c	10.27±0.04 ^b	11.13±0.03 ^a
	Renk tonu	0.718±0.015 ^a	0.667±0.029 ^{ab}	0.639±0.030 ^b
	SO ₂ dayanıklı pigmentler (AB)	2.86±0.08 ^b	3.22±0.10 ^b	4.20±0.30 ^a
Asit hidroliz yöntemi	İyonize antosiyanin (%)	12.34±0.38 ^a	7.00±0.08 ^c	10.75±0.05 ^b
	Tanen (g L ⁻¹)	0.941±0.046 ^c	3.045±0.048 ^b	3.610±0.014 ^a
Bisülfid ağartma yöntemi	Antosiyanin (mgL ⁻¹)	290.50±1.20 ^b	67.96±2.19 ^c	389.55±2.07 ^a
Renk (AB)*	Renk yoğunluğu	1.651±0.002 ^c	1.963±0.064 ^b	2.410±0.003 ^a
	Renk tonu	0.618±0.015 ^a	0.576±0.004 ^b	0.591±0.009 ^{ab}
Antosiyanin(AB)	Kopigmente antosiyanin	0.375±0.006 ^a	0.127±0.006 ^c	0.241±0.045 ^b
	Monomerik antosiyanin	0.600±0.005 ^c	0.812±0.057 ^b	0.925±0.006 ^a
	Polimerik antosiyanin	0.491±0.002 ^c	0.567±0.007 ^b	0.692±0.010 ^a

^{a,b,c} Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen değerler Tukey testine göre P<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir. *AB: Absorbans birimi.

Kopigmente, monomerik ve polimerik antosiyanin düzeyleri şaraplarda sırasıyla 0.127-0.375, 0.600-0.925, 0.491-0.692 AB aralıklarında ölçülmüştür. Kırmızı şaraplara renk veren temel bileşikler antosiyaninlerdir. Üzümlerde monomerik halde olan antosiyaninlerin bir kısmı, şarap üretimi süresince çeşitli reaksiyonlar sonucu daha stabil bir antosiyanin formu olan polimerik forma dönüşmektedirler. Merlot, Cabernet Sauvignon ve Cabernet Franc şaraplarında monomerik formdaki antosiyaninlerin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin şarapların genç oluşu ve şaraplarda baskın olan antosiyanin formunun henüz renksiz formda olması söylenebilir.

Olgun kırmızı şarapların renk karakterlerinin stabil forma gelmesinde antosiyaninlerin kopigmente olması etkilidir. Antosiyaninlerle birleşerek daha stabil ve daha yoğun renkli bileşikler kopigmentler oluşturur. Kopigmentler renksiz olmalarına rağmen antosiyaninlerle birleşerek renkli forma dönüşmektedirler (Kalkan Yıldırım & Şener, 2010). Şaraplarda koruyucu olarak kullanılan potasyum metabisülfidin oluşturduğu SO₂ renk kayıplarına yol açabilmektedir. Araştırma sonuçlarında en yüksek renk yoğunluğuna sahip Cabernet Sauvignon şarabının yine en yüksek antosiyanin, SO₂ düzeltilmiş renk yoğunluğu ve SO₂ dayanıklı pigmentlere sahip

olduğu görülmektedir. Renkteki artışla birlikte bu parametrelerdeki yükseklik de şaraplarda istenen bir özelliktir.

Asit hidroliz yöntemi ile tanen miktarları 0.941-3.610 mgL⁻¹ düzeylerinde, bisülfid ağartma yöntemi ile antosiyanin düzeyleri 67.96-389.55 mg L⁻¹ aralığında belirlenmiştir. Şarapların renk yoğunluğu ve renk tonu ise sırasıyla 1.651-2.410, 0.576-0.618 düzeylerinde ölçülmüştür.

