

ŞARAPTA YENİ ÖLDÜRÜCÜ MAYALARIN KARAKTERİZASYONU

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ahsen AFYONCU

Danışman:

Yrd. Doç. Dr. Nermin SARIGÜL

**Ocak, 2012
BURDUR**



T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Ahsen AFYONCU tarafından Yrd.Doç.Dr. Nermin SARIGÜL yönetiminde hazırlanan “Şarapta Yeni Öldürücü Mayaların Karakterizasyonu” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 19/01/2012

Yrd. Doç. Dr. Nermin SARIGÜL
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi


Başkan

Doç. Dr. Halil BIYIK
Adnan Menderes Üniversitesi


Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi


Jüri Üyesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ekrem ÇİÇEK
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Katil Sistemler	5
1.1.1. dsRNA Virüs Tabanlı Katil Maya Sistemleri	5
1.1.2. Sitoplazmik Doğrusal DNA Plazmidli Katil Maya Sistemleri	6
1.1.3. Kromozomlarda Kodlanan Katil Maya Sistemleri	7
1.2. Katil Toksinlerin Etki Mekanizması	9
1.3. Katil Mayalar Ve Fermantasyon Teknolojisinde Kullanımları	12
1.4. Melas	14
1.5. Şıra	15
1.6. Aktif Kuru Mayalar	16
1.7. Fermantasyon	17
1.7.1. Fermantasyon Ortamında Mayalar	19
1.7.2. Şarap Fermantasyonlarında Endojen Mayaların Kullanımı	20
1.7.3. Alternatif Şarap Mayalarının Seçimi ve Karışık Starter Kültür Kullanımı	21
2. MATERYAL ve YÖNTEM	24
2.1. Materyallar	24
2.1.1. Maya Suşları	24
2.1.2. Kültür Besiyerleri	25
2.1.2.1. YEPD Besiyerleri	25
2.1.2.2. Spor Oluşturma Besiyeri	26
2.1.2.3. Katil Özellik Belirleme Besiyeri	26

2.1.2.4. Tomato Juice Agar	27
2.1.2.5. MRS Agar	27
2.1.2.6. GYC Agar	27
2.1.2.7. Melas Ortamı	28
2.1.2.8. Şıra	28
2.1.3. Gram Boyamada Kullanılan Kimyasallar	29
2.1.3.1. Kristal Viyoleto Solüsyonu	29
2.1.3.2. Gram İyodür Solüsyonu	29
2.1.3.3. Safranin Solüsyonu	30
2.1.4. Araştırmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler	30
2.2. Yöntemler	32
2.2.1. Katil Mayaların Tespitine Yönelik Çalışmalar	32
2.2.1.1. Saflık Kontrolü	32
2.2.1.2. Katil Toksin Testi	32
2.2.2. Şarap Yapımı Öncesi Mayalar Üzerindeki Analizler	33
2.2.2.1. Şarap Yapımında Kullanılacak Mayaların Büyüme Eğrisinin Çıkarılması	33
2.2.2.2. Şarap Yapımında Kullanılacak Mayaların Canlı Hücre Sayımı ve Toplam Hücre Sayımı	33
2.2.2.3. Şarap Yapımında Kullanılacak Mayaların Biyokütle Tayini	34
2.2.3. Şıra Üzerinde Yapılan Analizler	34
2.2.3.1. pH Tayini	34
2.2.3.2. Spesifik Yoğunluk ve Briks Tayini	34
2.2.3.3. Sıcaklık Tayini	35
2.2.4. Şarap Fermantasyonu	35
2.2.5. Fermantasyon Sırasında Yapılan Analizler	41
2.2.5.1. Canlı Hücre Sayımı ve Toplam Hücre Sayımı	41
2.2.5.2. Spesifik Yoğunluk, Briks ve Sıcaklık Tayini	41
2.2.3.3. Gram Boyama	41
2.2.6. Duyusal Analiz	42
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	43
3.1. Yayma Mayalarının Kontrolü Ve Katil Maya Özelliğinin Belirlenmesi	43
3.2. Şarap Yapımı Öncesi Mayalar Üzerinde Yapılan Analizler	46

