

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Zeynep Dilan ÇELİK

**NARİNCE ÜZÜMLERİNİN ŞARABA İŞLENMESİ SIRASINDA
MAYA FLORASININ BELİRLENMESİ VE İZOLE EDİLEN
BAZİ MAYALARIN STARTER KÜLTÜR
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2017

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NARİNCE ÜZÜMLERİNİN ŞARABA İŞLENMESİ SIRASINDA MAYA
FLORASININ BELİRLENMESİ VE İZOLE EDİLEN BAZI MAYALARIN
STARTER KÜLTÜR POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep Dilan ÇELİK

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 16/06/2017 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Prof. Dr.Turgut CABAROĞLU Prof.Dr.Filiz ÖZÇELİK Prof.Dr.HüseyinERTEN
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Prof. Dr. Serkan SELLİ
ÜYE

Doç. Dr. Haşim KELEBEK
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2014-3049**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin,
çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir
ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

NARİNCE ÜZÜMLERİNİN ŞARABA İŞLENMESİ SIRASINDA MAYA FLORASININ BELİRLENMESİ VE İZOLE EDİLEN BAZI MAYALARIN STARTER KÜLTÜR POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zeynep Dilan ÇELİK

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman :Prof. Dr. Turgut CABAROĞLU
Yıl: 2017, Sayfa: 174
Jüri : Prof. Dr. Turgut CABAROĞLU
: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
: Prof. Dr. Hüseyin ERTEN
: Prof. Dr. Serkan SELLİ
: Doç. Dr. Haşim KELEBEK

2014 ve 2015 yıllarını kapsayan bu çalışmada, Tokat ve Nevşehir Yöresi Narince şaralarının spontan fermantasyonu sırasında ortamda bulunan *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar izole edilmiştir. İzole edilen mayalar PZR-RFLP analizleri ve mayaların 26S rRNA D1/D2 gen bölgelerinin DNA dizi analizi ile tanımlanmıştır. Tanımlanan bazı mayaların beyaz şarap üretimi için önemli bazı teknolojik özellikleri belirlenmiş ve Narince şarabının üretiminde kullanılabilecek potansiyel starter kültür mayaları belirlenmeye çalışılmıştır. Narince üzümlerinden ve üzüm şirasının spontan fermantasyonu sırasında ortamdaki 124 adet *Saccharomyces* spp. olmayan maya ve 141 adet *S. cerevisiae* olmak üzere toplam 265 maya tanımlanmıştır. 10 maya cinsine ait 12 maya türü tanımlanmış, bunlar: *H'spora uvarum*, *H'spora guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus*, *P. kluyveri*, *I. terricola*, *I. orientalis*, *P. occidentalis*, *L. thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. ve *C. zemplinina*'dır. Teknolojik özellikleri belirlenen izolatlar arasından 1281, 1088, 1044 kodlu *S. cerevisiae* izolatları ile 214 *T. delbrueckii*, 773 kodlu *H'spora uvarum* izolatları, yüksek etanol ve SO₂ toleransı, 15°C'de yoğun gelişebilme, düşük veya orta derecede H₂S oluşturmaları, yüksek fermantasyon hızı ve fermantasyon verimleri, düşük uçurucu asit oluşturmaları, gliserol ve aroma maddelerini dengeli bir biçimde üretmeleri nedeniyle Narince şarabı üretiminde kullanılabilecek potansiyel starter mayaları olarak seçilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Narince, Spontan fermantasyon, Starter maya, *S. cerevisiae*, Non-*Saccharomyces*

ABSTRACT

PHD THESIS

DETERMINATION OF YEAST FLORA DURING THE VINIFICATION OF NARINCE GRAPE VARIETY AND INVESTIGATION OF STARTER CULTURE POTENTIAL OF SOME ISOLATED YEASTS

Zeynep Dilan ÇELİK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Supervisor : Prof. Dr. Turgut CABAROĞLU

Year: 2017, Pages: 174

Jury : Prof. Dr. Turgut CABAROĞLU

: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

: Prof. Dr. Hüseyin ERTEN

: Prof. Dr. Serkan SELLİ

: Assoc. Prof. Dr. Haşim KELEBEK

This study was carried out in the year of 2014 and 2015 vintages. The dynamics of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* spp. population during the fermentation of Narince grape variety grown in Tokat and Nevşehir regions (Cappadocia) and also technological properties of the most promising yeasts that could be used in the production of Narince wines as starter culture were investigated. Identification of yeasts was done by PCR-RFLP analysis of 5.8 ITS rRNA region and sequence information for the D1/D2 domains of the 26S gene. This method was used for molecular identification of isolated yeasts. During spontaneous fermentation of Narince must and from Narince grapes, a total of 265 yeasts were identified, 124 as non-*Saccharomyces*, 141 as *S. cerevisiae*. Twelve different species belonging to ten genera were found as: *H' spora uvarum*, *H' spora guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus*, *P. kluyveri*, *I. terricola*, *I. orientalis*, *P. occidentalis*, *L. thermotolerans*, *Metschnikowia* sp. and *C. zemplinina*. Consequently three *S. cerevisiae*, one *T. delbrueckii* and one *L. thermotolerans* yeasts were selected as a potential starter culture for Narince wine production with their ethanol and SO₂ tolerances, strong growth at 15°C, low-medium H₂S production, higher fermentation rate and fermentation power, low production of acetic acid and production of moderate level of aroma compounds.

Keywords: Narince, Spontaneous fermentation, Starter yeast, *S. cerevisiae*, Non-*Saccharomyces*

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Şarap üretimi sırasında alkol fermantasyonunu gerçekleştiren mayalar, bunların teknolojik özellikleri ve fermantasyonun gerçekleştiği koşullar şarabın bileşimi üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Şarabın en önemli kalite parametrelerinden biri olan aroma maddelerinin çoğu bu aşamada mayalar tarafından oluşturulmaktadır. Şarap üreticileri alkol fermantasyonunda yöreye özgü *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan suşları kullanmayı tercih etmektedir. Bunun sebebi, bu suşların izole edildikleri şarap bölgelerindeki ortam şartlarına daha kolay uyum sağlaması ve fermantasyon sırasında ortama kolayca hâkim olmasıdır. Bununla birlikte yöreye özgü maya suşlarının kullanılması şarapta yörenin özelliklerini taşıyan duyuşsal karakterlerin ortaya çıkmasını sağlar. Dünya genelinde şarap üretiminde spontan fermantasyondan ziyade ya yöreye özgü çeşitten izole edilen starter kültürler ya da şarap tipine bağlı starter kültürler kullanılmaktadır. Ülkemizde ise büyük şarap işletmelerinde starter kültür kullanılmakta, küçük işletmelerde ise spontan fermantasyon uygulanmaktadır. Türkiye’de şarap sektörü için starter kültür üretimi yapılmamakta sektörde kullanılan starter mayalar tamamen yurtdışından ithal edilmektedir.

Narince (*Vitis vinifera* L.) kalite beyaz şarap veren yerli üzüm çeşitlerimizden biridir. Narince üzümü Tokat ve Amasya çevrelerinde yetiştirilir. Son yıllarda ise özellikle Nevşehir-Ürgüp yöresinde yayılmaya başlamıştır.

2014 ve 2015 yıllarını kapsayan bu çalışmada, Tokat ve Nevşehir Yöresi Narince üzümlerinden ve üzüm şıralarının spontan fermantasyonu sırasında ortamda bulunan *Saccharomyces (S.) cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar izole edilmiştir. İzole edilen mayaların beyaz şarap üretimi için önemli bazı teknolojik özellikleri belirlenmiş ve Narince şarabının üretiminde kullanılabilecek potansiyel starter kültür mayaları belirlenmeye çalışılmıştır. İzole edilen mayaların moleküler yöntemle tanımlanmasında PZR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Mayaların moleküler yöntemle tanımlanması 3 aşamada yapılmıştır.

İlk aşamada 5.8 ITS rRNA bölgesi ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak PZR'da çoğaltılmıştır ve ITS boyutlarına göre gruplandırılmıştır. İkinci aşamada 5.8S ITS PZR ile çoğaltılan DNA restriksiyon enzimleriyle (*Hhl*, *HaeIII* ve *Hinfl*) kesilmiştir ve enzim boyutlarına göre tekrar gruplandırılmıştır. Üçüncü aşamada 26S rRNA'nın D1/D2' alanının çoğaltılması NL1 ve NL 4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve elde edilen PZR ürünleri sekanslanmıştır. Elde edilen sekans sonuçları BioEdith ve MEGA6 programları ile değerlendirilmiştir. Her türe ait en az bir izolat teknolojik özellikleri belirlenmek üzere seçilmiştir. Seçilen mayaların, etanol, SO₂, sıcaklık toleransı, H₂S oluşturma, killer aktivitesi, enzim profilleri, köpük oluşturma, yüksek şeker konsantrasyonunda gelişme, fermantasyon hızları, flokülasyon, köpük oluşturma, gliserol ve aroma maddeleri üretme potansiyelleri belirlenmiştir. Gliserol analizi HPLC ile, aroma maddelerinin analizi GC-MS tekniği ile etil asetat ve asetaldehit analizleri ise GC-FID tekniği ile belirlenmiştir. İzolatların bazı teknolojik özellikleri ile ilgili verilere varyans analizi uygulanmış ve önemli bulunan farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca izolatların ürettikleri aroma maddelerine temel bileşen analizi (Principle Components Analysis, PCA) uygulanmıştır.

Narince üzümü ve şıranın fermantasyonundan izole edilen izolatların sekans sonuçları BioEdith programında değerlendirildikten sonra BLAST programında karşılaştırılmış ve izole edilen mayaların türleri belirlenmiştir. Narince üzümlerinden ve üzüm şırasının spontan fermantasyonu sırasında ortamdan 141 adet *S. cerevisiae* ve 124 adet non-*Saccharomyces* olmak üzere 265 adet maya tanımlanmıştır.

Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen mayalara uygulanan filogenetik kümeleme analizine göre, 22 adet *S. cerevisiae*, 1 adet *S. cerevisiae/paradoxus*, 10 adet *Hanseniaspora (H'spora) uvarum*, 3 adet *Issatchenkia (I.) orientalis*, 2 adet *Lachancea (L.) thermotolerans*, 1 adet *Wickerhamomyces (W.) anomalus*, 1 adet *Metschnikowia spp.* 2 adet *Issatchenkia (I.) terricola*, 1 adet *Candida (C.) zemplinina*, 1 adet *H'spora guilliermondii*, 1 adet *Torulaspota (T.) delbrueckii* ve 3

adet *Pichia (P.) kluyveri* olmak üzere toplam 48 adet izolat teknolojik özellikleri belirlenmek üzere seçilmiştir.

Seçilen mayalarda öncelikle H₂S oluşturma, farklı sıcaklıklarda, SO₂ ve etanol konsantrasyonlarında gelişebilme özelliklerine göre bir ön eleme yapılmıştır. Farklı sıcaklık, SO₂ ve etanol konsantrasyonlarında zayıf gelişen, yoğun (koyu kahve ve siyah) H₂S oluşturan mayalar elenmiştir. İkinci aşamada, %12 etanol, 200 mg/L SO₂, 3.5 pH olan bir sıvı besiyeri hazırlanmış ve mayalar bu besiyerine aşılansarak 15 derecede 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bunun sonucunda yoğun gelişme gösteren mayaların (spektrofotometrede 620 nm de ölçümleri yapılarak belirlenmiştir) killer aktivitesi, enzim profilleri, köpük oluşturma ve yüksek şeker konsantrasyonunda gelişme özellikleri, fermantasyon hızları belirlenmiştir. Mayalar fermantasyon hızlarına göre yeniden elenmiş ve yalnızca fermantasyon hızı ve verimi yüksek olan 10 adet *S. cerevisiae* ve 6 adet *Saccharomyces* spp. olmayan izolatin diğer teknolojik özelliklerine (fermantasyon sonunda dibe çökme, uçar asit oluşturma ve sekonder metabolit) devam edilmiştir.

S. cerevisiae mayaları gliserol, izoamil alkol, 2-fenil etanol ve etil asetat bileşiklerini *Saccharomyces* spp. olmayanlara göre daha yüksek miktarda üretmiştir. *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar ise gama-bütürolakton ve asetaldehit bileşiklerini *S. cerevisiae* mayalarına göre daha yüksek miktarda oluşturmuştur. Mayaların oluşturdukları aroma maddeleri ile yapılan PCA analizine göre, *S. cerevisiae* mayaları *Saccharomyces* spp. olmayanlardan belirgin bir şekilde ayrılmışlardır.

S. cerevisiae izolatları arasında 1281 kodlu izolat yüksek fermantasyon hızı, ortamda düşük miktarda (0.8 g/L) kalıntı şeker bırakması, düşük miktarda uçar asit oluşturma, yüksek flokülasyon özellikleri ile ön plana çıkmış ve bunu 1044 ve 1088 kodlu izolatlar takip etmiş ve bu izolatlar potansiyel starter *S. cerevisiae* kültürleri olarak seçilmişlerdir.

Saccharomyces spp. olmayan türler arasından 214 kodlu *T. delbrueckii* izolatu, düşük fermantasyon hızına ve flokülasyon özelliğine sahip olmasına

rağmen, yüksek miktarda etanol üretmesi, düşük miktarda kalıntı şeker bırakması ve köpük oluşturması ve yüksek miktarda yüksek alkol oluşturması ile, 773 kodlu *H'spora uvarum* izolatu ise, 15°C'de diğler türlere göre daha yoğun gelişmesi, düşük miktarda kalıntı şeker bırakması, diğler *Saccharomyces* spp. olmayan türlere göre daha düşük uçar asit oluşturması ile öne plana çıkmıştır. Bu iki *Saccharomyces* spp. olmayan maya ve Narince şarabının üretiminde *S. cerevisiae* ile karışık kültür olarak kullanılabilir potansiyel starter *Saccharomyces* spp. olmayan kültürler olarak seçilmişlerdir.



TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında beni cesaretlendiren, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım danışmanım Sayın Prof. Dr. Turgut CABAROĞLU'na, tez izleme komitemde yer alan ve aynı zamanda tezimin mikrobiyoloji ve moleküler genetik konularındaki bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Hüseyin ERTEN'e, tez izleme komitemde yer alan ve jüri üyesi olarak tezimi değerlendiren Sayın Doç. Dr. Haşim KELEBEK'e, jüri üyesi olarak tezimi değerlendiren sayın Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK ve Sayın Prof. Dr. Serkan SELLİ'ye teşekkür ederim.

Çalışmama desteklerde bulunan Sayın Prof. Dr. Kubilay VURSAVUŞ, Sayın Doç. Dr. Hatıra TAŞKIN ve Sayın Dr. Fuat BOZOK'a, teşekkür ederim. Üzüm numunelerimi sağlayan Kavaklıdere ve Diren Şarapçılığa, doktora eğitimim boyunca şarap üretimi konusundaki bilgi ve tecrübelerini benimle içtenlikle paylaşan şarap üretim uzmanı Özge KAYMAZ'a teşekkür ederim. Doktora çalışmam sırasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Dr. Merve DARICI, Bilal AĞIRMAN' a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Hilal MERAL, Ebru ASLAN ve Gamze GÜÇLÜ'ye, doktora eğitimim boyunca her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Meltem BERBER, Ömür YOL, Dr. Selin Yabacı KARAOĞLAN, Dr. Özge CUMAOĞULLARI ve Figen GÖKÇE ve Serap DURAN'a teşekkür ederim.

Hayatımı şekillendiren kararlar vermemde etkili olan sevgisini her zaman kalbimde hissedeceğim ve özleyeceğim sevgili Babaanneme teşekkür ederim. Fikir ve önerileriyle kararlarıma ışık tutan abim Mustafa Kemal ÇOLAK'a, hayatımın her aşamasında her kararımda arkamda olan ve beni her daim destekleyen sevgili annem Hatice UÇAR ve manevi annem Aynur KIRIMLI'ya ve aileme teşekkür ederim.

Son olarak kendimi buraya ait hissettiren Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET.....	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Üzüm ve Üzümün Fermantasyonu Sırasında Maya Florası.....	4
2.2. Mayaların Teknolojik Özellikleri.....	16
2.2.1. Etanol Toleransı.....	17
2.2.2. Kükürt Dioksit Toleransı.....	18
2.2.3. Sıcaklığa Karşı Duyarlılık.....	19
2.2.4. Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Üretimi.....	21
2.2.5. Mayaların Killer Özelliği.....	22
2.2.6. Mayaların Enzimatik Aktivite Özellikleri.....	23
2.2.7. Yüksek Şeker Konsantrasyonunda Gelişme.....	25
2.2.8. Köpük Oluşturma Özelliği.....	26
2.2.9. Fermantasyon Hızı.....	26
2.2.10. Mayanın Uçar Asit Oluşturma Gücü.....	27
2.2.11. Fermantasyon Sonunda Dibe Çökme.....	28
2.2.12. Mayaların Ürettiği Sekonder Metabolitler.....	29
3. MATERYAL VE METOT.....	37
3.1. Materyal.....	37
3.2. Metot.....	38

3.2.1. Denemelerin Kurulması.....	38
3.2.2. Analiz Metotları.....	39
3.2.2.1. Üzümlerde Yapılan Mikrobiyolojik Analizler.....	39
3.2.2.2. Maya Sayımı.....	40
3.2.2.3. Fermantasyon Sırasında Yapılan Mikrobiyolojik Analizler.	40
3.2.2.4. Fermantasyon Sırasında Mayaların İzolasyonu.....	40
3.2.3. Mayaların Moleküler Karakterizasyonu	41
3.2.4. Mayaların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	44
3.2.4.1. Farklı Sıcaklıklarda Gelişebilme Özelliğinin Belirlenmesi	46
3.2.4.2. Etanol Toleransının Belirlenmesi	46
3.2.4.3. Kükürtdioksit Toleransının Belirlenmesi	46
3.2.4.4. Hidrojen Sülfür Üretme Özelliğinin Belirlenmesi.....	46
3.2.4.5. Mayaların Köpük Oluşturması	47
3.2.4.6. Mayaların Yüksek Şeker Konsantrasyonunda Gelişebilmesi	48
3.2.4.7. Killer Aktivitenin Belirlenmesi	48
3.2.4.8. Mayaların Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	49
3.2.4.9. Fermantasyon Hızlarının Belirlenmesi	50
3.2.4.10. Mayaların Fermantasyon Sonunda Çökme (Flokülasyon) Oranı.....	51
3.2.4.11. Uçar Asit Miktarı.....	52
3.2.4.12. İkincil Metabolitlerin Belirlenmesi.....	52
3.2.5. Şıralarda Yapılan Analizler	56
3.2.5.1. Genel Analizler.....	56
3.2.5.2. Şeker Analizleri.....	56
3.2.6. İstatistiksel Analizler	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	59
4.1. Şıraların genel bileşimi	59
4.2. Fermantasyon Sırasındaki Maya Florası	61

4.3. Maya İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu.....	67
4.3.1. Filogenetik Analizlerle Oluşan Maya Türleri.....	71
4.3.2. 2014 Yılında Tokat ve Nevşehir Yörelerinden İzole Edilen Mayaların Dağılımı.....	73
4.3.3. 2015 Yılında Tokat ve Nevşehir Yörelerinden İzole edilen Mayaların Dağılımı.....	77
4.4. Tanımlanan Mayaların Teknolojik Özellikleri.....	82
4.4.1. Mayaların Farklı Sıcaklıklarda Gelişmesi.....	82
4.4.2. Mayaların Etanol Toleransı.....	85
4.4.3. Mayaların Kükürt Dioksit Toleransı.....	88
4.4.4. Mayaların Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Oluşturması.....	90
4.4.5. Mayaların Seçici Besiyerinde Gelişimlerine Göre Seçimi.....	93
4.4.6. Mayaların Killer Özellikleri.....	95
4.4.7. Mayaların Yüksek Şeker Derişimine Dayanıklılığı.....	97
4.4.8. Mayaların Köpük Oluşturması.....	98
4.4.9. Mayaların Enzimatik Aktivite Özellikleri.....	100
4.4.10. Mayaların Killer Aktivite, Yüksek Şeker Derişiminde Gelişme, Köpük Oluşturma ve Enzim Aktivitelerine Göre Seçimi.....	103
4.4.11. Mayaların Fermantasyon Hızı.....	103
4.4.12. Mayaların Fermantasyon Sonunda Dibe Çökmesi (Flokülasyon). 106	
4.4.13. Mayaların Oluşturduğu Uçar Asit Miktarları.....	107
4.4.14. Mayaların Ürettiği Sekonder Metabolitler.....	109
4.4.14.1. Gliserol.....	109
4.4.14.2. <i>S. cerevisiae</i> İzolatlarının Ürettiği Aroma Maddeleri.....	112
4.4.14.3. <i>Saccharomyces</i> spp. Olmayan İzolatların Ürettiği Aroma Maddeleri.....	124
4.4.14.4. <i>S. cerevisiae</i> ve <i>Saccharomyces</i> spp. Olmayan Mayaların Ürettiği Aroma Maddelerinin Karşılaştırılması.....	135
4.4.15. Starter Kültür Potansiyeli Olan Mayaların Seçimi.....	139

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	143
KAYNAKLAR.....	147
ÖZGEÇMİŞ.....	163
EKLER	164



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Beyaz şarap mayasının teknolojik özellikleri.....	16
Çizelge 2.2. Bazı esterlerin aroma tanımlayıcıları, şaraptaki konsantrasyonları ve algılanma eşik değerleri (Swiegers ve ark., 2005)	32
Çizelge 3.1. 5.8S rRNA Analizinde Kullanılan Primerler.....	42
Çizelge 3.2. ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak yapılan 5.8S rRNA analizinde kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.....	42
Çizelge 3.3. RFLP analizinden kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	43
Çizelge 3.4. 26S rRNA Analizinde Kullanılan Primerler.....	43
Çizelge 3.5. API ZYM kitinde bulunan enzimler.....	49
Çizelge 3.6. İkincil aroma maddelerinin kalibrasyon verileri	55
Çizelge 4.1. 2014 ve 2015 yıllarında Tokat ve Nevşehir yörelerinden elde edilen Narince şıralarının genel bileşimi	59
Çizelge 4.2. Mayaların RFLP enzimleri ile kesilmeleri sonucu gruplandırılması	69
Çizelge 4.3. Maya izolatlarının farklı sıcaklıklarda gelişme özellikleri.....	82
Çizelge 4.4. Maya izolatlarının farklı etanol düzeylerinde gelişme özellikleri.....	86
Çizelge 4.5. Maya izolatlarının farklı SO ₂ düzeylerinde (mg/L) gelişme özellikleri.....	88
Çizelge 4.6. Maya izolatlarının ürettiği H ₂ S.....	91
Çizelge 4.7. Maya izolatlarının killer özellikleri	95
Çizelge 4.8. Maya izolatlarının yüksek şeker derişimine dayanıklılığı.....	97
Çizelge 4.9. Maya izolatlarının köpük oluşturma özellikleri	98
Çizelge 4.10. <i>S. cerevisiae</i> ve <i>Saccharomyces</i> olmayan mayaların enzim özellikleri.....	101

Çizelge 4.11. <i>S. cerevisiae</i> ve <i>Saccharomyces</i> spp. olmayan mayaların fermantasyon hızları, fermantasyon verimleri ve fermantasyon sonunda kalan şeker.....	104
Çizelge 4.12. <i>S.cerevisiae</i> izolatlarının ürettikleri gliserol miktarları	110
Çizelge 4.13. <i>Saccharomyces</i> spp. olmayan izolatların ürettikleri gliserol miktarları	111
Çizelge 4.14. Mayaların oluşturduğu gliserol miktarları.....	111
Çizelge 4.15. <i>S. cerevisiae</i> izolatlarının ürettikleri aroma maddelerinin miktarları	113
Çizelge 4.16. <i>Saccharomyces</i> spp. olmayan mayaların ürettikleri aroma maddeleri miktarları	126
Çizelge 4.17. Ticari <i>S. cerevisiae</i> suşu, Narince'den izole edilmiş <i>S. cerevisiae</i> ve <i>Saccharomyces</i> spp. olmayan mayaların ürettikleri aroma maddelerinin Min. Maks. ve Ortalama miktarları	136
Çizelge 4.18. <i>S. cerevisiae</i> ve <i>Saccharomyces</i> spp. olmayan mayaların bazı önemli teknolojik özellikleri	141

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1	Maya metabolizması sonucunda üretilen aroma aktif bileşikler (Swiegers ve ark., 2005)	29
Şekil 3.1.	Tokat ve Nevşehir Yörelerinden elde edilen Narince üzümleri	37
Şekil 3.2.	Mikrobiyolojik analizler için toplanan Narince üzüm örnekleri	38
Şekil 3.3	Tokat ve Nevşehir yöresi Narince üzümleri ile kurulan fermantasyon denemeleri	39
Şekil 3.4.	Mayaların teknolojik özelliklerinin belirlenmesinde izlenen yol	45
Şekil 3.5.	Bazı mayaların BIGGY agar da ürettikleri H ₂ S	47
Şekil 3.6.	Maya suşlarının killer aktivite sonucu oluşturdukları zonlar	49
Şekil 3.7.	API ZYM kit ile enzim aktivitelerinin belirlenmesi	50
Şekil 3.8.	Mayaların fermantasyon hızlarının belirlenmesi	51
Şekil 3.9.	Uçar asit oluşturma özelliklerinin belirlenmesi	52
Şekil 4.1.	Narince şirasında belirlenen şekerlere ait HPLC kromatogramı	61
Şekil 4.2.	2014 ve 2015 yıllarına ait Narince üzümlerindeki toplam maya sayıları	62
Şekil 4.3	Tokat yöresi tortu alma işlemi uygulanmamış denemeye ait maya popülasyonu	63
Şekil 4.4.	Tokat yöresi tortu alma işlemi uygulanmamış denemeye ait maya popülasyonu	64
Şekil 4.5.	Nevşehir yöresi tortu alma işlemi uygulanmamış denemeye ait maya popülasyonu	65
Şekil 4.6.	Nevşehir yöresi tortu alma işlemi uygulanmış denemeye ait maya popülasyonu	65
Şekil 4.7.	Mayaların 5.8S rRNA bölgelerinin ITS primerleri kullanılarak çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü	67

Şekil 4.8.	HinFI restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görünümü	68
Şekil 4.9.	HhaI restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görünümü	68
Şekil 4.10.	HaeIII restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görünüm	69
Şekil 4.11.	26S rRNA PZR ürünlerinin agoroz jeldeki görünümleri	70
Şekil 4.12.	Maximum Likelihood ile oluşturulan filogenetik ağaç	72
Şekil 4.13.	26S rRNA analizine göre 2014 yılında Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen mayaların tür düzeyindeki dağılımı	73
Şekil 4.14.	2014 yılında Tokat yöresinden izole edilen mayaların tür düzeyinde dağılımı	74
Şekil 4.15.	2014 yılında Tokat yöresi üzümlerinden ve fermantasyon denemeleri sırasında izole edilen mayaların dağılımı	75
Şekil 4.16.	2014 yılında Nevşehir yöresinden izole edilen mayaların tür düzeyinde dağılımı	75
Şekil 4.17.	2014 yılında Nevşehir yöresi üzümlerinden ve fermantasyon denemeleri sırasında izole edilen mayaların dağılımı	76
Şekil 4.18.	26S rRNA analizine göre 2015 yılında Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen mayaların tür düzeyindeki dağılımı	78
Şekil 4.19.	2015 yılında Tokat yöresinden izole edilen mayaların tür düzeyinde dağılımı	78
Şekil 4.20.	2015 yılında Tokat yöresi üzümlerinden ve fermantasyon denemeleri sırasında izole edilen mayaların dağılımı	79
Şekil 4.21.	2015 yılında Nevşehir yöresinden izole edilen mayaların tür düzeyinde dağılımı	80
Şekil 4.22.	2015 yılında Nevşehir yöresi üzümlerinden ve fermantasyon denemeleri sırasında izole edilen mayaların dağılımı	81

Şekil 4.23.	Mayaların 15° C' de, %12 Etanol, ve 100 mg/L SO ₂ içeren besiyerinde gelişimlerinin optik yoğunlukların göre dağılımı	94
Şekil 4.24	<i>S. cerevisiae</i> ve <i>Saccharomyces</i> spp. olmayan mayaların flokülasyon özellikleri	107
Şekil 4.25.	<i>S. cerevisiae</i> ve <i>Saccharomyces</i> spp. olmayan mayaların oluşturdukları uçar asit miktarları	108
Şekil 4.26.	<i>S. cerevisiae</i> izolatlarının ürettiği etil asetat miktarları.....	116
Şekil 4.27.	<i>S. cerevisiae</i> izolatlarının ürettikleri (etil asetat hariç) yüksek alkollerin asetatlarının miktarları	118
Şekil 4.28.	<i>S. cerevisiae</i> izolatlarının ürettikleri yağ asiti etil esterlerinin miktarları.....	119
Şekil 4.29.	<i>S. cerevisiae</i> izolatlarının ürettikleri asetaldehit miktarları.....	121
Şekil 4.30.	Narince'den izole edilmiş <i>S. cerevisiae</i> izolatlarının ürettikleri aroma maddelerinin temel bileşen analizi; F1 ve F2 bileşenleri.....	123
Şekil 4.31.	Narince'den izole edilmiş <i>S. cerevisiae</i> izolatlarının ürettikleri aroma maddelerinin temel bileşen analizi; F1 ve F3 bileşenleri.....	123
Şekil 4.32.	<i>Saccharomyces</i> spp. olmayan izolatlarının ürettikleri etil asetat miktarları.....	128
Şekil 4.33.	<i>Saccharomyces</i> spp. olmayan izolatlarının ürettikleri yüksek alkollerin asetatlarının toplam miktarları.....	130
Şekil 4.34.	<i>Saccharomyces</i> spp. olmayan izolatlarının ürettikleri yağ asiti etil esterlerinin toplam miktarları.....	131
Şekil 4.35.	<i>Saccharomyces</i> spp. olmayan izolatlarının ürettikleri asetaldehit miktarları.....	133
Şekil 4.36.	Narince'den izole edilmiş <i>Saccharomyces</i> spp. olmayan izolatların ürettikleri aroma maddelerinin temel bileşen analizi; F1 ve F2 bileşenleri.....	134

Şekil 4.37. Ticari maya suşu, Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettikleri aroma maddelerinin temel bileşen analizi.....139



SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>S.</i>	: <i>Saccharomyces</i>
<i>H'spora</i>	: <i>Hanseniaspora</i>
<i>T.</i>	: <i>Torulaspota</i>
<i>C</i>	: <i>Candida</i>
<i>L.</i>	: <i>Lachancea</i>
<i>I.</i>	: <i>Issatchenkia</i>
<i>P.</i>	: <i>Pichia</i>
<i>W.</i>	: <i>Wickerhamomyces</i>
TH	: Tokat Yöresi Üzümi
NH	: Nevşehir Yöresi Üzümi
TA	: Tokat Yöresi Tortu Alma İşlemi Uygulanmamış Deneme
TB	: Tokat Yöresi Tortu Alma İşlemi Uygulanmış Deneme
NA	: Nevşehir Yöresi Tortu Alma İşlemi Uygulanmamış Deneme
NB	: Nevşehir Yöresi Tortu Alma İşlemi Uygulanmış Deneme
F1	: Fermantasyon başı
F2	: Fermantasyon ortası
F3	: Fermantasyon sonu
SO ₂	: Kükürt dioksit
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
YPD	: Yeast Extract Peptone Dextrose (Maya ekstrakt pepton dekstroz)
YNB	: Yeast Nitrogen Base
BIGGY	: Bismuth Glucose Glycine Yeast Agar (Bismut glukoz glisin maya agar)
Kob/mL	: Koloni oluşturan birim/ mililitre
FH	: Fermantasyon Hızı
FG	: Fermantasyon Gücü
dH ₂ O	: Deiyonize su

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
FID	: Alev İyonizasyon Dedektörü
GC	: Gaz Kromatografisi
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
RID	: Reaktif İndeks Dedektörü
UV	: Ultraviyole (Morötesi)
PCA	: Temel Bileşen Analizi

1. GİRİŞ

Ülkemiz, dünya bağcı ülkeler arasında 462 bin hektar bağ alanı ile 5. ve 3.7 milyon ton yaş üzüm üretimi ile 6. sırada yer almaktadır. Ancak ülkemizde şaraba işlenen üzüm miktarı toplam üretimin yaklaşık %2'si (OIV, 2016) kadardır. Bunun nedeni, ülkemizde şarap tüketiminin az ve ihracatın düşük olmasıdır.

Şarapta kalite, başta çeşit olmak üzere teruar olarak da adlandırılan üzümün yetiştiği bölgenin iklim ve coğrafik yapısına, üzüm ve fermantasyon sırasındaki mikrofloraya, uygulanan üretim tekniğine ve şarabın dinlendirme ve olgunlaşma koşullarına bağlıdır (Fleet ve Heard, 2002). Üretim sırasında alkol fermantasyonunu gerçekleştiren mayalar ve fermantasyonun gerçekleştiği koşullar şarabın bileşimi üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Şarabın en önemli kalite parametrelerinden biri olan aroma maddelerinin çoğu bu aşamada oluşmaktadır. Şarap üretiminde pastörizasyon işlemi uygulanmadığından üzümlerin doğal maya florası, koşullara bağlı olarak alkol fermantasyonu üzerinde etkili olmakta ve bu etki şarabın bileşimine de yansımaktadır. Şarap üretiminde mayaların varlığı ile ilgili ilk çalışmalar 125 yıl önce Louis Pasteur'un öncülüğünde başlamıştır. Pasteur şaraptaki alkol fermantasyonundan mayaların sorumlu olduğunu bulmuştur. Pasteur'den sonra şarap mikrobiyolojisi ile ilgili çalışmalar artarak devam etmiştir (Mortimer ve ark, 1999; Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a).

Üzümler farklı fizyolojik özelliklere sahip, mantar, maya, bakteri gibi birçok mikroorganizmayı üzerinde barındırır. Bu mikroorganizmalar arasındaki bazı türler sadece üzümlerde bulunurlar. Şarap mikrobiyolojisi açısından önemli mikroorganizmalar mayalar, laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterileridir. Bu mikroorganizmaların oranı üzümün olgunluk derecesine ve ortamdaki besin maddelerine göre değişir (Ribéreau-Gayonve ark, 2006a; Barata ve ark, 2012).

Üzüm şirasının fermantasyonu, üzümde ve şaraphane ortamında doğal olarak bulunan birçok maya türünün dahil olduğu kompleks bir mikrobiyal prosestir. Fermantasyonu *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspota* ve

Hansenula cinslerine ait maya türleri başlatır ancak, *S. cerevisiae* üzümde yaygın olarak bulunmamasına rağmen, fermantasyonun ileri aşamalarında yüksek etanol toleransı nedeniyle ortama hakim olur. Günümüzde kullanılan ticari maya suşları genellikle *S. cerevisiae*' ya ait suşlardır (Bauer ve ark, 2000; Bisson ve ark, 2009).

Şarap üreticileri alkol fermantasyonunda yöreye özgü *S. cerevisiae* suşlarını kullanmayı tercih etmektedir. Bunun sebebi, bu suşların izole edildikleri şarap bölgelerindeki ortam şartlarına daha kolay uyum sağlaması ve fermantasyon sırasında ortama kolayca hakim olmasıdır. Bununla birlikte yöreye özgü maya suşlarının kullanılması şarapta yörenin özelliklerini taşıyan duyuşsal karakterlerinin ortaya çıkmasını sağlar (Perez-Coello ve ark, 1999). Fermantasyon prosesindeki maya popülasyonunun şarabın kimyasal ve duyuşsal özelliklerine etkisi ile ilgili birçok çalışma vardır (Clemente-Jimenez ve ark, 2004; Elmacı ve ark, 2014).

Ülkemizde şarap işletmelerinde genellikle kontrollü alkol fermantasyonu tercih edilmekte ve maya olarak yurt dışında yabancı üzüm çeşitlerinden izole edilmiş ticari maya suşları kullanılmaktadır. Ancak yöreye özgü kaliteli şaraplar üretebilmek için alkol fermantasyonu sırasında yalnızca kendi yöresinden izole edilen mayaların kullanılması gerektiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Perez-Coello ve ark, 1999; Demuyter ve ark., 2004; Francesca ve ark, 2010). Narince (*Vitis vinifera* L.) ülkemizde yetişen iyi kalite şarap veren beyaz üzüm çeşitlerimizden biridir. Narince üzümü Tokat ve Amasya çevrelerinde yetiştirilir. Son yıllarda ise özellikle Nevşehir-Ürgüp yöresinde yayılmaya başlamıştır (Canbaş, 2008.). Narince, taneleri orta boylu, yuvarlak ve sıkı salkımlardan oluşur. Narince üzümünden yapılan şaraplar ise yeşilimsi sarı renkte olup, zengin aromaya ve genellikle dengeli asitliğe sahip olurlar ve yıllandırmaya uygun şaraplar üretilir (Selli ve ark, 2006; Canbaş, 2008).

Bu çalışmanın amacı, 2014 ve 2015 yıllarında Tokat ve Nevşehir Yöresi Narince üzümünün şaraba işlenmesi sırasında maya florasını belirlemek, moleküler tekniklerle tanımlamak ve tanımlanan bazı mayaların teknolojik özelliklerini belirleyerek starter kültür potansiyellerini saptamaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

İnsanoğlu tarihin ilk zamanlarından beri fermente içki üretmektedir. Ancak mayaların alkol fermantasyonundaki rolü 19. yüzyıl ortalarında anlaşılmaya başlanmıştır. 1680 yılında Hollandalı bir tüccar olan Antonie van Leeuwenhoek ilk defa kendi yaptığı mikroskop ile birada bulunan mayaları gözlemlemiştir. 18 yüzyılda Lavoisier alkol fermantasyonu ile ilgili kimyasal çalışmalar yapmıştır. Bir sonraki yüzyılda alkol fermantasyonu ile ilgili çalışmalar Gay-Lussac tarafından sürdürülmüştür. 1785 yılında, İtalyan bir bilim adamı olan Fabroni, mayalama işleminin, bitki-hayvan benzeri bir canlı tarafından gerçekleştirildiği ve bu canlının alkol fermantasyonundan sorumlu olduğunu kanıtlanmıştır. 1837 yılında Fransız fizikçi Charles Cagnard de La Tour ilk kez mayaların canlı organizmalar olduğunu ortaya koymuştur. Alman doğa bilimci Schwann sıcaklık ve belirli kimyasalların alkol fermantasyonunun durmasına neden olacağı ile ilgili teorisini doğrulamıştır. 1876 yılında Louis Pasteur ilk kez üzümün yüzeyinden gelen mayaların spontan alkol fermantasyonundan sorumlu olduğunu açıklamış ve bununla birlikte birçok maya cinsi ve türünü izole etmiştir. Bunun yanında Pasteur mayaların, şarabın duyuşal özellikleri üzerine de etkili olduğunu, alkol ve karbondioksitin yanı sıra gliserol gibi ikincil metabolitleri de ürettiğini kanıtlamıştır (Erten, 1997; Kurtzman ve Fell, 1998b; Ribererau-Gayon ve ark, 2006a; Chambers ve Pretorius, 2010).

Mayalar, tomurcuklanma veya sporla üreyen tek hücreli mantarlar olarak kabul edilirler. Yapılan son sınıflandırmaya göre mayalar Ascomycetes, Basidiomycetes ve Deuteromycetes olmak üzere mantarlar aleminde bulunan 3 grupta toplanmışlardır. Bu üç guruba ait 81 cins ve 590 tür vardır ve sinonimler, aynı türdeki farklı fizyolojik özellikler göz önüne alındığında 19. yy' dan bugüne 4000 maya türü adı kullanılmıştır. Ancak bunlardan yalnızca 15 tanesi üzüm üzerinde doğal olarak bulunurlar ve şarap üretim prosesine dahil olurlar (Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a).

Üzümler mantar, maya ve bakteriden oluşan kompleks bir mikrofloraya sahiptir. Bu canlı gruplarından parazit mantarlar gibi bazıları yalnızca üzümün yüzeyinde bulunurken diğerleri fermantasyon ortamında da yaşamlarını sürdürerek şarabın mikroflorasını oluştururlar. Mayalar şarap üretimi için şarap mikroflorasına ait en önemli canlı grubunu oluştururlar, Çünkü *Saccharomyces* olmadan kaliteli bir şarap üretmek imkânsızdır. *Saccharomyces*'in yanı sıra birçok *Saccharomyces* spp. olmayan maya türü de şarap üretimine dahil olmakta ve özellikle son yıllarda bunların kültürleri şarap sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır (Kurtzman ve Robnett, 1998b; Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a; Barata ve ark, 2012).

2.1. Üzüm ve Üzümün Fermantasyonu Sırasında Maya Florası

Mayalar doğada yaygın bir şekilde ve genellikle toprakta, bitkilerin yüzeyinde ve hayvanların sindirim sisteminde bulunurlar. Rüzgârlar ve böcekler yardımı ile doğada yayılırlar. Asma bitkisinde de düzensiz bir dağılım gösterirler. Az miktarlarda yapraklarda, sapta ve olgunlaşmamış üzüm tanesinde bulunurlar ve üzüm olgunlaşırken tane kabuğunda yoğunlaşırlar (Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a).

Sağlıklı bir üzüm tanesinde bağbozumundan hemen önce maya popülasyonu 10^3 - 10^5 kob/mL'dir (Fleet ve Heard, 2002). Üzüm tanesindeki baskın mayalar *Kloeckera* ve *Hanseniaspora* cinslerine ait türlerdir ve meyvenin toplam maya florasının % 50'den fazlasını oluştururlar. Üzümlerde, *Kloeckera* ve *Hanseniaspora* yanında daha az sayıda da *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* ve *Rhodotorula* cinsi mayalar bulunur. Kuvvetli fermentatif özelliği ile bilinen *Saccharomyces* cinsi mayalar üzümde bulunurlar ancak popülasyonları genellikle 50 kob/mL'den düşük olur (Henschke ve Jiranek, 2002; Fugelseng ve Edwards, 2007; Bisson ve Joseph, 2009).

Üzümdeki maya çeşidini ve popülasyonunu etkileyen birçok etken vardır. Bunlar; bağın coğrafi konumu, toprak çeşidi, bağın yaşı, üzüm çeşidi, asmanın olgunlaşması sırasındaki iklim koşulları, bağbozumunda kullanılan yöntemler,

pestisit kullanımı, bağbozumu sırasında üzümün olgunluk durumu, böcek, maya ve kuşların verdiği fiziksel zararlardır (Beltran ve ark., 2002; Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a; Fransesca ve ark, 2010).

Fermantasyon sırasındaki maya popülasyonu ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Şarap fermantasyonu spontan ve ticari maya suşu ile başlatılan fermantasyon olarak iki guruba ayrılabilir. Spontan fermantasyon üzüm kabuğunda ve şaraphane ortamında doğal olarak bulunan mayalar tarafından gerçekleştirilir (Mortimer ve Polsinelli, 1999).

Üzüm, şıra ve şaraptan mayaları izole etmek ve saymak için besiyeri ortamında yayma tekniği en çok kullanılan ve en güvenilir yöntemdir. Besiyeri olarak farklı agarlar kullanılmaktadır bunlar; şıra agar, malt ekstrakt agar, maya-malt (YM) agar ve diğer besin agarlarıdır. Bu besiyerleri, fermantasyon sırasında bulunan bütün maya türlerinin yetişebileceği seçici olmayan besiyerleridir (Fleet ve Heard, 2002).

Saccharomyces ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaları birbirinden ayırmak için kullanılan en yaygın besiyeri lizin agar'dır. *Saccharomyces* cinsi mayalar lizini azot kaynağı olarak kullanamazlar bu nedenle bu besiyerinde gelişemezler. Ancak yapılan bazı çalışmalarda 'yabani' *Saccharomyces* cinsi mayaların lizin agarda çok yavaş geliştiği bunun yanında bazı *Saccharomyces* spp. olmayan mayalarında bu besiyerinde iyi gelişmediği gözlenmiştir (Bisson ve Joseph, 2009).

Heard ve Fleet (1986), fermantasyon sırasında *Saccharomyces* spp. olmayan (*Kl. apiculata*, *C. stellata*) mayaların izole edilip sayılabilmesi için en uygun besiyerinin lizin-agar olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan araştırmalarda %12 etanol ve %0,015 metabisülfid içeren besin ortamının fermantasyon sırasında bulunan *Saccharomyces* mayaları için seçici besiyeri olacağı belirlenmiştir. Bu besiyerinde alkol ve kükürtdioksit toleransı düşük olan *Kloeckera* ve *Hanseniaspora* cinsi mayalar çoğalamaz bu nedenle *S. cerevisiae*'nin çoğalmasını gözlemek için kullanışlı bir besiyeridir (Fleet ve Heard, 2002).

Mayaların tanımlanması, mayaların izolasyonundan ve saf kültürlerinin elde edilmesinden sonra moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak yapılır. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR/PZR) kullanıldığı DNA bazlı metotlar gen ekspresyonu ile oluşan değişikliklerden etkilenmezler bu nedenle mayaların hızlı bir şekilde tanımlanması için kullanılan en uygun metotlardır. Bu aşamada mayalar izole edildikten ve saflaştırıldıktan sonra, 26S rRNA'nın sekanslanması, 5.8S rRNA'nın ya da mitokondrial DNA (mtDNA)'nın ITS (internal transcribed spacer) bölgesinin endonükleaz enzimleri kullanılarak kesilmesi ve gruplandırılması gibi metotlar kullanılmaktadır (Clemente-Jimenez ve ark, 2004; Bisson ve Joseph, 2009; Manzanares ve ark, 2011).

Jemec ve ark (2001), 5 farklı Malvasia üzüm şirasının spontan fermantasyonu sırasındaki maya popülasyonunu incelemişlerdir. İzole edilen 937 izolatin tamamının killer aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. *Saccharomyces* spp. olmayan türler PCR-RFLP analizleri ve fizyolojik testlerle belirlenmiştir. Tortu çöktükten sonra şıradaki toplam maya popülasyonunun 10^5 kob/mL olduğunu ve şırada *Candida*, *Metschnikowia*, *Hansenispora*, *Rhodotorula*, *Issatchenkia* ve *Debaryomyces* türlerinin ortama hakim olduğu bildirilmiştir. Şırada *S. cerevisiae* tanımlanamamış, ancak fermantasyonun ileri aşamalarında farklı karyotiplere sahip *S. cerevisiae* izolatlarının ortama hakim olduğu belirlenmiştir.

Beltran ve ark (2002), Garnatxa ve Xarello üzüm şıralarının fermantasyonu sırasında ortamdaki maya florasını incelemişlerdir. Bu çalışma 1995-2000 yılları arasında yapılmış ve çalışmada kullanılan şaraphane ilk kez bu araştırma için kullanılmıştır. *Saccharomyces* spp. olmayan ve *S. cerevisiae* suşları sırasıyla ribozomal DNA ve mitokondrial DNA RFLP teknikleri ile tanımlanmıştır. *Saccharomyces* spp. olmayan suşlardan özellikle *H'spora uvarum* ve *C. stellata* fermantasyonun ilk aşamasında ortamda baskın türler olmuştur. Daha sonra *S. cerevisiae* ortama hakim olmuştur. Ancak 1999 yılı sırasında ve fermantasyon başında *S. cerevisiae*'nin baskın tür olduğu bildirilmiştir. Fermantasyonda ticari

maya kullanımına devam edilmesiyle yerli maya popülasyonunun azaldığı bildirilmiştir.

Van Keulen ve ark (2003), Lake Erie yöresinde yetişen, Chardonnay, Riesling ve Pinot Gris'in spontan fermantasyonu sırasında maya popülasyonunu incelemişlerdir. Çalışmada *Saccharomyces* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaları biyokimyasal ve moleküler tekniklerle izole edip tanımlamışlardır. Mayaların moleküler karakterizasyonun RFLP ve 26 sRNA gen bölgesinin sekansı ile belirlenmiştir. Fermantasyonun başında *Saccharomyces* spp. olmayan *Hanseniaspora* cinsine ait türlerin ortama hakim olduğu fermantasyonun ileri aşamalarında ise *S. cerevisiae* türünün baskın olduğu bildirilmiştir.

Rementeria ve ark (2003), Bask' da bulunan (Kuzey İspanya) 'Txakoli de Bizkaia' şarap bölgesindeki maya popülasyonu üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar 1996 - 1997 bağbozumu yıllarına ait, bölgedeki beş farklı bağdan temin edilen farklı üzüm çeşitleri ile gerçekleştirilen spontan fermantasyon sırasındaki maya popülasyonlarını incelemişlerdir. Analizler sonucunda, 1997 bağbozumu yılına ait üzümlerdeki maya popülasyonunun daha fazla olduğu bildirilmiştir. Toplamda beş cinse ait yedi tür tanımlanmış, 1996 yılına ait üzümlerde en baskın cins *Rhodotorula* iken 1997 yılına ait üzümlerde baskın cinsin *Kloeckera* olduğu belirlenmiştir. Üzüm ve şıradan nadiren izole edilen *S. bayanus*'un ise fermantasyonun sonunda ortamdaki baskın tür olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte 1997 yılına ait bazı örneklerden *Saccharomyces* cinsine ait *S. kluyvery* türünün izole edildiği bildirilmiştir.

Demuyter ve ark (2004), Alsatian şaraplarında spontan fermantasyon sırasında ortamda bulunan mayaları belirlemişlerdir. Çalışmada, üç yıl boyunca şarap üretim prosesinin farklı aşamalarında sıra örneklemeleri yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda fermantasyonun başında ve sonunda *S.cerevisiae* klonları belirlenmiş ve inter- γ PZR yöntemi ile tanımlanmıştır. *Saccharomyces* spp. olmayan klonlar ise MET-2 genlerine uygulanan PZR-RFLP yöntemiyle suş düzeyinde tanımlanmışlardır. Bunun yanında bağda ve ezme işleminden sonra

tankta *Saccharomyces* popülasyonunu incelemişlerdir. Sonuçta bağdaki *Saccharomyces* popülasyonunun oldukça homojen olduğu, şarap üretim prosesi sırasında yeni suşların ortaya çıktığı, tanktaki maya popülasyonunun yalnızca *S. uvarum*'dan oluştuğu bildirilmiştir.

Nurgel ve ark (2005), 1998 ve 1999 yıllarında iki yıl süreyle Emir ve Kalecik karası üzüm şıralarının spontan fermantasyonu sırasında maya popülasyonunu incelemişlerdir. 1998 yılı Emir şırasının fermantasyonu sırasında *Kloeckera (Kl.) apiculata*, *Kluyveromyces (K.) thermotolerans*, *S.cerevisiae* ve *Candia (C.) pulcherrima* türlerinde ortama hakim olduğu *S. cerevisiae* türü baskın olduğunda *Saccharomyces* spp. olmayan türlerin popülasyonunun azaldığı bildirilmiştir. 1999 Emir şırasının spontan fermantasyonunda *Kl. apiculata*, *C. dattilla*, *C. pulcherrima*, *C. krusei* ve *S. cerevisiae* türleri izole edilmiş ve bu türlerin tamamının fermantasyon sonuna kadar ortamda kaldığı bildirilmiştir. 1998 Kalecik karası şırasının spontan fermantasyonu sırasında *Kl. apiculata*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae*, *C. holmii*, *C. valida*, *C. guillermundii* ve *Candida* sp türlerinin, 1999 yılı Kalecik karası şırasının fermantasyonu sırasında ise *Kl apiculata*, *C. pulcherrima*, *S. cerevisiae*, *C. holmii*, *C. valida* türlerinin izole edildiği bildirilmiştir.

Combina ve ark (2005), çalışmalarında Arjantin'de yetişen Malbec üzüm şırası ile endüstriyel koşullar altında gerçekleştirilen spontan fermantasyon sırasındaki maya popülasyonunun gelişimini incelemişlerdir. Çalışmada spontan fermantasyon sırasında ortamda önemli sayıda *Saccharomyces* spp. olmayan maya türleri olduğu ve özellikle *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata* ve *Metschnikowia pulcherrima* türlerinin yaygın olduğu bildirilmiştir.

Raspor ve ark (2006), kupaj yapılarak elde edilen ve Slovenya'nın coğrafi işaretli Cvček şarabının üretiminde kullanılan farklı üzüm çeşitlerinin maya florasını incelemişlerdir. Maya türlerinin çeşitliliğini belirlemek için PZR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Üzümlerin yüzeyinde *S. cerevisiae* türünün olmadığı, toplam 13 farklı *Saccharomyces* spp. olmayan maya türünün tanımlandığı bildirilmiştir.

Mercado ve ark (2007), Zona Alta del Rio Mendoza (Arjantin) bölgesinde yetişen, 2001 ve 2002 bağbozumu yıllarına ait Malbec üzümü ve sırasında ve şaraphane ortamındaki yerli *S. cerevisiae* mayalarını incelemişlerdir. Malbec üzümlerinde ve fermantasyon başında *Saccharomyces* cinsine ait maya türlerinin konsantrasyonunun düşük olduğu belirlenmiştir. Fermantasyonun sonunda ortamda bulunan mayaların %30-60'ının şaraphane ortamında varolan mayalar olduğu ve şaraphanenin mikroflorasına ait *Saccharomyces* cinsine ait maya türleri belirlenmiştir. Fermantasyon sırasında ortamda farklı oranlarda ticari maya suşları olduğu belirlenmiş fakat şaraphane ortamındaki popülasyonlarının düşük olduğu bildirilmiştir.

Gonzales ve ark (2007), Tenerife adasının 5 farklı şarap bölgesine ait, 11 şarap işletmesinden 2002 bağbozumu yılına ait fermantasyon sırasında ortamdaki maya florası incelenmiştir. Mayalar tür düzeyinde PZR-RFLP tekniği ile tanımlanmış, suş düzeyindeki tanımlama için ise mtDNA-RFLP tekniği kullanılmıştır. Fermantasyonun başında 26 maya türünün tanımlandığı ve *S.cerevisiae* suşlarının yalnızca bir şarap bölgesinden izole edildiği bildirilmiştir.