Kırmızı şaraplarda gerçekleştirilen önceki araştırmalarda kimyasal yaş (1) 0.2-0.5, kimyasal yaş (2) 0.1-0.2, renk yoğunluğu 2.8-6.1, SO₂ düzeltilmiş renk yoğunluğu 3.3-4.9, antosiyanin iyonizasyonu 15.5-28.3, SO₂ dayanıklı pigmentler 0.4-1.3 aralıklarında değişen düzeylerde belirlenmiştir (Basalekou ve ark., 2017; Guerrini ve ark., 2019). Ölçülen parametreler üzüm çeşidi ve vinifikasyon yöntemlerine göre değişiklik göstermekle birlikte araştırma sonuçları literatürle uyum içerisindedir.

Toplam fenolik bileşik ve toplam monomerik antosiyanin sonuçları

Şaraplara ait toplam fenolik bileşik (TFB) ve toplam monomerik antosiyanin (TA) sonuçları Çizelge 4'te verilmiştir. Her iki parametrede de Cabernet Sauvignon şarabı en yüksek miktarları vermiş, onu sırasıyla Cabernet Franc ve Merlot şarapları takip etmiştir. Toplam fenolik bileşik düzeyleri analiz edilen şaraplarda 2874 ile 3451 mg GAE L⁻¹, toplam monomerik antosiyanin düzeyleri 305-357 mg L⁻¹ aralıklarında ölçülmüştür. Araştırma sonuçlarına göre

toplam fenolik bileşik ve toplam antosiyanin düzeyleri birbirleri ile paraleldir, en yüksek toplam fenolik bileşik içeriğine sahip şarap en yüksek toplam antosiyanin düzeyine sahiptir. Di Profio ve ark. (2011) Merlot şaraplarının toplam fenolik bileşik düzeylerini 1060-1263 mg L⁻¹, toplam antosiyanin düzeylerini ise 191-312 mg L⁻¹ olarak ölçmüşlerdir. Aynı araştırmacılar toplam fenolik bileşik ve toplam antosiyanin düzeyleri Cabernet Franc ve Cabernet Sauvignon şaraplarında sırasıyla 1070-2476 mg L⁻¹, 148-289 mg L⁻¹; 1335-2590 mg L⁻¹, 187-413 mg L⁻¹ olarak ölçmüşlerdir. Araştırmada olduğu gibi toplam fenolik bileşik ve toplam antosiyanin sonuçlarının Cabernet Sauvignon şaraplarında diğerlerine göre daha yüksek seviyede olduğu görülmektedir. Şaraplara kattıkları organoleptik özelliklerin yanı sıra, antioksidan özellikleri ile de fenolik bileşikler şarapların en önemli kalite parametrelerindedir. Analiz edilen şarapların toplam fenolik bileşik ve antosiyanin düzeyleri oldukça yüksektir. Toplam fenolik bileşiklerin şarabın duyuşsal özelliklerine ve antioksidan etkilerine katkı sağlamaları gibi, antosiyaninler de üzüm ve şarabın başlıca renk bileşikleridir ve şarabın duyuşsal özellikleri üzerinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Daha da önemlisi antioksidan bileşikler olarak da görev yapmaktadırlar. Antosiyaninlerin anti-kanser, anti-inflamatuar, antimikrobiyal özelliklere sahip oldukları ve bu antioksidanların tüketiminin kardiyovasküler, diyabetik ve obeziteye bağlı hastalıkların insidansını azaltabileceği bildirilmiştir (Minussi ve ark., 2003).

Çizelge 4 Toplam fenolik bileşik ve toplam monomerik antosiyanin sonuçları

Table 4 Results of total phenolic compounds and total monomeric anthocyanin

	Şaraplar (Wines)		
	Merlot	Cabernet Franc	Cabernet Sauvignon
TFB (mg GAE L ⁻¹)	2874±3.2 ^c	3157±7.6 ^b	3451±3.6 ^a
TA (mgL ⁻¹)	305±4.6 ^b	315±1.6 ^b	357±6.2 ^a

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen değerler Tukey testine göre P<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir. TFB: Toplam fenolik bileşik, TA: Toplam monomerik antosiyanin.