3.3. Şıra Analizleri	63
3.3.1. pH Tayini	63
3.3.2. Spesifik Yoğunluk ve Briks Tayini	63
3.4. Fermantasyon Sırasında Yapılan Analizler	64
3.4.1. Sıcaklık Değişimleri	64
3.4.2. Briks Tayini	65
3.4.3. Üzüm Şırasında Spesifik Yoğunluk Tayini	66
3.4.3.1. Kırmızı Üzüm Şırasında Spesifik Yoğunluk Tayini	66
3.4.3.2. Beyaz Üzüm Şırasında Spesifik Yoğunluk Tayini	67
3.4.4. Kırmızı Üzüm Şırasında Fermantasyon Süresince Genel Değişimler	69
3.4.5. Beyaz Üzüm Şırasında Fermantasyon Süresince Genel Değişimler	71
3.4.6. Üzüm Şırasında Fermantasyon Süresince Laktik Asit Bakterisi ve Asetik Asit Bakterilerindeki Genel Değişimler	73
3.4.7. Duyusal Analiz	73
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	76
5. KAYNAKLAR	83
EKLER	91
EK-1	91
ÖZGEÇMİŞ	92

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ŞARAPTA YENİ ÖLDÜRÜCÜ MAYALARIN KARAKTERİZASYONU

Ahsen AFYONCU
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Çalışmamızda, önceki çalışmalarda bağlardan izole edilerek tanımlanmış olan mayalar üreme hızı, diğer mayaları öldürme kapasiteleri incelenerek şarap fermantasyonu için seçilmişlerdir. Maya büyümesi spektrofotometrik olarak % 2 ve % 10 oranında YEPD sıvı besiyerine, % 2 oranında melas besiyerine inokulum yapılarak belirlenmiştir. *S. cerevisiae* E7AR1 suşunun ortalama olarak en yüksek üreme hızına sahip olduğu belirlenmiştir.

Gelişme ve üreme durumu incelenen mayalar arasında biyokütle artışı ve hızı bakımından *S. cerevisiae* E7AR1, *T. delbrueckii* CH126, *T. delbrueckii* EX1180 ve *T. delbrueckii* BP4412 strainleri şarap yapımında kullanılmak üzere seçilmiştir. Ayrıca spontan olarak da şarap fermantasyonu gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon süresince şıra ortamındaki mayaların şeker tüketim miktarı incelendiğinde; kırmızı ve beyaz üzüm sırasında en iyi şeker tüketim kapasitesinin *S. cerevisiae* E7AR1 (Şıra 2) ve *T. delbrueckii* BP4412 + *S. cerevisiae* E7AR1 (Şıra 5)' de olduğu gözlenmiştir.

Fermantasyonun toplam süresi, katil özellik, şeker tüketimi ve duyuşal analiz bakımından üretilen kırmızı ve beyaz şaraplar karşılaştırılmıştır. Kırmızı ve beyaz şarapta yapılan duyuşal analizlerde berraklık puanlamasında en düşük puanı *T. delbrueckii* BP4412 + *S. cerevisiae* E7AR1 ko-kültürü ile üretilen şarap almıştır. Şarap Fermantasyon hızı ve duyuşal analiz sonuçları incelendiğinde en yüksek verimin *S. cerevisiae* E7AR1 straininden elde edildiği görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspóra delbrueckii*, şarap Fermantasyonu

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nermin SARIGÜL, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

CHARACTERIZATION OF NEW KILLER YEASTS IN WINE

Ahsen AFYONCU
Mehmet Akif Ersoy University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

In this study, yeast strains previously isolated and identified from vineyards were selected by their growth rate and killer abilities. The influences of inoculum size and medium on %2 inoculum in molasses medium. At these conditions *S. cerevisiae* E7AR1 has the most rapid growth as average.

S. cerevisiae E7AR1, *T. delbrueckii* CH126, *T. delbrueckii* EX1180 and *T. delbrueckii* BP4412 strains were selected for wine making according to their population growth rates and killer abilities. Wine fermentation was also performed by spontaneously.

During fermentation, sugar consumption in red and white grape must showed that *S. cerevisiae* E7AR1 (must 2) and *T. delbrueckii* BP4412 + *S. cerevisiae* E7AR1 (must 5) had the highest sugar consumption capacity.