Di Maro ve ark (2007), Champania (İtalya) bölgesine özgü Catalanesca beyaz üzüm şirasıyla yapılan spontan fermantasyon sırasında maya florasını incelemişlerdir. Mayaların tanımlanmasında PZR-DGGE ve 26s RNA gen bölgelerinin sekans analizleri yöntemleri kullanılmıştır. Moleküler analizler sonucunda onbir farklı cinse ait onyediy farklı maya türü tanımlanmıştır. Fermantasyonun başında *Hanseniaspora* spp., *Issatchenkia* spp, ve *Candida* spp. cinslerinin, ileri aşamalarında ise *S. cerevisiae* türünün ortama hakim olduğu bildirilmiştir.

Romancino ve ark (2008), Sicilya' nın iki farklı bölgesinde yetişen Catarratto, Nero d'Avola, Muscat ve Frappato üzüm şiralarında *Saccharomyces* spp. olmayan maya popülasyonunu incelemişlerdir. Mayaların moleküler yöntemlerle tanımlanmasında PZR-RFLP yöntemi kullanılmış ve moleküler analiz sonucunda her iki yöreye ait üzüm şiralarında *C. stellata*, *H'spora guilliermondii*,

H'spora osmophila, *H'spora uvarum*, *I. terricola*, *Kl. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *Zygoascus hellenicus*, *Zygosaccharomyces bailii* ve tanımlanamayan bir türün izole edildiği bildirilmiştir.

Blanco ve ark (2008), Galica (İspanya)'nın yerli beyaz çeşidi olan Lado (*Vitis vinifera*) üzüm şirasının spontan ve ticari maya suşu aşılansarak gerçekleştirilen fermantasyonlar sonunda ortamda bulunan maya popülasyonunun şarabın kimyasal özellikleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada mayaların sayımı için WL besin ve YPD agar, *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sayımı için Lizin agar kullanılmıştır. İzole edilen *S. cerevisiae* mayalarının karakterizasyonu mtDNA-RFLP tekniği ile belirlenmiş ve restriksiyon enzimi olarak *HinfI* kullanılmıştır. Spontan fermantasyon sırasında izole edilen *S. cerevisiae* türüne ait suşların genetik çeşitliliğinin düşük olduğu bildirilmiştir. Fermantasyonlar sonunda elde edilen şarapların genel olarak alkol derecelerinin ve toplam asit değerlerinin yüksek olduğu belirlenmiş ve spontan fermantasyon yapılan şarabın alkol derecesinin ticari maya suşu kullanılan şaraba göre daha düşük olduğu, toplam asit değerinin ise daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Chavan ve ark (2009), yaptıkları çalışmada Hindistan'da şarap üretiminde kullanılan Bangalore blue, Zinfandel, Cabernet, Cahenin Blanc, Sauvignon Blanc ve Shiraz olmak üzere altı üzüm çeşidine ait maya florasını araştırmışlardır. Mayaların morfolojik, koloni, fizyolojik karakteristiği belirlenmiş, ve mayalar rDNA'larındaki 5.8 S-ITS bölgelerinin sekanslanması ile tanımlanmışlardır. Sekans sonuçlarına göre 7 farklı cinse ait 11 farklı tür tanımlanmış ve bunların, *C. azyma*, *Candida quercitrusa*, *Debaryomyces hansenii*, *H'spora guilliermondii*, *H. viniae*, *H'spora uvarum*, *I. orientalis*, *I. terricola*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae* ve *Zygoascus steatolyticus* olduğu bildirilmiştir.

Francesca ve ark (2010), Champania bölgesinde bulunan Taurasi yöresindeki (İtalya) 4 bağdan (Coste, Fontana Iuto, Case d'alto ve Corridero) toplanan üzüm (Rovello bianco), yaprak, toprak, çimen, böcek ve kuş örneklerinde bulunan maya popülasyonunu incelemişler ve izole ettikleri yabancı mayaları suş

düzeyinde tanımlanmışlardır. Mayaların tanımlanmasında RAPD-PZR tekniği kullanılmıştır. İzole edilen *S. cerevisiae* suşu ve ticari maya suşu ile fermantasyon yapılmış ve elde edilen şarapların kimyasal ve duyuşal özellikleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada yörenin (*teroir*) maya popülasyonu ve çeşitliliği üzerinde etkisinin olduğu ve *teroir*'ın şarabın karakteristiği üzerine etkisi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca kuşların beslenme faaliyetleri sırasında mayaların yayılmasını sağladıkları bildirilmiştir.

Zhang ve ark (2010), Yeni Zelanda da bulunan ticari şaraphanelerdeki ve bağlardaki maya florasını incelemişlerdir. 2003 ve 2009 yılları arasında gerçekleştirilen çalışmada, moleküler analizler ile 17 farklı üzüm şirasından 1279 maya kolonisi izole edilmiş ve 9 cinse ait 25 maya türü tanımlanmıştır. Ayrıca mikrosatellit yöntemi ile izole edilen *S. cerevisiae* mayaları suş düzeyinde tanımlanmış ve izole edilen bazı suşların belirli ticari maya suşları ile aynı olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte izole edilen bazı *S. cerevisiae* suşlarının ise izole edildikleri yöreye özgü olduğu belirlenmiştir. Moleküler analiz sonuçlarına uygulanan kümeleme analizi ile Yeni Zelanda'da bulunan Central Ortego'dan izole edilmiş 5 genotipin, Şilide bulunan bazı genotiplerle çok yakın akrabalık gösterdiği bildirilmiştir.

Shi-Li ve ark (2010) Çin'de yetiştirilen üç farklı üzüm çeşidindeki maya popülasyonunu incelemişlerdir. Mayaların tanımlanmasında PZR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Üzümlerden *H'spora uvarum*, *Cryptococcus flavescens*, *P. fermnetans*, *C. zemplanina*, *Cryptococcus carnescens*, *C. inconpicua*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *I. terricola*, *C. quercitrusa*, *H'spora guilliermondii*, *C. bombi*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Cryptococcus magnus*, *M. pulcherrima*, *P. guilliermondii*, *I. orientalis* olmak üzere 8 farklı cinse ait 17 tür tanımlanmıştır. İzole edilen *P. guilliermondii*, *H'spora uvarum* ve *Cryptococcus flavescens* türlerinin üzümde baskın türler olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada üzümün mikroflorasında ilk defa *Sporidiobolus pararoseus* türü keşfedilmiştir. Üzümün çeşidi, kimyasal bileşeni ve yetiştiği

bölgenin, üzüm tanesinin yüzeyinde bulunan maya çeşitliliğini etkileyen faktörler olduğu bildirilmiştir.

Clavijo ve ark (2010), İspanya’da Serrania de Ronda bölgesinde bulunan iki bağın maya florasını incelemişlerdir. İki yıl yapılan çalışmalar sonucunda 1586 izolat elde edilmiş ve bunlardan 1281’i moleküler metotlar ile tanımlanmıştır. İzole edilen mayaların %84’ünü *Saccharomyces* spp. olmayan maya türlerinden (*Kluyveromyces thermotolerans*, *H’spora gulliermondii*, *H’spora uvarum* ve *I. orientalis* en fazla tanımlanan türler olmuştur) oluştuğu ve *S. cerevisiae* mayalarının genetik çeşitliliğinin düşük olduğu bildirilmiştir.

Csoma ve ark (2010), Macaristanda dört farklı şarap bölgesine ait (Mecsekalja, Badacsony, Kunsag ve Szekszard), beş farklı üzüm çeşidinin spontan fermantasyonu sırasında maya çeşitliliğini araştırmışlardır. Yapılan moleküler (karyotiping, MET2 , ITS1-ITS2 bölgeleri ve NTS bölgelerinde PZR-RFLP) ve fizyolojik analizler (melibioz ve mannitol kullanımı şeker-alkol-bakır toleransı, killer aktivite, fermantasyon hızı, üretilen metabolitler) sonucunda spontan fermantasyon sırasında *S. cerevisiae* popülasyonundaki çeşitliliğin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Alkol fermantasyonu sırasında ortama hakim maya suşlarının çok çeşitli olduğu belirlenmiştir ve *S. uvarum* suşlarında düşük oranda karyotip çeşitliliğine sahip olduğu bildirilmiştir.

Baffi ve ark (2011), Brezilya’nın güneydoğusunda yetiştirilen *Vitis labrusca*’ ya ait iki üzüm (Bordeaux ve Isabel) çeşidine ait maya florasının incelemişlerdir. Mayalar PZR-RFLP yöntemi ile birlikte rDNA’nın ITS ve D1/D2 gen bölgelerinin sekanslanması yöntemleri kullanılarak tanımlanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, üzüm ve şıralarda en yaygın türlerin sırasıyla *H’spora uvarum*, *I. occidentalis* ve *I. orientalis* olduğu belirlenmiş, bu türlerin yanında daha az sayıda *I. terricola* *S. cerevisiae*, *Aureobasidium pullulans* ve *Sporidiobolus pararoseus* türlerinin de ortamda bulunduğu bildirilmiştir.

Suranska ve ark (2012), Güney Moravian yöresinin (Çek Cumhuriyeti) beyaz çeşidi olan Ventolin üzümünde ve üzüm şirasının spontan fermantasyonu sırasında ortamdaki maya florasını incelemişlerdir. İzole edilen mayaların moleküler karakterizasyonunda PZR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Üzüm tanesinde ve fermantasyon sırasında izole edilen maya türlerinin *H'spora uvarum*, *Aurebasidium pullulans*, *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *P. fermentans*, *P. membranifaciens*, *P. kluyveri*, *Sporidiobolus salmonicolor*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* olduğu bildirilmiştir.

Blanco ve ark (2012), Galicia'ya özgü farklı üzüm şıralarının spontan fermantasyonu sırasında maya florasını incelemişlerdir. Fermantasyonun başında, ortasında ve sonunda ortamdaki mayalar izole edilmiş ve izole edilen *Saccharomyces* cinsine ait mayalar mtDNA-RFLP yöntemi ile suş düzeyinde tanımlanmıştır. Analiz sonuçlarına göre *S. cerevisiae* suşlarının genetik çeşitliliğinin düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte şıradaki asitlik ile maya suşu arasında bir korelasyon olduğu ve yüksek asitliğe sahip şıralarda belirli suşların baskın olduğu bildirilmiştir.

Capece ve ark (2012), İtalya'nın Cinque Terre bölgesinden daha önce spontan fermantasyon sırasında izole edilmiş 132 *S. cerevisiae* mayasının genotipik karakterizasyonlarını belirlemişlerdir. Mayalar bazı teknolojik özelliklerine göre sınıflandırılmış ve güçlü özellikler gösteren maya suşlarının hücre duvarı gen çeşitliliği, mtDNA-RFLP, inter-delta amplifikasyon analizleri ile genetik çeşitlilikleri belirlenmiştir. Analizler sonucunda suşlar arasında önemli derecede genetik çeşitlilik olduğu ve seçilen bazı *S. cerevisiae* suşlarının bölgede üretilecek Premium şarapların üretiminde starter kültür olarak kullanılabilceği bildirilmiştir.

Lederer ve ark (2013), Danimarka'da yetiştirilen ve üç farklı bağdan sağlanan Rondo, Zalas Perle ve Leon Millot üzüm çeşitlerinin maya florasının incelemişlerdir. Toplamda 200 izolat rep-PZR profillerine göre gruplandırılmış ve her gurubu temsil eden izolatların 26S rDNA gen bölgeleri sekanslanarak mayalar

moleküler olarak tanımlanmıştır. Moleküler analiz sonuçlarına göre üzümlerde *Saccharomyces* spp. olmayan türlerin baskın olduğu belirlenmiş ve *Rhototorula fujisanensi*, *Rhototorula glutinis*, *Rhototorula nothofagi*, *Cryptococcus carnescens*, *Cryptococcus festucosus*, *Cryptococcus victoriae*, *Cryptococcus wieringae*, *H'spora uvarum*, *M. fructicola*, *Kazachstania servazzii* ve *Sporobolomyces reseus* ve maya benzeri mantar olan *Aureobasidium pullulans* olmak üzere altı cinse ait on iki türün tanımlandığı bildirilmiştir.

Sun ve ark (2014), Çin'in Xiangning ve Shanxi bölgelerinde yetiştirilen Chardonnay, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Marselan ve Merlot üzümlerinin spontan fermantasyonu sırasında maya popülasyonunu incelemiştir. Mayaların moleküler yöntemle tanımlanmasında 26S rDNA gen bölgelerinin sekans analizi yöntemi kullanılmıştır. Fermantasyon ortamından, *Aureobasidium pullulans*, *C. zemplinina*, *H'spora uvarum*, *H'spora occidentalis*, *I. terricola*, *M. pulcherrima*, *P.kluyveri* ve *S. cerevisiae* olmak üzere yedi cinse ait sekiz tür izole edilmiştir. Fermantasyon denemelerinin tamamında *H'spora uvarum* ve *S. cerevisiae* türlerinin baskın türler olduğu bildirilmiştir. İzole edilen *Saccharomyces* spp olmayan türlerin çoğunun fermantasyonun bütün aşamalarında ortamda olduğu, ancak sayılarının üzüm çeşidine göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir. İzole edilen 102 adet *S. cerevisiae* mayası ayrıca interdelta sekans analizi ile suş düzeyinde tanımlanmış ve ortamda toplamda sekiz farklı genotip olduğu bildirilmiştir.

Teixeria ve ark (2014), Portekiz'in önemli şaraplık üzümlerinden olan Touriga Nacional (TN) üzüm şirasının spontan fermantasyonu sırasında *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların popülasyonunu incelemiştir. Moleküler analizler sonunda 11 maya türüne ait 279 izolat belirlenmiş ve sırasıyla *Starmerella bacillaris* (*C. zemplinina*), *H'spora guilliermondii* ve *H'spora uvarum* türlerinin en yaygın türler olduğu bildirilmiştir.

Vigentini ve ark (2016), Gürcistanın 5 farklı bölgesinde bulunan 22 farklı üzüm çeşidinin maya florasını incelemiştir. Moleküler analizler sonucunda

üzümlerde *M. pulcherrima*, *H'spora guilliermondii*, *Cryptococcus flavescens* türlerinin en yaygın türler olduğu, *T. delbrueckii*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida intermedia*, *S. cerevisiae*, *P. kluyveri*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida gotoi*, *H'spora vinea*, *P. terricola* türlerinin ise daha az bulunduğunu bildirmişlerdir.

Garofalo ve ark (2016), İtalya'nın iki farklı şarap bölgesinden sağlanan 'Nevo di Troia' üzüm şirasının spontan fermantasyonu sırasında maya florasını incelemişlerdir. Moleküler yöntem olarak PCR-RFLP yöntemi kullanılmış ve rDNA'nın 5.8 S ITS gen bölgesi sekanslanmıştır. Moleküler analiz sonuçlarına göre alkol fermantasyonu sırasında *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima*, *H'spora uvarum*, *I. orientalis*, *C. zemplinina*, *I. terricola*, *Kl. thermotolerans*, *T. delbrueckii*, *M. chrysoperlae*, *P. fermentans*, *H'spora opuntiae* ve *H'spora guilliermondii* türleri izole etmişler, maya türü ve popülasyonu açısından bölgeler arasında fark olduğunu bildirmişlerdir.

Ergül ve Özbaş (2016), Kalecik Karası ve Emir'den izole edilmiş 20 *S. cerevisiae* izolatının teknolojik özelliklerini belirlemişlerdir. Bütün izolatların uygulanan sıcaklık derecelerinde, pH ve şeker konsantrasyonlarında geliştiği, yalnızca 3 izolatın % 14 h/h etanole dayanıklı olduğu, 11 izolatın 200 mg/L SO₂' ortamında geliştiği belirlenmiştir. Dört izolatın önemli bazı enzimatik özellikleri ve diğer teknolojik özellikleri ile diğerlerinden ayrıldığı bildirilmiştir.

Raymond Eder ve ark (2017), Isabella (*Vitis labrusca* L.) üzümünde ve üzüm şirasının spontan fermantasyonu sırasındaki maya popülasyonunu incelemişlerdir. İzole edilen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaları tanımlayabilmek için, seçici besiyerleri kullanılmış ve mayaların 5.8S ITS rRNA bölgeleri sekanslanmıştır. Isabella üzümünden ve üzüm şirasının spontan fermantasyonu sırasında ortamdan *S. cerevisiae*, *C. californica*, *C. hellenica*, *S.bacillaris* (*C. zemplinina*), *H'spora uvarum*, *H'spora vineae*, *I. hanoiensis*, *C. azymoides*, *P. cecembensis* türlerinin izole edildiği bildirilmiştir.

2.2. Mayaların Teknolojik Özellikleri

Şarap üretimi için maya suşları seçilirken mayaların belirli teknolojik özellikleri göz önünde bulundurulur (Çizelge 2.1). Bunlar; seçilen suşun düşük miktarda uçar asit oluşturması, alkol toleransının yüksek olması, ortamdaki şekerin tamamını fermente edebilmesi, fermantasyon hızının istenen düzeyde olması, yüksek ya da düşük sıcaklıklarda çoğalabilmesi, kükürt dioksit toleransının yüksek olması, düşük H₂S üretimi, fermantasyon bittikten sonra kolayca çökmesi, düşük miktarda köpük oluşturması, killer özelliğinin olması, düşük asetaldehit, etil asetat ve asetik asit üretmesi, gliserol üretme gücü, yüksek alkol üretiminin kontrollü olması ve fermantasyon sırasında kullanılacak mayanın aroma bileşiklerini dengeli bir şekilde üretmesi beklenir (Regodón, 1997; Swiegers ve ark. 2005; Fleet, 2008; Elmacı ve ark. 2014).

Çizelge 2.1. Beyaz şarap mayasının teknolojik özellikleri

İstenen özellikler	İstenmeyen özellikler
- Fermantasyon hızı	- Uçar asit oluşturması
- Alkole karşı dayanıklılık	- H ₂ S üretimi
- Yüksek alkol verimi	- Köpük oluşturma
- Düşük pH, yüksek SO ₂ 'ye tolerans	- Asetaldehit oluşturma
- Düşük ve yüksek sıcaklıkla fermantasyon yapabilmesi	- Polifenol oksidaz enzimi üretmesi
- Killer özellik	- Etil karbamat ve biyojen amin üretmesi
- Şekerin tamamını fermente edebilmesi	- Karbonil bileşik oluşturma
- Aroma bileşiklerini yeterli ve dengeli üretebilmesi	- Üre ekstraksiyonu
- Gliserol oluşturma	
- Düşük azot ihtiyacı	
- Fermantasyon sonunda dibe çökme yeteneği	
- Malik asiti indirgeyebilmesi	
- β-glikozidaz aktivitesi	
- Resveratrol ve antioksidan üretimini artırması	

Mayaların teknolojik özelliklerinin yanında maya üreten firmalar için üretilecek, geliştirilecek mayalar için belirli kriterler vardır. Bunların en başında üretim maliyetinin düşük, ekonomik olması gelir. Mayalar, büyük miktarlarda ve ucuz substratlar kullanılarak üretilebilmelidir. Bunların yanında, mayaların kurutma, paketleme, depolama, yeniden aktive olma gibi stres koşullarına dayanıklı olması gerekir (Fleet, 2008).

2.2.1. Etanol Toleransı

Alkol fermantasyonu sırasında yüksek miktarda etanol oluşması mayalar için bir stres faktörüdür. Etanol, alkol fermantasyonunun ana ürünü olmasına rağmen hücre membranı için toksik etkiye sahiptir. Yapılan bazı çalışmalarda etanolün mitokondrial DNA'ya zarar vererek heksokinaz, alkol dehidrogenaz gibi enzimleri inaktive ettiği, amino asitleri inhibe ettiği ve mayanın hücre membranının akışkanlığını engellediği bildirilmiştir (Degre, 2002; Labagnara, 2016).

Şarap mayası, şıradaki şekeri anaerobik koşullarda alkol ve CO₂'e çevirir. Alkol, mayanın özgül fermantasyon hızını azaltan, fermantasyon aktivitesini ve gelişimini inhibe eden en önemli bileşik olduğundan, alkole karşı tolerans şarapçılıkta starter olarak kullanılacak mayanın seçiminde önemli bir kriterdir. Fermantasyon ortamında düşük miktarda oksijen bulunması, mayanın canlılığını, etanol toleransı ve verimini olumlu yönde etkiler. Ortamdaki bu oksijen mayanın hücre membranının akışkanlığını sağlayan sterol ve doymamış yağ asitlerinin sentezlenmesini sağlar. *S. cerevisiae* anaerobik koşullar altında sterol üretmez bu koşullar altında kusurlu hücre membranlarına sahip olur ve düşük metabolik aktivite gösterir. Fermantasyon sırasında mayaların bu bileşikleri üretebilmesi için belirli aralıklara havalandırma işlemi yapılarak ortama az miktarda oksijen girmesi sağlanmalıdır (Bauer ve Pretorius, 2000; Degre, 2002). *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların etanol toleransı *S. cerevisiae*'e göre daha düşüktür. Bu nedenle alkol fermantasyonu sırasında ortamda etanol miktarı arttıkça *S. cerevisiae* suşları

ortama hakim olurlar. Ancak alkol fermantasyonunun düşük sıcaklıklarda (10-15 °C) gerçekleştirilmesiyle *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların etanole olan toleransının arttığı bildirilmiştir (Fleet ve Heard, 2002).

2.2.2. Kükürt Dioksit Toleransı

Şarapçılıkta kükürt dioksit (SO₂) oksidasyonu önleyici, antimikrobiyal ve durultucu özelliklerinden dolayı kullanılır (Nurgel, 2000; Degre, 2002). Fermantasyon sırasında şarabın mikroflorası SO₂ kullanılarak kontrol edilebilir. Çünkü SO₂ *Saccharomyces* spp. olmayan birçok maya için oldukça toksiktir ancak *Saccharomyces*' e ait türler oldukça dirençlidir. SO₂ bu özelliğinden dolayı mayaları ayırt etmek için kullanılan bir parametredir. Şarapta apikulat mayalar (*Kloeckera* ve *Hanseniaspora*) ortama ilk hakim olan mayalardır. Ortama ilave edilen SO₂ bu mayaların gelişmesini baskılamakta, SO₂'ye karşı dayanıklı olan *S. cerevisiae*'nin ortama hakim olmasını destekler. Bu nedenle ortama ilave edilen mayanın SO₂'ye karşı dayanıklı olması istenir. (Fleet ve Heard, 2002; Fugelsang ve Edwards, 2007).

Alkol fermantasyonu sırasında SO₂ kullanımı ortamdaki maya florasını etkiler, fermantasyonun ilk birkaç gününde *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida* ve *Hansenula* cinsi mayalar 10⁶-10⁷ kob/mL'ye kadar çoğalır, daha sonra ortama *S. cerevisiae* türü hakim olur. Ancak fermantasyonun bu aşamasında *Zygosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Schizosaccharomyces* ve *Brettanomyces* cinsi mayalar da ortamda bulunabilir. Bu sonuca göre SO₂'nin her zaman başlangıç aşamasında ortamda bulunan yerli mayaları inhibe etmez bununla birlikte aynı cinse ait farklı maya türlerinin SO₂ toleransları farklı olabilir (Heard ve Fleet, 1988). Parish ve Carroll (1987), mayalar için en önemli özelliklerinden birinin şıradaki kükürde (25-200 mg/L) dayanabilme yeteneği olduğunu bildirmişlerdir.

SO₂'nin maya metabolizmasına etkisi ortamdaki pH'ya göre değişir ve bu nedenle belirlemek zordur. Ough ve ark (1988) tarafından 50 mg/L serbest SO₂'nin

3.0 pH da ortamda bulunan *S. cerevisiae* mayalarını inhibe ederken 3.2 pH 'da inhibe etmediği belirlenmiştir.

Şarap mayaları, doğal olarak veya alıştırılmaları sonucu fazla miktarda SO₂'ye dayanabilme özelliğine sahip olurlar. Mayanın SO₂'ye karşı dayanıklılığının biyokimyasal yönü hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bununla birlikte, maya hücresindeki glutasyon miktarı, SO₂'nin plazma zarındaki taşınımı ve difüzyon hızı, mayanın asetaldehit ve SO₂'i bağlayan bileşikler üretmesi ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivasyon derecesinin, mayanın SO₂'ye karşı dayanıklılığında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca mayaların SO₂'ye karşı dayanıklılıklarında hücre zarında bulunan lipitlerin doygunluk derecelerinin etkili olabileceği bildirilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, SO₂'nin hücre içindeki pH'yı düşürerek mayaları etkilediği ve ATPaz enzimin aktivitesi yüksek olan mayaların, daha fazla proton üretip hücre içi pH'yı koruyarak SO₂'e karşı daha dayanıklı oldukları bildirilmiştir (Degree, 2002; Fleet ve ark, 2002; Fugelsang ve ark, 2007).

Şıraya SO₂ eklenmesi ortamdaki maya florasını etkilemenin yanında fermantasyon sırasında ortamda bulunan mayanın karakteristik özelliklerini de etkiler. Yapılan çalışmalarda ortama ilave edilen SO₂'nin mayanın daha fazla asetaldehit üretmesine neden olduğu ve daha fazla köpük oluşturduğu bildirilmiştir (Romano ve Suzzi, 2002).

2.2.3. Sıcaklığa Karşı Duyarlılık

Fermantasyon sırasındaki ortam sıcaklığı maya florasını ve gelişen mayaların fermantasyon kinetiğini etkiler. Optimum fermantasyon sıcaklığı maya türüne göre değişir. *S. cerevisiae* türü mayaların çoğalması için gerekli olan optimum sıcaklık 30°C'dir ancak bu mayalar geniş bir sıcaklık aralığına (40 °C'ye kadar) kadar adapte olabilirler. Ancak bazı *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların düşük sıcaklıklarda (8-15 °C) daha iyi geliştiği bildirilmiştir (Aranda ve ark, 2011).

10 ile 32 °C aralığında mayaların fermantasyon hızında lineer bir artış olduğu belirlenmiştir. 40°C' ye kadar her 10°C'lik sıcaklık artışından fermantasyon yoğunluğunun iki katına çıktığı ancak 40°C'de bu değer düşüğü bildirilmiştir. Sıcaklığın artması ile birlikte etanolün toksik etkisi artar ve yüksek sıcaklık, fermantasyon sonucunda oluşan ve şarabın organoleptik özellikleri için gerekli olan uçucu bileşiklerin buharlaşmasına neden olur. Çok düşük sıcaklık ise maya hücre membranının akışkanlığını etkilediği için fermantasyonun durmasına neden olabilir. Şarap üretiminde beyaz şaraplar genellikle 10-18°C aralığında fermente edilirken kırmızı şaraplar 18-29°C aralığında fermente edilir. Fermantasyonun başlangıç aşamasında düşük sıcaklığın *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların gelişmesi istenen durumlarda uygulanabileceği bildirilmiştir (Aranda ve ark, 2011).

Beyaz şarap üretimi düşük sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinden, soğuğa dayanıklı suşların fermantasyonda kullanılması bir yandan fermantasyonun gecikmesini önler bir yandan da fermantasyon sonunda aroma maddeleri açısından ortaya çıkabilecek bazı sorunları ortadan kaldırır. Düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda etanol verimi daha düşük olurken, yağ asitleri, yüksek alkoller ve bunların esterlerinin üretimi artar. Bu nedenle özellikle aromatik, yarı aromatik beyaz şarap üretimi sırasında düşük sıcaklık uygulaması yapılır. Bununla birlikte soğuğa dayanıklı mayalar çok miktarda gliserol ve süksinik asit ve az miktarda asetik asit oluşturmakta ve bazıları malik asidi sentezleyebilmektedir (Ribéreau-Gayon ve ark, 2006b; Nurgel, 2000).

Domizio ve ark (2007), farklı fermantasyon koşullarında üretilen Vinsanto şaraplarının üretim sırasında mikrobiyal gelişimini gözlemişler ve farklı fermantasyon koşullarının maya popülasyonuna ve şarabının duyu özelliklerine etkisi incelemiştir. Fermantasyon geleneksel yöntemlerle 50 L'lik fıçılarda gerçekleştirilmiştir. Geleneksel mahzen koşullarında, fermantasyon başında düşük sıcaklık uygulamasının *Saccharomyces* spp. olmayan türlerin canlı kalma süresini uzattığı, fermantasyon sıcaklığının sürekli olarak 16-18°C derecelerinde korunduğunda *Saccharomyces* türlerine ait mayaların ortamda baskın olduğu

belirtilmiştir. Şarapların ticari maya suşu ile aşılması ve fermantasyon sıcaklığının Vinsanto şaraplarının kalitesini önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir.

Csomo ve ark (2010), Macaristan'nın Tokay Bölgesi'ndeki yerli üzüm çeşitlerinden izole ettikleri *S. cerevisiae* ve *S. uvarum* suşlarının farklı sıcaklıklardaki (14° ve 26° C) teknolojik özelliklerini incelemiştir. Araştırmacılar *S. uvarum* suşlarının 14 °C'de birçok *S. cerevisiae* suşuna kıyasla fermantasyon özelliklerinin daha iyi olduğunu belirlemiştir. Aynı üzüm çeşidinin spontan fermantasyonunun maya popülasyonu ile ilgili daha önceki yapılan çalışmada fermantasyon sırasında izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının *S. uvarum*' a göre düşük sıcaklıkta daha iyi fermantasyon özelliği gösterdiği bildirilmiştir.

2.2.4. Hidrojen Sülfür (H₂S) Üretimi

Uçucu sülfür bileşikleri (USB), fermente gıda ve içeceklerde bulunan ve ürünün kalitesi üzerinde önemli etkisi olan bileşiklerdir. Şarapta bulunan USB ise fermantasyon sırasında oluşurlar, birçoğu düşük algılanma eşik değerine sahiptir ve şaraba özgü kompleks aromalar kazandırır. Şarapta bulunan sülfür bileşikleri, tioller (merkaptanlar), sülfidler, tioesterler ve heterosiklik bileşikler olmak üzere 4 grupta toplanabilir. Şaraptaki bazı sülfür bileşikleri kendine özgü meyvemsi aromalar verirken bazıları da istenmeyen, çürük yumurta benzeri (hidrojen sülfür) kokular verirler (Rauhut, 2009). Hidrojen sülfür (H₂S), alkol fermantasyonu sırasında ve sonrasında ortaya çıkabilir ve maya metabolizması sonucunda üretilen bu bileşik, düşük algılanma eşik değerine sahip (50-80 µg/L) uçucu tiol tür. Hidrojen sülfür ayrıca diğer indirgen sülfür bileşiklerinin (merkaptanlar) öncülüdür (Swiegers ve ark, 2005; Kinzurik ve ark, 2016).

Mayaların şarapta H₂S oluşturmalarını etkileyen birçok biyolojik ve fizyolojik faktör vardır. Mayaların H₂S oluşturmaları suş düzeyinde farklılık gösterebilir ve bu farklılığa mayanın genetik özelliği, şıranın bileşimi ve fermantasyon koşulları neden olabilir. Ancak bazı maya suşlarının H₂S üretme özelliklerinin farklı ortamlarda değişiklik gösterdiği buna karşın bazı suşların bu

özelliğinin de ortam koşullarından etkilenmediği bildirilmiştir (Rauhut, 2009; Labagnara, 2016).

H₂S' in S- içeren amino asitlerin biyosentezi sırasında ara ürün olarak meydana geldiği bilinmektedir. Alkol fermantasyonu sırasında, şıradaki azot konsantrasyonu ve mayaların proteolitik aktiviteleri H₂S oluşmasına neden olan iki önemli etkidir. Eğer şırada yetersiz asimile edilebilir azot varsa, mayaların proteolitik aktiviteleri sonucunda ortamdaki protein ve peptitler indirgenir. Bunun sonucunda kükürt içeren proteinlerin yan ürünü olarak H₂S oluşur (Rauhut, 2009). Alkol fermantasyon sırasında yüksek sıcaklık ve pH, ortamda tortu bulunması, indirgenebilir bakır iyonlarının varlığı, H₂S oluşumunun artmasına neden olur. Üzüm şırasının tortusu protein içerir bu da maya metabolizması sonucunda ortamda bulunan S-içerikli amino asitlerin serbest kalmasına ve H₂S oluşumuna neden olur. Bu nedenle beyaz şarap üretiminde fermantasyondan önce tortu alma işlemi uygulanır (Fugelsang ve Edwards 2007; Rauhut, 2009).

Romano ve ark (1997), 98 *K. apiculata*, *H'spora guilliermondii* suşlarının H₂S oluşturma özelliklerini incelemiştir. *K. apiculata* suşlarının % 60' ının düşük % 20'sinin ise yüksek miktarda H₂S ürettikleri belirlenmiştir. *H'spora guilliermondii* suşlarının ise *K. apiculata* suşlarına göre daha düşük miktarlarda H₂S ürettikleri ve 2 suşun hiç H₂S üretmediği bildirilmiştir.

2.2.5. Mayaların Killer Özelliği

Mayaların killer özelliği ilk defa Bevan ve Makower (1963) tarafından bildirilmiştir. Killer özellik, bazı mayalar tarafından üretilen, protein veya glikoprotein yapıda olan toksik maddelerin bir sonucudur. Killer özellik bakımından mayalar 4 grup altında toplanabilir: killer (K), duyarlı (S), nötr (N) ve killer-duyarlı. Killer mayalar duyarlı mayaları toksin üreterek öldürürler. Duyarlı mayalar (S) bu toksinler tarafından öldürülürler. Nötr mayalar toksin üretmezler ancak toksinlere karşı bağışıklık gösterirler. Killer-duyarlı mayalar, kendi ürettikleri toksine karşı bağışıklıkları vardır ancak başka mayalar tarafından

üretilen toksinlere karşı duyarlı olabilirler. Killer mayaların duyarlı mayalar üzerindeki etkisi laboratuvar ortamında, 4.2-4.7 PH, 20 °C'de kolaylıkla belirlenebilir. Duyarlı maya agar katılaşmadan önce inoküle edilir, daha sonra katılaşan agara killer özelliği olduğu düşünülen maya inoküle edilir. Ortamda toksin olursa duyarlı maya zon oluşturamaz (Nurgel, 2000; Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a).

Mayalarda bulunan killer özellik ilk defa *S. cerevisiae* de keşfedilmiştir ancak *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Debarymoces*, *Rhototorula*, *Trichosporon* ve *Cryptococcus* gibi cinslere ait türlerin de killer özellik gösterdiği belirlenmiştir. *S. cerevisiae* maya suşlarının K1, K2, K3 ve KT28 olmak üzere 4 farklı killer özelliği vardır. K2 ve K3 toksini birbirine çok benzerdir ve K3 toksini K2' nin mutasyonu sonucunda olduğu, şarapta bulunan *S. cerevisiae* mayalarında K2 suşlarının yaygın olduğu bildirilmiştir (Riberau-Gayon ve ark, 2006a).

K1 toksini 2 alt birimden oluşan küçük bir proteindir ve yalnızca 4.2-4.4 PH aralığında aktive olduğu bu nedenle üzüm sırasında inaktif halde olduğu belirlenmiştir. K2 toksini glikoprotein yapıdadır ve 2.8 – 4.8 pH aralığında aktive olur. Bu nedenle K2 toksini salgılayan mayaların şıra ve şarapta aktif hale geçtiği ve etkisini gösterdiği bildirilmiştir (Riberau-Gayon ve ark, 2006a).

Starter kültür olarak kullanılacak bir mayada aranan özelliklerden biri de killer özelliğidir. Killer özelliğe sahip starter maya istenemeyen mayaların gelişmesini önleyebilir. Killer mayanın, toksine karşı bağışıklığı olduğundan, fermantasyona hakim olma olasılığı yüksektir. Böylelikle fermantasyonun gecikmesi veya durması önlenemediği gibi, istenemeyen mayaların aroma maddeleri üretmeleri de engellenmiş olur (Nurgel, 2000; Shimuzu, 2002).

2.2.6. Mayaların Enzimatik Aktivite Özellikleri

Şarap üretiminde, mayaların ürettiği enzimler şarabın duyuşsal ve fiziksel özelliklerini olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilir ve etkili olan başlıca enzim

grupları esterazlar, lipazlar, proteazlar ve glukozydazlar' dır (Villena ve ark., 2007). *S. cerevisiae* türü mayaların enzim üretme özellikleri zayıfken, *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların (*Candida*, *Debaromyces*, *Hansenispora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea* ve *Zygosaccharomyces*) daha kuvvetli enzim üretme özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir (Charonchai ve ark, 1997).

Şıradaki bağlı aroma bileşiklerinin maya tarafından biyokimyasal reaksiyonlarla serbest aroma bileşiklerine dönüşmesi istenen bir özelliktir. Bu reaksiyonlardan üzerinde en çok çalışılan bileşik terpenlerdir. Misket ve Riesling gibi aromatik üzümde sitronellol, jeraniol, linalol, nerol gibi monoterenler bulunur. Ancak bu terpenler üzüm ve şıradaki glukoza ya da disakkaritlere glikozit bağları ile bağlı halde bulunurlar. Fermanatasyon sırasında glikozit bağları mayaların reaksiyonları sonucu kırılır ve şıradaki aroması için önemli terpenler açığa çıkar. Mayaların glikozidaz aktivitesinin türlere ve suşlara göre değiştiği belirlenmiştir. *Hanseniaspora*, *Debaryomyces* ve *Dekkara* gibi *Saccharomyces* spp. olmayan cinslere ait türlerin glikozidaz aktivitesinin *Saccharomyces*'lara göre daha yüksek olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir (Fia ve ark, 2005; Maicas ve Mateo, 2005; Swiegers ve ark, 2005; Villena ve ark, 2007). Glikozidazlar arasında β -glikozidazlar şıradaki için en önemli enzimlerden biridir. Şıradaki üretimi sırasında bağlı aroma bileşiklerinin serbest hale geçmesi için genellikle *Aspergillus* spp.' mantarından izole edilen ticari enzimler kullanılmaktadır. Ticari enzimlerin içeriği saf değildir bu nedenle spesifik olarak istenen bağlı aroma bileşikleri dışında başka bileşiklerle de reaksiyona girebildiği ve şıradaki duyuşal özelliklerini ve kalitesini etkileyebildiği belirlenmiştir. Şıradaki üretimi sırasında ticari enzimleri kullanmak yerine, yalnızca bağlı aroma bileşiklerini serbest hale getirecek istenilen enzim aktivitesine sahip maya suşlarının kullanımı tercih edilmelidir (Villena ve ark, 2007).

Şıradaki üretiminde önemli bir diğere enzim gurubu da proteazlardır. Üzüm şıradaki yapısında peptidler ve proteinler bulunur ve şıradaki bu bileşikler stabil

olmadığından, şişelemeden sonra ya da depolaması süresince beyaz şaraplarda protein bulanıklığı oluşabilmektedir. Bu nedenle bulanıklık oluşturan bu proteinlerin enzimatik yolla hidrolizi şarabın stabilizasyonu ve durultulması açısından önem taşımaktadır. *S. cerevisiae* mayalarında proteaz aktivitesine rastlanmamıştır ancak bazı *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların asidik proteaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Moreno-Arribas ve Polo, 2005).

Mayaların enzim metabolizmaları sonucunda üretilen uçucu bileşikler şarabın duyuşal özelliklerine önemli katkı sağlarlar. Bu uçucu bileşikler arasında esterler şarabın meyvemsi karakterini veren en önemli uçucu bileşiklerdir. Mayalar tarafından yüksek alkollerin ve yağ asitlerinin etil esterler olmak üzere iki önemli ester grubu üretilir. Bu bileşiklerin hidrolizini sağlayan enzim grubu ise esterazlardır. Yağ asitlerinin etil esterlerinin, mayaların yağ metabolizması sonucunda kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin esterifikasyonu sonucunda oluştuğu bildirilmiştir (Ugliano, 2009). Mayaların ester aktiviteleri sonucunda üretilen esterlerin başında isoamil asetat ve 2-feniletıl asetat gelir.

2.2.7. Yüksek Şeker Konsantrasyonunda Gelişme

Alkol fermantasyonunun başında, şıranın şeker konsantrasyonunun yüksek olması mayaların gelişimini inhibe ederek fermantasyonun yavaşlamasına neden olduğu belirlenmiştir (Fugelsang ve Edwards, 2007). Mayaların yüksek şeker konsantrasyonunda gelişme özelliği, özellikle sıcak bölgelerde yetiştirilen ve yüksek şeker konsantrasyonuna sahip üzüm şıralarının fermantasyonu için önemlidir. Şıranın yüksek şeker konsantrasyonuna sahip olması, mayanın lag (adaptasyon fazı) fazının uzamasına, fermantasyon hızının düşmesine, mayanın biyokütlesinin ve fermantasyon sonunda etanol toleransının azalmasına neden olduğu ayrıca osmotik basınç nedeniyle mayaların gelişiminin inhibe olduğu bildirilmiştir (Elmacı ve ark. 2014).

2.2.8. Köpük Oluşturma Özelliği

Fermantasyon sırasında köpük oluşumu, fermantasyonun gerçekleştiği tankın hacmini azalttığından ve kontaminasyona elverişli ortam yarattığından istenemeyen bir özelliktir. Alkol fermantasyonu sırasında, köpük oluşumunu etkileyen başlıca faktörler kullanılan maya suşu, şıranın azot bileşimi ve fermantasyon sıcaklığının olduğu bildirilmiştir (Riberau-Gayon ve ark. 2006a; Elmacı ve ark. 2014).

2.2.9. Fermantasyon Hızı

Mayanın fermantasyon hızı, fermantasyon başladıktan sonraki 48 saatte oluşan karbondioksit (CO₂) kaybı ya da asimile edilen şeker miktarı ile ölçülür ve fermantasyon gücü, fermantasyon sonucunda oluşan alkol ile belirlenir. Fermantasyonun uzun sürmesi mayaların fermantasyon hızının düşük olmasından kaynaklanır ve düşük fermantasyon hızına sahip mayaların çoğu ortamdaki şekerin tamamını asimile edemez. Şarap üretimi için kullanılacak mayanın fermantasyon hızının 0.2 g/L'den fazla olması beklenir (Perez-Coello ve ark, 1999; Esteve-Zarzoso ve ark, 2000; Labagnara, 2016).

Şarap mayalarının istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesine fırsat vermeden ortama hakim olması, fermantasyonu başlatması ve belli bir zaman içerisinde fermantasyonu tamamlanması istenir. Fermantasyon hızının istenen sürede olması, maya seçimine bağlıdır. Fermantasyon sırasında CO₂ ile birlikte aroma kaybı da olduğundan bazı aromatik şarapların üretiminde, fermantasyon hızı düşük olan mayalar tercih edilir (Özçelik ve Denli, 1999).

Mayanın fermantasyon ortamına hakim olabilmesi için fermantasyon hızının ve ortamdaki şeker miktarına göre alkol veriminin yüksek olması gerekir. Yapılan çalışmalarda, iyi fermantasyon özelliklerine sahip bir mayanın, fermantasyonu hızlı bir şekilde başlatması ve düzgün bir şekilde sürdürmesi gerektiği, aynı şekilde mayanın ortamda fermente olabilen şekerin tamamına yakın

bir kısmını tüketebilme yeteneğine sahip olması gerektiği belirtilmiştir (Degre, 2002; Fleet, 2008).

Ciani ve Maccarelli (1998), *S. cerevisiae* (50 suş) , *T. delbrueckii* (90 suş), *C. stellata* (12 suş), *Saccharomyces ludwigii* (27 suş), *H'spora uvarum* (14 suş) , *K. apiculata* (23 suş) maya suşlarının fermantasyon hızları ve fermantasyon verimlerini belirlemiştir. Kullanılan 90 *T. delbrueckii* suşunun fermantasyon gücünün geniş bir aralıkta olduğu (4-14 % h/h), *C. stellata* suşlarının fermantasyon gücü ve fermantasyon hızlarının düşük olduğu, *K. apiculata* ve *H'spora uvarum* suşlarının çok düşük fermantasyon gücü ve hızına sahip olduğu, *Saccharomyces ludwigii* suşlarının ise fermantasyon hızı ve veriminin diğer *Saccharomyces* spp. olmayan maya suşlarına göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Csomo ve ark (2010), Macaristanın şaraplık üzüm çeşitlerinin spontan fermantasyonu sırasında izole edilen ve tanımlanan 32 *S. cerevisiae* ve 8 *S. uvarum* suşlarının farklı sıcaklıklarda (14 °C ve 26°C)'daki fermantasyon hızlarını incelemiştir. *S. uvarum* suşlarının 14 °C'deki fermantasyon hızlarının 26°C'ye göre daha yüksek olduğu ve *S. cerevisiae* suşlarının ise çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir. İzole edilen *S. cerevisiae* suşlarının bazıları 26 °C'de yüksek fermantasyon hızı gösterirken bazıları ise 14°C'de göstermiştir. Ayrıca bütün *S. uvarum* ve *S. cerevisiae* suşlarının 18°C'de 14°C'ye göre daha yüksek fermantasyon hızı gösterdiği de bildirilmiştir.

2.2.10. Mayanın Uçar Asit Oluşturma Gücü

Şarapta uçar asit, bozulma göstergesidir ve genellikle asetik asit cinsinden ifade edilir. Asetik asit, şarap üretimi sırasında oluşan en temel uçucu asittir ve asetik asit bakterileri tarafından üretildiği gibi fermantasyon sırasında mayalar tarafından da oluştururlar. Asetik asit miktarı şarap çeşidine göre değişkenlik göstermekle birlikte belli bir konsantrasyonun üstünde şarabın duyusal özelliklerini olumsuz etkiler. *S. cerevisiae* türünün asetik asit üretimi suşa göre farklılık gösterir

ve genellikle 100 mg/L ile 2 g/L değerleri arasında değişir (Swiegers ve ark, 2005; Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a).

Breda ve ark, (2013), 47 adet farklı *T. delbrueckii* suşunun ürettiği uçar asit miktarlarını incelemişler ve referans olarak 4 ticari *T. delbrueckii* ve 1 ticari *S. cerevisiae* suşunu kullanmışlardır. Denemede kullanılan ticari ve yerli suşlarının çoğunun ürettiği uçar asit miktarlarının birbirine yakın olduğu (0.3-0.6 g/L aralığında) yalnızca bir *T. delbrueckii* suşunun diğerlerine göre daha yüksek miktarda (0.7 – 1.0 g/L) uçar asit oluşturduğunu bildirmişlerdir.

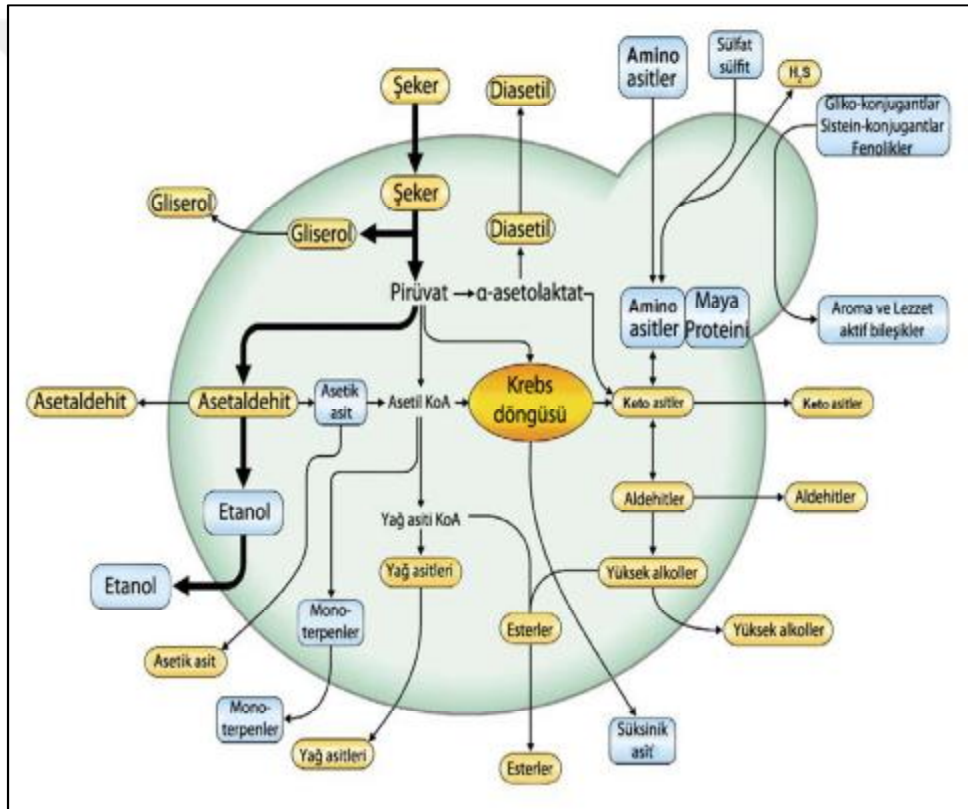
Teixeria ve ark, (2014), Touriga Nacional şıralarının spontan fermantasyonu sırasında izole ettikleri *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların uçar asit oluşturma özelliklerini incelemişler ve kontrol olarak ticari *S. cerevisiae* suşu kullanmışlardır. Araştırmacılar, izole ettikleri *P. terricola* (0.42 g/L), *Zygoascus heleniscus* (0.27 g/L) suşları dışındaki *Saccharomyces* spp. olmayan suşların ve kontrol olarak kullanılan maya suşunun yüksek miktarlarda (0.78 mg/L-1.33 mg/L) uçar asit oluşturduklarını bildirmişlerdir.

2.2.11. Fermantasyon Sonunda Dibe Çökme

Mayanın fermantasyon tamamlandıktan sonra hızlı bir şekilde dibe çökmesi şarabın kısa sürede ve fazla işlem uygulanmadan berraklaşmasını sağladığı ve tortu alma işlemini kolaylaştırdığı için önemlidir. Mayanın flokülasyon özelliğini etkileyen birden çok gen (FLO1, FLO2, flo3, FLO4, FLO5, flo6, flo7, FLO9, FLO10 eva MUC1) vardır ve bu özellik mayalar arasında suş düzeyinde farklılık gösterebilir. Flokülasyonu etkileyen diğer faktörlerin, pH, ortamdaki şeker miktarı, havalandırma ve ortamdaki Ca⁺ iyonları gibi çevresel faktörler olduğu bildirilmiştir (Özçelik ve Denli, 1999). Romano ve ark (1985), çalışmalarında otuz *S. cerevisiae* suşundan yalnızca 6'sının flokülasyon özelliği gösterdiğini bildirmişlerdi. Suzzi ve ark (1992), *Zygosaccharomyces bailii* suşunun flokülasyon özelliğinin ortamda glukoz, fruktoz, galaktoz, maltoz ve mannoz varlığında tamamen inhibe olduğunu bildirmişlerdir.

2.2.12. Mayaların Ürettiği Sekonder Metabolitler

Alkol fermantasyonunu gerçekleştiren mayalar şarapta bulunan sekonder metabolitlerin oluşumundan sorumludurlar. Mayaların şıradaki şekerleri fermente etmesi sonucunda etanol, karbondioksit ana ürünler olarak ortaya çıkar. Bu süreçte ayrıca, gliserol yüksek alkoller, esterler, uçucu yağ asitleri ve karbonil bileşikler (Şekil 2.1) de bu aşamada oluşurlar ve bu bileşikler mayaların sekonder metabolitleri olarak bilinirler (Manzanares ve ark, 2011).



Şekil 2.1. Maya metabolizması sonucunda üretilen aroma aktif bileşikler (Swiegers ve ark., 2005)

Gliserol alkol fermantasyonu sırasında maya metabolizması sonucu üretilen ve şarabın vizkositesini, gövdesini etkileyen metabolitlerden biridir.

Algılanma eşik değerinin (5.2 g/L) üzerinde şaraba tatlılık verir. Sek şaraplarda gliserol miktarı 4.2 g/L ile 10.4 g/L değerleri arasında bulunur. Termofil olan *S. cerevisiae* suşlarının mezofil olanlara göre daha fazla gliserol ürettiği bildirilmiştir. *Saccharomyces* spp. olmayan, özellikle *Candida stellata* ve *Saccharomyces ludwigii* türlerinin yüksek miktarda gliserol ürettiği ve mayaların stres koşullarında daha yüksek miktarda gliserol ürettiği bildirilmiştir. Mayaların gliserol üretimini arttıran başlıca faktörlerin yüksek şeker konsantrasyonu, ortamdaki SO₂ konsantrasyonunun fazla olması, yüksek fermantasyon sıcaklığı ve yüksek pH değeri olduğunu bildirilmiştir (Ugliano ve Henscke, 2009).

Regodón ve ark (1997), farklı şaraphanelerden temin edilen şıra ve şaraplardan izole edilmiş 21 *S. cerevisiae* izolatının, farklı şıralarda ürettiği gliserol miktarlarının 4.6 g/L ile 8 g/L değerleri arasında olduğu bildirmişlerdir.

Clemente-Jimenez ve ark (2004), Macabeo şirasından izole edilmiş *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan maya türlerinin teknolojik özelliklerinin belirlendiği çalışmada, gliserol miktarının *H'spora uvarum* suşu ile fermantasyon yapılmış şarapta 2.31 g/L, *I. orientalis* suşu ile fermantasyon yapılmış şarapta 0.11 g/L, *S. cerevisiae* suşu ile fermantasyon yapılmış şarapta 0.57 g/L olduğunu bildirmişlerdir.

Breda ve ark (2013), Afrika'nın şarap bölgelerinden daha önce izole edilmiş 43 *T. delbrueckii* izolatının ürettiği gliserol miktarının 5.1 g/L ile 7.9 g/L değerleri arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Aponte ve Blaiotto (2016), İtalya'nın Moscato di Sracena üzüm çeşidinden izola edilmiş 26 *S. cerevisiae* izolatının ürettiği gliserol miktarlarının 5.84 g/L ile 8.12 g/L değerleri arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Yüksek alkoller iki ya da daha fazla karbon atomu içeren, kaynama noktası ve molekül ağırlığı etanolden daha yüksek olan alkollerdir. Aromatik bileşikler arasındaki en büyük gurubu oluştururlar ve 300 mg/L'nin altında şaraba kompleks bir yapı kazandırır. Daha yüksek konsantrasyonlarda (400 mg/L ve üzeri) ise şaraba keskin, sert alkol aroması vererek olumsuz yönde etkilerler.