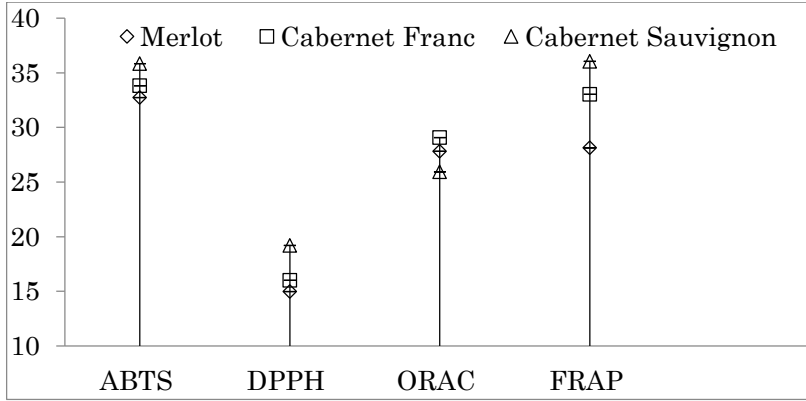
Antioksidan kapasite (ABTS, DPPH, ORAC, FRAP) sonuçları

Merlot, Cabernet Franc ve Cabernet Sauvignon şaraplarının antioksidan kapasite seviyeleri literatürde yoğun bir şekilde kullanılmakta olan dört farklı yöntemle belirlenmiştir. Şekil 1'de verilen sonuçlar incelendiğinde antioksidan kapasite düzeylerinin sırası ile ABTS, DPPH, ORAC ve FRAP yöntemlerine göre 32.74-35.83 µmol troloks mL⁻¹; 14.98-19.21 µmol troloks mL⁻¹; 25.93-29.07 µmol troloks mL⁻¹; 28.12-36.05 µmol troloks mL⁻¹ düzeylerinde oldukları görülmektedir. ORAC yöntemi dışındaki diğer yöntemlerde en yüksek antioksidan kapasite Cabernet Sauvignon şarabında saptanmış olup, Cabernet Sauvignon'u Cabernet Franc ve son olarak Merlot şarabı takip etmiştir. En düşük

antioksidan kapasite DPPH yöntemi ile 14.98 µmol troloks mL⁻¹ düzeyinde Merlot şarabından, en yüksek antioksidan kapasite ise FRAP yöntemi ile 36.05 µmol troloks mL⁻¹ düzeyinde Cabernet Sauvignon şarabından elde edilmiştir. Canlı sistemlerde gözlenen antioksidan kapasite, farklı fenolik bileşikler arasındaki etkileşimlerin bir sonucudur. Fenolik bileşikler, elektron transferi yoluyla indirgenerek veya aromatik halkalardaki hidroksil gruplarından hidrojen aktararak stabil serbest radikalleri temizleyebilmektedirler. Her iki mekanizmanın kombinasyonu şaraplarda sinerjik, antagonist ve hatta antioksidan etkilere yol açabilmektedir. Ayrıca antioksidanların etkinliği, oksijen ve fenolik hidrojen arasındaki bağ ayrışmasını sağlamak için gereken enerji gibi faktörlere, aynı zamanda pH'ya, indirgeme

potansiyeline, çözünürlüğe, stereokimyasal yapıya ve antioksidan radikallerin delokalizasyonuna da bağlıdır (Granato ve ark., 2010). Panceri ve ark. (2015) antioksidan kapasite düzeylerini Cabernet Sauvignon ve Merlot şaraplarında ABTS yöntemi ile 4.42-6.01 mMol troloks L⁻¹; DPPH yöntemi ile 2.67-4.72 mMol troloks L⁻¹ ve FRAP yöntemi ile 1.02-3.15 mMol troloks L⁻¹ olarak belirlemişler en yüksek antioksidan kapasite seviyesini Cabernet Sauvignon ABTS yöntemi ile ölçülmesi sonucunda elde ettiklerini

vurgulamışlardır. Araştırmada da ORAC yöntemi dışındaki yöntemlerde en yüksek antioksidan kapasite Cabernet Sauvignon şarabından elde edilmiştir. Cabernet Sauvignon şarabının toplam fenolik bileşik içeriğinin de yüksek olması dikkate alındığında, çalışmanın şarabın antioksidan kapasitesinin fenolik bileşime bağlı olduğunu doğrulayan diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğu söylenebilir (Zafrilla ve ark., 2003, Burin ve ark., 2011).