Red and white wines were compared for fermentation time, killer activity, sugar consumption and sensory analysis. In sensory analysis of red and white wine, *T. delbrueckii* BP4412 + *S. cerevisiae* E7AR1 had the lowest evaluation mark. According to fermentation period and sensory analysis the best yield was gained from the strain *S. cerevisiae* E7AR1.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaporadelbrueckii*, wine fermentation.

Advisor: Yrd. Doç. Dr. Nermin SARIGÜL, Mehmet Akif Ersoy University, Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

TEŞEKKÜR

Çalıőmamn her aşamasında ve tezin yazımı sırasında yol gosteren, değerli yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Nermin SARIGÜL' e sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Araőtırmalarım, çalıőmalarım sırasında yardım ve önerilerini esirgemeyen bu çalıőmanın yürütölmesinde mesleki bilgisinden ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Manuel RamírezFernández' e, laboratuvar çalıőmalarım sırasında yardımcı olan Arő. Gör. RocíoVelazquezMolinero ' ya, yüksek lisans eğitimim için hiçbir fedakarlığı ve desteği esirgemeyen babamAli İhsan AFYONCU' ya, çalıőmalarım süresince ilgi, sabır ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve iş arkadaşlarıma teőekkürlerimi sunarım.

Ahsen AFYONCU
BURDUR, 2012

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Viral toksinlerin (K1, K2, K28) etki mekanizması.....	10
Şekil 1.2. <i>S.cerevisiae</i> K1 ve K28 mayalarının viral toksinlerin reseptör aracılı..... eylem modu	12
Şekil 3.1. Bilinen fenotiplerle, mayaların 20 °C’ de pH 4’ de test plağı görüntüsü....	43
Şekil 3.2. Şarap mayalarının mikroskopik görüntüsü.....	45
Şekil 3.3. Şarap yapımında kullanılacak mayaların yayma mayası <i>S. cerevisiae</i> EX33 kullanılarak katil testi	46
Şekil 3.4. <i>S. cerevisiae</i> EX88 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme..... eğrisi (% 2 inokulum oranı)	47
Şekil 3.5. <i>S. cerevisiae</i> E7AR1 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme..... eğrisi (% 2 inokulum oranı)	48
Şekil 3.6. <i>S. cerevisiae</i> ROD23 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme..... eğrisi (% 2 inokulum oranı)	48
Şekil 3.7. <i>S. cerevisiae</i> EX1160 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme..... eğrisi (% 2 inokulum oranı).	49
Şekil 3.8. <i>T. delbrueckii</i> CH126 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme..... eğrisi (% 2 inokulum oranı)	50
Şekil 3.9. <i>T. delbrueckii</i> EX1178 suşuna ait mayaların YEPD-sıvı besiyerinde..... büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı)	50
Şekil 3.10. <i>T. delbrueckii</i> EX1180 suşuna ait mayaların YEPD-sıvı besiyerinde.... büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı)	51
Şekil 3.11. <i>T. delbrueckii</i> BP4412 suşuna ait mayaların YEPD-sıvı besiyerinde.... büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı)	52
Şekil 3.12. <i>S. cerevisiae</i> EX88 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme..... eğrisi (% 10 inokulum oranı)	52
Şekil 3.13. <i>S. cerevisiae</i> E7AR1 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme..... eğrisi (% 10 inokulum oranı)	53