Mayalar tarafından üretilen yüksek alkoller alifatik (propanol, izoamil alkol, izobütanol, amil alkol) ve aromatik (2-fenil etanol, tirosol) alkoller olmak üzere iki grupta toplanırlar. Yüksek alkoller ayrıca şarabın duyuusal özelliklerine önemli etkisi olan bazı esterlerin öncülleridir. (Swiegers ve ark, 2005; Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a; Manzanares ve ark, 2011).

Yüksek alkoller, amino asitlerin katabolizması sırasında (Ehrlich Reaksiyonu) ara ürün olarak ortaya çıkan α -keto asitlerin dekarboksilasyonu sonucunda oluşurlar. Bu reaksiyonun ilk aşamasında dallanmış zincirli ve aromatik yapıdaki aminoasit transferaz enzimi ile aminoasitlerden bir molekül amonyum (NH_3) ayrılarak (deaminasyon) α -keto asit oluşur. α -Keto asitten pirüvat dekarboksilaz enzimi ile CO_2 uzaklaşması (dekarboksilasyon) sonucunda aldehitler oluşur ve son olarak aldehitlerin alkol dehidrogenaz ile indirgenmesiyle yüksek alkoller oluşurlar. Yüksek alkoller, ortamda amino asit eksikliğinde glikoliz sırasında oluşan pirüvatın α -keto asite indirgenmesi yolu ile de üretilebilirler (Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a)

Mayaların yüksek alkol oluşturma özelliği tür ve suş düzeyinde farklılık gösterir ve şarap üretimi sırasında kullanılacak maya seçilirken yüksek alkol oluşturma özelliği de göz önünde bulundurulur. *Saccharomyces* türleri arasında *S. cerevisiae*'nin oluşturduğu yüksek alkol miktarı *S. bayanus*'a göre daha düşüktür. Ancak *S. cerevisiae*'nin oluşturduğu yüksek alkol miktarı suşlara göre büyük çeşitlilik gösterir. Genellikle, birçok *Saccharomyces* olmayan maya türünün oluşturduğu yüksek alkol miktarı ise *S. cerevisiae*'den daha düşüktür. Kullanılan maya türü ve şusu dışında alkol fermantasyonu sırasında oluşan her bir yüksek alkol bileşiği miktarını etkileyen diğer faktörler ise şıranın şeker miktarı, asimile azot miktarı, fermantasyon sıcaklığı, pH, havalandırma işlemi, ortamdaki tortu miktarı, üzüm çeşidi ve kabuk maserasyonu süresidir (Ugliano ve Henschke, 2009; Jolly ve ark, 2013).

Esterlerin büyük bir kısmı maya metabolizması sonucunda alkol fermantasyonu sırasında oluşurlar ve özellikle genç şarapların meyvemsi özelliğine

büyük katkı sağları (Bartowsk ve Pretorius, 2009). Şarapta en yaygın olarak bulunan esterler Çizelge 2.2' de gösterilen asetik asit ve yüksek alkollerin asetatları (etil asetat, heksil asetat, izoamil asetat, izobütil asetat ve 2-fenil etil asetat) ile düz zincirli yağ asitlerinin etil esterleri (etil bütanoat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanoat, etil propionat, etil laktat)' dir (Fugelsang ve Edwards, 2007; Manzanares ve ark, 2011).

Çizelge 2.2. Bazı esterlerin aroma tanımlayıcıları, şaraptaki konsantrasyonları ve algılanma eşik değerleri (Swiegers ve ark., 2005)

Esterler	Aroma tanımlayıcıları	Şaraptaki miktarı (mg/L)	Algılanma eşik değeri (mg/L)
Yüksek alkollerin asetatları			
Etil asetat	oje, meyvemsi	22.5-63.5	7.5*
Hekzil asetat	tatlı, parfüm, meyvemsi	0-4.8	0.7**
İzoamil asetat	muz, armut	0.1-3.4	0.03*
İzobütil asetat	Muz, meyvemsi	0.01-1.6	1.6***
2-fenil etil asetat	çiçeği, gül, bal, meyve	0-18.5	0.25*
Yağ asitlerinin esterleri			
Etil bütanoat	çiçeği, meyvemsi	0.02-1.8	0.02*
Etil heksanoat	yeşil elma, meyvemsi	0.03-3.4	0.05*
Etil oktanoat	tatlı, sabunumsu	0.05-3.8	0.02*
Etil dekanoat	tatlı, elma, solvent	0-2.1	0.2****
Etil propionat	meyvemsi	-	1.8*
Etil laktat	çilek, ahududu	-	150*

*,%10 etanol; **, şarap; ***, kırmızı şarap; ****, sentetik şarap

S. cerevisiae suşları heksil asetat, etil oktanoat, etil hekzaonoat gibi şarap aromasına önemli etkisi olan esterleri farklı miktarlarda üretebilirler. Bunun yanında birçok *Saccharomyces* olmayan mayanın da ester üreterek şarap aromasına katkı sağladığı bilinmektedir. *Candida*, *Hansenula* ve *Pichia* cinslerine ait birçok türün, *S. cerevisiae* suşlarından daha fazla etil asetat ürettikleri belirlenmiştir

(Nykanen, 1986; Manzanares ve ark, 2011). Ayrıca *Rhodotorula*'nın izoamil asetat, *H'spora uvarum* türünün de genel olarak yüksek miktarlarda ester ürettiği bildirilmiştir (Mateo ve ark, 1991; Romano ve ark, 1997; Manzanares ve ark, 2011).

Mayalar alkol dehidrogenaz enzimleri tarafından katalizlenen ve yüksek alkoller ve asetil CoA'nın substrat olarak kullanıldığı reaksiyonlar sonucunda etil esterleri üretilirler. Mayaların bu enzim aktiviteleri de genler tarafından kontrol edilir ve maya türü ve suşu arasında farklılık gösterir. Mayaların yağ asitlerinin esterlerini genetik ve enzimatik oluşturma mekanizmaları tam olarak anlayamamıştır. Alkol fermantasyonu sırasında oluşan esterlerin miktarları kullanılan maya türüne ve suşuna göre önemli farklılık gösterir. Bunun yanında üzüm çeşidi, fermantasyon sıcaklığı, şıranın içerdiği tortu miktarı, asimile azot miktarı başlangıçtaki şeker, oksijen ve lipit miktarları oluşan ester miktarını ve çeşitliliğini etkileyen diğer faktörlerdir (Swiegers ve ark, 2005).

Uçucu asitler, düz zincirli ya da dallanmış zincirli olarak ikiye ayrılırlar. Maya metabolizması sonucunda açığa çıkan başlıca uçuşu asitler, asetik propanoik, bütanoik, oktanoik, dekanoik, hekzanoik asitlerdir. Şarabın duyuşal özellikleri ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda hekzanoik, oktanoik ve dekanoik asitin beyaz şarabın aromasına katkı sağladığı, 2-metilpropionik asit gibi dallanmış zincirli uçucu asitlerin de şarabın bukesine katkı sağladığı bildirilmiştir (Ugliano ve Henschke, 2009).

Genellikle *S. cerevisiae* suşları, orta zincirli yağ asitlerini (C8 ve C10), *Saccharomyces* olmayan mayalara göre daha yüksek miktarlarda üretirler. Bunun yanında *Saccharomyces* olmayan mayaların ürettiği hekzanoik, oktanoik, dekanoik asit gibi kısa ve orta zincirli yağ asitleri belli bir seviyenin üzerine ulaştığında ortamdaki *S. cerevisiae* mayalarının gelişimini inhibe ederek fermantasyonun durmasına neden olabilirler (Fleet, 2003).

Karbonil bileşikler içinde bulunan uçucu aldehitler düşük algılanma eşik değerleri ve şaraba verdikleri karakteristik aromalar (fındığımsı, elma, limon)

nedeniyle en önemli karbonil bileşiklerdir. Bunlar arasında asetaldehit şarapta en fazla miktarda bulunan karbonil bileşigidir. Algılanma eşik değeri 100 mg/L 'dir ve şarapta 10-75 mg/L değerleri arasında bulunur. Asetaldehit çürük elma, fındık benzeri aroma verir ve beyaz şarapta oksidasyon göstergesidir. Şarapta, etanolün zamanla oksidasyonu, film oluşturan mayaların metabolizması, fazla miktarda O₂ ile temas ve fermantasyon sırasında yüksek miktarda SO₂ kullanılması, mayaların fazla miktarda asetaldehit üretmesine neden olabilir. Yapılan çalışmalarda SO₂ toleransı yüksek olan mayaların düşük olan mayalara göre daha fazla asetaldehit ürettikleri bildirilmiştir. Alkol fermantasyonu sırasında *Saccharomyces* spp. olmayan *K. apiculata*, *C. krusei*, *C. stellata*, *H. anomala*, *M. pulcherrima* türleri 40 mg/L ye kadar asetaldehit üretirken *S. cerevisiae* 6-190 mg/L değerleri arasında üretebilir. Karbonil aroma bileşikleri içindeki diğer bir önemli grup laktonlardır. Gama bütirolakton şarapta miktarı en yüksek bulunan laktondur ve laktonların duyuşal özellikleri tam olarak anlaşılammıştır (Swiegers ve ark, 2005; Manzanares ve ark, 2011).

Romano ve ark (1997), 96 apikulat mayasının asetaldehit ve etil asetat oluşturma profillerini incelemişlerdir. *K. apiculata* maya suşlarının 15.5-65.8 mg/L aralığında, *H'spora guilliermondii* suşlarının ise 10.5-27.7 mg/L aralığında asetaldehit ürettikleri bildirilmiştir. Her iki türe ait suşların ürettikleri etil asetat miktarlarının 8-40 mg/L aralığında değıştiğı, ancak bazı *K. apiculata* suşlarının 60 mg/L'nin üzerinde etil asetat ürettiğı bildirilmiştir.

Ciani ve Maccarelli (1998) şarapçılık için önemli olan beş *Saccharomyces* spp olmayan türe ait birçok maya suşunun teknolojik özelliklerini incelemişlerdir. Sonuçlara göre *C. stellata* ve *T. delbrueckii*'nin şarapların aroma ve lezzetlerine olumlu etkileri olduğı, *K. apiculata* mayasının yüksek miktarda asetik asit, etil asetat ve etanol ürettiğı belirlenmiştir.

Zohre ve ark (2002), üzüm şırasında, *K. apiculata*, *C. pulcherrima* ve *S. cerevisiae* mayalarının saf ve karışık kültürlerinin özelliklerini incelemişlerdir. Karışık kültürde *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların çoğaldığı ve ortamda

daha uzun süre kaldığı, *Sachharomyces* mayalarının ise fermantasyona hakim olduğunu belirlemişlerdir. Karışık ve saf kültürlerde en fazla etanolü *S. cerevisiae* mayaları üretmiştir. Saf kültürler ile yapılan fermantasyonda, *K. apiculata* ve *C. pulcherrima* mayaları, düşük etanol, yüksek indirgen şeker ve yüksek miktarda etil asetat üretmiştir. Karışık kültürle yapılan fermantasyonda etil asetat konsantrasyonu, *S. cerevisiae* saf kültürü ile yapılabildiğine göre daha fazla bulunmuştur.

Clemente-Jimenez ve ark, (2004), İspanya'nın Valle del Andrax bölgesinde, farklı üzüm çeşitleri ile yaptıkları denemelerde spontan fermantasyon sırasında *Candida*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Pichia* ve *Saccharomyces* türlerine ait mayaları tanımlamışlardır. Yapılan analizler sonucunda en iyi yüksek alkol profili *S. cerevisiae* mayası vermiştir. Bunu *H'spora uvarum*, *I. orientalis* ve *C. stellata* mayaları takip etmiştir. *M. pulcherrima* ve *P. fermentans* mayaları şarapta istenen aromalar olan, yüksek miktarlarda etil oktanoat ve 2-fenil etanol üretmişlerdir.

Cordero-Bueso ve ark (2013), İspanya da yetiştirilen Malvar beyaz üzümünün spontan fermantasyonu sırasında *Saccharomyces* spp. olmayan maya popülasyonunu belirlemiş ve izole edilen bazı mayaların şarap kalitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. İzole edilen 504 *Saccharomyces* spp. olmayan maya β -glukozidaz ve pektinaz aktivitelerine göre seçilmiş ve seçilen *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların şarabın duyuşal özelliğı üzerine olumlu etkisi olduğıu belirlenmiştir. Bununla birlikte *T. delbrueckii* mayasının şarabın çiçeksi ve meyvemsi özelliğini arttırdığını ve *S. cerevisiae* ile birlikte karışık kültür olarak kullanılabilereğı önerilmiştir. Ancak *H'spora guilliermondii* mayasının yüksek miktarda uçar asit ve etil asetat ürettiğı, fakat bu türle birlikte *Pichia* ve *Candida* cinsine ait türlerin şarap üretimi için önemli olan bazı enzimleri yüksek miktarda ürettikleri bildirilmiştir.

Liu ve ark (2015), Çin'in Shanshan Bölgesindeki yerli *S. cerevisiae* maya çeşitliliğini belirlemiş ve elde ettikleri 21 farklı genotipin teknolojik özelliklerini incelemişlerdir. Fermantasyon özelliğı daha iyi olan 8 suş seçilerek oluşturdukları

aroma bileşikleri belirlenmiştir. Toplam aroma bileşiği miktarı 218.47-267.82 mg/L arasında değişmiş, LFE1225 kodlu suşun ürettiği toplam ester miktarının diğer suşlara göre daha fazla olduğu ve LFN524 suşunun ise yüksek miktarda 2 fenil etil asetat üreterek ön plana çıktığı bildirilmiştir.

Vigentini ve ark (2016), Gürcistanın 5 farklı bölgesinde bulunan 22 farklı üzüm çeşidinden izole ettikleri *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, maya suşları ile iki farklı üzüm şiranında (Saperavi ve Goruli Mtsvane) fermantasyon denemeleri kurmuşlar ve elde ettikleri şarapların aroma profillerini incelemişlerdir. Şaraplarda bulunan, yüksek alkollerin miktarları şıra ve kullanılan suşa göre farklılık göstermiş ve her iki şırada da yüksek alkol miktarı (izoamil alkol, izobütil alkol, 2-fenil etanol) *S. cerevisiae* suşu inoküle edilen şaraplarda yüksek, *T. delbrueckii* suşu (191.5 mg/L) inoküle edilen şaraplarda düşük miktarlarda bulunmuştur. Saperavi şaraplarının yüksek alkol miktarının Goruli Mtsvane şaraplarına göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. Saperavi ve Goruli Mtsvane üzümleri düşük aromatik potansiyele sahip üzüm çeşitleridir. Bu çalışmada elde edilen şaraplarda yağ asitleri etil esterleri ve yüksek alkollerin asetatlarının miktarları algılanma eşik değerlerinin altında bulunmuştur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada 2014 ve 2015 yıllarında Tokat (Dimes/Diren şarap işletmesinin bağları) ve Nevşehir/Gülşehir (Kavaklıdere şarap işletmesinin bağları) olmak üzere 2 farklı yöreden sağlanan Narince üzümleri kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bağbozumu ve mikrobiyolojik analizler için örnek alma işlemi 2014 yılında 14 Eylül'de Nevşehir/Gülşehir yöresinden 16 Eylül'de ise Tokat yöresinden sağlanmıştır. Örnek alma işlemi 2015 yılında ise 17 Eylül'de Tokat yöresinden 21 Eylül'de Nevşehir/Gülşehir yöresinden sağlanmıştır.

Tokat Yöresi Narince Üzümleri



Nevşehir Yöresi Narince Üzümleri



Şekil 3.1. Tokat ve Nevşehir Yörelerinden elde edilen Narince üzümleri

Mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal analizler için üzüm örnekleme seçmemeye özen göstererek, farklı yön ve yüksekliklerden rastgele yapılmıştır. Mikrobiyolojik analizler ve fermantasyon denemelerinin kurulması için steril numune poşetlerine aseptik koşullarda makas kullanılarak 12'şer kg örnek

alınmıştır (Şekil 3.2). Tokat yöresinden alınan üzümler TH olarak, Nevşehir Yöresinden alınan üzümler ise NH olarak kodlanmıştır. Alkol fermantasyonunda kontrol olarak ticari Zymaflore X5 mayası (Laffort, Bordeaux, Fransa) kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Mikrobiyolojik analizler için toplanan Narince üzüm örnekleri

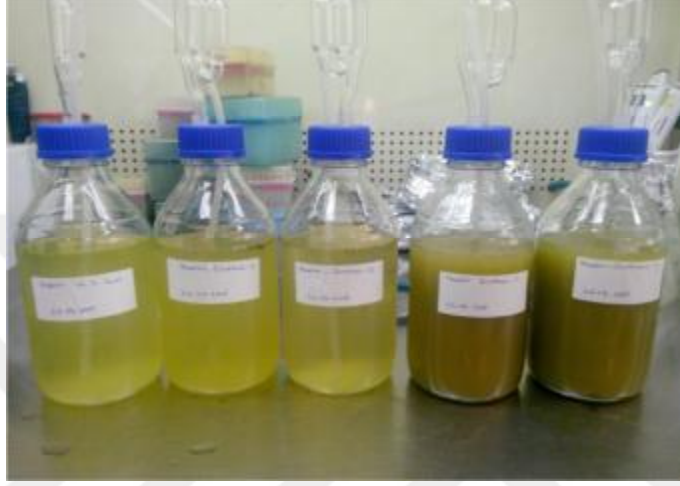
3.2. Metot

3.2.1. Denemelerin Kurulması

Steril poşetlerle laboratuvara getirilen üzümler, steril kabin içerisinde sıkılmış ve şıralar elde edilmiştir. Elde edilen şıralar iki gruba ayrılmıştır;

- Birinci grup şıraya hiçbir işlem uygulanmayarak fermantasyona bırakılmış ve Tokat yöresi için TA ve Nevşehir için NA olarak kodlanmıştır.
- İkinci grup şıralar endüstriyel beyaz şarap üretiminde uygulandığı gibi 10 °C'de 8 saat tortu alma işlemi uygulandıktan sonra fermantasyona bırakılmış ve Tokat yöresi için TB ve Nevşehir için NB olarak kodlanmıştır.

Denemeler her biri 750 mL olacak şekilde 1 L'lik fermantasyon başlıklı steril cam fermantasyon şişelerinde ikişer paralel olacak şekilde hazırlanmış ve fermantasyon 18°C'de gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Tokat ve Nevşehir yöresi Narince üzümleri ile kurulan fermantasyon denemeleri

3.2.2. Analiz Metotları

3.2.2.1. Üzümlerde Yapılan Mikrobiyolojik Analizler

Steril poşetlerde toplanan üzümler aseptik koşullarda tanelerine ayrılmış ve rastgele seçilen 25 g üzüm tanesi steril erlenlere konulmuştur. Üzümler üzerine 50 mL %0.9 NaCl tuzlu (fizyolojik) su eklenmiş ve orbital karıştırıcıda 150 devir/dk'da 3 saat karıştırılarak yüzey yıkama yöntemi ile homojenize edilmiştir. 1/10 oranında seyreltilen bu örnekten gerekli seyreltmeler yapılmış ve 0.1 mL seyreltilmiş örnek, mikroorganizma sayımı için besiyerleri üzerine yayma yöntemiyle yayılmıştır (Sabate ve ark, 2002; Fleet ve Heard, 2002).

3.2.2.2. Maya Sayımı

Toplam maya sayımında Maya Özütü Peptonlu Dekstroz (YPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) besiyeri kullanılmış ve petriler 28°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır (Esteve-Zarzoso ve ark, 2000).

Saccharomyces cinsi mayaların sayımında %10 etanol ve %0.015 sodyum metabisülfid içeren YPD besiyeri kullanılmış ve petriler 28°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır (Esteve-Zarzoso ve ark, 2000; Fleet ve Heard, 2002).

Saccharomyces spp. olmayan mayaların sayımında Lizin agar (Oxoid, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, ABD) kullanılmış ve petriler 28°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır (Esteve-Zarzoso ve ark., 2000).

Besiyerlerine bakteri gelişimini önlemek için 0.1 g/L oxotetracycline (Sigma- Aldrich, St. Louis, ABD) ve küf gelişimini önlemek için 2 g/L sodyum propionate (Alfa Aesar, Haverhill, ABD) ilave edilmiştir (Esteve-Zarzoso ve ark., 2000; Fleet ve Heard, 2002).

3.2.2.3. Fermantasyon Sırasında Yapılan Mikrobiyolojik Analizler

Fermantasyonun gidişi günlük sıcaklık ve yoğunluk ölçümleri ile izlenmiştir. Alkol fermantasyonun başında (F1), fermantasyon ortasında (yoğunluk yarıya düştüğünde; F2) ve fermantasyon sonunda (yoğunluk 1' in altına düştüğünde; F3) steril kaplara örnekler alınmıştır. % 0.9' luk tuzlu su kullanılarak gerekli seyreltilmeleri yapılan örnekler, toplam maya, *Saccharomyces* cinsi mayalar ve *Saccharomyces* cinsi olmayan mayaların sayımı için besiyerleri üzerine yayma yöntemiyle yayılmış ve 28°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır (Esteve-Zarzoso ve ark., 2000; Fleet ve Heard, 2002; Clemente-Jimenez ve ark., 2004).

3.2.2.4. Fermantasyon Sırasında Mayaların İzolasyonu

İnkübasyon sonunda YPD ve lizin agarda gerekli sayımlar yapıldıktan sonra farklı görünüşe sahip kolonileri temsil eden kolonilerden en az 10 koloni seçilerek aseptik koşullarda alınmış ve daha sonra bu koloniler birkaç defa tekrar

kültüre alınarak saflaştırılmıştır. Elde edilen izolatlar tanıları yapılmak üzere % 50 gliserol içeren ortamda, -40°C 'de saklanmıştır (Esteve-Zarzoso ve ark., 2000; Clemente-Jimenez ve ark., 2004).

3.2.3. Mayaların Moleküler Karakterizasyonu

Mayaların DNA İzolasyonu: Maya hücrelerinin genomik DNA izolasyonu InstaGene Matrix (Bio-Rad, Hercules, Kaliforniya, ABD) Kit'inde önerilen protokole göre gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle -40°C de muhafaza edilen maya izolatları tekrar aktif hale getirilmiştir. Aktif hale getirmek için, maya izolatları YPD broth içeren ependorf tüplerine %2 oranında aşılınmış ve 30°C ' de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe edilen mayalar 4°C ' de 14000 rpm' de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra sıvı kısım atılmış, kalan çökeltinin üzerine yıkama işlemi yapmak amacıyla 1 mL steril ultra saf su ilave edilmiştir. Tüpler tekrar santrifüj edilmiş ve sıvı kısım atılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Taze kültürlerle 100 μL genomik DNA izolasyon solüsyonu eklenerek 10 sn. vortekslenmiştir. Daha sonra tüpler 56°C ' lik su banyosunda 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Ependorf tüpleri tekrar 10 sn. vortekslenmiştir ve 100°C ' lik su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. Tüpler son olarak 10 sn. vortekste karıştırıldıktan sonra 4°C ' de 14000 rpm de 3 dk santrifüj edilmiştir. Üstteki faz yeni ve steril bir ependorf tüpüne aktarılmış ve izole edilen genomik DNA (gDNA)'lar kantitatif ve kalitatif olarak analiz edilmiş, pozitif sonuç verenler kullanılabilecek kadar -20°C ' de muhafaza edilmiştir.

5.8S ITS Gen Bölgesinin Çoğaltılması: Mayaların moleküler yöntemle tanımlanması Esteve-Zarzoso ve ark (1999; 2000) ve Clemente-Jimenez ve ark. (2004)' na göre 3 aşamada yapılmıştır. İlk aşamada 5.8 ITS rRNA bölgesi ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak (Çizelge 3.1) PZR'da çoğaltılmıştır. Bu amaçla tüplere toplam reaksiyon hacmi 50 μL olacak şekilde steril distile su, DNA (50-100 mg/ μL), Tampon (10 x inc 25 mM MgCl_2), dNTP (25 mM), MgCl_2 (25 mM), Primer

ITS1 (100 mM), Primer ITS4 (100 mM) ve Taq polimeraz (50 U /mM) konulmuştur (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. 5.8S rRNA Analizinde Kullanılan Primerler

Primer İsmi	DNA dizilimi (5'→3')
ITS1 İleri	5'- TCC GTA GGT GAA CCT GC GG - 3'
ITS4 Geri	5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3'

Çizelge 3.2. ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak yapılan 5.8S rRNA analizinde kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

PZR karışımı	Miktar (µL)
Tampon (10 x, 20 mM MgCl ₂ içeriyor)	5
MgCl ₂ (25 mM)	2.5
dNTP (25 µmol)	5
ITS1 (100 µM)	0.126
ITS4 (100 µM)	0.126
Taq polimeraz (50 U /µL)	0.15
dH ₂ O	34.598
DNA	2.5
Toplam Hacim	50

Döngü 95°C de 5 dakika denatürasyon aşaması ile başlayıp 94°C de 1 dk. ve 55°C'de 2 dk. 72°C de 2 dk. 35 döngü yapıp, 72 °C de 10 dakika ile sonuçlandırılmıştır. PZR ürünleri % 1,5 agaroz jellerde UV altında görüntülenmiştir. PZR ürünlerinin boyutu 100 baz çiftlik (bç) "DNA markörü" (Cat No: 10488058) yardımıyla belirlenmiştir.

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm Analizi (RFLP): İkinci aşamada 5.8S ITS PZR ile çoğaltılan DNA, restriksiyon enzimleriyle (*Hha1*, *Hae III* ve *Hinfl*) kesilmiştir. Tüplere toplam reaksiyon hacmi 12.5 µL olacak şekilde H₂O, tampon (10 X) ve Miks A için enzim *CfoI* (*Hha1*, 10U/µL) , Miks B için enzim *Hae III* (BSURI, 10U/µL) , Miks C için enzim *Hinfl* (10U/µL) konularak karışımlar hazırlanmış ve 1.5 mL' lik eppendorf tüplerine önce 7.5 µL miks ve sonra 5 µL PZR ürünü konularak santrifüj edilmiştir (Çizelge 3.3.). Daha sonra

örnekler 37°C'lik su banyosunda 10-16 saat bekletilmiştir. RFLP ürünleri % 2 agaroz jellerde 120 V'da 1,5 saat yürütülmüş ve UV altına görüntülenmiştir. RFLP-PZR ürününün boyutunu belirlemek için 50 bp'lik "DNA markörü" (Cat No: 10416014) kullanılmıştır. Farklı restriksiyon enzimleri kesimi sonucu yakın restriksiyon fragmanı veren izolatlar aynı gruba alınmış ve her grubu temsilen 1 veya 2 örnekte 26S rRNA bölgesi ileri analizi için Sanger metodu ile DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizleri hizmet alımı (MACROGEN, Hollanda) ile yapılmıştır.

Çizelge 3.3. RFLP analizinden kullanılan kimyasallar ve miktarları

	HhaI	Hinf	HaeIII
Tampon	buffer Tango 1.25 µL	buffer R 1.25 µL	buffer R 1.25 µL
Enzim	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
dH ₂ O	5.75 µL	5.75 µL	5.75 µL
ITS-PZR	5 µL	5 µL	5 µL
Toplam hacim	12.5 µL	12.5 µL	12.5 µL

26S rRNA Dizi Analizi: Üçüncü aşamada 26S rRNA'nın D1/D2' alanının çoğaltılması NL1 ve NL 4 primerleri (Çizelge 3.4) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 50 µL olacak şekilde tüplere steril distile su, DNA (50-100 mg/ µl), Tampon (10X), dNTP (25 mM), MgCl₂ (25 mM), Primer NL 1 (100 mM), Primer NL 4 (100 mM) ve Taq polimeraz polimeraz (50 U /mM) reaksiyona konulmuştur.

Çizelge 3.4. 26S rRNA Analizinde Kullanılan Primerler

Primer İsmi	DNA dizilimi (5'→3')
NL 1 İleri	5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3'
NL 4 Geri	5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'

26S bölgesi için PZR döngüsü 95°C de 5 dakika denatürasyon aşaması ile başlayıp 95°C de 1 dk. ve 52°C'de 45 saniye 30 döngü yapıp 72°C de 1 dk. ve 72 °C de 7 dakika uzama ile sonuçlandırılmıştır. PZR ürünlerinin elektroforezi için % 2 agaroz, TBE 1X içeren jel hazırlanmıştır. 100 bp marker ve PZR ürünleri 120 V'da 1,5 saat kadar jelde koşurulmuştur.

26S rRNA-PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi sonucu 103 izolatanın pozitif bant verdiği belirlenmiş, pozitif sonuç veren 103 adet 26S rRNA-PZR ürününün MACROGEN' de (Hollanda) DNA dizi analizi yapılmıştır.

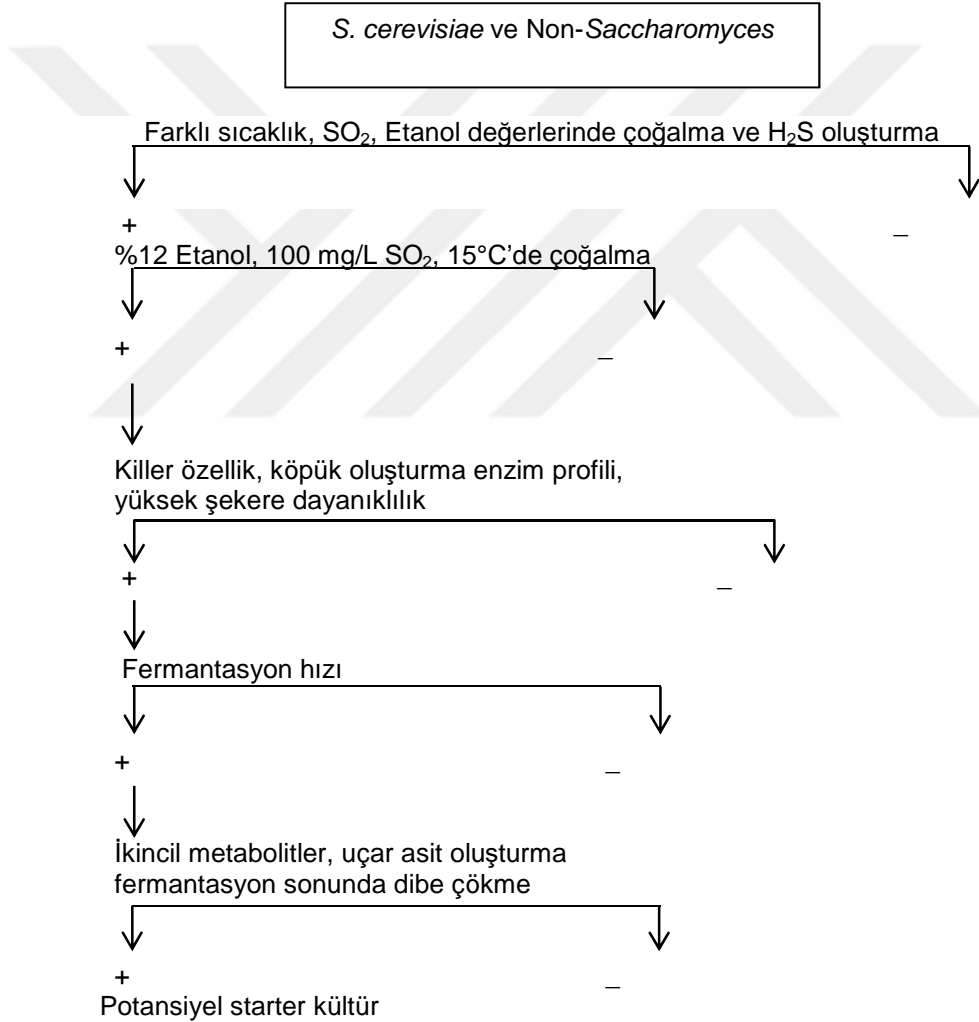
Filogenetik Analizler: Maya izolatlarının 26S rRNA gen bölgelerinin sekanslanması sonucunda elde edilen DNA dizi sonuçları 'BioEdith Sequence Alignment Editor' programı kullanılarak düzenlenmiş ve 'BLAST' programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda maya izolatlarının sekans sonuçları 'MEGA 6' programı ile Maximum Likelihood (ML) kullanılarak analiz edilmiş ve analizde 'Tamura-Nei Modeli' kullanılmıştır (Zwickl, 2006; Tamura ve ark., 2013).

3.2.4. Mayaların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

DNA dizi analizi sonucuna göre %98 ve üzeri benzerlik gösteren *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların teknolojik özelliklerinin belirlenmesinde Şekil 3.4'deki yol izlenmiştir.

Tanımlanan mayalarda öncelikle H₂S oluşturma, farklı sıcaklıklarda, SO₂ ve etanol konsantrasyonlarında gelişebilme özelliklerine göre bir ön eleme yapılmıştır. Farklı sıcaklık, SO₂ ve etanol konsantrasyonlarında zayıf gelişen, yoğun (koyu kahve ve siyah) H₂S oluşturan mayalar elenmiştir. İkinci aşamada, %12 etanol, 200 mg/L SO₂ ve pH' sı 3.5 olan sıvı besiyeri hazırlanmış ve mayalar bu besiyerine aşılanarak 15 derecede 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bunun sonucunda spektrofotometrede 620 nm de ölçümleri yapılarak gelişimleri belirlenen ve yoğun gelişme gösteren mayaların killer aktivitesi, enzim profilleri, köpük oluşturma ve yüksek şeker konsantrasyonunda gelişme özellikleri,

fermantasyon hızları belirlenmiştir. Mayalar fermentasyon hızlarına göre yeniden elenmiş ve yalnızca yüksek fermentasyon hızı ve verimine sahip, düşük kalıntı şeker bırakan mayaların diğer teknolojik özelliklerine (ikincil metabolit, fermentasyon sonunda dibe çökme ve uçar asit oluşturma) devam edilmiştir ve bu analizler sonucunda potansiyel starter kültür mayası belirlenmeye çalışılmıştır. (Perez-Coello ve ark., 1999; Elmacı ve ark., 2014).



Şekil 3.4. Mayaların teknolojik özelliklerinin belirlenmesinde izlenen yol

3.2.4.1. Farklı Sıcaklıklarda Gelişebilme Özelliğinin Belirlenmesi

Maya suşlarının farklı sıcaklık derecelerinde gelişmelerini incelemek için ilk olarak; YPD sıvı besiyerinde 24 saatlik aktif kültürler hazırlanmıştır. Bu kültürlerden YPD sıvı besiyerlerine ekimler yapılarak besiyerleri; 10 °C, 15°C, 20°C, 25°C, 37°C'lerde 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Kültürler belirli aralıklarla, gelişme durumları (gaz, köpük, bulanıklık oluşturma) açısından değerlendirilmiştir (Regodón ve ark, 1997; Nikolaou ve ark, 2006).

3.2.4.2. Etanol Toleransının Belirlenmesi

Maya izolatlarının etanol toleranslarının belirlendiği denemeler % 1 (h/h) oranında glukoz içeren YNB sıvı (pH 3.3) besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir. Deneylerde, YNB sıvı besiyerlerine; %0, 8, 10, 12 ve 14 (h/h) etanol eklenerek izolatların bu ortamlardaki gelişme ve fermantasyonu başlatabilme özellikleri değerlendirilmiştir. Aktifleştirilen maya izolatları besiyerlerine yaklaşık olarak; 10^6 kob/mL derişiminde aşılandıktan sonra, sıvı besiyerlerinin yüzeyleri, yaklaşık 2 cm kalınlığında steril vazelin ile kaplanmıştır. Ekim yapılan besiyerleri, 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmış ve belirli aralıklarla gelişme durumları (gaz, köpük, bulanıklık oluşturma) açısından değerlendirilmiştir (Parish ve Carrol, 1987).

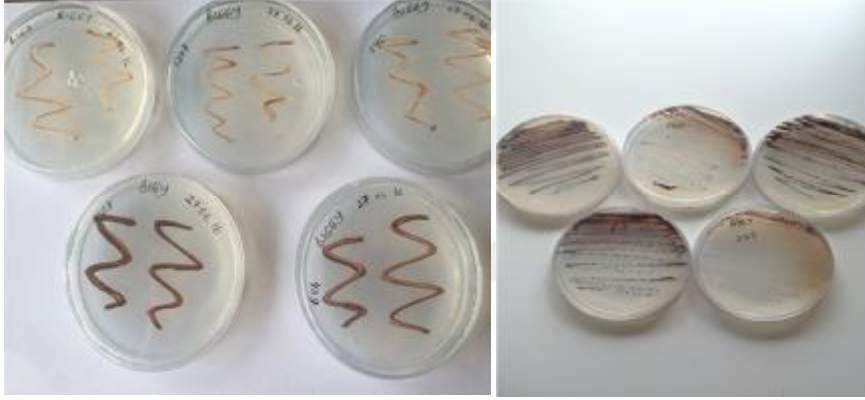
3.2.4.3. Kükürtdioksit Toleransının Belirlenmesi

Mayaların SO₂ dayanıklılığının belirlenmesinde YPD sıvı besiyeri kullanılmıştır. Besiyerlerine 50, 100, 150, 200 ve mg/L kükürt dioksit ilave edilmiştir. Mayalar belirli aralıklarla gelişme durumları (gaz, köpük, bulanıklık oluşturma) açısından değerlendirilmiştir (Parish ve Carol, 1987; Regedon ve ark, 1997).

3.2.4.4. Hidrojen Sülfür Üretme Özelliğinin Belirlenmesi

Mayaların H₂S üretme özelliklerinin inceleneceği denemeler, BIGGY agar besiyerinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Deneylerde ilk olarak, aktifleştirilen

maya izolatlarının çizgi yöntemi ile BIGGY agar besiyerlerine ekilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri 28°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda besiyerlerinde gelişen kültürlerin renkleri göz önünde bulundurularak sonuçlar değerlendirilmiştir. Değerlendirme sırasında literatürde önerilen yöntemeye göre, maya izolatları oluşturdukları renklere göre gruplandırılmıştır. Yöntemde, kültürün besiyerindeki rengi siyaha döndükçe üretilen H₂S miktarının arttığı kabul edilmektedir. Üretilen H₂S miktarına göre kültürler 1: beyaz, 2: krem, 3: açık kahverengi, 4: kahverengi, 5: koyu kahverengi, 6: siyah olarak gruplandırılmışlardır (Spiczki ve ark, 2001; Orlic ve ark, 2005).



Şekil 3.5. Bazı mayaların BIGGY agar da ürettikleri H₂S

3.2.4.5. Mayaların Köpük Oluşturması

Mayaların köpük oluşturma özelliği Regodón ve ark., (1997); Nikolaou ve ark.,(2006) tarafından önerilen yöntemeye göre yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan şıra otoklavda 105°C'de 15 dakika pastörize edilmiştir.

Denemeler 10'ar mililitre steril şıra içeren 16 mm x 160 mm boyutundaki test tüplerinde gerçekleştirilmiştir. 28°C'de 24 saat aktiveleştirilen maya izolatları 10 mL steril şıra içeren test tüplerine 10⁶ hücre/mL düzeyinde aşılanmış ve 30 °C, 20 °C ve 15°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Fermantasyon boyunca her gün oluşan

köpük hacmi mm olarak ölçülmüştür. Mayalar ulaşılan maksimum köpük miktarına göre F0 (2 mm'den düşük köpük oluşturanlar), F1 (2-4 mm arasında köpük oluşturanlar), F2 (4 mm' den fazla köpük oluşturanlar) şeklinde 3 grup altında toplanmıştır.

3.2.4.6. Mayaların Yüksek Şeker Konsantrasyonunda Gelişebilmesi

Mayanın yüksek şeker konsantrasyonunda gelişebilmesi Iranzo ve ark (1998) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Denemeler briks derecesi 30'a ayarlanmış YPG broth besiyerinde gerçekleştirilmiştir. 28°C'de 24 saat aktifleştirilen maya izolatları, 'durham tüp' içeren besiyerine (10 mL besiyeri içeren deney tüpleri) 1 öze dolusu inoküle edilerek 30°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmış ve 'durham tüpünün' üçte ikisinde gaz oluşturan maya suşlarının gelişmesi pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.2.4.7. Killer Aktivitenin Belirlenmesi

Mayaların killer aktivitelerini belirlemek için duyarlı *S. cerevisiae* suşu (NCYC 1006) kontrol amaçlı olarak kullanılmıştır. Duyarlı *S. cerevisiae* NCYC 1006 suşu 10^5 kob/mL olacak şekilde metilen mavisi ve fosfat sitrat solüsyonu içeren YPD katı besiyeri içine karıştırılmıştır (Şekil 3.6).

Metilen mavisi solüsyonu: 40 mg metilen mavisi 10 mL steril saf su içerisinde çözülerek YPD agar içine ilave edilmiştir.

Fosfat sitrat solüsyonu: 21 g sitrik asit ve 28,3 g K_2HPO_4 1L saf su içerisinde çözüldürülmüştür. Solüsyonun PH'sı 4.5 ayarlanmış ve sonrasında 121°C de 15 dk steril edilmiştir. 114 mL Steril fosfat sitrat solüsyonu 50 °C'ye soğutulmuş 1L YPD agar içerisine ilave edilmiştir.

İzole edilen endojen *S. cerevisiae* mayaları katılaşmış besi ortamının ince çizgi şeklinde ekilmiş ve 20 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar mayaların zon oluşturma aktivitelerine göre değerlendirilmiştir (Özçelik ve Dönmez, 1993; Regedon ve ark, 1997; Bağder, 2008).



Şekil 3.6. Maya suşlarının killer aktivite sonucu oluşturdukları zonlar

3.2.4.8. Mayaların Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

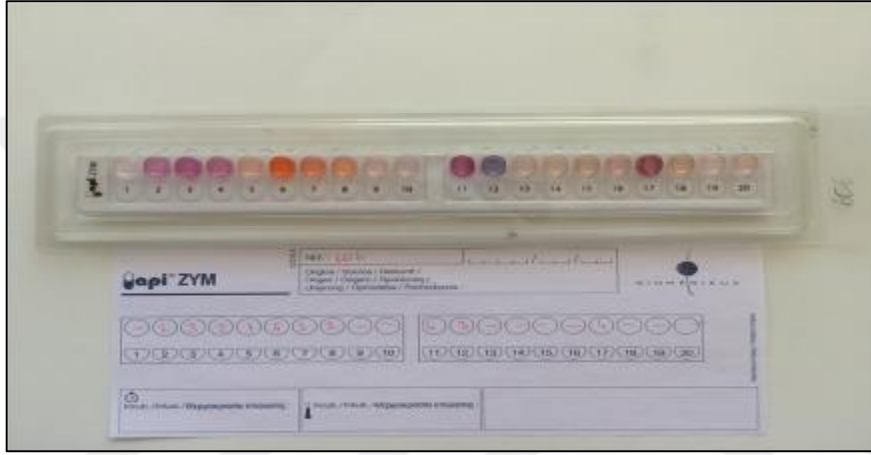
Maya izolatlarının Çizelge 3.5'te verilen enzim aktiviteleri Biomerux tarafından verilen protokol kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. API ZYM kitinde bulunan enzimler

Test	Enzim	Test	Enzim
1	Kontrol	11	Fosfataz asit
2	Fosfataz alkalın	12	Fosfoamidaz
3	Esteraz (C 4)	13	α Galaktosidaz
4	Esteraz lipaz (C 8)	14	β Galaktosidaz
5	Lipaz (C 14)	15	β Glukuronidaz
6	Lösin aminopeptidaz	16	α Glukosidaz
7	Valin aminopeptidaz	17	β Glukosidaz
8	Sistin aminopeptidaz	18	β Glukozamidaz
9	Tripsin	19	α Mannosidaz
10	α -Kimotripsin	20	α Fukosidaz

YPD katı besiyerinde 24 saat geliştirilen maya kültürler, kit (Biomerieux – France) içerisindeki 2 mL steril API NaCl (% 0,85) solusyonu ile süspanse edilmiş ve 5-6 McFarland bulanıklığında maya süspanسیونları hazırlanmıştır. Daha sonra kuyucukların içerisine bu süspanسیونdan 65 μ L ilave edilerek kitler 37 °C' de 4-5

saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kuyucukların içerisine sırasıyla, 1 damla ZYM A ve 1 damla ZYM B reaktifi damlatılarak 5 dk beklenmiş ve 10 sn 1000 W ışık kaynağı altında tutulan striplerdeki renk değişimleri ve yoğunlukları kullanma kılavuzunda belirtilen renk yoğunluklarına (Şekil 3.7) göre değerlendirilmiştir.



Şekil 3.7. API ZYM kit ile enzim aktivitelerinin belirlenmesi

3.2.4.9. Fermantasyon Hızlarının Belirlenmesi

Mayaların fermantasyon hızlarının belirlenmesi amacıyla, %20 (w/v) glukoz içeren YNB sıvı (pH 3.5) besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir. YPD sıvı besiyerinde aktiveleştirilen maya izolatları, YNB sıvı besiyerlerine yaklaşık 10^6 kob/mL olacak şekilde aşılmıştır. Deneyler, fermantasyon başlıklı 500 mL'lik şişelerde, 300 mL besiyeri hacminde, 18-20 °C'lerde ve iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8). Fermantasyonun gidişi, şişelerdeki CO₂ üretimine bağlı olarak gerçekleşen ağırlık kaybı günlük ölçülerek izlenmiştir. Fermantasyon hızı (FH), fermantasyon başladıktan sonraki ilk 48 saatte gerçekleşen CO₂ kaybının g/L.s olarak hesaplanması ile belirlenmiştir. Fermantasyon gücü (FG), fermantasyon sonunda her bir mayanın ürettiği alkol miktarı ölçülerek

belirlenmiştir. Fermantasyon sona erdiğinde, besiyerinde kalan şeker miktarı HPLC ile belirlenmiştir (Iranzo ve ark, 1998; Pérez-Coello ve ark, 1999).



Şekil 3.8. Mayaların fermantasyon hızlarının belirlenmesi

3.2.4.10. Mayaların Fermantasyon Sonunda Çökme (Flokülasyon) Oranı

Mayaların fermantasyon sonunda dibe çökme yetenekleri Helm sedimentasyon testi ile belirlenmiştir (Sores ve Mota, 1996). Maya izolatları öncelikle 100 mL YPD sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 25°C'de, orbital karıştırıcıda 150 rpm ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen mayalar 4500 G, 5 dk ve 4°C'de santrüfuj edilmiş ve sırasıyla 250 mM ETDA solüsyonu ile 2 kez yıkanmış, sonrasında pH 2'ye ayarlanmış 250 mM NaCl ve 4.5 pH'ya ayarlanmış 250 mM NaCl solüsyonları ile yıkanmıştır. Bu işlem sonunda mayalar 24 mL 4.5 pH da NaCl solüsyonu içerisinde 1×10^8 hücre /ml olacak şekilde süspansiyon edilmiştir. Mezürler CaCl (100 mM, 4.5 pH) içeren (bu değer 4 mM Ca^{2+} denk geliyor) solüsyonla 25 ml'ye tamamlanmış ve 18 defa alt üst edilmiş ve hareket etmeyecekleri bir yüzeyde sabit bir şekilde bırakılmışlardır. Daha sonra 2 saatte bir mezürlerin 20 mL'lik derecesine denk gelen kısımdan 200-1000 µL örnekler alınarak pH'sı 2 olan 250 mM NaCl solüsyonu içerisinde

çözündürülmüş ve ortamdaki hücre konsantrasyonunun 620 nm’de absorbansı okunmuştur. Maya izolatlarının flokülasyon oranı % olarak verilmiştir.

3.2.4.11. Uçar Asit Miktarı

Mayaların oluşturdukları uçar asit miktarlarını belirlemek için YPD sıvı besiyeri kullanılmıştır (Şekil 3.8). Uçar asit miktarının belirlenmesin buharlı damıtma yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (OIV, 2016).



Şekil 3.9. Uçar asit oluşturma özelliklerinin belirlenmesi

3.2.4.12. İkincil Metabolitlerin Belirlenmesi

Seçilen mayalar ile steril Narince şıraları kullanılarak 18°C’de fermantasyon denemeleri kurulmuştur. Fermantasyon sonunda mayaların fermantasyon metabolizması sonucu ürettiği sekonder metabolitler olan, esterler (etil asetat, izoamil asetat, etil hekzanoat, heksil asetat, etil oktanoat, etil dekanat, 2-fenil etil ester), yüksek alkoller (n-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-bütanol, 2-metil-1-bütanol, 2 fenil etanol) asetaldehit ve gliserol miktarları

belirlenmiştir. Mayaların oluşturdukları ikincil metabolitlerin miktarları 3 farklı metod ile belirlenmiştir. Asetaldehit ve etil asetat doğrudan şarabın GC-FID'a enjekte edilmesi ile belirlenmiş (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2011), diğer aroma bileşikleri ise Ortega ve ark. (2001) tarafından bildirilen mikro sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktın doğrudan GC/MS-FID'a enjeksiyonu ile belirlenmiştir. Mayaların ürettiği gliserol ise şarabın doğrudan HPLC'ye enjeksiyonu ile belirlenmiştir. Kontrol olarak X5 ticari mayası (Laffort, Fransa) kullanılmıştır.

Mikro sıvı-sıvı ekstraksiyon: Bu metoda göre, 2.7 mL örnek 15 mL vida kapaklı santrifüj tüpüne alınarak, üstüne 6.3 mL saf su, 4.1 g amonyum sülfat, 20 µL iç standart çözeltisi (140 µg/mL 2-oktanol ve 4-metil-2-pentanol) ve 0.25 mL diklorometan ilave edilmiştir. Sonra tüpler mekanik çalkalayıcıda 90 dk karıştırılarak, 2500 rpm'de 10 dk 20°C'de santrifüj edilmiştir. Diklorometan fazı mikro vialerle alınmıştır. Bu şekilde elde edilen ekstrakt doğrudan GC ve GC/MS' e enjekte edilerek aroma maddeleri belirlenmiştir (Ortega ve ark, 2001).

Aroma maddelerinin tanımlanması ve miktar tayini: Aroma maddelerinin miktarı ve tanımlanması "Agilent 6890N" marka gaz kromatografisi, buna bağlı "Agilent 5975B VL MSD" kütle spektrometresinde gerçekleştirilmiştir. Aroma maddelerinin miktar tayininde, "Agilent 6890N" marka alev iyonlaşma dedektörlü (FID) gaz kromatografisi kullanılmıştır. Aroma maddelerinin ayrımı DB-WAX kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. . Enjektör sıcaklığı 220°C, dedektör sıcaklığı 250°C, kolon sıcaklığı ise 40°C'de 4 dakika beklemeden sonra, dakikada 2°C artarak 90°C'ye ve daha sonra dakikada 3°C artarak 130°C'ye, daha sonra dakikada 4°C artarak 240°C'ye çıkacak ve bu sıcaklıkta 12 dakika sabit kalacak şekilde programlanmıştır. Cihaza enjekte edilen miktar 3µl'dir. Taşıyıcı gaz olarak He kullanılmıştır. Helyumun akış hızı 3,3 mL/dk'dır. Enjektör tipi ve sıcaklık programı gaz kromatografisi ile aynı koşullardadır. Kütle spektrometresinin iyonlaşma enerjisi 70 eV, iyon kaynağı

sıcaklığı 250°C, kuadropol sıcaklığı 120 °C tutularak, 1 saniye aralıklarla 29-350 kütle/yük (m/e) arasında tarama yapılmaktadır.

Aroma maddelerinin tanısında yukarıda belirtilen gaz kromatografisine bağlı “Agilent 5975B VL MSD” marka kütle spektrometresi kullanılmıştır. Enjektör tipi ve sıcaklık programı gaz kromatografisi ile aynı koşullardadır. Kütle spektrometresinin iyonlaşma enerjisi 70 eV, iyon kaynağı sıcaklığı 250°C, kuadropol sıcaklığı 120 °C tutularak, 1 saniye aralıklarla 29-350 kütle/yük (m/e) arasında tarama yapılmıştır. Piklerin tanısı, standardı bulunan bileşikler için standart çözelti enjekte edilerek, standardı olmayan bileşikler için kütle spektrumunun bilgisayar hafızasındaki kütle spektrumlarıyla karşılaştırılması yoluyla yapılmıştır. Piklerin tanısından sonra aroma maddelerinin konsantrasyonları iç standart yöntemiyle hesaplanmıştır (Schneider ve ark, 1998; 2001).

Aroma Maddelerinin Miktarlarının Hesaplanması: Piklerin tanısından sonra aroma maddelerinin miktarlarını hesaplamak için, standart bileşiklerden kalibrasyon elde edilecek ve iç standart yöntemiyle aşağıdaki formül kullanılarak miktarlar hesaplanmıştır. Hesaplama her bir bileşiğin cevap faktörü dikkate alınmıştır.

$$C_i = (A_i/A_{st}) \times C_{st} \times RF \times HF$$

C_i : Bileşiğin konsantrasyonu

A_i : Bileşiğin pik alanı

A_{st} : İç standartın pik alanı

C_{st} : İç standartın konsantrasyonu (140 µg/100 mL)

RF : Cevap faktörü

HF : Hesaplama faktörü (örnek miktarının L'ye çevrilmesi için faktör : 10).

Asetaldehit ve Etil asetat analizi: Fermantasyon sonunda oluşan asetaldehit ve etil asetat analizinde, “Agilent 7980 A” marka alev iyonlaşma dedektörlü (FID) gaz kromatografisi kullanılmıştır. Bu bileşiklerin miktarlarını belirlemek için şarap 0.45 µm'lik filtreden geçirilmiş ve doğrudan GC-FID'a enjekte edilmiştir. Bileşiklerin alıkonma zamanları standart maddelerin tek tek

GC'ne enjekte edilmesi ile belirlenmiştir. 6 farklı konsantrasyondaki kalibrasyon çözeltileri gaz kromatografisine 3 kez tekrarlanarak enjekte edilmiştir. Kalibrasyon grafiklerinin değerlendirilmesiyle elde edilen veriler Çizelge 3.6' da verilmiştir Her bir bileşiğin konsantrasyonu, iç standartın alanına göre daha önce oluşturulan kalibrasyon denkleminde otomatik olarak hesaplanmıştır (Ortega ve ark, 2001; Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2011).

Çizelge 3.6. İkincil aroma maddelerinin kalibrasyon verileri

Bileşikler	Korelasyon (R ²)	Altkonma Zamanı (dk)	Doğrusal Kalibrasyon Denklemi
Asetaldehit	0.9993	5.569	$y = 0.416839 \cdot x + 0.0143703$
Etil asetat	0.9998	9.254	$y = 0.553063 \cdot x + 0.0147160$

Kullanılan GC/FID koşulları aşağıda verilmiştir.