Şekil 1. Antioksidan kapasite (ABTS, DPPH, ORAC, FRAP) sonuçları
Figure 1. Results of antioxidant capacity (ABTS, DPPH, ORAC, FRAP)

Korelasyon analiz sonuçları

Araştırmada incelenen parametreler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amacıyla pearson korelasyon analizi yapılmış ve Çizelge 5' te verilen sonuçlara göre en yüksek korelasyon DPPH yöntemi ile antioksidan kapasite düzeyleri ile toplam antosiyanin seviyeleri arasında elde edilmiştir ($r=0.999$, $p<0.05$). Bu değeri $r=0.989$ ile FRAP methodu ile toplam fenolik bileşik arasındaki yüksek korelasyon takip etmiştir. Toplam antosiyanin düzeyi ile toplam fenolik bileşik düzeyi beklenildiği gibi $p<0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Şaraplarda bulunan antosiyaninler yüksek bitkilerin hemen hemen tüm dokularında bulunan suda çözünür flavonoid pigmentlerdir. Üzümlerde, esas olarak kabuklarda bulunurlar. Genç kırmızı şaraplardaki monomerik antosiyaninler, şarabın renginin oluşmasına katkıda bulunurlar. Dolayısıyla antosiyanin yüksek toplam fenolik bileşik miktarının da yüksek olmasına sebep olmaktadır (He ve ark., 2012). Toplam fenolik bileşik düzeyi ile antioksidan kapasite tayin yöntemleri arasındaki en yüksek korelasyon $r=0.989$ ile FRAP yöntemi arasında tespit edilmiştir. Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin birbirleri ile korelasyonları ise ORAC yöntemi dışında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu durum ABTS, DPPH ve FRAP yöntemlerinin şarapların antioksidan kapasite düzeylerinin ölçümünde kullanıldığı takdirde karşılaştırılabilir değerler sağladığını göstermektedir. Önceki araştırmalarda da bu teknikler arasında yüksek bir korelasyon bulunmuştur (Awika ve ark.,

2003; Thaipong ve ark., 2006). Bununla birlikte en düşük korelasyon katsayılarının ORAC yönteminde olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, ORAC yöntemi ile antioksidan kapasite tayininde farklı bir kimyasal tepkimenin olmasına atfedilebilir. DPPH, FRAP ve ABTS yöntemleri tek bir elektron transfer reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu yöntemlerde antioksidanlar, bir metal (Fe) veya bir radikal (DPPH veya ABTS) gibi oksidanlar tarafından oksitlenmektedir, dolayısıyla yöntemde antioksidan molekülden oksidana tek bir elektron aktarılmaktadır. Buna karşılık ORAC yöntemi, bu radikalın antioksidan bileşiklerden bir adet hidrojen atomu çıkardığı bir peroksil radikal oksijen türü üretildikten sonra bir hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayanmaktadır (Alañón ve ark., 2011). Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin birbirleri ile korelasyon değerleri incelendiğinde en yüksek korelasyon değerinin ABTS ve DPPH arasında olduğu gözlemlenmiştir. İki yöntemin r değerinin 0.994 olması her iki yöntemin de radikallerin yakalanmasına dayanan yöntemler olması söylenebilir. Sonuç olarak aynı kimyasal tepkimelere dayalı yöntemlerde yüksek korelasyonlar elde edilmiştir. Analizler arasında gözlenen bu farklılıklar, her bir bileşiğin bireysel moleküler yapısı ile de ilgilidir. Her yöntemin de antioksidan aktivitenin bir ölçüsü olduğu, ancak farklı radikallerin kullanıldığı akıld tutulmalıdır. Toplam fenolik bileşik düzeyleri bütün antioksidan kapasite tayin yöntemleri ile pozitif korelasyon göstermiştir. Bu da demek olmaktadır ki toplam fenolik bileşik antioksidan kapasiteye önemli

katkılarında bulunmaktadır. En yüksek korelasyon ise önceki çalışmalara benzer şekilde FRAP methodu ile olan ilişkisinde görülmüştür ($r=0.989$) (Arnous ve ark., 2002; Doshi ve ark., 2015). Romero-Díez ve ark. (2018)

nın da belirttiği gibi bu çalışmada da antioksidan ölçüm methodlarından ORAC methodu ile toplam fenolik bileşik düzeylerinin ilişkisi zayıf olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 5 Şarapların toplam fenolik bileşik, toplam antosiyanin ve antioksidan kapasite sonuçlarına ait korelasyon katsayıları