Şekil 3.14. <i>S. cerevisiae</i> ROD23 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme.....	54
eğrisi (% 10 inokulum oranı)	
Şekil 3.15. <i>S. cerevisiae</i> EX1160 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme.....	54
eğrisi (% 10 inokulum oranı)	
Şekil 3.16. <i>T. delbrueckii</i> CH126 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme.....	55
eğrisi (% 10 inokulum oranı)	
Şekil 3.17. <i>T. delbrueckii</i> EX1178 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme.....	56
eğrisi (% 10 inokulum oranı)	
Şekil 3.18. <i>T. delbrueckii</i> EX1180 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme.....	56
eğrisi (% 10 inokulum oranı)	
Şekil 3.19. <i>T. delbrueckii</i> BP4412 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme.....	57
eğrisi (% 10 inokulum oranı)	
Şekil 3.20. <i>S. cerevisiae</i> EX88 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi.....	58
(% 2 inokulum oranı)	
Şekil 3.21. <i>S. cerevisiae</i> E7AR1 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi.....	58
(% 2 inokulum oranı)	
Şekil 3.22. <i>S. cerevisiae</i> ROD23 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi.....	59
(% 2 inokulum oranı)	
Şekil 3.23. <i>S. cerevisiae</i> EX1160 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi.....	60
(% 2 inokulum oranı)	
Şekil 3.24. <i>T. delbrueckii</i> CH126 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi.....	60
(% 2 inokulum oranı)	
Şekil 3.25. <i>T. delbrueckii</i> EX1178 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi.....	61
(% 2 inokulum oranı)	
Şekil 3.26. <i>T. delbrueckii</i> EX1180 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi.....	62
(% 2 inokulum oranı)	
Şekil 3.27. <i>T. delbrueckii</i> BP4412 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi.....	62
(% 2 inokulum oranı)	
Şekil 3.28. Mayaların YEPD-sıvı besiyeri ve melas ortamında ikilenme süreleri..	63
Şekil 3.29. Kırmızı üzüm şirasının spontan fermantasyonundan YEPD-Agar.....	70
besiyerine yapılan yayma plaka ekimi	
Şekil 3.30. Kırmızı üzüm şirasının spontan fermantasyonunda gözlenen apikulat..	70
mayalarının mikroskopik görüntüsü	

Şekil 3.31. Kırmızı üzüm sırasında fermantasyon ve toplam hücre sayısı.....	71
değişimi	
Şekil 3.32. Beyaz üzüm sırasında fermantasyon ve toplam hücre sayısı.....	72
değişimi	
Şekil 3.33. Duyusal analiz aşamasında kırmızı şaraplar.....	74
Şekil 3.34. Duyusal analiz aşamasında beyaz şaraplar.....	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Öldürücü mayalar ve onların öldürücü toksinleri	4
Çizelge 1.2. <i>S. cerevisiae</i> katil cinsinin fenotipleri ve özellikleri.....	5
Çizelge 1.3. Öldürücü fenotip mayalarda ekspresyonun genetik materyali	8
Çizelge 1.4. Öldürücü toksinler ve hedef hücredeki reseptörleri.....	11
Çizelge 2.1. Yayma mayaları	24
Çizelge 2.2. Maya üretimi için kullanılan şarap mayası suşları.....	25
Çizelge 2.3. Rutin ekimler için kullanılan YEPD-sıvı besiyerinin içeriği.....	26
Çizelge 2.4. Spor oluşumuna bakmak için kullanılan besiyerinin içeriği.....	26
Çizelge 2.5. GYC-agarın içeriği.....	27
Çizelge 2.6. Mayaların çoğalması için hazırlanan melas ortamı (pH 4,0).....	28
Çizelge 2.7. Kristal viyoleto solüsyonu içeriği.....	29
Çizelge 2.8. Gram iyodür solüsyonu içeriği.....	29
Çizelge 2.9. Safranin solüsyonu içeriği.....	30
Çizelge 2.10. Araştırmalarda kullanılan araç ve gereçler.	30
Çizelge 2.11. Şıralara uygulanan mayalar.	35
Çizelge 2.12. Beyaz üzüm sırasında spontan fermantasyon çalışması.....	37
Çizelge 2.13. Beyaz üzüm sırasında mayalar ile fermantasyon çalışması.....	38
Çizelge 2.14. Kırmızı üzüm sırasında spontan fermantasyon çalışması.....	39
Çizelge 2.15. Kırmızı üzüm sırasında mayalar ile fermantasyon çalışması.	40
Çizelge 2.16. Duyusal analiz formu.....	42
Çizelge 3.1. Fermantasyon süresince gözlenen sıcaklık değişimleri	64
Çizelge 3.2. Fermantasyon süresince şıralardaki briksin fermantasyon boyunca.....	65
değişimi	
Çizelge 3.3. Kırmızı üzüm şirasının fermantasyonu sırasındaki yoğunluk değişimi.....	67
Çizelge 3.4. Beyaz üzüm şirasının fermantasyonu sırasındaki yoğunluk değişimi.....	68
Çizelge 3.5. Kırmızı şaraptaki duyusal analiz sonuçları.....	73
Çizelge 3.6. Beyaz şaraptaki duyusal analiz sonuçları	74