GC/FID Koşulları

Enjeksiyon	: Split (1:50)
Dedektör	: FID
Kolon	: CP-WAX 57-CB (Chrompack, Hollanda) 60 m uzunluk, 0.25 mm iç çap ve 0.4 µm film kalınlığında fused silika kapiler kolon.
Enjeksiyon sıcaklığı	: 160°C
Dedektör sıcaklığı	: 180°C
Fırın sıcaklığı	: 40 °C'de 5 dk 40°C'den 102°C'ye 4°C/dk artış 102°C'den 112°C'ye 2°C/dk artış 112°C'den 125°C'ye 5°C/dk artış, 5 dk bekleme 125°C'den 160°C'ye 3°C/dk artış 160 °C'den 200°C'ye 6°C/dk artış, 5 dk bekleme
Taşıyıcı Gaz	: He (1.3 mL/dk)
Diğer gazlar	: Kuru hava (350 ml/dk), hidrojen (35 ml/dk)
Enjeksiyon miktarı	: 1µL

Gliserol analizi: Mayaların ürettiği gliserol miktarlarını belirlemek amacıyla Shimadzu LC-20AD model HPLC cihazı ile, dedektör olarak refraktif indeks dedektörü (RID), kolon olarak Bio-Rad HPX-87H (300 x 7.8 mm) marka

kolon kullanılmıştır. Taşıyıcı faz olarak 5 mM'lık sülfürik asit (H₂SO₄) çözeltisi kullanılmış ve akış hızı 0.5 mL/dak olarak ayarlanmıştır. Çalışmada kullanılan kolon fırın sıcaklığı 50°C' ye ayarlanmıştır. Gliserol konsantrasyonunun belirlenmesinde dış standart yönteminden yararlanılmıştır. Bu amaçla gliserol standartından 7 farklı konsantrasyonda kalibrasyon çözeltileri hazırlanmış, HPLC'e enjekte edilmiş ve elde edilen verilerden kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Bu eğriler kullanılarak örneklerdeki gliserol miktarları belirlenmiştir (Erten, 1998; Pickering ve ark., 1998; Cordier ve ark., 2007).

Gliserol miktarının belirlenmesinde kullanılan standart madde, bu maddeye ait genel veriler (molekül ağırlığı ve formül), alıkonma zamanı (RT), çalışılan konsantrasyon aralığı ve kullanılan denklemin R² değeri Çizelge 3.7' de görülmektedir.

Çizelge 3.8. Analizde kullanılan gliserolün genel verileri ve kalibrasyon denklemleri

Standart	Formül	MA (g/mol)	RT	Kons .aralığı (g/L)	R ²
Gliserol	C ₃ H ₈ O ₃	92.09	15.9	10-0.3	0.9995

3.2.5. Şıralarda Yapılan Analizler

3.2.5.1. Genel Analizler

Şırada, yoğunluk, toplam asitlik, pH, indirgen şeker analizleri, esmerleşme indisi (Ough ve Amerine, 1988; Anon, 2005) yapılmıştır.

3.2.5.2. Şeker Analizleri

Şıraların şeker dağılımını, konsantrasyonlarını ve mayaların fermantasyon sonunda ortamda bıraktıkları kalıntı şeker miktarlarını belirlemek amacıyla Shimadzu marka LC-20AD model HPLC cihazı, dedektör olarak refraktif indeks dedektörü (RID), kolon olarak Bio-Rad HPX-87H (300 x 7.8 mm) marka kolon

kullanılmıştır. Şeker analizinde kullanılan taşıyıcı faz, analiz koşulları yukarıda (gliserol analizinde) belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Erten, 1998; Pickering ve ark. 1998; Cordier ve ark. 2007).

Glukoz ve fruktoz miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart maddeler, bu maddelere ait genel veriler (molekül ağırlığı ve formülleri), standartların alıkonma zamanları (RT), çalışılan konsantrasyon aralığı ve kullanılan denklemlerin R^2 değerleri Çizelge 3.8’ de görülmektedir.

Çizelge 3.9. Analizde kullanılan şekerlerin genel verileri ve kalibrasyon denklemleri

Standart	Formül	MA (g/mol)	RT	Kons. aralığı (g/L)	R^2
Glukoz	$C_6H_{12}O_6$	180.16	10.8	5.0-0.15	0.9995
Fruktoz	$C_6H_{12}O_6$	180.16	11.8	5.0-0.15	0.9996

3.2.6. İstatistiksel Analizler

Çalışmada mayaların sekans sonuçları MEGA6 istatistik programı ile değerlendirilmiştir (Tamura ve ark., 2013). İzole edilen mayaların fermantasyon hızı, uçur asit oluşturma gücü, ürettikleri gliserol ve aroma maddeleri ile ilgili verilere varyans analizi uygulanmış ve önemli bulunan farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca aroma maddelerine temel bileşen analizi (Principle Components Analysis, PCA) uygulanmıştır. Varyans analizlerinde SPSS 20 (IBM), PCA analizlerinde XLSTAT (Addinsoft, New York, ABD) paket programları kullanılmıştır (Lawless ve Heyman, 2010).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Şıraların genel bileşimi

Tokat ve Nevşehir yörelerinden 2014 ve 2015 bağbozumu yıllarında Narince üzümlerinden elde edilen şıraların genel bileşimi Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. 2014 ve 2015 yıllarında Tokat ve Nevşehir yörelerinden elde edilen Narince şıralarının genel bileşimi

<i>Genel Analizler</i>	Tokat		Nevşehir		F_x	F_y
	2014	2015	2014	2015		
Yoğunluk (g/cm ³ , 20°C)	1.096±0.0	1.087±0.0	1.103±0.0	1.103±0.0	*	*
SÇKM (Biriks°)	22.8±0.2	20.0±0.3	24.0±0.2	23.8±0.1	*	*
pH	3.5±0.1	3.2±0.0	2.8±0.0	3.3±0.0	*	öd
Toplam asitlik (g/L) ^a	4.1±0.0	5.4±0.0	4.8±0.0	5.6±0.0	*	*
İndirgen şeker (g/L)	254.6±1.0	226.0±2	268.8±0.4	268.2±1.7	*	*
Esmerleşme indisi (OY ₄₂₀)	0.07±0.0	0.06±0.0	0.04±0.0	0.04±0.0	*	*
Şekerler (g/L)					*	*
Glukoz	128.2±1.7	113.9±1.4	135.6±0.4	135.0±1.4	*	*
Fruktoz	125.2±1.7	111.8±2.0	131.9±0.4	132.2±2.0	*	*

^aTartarik asit cinsinden, F_x : varyans analizine göre yörenin etkisi, F_y : varyans analizine göre yılın etkisi, * p<0.05, öd : önemli değil

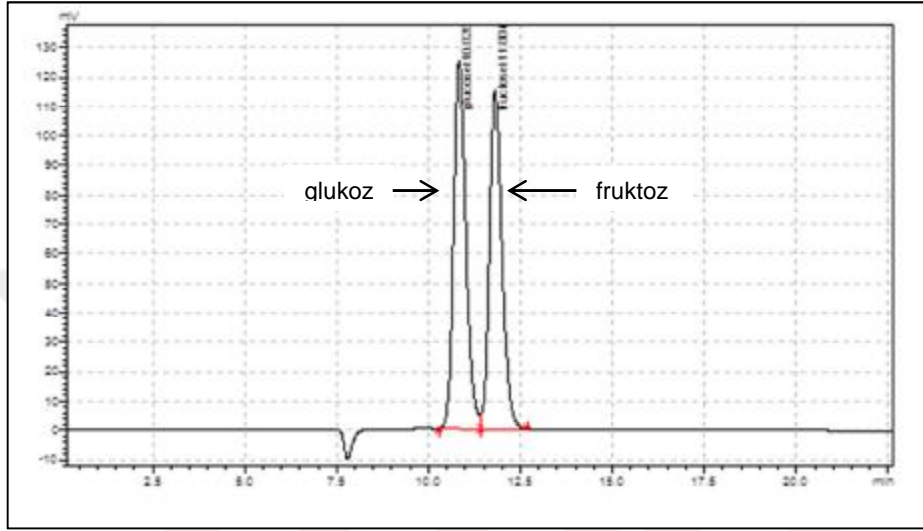
2014 ve 2015 yıllarında Tokat yöresinden elde edilen üzüm şıralarının suda çözünür kuru madde (SÇKM) miktarları sırasıyla 22.8 ile 20.0 briks değerlerinde bulunmuş, indirgen şeker miktarları ise 254.6 g/L ve 226.0 g/L bulunmuştur. Kalite beyaz şaraba işlenecek üzümlerde bağbozumu için önerilen olgunluk düzeyinin 19.5-23.0 briks arasında olması gerektiği bildirilmiştir (Boidron ve ark., 1978). Bu değerlere göre Tokat yöresine ait Narince şıralarının briks değerleri bakımından uygun olduğu belirlenmiştir. 2014 yılında elde edilen şıranın şeker içeriği 2015 yılına göre daha yüksek bulunmuştur. Şıraların toplam asit değerleri

tartarik asit cinsinden sırasıyla 4.1 ve 5.4 g/L, pH değerleri ise sırasıyla 3.5 ve 3.2 bulunmuştur. Toplam asit miktarı olgunlaşmamış üzüm ve şıralarda 15 g/L'yi bulabilir. Normal şartlar altında miktarı sıklıkla 6 g/L civarındadır. Fakat sıcaklığın yüksek olduğu güney bölgelerde 2-3g/L gibi düşük değerlerde de bulunabilir (Ribéreau-Gayon, 2006b). Şıraların esmerleşme potansiyeli OY₄₂₀ indisi ile belirlenmiştir. Yüksek OY indisi esmerleşmenin arttığını göstermektedir. Bu değer 2014 yılı sırasında 0.07, 2015 yılı sırasında 0.06 olarak belirlenmiştir. Üzümlerde şeker miktarının en fazla glikoz ve fruktoz olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). 2014 ve 2015 yıllarında Tokat yöresinden elde edilen şıralarda glikoz miktarı sırasıyla 128.2 g/L ve 113.9 g/L, fruktoz miktarı ise 125.2 g/L ve 111.8 g/L bulunmuştur. Yıllara bağlı olarak değişmekle birlikte şaraplık üzümlerde toplam glikoz ve fruktoz miktarı yaklaşık olarak 150-250 g/L arasında bulunur (Ribéreau-Gayon ve ark., 2006b). Tokat yöresi Narince şıralarında glukoz ve fruktozun toplam miktarı bu değerler arasında bulunmuştur.

2014 ve 2015 yıllarında Nevşehir yöresinden elde edilen şıraların SÇKM miktarları sırasıyla 24.0 ile 23.8 briks değerlerinde bulunmuş, indirgen şeker her iki yılda da birbirine çok yakın değerlerde, sırasıyla 268.8 g/L ve 268.2 g/L bulunmuştur. Nevşehir yöresi Narince şıralarının briks değerleri literatürde verilen (Boidron ve ark., 1978) değerlerin üzerinde bulunmuştur. Şıraların toplam asit değerleri sırasıyla 4.8 g/L ile 5.63 g/L, pH değerleri ise sırasıyla 2.8 ile 3.33 bulunmuştur. Neşvehir yöresinden elde edilen şıraların OY indisi ise her iki yılda da 0.04 bulunmuştur. 2014 ve 2015 yıllarında Nevşehir yöresinden elde edilen şıralarda glikoz miktarı sırasıyla 135.6 g/L ve 135.0 g/L, fruktoz miktarı ise 131.9 g/L ve 132.2 g/L bulunmuştur (Şekil 4.1). Nevşehir yöresi Narince şıralarında bulunan glukoz ve fruktozun toplam miktarı literatürde verilen (Ribéreau-Gayon ve ark., 2006b) değerlerin üzerinde bulunmuştur.

Şıraların yoğunluk, SÇKM, indirgen şeker, toplam asitlik, glukoz ve fruktoz miktarları her iki yılda da Neşvehir yöresinde Tokat yöresine göre daha yüksek bulunmuş ve yörenin ve yılın (pH hariç) etkisi istatistiksel açıdan önemli

($p < 0.05$) bulunmuştur. Ancak aynı zamanda şıraların genel bileşimleri üzerine yöre ve yıl etkisi olduğu gözlemlenmiştir.



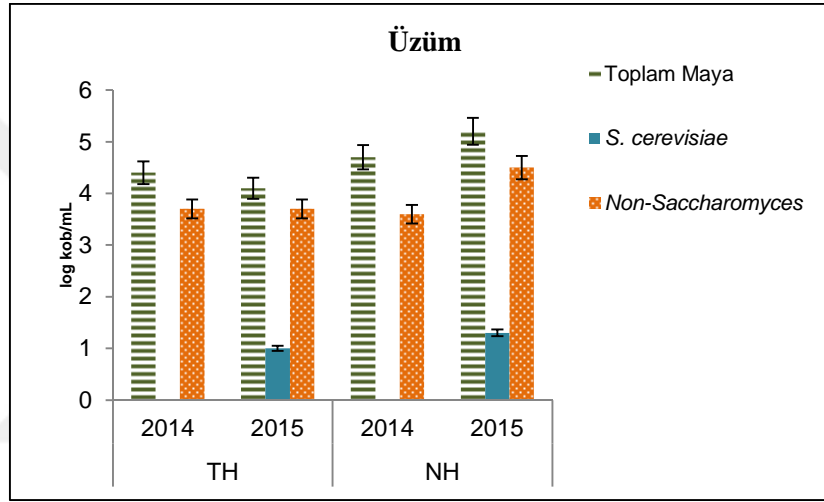
Şekil 4.1. Narince şırasında belirlenen şekerlere ait HPLC kromatogramı

4.2. Fermantasyon Sırasındaki Maya Florası

Tokat ve Nevşehir yörelerine ait üzümde ve fermantasyon süresince toplam maya, *S. cerevisiae* türü maya ve *Saccharomyces* spp. cinsi olmayan mayaların sayımları yapılmıştır. Denemeler sırasında alkol fermantasyonunun başında birinci örnekleme ve ekim, fermantasyon ortasında ikinci örnekleme ve ekim (F2) ve son olarak fermantasyon sonunda ise üçüncü örnekleme ve ekimler (F3) yapılmıştır. Üzümlerde ve fermantasyon sırasında şıralardaki mikrobiyolojik değişimler Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

Toplam maya sayısı, *Saccharomyces* cinsine giren ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sayısını gösterir. Tokat yöresinden elde edilen 2014 ve 2015 yıllarına ait Narince üzümde toplam maya sayısı sırasıyla 4.4 log kob/mL ile 4.1 log kob/mL, *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar ise iki yılda da 3.7 log kob/mL bulunmuştur. 2014 yılı üzümde *S. cerevisiae* mayaları

sayılamamışken 2015 yılı üzümünde 1 log kob/mL bulunmuştur. Neşehir yöresine ait 2015 yılı Narince üzümünde ise toplam maya sayısı sırasıyla 4.7 log kob/mL ile 5.2 log kob/mL, *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların toplam sayısı 3.6 log kob/mL ile 4.5 log kob/mL bulunmuştur. 2014 yılı üzümünde *S. cerevisiae* mayaları sayılamamışken 2015 yılı üzümünde 1.3 log kob/mL bulunmuştur (Şekil 4.2).

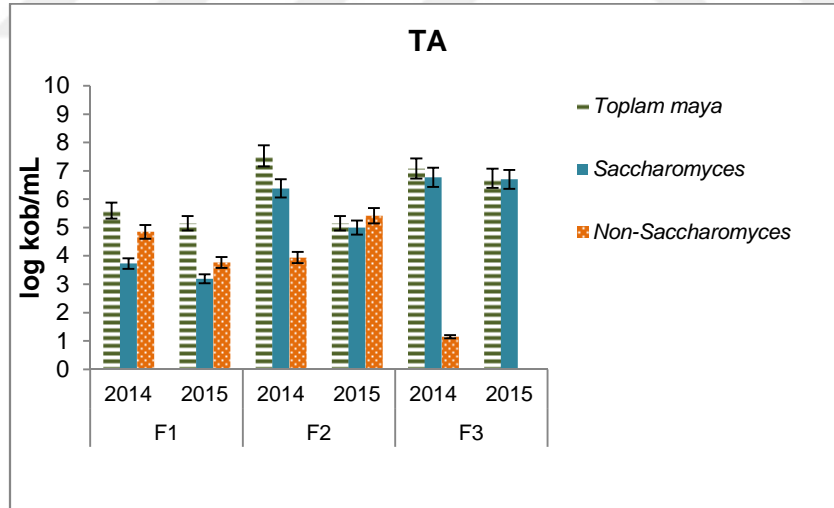


Şekil 4.2. 2014 ve 2015 yıllarına ait Narince üzümündeki toplam maya sayıları

Sağlıklı bir üzüm tanesinde bağbozumundan hemen önce Toplam maya popülasyonu 10^3 - 10^5 kob/mL'dir (Fleet ve Heard, 1993). Tokat ve Nevşehir yörelerine ait üzümde maya popülasyonu 10^3 ile 10^5 kob/mL arasında bulunmuştur. 2014 yılı Tokat ve Nevşehir yörelerine ait üzümde toplam maya sayısı ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sayısı birbirine yakın değerlerde bulunmuştur. 2014 yılında *S. cerevisiae* cinsi her iki yöreye ait üzümde de belirlenememiştir. 2015 yılında ise toplam maya, *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların toplam sayısı Nevşehir bölgesi üzümünde daha yüksek bulunmuştur. Üzümdeki maya çeşidini ve popülasyonunu etkileyen birçok etken vardır. Bunlar; bağın coğrafi konumu, toprak çeşidi, bağın yaşı, üzüm çeşidi,

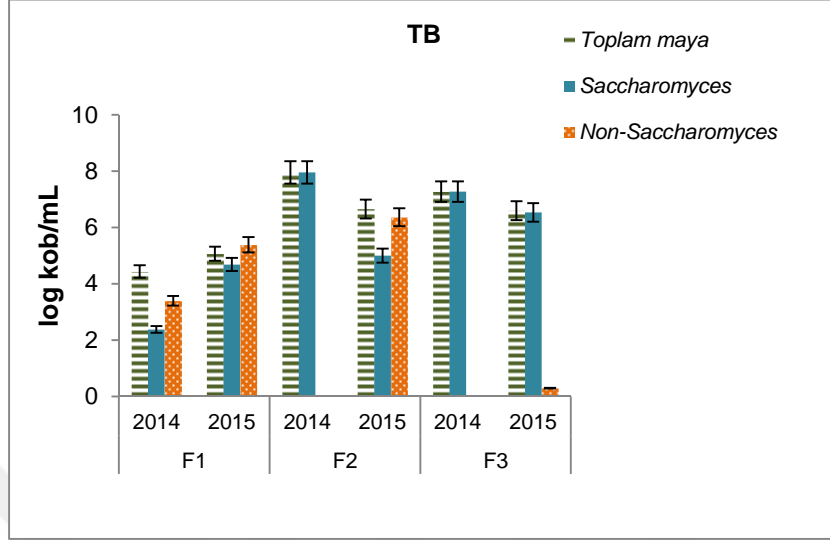
asmanın olgunlaşması sırasındaki iklim koşulları, bağbozumunda kullanılan yöntemler, pestisit kullanımı, bağbozumu sırasında üzümün olgunluk durumu, böcek, maya ve kuşların verdiği fiziksel zararlarıdır (Beltran ve ark., 2002; Ribéreau-Gayon ve ark., 2006a; Fransesca ve ark., 2010).

Tokat yöresi Narince üzümünün 2014 ve 2015 yılları fermantasyon denemeleri sırasında yapılan ekimlerde fermantasyon başında (F1) TA ve TB denemelerinde toplam maya sayısı 4.44 log kob/mL ile 5.6 log kob/mL değerleri arasında, *S. cerevisiae* türü mayaların sayısı 2.38 log kob/mL ile 4.69 log kob/mL değerleri arasında, *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sayısı ise 3.4 log kob/mL ile 5.39 log kob/mL değerleri arasında bulunmuştur (Şekil 4.3, Şekil 4.4) Fermantasyon ilerledikçe toplam maya ve *S. cerevisiae* türü mayaların sayısı artmış ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sayısı 2014 yılında fermantasyon ortasında ve sonunda azalırken 2015 yılında fermantasyon ortasında artmış ve fermantasyon sonunda belirlenememiştir.



Şekil 4.3 Tokat yöresi tortu alma işlemi uygulanmamış denemeye ait maya popülasyonu

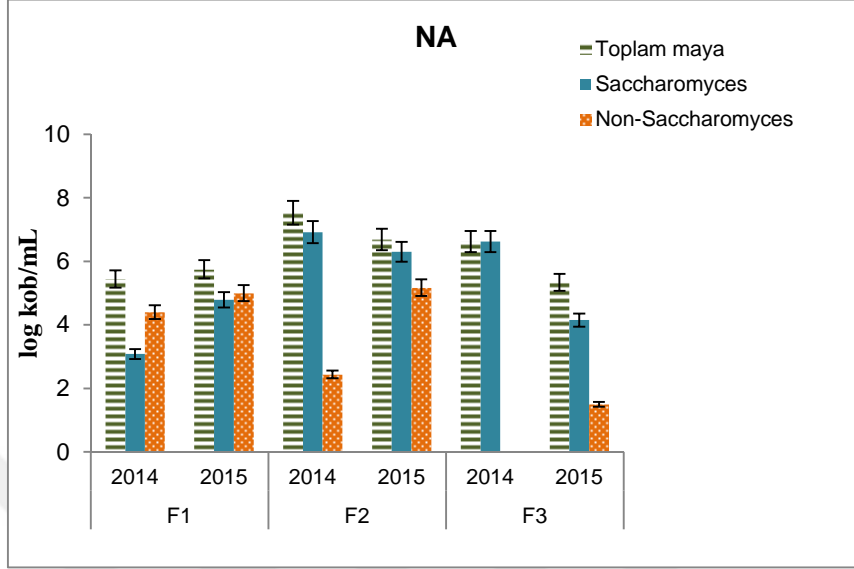
TA: tortu alma işlemi uygulanmamış deneme; F1: fermantasyon başı; F2: fermantasyon ortası; F3: fermantasyon sonu



Şekil 4.4. Tokat yöresi tortu alma işlemi uygulanmış denemeye ait maya popülasyonu

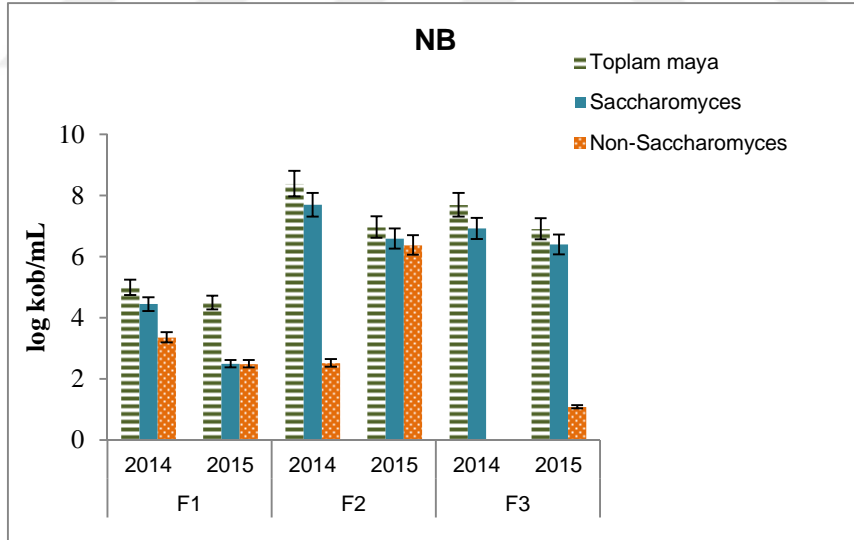
TB: tortu alma işlemi uygulanmış olan deneme; F1: fermantasyon başı; F2: fermantasyon ortası; F3: fermantasyon sonu

Nevşehir yöresi Narince üzümünün 2014 ve 2015 yılları fermantasyonu sırasında yapılan ekimlerde fermantasyon başında NA ve NB denemelerinde toplam maya sayısı 4.5 log kob/mL ile 5.75 log kob/mL değerleri arasında, *S. cerevisiae* türü mayaların sayısı 6.69 log kob/mL ile 8.39 log kob/mL değerleri arasında, *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sayısı ise 2.5 log kob/mL ile 5 log kob/mL değerleri arasında bulunmuştur. Fermantasyon ilerledikçe toplam maya ve *S. cerevisiae* maya sayıları artmış ve 2015 yılı hariç *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sayısı fermantasyon ortasında ve sonunda azalmıştır (Şekil 4.5, Şekil 4.6)



Şekil 4.5. Nevşehir yöresi tortu alma işlemi uygulanmamış denemeye ait maya popülasyonu

NA: tortu alma işlemi uygulanmamış deneme; F1: fermantasyon başı; F2: fermantasyon ortası; F3: fermantasyon sonu



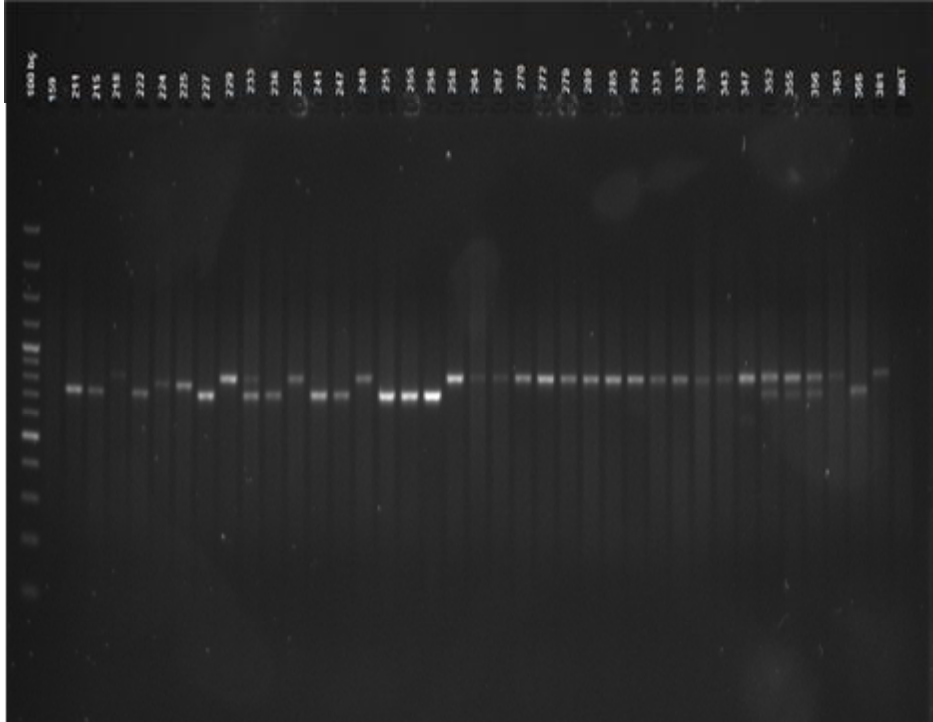
Şekil 4.6. Nevşehir yöresi tortu alma işlemi uygulanmış denemeye ait maya popülasyonu

NB: tortu alma işlemi uygulanmış olan deneme; F1: fermantasyon başı; F2: fermantasyon ortası; F3: fermantasyon sonu

Her iki yörede fermantasyon başındaki toplam maya popülasyonu tortu alma işlemi uygulanan denemelerde (TB, NB) tortu alma işlemi uygulanmayan (TA, NA) denemelere göre düşük bulunmuştur. Şarap üretiminde tortu alma işleminden sonra şıradaki maya popülasyonunun önemli derecede düştüğü ve 10^4 ile 10^5 kob/mL'yi geçmediği bildirilmiştir (Ribéreau-Gayon ve ark., 2006a). Her iki yöre karşılaştırıldığında fermantasyonun başında toplam maya popülasyonu en çok NA denemesinde bulunmuştur. Fermantasyon ortasında *S. cerevisiae* cinsi maya popülasyonu artmış ve bu artış en çok NB denemesinde olmuş bunu sırasıyla NA denemesi takip etmiştir. Fermantasyon sonunda ise TA ve TB denemeler hariç bütün denemelerde popülasyon azalmıştır. *S. cerevisiae* üzümde yaygın olarak bulunmamasına rağmen, fermantasyonun ilerleyen aşamalarında yüksek etanol toleransı nedeniyle ortama hakim olur (Esteve-Zarzoso ve ark, 2000). *Saccharomyces* spp. cinsi dışındaki mayalar ise fermantasyon başında *S. cerevisiae* 'ya göre daha yoğun bulunmuş, fermantasyon ortasında popülasyon TB 2014, NA ve NB 2014 denemeleri hariç artmıştır. Fermantasyon sonunda ise bütün denemelerde düşmüş ve yine TB 2014, TA 2015 ile NA ve NB 2014 denemelerinde sayılamamışlardır. Fermantasyon sırasında *Saccharomyces* spp. dışındaki mayaların popülasyonu ortam şartlarına göre 10^6 - 10^7 kob/mL'ye çıkabilir (Romano ve ark. 2003). Şarabın fermantasyonu, üzümde ve şaraphane ortamında doğal olarak bulunan birçok maya türünün dahil olduğu kompleks bir mikrobiyal prosestir. Fermantasyonu alkol toleransı düşük olan zayıf fermentatif özellikteki *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspota* ve *Hansenula* türlerinde ait *Saccharomyces* spp. dışındaki mayalar başlatırlar (Esteve-Zarzoso ve ark., 2000). Narince şaraplarının spontan fermantasyonu sırasında, fermantasyon başında *Saccharomyces* spp. cinsi dışındaki mayaların sayısı yüksek bulunmuş, fermantasyon sonuna doğru ise *Saccharomyces* spp. cinsi mayalar ortama hakim olmaya başlamıştır.

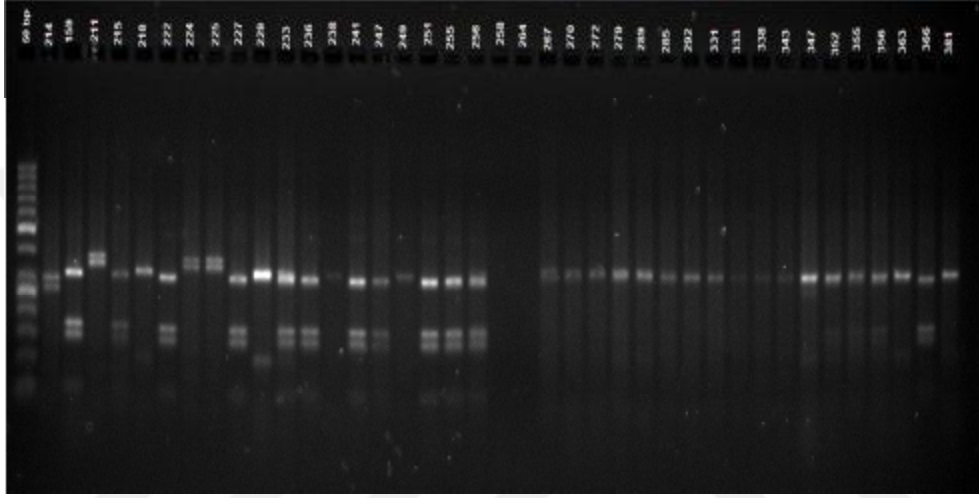
4.3. Maya İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

Tokat ve Nevşehir Yörelerinden, her iki yılda toplamda 850 adet maya izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. İzole edilip saflaştırılan mayalar YPD agardaki koloni özelliklerine göre gruplandırılmış ve her gruptan en az 2 izolat olacak şekilde 300 adet izolat genetik yöntemlerle tanımlamaları yapılmak üzere seçilmişlerdir. Mayaların moleküler yöntemle tanımlanması 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, 5.8 ITS rRNA bölgesi ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak PZR'da çoğaltılmıştır (Şekil 4.7), ikinci aşamada 5.8S ITS PZR ile çoğaltılan DNA, restriksiyon enzimleriyle (*HhaI*, *Hae III* ve *HinfI*) kesilmiştir (Şekil 4.8, 4.9, 4.10). Restriksiyon enzim sonuçlarına göre izolatlar tekrar gruplandırılmış ve her gruptan en az iki örnek olacak şekilde seçilen 103 adet izolatın 26S rRNA bölgeleri PZR'da çoğaltılmış (Şekil 4.11) ve sekansa gönderilmiştir.

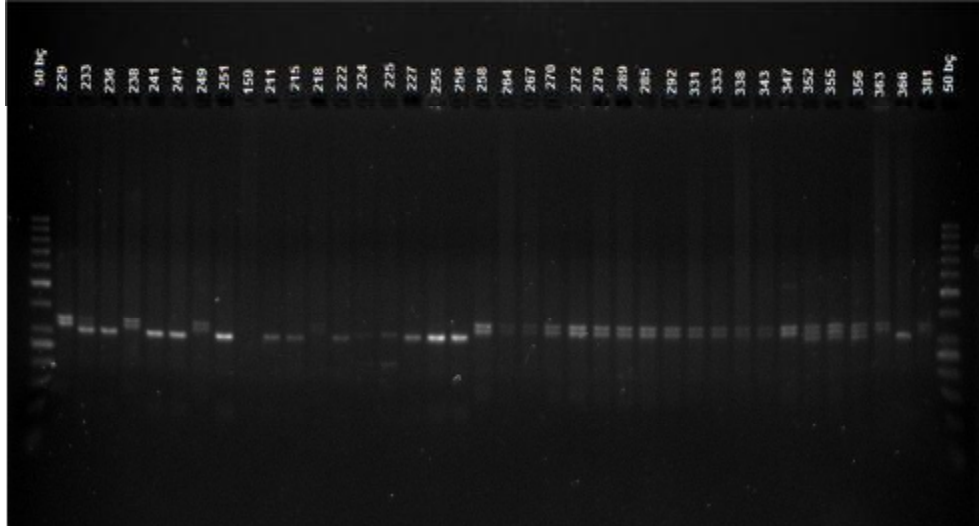


Şekil 4.7. Mayaların 5.8S rRNA bölgelerinin ITS primerleri kullanılarak çoğaltılması sonucu elde edilen jel görüntüsü

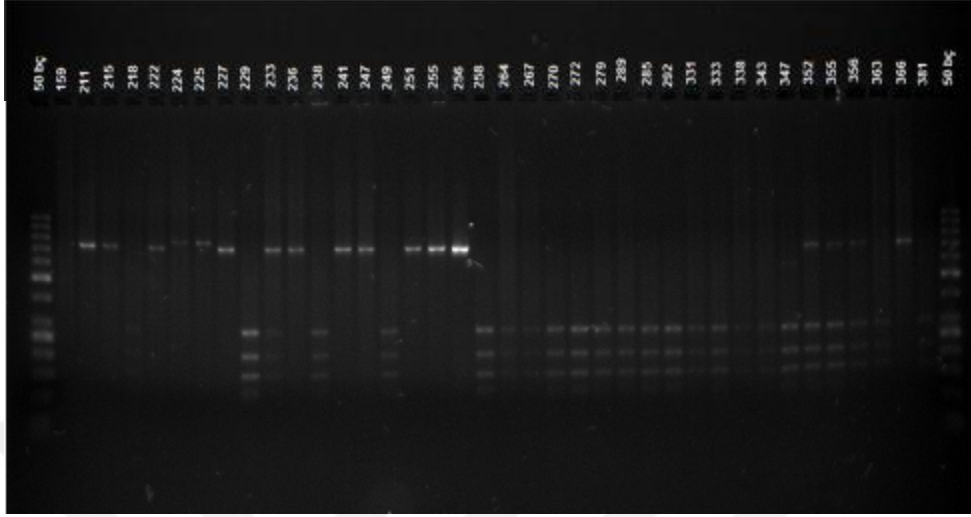
Farklı restriksiyon enzimleri kesimi sonucu yakın restriksiyon fragmanı veren izolatlar aynı gruba alınmış (Çizelge 4.2) ve gruplandırmaların doğruluğunu kesinleştirmek amacıyla her gruba ait PZR ürünleri kendi arasında tekrar agaroz jelde koşulmuştur.



Şekil 4.8. HinFI restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görünümü



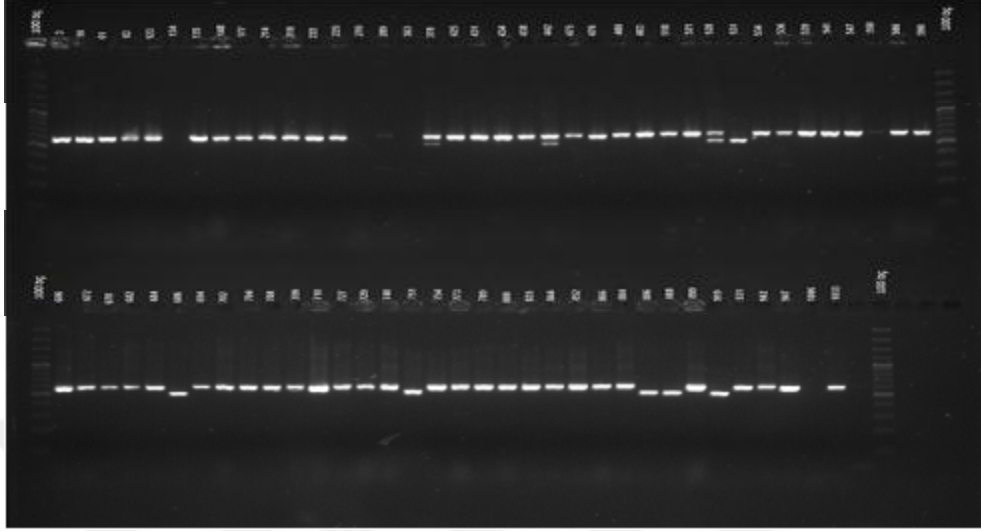
Şekil 4.9. HhaI restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görünümü



Şekil 4.10. HaeIII restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görünümü

Çizelge 4.2. Mayaların RFLP enzimleri ile kesilmeleri sonucu gruplandırılması

Maya Türü	ITS boyutu	HhaI	Hinf	HaeIII
<i>S. cerevisiae</i>	850	150+325+375	110+365+375	125+170+230+325
<i>S. paradoxus</i>	850	150+325+375	110+365+375	125+170+230+325
<i>T.delbrueckii</i>	800	100+150+220+330	380+410	800
<i>H'spora guilliermondii</i>	750	105+320+340	160+200+360	750
<i>H'spora uvarum</i>	750	160+200+370	100+320+340	750
<i>I. orientalis</i>	500	6+52+69+179+204	137+154+219	38+90+382
<i>I. terricola</i>	450	45+85+90+100+130	105+105+240	125+290
<i>L. thermotolerans</i>	700	95+285+315	345+355	90+90+215+310
<i>W. anomalus</i>	620	50+560	300+310	620
<i>C. zemplinia</i>	460	56+103+105+196	225+235	460
<i>P. kluyveri</i>	450	80+115+175	200+250	80+370
<i>P. occidentalis</i>	400	250+110+80	400+100	225+150+125
<i>Metschnikowia</i> sp.	400	250+100+95	175+100	200+190



Şekil 4.11. 26S rRNA PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görünüşleri

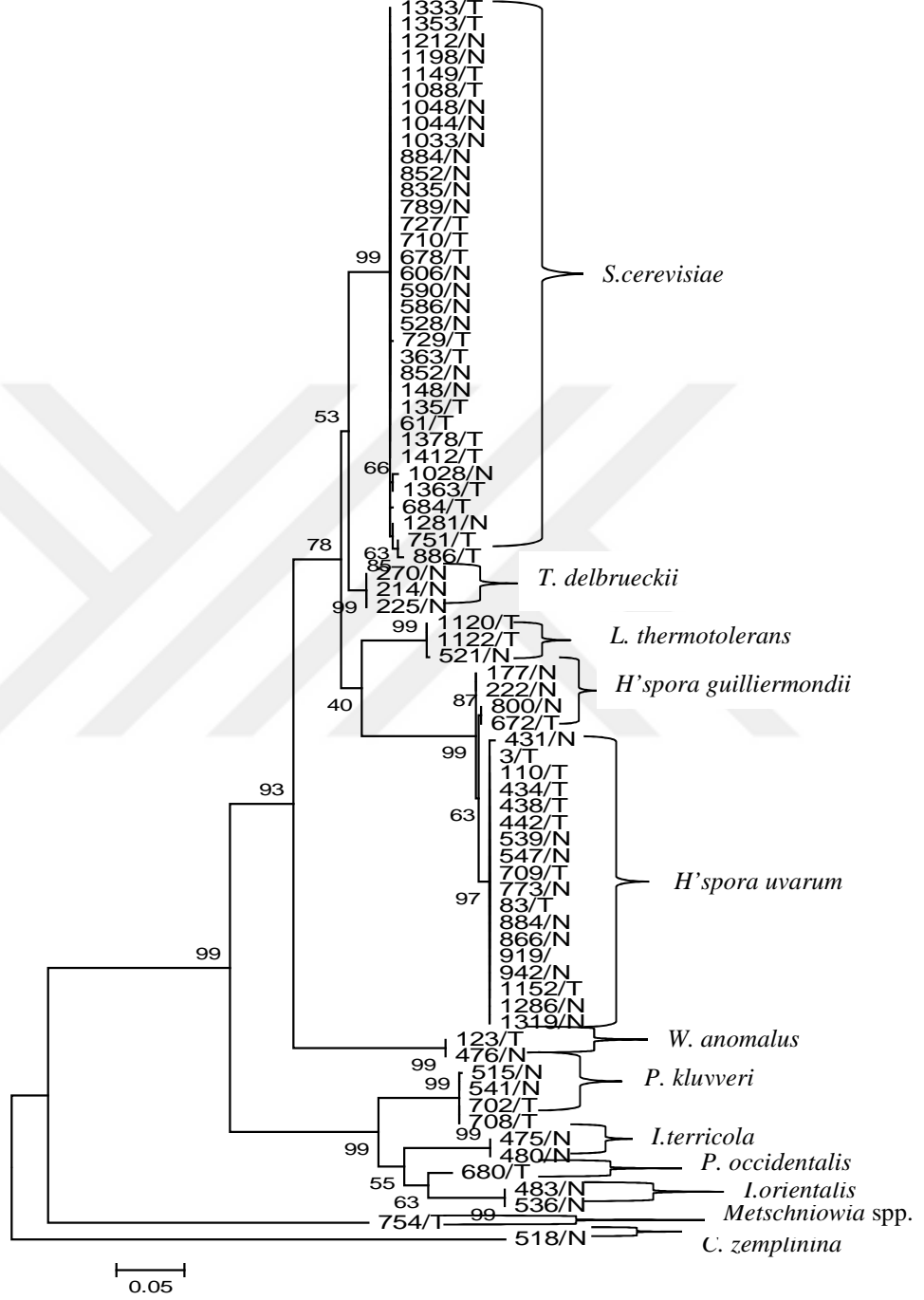
DNA dizi analizi sonucuna göre %97 ve üzeri benzerlik gösteren mayaların listesi, izolasyon kaynağı, örnekleme zamanı, hangi besiyerinden izole edildiği ve 26S rRNA sonuçlarına göre hangi maya türü ile benzerlik gösterdiği EK 1. ve EK 2’de verilmiştir.

Sekans sonuçları BLAST programı kullanılarak değerlendirilmiş ve BLAST sonuçlarına göre 141 adet *S. cerevisiae* ve 124 adet non-*Saccharomyces* olmak üzere 265 adet izolat maya olarak tanımlanmıştır. 2014 yılında 76 adet maya izole edilmiş ve bunların 10 tanesi üzümünden, 66 tanesi ise fermantasyon ortamından elde edilmiştir. Üzümünden izole edilen mayaların 9 tanesi Tokat Yöresinden 1 tanesi Nevşehir yöresinden izole edilirken, fermantasyon ortamında izole edilen mayaların 37 tanesi Tokat Yöresinden, 29 tanesi ise Nevşehir Yöresinden izole edilmiştir. 2015 yılında ise 189 adet maya izole edilmiş ve bunların 6 tanesi üzümlerden geriye kalan 183 tanesi ise fermantasyon ortamından izole edilmiştir. Üzümünden izole edilen mayaların 2 tanesi Tokat Yöresinden, 4 tanesi Nevşehir Yöresinden izole edilirken, fermantasyon ortamında izole edilen

183 mayanın 79 tanesi Tokat Yöresinden 104 tanesi ise Nevşehir Yöresinden izole edilmiştir.

4.3.1. Filogenetik Analizlerle Oluşan Maya Türleri

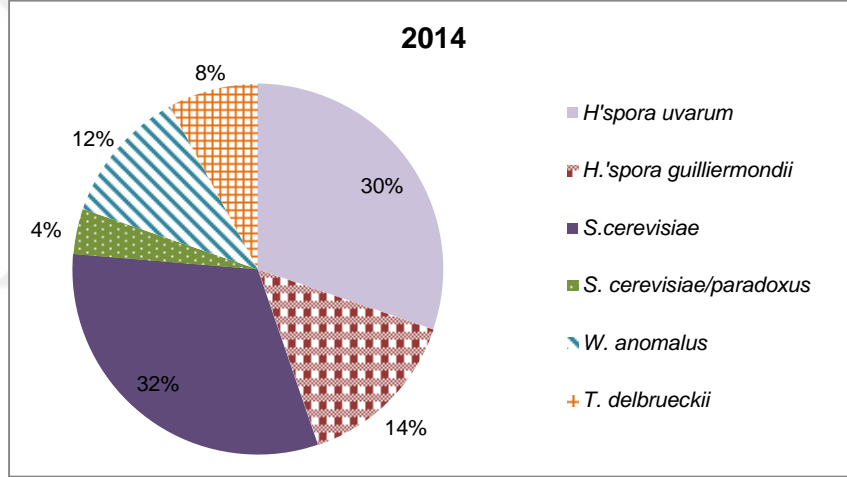
Maya izolatlarının 26S rRNA gen bölgelerinin dizi analizi sonucunda elde edilen filogenetik kümeleme analizine göre (Şekil 4.12), *S. cerevisiae* izolatları 36 örnekle temsil edilmiş ve 26S rRNA gen bölgesi için 99 Bootstrap almıştır. *S. cerevisiae* izolatları kendi içerisinde üç alt guruba ayrılmışlardır. *T. delbrueckii*, izolatları 99 Bootstrap almıştır. *Hanseniaspora* türleri 99 Bootstrap almıştır ve - *H'spora guilliermondii*, *H'spora uvarum* türlerinden ayrılmışlardır. *H'spora uvarum* türleri 97 Bootstrap, *H'spora guilliermondii* ise %87 Bootstrap almıştır. *L. thermotolerans* % 100 Bootstrap almıştır. *W. anomalus* türleri 99 Bootstrap almışlardır. *Pichia* ve *Issatchenkia*' ya ait türler aynı orjinli olup 99 Bootstrap almışlardır. *P. kluyveri* türleri diğerlerinden ayrılmış ve 99 Bootstrap almışlardır. *I. terricola*, ve *I. orientalis* ise yine 99 Bootstrap almışlardır. *P. occidentalis* türünden yalnızca bir tane izole edildiği için Bootstrap alamamıştır. *C. zemplinina* ve *Metchnikowia* sp. türleri diğer türlerden tamamen ayrılmış ve birer tane izole edildikleri için Bootstrap alamamışlardır. Maximum Likelihood analizine göre izole edilen maya türlerinin çoğu % 70'in üzerinde Bootstrap alarak birbirlerinden ayrılmışlardır. Bu da tespit edilen türlerin güvenilir bir şekilde ayrıldığını göstermektedir.



Şekil 4.12. Maximum Likelihood ile oluşturulan filogenetik ağaç

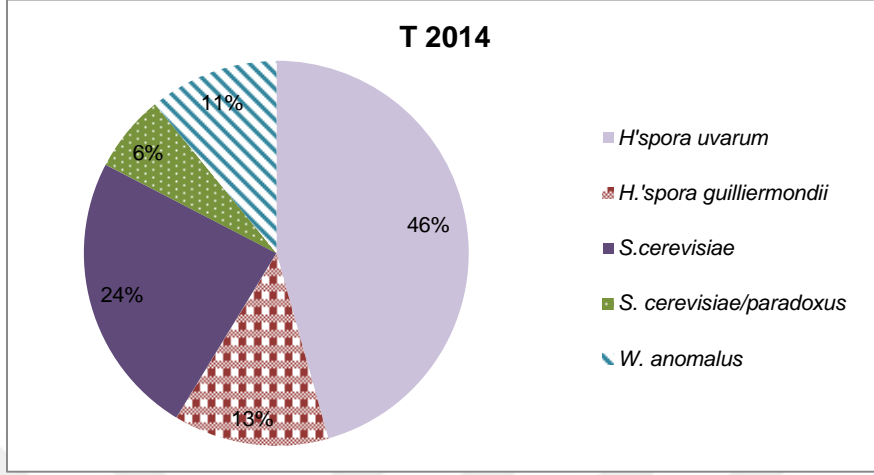
4.3.2. 2014 Yılında Tokat ve Nevşehir Yörelerinden İzole Edilen Mayaların Dağılımı

2014 yılında Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen mayaların dağılımı Şekil 4.13' te verilmiştir. 2014 yılında *H'spora uvarum*, *H'spora guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae/paradoxus*, *T. delbrueckii*, *I. orientalis* ve *W. anomalus* olmak üzere 4 cinse ait 6 tür belirlenmiştir ve en fazla izole edilen tür *S. cerevisiae* olmuş ve bunu sırasıyla *H'spora uvarum*, *H'spora guilliermondii*, *W. anomalus*, *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae/paradoxus* ve *I. orientalis* türleri takip etmiştir.



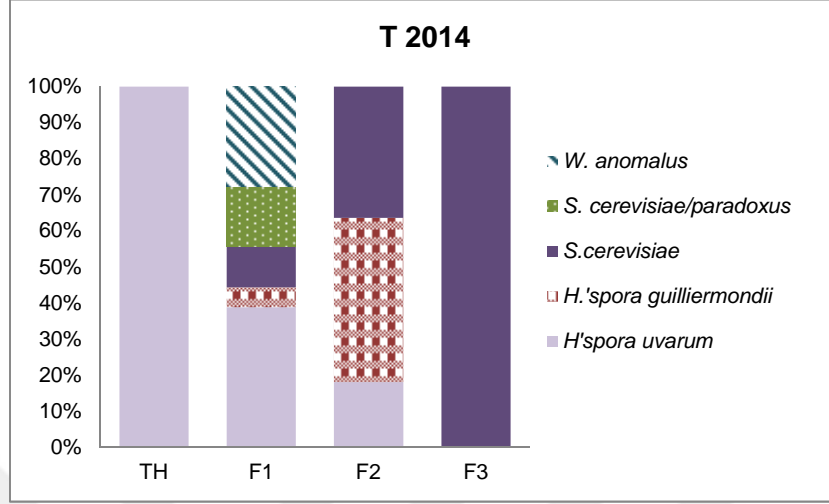
Şekil 4.13. 26S rRNA analizine göre 2014 yılında Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen mayaların tür düzeyindeki dağılımı

2014 yılında Tokat yöresinden izole edilen mayaların genel dağılımı Şekil 4.14' de verilmiştir. 2014 yılı Tokat yöresinden en fazla izole edilen tür *H'spora uvarum* olmuş ve bunu sırasıyla *S. cerevisiae*, *H'spora guilliermondii*, *W. anomalus* ve *S. cerevisiae/paradoxus* türleri takip etmiştir.



Şekil 4.14. 2014 yılında Tokat yöresinden izole edilen mayaların tür düzeyinde dağılımı

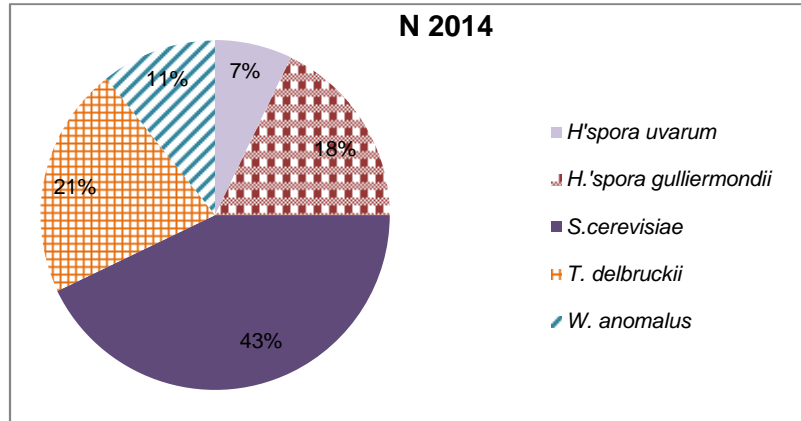
Üzümlerden ve alkol fermantasyonu sırasında ortamdaki izole edilen mayaların tür düzeyindeki dağılımları ise Şekil 4.15' te verilmiştir. Tokat yöresi üzümlerinde yalnızca *H'spora uvarum* izole edilmiştir. Fermantasyon denemeleri sırasında, fermantasyon başında (F1) *H'spora uvarum*, *W. anomalus*, *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae/paradoxus*, *H'spora guilliermondii* izole edilmiş ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların baskın olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon ortasında (F2), *S. cerevisiae*, *H'spora guilliermondii* *H'spora uvarum* izole edilmiştir. Fermantasyon ortasında izole edilen *H'spora guilliermondii* ve *S. cerevisiae* sayıları artmış, ve *H'spora uvarum*' un ise azalmıştır. Fermantasyon sonunda (F3) ise ortamda yalnızca *S. cerevisiae* belirlenmiştir.