Table 5 Correlation coefficients of total phenolic compounds, total anthocyanin and antioxidant capacity of wines

	TFB	TA	ABTS	DPPH	ORAC
TFB	1				
TA	0.946*	1			
ABTS	0.986*	0.987*	1		
DPPH	0.962*	0.999*	0.994*	1	
ORAC	-0.604	-0.830	-0.729	-0.799	1
FRAP	0.989*	0.888	0.950*	0.911*	-0.480

* $P<0.05$ düzeyinde önemlidir. TFB: Toplam fenolik bileşik, TA: Toplam monomerik antosiyanin, ABTS: 2,2'-azinobis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ORAC: Oxygen radical absorbance capacity (Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi), FRAP: Ferric reducing antioxidant power (Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmada Merlot, Cabernet Franc ve Cabernet Sauvignon şaraplarının fermantasyon sonunda toplam fenolik bileşik, toplam monomerik antosiyanin ve dört farklı yöntemle antioksidan kapasite düzeyleri tespit edilerek, sonuçların birbirleri ile korelasyon düzeyleri incelenmiştir. En yüksek toplam fenolik bileşik ve toplam monomerik antosiyanin düzeyleri Cabernet Sauvignon çeşidine ait kırmızı şarapta ölçülmüş, ayrıca toplam fenolik bileşik, toplam monomerik antosiyanin ve antioksidan kapasite düzeylerinin birbirleri ile korele oldukları sonucuna varılmıştır. Araştırmada antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan ABTS, DPPH, FRAP yöntemlerinin kırmızı şarapların antioksidan kapasitesi için karşılaştırılabilir sonuçlar verdiği sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte, ORAC yönteminden elde edilen sonuçlar diğer yöntemlerle korelasyon göstermemiştir. Bu durum, yalnızca zincir kıran antioksidanların peroksil radikallerine karşı aktivitesini ölçen ORAC tahlilinin altında yatan ilkeye atfedilir. Ayrıca, ORAC diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında farklı bir mekanizmaya dayanmaktadır. Bu nedenle, farklı reaktif oksijen türleri ve farklı reaksiyon mekanizmaları nedeniyle, antioksidan kapasite değerlendirmesi için tek bir yöntem seçmek oldukça zor olmakla birlikte önerilmemektedir. Sonuç olarak, çeşitli reaktif oksijen türlerine karşı tam bir antioksidan kapasite profilini ortaya koyabilmek adına farklı yöntemlerin bir arada kullanılması önem taşımaktadır. Kırmızı şarapların sahip oldukları fenolik bileşik içerikleri ile antioksidan etki göstermeleri sebebiyle organoleptik özelliklerinin yanı sıra antioksidatif olarak da değerlendirmeleri önem taşımaktadır.

TEŞEKKÜR

Şarapları temin ettiğimiz Chateau Kalpak firmasından Buket Yıldız ve Bülent Kalpak'a

teşekkürlerimizi sunarız.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamışlardır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Alañón, M.E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., Gordon, M.H., & Pérez-Coello, M.S. (2011). A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry*, 128(4), 997-1002.
- Arnous, A., Makris, D.P., & Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6), 655-665.
- Atak, A., & Goksel, Z. (2019). Farklı Vitis Türlerine Mensup Üzüm Çeşit/Genotiplerinde Bazı Fenolik Madde Değişimlerinin Belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 56(2), 153-161.
- Averilla, J.N., Oh, J., Kim, H.J., Kim, J.S., & Kim, J.S. (2019). Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by-products. *Food science and biotechnology*, 28(6), 1607-1615.
- Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6657-6662.
- Basalekou, M., Pappas, C., Kotseridis, Y., Tarantilis, P.A., Kontaxakis, E., & Kallithraka, S. (2017). Red wine age estimation by the alteration of its color parameters: Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to monitor wine maturation