1. GİRİŞ

Şarap üretiminde özel olarak seçilmiş maya türlerinin kullanılması ile birçok ülkede çok iyi sonuçlar alındığı belirtilmektedir. Saflaştırıldıktan sonra karakterize edilerek, şarap fabrikalarının kültür koleksiyonuna katılan mayalar ile üretilen son ürünlerin kalitesinin, spontan fermantasyon yolu ile üretilenlerden daha iyi olduğu ifade edilmektedir. Son yıllarda, İspanya gibi geleneksel şarap üretimi yapan ülkelerde, kontrollü şıra fermantasyonu için özel olarak seçilmiş, yerel maya türlerinin kullanımında artış olduğu ifade edilmektedir. Yerel maya suşlarının, çevresel koşullara daha iyi adapte olabilmeleri nedeni ile yarışçıl özelliklerinin daha fazla olduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle yerel suşların fermantasyon sırasında baskın florada yer alabilecekleri ve şarabın oluşumundan sorumlu en önemli biyolojik etmen olabilecekleri ifade edilmektedir.

Öldürücü mayaların, şarap fermantasyonunda istenmeyen türlerin ve yabancı maya türlerinin gelişmesini önlemede ve fermantasyonda istenmeyen bileşiklerin oluşumunun kontrolünde kullanılabileceği düşünülmektedir. Şarap ve bira endüstrisinde son yıllardaki eğilim; katil özelliğe sahip, şaraplık kalitesi yüksek bir maya suşu geliştirmektir. Bunun için fermantasyonda ön kültür olarak katil maya kullanılırsa, katil mayalar dominant hale gelir; şarap fermantasyonunda istenmeyen yabancı maya türlerinin gelişmesini önler ve fermantasyonda istenmeyen bileşiklerin, aşırı H_2S , uçucu asitler ve aroma oluşumunun kontrolünü sağlar. Bir katil maya, şarap yapımı için pozitif karakteristiklere sahip olursa ve starter kültür olarak kullanılırsa şarap fermantasyonu sorunsuz tamamlanacak ve fermantasyon prosesi kendi kendini koruyabilecektir

Bu çalışmada şarap üretimi amacıyla Çizelge 2.2.'deki yerel katil mayalar ile özellikleri bilinen ticari aktif kuru mayalar kullanılmıştır. Ticari maya suşları ve katil mayalar sıvı besiyerinde aktiveleştirilmiş ve fermantasyon ortamlarına inokülasyonları yapılmıştır. Farklı cinslere ait mayalar, katil mayalar ile kullanılarak bu mayaların fermantasyon yetenekleri karşılaştırılmıştır. Fermantasyonda ortamdaki gaz (CO_2) oluşumu ile etil alkol oluşumu kantitatif olarak izlenmiştir. Fermantasyona başlama hızı, şeker tüketim kapasitesi ve duyu analizi bakımından kırmızı ve beyaz üzüm şıralarına öldürücü mayaların etkisi incelenmiştir.

Katil mayalar ilk olarak Makower ve (1963) tarafından *Saccharomyces cerevisiae*' nin laboratuvar suşlarının arasında keşfedilmiştir (Marquina ve diğ., 2002; Manfred ve Breinig, 2002; Mohamudha ve Ayesha Begum, 2010). Araştırmacılar maya suşlarını katil, hassas ve nötral olmak üzere 3 gruba ayırmıştır. Katil mayalar, aynı türün duyarlı suşlarını öldüren fakat kendilerinin bağışık olduğu protein yapıda toksinler salgırlar. Bu proteinler öldürücü toksinler diye adlandırılır (Schmitt ve Breinig, 2002; 2006; Rodrigez- Cousiño ve diğ., 2011).