Şekil 4.15. 2014 yılında Tokat yöresi üzümlerinden ve fermantasyon denemeleri sırasında izole edilen mayaların dağılımı

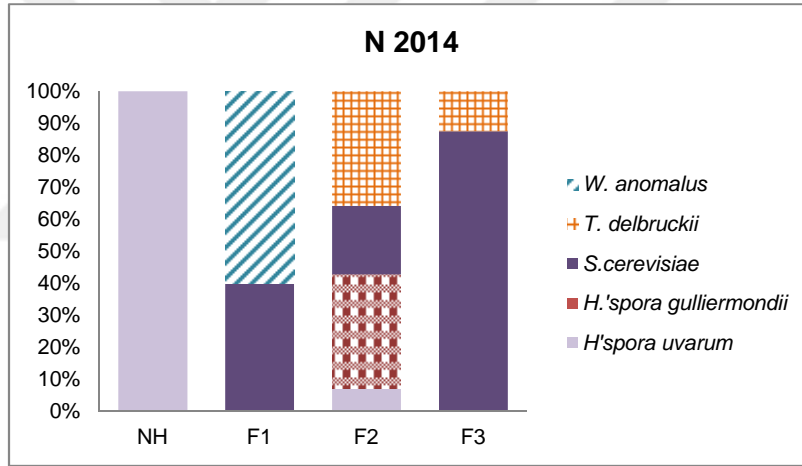
TH: Üzüm; F1: fermantasyon başı; F2: fermantasyon ortası; F3: fermantasyon sonu

2014 yılında Nevşehir yöresinden izole edilen mayaların genel dağılımı Şekil 4.16'da, verilmiştir. 2014 yılı Nevşehir yöresi Narince üzümlerinden ve alkol fermantasyonu sırasında ortamdaki en fazla izole edilen tür *S. cerevisiae* olmuş ve bunu sırasıyla *T. delbrueckii*, *H'spora guilliermondii*, *W. anomalus* ve *H'spora uvarum* ve *I. orientalis* takip etmiştir.



Şekil 4.16. 2014 yılında Nevşehir yöresinden izole edilen mayaların tür düzeyinde dağılımı

Nevşehir yöresi Narince üzümünden ve alkol fermantasyonu sırasında ortamdan izole edilen mayaların tür düzeyindeki dağılımları ise Şekil 4.17’ de verilmiştir. 2014 yılında Nevşehir yöresi üzümünde de yalnızca *H'spora uvarum* izole edilmiştir. Nevşehir yöresi Narince şıralarının fermantasyonu sırasında, fermantasyon başında (F1) *W. anomalus*, *S. cerevisiae* izole edilmiş, fermantasyon ortasında (F2), *S. cerevisiae*'nin yanında *H'spora guilliermondii*, *T. delbrueckii*, *H'spora uvarum* türleri izole edilmiştir. Fermantasyon başında ve ortasında *Saccharomyces* spp. olmayan türler ortama hakim olmuştur. Fermantasyon sonunda (F3) *S.cerevisiae* ortama hakim olmuş ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayalardan yalnızca *T. delbrueckii* izole edilmiştir.



Şekil 4.17. 2014 yılında Nevşehir yöresi üzümünden ve fermantasyon denemeleri sırasında izole edilen mayaların dağılımı

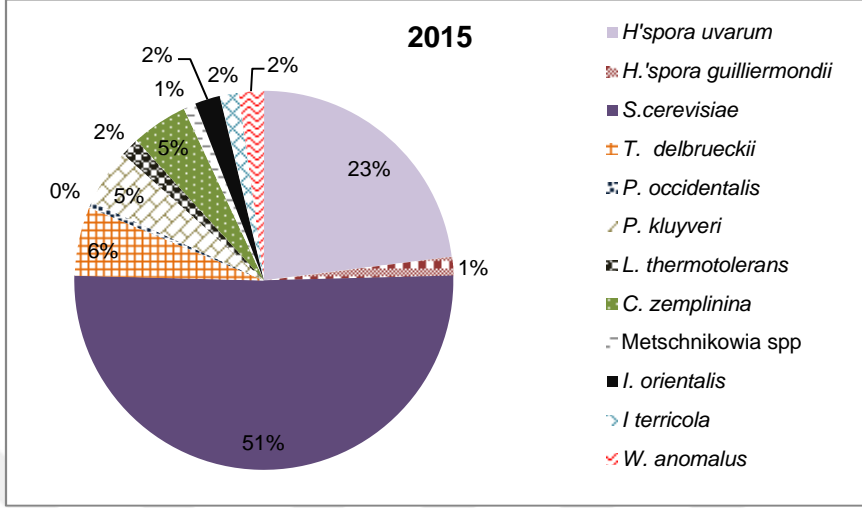
NH: Üzüm; F1: fermantasyon başı; F2: fermantasyon ortası; F3: fermantasyon sonu

2014 yılında Tokat ve Nevşehir yörelerinin maya dağılımı karşılaştırıldığında her iki yörenin üzümünden yalnızca *H'spora uvarum* izole edilmiştir. Alkol fermantasyonu sırasında F1’ de her iki yörede de *S.cerevisiae* ve *W. anomalus* izole edilmiştir. Tokat yöresinde Nevşehirden farklı olarak *S. cerevisiae/paradoxus* ve *H'spora guilliermondii* türleri de izole edilmiştir.

Nevşehir yöresinde ise Tokat'dan farklı olarak *I. orientalis* türü izole edilmiştir. F2' de Tokat yöresinde *S. cerevisiae* ve *H'spora guilliermondii* sayıları artarken *H'spora uvarum* azalmış, Nevşehir yöresinde ise *T. delbrueckii* ve *H'spora guilliermondi* türlerinin sayıları artmış ve onların yanında *S. cerevisiae* ve *H'spora uvarum* türleri de izole edilmiştir. F3' de ise her iki yörede de *S. cerevisiae* ortama hakim olmuş, Nevşehir yöresinde Tokat'tan farklı olarak *T. delbrueckii* türü de fermantasyon sonunda izole edilmiştir. *Saccharomyces* spp. olmayan türler genellikle üzümde ve fermantasyon başında ortamda baskın olan türlerdir ve düşük alkol toleransları nedeni ile fermantasyonun ileri aşamalarında ortamda bulunamazlar (Fugelsang ve Edwards, 2007). 2014 yılında izole edilen toplam 76 izolatın 24'ü tortu alma işlemi uygulanmamış denemelerde, geri kalanı ise tortu alma işlemi uygulanmış denemelerden elde edilmiştir. Fermantasyon sırasında tortu alma işleminin *Saccharomyces* spp. olmayan maya çeşitliliğini azalttığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a; Di Maro ve ark, 2007; Fleet, 2008). Ancak 2014 yılı Narince şıralarının fermantasyonu sırasında tortu alma işleminin *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların çeşitliliği ve popülasyonu üzerine etkisi belirlenememiştir.

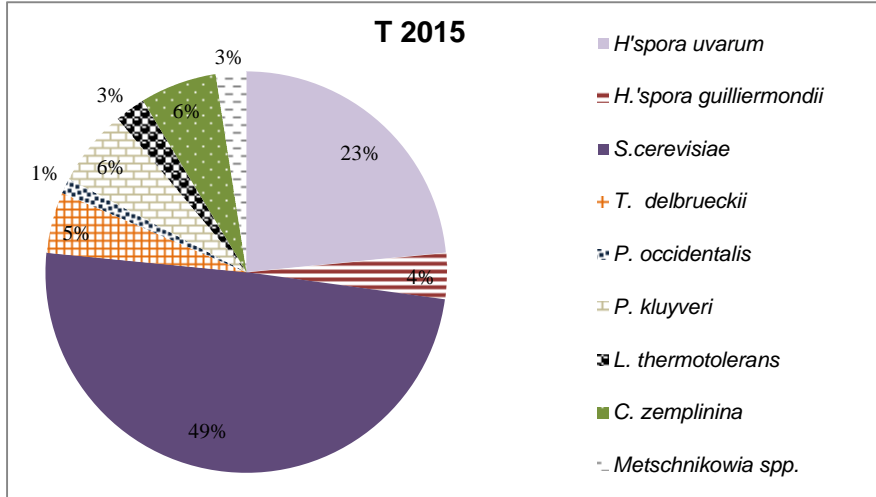
4.3.3. 2015 Yılında Tokat ve Nevşehir Yörelerinden İzole edilen Mayaların Dağılımı

2015 yılında Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen mayaların dağılımı Şekil 4.18'de verilmiştir. 2015 yılında *H'spora uvarum*, *H'spora guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *I. orientalis*, *I. terricola*, *P. occidentalis*, *P. kluyveri*, *L. thermotolerans*, *C. zemplinina*, *Metschnikowia* spp., ve *W. anomalus* olmak üzere olmak üzere 9 cinse ait 12 tür belirlenmiştir ve en fazla izole edilen tür *S. cerevisiae* olmuş, bunu *H'spora uvarum* ve diğer türler takip etmiştir.



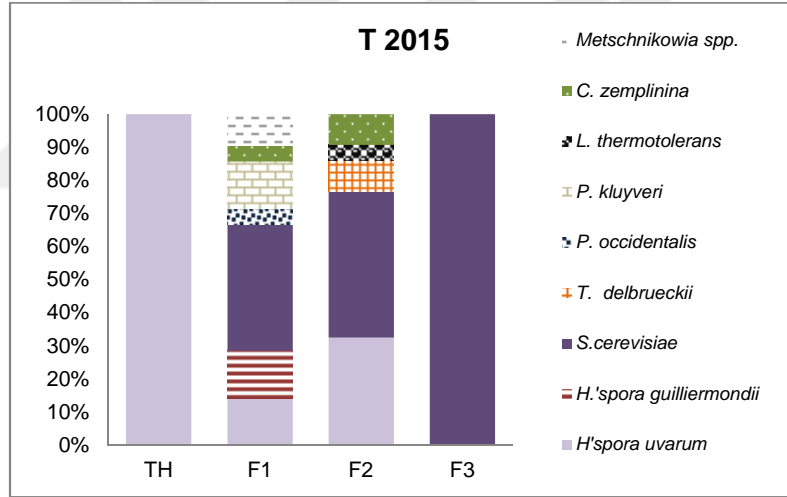
Şekil 4.18. 26S rRNA analizine göre 2015 yılında Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen mayaların tür düzeyindeki dağılımı

2015 yılında Tokat yöresinden izole edilen mayaların genel dağılımı Şekil 4.19 'da verilmiştir. 2015 yılında Tokat yöresinden en fazla izole edilen tür *S. cerevisiae* olmuş ve bunu *H'spora uvarum* takip etmiştir.



Şekil 4.19. 2015 yılında Tokat yöresinden izole edilen mayaların tür düzeyinde dağılımı

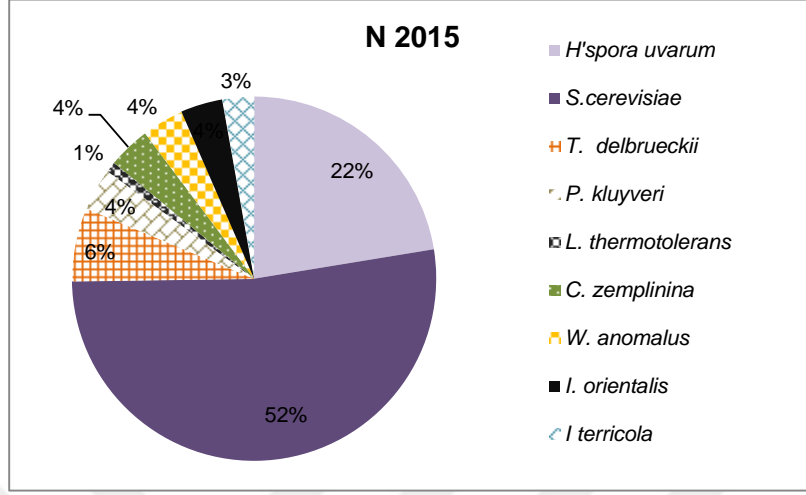
2015 yılında Tokat yöresi Narince üzümlerinden ve alkol fermantasyonu sırasında ortamdaki izole edilen mayaların tür düzeyindeki dağılımları ise Şekil 4.20’de verilmiştir. Üzümlerde yalnızca *H'spora uvarum* izole edilmiştir. Alkol fermantasyonu sırasında, fermantasyon başında (F1) *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum*, *H'spora guilliermondii*, *C. zemplinina*, *P. occidentalis*, *P. kluyveri* ve *Metschnikowia* spp. izole edilmiş, *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların ortama hakim olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon ortasında (F2)’de ise *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum* ortama hakim olmaya başlamış, *C. zemplinina* türü mayaların sayısı artmış ve bunların yanında *L. thermotolerans* ve *T. delbrueckii* maya türleri de izole edilmiştir. F3’de ise yalnızca *S. cerevisiae* izole edilmiş ve ortamda baskın maya türü olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20. 2015 yılında Tokat yöresi üzümlerinden ve fermantasyon denemeleri sırasında izole edilen mayaların dağılımı

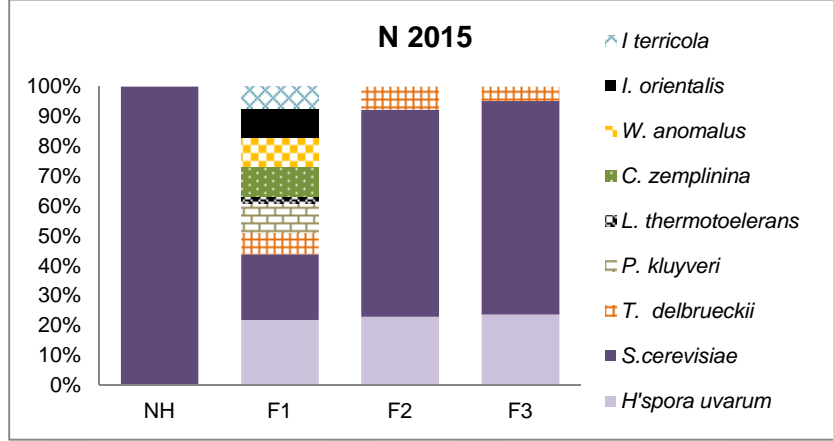
TH: Üzüm; F1: fermantasyon başı; F2: fermantasyon ortası; F3: fermantasyon sonu

2015 yılında Nevşehir yöresinden izole edilen mayaların genel dağılımı Şekil 4.21 ‘de verilmiştir. 2015 yılında Nevşehir yöresinden en fazla izole edilen tür *S. cerevisiae* olmuş ve bunu *H'spora uvarum* takip etmiştir.



Şekil 4.21. 2015 yılında Nevşehir yöresinden izole edilen mayaların tür düzeyinde dağılımı

2015 yılında Nevşehir yöresi Narince üzümlerinden ve alkol fermantasyonu sırasında ortamdaki izole edilen mayaların tür düzeyindeki dağılımları da Şekil 4.22'de verilmiştir. Üzümlerde yalnızca *S. cerevisiae* izole edilmiştir. Fermantasyon denemeleri sırasında, fermantasyon başında (F1) *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum*, *T. delbrueckii*, *C. zemplinina*, *P. kluyveri*, *L. thermotolerans*, *I. terricola*, *I.orientalis* ve *W. anomalus* izole edilmiş ve fermantasyon başında *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların ortama hakim olduğu tespit edilmiştir. Fermantasyon ortası ve fermantasyon sonunda *S. cerevisiae* ortama hakim olmaya başlamış ve bunun yanında *H'spora uvarum* ve *T. delbrueckii* türleri de izole edilmiştir.



Şekil 4.22. 2015 yılında Nevşehir yöresi üzümünden ve fermantasyon denemeleri sırasında izole edilen mayaların dağılımı
 NH: Üzüm; F1: fermantasyon başı; F2: fermantasyon ortası; F3: fermantasyon sonu

2015 yılında Tokat ve Nevşehir yörelerinin maya dağılımı karşılaştırıldığında Tokat yöresinden 7 tür izole edilirken, Nevşehir Yöresinden 8 tür izole edilmiştir. Tokat yöresi üzümünden yalnızca *H'spora uvarum* izole edilmiş, Nevşehir yöresi üzümünden ise yalnızca *S. cerevisiae* izole edilmiştir. Fermantasyon denemeleri sırasında F' de her iki yörede de *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum*, *C. zemplinina* ve *P. kluyveri* izole edilmiştir. Tokat yöresinde Nevşehir'den farklı olarak *Metschnikowia* spp., *P. occidentalis*, *H'spora guilliermondii* türleri izole edilmiştir. Nevşehir yöresinde Tokat'tan farklı olarak *L. thermotolerans*, *I. orientalis*, *I. terricola*, *W. anomalus* ve *T. delbrueckii* türleri izole edilmiştir. F2' de her iki yörede de *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum*, ve *T. delbrueckii* türleri izole edilmiştir. Tokat yöresinde ise Nevşehir'den farklı olarak *C. zemplinina* ve *L. thermotolerans* türleri izole edilmiştir. F3' de ise her iki yörede de *S. cerevisiae* ortama hakim olmuş, Nevşehir yöresinde Tokat' tan farklı olarak *H'spora uvarum* ve *T. delbrueckii* türleri de izole edilmiştir. 2015 yılı fermantasyon denemeleri sırasında tortu alma işlemi uygulanmamış denemelerdeki *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sayısı ve çeşidi tortu alma işlemi uygulanmış denemelere göre daha fazla bulunmuştur.

4.4. Tanımlanan Mayaların Teknolojik Özellikleri

Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen mayaların filogenetik kümeleme analizine göre, 22 adet *S. cerevisiae*, 1 adet *S. cerevisiae/paradoxus*, 10 adet *H'spora uvarum*, 3 adet *I. orientalis*, 2 adet *L. thermotolerans*, 1 adet *W. anomalous*, 1 adet *Metschnikowia* spp., 2 adet *I. terricola*, 1 adet *C. zemplinina*, 1 adet *H'spora guilliermondii*, 1 adet *T. delbrueckii* ve 3 adet *P. kluyveri* olmak üzere toplam 48 adet izolat teknolojik özellikleri belirlenmek üzere seçilmiştir.

4.4.1. Mayaların Farklı Sıcaklıklarda Gelişmesi

Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların farklı sıcaklıklarda (10°C, 15°C, 25°C, 30°C, 37°C) gelişme özellikleri Çizelge 4.3 'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Maya izolatlarının farklı sıcaklıklarda gelişme özellikleri

Maya Kodu	Maya türü	10 °C	15 °C	25 °C	30 °C	37 °C
61	<i>S. cerevisiae/paradoxus</i>	++	++	+++	+++	++
148	<i>I. orientalis</i>	+	+	++	+++	+++
214	<i>T. delbrueckii</i>	+	+	++	++	+
431	<i>H'spora uvarum</i>	+	+	++	++	-
442	<i>H'spora uvarum</i>	+	+	+++	+++	-
475	<i>I. terricola</i>	+	+	+++	+++	++
476	<i>W. anomalous</i>	+	+	+	++	+++
480	<i>I. terricola</i>	+	+	+	+++	+++
483	<i>I. orientalis</i>	+	+	+	+++	+++
518	<i>C. zemplinina</i>	+	+	+	+	+
521	<i>L. thermotolerans</i>	++	++	++	++	++
528	<i>S.cerevisiae</i>	+	+	+	+	++
536	<i>I. orientalis</i>	+	+	+	+	+
539	<i>H'spora uvarum</i>	+	+	+	+	+
541	<i>P. kluyveri</i>	+	+	+	+	+

Çizelge 4.3.'ün devamı

Maya Kodu	Maya türü	10 °C	15 °C	25 °C	30 °C	37 °C
590	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	++
606	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	+
672	<i>H'spora guilliermondii</i>	+F	+F	+F	+F	++F
678	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+
682	<i>H'spora uvarum</i>	+	+	++	+++	++
684	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	++
702	<i>P. kluyveri</i>	+	+	+	+	-
709	<i>P. kluyveri</i>	+	+	+	+	+
710	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+
727	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+++	+++	++
754	<i>Metschnikowia spp.</i>	+	+	+	+	-
773	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+++	+++	+++	+++
789	<i>H'spora uvarum</i>	+	+	+	+	-
835	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	++	+++	++
866	<i>H'spora uvarum</i>	+	+	+	+	-
884	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	+++
919	<i>H'spora uvarum</i>	+	+	+	+	+
942	<i>H'spora uvarum</i>	++	++	++	++	+++
1028	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	++
1044	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	+
1048	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	++
1088	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	+
1120	<i>L.thermotolerans</i>	++	++	++	+++	+++
1149	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	++
1152	<i>H'spora uvarum</i>	+	+	+	+	-
1198	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	++
1212	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	++
1281	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	+++	+++	+
1333	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	+
1353	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	+++	+++
1363	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	++
1378	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	++
1412	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++	++

+: zayıf gelişim, ++: orta derecede gelişim, +++: yoğun gelişim, F: film oluşumu

Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen *S. cerevisiae* izolatlarının bütün sıcaklık derecelerinde geliştiği ancak gelişme yoğunluklarının sıcaklık derecelerine göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Şarap üretiminde beyaz şaraplar genellikle 10-18°C aralığında fermente edilirler. Beyaz şarap üretimi düşük sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinden, soğuğa dayanıklı suşların fermantasyonda kullanılması bir yandan fermantasyonun gecikmesini önler bir yandan da fermantasyon sonunda aroma maddeleri açısından ortaya çıkabilecek bazı sorunları ortadan kaldırır (Nurgel, 2000; Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a). Narince'den izole edilen 1353 kodlu *S. cerevisiae* suşu düşük sıcaklık derecesinde (10°C-15°C) diğer *S. cerevisiae*' lere göre daha yoğun gelişmiş ve gaz oluşturmuştur.

Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların farklı sıcaklıklarda gelişme özellikleri çeşitlilik göstermiş ve 10°C-15°C'de 773 kodlu *H'spora uvarum* izolatu diğer türlere ve *H'spora uvarum* izolatlarına göre daha yoğun gelişmiş, gaz oluşturmuş ve onu 521 kodlu *L. thermotolerans*, 942 kodlu *H'spora uvarum* ile 1120 kodlu *L. thermotolerans* izolatları takip etmiştir. Bazı *H'spora uvarum* izolatlarının (431, 442, 702, 789, 866, 1152) 37°C'de gelişmediği belirlenmiştir. 475 ve 480 kodlu *I. terricola* 15°C'de yoğun gelişme göstermemiş, ancak yüksek sıcaklıklarda daha iyi gelişmiştir. 518 ve 528 kodlu *C. zemplinina* ile 541 ve 709 kodlu *P. kluyveri* izolatları uygulanan sıcaklık derecelerinin hepsinde zayıf gelişmişlerdir. 672 ve 678 kodlu *H. guilliermondii* izolatları da uygulanan sıcaklık denemelerinde zayıf gelişmiş ve 672 kodlu izolat bütün sıcaklık derecelerinde film oluşturmuştur. 754 kodlu *Metschinkowia* spp. izolatu ise 37°C'de gelişmemiş ve diğer sıcaklık derecelerinde ise zayıf gelişmiştir.

S. cerevisiae ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların özellikle düşük sıcaklıklarda gelişme özellikleri karşılaştırıldığında, her iki türe ait izolatların da 10°C-15°C'de benzer özellik gösterdiği ve bu sıcaklıkta çok iyi gelişmediği belirlenmiştir. Ancak 773 kodlu *H'spora uvarum* ve 1353 kodlu *S. cerevisiae*

izolatları 10°C-15°C'de en yoğun gelişen izolatlar olmuşlardır. Fermantasyon sıcaklığı, fermantasyon sırasındaki maya florasını etkileyen önemli parametrelerden biridir, düşük sıcaklıklarda (15-20 °C) gerçekleşen fermantasyonlarda *Hanseniaspora* ve *Candida* türleri oluşan alkole daha dayanıklı olurlar ve fermantasyonun ileri aşamalarına kadar ortamda bulunarak şarabın aromasına büyük katkı sağlarlar (Di Maro ve ark., 2007). Narince'den izole edilen 518 kodlu *C. zemplinina* ve 773 kodlu izolat hariç diğer *Hanseniaspora* türlerinin düşük sıcaklıkta çok yoğun gelişemediği belirlenmiştir. Sharf ve Margalith (1983) sentetik şarap ortamında *S. cerevisiae* ve *Kl. apiculata* karışık kültürleri ile yapılan çalışmada, 10-20 C°'ler arasında *Kl. apiculata* mayalarının, 30 C° ise *S. cerevisiae* mayalarının ortama hakim olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar *Kl. apiculata* mayalarının düşük sıcaklıkta *S. cerevisiae*'ya göre daha iyi geliştiğini bildirmişlerdir. Heard ve Fleet (1988), *Kl. apiculata*, *C. apiculata* ve *S. cerevisiae* karışık kültürlerinin 10, 20 ve 25 C°'de çoğalma kinetiklerini incelemişlerdir. 25 C°'de *S. cerevisiae* ortama hakim olduğunu, *Kl. apiculata* ve *C. stellata* türlerinin fermantasyonun başında öldüğünü, ancak 10 C°'de yapılan fermantasyonda *Kl. apiculata* ve *C. stellata* fermantasyon boyunca ortama hakim olduğunu bildirmişlerdir. Erten (2002), *S. cerevisiae* ve *Kl. apiculata* türlerinin gelişimi üzerine sıcaklığın etkisini incelemiştir. Çalışmada, *Kl. apiculata* mayalarının düşük sıcaklıklarda (10 ve 15°C'lerde) daha yüksek sıcaklıklara göre (20°C) daha iyi geliştiğini ve daha uzun süre ortamda bulunduğunu ancak bütün sıcaklık denemelerinde fermantasyon sonunda ortama hakim türün *S. cerevisiae* olduğunu bildirmiştir.

4.4.2. Mayaların Etanol Toleransı

Etanol, alkol fermantasyonunun ana ürünü olmasına rağmen hücre membranı için toksik etkiye sahiptir ve bu nedenle alkol fermantasyonu sırasında kullanılacak etanol toleransı önemli bir kriterdir. Tokat ve Nevşehir Yörelerinden izole edilen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların farklı etanol

miktarlarında (0 %, 8 %, 10 %, 12 %, 14 %) gelişme özellikleri Çizelge 4.4 'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Maya izolatlarının farklı etanol düzeylerinde gelişme özellikleri

Maya Kodu	Maya Türü	0%	8%	10%	12%	14%
61	<i>S. cerevisiae/paradoxus</i>	+++	++	++	++	++
148	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	-	-	-
214	<i>T. delbreuckii</i>	+++	+++	+++	+	+
431	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+	+	-	-
442	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+	+	+	-
475	<i>I. terricola</i>	+++	+	+	-	-
476	<i>W. anomalus</i>	+++	-	-	-	-
480	<i>I. terricola</i>	+++	++	++	-	-
483	<i>I. orientalis</i>	+++	++	-	-	-
518	<i>C. zemplinina</i>	+++	++	++	+	+
521	<i>L. thermotolerans</i>	+++	++	++	++	+
528	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	+	+	+
536	<i>I. orientalis</i>	+++	++	+	-	-
539	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+	+	+	-
541	<i>P. kluyveri</i>	+++	++	-	-	-
590	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	++	++	+
606	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	+	+	-
672	<i>H'spora guilliermondii</i>	+++	+	+	+	-
678	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+	+	+	-
682	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+++	++	+	-
684	<i>S.cerevisiae</i>	+++	+	+	+	+
702	<i>P. kluyveri</i>	+++	+	+	+	-
709	<i>P. kluyveri</i>	+++	+	+	-	-
710	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+	+	+	-
727	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+	+	+	+
754	<i>Metschnikowia sp.</i>	+++	-	-	-	-
773	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+	+	+	+
789	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+	+	+	-
835	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	+	-	-
866	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+	+	+	+
884	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	+	+	+
919	<i>H'spora uvarum</i>	+++	++	+	-	-
942	<i>H'spora uvarum</i>	+++	++	++	++	-
1028	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	+	+	-
1044	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	++	++	++

Çizelge 4.4.'ün devamı

Maya Kodu	Maya Türü	0%	8%	10%	12%	14%
1048	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	++	-	-
1088	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	+++	+++
1120	<i>L. thermotolerans</i>	+++	+++	++	-	-
1149	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+	+	+	+
1152	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+	+	-	-
1198	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+	+	+	+
1212	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	++	++	++
1281	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	++	++	++
1333	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	+++	++
1353	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	+	+	+
1363	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	+	+	+
1378	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	+++	+++
1412	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	++	++	++

+: zayıf gelişim, ++: orta derecede gelişim, +++: yoğun gelişim

Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen *S. cerevisiae* izolatlarının tamamı, etanol konsantrasyonlarının hepsinde gelişmiş ancak, gelişme yoğunlukları etanol konsantrasyonu ve maya koduna göre değişkenlik göstermiştir. Teknolojik özellikleri belirlenen 1088 ve 1378 kodlu izolatlar etanol konsantrasyonlarının tamamında yoğun gelişmiş ve onları 61, 590, 1044, 1212, 1281, 1333 ve 1412 kodlu izolatlar takip etmiştir. Bazı *S. cerevisiae* izolatları (148, 590, 606, 684, 727, 884, 1149, 1198, 1353 ve 1363 kodlu mayalar) % 8 ve üzeri etanolde zayıf gelişmişlerdir.

Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edile *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların farklı etanol konsantrasyonlarında gelişme özellikleri de değişiklik göstermiş ve 214 kodlu *T. delbrueckii*, 475 kodlu *I. terricola*, 521 kodlu *L. thermotolerans*, 518 ve 528 kodlu *C. zemplinina* ile 773, 866 kodlu *H'spora uvarum* izolatları çok düşük yoğunlukta da olsa %14 etanole kadar gelişmişlerdir. *Hansenispora* cinsine ait türlerin etanol toleransı değişkenlik göstermiş ve 442, 539, 682, 942 kodlu *H'spora uvarum* izolatları ile 672 ve 678

kodlu *H. guilliermondii* % 12 etanole kadar gelişirken, 431, 919 ve 1152 kodlu *H'spora uvarum* izolatları %10 etanole kadar gelişmişlerdir. Diğer *Saccharomyces* spp. olmayan türler arasında, 475 ve 480 kodlu *I. terricola* ile 709 kodlu *P. kluyveri* izolatları % 10 etanole kadar gelişirken, 476 kodlu *W. anomalus* ve 754 kodlu *Metschnikowia* spp. uygulanan etanol konsantrasyonlarının hiçbirinde gelişmemişlerdir. *I. orientalis* izolatlarının farklı etanol konsantrasyonlarında gelişme özellikleri değişkenlik göstermiş ve 483 kodlu izolat % 8 etanole kadar gelişirken, 536 %10 etanole kadar gelişmiştir. 1120 kodlu *L. thermotolerans* ise % 10 etanole kadar iyi gelişmiş ancak daha yüksek konsantrasyonlarda gelişmemiştir. *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların etanol toleransı *S. cerevisiae*'ya göre daha düşüktür (Fleet ve Heard, 2002). Ancak Narince'den izole edilmiş *T. delbrueckii*, *C. zemplinina*, *L. thermotolerans* ve *Hansenispora*' ya ait bazı izolatların alkol toleransı, Narince'den izole edilmiş bazı *S. cerevisiae* izolatlarından yüksek bulunmuştur.

4.4.3. Mayaların Kükürt Dioksit Toleransı

Şarapçılıkta kükürt dioksit (SO₂) oksidasyonu önleyici, antimikrobiyal ve durultucu özelliklerinden dolayı kullanılır ve fermantasyon sırasında kullanılan suşun SO₂' ye olan toleransı önemlidir (Ribéreau-Gayon ve ark., 2006). Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların farklı SO₂ miktarlarında (50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L) gelişme özellikleri Çizelge 4.5 'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Maya izolatlarının farklı SO₂ düzeylerinde (mg/L) gelişme özellikleri

Maya Kodu	Maya türü	50	100	150	200
61	<i>S. cerevisiae/paradoxus</i>	+++	+++	+++	+++
148	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+	+	+
214	<i>T. delbrueckii</i>	+++	+	+	+
431	<i>H'spora uvarum</i>	++	+	+	-
442	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+++	+++	+++

Çizelge 4.5.'in devamı

Maya Kodu	Maya türü	50	100	150	200
475	<i>I. terricola</i>	+++	+++	+++	+++
476	<i>W. anomalous</i>	+++	+	+	+
480	<i>I. terricola</i>	+++F	+++F	+++F	+++F
483	<i>I. orientalis</i>	++F	+F	+F	-
518	<i>C. zemplinina</i>	+++	+++	+++	+++
521	<i>L. thermotolerans</i>	+	+	+	+
528	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++
536	<i>I. orientalis</i>	+++F	+++F	+++F	+++F
539	<i>H'spora uvarum</i>	+++F	+F	+F	+F
541	<i>P. kluyveri</i>	++	++	+	+
590	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	++
606	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++
672	<i>H'spora guilliermondii</i>	+++F	+++F	+++F	+++F
678	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++	++	+
682	<i>H'spora uvarum</i>	+	+	+	+
684	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	++
702	<i>P. kluyveri</i>	+++	+++	+++	+++
709	<i>P. kluyveri</i>	++	++	++	-
710	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	-	-
727	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	+++
754	<i>Metschnikowia spp.</i>	++	++	+	-
773	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+++	+++	+++
789	<i>H'spora uvarum</i>	++	++	++	++
835	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	++
866	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+++	+++	+++
884	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	+++
919	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+++	+++	+++
942	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+++	++	++
1028	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+
1044	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++
1048	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++
1088	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	+++
1120	<i>L.thermotolerans</i>	+++	+++	+++	+++
1149	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+
1152	<i>H'spora uvarum</i>	+++	+++	++	-
1198	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	+++
1212	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++
1281	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	++
1333	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	+++
1353	<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	++
1363	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	++	++
1378	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	+++	+++
1412	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++	++	++

+: zayıf gelişim, ++: orta derecede gelişim, +++: yoğun gelişim, F: yüzeyde film tabakası

Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen *S. cerevisiae* mayalarının bütün SO₂ konsantrasyonlarında geliştiği ancak gelişme yoğunluklarının izolatlar arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. SO₂ toleransı belirlenen 61, 727, 884, 1088, 1198, 1333, ve 1378 kodlu izolatlar konsantrasyonların tamamında çok yoğun gelişmiş ve onları 684, 1044, 1212, 1281, 1353, 1363 ve 1412 kodlu izolatlar takip etmiştir. 148, 1028 ve 1149 kodlu izolatlar ise SO₂ konsantrasyonlarının tamamında zayıf gelişme göstermiştir.

Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların farklı SO₂ konsantrasyonlarında gelişme özelliklerinin değişkenlik gösterdiği ve bazı *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların (*I. terricola*, *I. orientalis*, *H'spora uvarum*, *H'spora guilliermondii*) film oluşturdukları belirlenmiştir. 442, 702, 773, 866, 919 kodlu *H'spora uvarum*, 672 kodlu *H. guilliermondii*, 475, 480 kodlu *I. terricola*, 518 kodlu *C. zemplinina* ile 536 ve 1120 kodlu *I. orientalis* izolatları bütün SO₂ konsantrasyonlarında yoğun gelişmişlerdir. 539, 682, kodlu *H'spora uvarum* izolatları 50 mg/L'nin üzerindeki SO₂ konsantrasyonunda zayıf gelişmiş, 431, 1152 kodlu izolatlar 150 mg/L SO₂'ye kadar, 710 kodlu izolat 100 mg/L SO₂ ye kadar gelişmiş ve 539 kodlu *H'spora uvarum* bütün SO₂ konsantrasyonlarında film oluşturmuştur.

Alkol fermantasyonunun mikrobiyolojisi SO₂ kullanılarak kontrol edilebilirken *Saccharomyces* spp. olmayan birçok türün SO₂ toleransı *Saccharomyces*'a göre çok daha düşüktür (Henick-Kling ve Daniel, 1998). Narince'den izole edilmiş *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların ise 476 (*W. anomalus*) ve 521 (*L. thermotolerans*) kodlu izolatlar hariç 200 mg/L SO₂' ye kadar geliştikleri belirlenmiştir.

4.4.4. Mayaların Hidrojen Sülfür (H₂S) Oluşturması

H₂S alkol fermantasyonu sırasında, maya metabolizması sonucunda üretilen ve çürük yumurta benzeri kokusu ile şarap aromasını olumsuz etkileyen, şarapta istenmeyen bir bileşiktir (Ugliano ve Henschke, 2009). Tokat ve Nevşehir

yörelereinden izole edilen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların H₂S oluşturma özellikleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Maya izolatlarının ürettiği H₂S

Maya Kodu	Maya türü	H ₂ S
61	<i>S. cerevisiae/paradoxus</i>	3-Açık kahverengi
148	<i>S. cerevisiae</i>	3-Açık kahverengi
214	<i>T. delbrueckii</i>	3-Açık kahverengi
431	<i>H'spora uvarum</i>	4-Kahverengi
442	<i>H'sporavuarum</i>	3-Açık kahverengi
475	<i>I. terricola</i>	5-Koyu kahverengi
476	<i>W. anomalus</i>	3-Açık kahverengi
480	<i>I. terricola</i>	5-Koyu kahverengi
483	<i>I. orientalis</i>	5-Koyu kahverengi
518	<i>C. zemplinina</i>	5-Koyu kahverengi
521	<i>L. thermotolerans</i>	4-Kahverengi
528	<i>S. cerevisiae</i>	5-Koyu kahverengi
536	<i>I. orientalis</i>	2-Krem rengi
539	<i>H'spora uvarum</i>	5-Koyu kahverengi
541	<i>P. kluyveri</i>	4-Kahverengi
590	<i>S. cerevisiae</i>	3-Açık kahverengi
606	<i>S. cerevisiae</i>	3-Açık kahverengi
672	<i>H'spora guilliermondii</i>	5-Koyu kahverengi
678	<i>S. cerevisiae</i>	4-Kahverengi
682	<i>H'spora uvarum</i>	3-Açık kahverengi
684	<i>S. cerevisiae</i>	4-Kahverengi
702	<i>P. kluyveri</i>	4-Kahverengi
709	<i>P. kluyveri</i>	3-Açık kahverengi
710	<i>S. cerevisiae</i>	5-Koyu kahverengi
727	<i>S.cerevisiae</i>	4-Kahverengi
754	<i>Metschnikowia</i> spp.	4-Kahverengi
773	<i>H'spora uvarum</i>	4-Kahverengi
789	<i>H'spora uvarum</i>	3-Açık kahverengi

Çizelge 4.6.'nın devamı

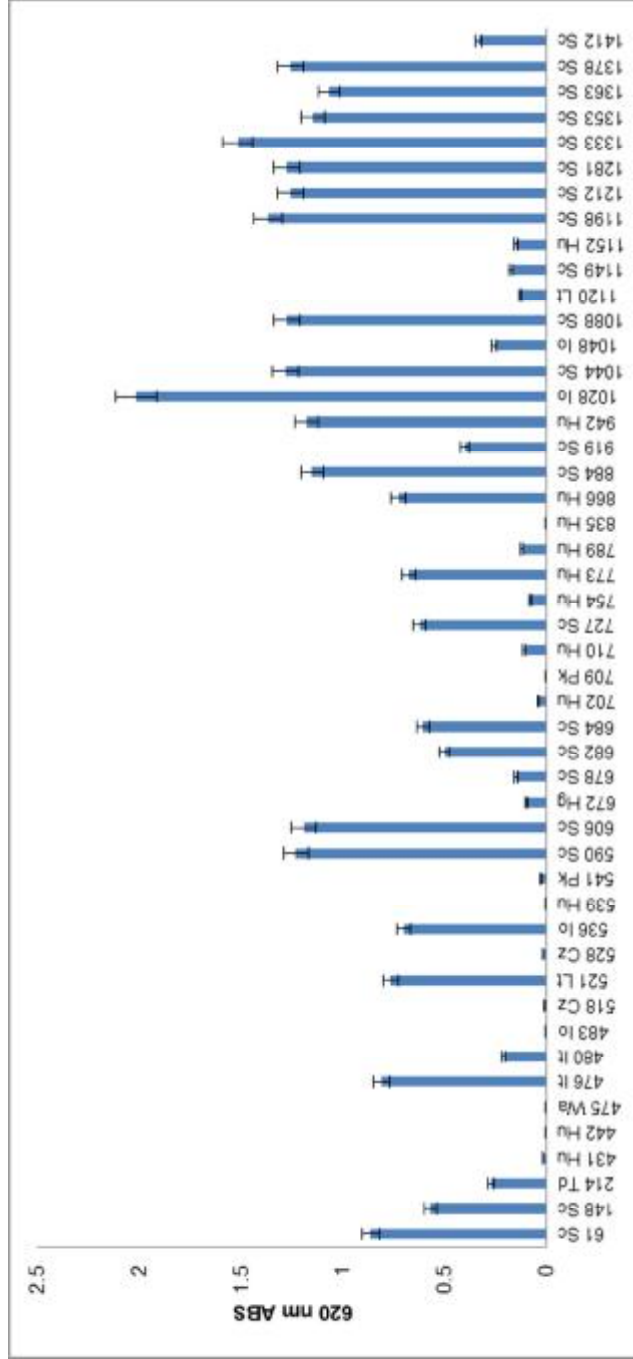
Maya Kodu	Maya türü	H ₂ S
835	<i>S. cerevisiae</i>	3-Açık kahverengi
866	<i>H'spora uvarum</i>	2-Krem rengi
884	<i>S. cerevisiae</i>	3-Açık kahverengi
919	<i>H'spora uvarum</i>	4-Kahverengi
942	<i>H'spora uvarum</i>	3-Açık kahverengi
1028	<i>S. cerevisiae</i>	5-Koyu kahverengi
1044	<i>S. cerevisiae</i>	3-Açık kahverengi
1048	<i>S. cerevisiae</i>	5-Koyu kahverengi
1088	<i>S. cerevisiae</i>	4-Kahverengi
1120	<i>L. thermotolerans</i>	4-Kahverengi
1149	<i>S. cerevisiae</i>	4-Kahverengi
1152	<i>H'spora uvarum</i>	5-Koyu kahverengi
1198	<i>S. cerevisiae</i>	3-Açık kahverengi
1212	<i>S. cerevisiae</i>	4-Kahverengi
1281	<i>S. cerevisiae</i>	2-Krem rengi
1333	<i>S. cerevisiae</i>	3-Açık kahverengi
1353	<i>S. cerevisiae</i>	3-Açık kahverengi
1363	<i>S. cerevisiae</i>	3-Açık kahverengi
1378	<i>S. cerevisiae</i>	4-Kahverengi
1412	<i>S. cerevisiae</i>	4-Kahverengi

Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen *S. cerevisiae* mayalarının H₂S oluşturma özellikleri maya koduna göre değişkenlik göstermiş, 1281 kodlu suş BIGGY agar üzerinde krem rengi (2) oluşturarak en düşük seviyede H₂S oluştururken 528, 710, 1028 ve 1048 kodlu izolatlar koyu kahverengi (5) üreterek en yüksek seviyede H₂S oluşturan *S. cerevisiae* izolatları olmuştur. Esteve-Zarzoso ve ark (2000), farklı üzüm çeşitlerinden izole ettikleri 23 adet *S. cerevisiae* suşunun, çoğunun H₂S üretmediğini, izole edilen suşlardan yalnızca 5 adetinin düşük düzeylerde H₂S ürettiklerini bildirmişlerdir. Elmacı ve ark (2014), Narince'den izole edilmiş 2 suşun düşük düzeyde H₂S ürettiklerini bildirmişlerdir.

Narince'den izole edilen *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlar çeşitli seviyede H₂S oluşturmuşlar ve 536 kodlu *I. orientalis* ve 866 kodlu *H'spora uvarum* izolatları krem renk oluşturarak en düşük seviyede H₂S üretirken, 480 (*I. terricola*), 483, 1028, 1048 (*I. orientalis*), 518 ve 528 (*C. zemplinina*), 539, 710 ile 1152 (*H'spora uvarum*) ve 672 (*H. guilliermondii*) kodlu izolatlar koyu kahverengi oluşturarak en yüksek seviyede H₂S üreten izolatlar olmuşlardır. Benedictis ve ark (2011), Negroamaro şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole ettikleri *H'spora uvarum* suşlarının H₂S üretme özelliklerini incelemişler ve izole ettikleri suşların düşük düzeylerde H₂S ürettiklerini bildirmişlerdir. Teixeira ve ark (2014), Touriga Nacional üzüm şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole ettikleri *H'spora guilliermondii* suşlarının düşük düzeyde, *H'spora uvarum* suşlarının orta düzeyde, *I. terricola* suşlarının yüksek düzeyde H₂S ürettiklerini bildirmişlerdir. İzole edilen *I. orientalis* ve *C. zemplinina* suşlarının ise H₂S üretme özelliklerinin farklılık gösterdiğini, bazı suşların düşük, bazılarının ise yüksek düzeyde H₂S ürettiklerini bildirmişlerdir.

4.4.5. Mayaların Seçici Besiyerinde Gelişimlerine Göre Seçimi

Narince'den izole edilmiş mayalar arasında kuvvetli etanol, SO₂ toleransı ve 15 derecede gelişme özelliklerini daha kesin bir şekilde belirlemek için mayaların stres ortamındaki (15°C'de, %12 etanol ve 100 mg/L SO₂ içeren seçici YPD broth, 7 gün inkübasyon) gelişimleri incelenmiş, Durham tüpü yardımı ile oluşturdukları gaz miktarı gözlenmiş ve 7 günün sonunda 620 nm'de optik yoğunlukları ölçülerek gelişme yoğunlukları belirlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Mayaların 15° C’ de, %12 Etanol, ve 100 mg/L SO₂ içeren besiyerinde gelişimlerinin

Sc: *S. cerevisiae*, Io: *I. orientalis*, Td: *T. delbrueckii*, Hu: *H. sporawarum*, Wa: *W. anomalous*, It: *I. terricola*, Cz: *C. zemplinina*, Lt: *L. thermotolerans*, Hg: *H. gulliermondii*, Pk: *Pichia kluyveri*, Mspp: *Metschnikowia* sp.

Şekil 4.23' de görüldüğü gibi en yoğun gelişmeyi 1028 kodlu *S. cerevisiae* izolatu göstermiş, ve bunu sırasıyla aynı türdeki 1333, 1198, 1281, 1212, 1378 ve 590 kodlu izolatlar takip etmiştir. *S. cerevisiae* mayaları genel olarak bu seçici besiyerinde yoğun gelişmiş ancak 678, 919, 1149 kodlu izolatlar çok düşük yoğunluklarda geliştikleri için elenmişlerdir. Geriye kalan *S. cerevisiae* mayaları (61, 148, 590, 606, 684, 884, 1028, 1044, 1088, 1198, 1212, 1281, 1333, 1353, 1363, 1378, 1412) diğer teknolojik özellikleri belirlenmek üzere seçilmişlerdir. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların seçici besiyerindeki gelişimleri değişkenlik göstermiş ve 431, 442, 483, 539, 541, 702, 709, 789, 835, 1120 kodlu izolatlar zayıf gelişerek elenmişlerdir. Geriye kalan 214 (*T. delbrueckii*), 476, 488 (*I. terricola*), 521 (*L. thermotolerance*), 536 (*I. orientalis*), 773, 866, 942 (*H'spora uvarum*) kodlu *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlar diğer teknolojik özellikleri belirlenmek üzere seçilmişlerdir.

4.4.6. Mayaların Killer Özellikleri

Starter kültür olarak kullanılacak bir mayada aranan özelliklerden biri de killer özelliktir. Killer özelliğe sahip starter maya istenmeyen mayaların gelişmesini önleyebilir (Ribéreau-Gayon ve ark, 2006a). Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların killer özellikleri Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Maya izolatlarının killer özellikleri

Maya kodu	Maya izolatu	Killer
61	<i>S. cerevisiae</i>	-
148	<i>S. cerevisiae</i>	+
214	<i>T. delbrueckii</i>	+
476	<i>W. anomalus</i>	-
480	<i>I. terricola</i>	-
521	<i>L. thermotolerans</i>	+
536	<i>I. orientalis</i>	-

Çizelge 4.7.'nin devamı

Maya kodu	Maya izolatı	Killer
590	<i>S. cerevisiae</i>	+
606	<i>S. cerevisiae</i>	+
684	<i>S. cerevisiae</i>	+
727	<i>S. cerevisiae</i>	+
773	<i>H'spora uvarum</i>	+
866	<i>H'spora uvarum</i>	+
884	<i>S. cerevisiae</i>	+
942	<i>H'spora uvarum</i>	+
1028	<i>S. cerevisiae</i>	+
1044	<i>S. cerevisiae</i>	+
1088	<i>S. cerevisiae</i>	+
1198	<i>S. cerevisiae</i>	+
1212	<i>S. cerevisiae</i>	+
1281	<i>S. cerevisiae</i>	+
1333	<i>S. cerevisiae</i>	+
1353	<i>S. cerevisiae</i>	-
1363	<i>S. cerevisiae</i>	-
1378	<i>S. cerevisiae</i>	+
1412	<i>S. cerevisiae</i>	-

Analiz sonuçlarına göre 61, 1353, 1363, 1412 kodlu *S. cerevisiae* izolatları ile 214, 476, 480, 536 kodlu *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlar hariç diğer izolatların killer özelliği olduğu belirlenmiştir. Rodriguez ve ark (2010), İspanyadaki şaraphanelerdeki maya popülasyonunu 9 yıl boyunca incelemişler ve izole ettikleri ve teknolojik özelliklerini inceledikleri *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların tamamının killer özellik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Barrajon ve ark, (2011) ticari ve yerli mayaların teknolojik özelliklerini karşılaştırmışlar ve 14 ticari, 21 yerli *S. cerevisiae* izolatı kullanmışlardır. Yapılan çalışmada kullanılan bütün izolatların K2 toksinine dirençli oldukları bildirilmiştir. Elmacı ve ark, (2014) Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* (Narince 3, Narince 4) izolatlarının killer özellik göstermediğini ve K2

toksinine karşı duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Narineden izole edilmiş izolatların çoğunun killer aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir

4.4.7. Mayaların Yüksek Şeker Derişimine Dayanıklılığı

Alkol fermantasyonun başında, şıranın şeker konsantrasyonunun yüksek olması mayaların gelişimini inhibe ederek fermantasyonun yavaşlamasına neden olur ve genellikle yüksek şeker konsantrasyonuna dayanıklılık sıcak bölgelerde kullanılan mayalarda istenen bir özelliktir (Elmacı ve ark., 2014). Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların yüksek şeker derişiminde gelişme özellikleri Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Maya izolatlarının yüksek şeker derişimine dayanıklılığı

Maya kodu	Maya izolatu	250 g/L şeker
61	<i>S. cerevisiae</i>	+++
148	<i>S. cerevisiae</i>	+++
214	<i>T. delburckii</i>	+++
476	<i>W. anomalus</i>	++
480	<i>I. terricola</i>	+++
521	<i>L. thermotolerans</i>	+
536	<i>I. orientalis</i>	+++
590	<i>S. cerevisiae</i>	+++
606	<i>S. cerevisiae</i>	+++
684	<i>S. cerevisiae</i>	++
727	<i>S. cerevisiae</i>	+++
773	<i>H'spora uvarum</i>	+++
866	<i>H'spora uvarum</i>	+++
884	<i>S. cerevisiae</i>	+++
942	<i>H'spora uvarum</i>	+++
1028	<i>S. cerevisiae</i>	+++
1044	<i>S. cerevisiae</i>	+++
1088	<i>S. cerevisiae</i>	+++
1198	<i>S. cerevisiae</i>	+++
1212	<i>S. cerevisiae</i>	+
1281	<i>S. cerevisiae</i>	+++

Çizelge 4.8.'in devamı

Maya kodu	Maya izolatı	250 g/L şeker
1353	<i>S. cerevisiae</i>	+++
1363	<i>S. cerevisiae</i>	+++
1333	<i>S. cerevisiae</i>	+++
1378	<i>S. cerevisiae</i>	+++
1412	<i>S. cerevisiae</i>	+++

+: zayıf gelişim, ++: orta derecede gelişim, +++: yoğun gelişim

Yüksek şeker derişiminde *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların genel olarak yoğun geliştiği, ancak, 1212 ve 684 kodlu *S. cerevisiae* ve 521 kodlu *L. thermotolerans*, 476 kodlu *I. orientalis* izolatlarının diğerlerine göre daha zayıf geliştiği belirlenmiştir. Aponte ve Blaiotto (2016), Moscato di Saracena şırasının spontan fermantasyonu sırasında izole ettikleri *S. cerevisiae* suşlarının tamamının %45 şekere kadar tolerans gösterdiklerini bildirmişlerdir. Elmacı ve ark (2014), Narince'den izole edilen Narince 3 ve Narince 4 *S. cerevisiae* suşlarının 30 Biriks derecesinde fermantasyon özelliği gösterdiklerini bildirmişlerdir.

4.4.8. Mayaların Köpük Oluşturması

Fermantasyon sırasında köpük oluşumu, fermantasyonun gerçekleştiği tankın hacmini azalttığından ve kontaminasyona elverişli ortam yarattığından istenmeyen bir özelliktir (Elmacı ve ark, 2014). Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların köpük oluşturma özellikleri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Maya izolatlarının köpük oluşturma özellikleri

Maya kodu	Maya suşu	Köpük oluşturma		
		30 °C	20°C	15°C
61	<i>S. cerevisiae</i>	F2	F1	F0
148	<i>S. cerevisiae</i>	F2	F0	F0
214	<i>T. delburueckii</i>	F2	F0	F0

Çizelge 4.9.'un devamı

Maya kodu	Maya suşu	Köpük oluşturma		
		30 °C	20°C	15°C
476	<i>W. anomalus</i>	F2	F0	F0
480	<i>I. terricola</i>	F2	F0	F0
521	<i>L. thermotolerans</i>	F2	F1	F0
536	<i>I. orientalis</i>	F2	F1	F0
590	<i>S. cerevisiae</i>	F2	F2	F0
606	<i>S. cerevisiae</i>	F2	F1	F0
684	<i>S. cerevisiae</i>	F2	F2	F0
727	<i>S. cerevisiae</i>	F2	F2	F1
773	<i>H'spora uvarum</i>	F2	F2	F0
866	<i>H'spora uvarum</i>	F2	F1	F0
884	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F2	F1
942	<i>H'spora uvarum</i>	F2	F2	F0
1028	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F2	F1
1044	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F2	F1
1088	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F1	F0
1198	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F1	F0
1212	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F2	F2
1281	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F2	F1
1353	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F2	F0
1363	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F2	F0
1333	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F1	F1
1378	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F2	F0
1412	<i>S. cerevisiaie</i>	F2	F2	F0

F0: 2 mm'den düşük köpük oluşumu, F1: 2-4 mm arasında oluşan köpük oluşumu, F2: 4mm'den yüksek köpük oluşumu.