- time. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2017.
- Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of "antioxidant power": The Frap assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Burin, V.M., Costa, L.L.F., Rosier, J.P., & Bordignon-Luiz, M.T. (2011). Cabernet Sauvignon wines from two different clones, characterization and evolution during bottle ageing. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1931-1938.
- Cliff, M.A., King, M.C., & Schlosser, J. (2007). Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International*, 40(1), 92-100.
- Cosme, F., Pinto, T., & Vilela, A. (2018). Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. *Beverages*, 4(1), 22.
- Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L., & Giammanco, M. (2008). The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*, 111, 45-49.
- Di Profio, F., Reynolds, A.G., & Kasimos, A. (2011). Canopy management and enzyme impacts on Merlot, Cabernet franc, and Cabernet Sauvignon. II. Wine composition and quality. *American journal of enology and viticulture*, 62(2), 152-168.
- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., & Tikkanen, M. J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food chemistry*, 83(2), 255-262.
- Doshi, P., Adsule, P., Banerjee, K., & Oulkar, D. (2015). Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera* L.) by products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 181–190.
- Finotti, E., & Di Majo, D. (2003). Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Nahrung/Food*, 47(3), 186–187.
- Giusti, M.M., & Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, (1), F1-2.
- Granato, D., Katayama, F.C.U., & Castro, I.A. (2010). Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 1542-1549.
- Guerrini, L., Pantani, O.L., Politi, S., Angeloni, G., Masella, P., Calamai, L., & Parenti, A. (2019). Does bottle color protect red wine from photo-oxidation?. *Packaging Technology and Science*, 32(5), 259-265.
- He, F., Liang, N.N., Mu, L., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J., & Duan, C.Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, 17(2), 1483-1519.
- Huang, D.J., Ou, B.X., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., & Prior, R.L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437–4444.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- OIV. (2015). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, Vol 1& 2.
- Obrique-Slier, E., López-Solís, R., Castro-Ulloa, L., Romero-Díaz, C., & Peña-Neira, Á. (2012). Phenolic composition and physicochemical parameters of Carménère, Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc grape seeds (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *LWT-food Science and Technology*, 48(1), 134-141.
- Kalkan Yıldırım, H., & Şener, H. (2010). Farklı Mayşe Fermantasyon Sıcaklığı ve Süresinin Kırmızı Şarabın Cabernet Sauvignon Kimyasal ve Fiziksel Özelliklerine Etkisi. *Akademik Gıda*, 8(5), 12-19.
- Katalinić, V., Milos, M., Modun, D., Musić, I., & Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food chemistry*, 86(4), 593-600.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B., & Kinsella, E. (1994). Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 64–69.
- Lachman, J., Šulc, M., Faitová, K., & Pivec, V. (2009). Major factors influencing antioxidant contents and antioxidant activity in grapes and wines. *International Journal of Wine Research*, 1, 101–121.
- Leal, C., Santos, R.A., Pinto, R., Queiroz, M., Rodrigues, M., Saavedra, M.J., Barros, A., & Gouveias, I. (2020). Recovery of bioactive compounds from white grape (*Vitis vinifera* L.) stems as potential antimicrobial agents for human health. *Saudi journal of biological sciences*, 27(4), 1009-1015.
- Lee, S.Y., Lee, S.J., Yim, D.G., & Hur, S.J. (2020). Changes in the content and bioavailability of onion quercetin and grape resveratrol during in vitro human digestion. *Foods*, 9(6), 694.
- López-Alarcón, C., & Lissi, E. (2006). A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals. *Free Radical Research*, 40(9), 979-985.
- Manini, P., Lino, V., Franchi, P., Gentile, G., Sibillano, T., Giannini, C., Picardi, E., Napolitano, A., Valgimigli, L., Chiappe, C., & d'Ischia, M. (2019). A Robust Fungal Allomelanin Mimic: An Antioxidant