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise öldürücü özellikleri bakımından mayalar dört sınıfa ayrılmıştır. Bunlar; öldürücü; K, duyarlı; S, nötral; N, öldürücü- duyarlı; K-S suşlarıdır. Öldürücü suşlar kendi toksinine bağışık olup, nötral suşlar ise hem toksin üretmezler hem de öldürücü toksine karşı duyarsızdır. Öldürücü-duyarlı suşlar ise öldürücü faktöre sahip olup, aynı zamanda diğ er katil mayaların toksinine karşı da duyarlıdırlar (Hutchins ve Bussey, 1983). Bu toksinlerin etkisi hem toksinin güçlülüğüne hem de seçilen koşullar altında hücrelerin duyarlılığına ve büyüme fazına bağlıdır (Özçelik ve diğ., 1996).

Öldürücü toksin sentezleme özelliği ş arap ve bira fermantasyonları ile ekmek üretim prosesi olmak üzere diğ iş ik fermantasyonlarda görülebilir. Öldürücü maya türleri, farklı gıda ve içki fermantasyonlarından olabildiği gibi, göller, nehirler, meyve ve sebzeler gibi diğ iş ik ortamlardan da izole edilmişlerdir. Ekolojik çalışmalarda, katil türlerdeki öldürücü aktivitenin toksin üretmekten habitatından diğ er mayaları uzak tutmak şeklinde bir rekabet mekanizması olduğunu işaret etmektedir (Hutchins ve Bussey, 1983).

S. cerevisiae katil maya türleri arasında ekonomik önemi nedeniyle en çok incelenen türdür (Vondrejs ve diğ., 1996; Manfred ve Breinig, 2002). Çizelge 1.2.' de *S. cerevisiae* katil türe ait fenotipler ve özellikleri gösterilmiştir. Ş u anda katil olan türlere ait bu mayalar, salgılanan toksinlerin moleküler özelliklerine, onların öldürme profiline, çapraz bağışıklık eksikliğine ve genetik belirleyicilerin kodlarına göre K1, K2 ve K28 olmak üzere 3 ana gruba ayrılmıştır (Schmitt ve Breinig, 2002; 2006; Mohamudha ve Ayesha Begum, 2010; Rodrigez-Cousiño ve diğ., 2011). Bu mayalar, dsRNA tarafından kodlanan toksinleri üreten suşlar tarafından oluşturulmuştur. Ama KHR ve KHS adlı toksinleri üreten katil mayalar kromozomal DNA üzerinde kodlanmıştır (Goto ve diğ., 1990; Onat, 2007; Rodrigez-Cousiño ve diğ., 2011).

1978 yılında Young ve Yagiu, çapraz - karşılıklı öldürme ve öldürücü suşlar arasındaki immün etkileşime bağlı olarak öldürücü maya suşlarını 10 gruba ayırmıştır (Young ve Yagiu, 1978; Goto ve diğ., 1991; Yener, 2006; Stefanie ve diğ., 2006).

Young ve Yagiu' nun bu sınıflandırmasına Wickner tarafından K11 tipi eklenmiştir. Çizelge 1.1.' de öldürücü mayalar ve onların öldürücü toksinleri gösterilmektedir (Goto ve diğ., 1991). İlk üç grup (K1, K2 ve K3) *Saccharomyces cerevisiae* suşudur. K1 toksini yüksek sıcaklığa ve proteazlara karşı duyarlı olup, pH optimumu 4,6-4,8 arasındadır. Bu nedenle K1 toksini düşük pH' da inaktif hale geleceğinden, şarap fermantasyonunda önemli değildir (Manfred ve Breinig, 2002). Buna karşılık K2 toksini pH 2,8-4,8 arasında stabildir. Wingfield ve diğ., (1986) K3 toksin tipi K2 toksin tipinin bir mutanı ve bu iki tipin K1'den farklı olduğunu belirtmişlerdir (Wickner, 1979; Wingfield ve diğ., 1986). K3 tipinin sadece şarap mayasındaki suşlardan oluşur ve K1, K2 tipi katilleri öldürme aktivitesine sahiptir. Bu nedenle K2 ve K3 tipi mayalar şarap endüstrisinde bir sorun yaratabilirler. Bu tip mayaların toksinlerinin fermantasyonu sağlayan duyarlı şarap mayalarına karşı, öldürücü olduğu saptanmıştır.