S. cerevisiae ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların köpük oluşturma özelliklerinin sıcaklıkla birlikte değiştiği, yüksek sıcaklıkta (30°C) bütün mayaların 4 mm'den fazla (F2) köpük oluşturduğu belirlenmiştir. Sıcaklık uygulaması düşüktüğü mayaların köpük oluşturma özellikleri değişmiş ve 15°C'de bütün mayalar 4 mm'den düşük köpük oluşturmuşlardır. 20°C'de ise 148, 1088, 1198 ve 1333 *S. cerevisiae* ile 61 kodlu *S. cerevisiae/paradoxus* izolatları hariçi diğerleri 4

mm'den fazla köpük oluşturmuş, *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar ise genellikle (773 ve 942 hariç) 4 mm'den düşük köpük oluşturmuşlardır. Narince'den izole edilmiş *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların *S. cerevisiae* izolatlarına göre daha düşük köpük oluşturdukları belirlenmiştir. Regadón ve ark (1997), *S. cerevisiae* suşları ile yaptıkları çalışmada ise bütün suşların düşük miktarda köpük oluşturduğunu bildirmişlerdir. Clemente-Jimenez ve ark (2004), farklı üzüm şıralarından izole ettikleri mayalar ile yürüttükleri çalışmada *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum* ve *Metschnikowia pulcherima* suşlarının köpük oluşturmadığını, *Candida stelatta* suşunun orta düzeyde köpük oluşturduğunu ve *Issatchenkia terricola* suşunun ise yüksek miktarda köpük oluşturduğunu bildirmişlerdir. Elmacı ve ark (2014), Narince'den izole edilmiş Narince 3 ve Narince 4 *S. cerevisiae* suşlarının, 4 mm'den fazla köpük oluşturduklarını bildirmişlerdir. Teixeira ve ark (2014), *S. cerevisiae* ve 10 farklı *Saccharomyces* spp. olmayan (*Candida diversa*, *Hansenispora gulliermondii*, *Hansenispora uvarum*, *Hansenispora opuntiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia terricola*, *Starmerella bacillaris*, *Zygosaccharomyce bailii*, *Zygosaccharomyce bisporus* ve *Zygoascus hellenicus*) suşunun yüksek miktarda köpük oluşturduklarını bildirmişlerdir. Aponte ve ark (2016), Moscato di Saracena üzümünden izole edilmiş 26 adet *S. cerevisiae* suşundan 9'unun düşük düzeyde köpük oluşturduğunu, geriye kalanların ise orta ve yüksek düzeylerde köpük oluşturduklarını bildirmişlerdir.

4.4.9. Mayaların Enzimatik Aktivite Özellikleri

Şarap üretiminde, mayaların ürettiği enzimler şarabın duyuşsal ve fiziksel özelliklerini olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilir bu nedenle alkol fermantasyonu sırasında kullanılan mayaların enzim özellikleri önemlidir (Ribéreau-Gayon ve ark, 2006). Narince'den izole edilen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların enzimatik aktivite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla API-ZYM (Biomerieux) test kitlerinden yararlanılmış ve sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* olmayan mayaların enzim özellikleri

Enzimler	61 Sc	148 Sc	214 Td	476 Wd	480 H	521 Lt	536 Io	590 Sc	606 Sc	684 Sc	727 Sc	773 Hu	866 Hu	884 Sc	942 Hu	1028 Sc	1044 Sc	1088 Sc	1198 Sc	1212 Sc	1281 Sc	1333 Sc	1353 Sc	1363 Sc	1378 Sc	1412 Sc
Alkalın fosfataz	1	3	2	-	2	1	-	1	2	1	-	1	1	1	-	3	1	2	1	1	1	1	1	-	2	1
Esteraz (C4)	3	2	2	2	3	3	2	3	3	3	3	2	3	3	3	2	2	1	2	3	3	3	2	3	3	1
Esteraz lipaz (C8)	2	1	3	1	2	2	-	2	2	2	2	2	1	2	2	2	3	3	1	2	3	2	2	2	3	2
Lipaz (C14)	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-
Lösin arilamidaz	5	4	5	4	4	4	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	4	5	5	5	4	5	4	4
Valin arilamidaz	2	2	2	-	1	2	-	1	3	2	-	3	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	3
Sitin arilamidaz	2	2	1	-	1	1	-	2	2	3	1	2	2	3	2	3	3	2	2	3	3	2	3	3	2	1
Tripsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Kimotripsin	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Asit fosfataz	4	4	2	-	1	3	1	4	4	4	5	4	2	4	4	5	4	5	4	4	4	4	4	4	5	5
Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz	3	3	2	1	4	1	-	3	3	3	3	3	1	3	2	5	3	3	3	1	3	2	4	3	3	2
α -Galaktozidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Galaktozidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Glukuronidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Glukozidaz	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-
β -Glukozidaz	1	1	1	-	4	-	-	-	4	-	-	-	1	2	-	1	-	2	-	1	-	-	-	-	3	3
N-asetil- β -glukozaminidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Mannozydaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Fukozidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: aktivite yok, 1: çok düşük aktivite, 2: düşük aktivite, 3: orta aktivite, 4: yüksek aktivite, 5: çok yüksek aktivite, Sc, *S. cerevisiae*
Td, *T. delbrueckii*; Lt, *L. thermotolerans*; Io, *I. orientalis*; Hu, *H. sporu uvarum*

S. cerevisiae ve *Saccharomyces* spp. olmayan maya türlerinin API-ZYM test kitleleriyle yapılan analizlerde izolatların tiripsin, α -galaktozidaz, β -galaktozidaz, β -glukoronidaz, N-asetil- β glukozaminidaz, α -mannozidiaz, ve α -fukozidaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi belirlenememiştir. *S. cerevisiae* izolatlarında bu enzimlerin yanında α -kimotiripsin ve α -glukosidaz enzim aktiviteleri de saptanmamıştır (Çizelge 4. 10).

S.cerevisaie izolatlarında lösün arilamidaz ve ati fosfotaz enzim aktiviteleri yüksek; esteraz (C4) aktivitesi 148, 1044, 1198, 1353 kodlu izolatlarda düşük, 1088’de çok düşük, diğerlerinde orta düzeyde; esteraz lipaz (C8) aktivitesi 1044, 1088, 1281 ve 1378’de orta düzeyde, diğerlerinde düşük; valin arilamidaz aktivitesi 1088 ve 1378’de orta düzeyde, diğerlerinde düşük; sistin arilamidaz aktivitesi 684, 884, 1044, 1198, 1353, 1363’de orta düzeyde, diğerlerinde düşük; naftiol-AS-BI-fosfohidrolaz aktivitesi 1353’de yüksek, 1212 ve 1333’de düşük, diğerlerinde orta düzeyde; β -glukozidaz aktivitesi ise 606’ da yüksek, 1378 ve 1412’de orta düzeyde, 884 ve 1088’de düşük düzeyde, diğerlerinde ise belirlenememiştir. α -Glukozidaz aktivitesi yalnızca 148 kodlu izolatta belirlenmiştir. *S. cerevisiae* izolatlarında lipaz (C14) aktivitesi 1198, 1353 ve 1378’de çok düşük düzeyde, diğerlerinde ise saptanamamıştır. Elmacı ve ark, (2014), Narince’den izole edilmiş 2 *S. cerevisiae* suşunun düşük esteraz ve esteraz lipaz aktivitesi gösterdiğini ve yüksek lösün arilamidaz ve asit fosfotaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Aponte ve Blaiotta (2016), *Moscato di Saracena* şaraplarından izole ettikleri 26 *S. cerevisiae* suşunun yüksek lösün arilamidaz aktivitesi gösterdiklerini ancak tiripsin, kimotiripsin, α -galaktozidaz, β -galaktozidaz, β -glukoronidaz, N-asetil- β -glukozaminidaz aktivitesi göstermediğini, düşük düzeyde alkalın fosfotaz, lipaz ve naftol-AS-BI-fosfohidrolaz aktivitesi gösterdiklerini ve orta düzeyde esteraz lipaz, valin arilamidaz ve sistin arilamidaz aktiviteleri gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Saccharomyces spp. olmayan izolatlarda lösün arilamidaz aktivitesi yüksek, asit fosfotaz aktivitesi 521’de orta düzeyde, 214, 866, 480’ da düşük düzeyde, diğerlerinde ise yüksek düzeyde, esteraz (C4) aktivitesi 480, 521, 773’de orta

düzyde, diğerlerinde düşük, esteraz lipaz (C8) aktivitesi 214'de orta düzeyde, diğerlerinde düşük, vanilin arilamidaz aktivitesi, 773'de orta düzeyde, 536'da belirlenememiş, diğerlerinde ise düşük düzeyde, sistin arilamidaz aktivitesi, 1028'de orta düzeyde, 536'da belirlenememiş, diğerlerinde ise düşük düzeyde, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz aktivitesi 480' de yüksek, 773'de ort düzeyde, diğerlerinde ise düşük düzeyde, β -glukozidaz aktivitesi ise yalnızca 480 kodlu izolatta belirlenmiştir. Lipaz (C14) aktivitesi 480 ve 536 kodlu izolatlarda çok düşük düzeyde, diğerlerinde ise belirlenememiştir.

4.4.10. Mayaların Killer Aktivite, Yüksek Şeker Derişiminde Gelişme, Köpük Oluşturma ve Enzim Aktivitelerine Göre Seçimi

Tokat ve Nevşehir Yörelereinden izole edilen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlaraın killer ve enzim aktiviteleri, yüksek şeker derişiminde gelişme ve köpük oluşturma özellikleri değerlendirilmiş ve zayıf özellik gösteren mayalar elenmişlerdir. Analiz sonuçlarına göre *S. cerevisiae* izolatlaraı arasında, killer özellik göstermeyen 61, 1353, 1363 ve 1412 izolatlaraı ile, yüksek şeker derişiminde zayıf gelişen ve yüksek köpük oluşturan 1212 kodlu izolat ile, *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar arasında ise killer özelliğe sahip olmayan, yüksek şeker derişiminde zayıf gelişen, düşük enzim aktivitesine sahip olan 476 kodlu *W. anomalus* elenmiştir.

4.4.11. Mayaların Fermantasyon Hızı

Tokat ve Nevşehir Yörelereinden izole edilen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* olmayan mayaların fermantasyon hızları (FH), fermantasyon gücü (FG), ve kalan şeker miktarları Çizelge 4.11' de verilmiştir.

Çizelge 4.11. *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların fermantasyon hızları, fermantasyon verimleri ve fermantasyon sonunda kalan şeker

Maya kodu	Maya türü	FH (CO ₂ g/L.h)	FG (% h/h etanol)	Kalan şeker (g/L)
148	<i>S. cerevisiae</i>	0.13±0.0 ^h	5.41±0.1 ^k	51.20±0.6 ^d
214	<i>T. delburckii</i>	0.41±0.0 ^{f,g}	9.40±0.2 ^c	3.41±0.4 ^j
480	<i>I. terricola</i>	0.14±0.0 ^h	2.42±0.1 ^m	123.50±2.9 ^a
521	<i>L. thermotolerans</i>	1.10±0.0 ^c	3.80±0.3 ^l	61.00±0.05 ^c
536	<i>I. orientalis</i>	0.47±0.0 ^f	8.51±0.1 ^d	20.50±1.5 ^e
590	<i>S. cerevisiae</i>	1.11±0.0 ^c	9.83±0.1 ^{a,b}	1.82±0.0 ^{j,k}
606	<i>S. cerevisiae</i>	0.76±0.0 ^d	8.91±0.1 ^e	11.71±0.2 ^g
684	<i>S. cerevisiae</i>	0.74±0.0 ^{d,e}	2.50±0.1 ^m	98.80±2.7 ^b
773	<i>H'spora uvarum</i>	0.78±0.0 ^d	8.30±0.1 ^{e,f}	2.80±0.04 ^j
866	<i>H'spora uvarum</i>	0.61±0.0 ^e	7.90±0.1 ^{g,h}	9.12±0.9 ⁱ
884	<i>S. cerevisiae</i>	0.45±0.1 ^f	9.84±0.1 ^{a,b}	2.80±0.0 ^{j,k}
942	<i>H'spora uvarum</i>	0.42±0.1 ^{f,g}	7.63±0.1 ^h	10.91±0.0 ^{g,h}
1028	<i>S. cerevisiae</i>	1.39±0.1 ^b	7.17±0.1 ⁱ	17.80±0.3 ^f
1044	<i>S. cerevisiae</i>	1.27±0.0 ^b	9.69±0.0 ^{b,c}	2.82±0.02 ^j
1088	<i>S. cerevisiae</i>	0.99±0.1 ^c	10.00±0.2 ^{a,b}	1.60±0.09 ^{j,k}
1198	<i>S. cerevisiae</i>	0.31±0.0 ^d	6.70±0.0 ^j	17.41±0.2 ^f
1281	<i>S. cerevisiae</i>	2.47±0.2 ^a	10.12±0.1 ^a	0.80±0.1 ^k
1333	<i>S. cerevisiae</i>	0.53±0.01 ^{f,g}	9.06±0.2 ^d	9.40±0.1 ^{h,i}
1378	<i>S. cerevisiae</i>	0.30±0.2 ^g	8.40±0.04 ^{e,f}	16.90±0.1 ^f
F		*	*	*

FH: Fermantasyon hızı, FG: Fermantasyon gücü F: varyans analizine göre önem düzeyi, *: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen izolatlar arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemlidir.

Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen *S. cerevisiae* izolatlarının fermantasyon hızları 0.13 ile 2.47 g CO₂ /L.h arasında bulunmuştur. Şarap üretimi için kullanılacak olan mayanın fermantasyon hızının 0.25 g CO₂ /L.h'den fazla olması beklenir (Bağder ve ark, 2015). Fermantasyon hızları belirlenen 148 kodlu izolat dışındaki *S. cerevisiae* mayalarının fermantasyon hızları 0.25 g/L'den yüksek bulunmuştur. *S. cerevisiae* izolatlarının fermantasyon güçleri ise % 2.5 ile % 10.1 (h/h) etanol aralığında bulunmuş, 148 ve 684 kodlu izolatların fermantasyon gücü diğer *S. cerevisiae* izolatlarına göre düşük bulunmuştur. 884, 1044, 1088 ve 1281 kodlu izolatlar ortamdaki şekeri 3 g/L'nin altına kadar fermente etmişlerdir.

S. cerevisiae türüne ait şarap mayalarının teknolojik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, mayaların ürettikleri etanol miktarlarının, % 11.3-13.2 (h/h) (Regodón ve ark., 1997), 8-%16 (h/h) (Ciani ve Maccarelli, 1998), % 12.9-13.6 (h/h) (Salinas ve ark., 2010), % 7.7-12.4 (h/h) (Elmacı ve ark, 2014), % 12.9-15.8 (h/h) (Aponte ve Blaiotta, 2016), düzeylerinde olduğu bildirilmiştir. Narince'den izole edilen bazı *S. cerevisiae* izolatlarının ürettikleri etanol miktarı oldukça düşük bulunmuştur. Bu izolatlarla kurulan denemelerde çeşitli nedenlerden dolayı (besin eksikliği) fermantasyonun durduğu düşünülmektedir.

Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların fermantasyon hızları ise 0.12 ile 1.39 g CO₂/L.h. arasında, fermantasyon gücü % 2.4 ile % 9.4 (h/h) arasında bulunmuştur. Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi 480 kodlu *I. terricola* mayasının fermantasyon hızı 0.25 g CO₂/L.h 'nin altında bulunmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan türler arasında fermantasyon hızı en yüksek olan 521 kodlu *L. thermotolerans* olmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatları ile fermantasyon yapılmış şaraplarda kalıntı şeker miktarları 2.8-123 g/L değerleri arasında bulunmuştur. 773 kodlu izolat ortamdaki şekeri 3 g/L'nin altına kadar, 214 kodlu *T. delbrueckii* ise 3.4 g/L' ye kadar fermente etmiştir.

Sacharomyces spp. olmayan şarap mayalarının teknolojik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, mayaların ürettikleri etanol miktarları türlere göre farklılık göstermiş ve, *H'spora uvarum* suşlarının % 3.7-6 (h/h) (Ciani ve Maccarelli, 1998; Beneticis ev ark, 2011; Teixeira ve ark, 2014) düzeylerinde, *T.delbrueckii* suşlarının % 4-14 (h/h) (Ciani ve ark, 1998), % 6-13 (h/h) (Breda ve ark, 2013) düzeylerinde, *I. orientalis* suşlarının % 2.5-10.89 (h/h) (Clemente-Jimenez ve ark, 2004; Teixeria ve ark, 2014) düzeylerinde, *L. thermotolerans* suşlarının 7.5-% 13.5 (h/h) (Kapsopoulaou ve ark, 2005; Ugliano ve Henschke, 2009) düzeylerinde, *I. terricola* suşlarının % 4.96- 8 (h/h) (Ugliano ve Henschke, 2009; Teixeira ve ark, 2014) düzeylerinde etanol ürettikleri bildirilmiştir.

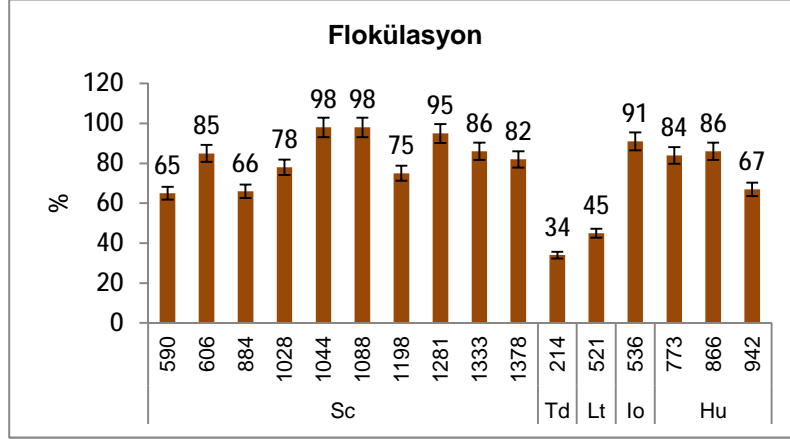
Narince'den izole edilmiş *H'spora uvarum* ve *I. terricola* izolatları hariç diğer türlerin ürettikleri etanol miktarları literatürde verilen değerler aralığında bulunmuştur. Ancak *H'spora uvarum* izolatlarının ürettikleri etanol miktarları, literatürde bildirilen değerlerin üzerinde, *I. terricola* izolatının ise literatürde (Ugliano ve Henschke, 2009; Teixeira ve ark, 2014) bildirilen değerlerin altında olduğu bulunmuştur.

Narineden izole edilmiş *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların fermantasyon hızları, fermantasyon güçleri ve fermantasyon sonunda ortamda kalan şeker miktarları değerlerindirildiğinde 480 (*I. terricola*) kodlu izolat ile 148, 684, kodlu *S. cerevisiae* izolatları elenmişlerdir.

4.4.12. Mayaların Fermantasyon Sonunda Dibe Çökmesi (Flokülasyon)

Mayanın fermantasyon tamamlandıktan sonra hızlı bir şekilde dibe çökmesi şarabın kısa sürede ve fazla işlem uygulanmadan berraklaşmasını sağladığı ve tortu alma işlemini kolaylaştırdığı için önemlidir (Soares ve Mota, 1997).

Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen *S. cerevisiae* izolatlarının flokülasyon değerleri % 65 ile % 98 arasında bulunmuştur (Şekil 4.24). 1044, 1088, 1281 kodlu izolatlar yüksek flokülasyon özelliği gösterirken 590 ve 884 kodlu izolatlar en düşük flokülasyon özelliği gösteren izolatlar olmuştur.



Şekil 4.24. *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların flokülasyon özellikleri

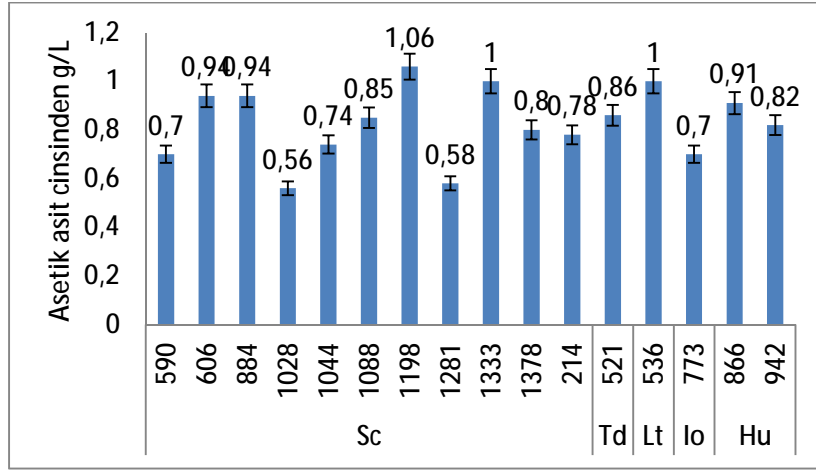
Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların flokülasyon değerleri ise % 34 ile % 91 arasında bulunmuş, en yüksek flokülasyon özelliğini 536 kodlu *I. orientalis* izolatu gösterirken en düşük flokülasyon özelliğini 214 kodlu *T. delbrueckii* izolatu göstermiştir.

4.4.13. Mayaların Oluşturduğu Uçar Asit Miktarları

Şarapta uçar asit, bozulma göstergesidir ve genellikle asetik asit cinsinden ifade edilir. Asetik asit, şarap üretimi sırasında oluşan en temel uçucu asittir ve asetik asit bakterileri tarafından üretildiği gibi fermantasyon sırasında mayalar tarafından da üretilir (Fleet ve Heard, 2002). Asetik asit konsantrasyonu, şarap tipine göre değişiklik göstermekle birlikte ve 0.7 ile 1.1 g/L arasında kusur olarak tanımlanmaktadır. Şaraptaki en uygun asetik asit konsantrasyonu 0.2 g/L ile 0.7 g/L arasındadır (Swiegers ve ark, 2005).

Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* izolatlarının ürettikleri uçar asit miktarları 0.56 g/L ile 1.06 g/L arasında değişmiş ve 1028, 1281 ve 590 kodlu izolatlar hariç diğerleri fermantasyon sonunda 0.7 g/L'nin üzerinde asetik asit üretmişlerdir (Şekil 4.25). *Sacharomyces* cinsine ait şarap mayalarının teknolojik

özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, mayaların ürettikleri uçur asit miktarlarının, 0.19-0.36 g/L (Regodón ve ark, 1997), 0.53 g/L-1.75 g/L (Ciani ve Maccarelli, 1998), 0.33-0.90 g/L (Esteve-Zarzoso ve ark, 2000), 0.2-1.8 g/L (Romano ve ark, 2003), 0.25-0.48 g/L (Nikolaou ve ark, 2006), 0.84-1.11 g/L (Salinas ve ark, 2010), 0.52-1.10 g/L (Elmacı ve ark, 2014), 0.92-1.62 g/L (Aponte ve Blaiotta, 2016), 0.5-1.3 g/L (Labagnara, 2016) düzeylerinde olduğu bildirilmiştir.



Şekil 4.25. *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların oluşturdukları uçur asit miktarları

Sc, *S. cerevisiae*; Td, *T. delbrueckii*; Lt, *L. thermotolerans*; Io, *I. orientalis*; Hu, *H'spora uvarum*

Narince'den izole edilen *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettikleri uçur asit miktarı 0.7 g/L ile 1.0 g/L arasında değişmiş ve 773 kodlu *H'spora uvarum* izolatu dışındaki izolatlar 0.7 g/L'nin üzerinde asetik asit üretmişlerdir (Şekil 4.25). Apikulat mayalar genellikle yüksek miktarda asetik asit oluşturular (Jolly ve ark, 2013). Narince'den izole edilmiş apikulat mayalar ise asetik asit üretiminde çeşitlilik göstermiştir. *Sacharomyces* spp. dışındaki şarap mayalarının teknolojik özelliklerini belirlemek amacı ile yapılan çalışmalarda, *H'spora uvarum* suşlarının ürettiği uçur asit miktarının 0.68-0.98 g/L (Ciani ve Maccarelli, 1998), 0.62-1.22 g/L (Benedictis ve ark, 2011), 0.63-0.91 g/L (Tofalo ve ark, 2011), 0.88

g/L (Teixeira ve ark, 2014) düzeylerinde, *T. delbrueckii* suşlarının 0.02-0.72 g/L (Ciani ve Maccarelli, 1998), 0.3-0.5 g/L (Breda ve ark, 2013), *I. orientalis* suşun 0.86 g/L (Mónaco ve ark, 2014), düzeylerinde olduğu bildirilmiştir. *L. thermotorleans* suşlarının genellikle düşük miktarlarda, 0.18 g/L (Kapsopoulou ve ark., 2005), 0.26 g/L (Gobbi ve ark, 2013), düzeylerinde asetik asit ürettiği bildirilmiştir. Ancak Narince'den izole edilmiş *L. thermotolerans*' in ürettiği uçur asit miktarı literatürdeki bu değerlerden yüksek bulunmuştur.

Genel olarak Narince'den izole edilmiş *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların nispeten yüksek konsantrasyonlarda asetik asit ürettiği görülmektedir. Bu durum fermantasyon denemelerinin küçük hacimli şişelerde yapılmış olması ve örnekleme için fermantasyon şişelerinin sıklıkla açılmış olmasından kaynaklanabilir.

4.4.14. Mayaların Ürettiği Sekonder Metabolitler

4.4.14.1 Gliserol

Gliserol, su ve etanolden sonra şarapta en yüksek konsantrasyonda bulunan bileşiktir ve glikoliz sırasında oluşur. Sek şaraplarda gliserol miktarı 4 g/L ile 10 g/L değerleri arasında bulunur. Gliserol tatlı ve yağmsı bir bileşiktir ve şarabın gövdesi ve viskozitesi üzerinde etkilidir (Ribéreau-Gayon ve ark, 2006b).

Tokat ve Nevşehir Yörelerinden izole edilmiş *S. cerevisiae* izolatlarının ürettikleri gliserol miktarları Çizelge 4.12'de verilmiştir. Maya izolatlarının ürettikleri gliserol miktarları 4.75 g/L ile 7.73 g/L arasında değişmiş ve en yüksek gliserol üreten izolatın 606 kodlu izolat olduğu belirlenmiştir. Gliserolün algılanma eşik değeri 5.2 g/L'dir (Ugliano ve Henschke, 2009). 884, 1044 ve 1281 kodlu izolatlar hariç diğer izolatların ürettiği gliserol miktarı algılanma eşik değerinin üzerinde bulunmuştur. Farklı *S.cerevisiae* izolatları ve ticari *S. cerevisiae* suşunun ürettiği gliserol miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Nikolaou ve ark (2007), Hamburg Misketinden izole edilmiş *S. cerevisiae* suşlarının 3.57 g/L ile 6.17 g/L arasında gliserol ürettiğini, Aponte ve

ark (2016), ise 26 adet *S. cerevisiae* suşunun 5.84 g/L ile 7.99 g/L arasında gliserol ürettiğini bildirmişlerdir. Narinceden izole edilen *S. cerevisiae* izolatlarının ürettiği gliserol miktarları literatürlerde verilen bu değerler arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.12. *S.cerevisiae* izolatlarının ürettikleri gliserol miktarları

Maya kodu	Gliserol (g/L)
Kontrol	6.08±0.1 ^b
590	5.50±0.2 ^d
606	7.73±0.4 ^a
884	5.04±0.1 ^e
1028	5.89±0.3 ^{c,d}
1044	5.15±0.1 ^e
1088	5.22±0.2 ^e
1198	6.12±0.1 ^b
1281	4.78±0.1 ^f
1333	5.74±0.2 ^c
1378	5.54±0.2 ^{c,d}
F	*

F: varyans analizine göre farklılık durumu; * Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen izolatlar arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemli

Saccharomyces spp. olmayan izolatlarının ürettiği gliserol miktarları Çizelge 4.13' de verilmiştir. Mayaların ürettiği gliserol miktarları 4.36 g/L ile 6.05 g/L arasında bulunmuş, en yüksek gliserol üreten izolatın 214 kodlu *T. delbrueckii* olduğu belirlenmiştir. İzolatların ürettiği gliserol miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0.05). *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ticari *S. cerevisiae* suşundan daha düşük miktarda gliserol ürettiği belirlenmiştir. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlardan yalnızca 214 (*T. delbrueckii*) ve 521 (*T. thermotolerans*) kodlu izolatların ürettiği gliserol algılanma eşik değerinin üzerinde bulunmuştur. Breda ve ark (2013), *T. delbrueckii* suşlarının ürettiği gliserol miktarlarının 5 g/L ile 7.9 g/L arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Benedictis ve ark (2011), *H'spora uvarum* suşlarının 5.25 g/L ile 7.25 g/L arasında gliserol ürettiğini, Teixeira ve ark (2015), ise *H'spora uvarum* suşunun 11.9 g/L

gliserol ürettiğini bildirmişlerdir. Narineden izole edilen *H'spora uvarum* izolatlarının ürettiği gliserol miktarları bu değerlerin altında bulunmuştur.

Çizelge 4.13. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettikleri gliserol miktarları

Maya kodu	Maya türü	Gliserol (g/L)
Kontrol	<i>S. cerevisiae</i>	6.08±0.1 ^a
214	<i>T. delbrueckii</i>	6.05±0.2 ^a
521	<i>L. thermotolerans</i>	5.21±0.2 ^b
536	<i>I. orientalis</i>	4.99±0.2 ^c
773	<i>H'spora uvarum</i>	5.05±0.3 ^c
866	<i>H'spora uvarum</i>	4.36±0.1 ^e
942	<i>H'spora uvarum</i>	4.81±0.2 ^d
F		*

F: varyans analizine göre farklılık durumu; * Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen izolatlar arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemli

Narince'den izole edilen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettikleri gliserol miktarlarının ortalama değerleri karşılaştırıldığında *S. cerevisiae* izolatlarının *Saccharomyces* spp. olmayanlara göre daha yüksek miktarda gliserol ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Mayaların oluşturduğu gliserol miktarları

	Gliserol (g/L)			
	Ort	Min	Maks	SD
Kontrol	6.0 ^a	5.9	6.2	0.0
non- <i>Saccharomyces</i>	5.0 ^b	4.1	6.1	0.1
<i>S. cerevisiae</i>	5.6 ^{a,b}	4.7	7.7	0.1
F		*		

F, varyans analizine göre farklılık durumu; * Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen izolatlar arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemli; Ort., mayaların ürettiği gliserol miktarlarını ortalaması; Min., değerler arasındaki minimum değer; Max., değerler arasındaki maksimum değer

4.4.14.2 *S. cerevisiae* İzolatlarının Ürettiği Aroma Maddeleri

S. cerevisiae izolatlarının oluşturduğu aroma maddelerinin miktarları (mg/L) Çizelge 4.15'te verilmiştir. 606 kodlu izolat ile fermente edilmiş şarapta 26, diğer şaraplarda 27 adet aroma maddesi tanımlanmış ve bunların toplam miktarları 266 mg/L ile 736 mg/L arasında bulunmuştur.

Yüksek alkoller: Mayaların yüksek alkol oluşturma özelliği tür ve suş düzeyinde farklılık gösterir ve şarap üretimi sırasında kullanılacak maya seçilirken yüksek alkol oluşturma özelliği de göz önünde bulundurulur (Ugliano ve Henschke, 2009). Narineden izole edilen *S. cerevisiae* izolatlarının oluşturduğu aroma maddeleri içerisinde yüksek alkoller (606 kodlu izolat hariç) en yüksek miktarda açığa çıkan bileşikler olmuştur. Toplam yüksek alkol miktarları izolatlar arasında değişkenlik göstermiş ve 150 mg/L ile 372 mg/L arasında değişmiştir (Çizelge 4. 15). Şaraplarda mayaların oluşturduğu yüksek alkollü bileşiklerin miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Şarapta toplam yüksek alkol miktarının 300 mg/L'nin altında olması istenir. Daha yüksek konsantrasyonlar şaraba hoş olmayan keskin bir koku kazandırır (Henschke ve Jiranek, 2002; Riberau-Gayon ve ark, 2006a). Narineden izole edilmiş *S. cerevisiae* izolatları arasında 1378 hariç diğerlerinin ürettiği yüksek alkol miktarları uygun bulunmuştur. Regodón Mateos ve ark (2006), *S. cerevisiae* suşlarının oluşturduğu yüksek alkol miktarlarınının şıranın bileşimi, fermantasyon koşulları ve kullanılan suşa göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.15. *S. cerevisiae* izolatlarının ürettikleri aroma maddelerinin miktarları

		AROMA BİLEŞİKLERİ (mg/L)												F
Yüksek alkoller	LRI ID	K	590	606	884	1028	1044	1088	1198	1281	1333	1378		
1-propanol	987/ABC	2.36±0.02 ^b	1.34±0.1 ^f	2.91±0.1 ^a	1.83±0.02 ^d	1.66±0.2 ^d	1.13±0.02 ^g	2.35±0.04 ^b	1.62±0.02 ^e	1.11±0.02 ^g	1.91±0.01 ^c	1.29±0.05 ^f	*	
İzobutil alkol	1024/ABC	13.14±0.09 ^f	13.26±0.7 ^c	19.50±1 ^a	9.37±0.13 ^d	19.17±5 ^b	13.26±0.22 ^e	13.50±0.15 ^e	9.26±0.25 ^d	13.38±0.15 ^e	9.82±0.04 ^b	14.31±0.4 ^b	*	
İzoamil alkol	1176/ABC	190.27±3.7 ^d	182.73±8 ^d	126.40±4 ^f	114.31±2.5 ^g	243.49±6 ^b	198.86±2.8 ^c	188.84±0.01 ^d	136.34±5 ^e	182.62±1 ^d	133.63±0.5 ^e	253.51±7.5 ^a	*	
2,3-Butanediol	1495/ABC	0.56±0.04 ^c	0.28±0.01 ^e	0.38±0.01 ^e	0.12±0.01 ^g	0.03±0.00 ^h	0.20±0.02 ^f	0.40±0.01 ^d	1.19±0.01 ^d	0.41±0.02 ^d	1.52±0.06 ^b	0.15±0.01 ^g	*	
Methionol	1737/ABC	0.81±0.02 ^b	0.39±0.02 ^e	0.53±0.02 ^e	0.25±0.01 ^g	0.53±0.01 ^g	0.49±0.01 ^d	0.34±0.01 ^f	0.33±0.01 ^f	0.45±0.04 ^d	0.47±0.01 ^d	0.89±0.05 ^a	*	
2-Fenil etanol	1905/ABC	63.28±0.7 ^b	42.72±1.5 ^d	29.90±0.6 ^f	24.99±0.7 ^g	37.46±0.5 ^e	49.66±0.65 ^c	47.53±0.1 ^d	25.25±0.1 ^g	43.08±1 ^d	48.63±3 ^e	102.52±3.5 ^b	*	
Toplam		270.42	240.72	179.62	150.87	302.34	263.6	252.96	173.99	241.05	195.98	372.67		
Esteryler														
Etil asetat**	898/ABC	30.3±1.7 ^e	29.38±0.3 ^e	531.09±6 ^a	83.39±1.4 ^d	28.70±0.9 ^e	29.9±0.5 ^e	27.26±0.11 ^{e,f}	105.43±3 ^b	24.26±0.04 ^f	62.39±1.5 ^f	24.14±0.7 ^f	*	
İzoamil asetat	1119/ABC	1.67±0.1 ^e	1.87±0.07 ^d	0.71±0.03 ^h	1.37±0.06 ^h	2.96±0.1 ^a	2.17±0.02 ^e	0.63±0.01 ^g	2.59±0.07 ^g	1.95±0.03 ^d	1.68±0.01 ^e	2.42±0.07 ^b	*	
hekzil asetat	1222/ABC	0.24±0.03 ^e	0.17±0.01 ^e	0.13±0.01 ^f	0.18±0.01 ^f	0.29±0.01 ^a	0.13±0.01 ^f	0.56±0 ^b	0.25±0.01 ^b	0.10±0.01 ^g	0.21±0.01 ^d	0.21±0.01 ^d	*	
Etil heksanoat	1238/ABC	0.35±0.01 ^{b,c,d}	0.29±0.02 ^f	0.09±0.00 ^g	0.33±0.01 ^{c,d,e}	0.53±0.03 ^{b,c}	0.36±0.01 ^c	0.12±0.01 ^g	0.37±0.01 ^b	0.31±0.01 ^{e,f}	0.32±0.05 ^{d,e,f}	0.35±0.02 ^{b,c,d}	*	
Etil laktat	1310/ABC	0.20±0.03 ^e	0.18±0.01 ^e	0.15±0.01 ^f	0.15±0.01 ^f	0.78±0.02 ^a	0.19±0.02 ^e	0.22±0.03 ^d	0.19±0.01 ^e	0.19±0.01 ^e	0.3±0.01 ^e	0.33±0.01 ^b	*	
Etil oktanat	1430/ABC	0.21±0.01 ^b	0.17±0.02 ^{c,d}	sp	0.18±0.01 ^e	0.17±0.01 ^{d,e}	0.23±0.01 ^a	0.6±0 ^b	0.10±0.01 ^g	0.17±0.02 ^{c,d}	0.13±0.01 ^f	0.16±0.01 ^e	*	
Etil-3-hidroksibütanoat	1483/ABC	0.22±0.04 ^b	0.20±0.01 ^c	0.14±0.02 ^g	0.15±0.01 ^f	0.24±0.02 ^a	0.15±0.01 ^f	0.16±0.01 ^e	0.14±0.01 ^h	0.14±0.01 ^h	0.18±0.01 ^d	0.18±0.01 ^d	*	
Etil dekanat	1634/ABC	0.07±0.02 ^{c,d}	0.04±0.01 ^f	0.08±0.00 ^b	0.02±0.01 ^g	0.08±0.00 ^b	0.06±0.01 ^{d,e}	0.40±0.02 ^a	0.04±0.01 ^f	0.05±0.00 ^{e,f}	0.07±0.00 ^{b,c}	0.06±0.01 ^{c,d}	*	
2-Feniletil asetat	1786/ABC	0.27±0.04 ^f	0.44±0.02 ^d	0.18±0.01 ^g	0.25±0.01 ^f	0.59±0.03 ^b	0.48±0.01 ^c	0.27±0.02 ^e	0.36±0.01 ^e	0.47±0.02 ^c	0.28±0.01 ^f	0.86±0.07 ^a	*	
Etil-4-hidroksibütanoat	1819/ABC	3.06±0.06 ^d	2.87±0.2 ^d	1.5±0.3 ^e	1.15±0.02 ^h	1.08±0.3 ^b	3.36±0.05 ^c	2.53±0.3 ^e	2.56±0.1 ^f	4.06±0.22 ^a	3.80±0.3 ^b	2.46±0.09 ^f	*	
Etil hidrojen süksinat	2440/ABC	0.13±0.01 ^e	0.11±0.01 ^f	0.07±0.00 ^g	0.11±0.01 ^f	0.23±0.01 ^a	0.16±0.01 ^d	0.07±0.00 ^g	0.01±0 ^h	0.24±0.01 ^a	0.21±0.01 ^b	0.19±0.03 ^c	*	
Toplam		36.72	35.72	534.14	87.28	35.65	37.13	31.33	112.04	31.94	69.57	31.36		
Uçucu asitler														
Asetik asit	1394/ABC	0.54±0.02 ^f	0.63±0.01 ^e	1.047±0.2 ^e	0.62±0.01 ^e	0.86±0.1 ^d	0.33±0.05 ^g	0.37±0.02 ^g	1.45±0.03 ^b	0.38±0.02 ^g	1.12±0.3 ^b	0.60±0.02 ^e	*	
İzobütirik asit	1588/ABC	0.23±0.02 ^h	0.31±0.01 ^e	0.29±0.01 ^f	0.25±0.02 ^g	0.37±0.01 ^b	0.34±0.01 ^e	0.32±0.01 ^{d,e}	0.13±0.01 ^{d,e}	0.33±0.02 ^{c,d}	0.19±0.01 ⁱ	0.42±0.02 ^g	*	
Bitirik asit	1647/ABC	0.12±0.01 ^e	0.14±0.01 ^e	0.03±0.00 ^g	0.11±0.01 ^f	0.23±0.02 ^a	0.12±0.01 ^e	0.12±0.01 ^{e,f}	0.13±0.01 ^d	0.13±0.01 ^d	0.15±0.01 ^d	0.13±0.01 ^d	*	
İzovalerik asit	1684/ABC	0.62±0.01 ^c	0.56±0.02 ^d	0.17±0.01 ^g	0.27±0.01 ^f	0.86±0.04 ^a	0.71±0.01 ^b	0.69±0.03 ^b	0.16±0.01 ^g	0.62±0.05 ^c	0.34±0.01 ^e	0.85±0.01 ^a	*	
Heksanoik asit	2089/ABC	1.87±0.02 ^g	2.63±0.2 ^{c,d}	0.55±0.02 ^h	1.86±0.02 ^g	2.83±0.1 ^b	2.48±0.04 ^f	1.93±0.02 ^g	2.75±0.03 ^{b,c}	2.4±0.1 ^{d,e}	3.03±0.2 ^a	2.31±0.04 ^f	*	
Oktanik asit	2133/ABC	2.74±0.1 ^{d,e}	2.62±0.07 ^e	0.42±0.02 ^h	2.42±0.02 ^g	3.81±0.2 ^a	2.82±0.03 ^d	1.56±0.03 ^g	3.65±0.06 ^b	1.57±0.4 ^g	2.95±0.4 ^e	2.85±0.01 ^{c,d}	*	
Dekanoik asit	2264/ABC	1.38±0.1 ^a	0.37±0.03 ^g	0.26±0.01 ^h	0.47±0.01 ^f	0.84±0.03 ^c	0.58±0.01 ^e	0.07±0.00 ^g	0.98±0.06 ^b	0.17±0.01 ⁱ	0.74±0.02 ^g	0.57±0.01 ^e	*	
Heksadekanoik asit	2886/ABC	0.39±0.01 ^d	0.85±0.05 ^b	0.14±0.01 ^g	0.15±0.02 ^g	0.06±0.00 ^h	1.61±0.08 ^a	0.1±0.01 ^{g,h}	0.77±0.07 ^e	0.21±0.01 ^f	0.28±0.01 ^e	0.90±0.08 ^b	*	
Toplam		7.89	8.11	2.91	6.45	9.86	8.99	5.16	10.01	5.91	8.8	8.63		

Çizelge 4.15' nin devamı

Laktonlar	LRI	ID	K	590	606	884	1028	1044	1088	1198	1281	1333	1378	F
Gamma-Bütürolakton	1588	ABC	0.40±0.04 ^{fg}	0.32±0.01 ^{hi,i}	0.53±0.02 ^d	0.49±0.01 ^{de}	2.25±0.1 ^a	0.23±0.01 ^j	0.34±0.01 ^{gh}	0.44±0.01 ^{ci}	0.26±0.01 ^{ij}	0.67±0.02 ^c	0.81±0.01 ^b	*
Toplam			0.4	0.32	0.53	0.49	2.25	0.23	0.34	0.44	0.26	0.67	0.81	
Aldehitler														
Asetaldehit**	706	ABC	11.12±0.5 ^{de}	13.5±0.3 ^c	18.80±0.9 ^b	21.35±0.7 ^a	4.42±0.6 ^e	8.39±0.4 ^f	18.43±0.2 ^b	19.76±5 ^{ab}	12.49±0.06 ^{cd}	14.06±1 ^c	9.26±0.7 ^{ef}	*
Toplam			11.12	13.5	18.8	21.35	4.425	8.39	18.43	19.76	12.49	14.06	9.26	
Genel Toplam			326.55	298.37	736.01	266.44	354.52	318.34	308.22	316.24	291.65	289.08	422.73	

LRI, DB wax kolonda belirlenen Kovats indeksi değeri; ID, Tanımlama; A, standartların enjekte edilmesi ile tanımlanması; B, kütle spektrometresi kullanılarak tanımlama; C, alkonma indeksini literatürle karşılaştırarak tanımlama; sp, saptanamadı; F: varyans analizine göre farklılık durumu, *: p<0.05 önem düzeyinde önemli; **:miktarları direk enjeksiyonlar GC-FID' da belirlenmiştir

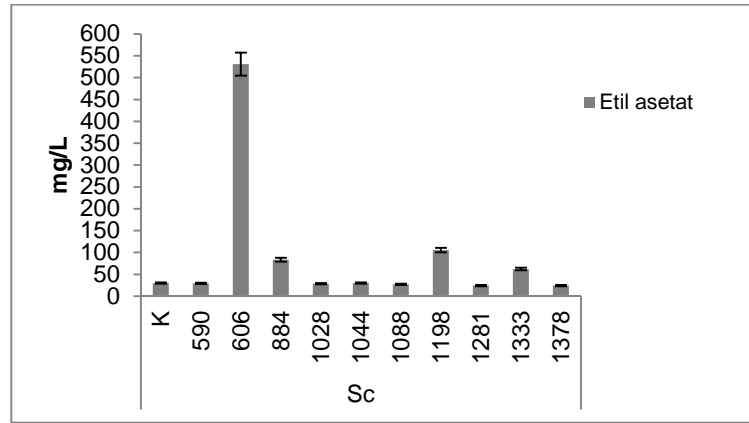
İzolatların oluşturduğu yüksek alkoller içerisinde en baskın olanı izoamil alkol olmuştur. Bu bileşik algılanma eşik değeri olan 30 mg/L'nin üzerinde fuzel alkol ve peynir altı suyu kokusu verir (Swiegers ve ark., 2005). Narineden izole edilen *S. cerevisiae* izolatlarının oluşturduğu izoamil alkol miktarı 114 mg/L ile 253 mg/L arasında değişmiştir. En yüksek izoamil alkol oluşturan izolat 1378 (253 mg/L) olmuş ve bunu 1028 (243 mg/L) kodlu izolat takip etmiştir. En düşük izoamil alkol oluşturan izolat ise 884 (114 mg/L) olmuştur. Airén şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen 13 farklı *S. cerevisiae* suşunun ürettiği izoamil alkol miktarının 79-213 mg/L değerleri arasında olduğu bildirilmiştir (Perez-Coello ve ark., 1999).

Şarapta mayaların oluşturduğu yüksek alkoller içerisinde en önemli bileşiklerden biri de aromatik alkol olan 2-fenil etanoldür. Bu bileşik algılanma eşik değeri olan 10 mg/L'nin üzerinde çiçeksi, gül kokuları verir (Fleet, 2008). İzolatların oluşturduğu 2-fenil etanol miktarı 24 mg/L ile 102 mg/L arasında bulunmuştur. En yüksek 2-fenil etanol oluşturan izolat 1378 olmuş ve bunu sırasıyla ticari maya suşu, 1044, 1333 ve 1088 kodlu izolatlar takip etmiştir. En düşük 2-fenil etanol üreten izolat ise 884 kodlu izolat olmuş ve bunu sırasıyla 1198 ve 606 kodlu izolatlar takip etmiştir. Perez-Coello ve ark (1999), izole ettikleri *S. cerevisiae* izolatlarının ürettiği 2-fenil etanol miktarının 8 mg/L ile 66 mg/L değerleri arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Esterler: Esterlerin büyük bir kısmı maya metabolizması sonucunda alkol fermantasyonu sırasında oluşurlar ve özellikle genç şarapların meyvemsi aromasından sorumludurlar (Bartowski ve Pretorius, 2009). Esterler kaynaklarına göre, yüksek alkollerin asetatları (en önemlileri etil asetat, hekzil asetat, izoamil asetat ve 2-fenil etil asetat' tır) ve yağ asitlerinin etil esterleri (en önemlileri etil hekzanoat, etil oktanoat ve etil dekanat' tır) olmak üzere iki grup altında toplanabilirler (Swiegers ve ark., 2005). Narineden izole edilen *S. cerevisiae* izolatları ile yapılan fermantasyonların sonunda elde edilen şaraplarda 11 adet ester bileşiği tanımlanmış ve bunların toplam miktarları 31 mg/L ile 534 mg/L arasında

değişmiştir. En yüksek miktarda toplam ester üreten izolat 606 olmuş ve bunu sırasıyla 1198 ve 884 kodlu izolatlar izlemiştir. Şaraplarda mayaların oluşturduğu ester bileşiklerinin miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

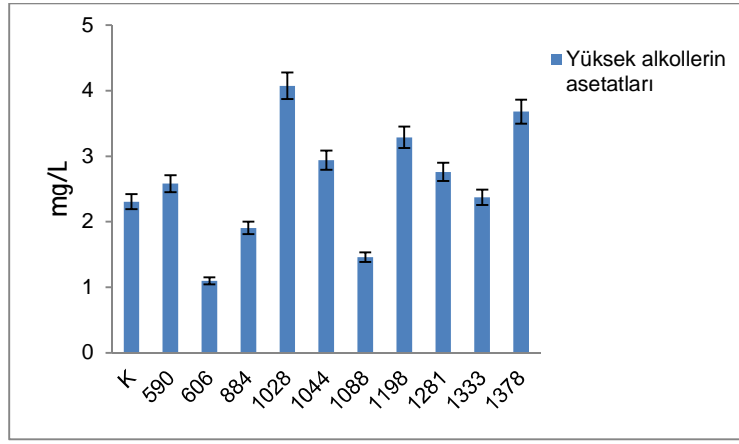
İzolatların ürettiği yüksek alkollerin asetatları arasında öne çıkan ester bileşiği etil asetat olmuştur. Etil asetatın algılanma eşik değeri 7.5 mg/L'dir ve düşük konsantrasyonlarda şaraba meyvemsi aroma ile katkı sağlarken 150-200 mg/L'nin üzerinde şarap aromasını olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Swiegers ve ark, 2005, Benedictis ve ark, 2011). İzolatların ürettiği etil asetat miktarı 24 mg/L ile 531 mg/L arasında bulunmuştur. En yüksek etil asetat üreten izolat 606 ve bunu sırasıyla 1198 (105 mg/L) ve 884 (83 mg/L) izolatları izlemiştir. En düşük miktarda etil asetat üreten izolatlar ise 1281 ve 1378 (24 mg/L) olmuştur. (Şekil 4.26). Tüm izolatların oluşturduğu etil asetat miktarları algılanma eşik değerinin üzerinde bulunmuş ancak 606 kodlu izolat oldukça yüksek değerde (531 mg/L) etil asetat üretmiştir. Yüksek miktarda etil asetat üretmesinden dolayı 606 kodlu izolatın kalite şarap üretimi için uygun olmadığı benimsenmiştir.



Şekil 4.26. *S. cerevisiae* izolatlarının ürettiği etil asetat miktarları

Etil asetat hariç izolatların ürettiği yüksek alkollerin asetatlarının toplam miktarı 1.10 mg/L ile 4 mg/L arasında bulunmuş, etil asetat dışında yüksek alkollerin asetatlarını en yüksek miktarda üreten izolat 1028 olmuş ve bunu sırasıyla 1378 ve 1198 kodlu izolatlar takip etmiştir (Şekil 4.27). İzolatların ürettiği yüksek alkollerin asetatları arasındaki önemli bileşikler izoamil asetat, 2-feniletıl asetat ve hekzil asetat olmuştur. İzoamil asetat algılanma eşik değerin (0.03 mg/L) üzerinde şaraba armut-muz kokusu verir (Swiegers ve ark., 2005). Narinceden izole edilmiş izolatların ürettiği izoamil asetat miktarı 0.63 mg/L ile 2.96 mg/L arasında değişmiştir. En yüksek izoamil asetat üreten izolat 1028 olmuş ve bunu sırasıyla 1198 (2. 59 mg/L) ve 1378 (2.42 mg/L) kodlu izolatlar takip etmiş, en düşük miktarda izoamil asetat üreten izolat ise 1088 (0.63 mg/L) olmuştur. 2- Feniletıl asetat algılanma eşik değerin (0.25 mg/L) üzerinde şaraba çiçeksi-meyvemsi kokular verir (Swiegers ve ark, 2005). Narinceden izole edilmiş izolatların ürettiği 2-feniletıl asetat miktarı 0.18 mg/L ile 0.86 mg/L arasında bulunmuştur. En yüksek miktarda 2-feniletıl asetat üreten izolat 1378 olmuş ve bunu sırasıyla 1028 (0.59 mg/L) ve 1281 (0. 47 mg/L) kodlu izolatlar takip etmiştir. En düşük miktarda 2-feniletıl asetat üreten izolat 606 olmuş ve bu izolatın ürettiği 2-feniletıl asetat miktarı algılanma eşik değerin altında bulunmuştur. Şarap aroması için önemli diğer bir ester bileşiği olan hekzil asetat algılanma eşik değerin (0.7 mg/L) üzerinde şaraba-tatlı-parfüm-meyvemsi kokular verir (Swiegers ve ark, 2005). Narinceden izole edilmiş izolatların ürettiği hekzil asetat miktarı 0.13 mg/L ile 0.56 mg/L değerleri arasında bulunmuştur. En yüksek miktarda hekzil asetat üreten izolat 1088 olmuş ve bunu sırasıyla 1028 (0.29 mg/L) ve 1198 (0.25 mg/L) kodlu izolatlar takip etmiştir. *S. cerevisiae* türü mayaların ürettiği yüksek alkollerin asetatlarının miktarı, mayanın esteraz aktivitesine göre değişebilir. Bununla birlikte *S. cerevisiae*' da ATF1 geni ile kontrol edilen alkol asetiltransferaz (AATase) yüksek alkollerin asetatlarının oluşmasını sağlayan en önemli enzimdir. Ancak *S. cerevisiae*' nın farklı tipte birçok AATase enzimine sahip olduğu ve mayanın ürettiği yüksek alkollerin asetatlarının miktarının suş

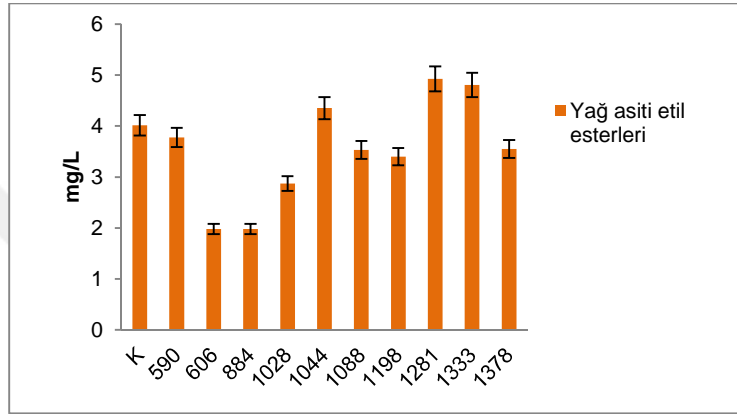
düzeyinde farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Fuji ve ark., 1996; Plata ve ark., 2003). Narineden izole edilen *S. cerevisiae* izolatlarının ürettiği yüksek alkollerin asetatlarının miktarlarının farklı olması, mayaların estereaz aktivitelerinin ve ATTase enzimlerinin suş düzeyinde farklılık göstermesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.27. *S. cerevisiae* izolatlarının ürettikleri (etil asetat hariç) yüksek alkollerin asetatlarının miktarları

İzolatların ürettiği yağ asiti etil esterlerinin toplam miktarı 1.98 mg/L ile 4.92 mg/L arasında değişmiştir. Yağ asiti etil esterlerini en yüksek miktarda üreten izolat 1281 olmuş ve bunu sırasıyla 1333 ve 1044 kodlu izolatlar takip etmiştir (Şekil 4.28). İzolatların ürettiği yağ asitlerinin etil esterleri arasında miktar olarak önce çıkan bileşikler etil heksanoat ve etil oktanoat olmuştur. Etil heksanoat algılanma eşik değerinin (0.014 mg/L), üzerinde şaraba meyvemsi, yeşil elma kokuları verir (Swiegers ve ark, 2005). İzolatların ürettiği etil heksanoat miktarı 0.09 mg/L ile 0.53 mg/L arasında bulunmuştur. En yüksek miktarda etil heksanoat oluşturan izolat 1028 olmuş ve bunu sırasıyla 1198 (0.37 mg/L) ve 1044 (0.36 mg/L) kodlu izolatlar takip etmiştir. Etil oktanoat algılanma eşik değerinin (0.005 mg/L) üzerinde şaraba tatlı-çiçeksi-meyvemsi kokular verir (Swiegers ve ark.,

2005; Gil ve ark, 2006). İzolatların ürettiği etil oktanoat miktarı 0.10 mg/L ile 0.6 mg/L arasında değişmiş, 606 kodlu izolatın ürettiği etil oktanoat miktarı belirlenememiştir. En yüksek miktarda etil oktanoat üreten izolat 1088 olmuş ve bunu sırasıyla 1044 kodlu izolat (0.23 mg/L) ve kontrol mayası (0.21 mg/L) takip etmiştir.