- and Potent π -Electron Donor with Free-Radical Properties that can be Tuned by Ionic Liquids. *Chem Plus Chem*, 84(9), 1331-1337.
- McDonald, M.S., Hughes, M., Burns, J., Lean, M.E.J., Matthews, D., & Crozier, A. (1998). Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 368–375.
- Mercurio, M.D., Damberg, R.G., Herderich, M.J., & Smith, P.A. (2007). High throughput analysis of red wine and grape phenolics-adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4651–4657.
- Mercurio, M.D., & Smith, P.A. (2008). Tannin quantification in red grapes and wine: comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5528–5537.
- Merkytė, V., Longo, E., Windisch, G., & Boselli, E. (2020). Phenolic Compounds as Markers of Wine Quality and Authenticity. *Foods*, 9(12), 1785.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., & Van Beek, T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.
- Minussi, R.C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G.M., & Duran, N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, 82, 409–416.
- Panceri, C.P., De Gois, J.S., Borges, D.L., & Bordignon-Luiz, M.T. (2015). Effect of grape dehydration under controlled conditions on chemical composition and sensory characteristics of Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 228-235.
- Pertuzatti, P.B., Mendonça, S.C., Alcoléa, M., Guedes, C.T., da Encarnação Amorim, F., Beckmann, A.P.S., Gama, L.G., & Américo, M.F. (2020). Bordo grape marc (*Vitis labrusca*): Evaluation of bioactive compounds in vitro and in vivo. *LWT*, 129, 109625.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A.I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112891.
- Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M., & Watson, B.T. (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 187–194.
- Prior, R. L., & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free radical biology and medicine*, 27(11-12), 1173-1181.
- Radonjic, S.S., Maras, V., & Kosmerl, T. (2019). The importance of total polyphenols content in red wine. *In The Third Mediterranean International Congress on Natural Sciences, Health Sciences and Engineering, Podgorica, Montenegro*.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology, Vol. 2: The Chemistry of Wine*. Wiley: West Sussex. pp 1–441.
- Romero-Díez, R., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M.J., Duarte, C.M., Matias, A.A., & Bronze, M.R. (2018). Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities. *Food chemistry*, 259, 188-195.
- Saint-Criq de Gaulejac, N., Provost, C., & Vivasoural, N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 425-431.
- Sartor, S., Caliarì, V., Malinovski, L.I., Toaldo, I.M., & Bordignon-Luiz, M.T. (2017). Bioactive profiling of polyphenolics and oenological properties of red wines from Italian grapes (*Vitis vinifera* L.) cultivated in a selected subtropical region. *International journal of food properties*, 20(2), 1319-1328.
- Singleton, V.L., & Rossi, J.J.A. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–58.
- Snopek, L., Mlček, J., Fic, V., Hlaváčová, I., Škrovánková, S., Fišera, M., Velichová, H., & Ondrášová, M. (2018). Interaction of polyphenols and wine antioxidants with its Sulfur dioxide preservative. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 12, 180–185.
- Somers, T.C., & Evans, M.E. (1977). Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “chemical age. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(3), 279–287.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins-Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assay for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675.
- Trouillas, P., Calliste, C. A., Allais, D. P., Simon, A., Marfak, A., Delage, C., & Duroux, J. L. (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal

- teas. *Food chemistry*, 80(3), 399-407.
- Tufarelli, V., Casalino, E., D'Alessandro, A.G., & Laudadio, V. (2017). Dietary phenolic compounds: biochemistry, metabolism and significance in animal and human health. *Current drug metabolism*, 18(10), 905-913.
- Urvieta, R., Jones, G., Buscema, F., Bottini, R., & Fontana, A. (2021). Terroir and vintage discrimination of Malbec wines based on phenolic composition across multiple sites in Mendoza, Argentina. *Scientific reports*, 11(1), 1-13.
- Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J.M., Martínez-Cachá, A., Pardo, F., & López Nicolás, J.M. (2003). Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4694-4700.