K4-K11 öldürücü tipleri ise *Saccharomyces cerevisiae*' nin dışındaki diğer cins ve türlere özgüdür (Wickner, 1979). Bu sınıflandırma Çizelge 1.1.' de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Öldürücü Mayalar ve Onların Öldürücü Toksinleri (Goto ve diğ., 1991; Yener, 2006).

<u>Öldürücü Protein Üreten Suşlar</u>	<u>Sınıflandırma</u>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	K1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	K2
<i>Saccharomyces capensis</i>	K3
<i>Candida glabrata</i>	K4
<i>Pichia anomala</i>	K5
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	K6
<i>Candida valida</i>	K7
<i>Hansenula anomala</i>	K8
<i>Hansenula mrakii</i>	K9
<i>Kluyveromyces drosophilae</i>	K10
<i>Torulopsis glabrata</i>	K11

* K2 yalnızca fermantasyon kontaminantlarında bulunması ve K1 katillerini öldürmesine rağmen, K1 fenotipi, geniş bir şekilde *S. cerevisiae*'nin laboratuvar suşlarında ve yabani suşlarında bulunmaktadır.

Öldürücü toksinler, türler ve suşlar arasında; proteinlerin 3 boyutlu yapısı, toksinlerin etki mekanizması, moleküler büyüklüğü ve onları kodlayan gen bakımından farklılıklar gösterir (Türkmen, 1993).

Öldürücü maya toksinlerinin etkinliği pH ve sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Genellikle pH 4-5 ve 20–25 °C'de aktif ve kararlıdır. Ayrıca her toksinin daha öldürücü etki gösterdiği optimum pH ve sıcaklık değeri vardır (Hutchins ve Bussey, 1983; Suzuki, 1999; Yener, 2006).

Çizelge 1.2. *S. cerevisiae* Katil Cinsinin Fenotipleri ve Özellikleri (Yener, 2006; Özçelik, 2007)

<u>Fenotip</u>	<u>Özellikleri</u>
$K_1^+ R_1^+$	Öldürücü protein üreten, kendi proteinine bağışık, K2 ve K3 proteinlerine duyarlı türler.
$K_2^+ R_2^+$	Öldürücü protein üreten, kendi proteinine bağışık, K1 ve K3 proteinlerine duyarlı türler.
$K_3^+ R_3^+$	Öldürücü protein üreten, kendi proteinine bağışık, K1 ve K2 proteinlerine duyarlı türler
$K^- R^+$	Nötral fenotip; Suşlar katil protein üretmezler ve bağışıktırlar.
$K_1^{++} R_1^+$	Süper katil fenotip; Suşlar daha aktif ve daha stabil K1 katil proteinini üretir.
$K_1^+ R_1^w$	İntihar fenotip; Toksin üreten ve K1 toksinine karşı azalan bir bağışıklık gösteren türlerdir.
$K^- R^-$	Katil protein üretmeyen duyarlı türlerdir.

* K^+ ; Katil özelliğinin varlığını, K^- ; Katil özelliğinin yokluğunu,

* R^+ ; Bağışıklık özelliğinin varlığını, R^- ; Bağışıklık özelliğinin yokluğunu ifade eder.

1.1. Katil Sistemler

1.1.1. dsRNA Virüs Tabanlı Katil Maya Sistemleri

Saccharomyces cinsi üyelerinin ürettiği katil toksin, çift sarmallı RNA plazmid (dsRNA plazmid) varlığına bağlıdır. Bunlar dsRNA virüsleri veya virüs benzeri partiküller olarak tanımlanırlar. Virüs benzeri bu partiküller tomurcuklanma sırasında hücreden hücreye füzyon ile taşınırlar ve *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ve *Pichia* cinslerine ait türlerde rastlanmaktadır (Türkiye 9. Gıda Kongresi, 2006).

Öldürücü fenotip her zaman dsRNA ile belirlenmez. *Kluyveromyces lactis* gibi diğer maya cinslerinde, öldürücü fenotip için gerekli bilgi lineer çift iplikçikli DNA tarafından taşınmaktadır.

Candida sp. ve *Hansenula anomala*'nın öldürücü karakteri ise ekstrakromozomal genlerle değil, kromozomal genlerle kodlanmıştır (Türkiye 9. Gıda Kongresi, 2006).