Şekil 4.28. *S. cerevisiae* izolatlarının ürettikleri yağ asiti etil esterlerinin miktarları

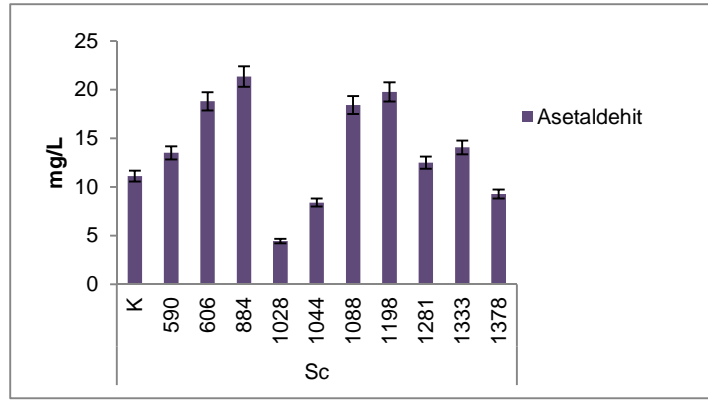
Uçucu asitler: Şarapta bulunan uçucu asitleri etkileyen başlıca faktörler, maya suşu, ortamdaki besin miktarı, fermantasyon koşullarıdır. Şarap fermantasyonunda maya metabolizması sonucunda oluşan uçucu asitlerin %90'nını asetik asit, geri kalanını ise propanoik, bütanoik, oktanoik asit gibi uçucu asitler oluşturur. Fermantasyon sırasında oluşan hekzanoik, oktanoik ve dekanolik asit özellikle beyaz şarap aromasına katkı sağlar (Ribéreau-Gayonve ark, 2006a; Ugliano ve Henschke, 2009). Narineden izole edilen *S. cerevisiae* izolatları ile yapılan fermantasyonların sonunda elde edilen şaraplarda 8 adet uçucu asit bileşiği tanımlanmış ve miktarları 2.9 mg/L ile 10 mg/L arasında değişmiştir. En yüksek miktarda uçucu asit oluşturan izolat 1198 olmuş ve bunu sırasıyla 1044, 1333 ve 1378 kodlu izolatlar takip etmiştir. *S. cerevisiae* izolatlarının oluşturduğu uçucu asit miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

İzolatların ürettiği, miktar olarak öne çıkan uçucu asitler oktanoik ve hekzanoik asit olmuştur. Oktanoik asitin algılanma eşik değeri 10 mg/L dir ve algılanma eşik değerinin üzerinde şaraba yanık, olgun peynir kokuları verir. Narineden izole edilen *S. cerevisiae* izolatlarının ürettiği oktanoik asit miktarı 0.42 mg/L ile 3. 65 mg/L arasında değişmiştir. Hekzanoik asitin algılanma eşik değeri 8 mg/L dir ve algılanma eşik değerinin üzerinde şaraba olgun peynir kokusu verir. İzolatların ürettiği hekzanoik asit miktarı 0.55 mg/L ile 3 mg/L arasında değişmiştir. İzolatların ürettiği oktanoik ve hekzanoik asit algılanma eşik değerlerinin altında bulunmuştur.

Laktonlar: Laktonlar fermantasyon sırasında oluşurlar ve bazıları üzümlemlerden de gelebilirler. En iyi bilinen lakton gama-bütirolaktondur ve şarabın duyuşsal özelliğine önemli bir katkısı yoktur (Ribéreau-Gayonve ark., 2006a). Narineden izole edilen *S. cerevisiae* izolatları ile yapılan fermantasyonların sonunda elde edilen şaraplarda yalnızca gama-bütirolakton bileşiği tanımlanmış ve miktarı 0.23 mg/L ile 0.81 mg/L arasında değişmiştir. İzolatların oluşturduğu gama-bütirolakton miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Gama bütirolaktonun algılanma eşik değeri 20 mg/L' dir (Swiegers ve ark, 2005). İzolatların ürettiği gama bütirolakton miktarı bu değerin oldukça altında bulunmuştur.

Asetaldehit: Asetaldehit şarapta en fazla bulunan karbonil bileşiğidir ve şaraptaki konsantrasyonu maya suşuna göre değişiklik gösterir (Bartowsky ve Pretorius, 2009). Şarapta asetaldehit miktarının yıllanma ile birlikte arttığı ancak genç şaraplarda maya suşunun asetaldehit oluşumuna etki ettiği bildirilmiştir (Peinado ve Mauricio, 2009). Asetaldehit miktarı Narineden izole edilen *S. cerevisiae* izolatları ile elde edilen şaraplarda 4.4 mg/L ile 21.3 mg/L arasında değişmiştir. En yüksek miktarda asetaldehit üreten izolat 884 olmuş ve bunu sırasıyla 1198 (19 mg/L) ve 606 kodlu (18 mg/L) izolatlar takip etmiştir (Şekil 4.29). İzolatların ürettiği asetalehit miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Asetaldehit'in algılanma eşik değeri 100 mg/L' dir,

düşük miktarlarda şaraba meyvemsi aroma verirken 200 mg/L'nin üzerinde şarabın duyuusal özelliklerini olumsuz etkiler ve özellikle beyaz şarapta oksidasyon göstergesi olarak kabul edilir (Bartowsky ve Pretorius, 2009). Narineden izole edilmiş izolatların ürettiği asetaldehit miktarı algılanma eşik değerinin altında bulunmuştur. Ciani ve Maccarelli (1998), izole ettikleri 50 *S. cerevisiae* suşununun 25 mg/L ile 106 mg/L arasında asetaldehit ürettiklerini bildirmişlerdir. Perez-Coello ve ark (1999), izole ettikleri farklı *S. cerevisiae* suşlarının ürettikleri asetaldehit miktarlarının 18 mg/L ile 670 mg/L arasında değiştiğini; Csomó ve ark (2010), ise izole ettikleri *S. cerevisiae* suşlarının 7.9 mg/L ile 315 mg/L arasında asetaldehit ürettiklerini bildirmişlerdir.

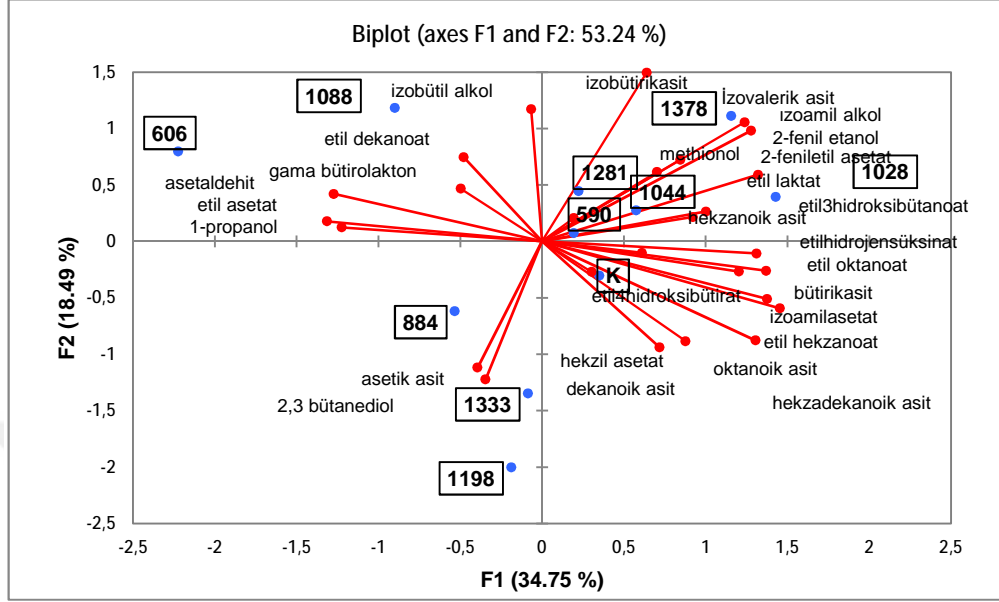


Şekil 4.29. *S. cerevisiae* izolatlarının ürettikleri asetaldehit miktarları

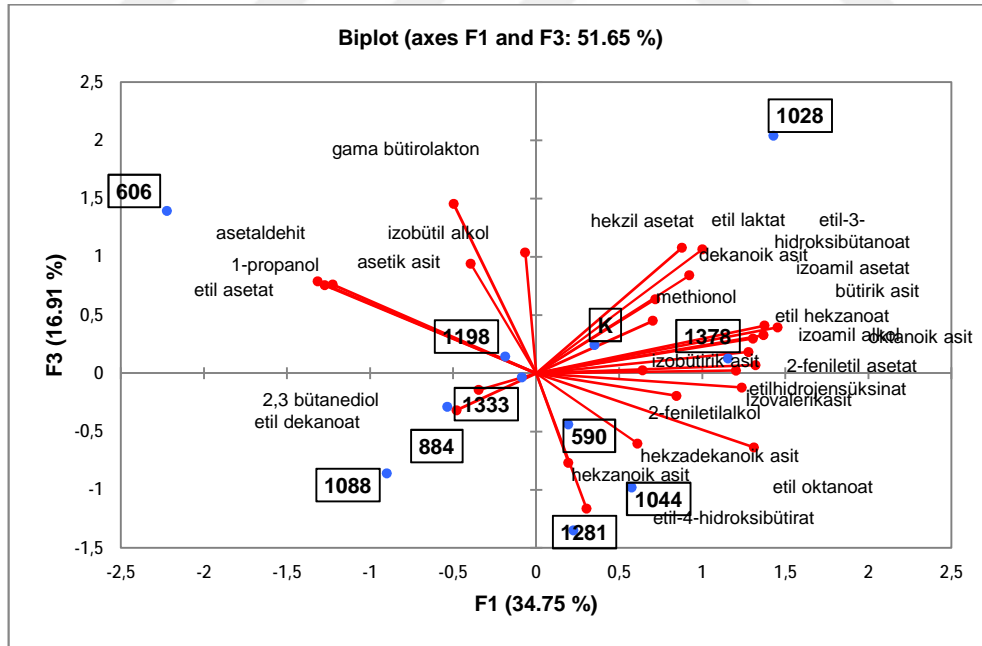
Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* izolatlarının ürettikleri aroma maddeleri miktarlarının temel bileşen analizi sonuçları iki farklı diyagramda (Şekil 4. 30, 4.31) verilmiştir. Temel bileşen analizine göre F1 bileşeni % 34.75, F2 bileşeni %18.49, F3 bileşeni %16.91, F4 bileşeni ise % 8.09 oranında varyansı açıklamaktadır ve temel bileşen analizi toplamda 4 bileşen ile %78.24 oranında varyansı açıklamaktadır. F4 bileşeni varyansı %10'un altında açıkladığı için dikkate alınmamıştır.

PCA korelasyon matrisine göre (Şekil 4.30, Şekil 4.31) 1. Boyut bileşeni (F1) 1-propanol, izoamil alkol, etil asetat, izoamil asetat, etil hekzanoat, 2-feniletil asetat, bütirik asit, izovalerik asit, oktaonik asit ve asetaldehit bileşiklerini açıklarken, F2 izobütül alkol, asetik asit, izobütirik asit bileşiklerini açıklamış, F3 bileşeni ise hegzil asetat, etil laktat ve gama-bütürolakton bileşenlerini açıklamıştır. F1(% 34.75) bileşeni kontrol mayası, 884, 1333 ve 1198 kodlu izolatları diğer izolatlardan ayırırken, F2 (%18.49) ve F3 (%16.91) bileşenleri, 606, 1088, 884, 1333 ve 1198 kodlu izolatları diğer izolatlardan ayırmıştır

Şekil 4.30' a göre F1 ve F2 bileşenleri, maya izolatlarını ve aroma maddelerini 4 guruba ayırmıştır. 606 ve 1088 kodlu izolatlar ile birlikte gama-bütürolakton, etil asetat, asetaldehit, izobütül alkol, 1-propanol ve etil dekanolat bileşikleri sol üst kısımda toplanmıştır. 1-Propanol, izoamil asetat (-0.693; $p<0.05$), etil oktanoat (-0.682, -0.602; $p<0.05$), 2-feniletil asetat (-0.694; $p<0.05$), etil hekzanoat (-0.603; $p<0.05$), bileşikleri ile, etil asetat, etil oktanoat (-0.800; $p<0.05$) ile, asetaldehit bileşiği ise etil hekzanoat (-0.630; $p<0.05$), etil oktanoat (-0.776; $p<0.05$), bütirik asit (-0.712; $p<0.05$) ve oktanoik asit (-0.639; $p<0.05$) bileşikleri ile negatif korelasyon göstermiştir. 1378, 1028, 1044, 590 ve 1281 kodlu izolatlar ile İzoomil alkol, izovalerik asit, 2-fenil etanol, 2-feniletil asetat, hekzanoik asit, etil laktat, etil-3-hidroksibütanoat bileşikleri sağ üst kısımda toplanmıştır. Bu bileşiklerden, 2-feniletil asetat, 1-propanol (-0.694; $p<0.05$) ile, izovalerik asit, etil asetat (0.610; $p<0.05$), asetik asit (0.659; $p<0.05$) bileşikleri ile negatif korelasyon göstermiştir. 884, 1198 ve 1333 izolatlar ile 2,3 bütanediol ve asetik asit bileşikleri sol alt kısımda toplanmıştır. Asetik asit bileşiği izobütirik asit (-0.639; $p<0.05$) ve izovalerik asit (-0.659; $p<0.05$) ile negatif korelasyon göstermiştir. Kontrol mayası (K) ile hegzil asetat, izoamil asetat ve birçok uçucu asit bileşiği ile sağ alt kısımda toplanmıştır. İzoomil asetat, 1-propanol (-0.693; $p<0.05$) ve etil dekanolat (-0.645 $p<0.05$) bileşikleri ile negatif korelasyon göstermiştir.



Şekil 4.30. Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* izolatlarının ürettikleri aroma maddelerinin temel bileşen analizi; F1 ve F2 bileşenleri



Şekil 4.31. Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* izolatlarının ürettikleri aroma maddelerinin temel bileşen analizi; F1 ve F3 bileşenleri

4.4.14.3. *Saccharomyces* spp. Olmayan İzolatların Ürettiği Aroma Maddeleri

Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilmiş *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettiği aroma maddelerinin miktarları (mg/L) Çizelge 4.16'da verilmiştir. İzolatların ürettiği aroma maddelerinin sayısı farklılık göstermiş, 521, 536, 866 ve 942 kodlu izolatlar 27 adet aroma maddesi oluşturmuş, 214 kodlu izolat 26, 773 kodlu izolat 25 adet aroma maddesi oluşturmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların ürettikleri aroma maddelerinin toplam miktarları 185 mg/L ile 300 mg/L arasında değişmiştir.

Yüksek alkoller: Narinceden izole edilen *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlarının oluşturduğu aroma maddeleri içerisinde yüksek alkoller en yüksek miktarda açığa çıkan bileşikler olmuştur. Toplam yüksek alkol miktarı türler arasında değişiklik göstermiş ve 129 mg/L ile 250 mg/L arasında bulunmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettiği toplam yüksek alkol miktarı ticari *S. cerevisiae* suşuna göre düşük bulunmuştur. Genellikle *Saccharomyces* spp. olmayan suşların ürettiği toplam yüksek alkol miktarı *S. cerevisiae* suşlarına göre daha düşüktür (Manzanares ve ark., 2011). Toplam yüksek alkol miktarını en fazla üreten izolat 536 kodlu *I. orientalis* olmuş, bunu *L. thermotolerans* (521) ve *T. delbrueckii* (214) izolatları takip etmiştir. İzolatların ürettiği yüksek alkollerin miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Clemente-Jimenez ve ark (2004), yaptıkları çalışmada *S. cerevisiae* suşunun *Saccharomyces* spp. olmayan suşlara göre daha fazla yüksek alkol oluşturduğunu belirtmişlerdir. *H'spora uvarum* suşunun ise en yüksek miktarda (201 mg/L) yüksek alkol oluşturan *Saccharomyces* spp. olmayan suş olduğunu ve bunu sırasıyla *I. orientalis* (170 mg/L) ve *C. stellata* (164 mg/L) suşlarının izlediğini bildirmişlerdir. Narince'den izole edilen *I. orientalis* izolatının ürettiği toplam yüksek alkol miktarı literatürde verilen bu değer üzerinde (250 mg/L) bulunmuştur. Benedictis ve ark (2011), *H'spora uvarum* suşlarının ürettiği toplam yüksek alkol miktarının 37 mg/L ile 73 mg/L arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Narince'den izole edilen *H'spora uvarum* izolatlarının ürettiği toplam yüksek alkol miktarı ise diğer izolatlara göre daha düşük miktarda olup 129 mg/L ile 160 mg/L arasında bulunmuştur.

Narineden izole edilen izolatların oluşturduğu yüksek alkoller içerisinde en baskın olanı izoamil alkol olmuştur. İzamil alkol miktarı 101 mg/L ile 197 mg/L arasında değişmiş, en yüksek izoamil alkol üreten tür 536 kodlu *I. orientalis* olmuş bunu sırasıyla ticari maya suşu (190 mg/L) ve 521 kodlu *L. thermotolerans* (178 mg/L) takip etmiştir. *H'spora uvarum* türleri ise (773, 866, 942) en düşük miktarda izoamil alkol üreten türler olmuştur. Romano ve ark (2003), *H'spora uvarum* türünün 50 mg/L'nin latında izoamil alkol oluşturduğunu bildirmişlerdir. Clemenete-Jimenez ve ark (2004), *H'spora uvarum* türünün oluşturduğu izoamil alkol miktarının 114 mg/L, *I. orientalis* türünün oluşturduğu izoamil alkol miktarının ise 118 mg/L olduğunu bildirmişlerdir.

Saccharomyces spp. olmayan izolatların oluşturduğu 2-fenil etanol miktarı 18 mg/L ile 60 mg/L arasında değişmiştir. İzolatların ürettiği 2- fenil etanol miktarı kontrol suşundan (63 mg/L) düşük bulunmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan türler arasında en yüksek miktarda 2- fenil etanol üreten izolat 214 kodlu *T. delbrueckii* (60 mg/L) olmuş ve bunu 536 kodlu *I. orientalis* (34 mg/L) takip etmiştir. İzolatların ürettiği 2-fenil etanol miktarı algılanma değerinin (10 mg/L) üzerinde bulunmuştur. Clemente-Jimenez ve ark (2004), *H'spora uvarum* türünün 47 mg/L, *I. orientalis* türünün ise 53 mg/L 2-fenil etanol ürettiklerini bildirmişlerdir.

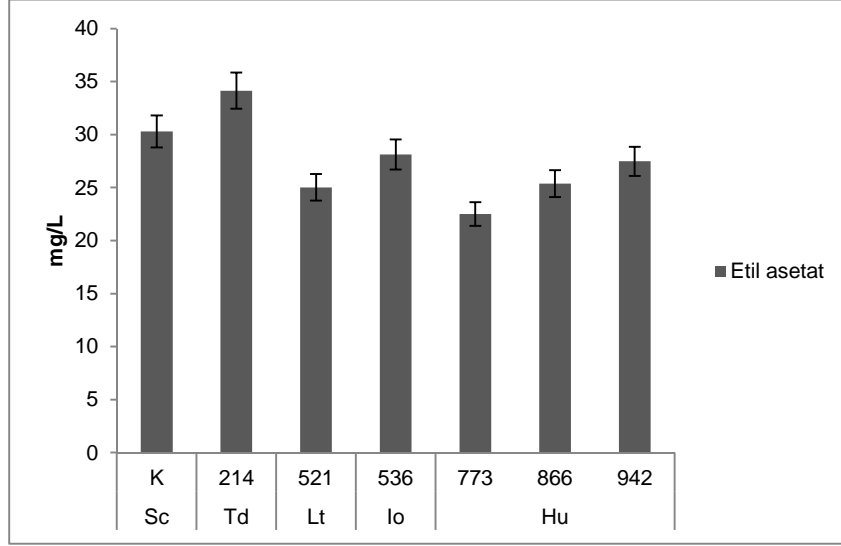
Çizelge 4.16. *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların ürettikleri aroma maddeleri miktarları

AROMA BİLEŞİKLERİ (mg/L)										
<i>Yüksek alkoller</i>	LRI	ID	K Sc	214 Td	521 Lt	536 Io	773 Hu	866 Hu	942 Hu	F
1-propanol	987	ABC	2.36±0.02 ^c	2.58±0.11 ^b	1.68±0.5 ^c	1.25±0.09 ^g	4.05±0.1 ^a	2.19±0.1 ^d	1.44±0.5 ^f	*
İzobutil alkol	1024	ABC	13.14±0.09 ^c	10.92±0.09 ^d	12.45±0.4 ^c	15.8±0.9 ^a	15.07±0.2 ^b	6.25±0.4 ^f	8.86±0.4 ^e	*
İzoamil alkol	1176	ABC	190.27±3.7 ^a	124.75±1.05 ^c	178.17±0.1 ^b	197.5±3.4 ^a	120.06±0.3 ^c	101.94±2.8 ^e	111.03±9.2 ^d	*
2,3-Butanediol	1495	ABC	0.56±0.04 ^a	0.08±0.00 ^c	0.50±0.07 ^a	0.31±0.02 ^b	0.38±0.01 ^b	0.06±0.1 ^c	0.32±0.01 ^b	*
Methionol	1737	ABC	0.81±0.02 ^b	1.98±0.03 ^a	0.54±0.02 ^c	0.55±0.03 ^c	0.18±0.01 ^e	0.36±0.2 ^d	0.34±0.02 ^d	*
2-Fenil etanol	1914	ABC	63.28±0.7 ^a	60.14±0.18 ^b	28.8±0.3 ^d	34.73±0.1 ^c	20.70±0.2 ^e	18.02±1 ^f	27.0±3 ^g	*
Toplam			270.42	200.45	222.14	250.14	160.44	129.12	149	
Esterler										
Eti asetat**			30.3±2 ^b	34.14±1.4 ^a	25.05±0.4 ^d	28.12±2 ^c	22.51±1 ^e	25.37±0.4 ^d	27.4±0.3 ^c	*
İzoamil asetat	11190	ABC	1.67±0.1 ^a	0.85±0.02 ^c	1.75±0.1 ^a	1.79±0.1 ^a	1.04±0.2 ^b	0.6±0.02 ^d	0.76±0.02 ^c	*
hekzil asetat	1222	ABC	0.24±0.03 ^a	0.16±0.01 ^c	0.23±0.01 ^a	0.18±0.01 ^b	nd	0.16±0.01 ^c	0.17±0.01 ^c	*
Etil hekzanoat	1176	ABC	0.35±0.01 ^b	0.10±0.01 ^c	0.23±0.02 ^d	0.44±0.01 ^a	0.07±0.00 ^f	0.28±0.01 ^c	0.34±0.01 ^b	*
Etil laktat	1353	ABC	0.20±0.03 ^c	0.14±0.01 ^e	0.25±0.01 ^a	0.22±0.01 ^b	0.19±0.01 ^d	0.17±0.01 ^e	0.16±0.01 ^f	*
Etil oktanoat	1430	ABC	0.12±0.01 ^b	sp	0.17±0.01 ^a	0.12±0.01 ^b	sp	0.08±0.00 ^c	0.14±0.01 ^b	*
Etil-3-hidroksibütanoat	1483	ABC	0.22±0.04 ^a	0.04±0.00 ^c	0.16±0.01 ^b	0.16±0.01 ^b	0.09±0.00 ^d	0.08±0.00 ^d	0.11±0.02 ^c	*
Etil dekanooat	1634	ABC	0.07±0.02 ^b	0.06±0.00 ^b	0.05±0.00 ^c	0.04±0.00 ^d	0.09±0.00 ^a	0.05±0.00 ^c	0.03±0.00 ^d	*
2-Feniletil asetat	1786	ABC	0.27±0.04 ^a	0.21±0.01 ^c	0.23±0.02 ^{b,c}	0.25±0.01 ^{a,b}	0.20±0.01 ^c	0.13±0.01 ^d	0.16±0.01 ^d	*
Etil-4-hidroksibütanoat	1819	ABC	3.06±0.06 ^d	0.79±0.03 ^e	7.68±0.1 ^a	3.8±0.1 ^c	1.5±0.2 ^e	1.08±0.08 ^f	6.50±0.4 ^b	*
Etil hidrojen süksinat	2440	ABC	0.13±0.01 ^b	0.11±0.01 ^c	0.20±0.01 ^a	0.09±0.00 ^c	0.05±0.00 ^d	0.11±0.01 ^{b,c}	0.01±0.00 ^c	*
Toplam			36.8	36.84	36.27	35.48	26.12	28.41	36.2	
Uçucu asitler										
Asetik asit	1394	ABC	0.54±0.02 ^d	0.34±0.01 ^e	0.57±0.04 ^d	0.3±0.01 ^c	1.13±0.1 ^a	0.72±0.02 ^c	0.86±0.04 ^b	*
İzobütirik asit	1588	ABC	0.23±0.02 ^d	0.47±0.01 ^a	0.31±0.01 ^b	0.26±0.02 ^c	0.14±0 ^e	0.09±0.00 ^f	0.14±0.02 ^e	*
Bütirik asit	1647	ABC	0.12±0.01 ^d	0.10±0.01 ^c	0.19±0.01 ^a	0.17±0.01 ^b	0.05±0.00 ^f	0.12±0.01 ^d	0.16±0.01 ^c	*
İzovalerik asit	1684	ABC	0.62±0.01 ^a	0.28±0.01 ^c	0.62±0.02 ^a	0.50±0.02 ^b	0.12±0.01 ^d	0.27±0.02 ^c	0.26±0.01 ^c	*
Hekzanoik asit	2089	ABC	1.87±0.02 ^c	0.89±0.03 ^f	2.54±0.01 ^c	2.67±0.03 ^b	0.57±0.02 ^g	2.09±0.09 ^d	2.98±0.5 ^a	*
Oktanoik asit	2133	ABC	2.74±0.1 ^d	0.45±0.02 ^c	3.45±0.03 ^b	3.17±0.03 ^c	0.55±0.02 ^e	2.81±0.2 ^d	3.87±0.2 ^a	*
Dekanoik asit	2264	ABC	1.38±0.1 ^a	0.07±0.01 ^c	0.90±0.03 ^c	0.80±0.04 ^c	0.15±0.01 ^e	0.64±0.01 ^d	1.02±0.09 ^b	*
Hekzadekanoik asit	2886	ABC	0.39±0.01 ^c	0.70±0.02 ^c	0.25±0.03 ^f	0.18±0.01 ^g	0.77±0.03 ^b	0.46±0.01 ^d	1.04±0.08 ^a	*
Toplam			7.88	3.32	8.82	8.07	3.48	7.2	10.32	
Laktonlar										
Gama-Bütirolakton	1588	ABC	0.40±0.04 ^c	0.49±0.02 ^d	0.76±0.02 ^b	0.37±0.01 ^c	0.47±0.01 ^d	1.65±0.1 ^a	0.62±0.01 ^c	*
Toplam			0.4	0.49	0.77	0.37	0.47	1.65	0.62	
Aldehitler										
Asetaldehit**	706	ABC	11.12±0.5 ^c	13.04±2 ^b	17.95±1.1 ^a	6.51±1.1 ^d	10.61±0.4 ^c	19.07±0.5 ^a	17.17±0.9 ^a	*
Toplam			11.12	13.04	17.955	6.51	10.61	19.07	17.17	
Genel Toplam			326.62	254.14	285.95	300.57	201.13	185.45	213.31	

KSc, Kontrol *S. cerevisiae* suşu, Td, *T. delbrueckii*, Lt, *L. therotolerans*, Io, *I. orientalis*, Hu, *H. spora uvarum*; LRI, DB wax kolonda belirlenen Kovats indeksi değeri; ID, Tanımlama; A, standartların enjekte edilmesi ile tanımlanması; B, kütle spektrometresi kullanılarak tanımlama; C, alıkonma indeksini literatürle karşılaştırarak tanımlama; Sp, saptanamadı; F: varyans analizine göre farklılık durumu, *: p<0.05 önem düzeyinde önemli; **, miktarları direk enjeksiyonla GC-FID da belirlenmiştir.

Esterler: Narince'den izole edilen *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettikleri ester bileşiği sayısı değişkenlik göstermiş, 521, 536, 866, 942 kodlu izolatlar 11 adet, 214 ve 773 kodlu izolatlar ise 10 adet ester bileşiği oluşturmuştur. İzolatların ürettiği ester bileşiklerinin toplam miktarı 26 mg/L ile 36 mg/L arasında değişmiştir. En yüksek miktarda ester üreten izolat *T. delbrueckii* (214) olmuş, bunu sırasıyla ticari *S. cerevisiae* suşu ve *L. thermotolerans* takip etmiştir. İzolatların ürettiği ester miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Saccharomyces spp. olmayan izolatların ürettiği yüksek alkollerin asetatları arasında öne çıkan ester etil asetat olmuştur. İzolatların ürettiği etil asetat miktarı 22 mg/L ile 34 mg/L değerleri arasında bulunmuştur. En yüksek miktarda etil asetat üreten izolat *T. delbrueckii* (214) olmuş, bunu sırasıyla ticari *S. cerevisiae* suşu (30mg/L) ve *I. orientalis* (28 mg/L) takip etmiştir (Şekil 4.32). İzolatların ürettiği etil asetat miktarı algılanma eşik değeri olan 7.5 mg/L'nin (Swiegers ve ark, 2005) üzerinde bulunmuştur. Zohre ve Erten (2002), *Kl. apiculata* suşunun 580 mg/L etil asetat ürettiğini bildirmişlerdir. Clemente-Jimenez ve ark (2004), *C. stellata* suşunun 74 mg/L, *H'spora uvarum* suşunun 69 mg/L, *I. terricola* suşunun 222 mg/L, *M. pulcherrima* suşunun 62 mg/L, *P. fermentas* suşunun 52 mg/L etil asetat ürettiğini, *I. orientalis* suşunun ise etil asetat üretmediğini bildirmişlerdir. Viana ve ark (2008), *Hanseniaspora* cinsi mayaların 223 mg/L, *Pichia* cinsi mayaların 204 mg/L, *Torulasporea* cinsi mayaların ise 3.87 mg/L etil asetat ürettiğini bildirmişlerdir. Benedictis ve ark (2011), 9 farklı *H'spora uvarum* suşunun 52 mg/L ile 150 mg/L arasından etil asetat ürettiğini bildirmişlerdir.

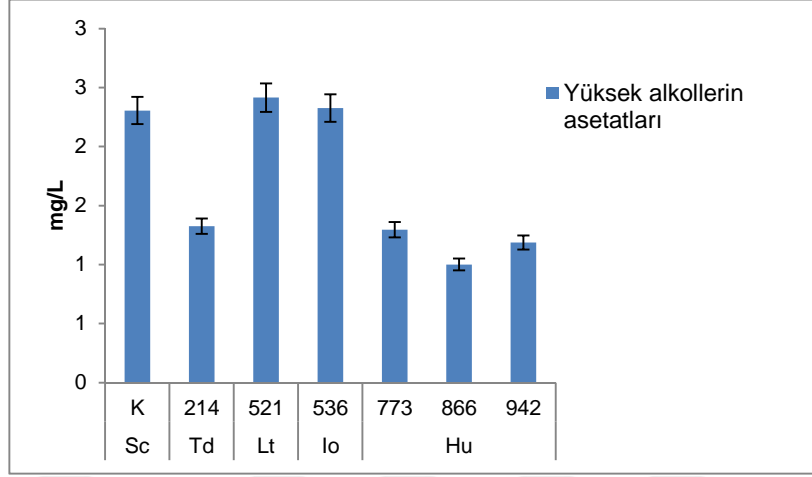


Şekil 4.32. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlarının ürettikleri etil asetat miktarları

KSc, Kontrol *S. cerevisiae* suşu, Td, *T. delbrueckii*, Lt, *L. thermotolerans*, Io, *I. orientalis*, Hu, *H'spora uvarum*

İzolatların ürettiği yüksek alkollerin asetatlarının toplam miktarı (etil asetat hariç), 1 mg/L ile 2.4 mg/L değerleri arasında değişmiştir (Şekil 4.33). Yüksek alkollerin asetatlarını en yüksek miktarda üreten tür *L. thermotolerans* (2.42 mg/L) olmuş bunu sırasıyla *I. orientalis* (2.33 mg/L) ve ticari *S. cerevisiae* (2.31 mg/L) mayası takip etmiştir. İzolatların ürettiği yüksek alkollerin asetatları arasındaki önemli bileşikler izoamil asetat, 2-feniletıl asetat ve hekzil asetat olmuştur. İzolatların ürettiği izoamil asetat miktarı 0.6 mg/L ile 1.79 mg/L arasında değişmiş, en yüksek miktarda izoamil asetat üreten tür *I. orientalis* olmuştur. En düşük miktarda üreten tür ise 866 kodlu *H'spora uvarum* (0.6 mg/L) olmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan türlerin ürettiği izoamil asetat miktarı algılanma eşik değeri olan 0.03 mg/L'nin (Swiegers ve ark., 2005) üzerinde bulunmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan İzolatların ürettiği 2-feniletıl asetat miktarı 0.13 mg/L ile 0.25 mg/L olup ticari *S. cerevisiae* suşunun ürettiği 2-feniletıl asetat miktarından (0.27 mg/L) daha düşük bulunmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan türler arasında en yüksek miktarda 2-feniletıl asetat üreten tür *I. orientalis* (25

mg/L) olmuş, en düşük miktarda üreten izolat ise 866 kodlu *H'spora uvarum* (0.13 mg/L) olmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlar arasında yalnızca 536'nın oluşturduğu 2-feniletıl asetat miktarı algılanma eşik değeri olan 0.25 mg/L'nin (Swiegers ve ark, 2005) üzerinde bulunmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettiği hekzil asetat miktarı 0.16 mg/L ile 0.23 mg/L arasında olup ticari *S. cerevisiae* mayasının ürettiği hekzil asetat miktarından (0.24 mg/L) daha düşük bulunmuştur. En yüksek miktarda hekzil asetat üreten *Saccharomyces* spp. olmayan izolat *L. thermotolerans* (0.23 mg/L) olmuş, en düşük miktarda üreten izolatlar ise *T. delbrueckii* (0.16 mg/L) ve *H'spora uvarum* (0.16 mg/L) olmuştur. İzolatların ürettiği hekzil asetat miktarı algılanma eşik değeri olan 0.7 mg/L'nin (Swiegers ve ark, 2005) üzerinde bulunmuştur. 773 kodlu izolatın hekzil asetat üretmediği görülmüştür. Viana ve ark (2008), *Hanseniaspora* cinsi mayaların 1.639 mg/L izoamil asetat, 12.68 mg/L 2-feniletıl asetat ürettiğini, *Pichia* cinsi mayaların 0.630 mg/L izoamil asetat, 0.563 mg/L 2-feniletıl asetat, *Torulaspóra* cinsi mayaların ise 0.023 mg/L izoamil asetat, 0.013 mg/L 2-feniletıl asetat ürettiğini bildirmişlerdir. *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Pichia*, *Kloeckera* gibi cinslere ait *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların özellikle yüksek β-glikozidaz aktivitesine sahiptir ve önemli enzimatik aktiviteleri ile şarap aromasına katkı sağlamaktadır. *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar yüksek alkollerin asetatlarını nispeten yüksek miktarlarda üretebilirler ve bu özellikleri ile son yıllarda *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların *S. cerevisiae* ile birlikte karışık kültür olarak kullanımı yaygınlaşmıştır (Jolly ve ark., 2013). Ancak *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sahip oldukları enzimatik aktiviteleri suş düzeyinde farklılık gösterir (Viana ve ark., 2008).

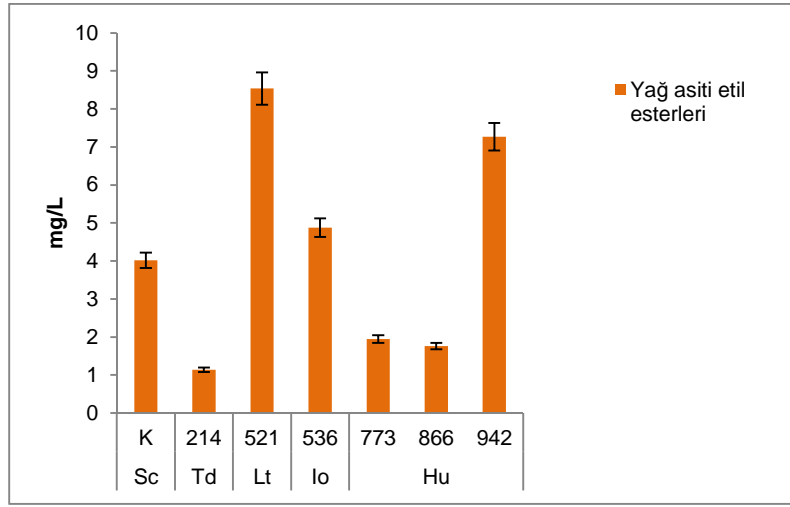


Şekil 4.33. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlarının ürettikleri yüksek alkollerin asetatlarının toplam miktarları

KSc, Kontrol *S cerevisiae* suşu, Td, *T. delbrueckii*, Lt, *L. thermotolerans*, Io, *I. orientalis*, Hu, *H'spora uvarum*

İzolatların ürettiği yağ asiti etil esterlerinin toplam miktarı 1.1 mg/L ile 8.5 mg/L arasında bulunmuş, yağ asiti etil esterlerinin en yüksek miktarda üreten izolat 521 olmuş ve bunu 942 (7.2 mg/L) takip etmiştir (Şekil 4.34). *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettiği yağ asitlerinin esterleri arasında öne çıkan bileşikler etil hekzanoat ve etil oktanoat olmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettiği etil hekzanoat miktarı 0.07 mg/L ile 0.44 mg/L arasında bulunmuştur. En yüksek miktarda etil hekzanoat üreten tür *I. orientalis* olmuş ve bunu sırasıyla ticari maya (0.35 mg/L) ve 942 (0.34 mg/L) kodlu *H'spora uvarum* takip etmiştir. İzolatların oluşturduğu etil hekzanoat miktarı algılanma eşik değerinin (0.014 mg/L) üzerinde bulunmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettiği etil oktanoat miktarı 0.08 mg/L ile 0.17 mg/L değerleri arasında bulunmuştur. En yüksek miktarda etil oktanoat üreten izolat *L. thermotolerans* olmuş ve onu 942 kodlu *H'spora uvarum* (0.14 mg/L) takip etmiştir. İzolatların ürettiği etil oktanoat miktarı (214 ve 773 hariç) algılanma eşik değerinin (0.005 mg/L) üzerinde bulunmuştur. 214 ve 773 kodlu izolatların etil oktanoat üretmediği görülmüştür. Zohre ve Erten (2002) yaptıkları çalışmada, *Kl. apiculata* suşunun etil hekzanoat ve etil oktanoat üretmediğini belirtmişlerdir. Clemente-Jimenez ve ark (2004),

spontan fermantasyon sırasında izole ettikleri *C. stellata*, *H'spora uvarum*, *I. orientalis*, *I. terricola* ve *S. cerevisiae* suşlarının etil oktanoat üretmediğini bildirmişlerdir. Viana ve ark (2008), *Hanseniaspora* cinsi mayaların 0.003 mg/L etil hekzanoat, 0.021 mg/L etil oktanoat, *Pichia* cinsi mayaların 0.007 mg/L etil hekzanoat, 0.0012 mg/L etil oktanoat, *Torulaspota* cinsi mayaların ise 0.009 mg/L etil hekzanoat, 0.0052 mg/L etil oktanoat ürettiğini bildirmişlerdir.



Şekil 4.34. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlarının ürettikleri yağ asiti etil esterlerinin toplam miktarları

KSc, Kontrol *S cerevisiae* suşu, Td, *T. delbrueckii*, Lt, *L. therotolerans*, Io, *I. orientalis*, Hu, *H'spora uvarum*

Uçucu asitler: *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlar 8 adet uçucu asit bileşiği oluşturmuş ve miktarları 3.4 mg/L ile 10.32 mg/L değerleri arasında değişmiştir. En yüksek miktarda uçucu asit üreten izolat 942 olmuş, bunu sırasıyla 521 (8.8 mg/L) ve 536 (8 mg/L) takip etmiştir. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettiği uçucu asit miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

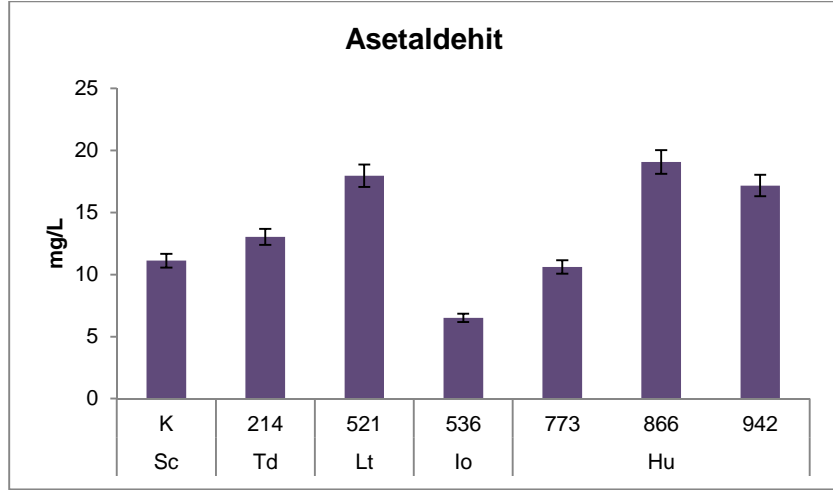
Saccharomyces spp. olmayan izolatların ürettiği, miktar olarak öne çıkan uçucu asitler oktanoik ve hekzanoik asit olmuştur. İzolatların ürettiği oktanoik asit miktarı 0.45 mg/L ile 3.8 mg/L değerleri arasında bulunmuş, en yüksek miktarda

oktanoik asit üreten izolat 942, en düşük miktarda oktanoik asit üreten izolat ise 214 olmuştur. İzolatların ürettiği hekzanoik asit miktarı 0.89 mg/L ile 2.9 mg/L değerleri arasında bulunmuş, en yüksek miktarda hekzanoik asit üreten izolat 942 iken en düşük miktarda üreten izolat 214 olmuştur. İzolatların ürettiği oktanoik asit ve hekzanoik asit (8 mg/L) algılanma eşik değerlerinin altında bulunmuştur. Cordero-Bueso ve ark (2013), *L. thermotolerans* mayasının, 0.21 mg/L hekzanoik asit, 0.20 mg/L oktanoik asit, 0.12 mg/L dekanolik asit ürettiğini, *T. delbrueckii* mayasının ise 0.31 mg/L hekzanoik asit, 0.59 mg/L oktanoik ve 0.21 mg/L dekanolik asit ürettiğini bildirmişlerdir. Narineden izole edilen *L. thermotolerans* ve *T. delbrueckii* izolatların ürettiği hekzanoik, oktanoik ve dekanolik asit miktarları Cordero-Bueo ve ark (2013) bildirdiği değerlerden yüksek bulunmuştur.

Laktonlar: *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlarla elde edilen şaraplarda yalnızca gama-bütürolakton bileşiği tanımlanmış ve miktarı 0.37 mg/L ile 2.25 mg/L değerleri arasında değişmiştir. İzolatların ürettiği gama bütürolakton miktarı algılanma eşik değerinin (20 mg/L) altında bulunmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların oluşturduğu gama-bütürolakton bileşiği miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Asetaldehit: Narineden izole edilen *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların oluşturduğu asetladehit miktarı 6.5 mg/L ile 19 mg/L arasında değişmiştir. En yüksek miktarda asetaldehit üreten tür 886 kodlu *H'spora uvarum* olmuş, bunu sırasıyla 521 (17.9 mg/L) ve 942 (17.1 mg/L) takip etmiştir. En düşük miktarda asetaldehit üreten tür ise *I. orientalis* (6.5 mg/L) olmuş ve bunu 773 kodlu *H'spora uvarum* (10.6 mg/L) takip etmiştir (Şekil 4.35). *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettiği asetaldehit bileşiği miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Romano ve ark (2003), *H'spora uvarum* suşunun 200 mg/L asetaldehit ürettiğini bildirmişlerdir. Clemente-Jimenez ve ark (2004), *H'spora uvarum* suşunun 259 mg/L, *I. orientalis* suşunun ise 72 mg/L asetaldehit ürettiğini bildirmişlerdir. Narince'den izole edilmiş *H'Spora uvarum* ve *I. orientalis* türlerinin ürettiği asetaldehit miktarı bu değerlerin altında

bulunmuştur. Benedictis ve ark (2011), *H'spora uvarum* suşlarının ürettiği asetaldehit miktarlarının 9 mg/L ile 13 mg/L arasında değiştiğini bildirmişlerdir.



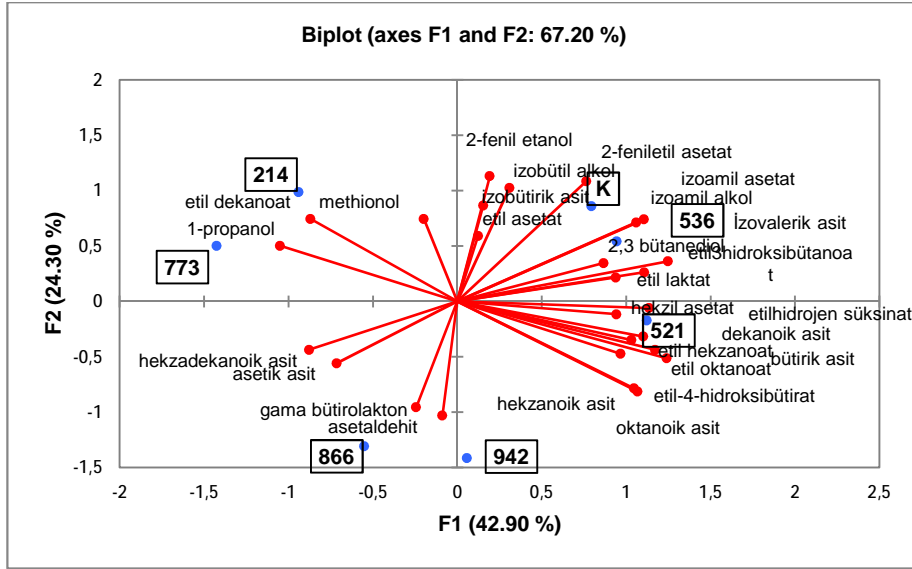
Şekil 4.35. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlarının ürettikleri asetaldehit miktarları

KSc, Kontrol *S cerevisiae* suşu, Td, *T. delbrueckii*, Lt, *L. therotolerans*, Io, *I. orientalis*, Hu, *H'spora uvarum*

Narineden izole edilmiş *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettikleri aroma maddeleri miktarlarının temel bileşen analizi sonuçları üç Şekil 4.36' da verilmiştir. Temel bileşen analizine göre F1 bileşeni % 42.90, F2 bileşeni %24.30, F3 bileşeni %16.08 oranında varyansı açıklamaktadır ve temel bileşen analizi toplamda 3 bileşen ile %83.28 oranında varyansı açıklamaktadır.

PCA korelasyon matrisine göre (Şekil 4.36) 1. Boyut bileşeni (F1), 1-propanol, izoamil alkol, etil asetat, 2-feniletıl asetat dışındaki bütün esterleri, asetik asit ve izobütirik asit dışındaki bütün uçucu asit bileşiklerini açıklarken, F2 bileşeni, izobütıl alkol, 2-fenil etanol, 2-feniletıl asetat, izobütirik asit, gama-bütırolakton ve asetladehit bileşiklerini açıklamış, F3 bileşeni ise 214 izolatu ile methionol, etil asetat ve asetik asit bileşiklerini açıklamıştır. F bileşeni (%42.90), 521, 942 ve 866 kodlu izolatları diğerlerinden ayırırken, F2 bileşeni, 214, 773 ve 866 kodlu izolatları diğer izolatlardan ayırmıştır.

PCA korelasyon matrisine göre (Şekil 4.36) F1 ve F2 bileşenleri maya izolatlarını ve aroma maddelerini 4 gruba ayırmıştır. 214 kodlu *T. delbrueckii* ve 773 kodlu *H'spora uvarum* izolatları ile methionol, 1-propanol ve etil dekanoat bileşikleri sol üst kısımda toplanmıştır. Bu bileşiklerden 1-propanol, hekzil asetat (-0.794; $p < 0.05$), etil hekzanoat (-0.807; $p < 0.05$), etil oktanoat (-0.797; $p < 0.05$), bütirik asit (-0.957; $p < 0.05$), hekzanoik asit (-0.919; $p < 0.05$) oktanoik asit (-0.837; $p < 0.05$) bileşikleri ile, etil dekanoat ise bütirik asit (-0.909; $p < 0.05$), hekzanoik asit (-0.915; $p < 0.05$) ve oktanoik asit (-0.832; $p < 0.05$) bileşikleri ile negatif korelasyon göstermiştir. Kontrol mayası ve 536 kodlu *I. orientalis* ile etil asetat, izoamil asetat, 2-feniletıl asetat gibi duyuşal açıdan önemli esterlerle ve, izoamil alkol, izobütıl alkol, 2-fenil etanol gibi bileşikler sağ üst kısmında toplanmıştır. Bu bileşiklerden izoamil alkol, hekzadekanoik asit (-0.768; $p < 0.05$) ile, izobütıl alkol, gama-bütırolakton (-0.797; $p < 0.05$), ve asetaldehit (-0.842; $p < 0.05$) bileşikleri ile negatif korelasyon göstermiştir.



Şekil 4.36. Narince'den izole edilmiş *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettikleri aroma maddelerinin temel bileşen analizi; F1 ve F2 bileşenleri

4.4.14.4 *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. Olmayan Mayaların Ürettiği Aroma Maddelerinin Karşılaştırılması

Narince'den izole edilen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların oluşturdukları aroma maddelerinin minimum, maksimum ve ortalama değerler üzerinden karşılaştırılması Çizelge 4.17'de verilmiştir. Mayaların ürettikleri yüksek alkoller, esterler, uçucu asitler, lakton ve asetaldehit bileşiklerinin toplam miktarlarının ortalama değeri 235 mg/L ile 364 mg/L arasında bulunmuş ve *S. cerevisiae* izolatlarının ürettiği toplam aroma maddesi miktarı *Saccharomyces* spp. olmayanlara göre yüksek bulunmuştur.

S. cerevisiae ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların oluşturduğu izoamil alkol, 2-fenil etanol, izoamil asetat, etil oktanoat, 2-feniletıl asetat, izovalerik asit ve dekanolik asit miktarlarının ortalama değerleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Narineden izole edilmiş *S. cerevisiae* izolatlarının ürettiği izoamil asetat, etil oktaonat, ve 2-feniletıl asetat bileşiklerinin ortalama miktarları diğer mayalara göre daha yüksek bulunmuştur. Ticari *S. cerevisiae* suşunun ürettiği izoamil alkol, 2-fenil etanol, izovalerik asit ve dekanolik asit bileşiklerinin ortalama miktarı Narineden izole edilmiş *Saccharomyces* spp. olmayan ve *S. cerevisiae* izolatlarına göre daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.17. Ticari *S. cerevisiae* suşu, Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların ürettikleri aroma maddelerinin Min. Maks. ve Ortalama miktarları

	Kontrol				non- <i>Saccharomyces</i>				<i>S. cerevisiae</i>				ID	F
	Ort	Min	Maks	SH	Ort*	Min	Maks	SH	Ort	Min	Maks	SH		
Yüksek alkoller														
1-propanol	2.36	2.34	2.38	0	2.2	1.16	4.16	0.2	1.72	1.09	3.04	0.1	ABC	öd
İzobutil alkol	13.14	13.04	13.24	0	11.56	5.85	16.74	0.8	13.48	9.02	20.6	0.6	ABC	öd
İzoamil alkol	190.3	186.5	194	2	138.9	99.09	201	8.7	175.9	111.9	261	8.6	ABC	*
2,3-Butanediol	0.56	0.52	0.61	0	0.27	0.06	0.58	0	0.46	0.03	1.59	0.1	ABC	öd
Methionol	0.81	0.79	0.83	0	0.66	0.18	2.02	0.1	0.47	0.24	0.89	0	ABC	öd
2-fenil etanol	63.28	62.49	64.07	1	27.1	0.16	60.33	4.4	45.17	24.25	106	3.9	ABC	*
Toplam	270.4	267.6	273.3	2	180.7	113	254.9	12	237.2	149.3	384.1	12		
Esterler														
Etil asetat	30.3	28.59	32	1	27.11	21.51	35.63	0.9	94.6	23.39	537.2	28	BC	öd
İzoamil asetat	1.67	1.55	1.79	0	1.13	0.6	1.92	0.1	1.87	0.65	3.03	0.1	ABC	*
Etil hekzanoat	0.35	0.34	0.36	0	0.24	0.06	0.46	0	0.31	0.09	0.56	0	ABC	öd
hekzil asetat	0.24	0.23	0.24	0	0.15	0	0.24	0	0.17	0.05	0.31	0	ABC	öd
Etil laktat	0.2	0.2	0.2	0	0.19	0.14	0.25	0	0.27	0.14	0.82	0	ABC	öd
Etil oktanoat	0.12	0.11	0.14	0	0.09	0	0.19	0	0.14	0	0.24	0	ABC	*
Etil-3-hidroksibütan	0.22	0.22	0.23	0	0.11	0.04	0.17	0	0.17	0.13	0.25	0	ABC	öd
Etil dekanat	0.06	0.06	0.07	0	0.06	0.03	0.1	0	0.09	0.02	0.4	0	ABC	öd
Etil-4-hidroksibütan	3.06	2.99	3.13	0	3.57	0.79	7.79	0.7	2.54	1.05	4.28	0.2	ABC	öd
2-Feniletal asetat	0.27	0.23	0.31	0	0.2	0.13	0.27	0	0.42	0.16	0.87	0	ABC	*
Etil hidrojen süksinat	0.13	0.12	0.14	0	0.11	0.05	0.22	0	0.15	0.07	0.25	0	ABC	öd
Toplam	36.62	34.8	38.43	1	32.96	24.78	38.07	1.1	100.7	30.6	540.3	27		
Uçucu asitler														
Asetik asit	0.54	0.52	0.56	0	0.66	0.3	1.14	0.1	0.74	0.29	1.46	0.1	ABC	öd
İzobütirik asit	0.23	0.22	0.23	0	0.24	0.09	0.47	0	0.3	0.13	0.43	0	ABC	öd
Bütirik asit	0.12	0.12	0.12	0	0.13	0.05	0.19	0	0.13	0.03	0.23	0	ABC	öd
İzovalerik asit	0.62	0.61	0.63	0	0.34	0.12	0.63	0	0.52	0.15	0.89	0	ABC	*
Hekzanoik asit	1.87	1.85	1.89	0	1.96	0.56	3.01	0.2	6.34	0.53	44.03	2.3	ABC	öd
Oktanoik asit	2.74	2.59	2.88	0	2.38	0.43	3.93	0.3	2.47	0.38	3.98	0.2	ABC	öd
Dekanoik asit	1.38	1.22	1.54	0	0.59	0.06	1.07	0.1	0.5	0.07	1.04	0.1	ABC	*
Hekzadekanoik asit	0.39	0.37	0.4	0	0.57	0.18	1.08	0.1	0.51	0.06	1.61	0.1	ABC	öd
Toplam	7.88	7.54	8.23	0	6.87	3.25	10.45	0.6	11.51	2.9	47.31	2.2		

Çizelge 4.17'nin devamı

Laktonlar	Kontrol				non-Saccharomyces				S. cerevisiae				ID	F
	Ort	Min	Maks	SH	Ort ¹	Min	Maks	SH	Ort ²	Min	Maks	SH		
Gama-Bütirolakton	0.4	0.4	0.4	0	0.73	0.35	1.69	0.1	0.63	0.22	2.37	0.1	BC	öd
Toplam	0.4	0.4	0.4	0	0.73	0.35	1.69	0.1	0.63	0.22	2.37	0.1		
Aldehitler														
Asetaldehit	11.12	10.6	11.63	0	14.06	5.36	19.66	1.1	14.05	3.78	22.8	1	BC	öd
Toplam	11.12	10.6	11.63	0	14.06	5.36	19.66	1.1	14.05	3.78	22.8	1		
Genel Toplam	326	326	327	0	235	178	308	12	364	265	736	24		

Ort, Ticari *S. cerevisiae* mayası ile fermentasyon yapılmış şarabın miktarının ortalaması, Ort¹ *Saccharomyces* spp. dışındaki mayalar ile fermentasyon yapılmış şarapların miktarlarının ortalaması, Ort², *S. cerevisiae* mayaları ile fermentasyon yapılmış şarapların miktarlarının ortalaması; Min., değerler arasındaki minimum değer; Maks., değerler arasındaki maksimum değer, SH., standart hata, ID, Tanımlama: A, standartların enjekte edilmesi ile tanımlama; B; kütle spektrometresi kullanarak tanımlama; C, alikonma indeksini literatürle karşılaştırılarak tanımlama, F, varyans analizine göre farklılık durumu, öd: önemli değil,* p<0.05 düzeyinde önemlidir

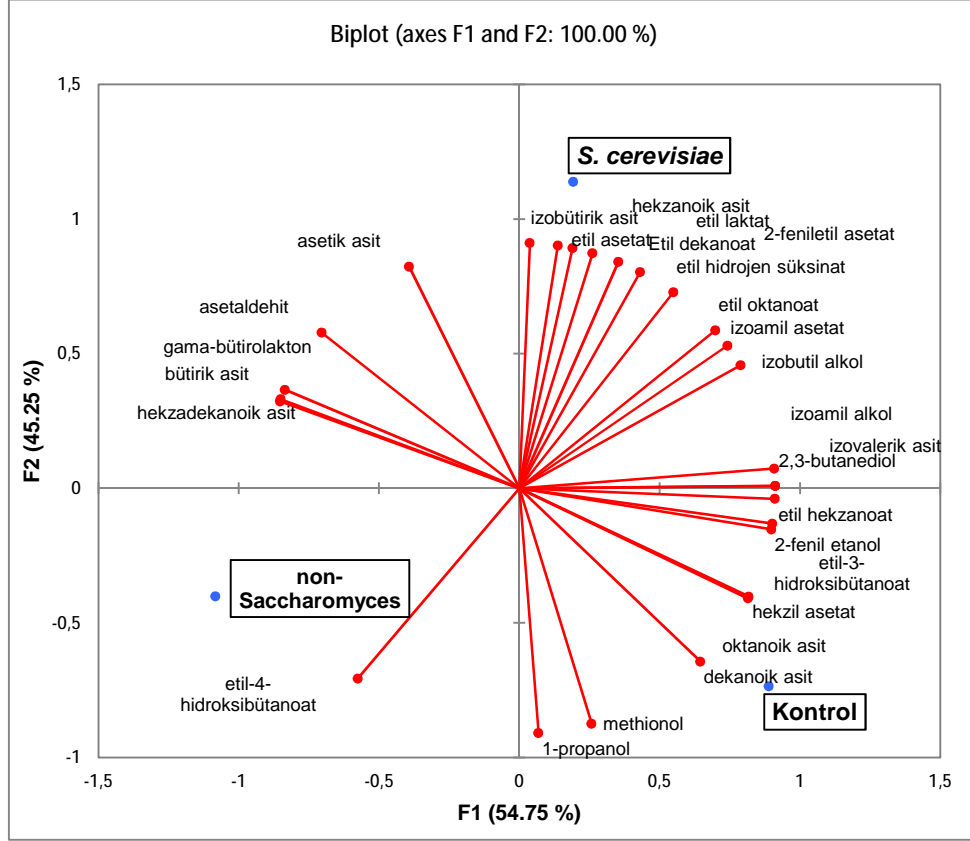
S. cerevisiae mayalarının oluşturduğu etil asetat miktarı daha yüksek bulunmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların ürettiği asetaldehit ve gama-bütirolakton bileşiklerinin ortalama miktarı diğerlerine göre daha yüksek bulunmuştur ancak bu bileşiklerin miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (p<0.05).

Narineden izole edilmiş *S. cerevisiae* izolatlarının ürettikleri aroma maddeleri miktarlarının temel bileşen analizi sonuçları Şekil 4.37' te verilmiştir. Temel bileşen analizine göre F1 bileşeni % 54.75, F2 bileşeni %45.25, oranında varyansı açıklamaktadır ve temel bileşen analizi %100 oranında varyansı açıklamaktadır.

PCA korelasyon matrisine göre (Şekil 4.37) 1. boyut bileşeni (F1) kontrol mayası ve *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlar ile, izobütil alkol, izoamil alkol, 2,3-bütanediol, 2-fenil etanol, izoamil asetat, etil heksanoat, heksil asetat, etil oktanoat, izovalerik asit, bütirik asit, oktaonik asit, heksadekanonik asit, gama bütirolakton ve asetaldehit bileşiklerini açıklamıştır. F2 bileşeni ise *S. cerevisiae* izolatları ile 1-propanol, methionol, etil asetat, etil laktat, etil dekanota, 2-feniletal asetat, asetik asit ve izobütirik asit bileşiklerini açıklamıştır.

Şekil 4.37'e göre *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar ve kontrol mayası F1 ile korele iken, *S. cerevisiae* mayaları F2 ile korelasyon göstermiştir. Temel bileşen analizine göre Kontrol, *S.cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar ürettikleri aroma maddelerinin ortalama değerlerine göre üç farklı alana ayrılmışlardır. Bununla birlikte *S. cerevisiae* mayaların *Saccharomyces* spp. olmayanlardan belirgin bir biçimde ayrılmıştır. Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* mayaları etil oktanoat, 2-fenilenil etil asetat, etil dekanoat, izoamil asetat, izobütül alkol, izoamil alkol, izobütirik asit gibi aroma maddeleri ile pozitif korelasyon göstermiştir. Kontrol mayası ise hekzil asetat, etil hekzanoat, oktanoik asit, dekanoik asit, 2-fenil etanol gibi bileşiklerle pozitif korelasyon göstermiştir. Temel bileşen analizine göre gama bütirolakton hekzil asetat (-0.999; $p<0.05$) ve oktanoik asit (-0.999; $p<0.05$) bileşikleri ile negatif korelasyon göstermiştir.





Şekil 4.37. Ticari maya suşu, Narince'den izole edilmiş *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ürettikleri aroma maddelerinin temel bileşen analizi

4.4.15. Starter Kültür Potansiyeli Olan Mayaların Seçimi

Narince üzümünden ve Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında izole edilen ve teknolojik özellikleri belirlenen endojen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların önemli bazı teknolojik özellikleri Çizelge 18'de verilmiştir. Mayaların bazı enzim aktiviteleri aynı olduğu için ve yüksek şeker derişiminde bütün izolatlar iyi geliştiği için bu özellikler tabloya dahil edilmemiştir.

S. cerevisiae izolatları arasında Nevşehir yöresinden izole edilen 1281 kodlu izolat yüksek fermantasyon hızı, ortamda düşük miktarda (0.8 g/L) kalıntı şeker bırakması, düşük miktarda uçar asit oluşturması, asetladehit, etil asetat ve toplam yüksek alkoller dengeli üretmesi, yüksek flokülasyon özellikleri ile ön plana çıkmış ve bunu Nevşehir yöresinden izole edilen 1044 ve Tokat yöresinden izole edilen 1088 kodlu izolatlar takip etmiş ve bu izolatlar potansiyel starter *S. cerevisiae* kültürleri olarak seçilmişlerdir.

Saccharomyces spp. olmayan türler arasından Nevşehir Yöresinden izole edilen 214 kodlu *T. delbrueckii* izolatı, düşük fermantasyon hızına ve flokülasyon özelliğine sahip olmasına rağmen, yüksek miktarda etanol üretmesi, düşük miktarda kalıntı şeker bırakması ve düşük seviyede köpük oluşturması, yüksek miktarda yüksek alkol oluşturması ile, yine Nevşehir Yöresinden izole edilen 773 kodlu *H'spora uvarum* izolatı ise, 15°C'de diğer türlere göre daha yoğun gelişmesi, düşük miktarda kalıntı şeker bırakması, diğer *Saccharomyces* spp. olmayan türlere göre daha düşük uçar asit oluşturması ile öne plana çıkmış ve *S. cerevisiae* ile birlikte kullanılacak potansiyel starter *Saccharomyces* spp. olmayan kültürler olarak seçilmişlerdir.

Çizelge 4.18. *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların bazı önemli teknolojik özellikleri

Kod	12 ° Etanol 15°C (h/h)	SO ₂ (150 mg/L)	H ₂ S Killer	Köpük 15°/20°	Ferm hız(g CO ₂ /L.sa)	Alkol miktarı (%h/h)	Kalan şeker miktarı (g/L)	Uçur asit (g/L)	Floktilyasy on (%)	Glisserol (g/L)	Asetaldeh it (mg/L)	Etil asetat (mg/L)	Yüksek alkoller (mg/L)	
590	++	+++	3	+	F0F2	1.11	9.83	1.82	0.7	65	5.5	13.5	29.4	240.72
606	+	++	3	+	F0F1	0.76	8.91	11.77	0.94	85	7.73	18.88	531.1	179.62
884	+	+++	3	+	F1/F2	0.45	9.84	2.8	0.94	66	5.04	21.35	83.39	150.87
1028	+	++	5	+	F1/F2	1.39	7.17	17.8	0.56	78	5.89	4.62	28.7	302.34
1044	++	++	3	+	F1/F2	1.27	9.9	2.8	0.74	98	5.15	8.39	29.9	263.6
1088	+++	+++	4	+	F0/F1	0.99	10	1.6	0.85	98	5.22	18.4	27.26	252.96
1198	+	+++	3	+	F0F1	0.76	6.7	17.41	1.06	75	6.12	19.76	105.4	173.96
1281	++	+++	2	+	F1/F2	2.47	10.12^a	0.8	0.58	95	4.78	12.5	24.26	241.05
1333	+++	+++	3	+	F1/F1	0.53	9.06	9.4	1	86	5.74	14.06	62.39	195.98
1378	+++	+++	4	+	F0F2	0.3	8.4	16.9	0.8	82	5.54	9.26	24.14	372.67
214 Td	+	+	3	+	F0/F0	0.41	9.4	3.41	0.78	34	6.05	13.04	34.14	200.45
521 Lt	++	++	4	+	F0F1	1.1	3.8	61	0.86	45	5.21	17.96	25.03	222.14
536 Io	-	++	2	-	F0F1	0.47	8.51	20.5	1	91	4.99	6.51	28.12	250.14
773 Hu	+	+++	4	+	F0/F2	0.78	8.3	2.8	0.7	84	5.05	10.61	22.51	160.44
866 Hu	+	+++	2	+	F0F1	0.45	7.9	9.12	0.92	86	4.36	19.07	25.83	129.12
942 Hu	++	+	3	+	F0F2	0.42	7.63	10.91	0.82	67	4.81	17.2	27.4	149

* , asetik asit cinsinden, Td: *T. delbrueckii*, Lt: *L. thermotolerans*, Io: *I. orientalis*, Hu: *H. spora uvarum*.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu araştırmada, 2014 ve 2015 yıllarında Tokat ve Nevşehir Yörelerinde yetiştirilen ve ülkemizin kalite beyaz şaraplık üzüm çeşitlerinden biri olan Narince üzümünde ve fermantasyon denemeleri sırasında şıra ortamındaki maya florası incelenmiş ve izole edilen mayaların şarapçılık açısından önemli teknolojik özellikleri belirlenerek, Narince şarabı üretiminde kullanılabilecek en uygun potansiyel starter mayalar belirlenmeye çalışılmıştır. Mayaların moleküler yöntemlerle tanımlanmasında PZR/RFLP yöntemi ve 26S rRNA'nın sekans sonuçlarının değerlendirilmesinde BioEdit programı kullanılmıştır. Aroma maddelerinin belirlenmesinde GC-FID ve GC/MS, şeker, ve gliserol analizinde HPLC yöntemi kullanılmıştır. Aroma verilerine temel bileşen analizi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Tokat ve Nevşehir yöreleri üzümünde ve fermantasyon başında *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sayısı yüksek bulunmuş, fermantasyon ilerledikçe *S. cerevisiae* mayaları ortama hakim olmuştur. Toplam 265 adet maya izole edilmiş ve izole edilen *S. cerevisiae* (141 adet) mayalarının sayısı, non-*Saccharomyces* (124 adet)'lerden yüksek bulunmuştur. Narince üzümünden ve üzüm şirasının spontan fermantasyonu sırasında ortamdan, *H'spora uvarum*, *H'spora guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus*, *P. kluyveri*, *I. terricola*, *I. orientalis*, *P. occidentalis*, *L. thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. ve *C. zemplinina* türleri tanımlanmıştır. *H'spora guilliermondii*, *P. occidentalis*, *Metschnikowia* spp. yalnızca Tokat Yöresinden, *T. delbrueckii*, *I. orientalis*, *I. terricola* ve *W. anomalus* ise yalnızca Nevşehir Yöresinden izole edilmiştir.

Bütün sıcaklık derecelerinden en iyi gelişen izolatlar 773 kodlu *H'spora uvarum* ve 1353 kodlu *S. cerevisiae* olmuştur. Genel olarak düşük sıcaklıklarda mayaların çoğu yoğun gelişmemişlerdir. Alkol konsantrasyonlarının tamamında en yoğun gelişen izolat 1088 kodlu *S. cerevisiae* olmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların etanol toleransı beklendiği gibi daha zayıf bulunmuş, *W.*

anomalus ve *Metschinokowia* sp. türleri uygulanan etanol konsantrasyonlarının hiçbirinde gelişmemiş, *T. delbrueckii* ve bazı *H'spora uvarum* izolatları %14 etanole kadar gelişebilmişlerdir. *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların SO₂ toleransı yüksek bulunmuş, 521 kodlu *L. thermotolerans*, 682 *H'spora uvarum*, 1028 kodlu *S.cerevisiae* izolatları ise bütün konsantrasyonlarda zayıf gelişmişlerdir. *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar genel olarak orta düzeyde (açık kahverengi, kahverengi) H₂S üretmişlerdir. Bazı *S. cerevisiae* (61, 1353, 1363, 1412) izolatları ile *W. anomalus*, *I. terricola* ve *I. orientalis* türleri killer aktivite göstermemiştir. İzolatların çoğu (521 ve 1212 hariç) yüksek şeker derişiminde (200 mg/L) yoğun gelişmiş ve fermantasyonu başlatmışlardır. İzolatların köpük oluşturma özelliklerinin sıcaklıkla birlikte değiştiği belirlenmiş, 30° C'de bütün izolatlar yüksek köpük oluşturmuş, 20°C' de 1 adet *S. cerevisiae* izolatı (148) ile *Saccharomyces* spp. olmayan, 214, 476 ve 480 kodlu izolatlar düşük köpük oluşturmuş, 15°C de ise (1212 kodlu izolat hariç) izolatlar düşük düzeyde köpük oluşturmuşlardır. *S. cerevisiae* izolatlarının tamamının yüksek düzeyde lösin arilamidaz ve asit fosfotaz aktivitesi gösterdikleri, 606, 1378 ve 1412 kodlu izolatların β-glukozidaz aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların esteraz, lösin arilamidaz gösterdikleri ve yalnızca 480 kodlu *I. terricola* izolatının β-glukozidaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. *Saccharomyces* spp olmayan izolatların genel olarak fermantasyon gücü *S. cerevisiae* izolatlarına göre daha düşük bulunmuştur. Ancak 214 kodlu *T. delbrueckii* izolatının fermantasyon gücü (%9.4 h/h) yüksek, ortamdaki şekerin çoğunu (indirgen şeker 3.4 g/L) fermente etmiştir. Genel olarak fermantasyon bitiminde maya suşlarının ürettikleri uçar asit miktarlarının yüksek olduğu belirlenmiştir.

S. cerevisiae izolatlarının *Saccharomyces* spp. olmayanlara göre daha fazla miktarda gliserol ürettiği belirlenmiştir. *S. cerevisiae* izolatları 27 adet aroma maddesi üretmiş ve ürettikleri toplam aroma maddelerinin ortalaması 373 mg/L bulunmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların farklı sayılarda aroma

maddesi ürettiği, 773 kodlu *H'spora uvarum* izolatının 25, 214 kodlu *T. delbrueckii* izolatının 26, diğer izolatlar ise 27 adet aroma maddesi ürettiği belirlenmiştir. *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların ürettiği toplam aroma maddelerinin ortalaması 251 mg/L bulunmuştur. Kontrol suşunun ise 27 adet aroma maddesi ürettiği ve toplam aroma miktarının 328 mg/L olduğu belirlenmiştir. *S.cerevisiae* izolatlarının ürettiği toplam aroma maddesi, izoamil asetat ve etil oktanoat miktarları kontrol suşundan ve *Saccharomyces* spp. olmayan izolatlardan daha yüksek bulunmuştur. *Saccharomyces* spp. olmayan izolatların ise daha yüksek miktarda asetaldehit ve gama-bütirolakton ürettiği belirlenmiştir. PCA analizi sonucuna göre *S. cerevisiae*, *Saccharomyces* spp olmayan mayalar ve kontrol mayası ürettikleri aroma maddeleri miktarlarına göre birbirinden ayrılmıştır. F1 bileşeni *S.cerevisiae* izolatları ürettikleri aroma maddeleri miktarlarına göre kontrol şarabından ve *Saccharomyces* spp olmayan izolatlardan ayrılmıştır. F2 bileşenine göre ise *Saccharomyces* spp olmayan mayalar ürettikleri aroma maddelerine göre *S. cerevisiae* izolatları ve kontrol mayasından ayrılmıştır.

Narince'den izole edilen diğer maya izolatlarından daha iyi teknolojik özelliklere sahip ve esterler, etil asetat, asetaldehit gibi şarabın duyuşal özelliğini etkileyen aroma bileşiklerin dengeli miktarlarda üreten Nevşehir Yöresinden izole edilen 1281 ve 1044 kodlu *S. cerevisiae* izolatları Tokat Yöresinden izole edilen 1088 kodlu *S. cerevisiae* izolatı Narince şarabının üretiminde kullanılabilecek potansiyel starter *S. cerevisiae* kültürleri olarak seçilmişlerdir. Nevşehir Yöresinden izole edilen 214 kodlu *T. delbrueckii* ve 773 kodlu *H'spora uvarum* izolatları ise Narince şarabının üretiminde *S. cerevisiae* ile birlikte karışık kültür olarak kullanılabilecek potansiyel starter *Saccharomcyes* spp. olmayan mayalar olarak seçilmişlerdir.

Sonuç olarak Narince'den izole edilen *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan bazı izolatların kalite Narince şarabı üretimi için uygun oldukları belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular Avrupa Birliği Ülkelerinde kalite şaraplar için uygulanan ve ülkemizde de uygulanması gereken Kökeni Kontrollü

İsimlendirme sistemine geçişte Narince şarabı için kaynak oluşturabilir. Elde edilen potansiyel izolatlar ile uygulamaya dönük büyük çaplı şarap üretilerek sonuçların doğrulanmasında yarar vardır.



KAYNAKLAR

- Anonim, 2005. Community methods for analysis of wines, EEC No 2676/90. Office of Official Publications of the European Communities, 194 s.
- Aponte, M., Blaiotta, G., 2016. Selection of an autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strain for the vinification of 'Moscato di Saracena', a Southern Italy (Clabry Region) Possito Wine. *Food Microbiology*, 54, (30-39).
- Aranda, A., Matallana, E., Í del Olmo, 2011. *Saccharomyces* Yeasts 1: Primary fermentation (A.V. Carrascosa, R. Múnoz, R. González, Editörler). *Molecular Wine Microbiology*, Elsevier, First Edition, San Diego, s 1-49.
- Baffi, M.A., Bezerra, C.S., Arévalo-Villena, M., Briones-Pérez, A.I., Gomes, E., Da Silva, R., 2011. Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. *Annual Microbiology*, 61, 75-78.
- Bağder, S., 2008. Türkiye'de değişik şarap bölgelerinden izole edilmiş şarap mayalarının teknolojik özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi , Ankara.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 243-259.
- Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Úbeda, J., Borines, A., 2011. Enological properties in wild and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: Relationship with competition during alcoholic fermentation. *World Journal of Microbial Biotechnology*, 27, 2703-2710.
- Bartowsky, E.J., Pretorius, I.S., 2009. Microbial fromation and modification of flavor and off-flavor compounds in wine (H. König, G. Uden, J., Fröhlich). *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*, Springer, Heidelberg, s 209-230.

- Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine-A Review. *S. African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 27-49.
- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Gulliamon, J.M., Rozes, N., Mas, A., 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 287-293.
- Benedictis, M., Bleve, G., Grieco, F., Tristezza, M., Tufariello, M. Grieco, F., 2011. An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99, 189-200.
- Bevan, E.A., Makower, M., 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. *Proceedings of the XI International Congress of Genetics*, 1, 202-203.
- Blanco, P., Mirás-Avalos, J.M., Orriols, I., 2012. Effect of must characteristics on the diversity of *Saccharomyces* strains and their prevalence in spontaneous fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 936-944.
- Blanco, P., Vaquez-Alen, M., Losada, A., 2008. "Influence of yeast population on characteristics of the wine obtained in spontaneous and inoculated fermentations of must from *Vitis vinifera* Lado. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35:183-188.
- Bisson, L.F., Joseph, C.M.L, 2009. Yeast. (H. König, G. Uden, J. Fröhlich, Editörler) *Biology of microroganisms on grapes, in mus and in wine*, Springer, Hiedelberg, s. 47-60.
- Breda, V., Jolly, N., Van Wyk, J., 2013. Characterization of commercial and natural *Torulasporea delbrueckii* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 80-88.
- Boidron J.-N., 1978. Relation entre les substances terpéniques et la qualité du raisin (Role du *Botrytis cinerea*). *Annales de Technologie. Agricole*, 27 (1), 141.

- Canbaş, A., 2008. şarap teknolojisi ders notları. çukurova Őniversitesi, Ziraat Fakóltesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana, 163 (s).
- Cabaroğlu T., Yılmaztekin M. 2011., Methanol and major volatile compounds of Turkish raki and effect distillate source. Journal of Institute of Brewing, 117, 98-105.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Romano, P., 2012. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian 'heroic vine-growing area'. Food Microbiology, 31, 159-166.
- Chambers, P.J., Pretorius, I., 2010. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. EMBO reports, Vol 11, 914-920.
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., Todd, B.E.N., 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. Australian Journal of Grape and Wine Research, 3, 2-8.
- Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D.P., Shouche, Y., Deshpande, M.V., 2009. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. Food Microbiology, 26, 801-808.
- Clavijo, A., Calderon, I.L., Paneque, P., 2010. Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. International Journal of Food Microbiology, 143, 241-245.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martinez-Rodriguez, Heras-Vazquez, F.J.L., Rodriguez-Vico, F., 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. Food Microbiology, 21, 149-155.

- Ciani, M., Maccarelli, F., 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeast associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 199-203.
- Combina, M., Elia, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C., 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina.. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 237-243.
- Cordier, H., Mendes, F., Vasconcelos, I., François, J.M., 2007. A metabolic and genomic study of engineered *S. cerevisiae* strains for high glycerol production. *Metabolic Engineering*, 9, 364-378.
- Csoma, H., Zakany, N., Capece, A., Romano, P., Sipiczki, M., 2010. "Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 239-248.
- Degre, R., 2002. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria (G.H., Fleet, Editor). *Wine Microbiology and Biotechnology*, Taylor&Francis, New York., s 421-447.
- Del Mónaco, S.M., Barda, N.B., Rubio, N.C., Caballero, A.C., 2014. Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii*, for wine deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 451-464.
- Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J.-L., Le Jeune, C., 2004. Predominance of *Saccharomymces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation for three consecutive years in an Alsatian winery. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1140-1148.
- Di Maro, E., Ercolini, D., Coppola, S., 2007. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *Internatioanl Journal of Food Microbiology*, 117, 201-210.

- Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C., Sabatelli, M.P., 2007. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 281-289.
- Elmacı, A.B., Özçelik, F., Tokatlı, M., Çakır, İ., 2014. Technological properties of indigenous wine yeast strains isolated from wine production regions of Turkey. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105:835-847.
- Ergül, Ş., Özbaş, Z.Y., 2016. Characterization of some indigenous *Saccharomyces cerevisiae* isolates obtained during vinification of 'Kalecik Karası' and 'Emir' grapes grown in central Anatolia. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 31, 51-62.
- Erten, H., 1997. The production of low alcohol wines by aerobic yeasts. PhD Thesis, Edinburg, 201s.
- Erten, H., 1998. Metabolism of fructose as an electron acceptor by *Leuconostoc mesenteroides*. *Process Biochemistry*, 33(7):735-739
- Erten, H., 2002. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 377-382.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.
- Esteve-Zarzoso B., Gostincar, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A., 2000. Selection and molecular characterization of wine yeasts isoalted from the El Penedes area (Spain). *Food Microbiology*, 17, 553-562.

- Fia, G., Giovani, G., Rosi, I., 2005. Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 509-517.
- Fleet, G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11-22.
- Fleet, G.H., Heard, G.M., 2002. Yeasts growth during fermentation (G.H., Fleet Editor). *Wine Microbiology and Biotechnology*, 2. Baskı, Taylor&Farancis, New York, s. 27-54.
- Fleet, G. H., 2008. "Wine yeasts for the future. Federation of European Microbiological Societies. *Yeast Research*, 8, 979-995.
- Fleet, G. H., Prakitchaiwattana, C., Beh, A.L., Heard, G., 2002. "The yeast ecology of wine grapes. Biodiversity and biotechnology of wine yeasts: Research Singpost, Kerala, India, 1-17.
- Francesca, N., Chiurazzi, M., Romano, R., Aponte, M., Settani, L., Moschetti, G., 2010." Indigenous yeast communities in the environment of 'Rovello bianco' grape variety and their use in commercial white wine fermentation". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26:337-351.
- Fugelsang, K. C., Edwards, C. G., 2007. *Wine Microbiology, Practical Applications and Procedures*. Springer, NY, USA, pp (82-101).
- Fuji, T., Yoshimoto, H., Tamai, Y., 1996. Acetate ester production by *Saccharomyces cerevisiae* lacking the ATF1 gene encoding the alcohol acetyltransferase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81, 538-542.
- Garofalo, C., Tristezza, M., Grieco, F., Spano, G., Capozzi, V., 2016. From grape berries to wine: population dynamics of cultivable yeasts associated to 'Nero di Troia' autochthonous grape cultivar. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32:59.

- Gil, M., Cabellos, J.M., Arroyo, T., Prodanov, M., 2006. Characterization of the volatile fraction of young wines from the denomination of origin 'Vinos de Madrid' (Spain). *Analytica Chimica Acta*, 563, 145-153.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, Mannazua, I., Ciani, M., 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, 33, 271-281.
- Gonzalez, S.S., Barrio, E., Querol, A., 2007. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1018-1025.
- Heard, G.M., Fleet, G.H., 1986. Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 60, 477-481.
- Heard, G.M., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Microbiology*, 65, 23-28.
- Henick-Kling, E, Daniel, M., 1998. Selective effect of sulphur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 865-876.
- Henschke, P. A., Jiranek, V., 2002. Yeasts-metabolism of nitrogen compounds in wine microbiology and biotechnology. Ed. Fleet, G. H. Harwood Academic Publishers GmbH, London.
- Iranzo, J.F.U., Perez, A.I.B., Canas, P.M.I., 1998. Study of oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. *Food Microbiology*, 15, 399-406.
- Jemec, K.P., Cadez, N., Zagorc, T., Bubic, V., Zupec, A., Raspor, P., 2001. "Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must". *Food Microbiol.*, Vol.18, Issue 3, p 247-259.

- Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S., 2013. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14, 215-237.
- Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., Spyropoulos, H., 2005. Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1599-1602.
- Kinzurik, M.I., Herbst-Johnstone, Gardner, R.C., Fedrizzi, B., 2016. Hydrogen sulfide production during yeast fermentation causes the accumulation of ethanethiol, S-ethyl thioacetate and diethyl disulfide. *Food Chemistry*, 209, 341-347.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., 1998a. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. First Edition, Elsevier, Amsterdam, 1055s.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998b. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371
- Labagnara, T., 2016. Wine yeast biodiversity during spontaneous fermentation in response to environment stress. *Doktora Tezi, Bologna Üniversitesi, Bologna*, 145 s.
- Lawless, H. T., Heymann, H., 2010. *Sensory evaluation of food: principles and practices*. Second Edition. Springer, 596s.
- Lederer, M.A., Nielsen, D.S., Toldam-Andersen, T.B., Herrmann, J.V., Arneborg, N., 2013. Yeast species associated with different wine grape varieties in Denmark. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 63, 89-96.

- Liu, N., Quin, Y., Song, Y., Ye, D., Yuan, W., Pei, Y., Xue, B., Liu, Y., 2015. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains in Shanshan County (Xinjiang, China) for winemaking and other aroma-producing characteristics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 1781-1792.
- Maicas, S., Mateo, J.J., 2005. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: A Review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 3, 322-335.
- Manzanares, P., Vallés, S., Viana, F., 2011. Non-*Saccharomyces* yeasts in the winemaking process (A.V., Carrascosa, R., Muñoz, R. Gonzáles, Editörler). *Molecular Wine Microbiology*, First edition, Elsevier, San Diego, s.85-142.
- Mateo, J., Jimenez, M., Huerta, T., Pastor, A., 1991.” Contribution of different yeasts isolated from musts of Monastrell grapes to the aroma of wine”. *International Journal of. Food Microbiology*, 14: 153-160.
- Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., Combina, M., 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, 24, 403-412.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., 2005. Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 265-286.
- Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeasts. *Research in Microbiology*, 150, 199-204.
- Nurgel, C. 2000. Emir ve Kalecik Karası üzümünün şaraba işlenmesinde maya florasındaki gelişmeler ve fermantasyonda kullanılan mayaların kalite üzerine etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Adana, 161 s.

- Nurgel, C., Erten, H., Canbaş, A., Cabaroğlu, T., Selli, S., 2005. Yeast flora during the fermentation of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Emir and Kalecik karası grown in Anatolia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21:1187-1194
- Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Tzanetakis, N., 2006. Selection of indigenous *S. cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*, 23, 205-211.
- Nykänen, L., 1986. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 84-96.
- OIV, 2016, International Organisation of Vine and Wine, Compendium of international methods of wine and must analysis. Edition 2016, Volume 2.
- Orlić, S., Očić, N., Jeromel, A., Huić, K., Redžepović, S., 2005. Selection of indigenous *S. cerevisiae* strains from Kutjevo wine growing area at the laboratory scale. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 70 (3), 93-97.
- Ortega, C., López, R., Cacho, J., Ferreira, V., 2001. Fast analysis of important wine volatile compounds development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionization detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*. 923, 205-214.
- Ough, C.S, Amerine, M.A., 1988. *Methods for analysis of musts and wines*, John Willey and Sons, New York, 377s.
- Özçelik, F., Dönmez, S., 1993. Killer yeasts and the determination of killer characters of some yeasts. *Doğa-Turkish Journal of Biology*, 17,1-4.
- Özçelik, F., Denli, Y., 1999. şarap Mayalarının Teknolojik Özellikleri. *Gıda Dergisi*, 24 (6), 385-389.
- Parish, M. E., Carrol, D. E., 1987. Fermentation characteristics of *S. cerevisiae* isolates from *Vitis rotundifolia* grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1); 45-48.

- Peinado, R.A., Mauricio, J.C., 2009. Biologically aged wines (M.V., Moreno-Arribas, M.C. Polo). *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer, Madrid, s 81-101.
- Perez-Coello, M.S., Briones Perez, A. I., Ubeda Iranzo, J. F. , Martin Alvarez, P. J., 1999. Characteristics of wines fermented with different *S. cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. *Food Microbiology*, 16, 563-573.
- Pickering, G. J., Heatherbl, D. A., Barnes, M. F., 1998. Optimizing glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose Oxidase. *Food Research International*, 31 (10), 685-692.
- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J.C., Ortega, J.M., 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, 20, 217-224.
- Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Mozina, S.S., Cadez, N., 2006. « Yeast isolated from three varieties of grape cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region”, Slovenia. *Internation Journal of Food Microbiology*, 109, 97-102.
- Rauhut, D., 2009. Usage and formation of sulphur compounds (H. König, G., Uden, J. Fröhlich, Editörler). *Biology of Microroganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer, Heidelberg, s 181-207.
- Raymond Eder, M.L., Reynoso, C., Lauret, S.C., Rosa, A.L., 2017. Isolation and identification of the indigenous yeast population during spontaneous fermentation of Isabella (*Vitis labrusca* L.) grape must. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-8.
- Regodón , J.A., Perez, Vlades, M.E., De Miguel, C., Ramirez, M., 1997. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology*, 14,247-254.

- Regodón Mateos, J.A., Pérez-Nevado, F., Ramírez-Fernández, M., 2006. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzym and Microbial Technology*, 40, 151-157.
- Rementería, A., Rodríguez, J.A., Cadaval, A., Amenabar, R., Muguruza, J.R., Hernando, F.L., Sevilla, M.J., 2003. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the 'Txakoli de Bizkaia region (Basque Country, North Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 86, 201-207.
- Riberéau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., 2006a. The microbiology of wine and vinifications. *Handbook of Enology Vol. 1*, 2 nd. Ed. John Wiley & Sons, Ltd., UK.,p.(41).
- Riberéau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu., 2006b. Organic acids in wine. *Handbook of Enology Vol. 2*, 2 nd. Ed. John Wiley & Sons, Ltd., UK., s.3-51.
- Rodríguez, M.E., Infante, J.J., Molina, M., Domínguez, M., Rebordinos, L., Cantoral, J.M., 2010. Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1292,1302.
- Romancino, D.P., Di Maio, S., Muriella, R., Oliva, D., 2008. Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). *Journal of Applied Microbiology*, 105, 2248-2254.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003. Function of yeast species and strain in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169-180.
- Romano, P., Suzzi, G., 2002. Sulfur dioxide and wine microorganisms. *Wine Microbiology and Biotechnology*. (G.H. Fleet, Editor), Taylor&Francis, New York, s 373-393.

- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., 1992. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 126-130.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., Maifreni, M., 1997. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 615-618.
- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.M., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*, 157, 167-174.
- Salinas, F., Mandakovic, D., Urzua, U., Massera, A., Miras, S., Combina, M., Angelica Ganga, M., 2010. Genomic and phenotypic comparison between similar wine yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* from different geographic origin. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1850-1858.
- Schneider, R., Baumes, R., Bayanove, C., Razungles, A., 1998. "Volatile compounds involved in the aroma of sweet of fortified wines (Vins Doux Naturels) from Grenache Noir". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 3230-3237.
- Schneider, R., Razungles, A., Augier, C., Baumes, R., 2001. Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in muscadet wines. *Journal of Chromatography A*, 936, 145-15.
- Selli, S., Canbaş, A., Cabaroğlu, T., Erten, H., Lepoutre, J.P., Günata, Z., 2006. Effect of skin contact on the free and bound aroma compounds of the white wine of *Vitis vinifera* L cv. Narince, *Food Control*, 17, 75-82.
- Shi-Li, S.-S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J.-Y., Han, B.-Z., Reeves, M., 2010. Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 85-90.

- Shimuzu, K., 2002. Killer Yeasts. Wine Microbiology and Biotechnology. (G.H. Fleet, Editör)., Taylor&Francis, New York, s 243-262.
- Soares, E.V., Mota, M., 1996. Quantification of yeast flocculation. Journal of Institute of Brewing, Vol. 103, pp. 93-98.
- Spiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I., Antunovics, Z., 2001. Analysis of yeasts derived from natural fermentation on a Tokaj winery. Antonie van Leeuwenhoek, 79, 97-105.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E.J. Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. Australian Journal of Grape and Wine Research, Vol. 11, Issue 2, p 139-173.
- Sun, Y., Guo, J., Liu, F., Liu, Y., 2014. Identification on indigenous yeast flora isolated from the five winegrape varieties harvested in Xiangnin, China. Antonie van Leeuwenhoek, 105, 533-540.
- Suranska, H., Vranova, D., Omelkova, J., Vadkertiova, R., 2012. Monitoring of yeast population isolated during spontaneous fermentation of Moravian wine. Chemical papers, 66(9), 861-868.
- Suzzi, G., Romano, P., Benevelli, M., 1992. The flocculation of wine yeasts: biochemical and morphological characteristics in *Zygosaccharomyces*-flocculation in *Zygosaccharomyces*. Antonie van Leeuwenhoek, 61, 317-322.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30, 2725-2729.
- Teixeira, A., Caldeira, I., Duarte, F.L., 2015. Molecular and oenological characterization of Touriga Nacional non-*Saccharomyces* yeasts. Journal of Applied Microbiology, 118, 658-671.
- Tofalo, R., Schirone, M., Telera, G.C., Manetta, A.C., Corsetti, A., Suzzi, G., 2011. Influence of organic viticulture, on Non-*Saccharomyces* wine yeast populations. Annals of Microbiology, 61, 57-66.

- Ugliano, M., 2009. Enzymes in winemaking (M.V., Moreno-Arribas, M.C. Polo). Wine Chemistry and Biochemistry, Springer, Madrid, s 103-126.
- Ugliano, M., Henschke, P.A., 2009. Yeasts and wine flavour (M.V., Moreno-Arribas, M.C. Polo). Wine Chemistry and Biochemistry, Springer, Madrid, s 313-392.
- Van Keulen, H., Lindmark, D.G., Zeman, K.E., Gerlosky, W., 2003. Yeasts present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83: 149-154.
- Viana, F., Gil, J.V., Genovés, S., Vallés, S., Manzanares, P., 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*, 25, 778-785.
- Vigentini, I., Maghradze, D., Petrozziello, M., Bonello, F., Mezapelle, V., Valdetara, F., Failla, O., Foschino, R., 2016. Indigenous Georgian wine-associated yeasts and grape cultivars to edit the wine quality in a precision oenology perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-13.
- Villena, M.A., Iranzo, J.F.Ú., Pérez, A.I.B., 2007. β - Glukosidaze activity in wine yeasts: application in enology. *Enzym and Microbial Technology*, 40, 420-425.
- Zhang, H.Y., Lee, S.A., Bradbury, J.E., Warren, R.N., Sheth, H., Hooks, D.O., Richards, K.D., Gardner, R.C., 2010. Yeasts isolated from New Zeland vineyards and wineries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 491-496.
- Zohre, D. E., Erten, H., 2002. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochemistry*, 38, 319-324.
- Zwickl, D.J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the Maximum Likelihood criterion. *Doktora Tezi, Texas*, 115s.



ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Gaziantep' de doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2007 yılında Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2007-2008 yılları arasında ABD'nin Virginia eyaletinde bulunan Northern Virginia Community College da dil eğitimi gördü. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında yüksek lisans programı dahilinde Erasmus Staj Hareketliliği Programına katılarak bir dönem Fransa Bordeaux Üniversitesi Bağcılık ve Şarapçılık Fakültesinde çeşitli projelerde çalıştı. 2012 yılında yüksek lisans öğrenimini bitirerek aynı yıl Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı doktora programına başladı. Halen Çukurova Üniversitede Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine devam etmektedir.



EKLER



Ek 1. Tokat ve Nevşehir Yöreleri'nden 2014 yılında izole edilen mayalar

Maya kodu	İzolasyon kaynağı	Örnekleme Zamanı	Besiyeri	Maya türü	Blast omology %
1	TH	1	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
2	TH	1	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
3	TH	1	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
4	TH	1	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
8	TH	1	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
9	TH	1	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
10	TH	1	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
14	TH	1	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
17	NH	1	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
21	TH	1	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
25	TH	1	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
30	TA	2	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
37	TA	2	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
54	TB	2	YPD	<i>W. anomalus</i>	99%
61	TB	2	YPD	<i>S.cerevisiae/paradoxus</i>	99%
62	TB	2	YPD	<i>S.cerevisiae/paradoxus</i>	99%
68	TB	2	YPD	<i>S.cerevisiae/paradoxus</i>	99%
83	TB	2	YPD	<i>H'spora guilliermondii</i>	100%
95	TA	2	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
100	TA	2	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
101	TB	2	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
102	TB	2	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
103	TB	2	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
105	TB	2	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
110	TB	2	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
113	TB	2	LİZİN	<i>W. anomalus</i>	99%
114	TB	2	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
122	TB	2	YPD	<i>W. anomalus</i>	99%
123	TB	2	YPD	<i>W. anomalus</i>	99%
125	TB	2	YPD	<i>W. anomalus</i>	99%
135	TB	2	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
137	NB	2	LİZİN	<i>W. anomalus</i>	99%
141	NA	2	LİZİN	<i>W. anomalus</i>	99%

EK 1'in devamı

Maya kodu	İzolasyon kaynağı	Örnekleme Zamanı	Besiyeri	Maya türü	Blast omology %
142	NA	2	YPD	<i>W. anomalus</i>	99%
148	NA	2	LİZİN	<i>S.cerevisiae</i>	98%
149	NA	2	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	98%
159	NA	3	YPD	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
171	NA	2	LİZİN	<i>W. anomalus</i>	99%
176	NA	3	YPD	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
177	NA	3	YPD	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
192	NA	4	LİZİN	<i>T. delbrueckii</i>	99%
198	NB	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
211	NB	3	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%
214	NB	3	LİZİN	<i>T. delbrueckii</i>	99%
215	NB	3	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
218	NB	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
219	NB	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
222	NB	3	LİZİN	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
223	NB	3	LİZİN	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
224	NB	3	LİZİN	<i>T. delbrueckii</i>	99%
225	NB	3	LİZİN	<i>T. delbrueckii</i>	99%
227	TA	3	YPD	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
229	TA	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
236	TA	3	YPD	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
238	TA	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
241	TB	3	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
247	TB	3	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
249	TB	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
251	TB	3	YPD	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
255	TB	3	YPD	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
256	TB	3	YPD	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
258	TB	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
264	NB	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
267	NB	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
269	NB	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
270	NB	4	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%

EK 1'in devamı

Maya kodu	İzolasyon kaynağı	Örnekleme Zamanı	Besiyeri	Maya türü	Blast omology %
279	NB	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
285	NA	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
289	NA	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
292	NA	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
363	TB	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	98%
364	TB	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	98%
365	TB	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
394	TA	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
397	TA	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
398	TA	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%

T:Tokat, N: Nevşehir, A: tortu alma işlemi uygulanmamış deneme, B: tortu alma işlemi uygulanmamış deneme, 1: üzüm, 2: fermantasyon başı, 3: fermantasyon ortası, 4: fermantasyon sonu

Ek 2. Tokat ve Nevşehir Yörelere'nden 2015 yılında izole edilen mayalar

Maya kodu	İzolasyon kaynağı	Örnekleme Zamanı	Besiyeri	Maya türü	Blast omology %
438	TH	2	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
442	TH	2	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
468	NA	3	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
466	NA	3	YPD	<i>C. zemplinina</i>	99%
470	NA	3	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
475	NA	3	YPD	<i>I. terricola</i>	99%
476	NA	3	YPD	<i>W. anomalus</i>	99%
477	NA	3	YPD	<i>C. zemplinina</i>	99%
480	NA	3	YPD (+)	<i>I. terricola</i>	99%
481	NA	3	YPD (+)	<i>I. terricola</i>	99%
483	NA	3	YPD (+)	<i>I. orientalis</i>	100%
484	NA	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%
488	NA	3	YPD (+)	<i>C. zemplinina</i>	99%
498	NA	3	LİZİN	<i>I. orientalis</i>	99%
515	NA	3	YPD	<i>P. kluyveri</i>	99%
516	NA	3	YPD	<i>P. kluyveri</i>	99%
518	NA	3	YPD	<i>C. zemplinina</i>	99%
521	NA	3	YPD	<i>L. thermotolerans</i>	99%
523	NA	3	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%
528	NA	3	YPD (+)	<i>C. zemplinina</i>	98%
529	NA	3	YPD (+)	<i>C. zemplinina</i>	99%
532	NA	3	YPD (+)	<i>I. orientalis</i>	99%
536	NA	3	YPD (+)	<i>I. orientalis</i>	99%
539	NB	3	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
541	NB	3	LİZİN	<i>P. kluyveri</i>	99%
542	NB	3	LİZİN	<i>P. kluyveri</i>	99%
543	NB	3	LİZİN	<i>W. anomalus</i>	99%
545	NB	3	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
546	NB	3	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
547	NB	3	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
549	NB	3	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
550	NB	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%
553	NB	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%

EK 2'nin devamı

Maya kodu	İzolasyon kaynağı	Örnekleme Zamanı	Besiyeri	Maya türü	Blast omology %
555	NB	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	100%
556	NB	3	YPD (+)	<i>W. anomalus</i>	99%
558	NB	3	LİZİN	<i>W. anomalus</i>	99%
570	NB	3	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%
573	NB	3	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%
580	NA	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	100%
583	NA	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%
590	NH	2	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
591	NH	2	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
592	NH	2	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
594	NH	2	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
606	NB	3	YPD	<i>I. orientalis</i>	99%
659	TB	3	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
662	TB	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
672	TB	3	YPD (+)	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
673	TB	3	YPD (+)	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
678	TB	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%
679	TB	3	YPD (+)	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
680	TB	3	LİZİN	<i>P. occidentalis</i>	99%
681	TB	3	LİZİN	<i>S.cerevisiae</i>	98%
682	TB	3	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
683	TB	3	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
684	TB	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%
687	TB	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%
688	TB	3	YPD	<i>C. zemplinina</i>	99%
702	TB	3	YPD (+)	<i>P. kluyveri</i>	99%
703	TB	3	YPD (+)	<i>P. kluyveri</i>	99%
705	TB	3	YPD	<i>P. kluyveri</i>	99%
708	TB	3	LİZİN	<i>P. kluyveri</i>	99%
709	TA	3	YPD	<i>P. kluyveri</i>	99%
710	TA	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
711	TA	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
727	TA	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%

EK 2'nin devamı

Maya kodu	İzolasyon kaynağı	Örnekleme Zamanı	Besiyeri	Maya türü	Blast omology %
728	TA	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
729	TA	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%
730	TA	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%
740	TA	3	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%
741	TA	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
744	TA	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
751	TA	3	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
754	TA	3	LİZİN	<i>Metschnikowia sp.</i>	99%
755	TA	3	LİZİN	<i>Metschnikowia sp.</i>	99%
773	NB	3	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
774	NB	3	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
782	NB	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
787	NB	4	LİZİN	<i>S.cerevisiae</i>	
788	NB	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
789	NB	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
790	NB	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
793	NB	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
800	NB	4	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%
801	NB	4	YPD (+)	<i>S.cerevisiae</i>	99%
835	NB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
836	NB	4	YPD	<i>H'sporauvarum</i>	99%
837	NA	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
840	NA	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	99%
844	NA	4	YPD	<i>S.cerevisiae</i>	98%
853	NA	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
866	NA	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
867	NA	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
870	NA	4	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%
871	NA	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
879	TB	4	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%
880	TB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
882	TB	4	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%
884	NA	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%

EK 2'nin devamı

Maya kodu	İzolasyon kaynağı	Örnekleme Zamanı	Besiyeri	Maya türü	Blast omology %
885	NA	4	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%
886	TB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
887	TB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
888	TB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
890	TB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
891	TB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
893	TB	4	YPD	<i>C. zemplinina</i>	99%
896	TB	4	YPD	<i>C. zemplinina</i>	99%
899	TB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
900	TB	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
902	TB	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
916	TB	4	YPD	<i>C. zemplinina</i>	99%
917	TB	4	YPD (+)	<i>S. cerevisiae</i>	100%
918	TB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	100%
919	TB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
920	TB	4	YPD	<i>C. zemplinina</i>	99%
924	TB	4	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%
928	TB	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
930	TB	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
931	TB	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
935	TB	4	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%
938	NB	4	YPD	<i>T. delbrueckii</i>	99%
941	NB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
942	NB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
950	NB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
951	NB	4	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	99%
952	NB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
953	NB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
999	NB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1006	NB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1017	NB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1028	NB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1029	NB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	100%

EK 2'nin devamı

Maya kodu	İzolasyon kaynağı	Örnekleme Zamanı	Besiyeri	Maya türü	Blast omology %
1032	NB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	100%
1033	NB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	100%
1044	NB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1045	NB	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1048	NB	4	YPD (+)	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1068	NA	4	YPD (+)	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1082	TA	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1088	TA	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1089	TA	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1090	TA	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1094	TA	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1120	TA	4	YPD (+)	<i>L. thermotolerans</i>	98%
1121	TA	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	100%
1122	TA	4	YPD	<i>L. thermotolerans</i>	99%
1144	TA	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	98%
1149	TA	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	98%
1150	TA	4	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1151	TA	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
1152	TA	4	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	99%
1186	NB	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1188	NB	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1191	NB	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1193	NB	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1196	NB	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1198	NB	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1199	NB	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1210	NB	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1203	NB	5	YPD	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
1212	NB	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1213	NB	5	YPD	<i>H'spora guilliermondii</i>	99%
1256	NA	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1259	NA	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1261	NB	5	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	97%

EK 2'nin devamı

Maya kodu	İzolasyon kaynağı	Örnekleme Zamanı	Besiyeri	Maya türü	Blast omology %
1262	NB	5	LİZİN	<i>H'spora uvarum</i>	97%
1266	NA	5	LİZİN	<i>T. delbrueckii</i>	98%
1268	NA	5	YPD (+)	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1273	NA	5	YPD (+)	<i>S. cerevisiae</i>	98%
1277	NA	5	YPD (+)	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1281	NA	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1286	NA	5	YPD	<i>S. cerevisiae</i>	99%
1287	NA	5	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	98%
1319	NA	5	YPD	<i>H'spora uvarum</i>	98%

T:Tokat, N: Nevşehir, A: tortu alma işlemi uygulanmamış deneme, B: tortu alma işlemi uygulanmamış deneme, 1: üzüm, 2: fermantasyon başı, 3: fermantasyon ortası, 4: fermantasyon sonu