S. cerevisiae' de L (4,6-4,8 kb) ve M (1,0-1,8 kb) olarak isimlendirilen iki dsRNA (L dsRNA ve M dsRNA) plazmidi tanımlanmıştır (Soares ve Sato, 1999; Manfred ve Breinig, 2002; Tsutomu ve Esteban, 2010). Sırasıyla K1, K2, K3 gibi farklı tipte suşlara ait farklı boyutlarda plazmitler vardır. Bunlar; M1 (1,9 kb), M2 (1,7 kb), M3 ds (1,5 kb). M dsRNA hücrede 10-100 arasında değişen yüksek kopya sayısında bulunmaktadır. M dsRNA katil toksinle beraber kendini, kendi ürettiği toksinden koruyan bağışıklık faktörlerini kodlar. L dsRNA, M formundan 3 kat daha büyüktür. L dsRNA, virüs benzeri kapsül proteinini; M dsRNA ise katil toksin sentezini kodlar. Diğer bir ifade ile L dsRNA M dsRNA' nın enkapsidasyonu için gerekli proteinleri kodlamaktadır M dsRNA ise katil fenotipin ortaya çıkmasından sorumludur. M dsRNA virüsü sadece öldürücü aktiviteye sahip suşlarda bulunur. L dsRNA virüsü ise pek çok maya suşunda bulunabilir.

1.1.2. Sitoplazmik Doğrusal DNA Plazmidli Katil Maya Sistemleri

Sitoplazmada bulunan doğrusal (lineer) ekstrakromozomal dsDNA elementleri doğrusal plazmidler olarak bilinir ve prokaryotlar ile ökaryotlar arasında geniş yayılım gösterir. Doğrusal DNA plazmidi genellikle ipliksi mantarlar ve bitkiler arasında mitokondri ile ilişkilidir. Mayalarda ise doğrusal DNA plazmidi sitoplazmadadır ve özel bir genetik organizasyona sahiptir. Bu nedenle mayaların doğrusal plazmidleri ayrı bir plazmid grubu olarak değerlendirilebilir (Berry, 1995).

S. italicus, *D. diastaticus*, *T. dattila* ve *K. lactis*'de iki tane lineer çift iplikçikli ve öldürücü toksin üretme yeteneğinde DNA plasmidlerinin varlığı açıklanmıştır. Bunlar; pGKL 1 ve pGKL 2'dir. Bu DNA plasmidlerine sahip olan *K. lactis* suşunun, toksik maddeler salgılayarak diğer mayaları (toksik madde sentezlemeyenler) öldürdüğü belirlenmiştir. (Rosini, 1983; Stefanie ve diğ., 2006). pGKL 1 ve pGKL 2 plazmidi çekirdekte değil, sitoplazmada bulunmaktadır ve katil fenotipin oluşması ile ilişkilidir. Bu öldürücü toksinler, pGKL 1 (8,9 kb), pGKL 2 (13,5 kb)'den daha küçüktür ve otonom değildir. pGKL 2 ise 13,4 kb' dır ve otonomdur (Paluszynski ve diğ. 2007; Yener, 2006; Stefanie ve diğ., 2006).

pGKL 1, katil toksinleri ve buna karşı hücrenin bağışıklığı ile ilgili proteinleri kodlarken; büyük plazmid pGKL 2, linear plazmidlerin bakım ve replikasyonu için gerekli olması muhtemeldir (Bostian ve diğ., 1980; Stark ve diğ., 1990; Schickel ve diğ., 1996; Yener, 2006; Stefanie ve diğ., 2006). pGKL 2, daha üniform bir plazmid iken, pGKL 1 türler arası değişkenlik gösterir. *Kluyveromyces lactis* türüne ait olan öldürücü mayalar yüksek moleküler ağırlıkta iki alt üniteli toksin üretmektedirler. Bu toksin, adenil siklaz aktivitesini inhibe etmektedir (Magliani ve Conti, 1997).

Ustilago maydis'te katil özellik dsRNA mikovirüsleri tarafından kodlanır. Santos ve diğ. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada *Ustilago maydis*'in katil faaliyetlerinin *Brettanomyces bruxellensis*'e karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır. *B. bruxellensis* şarap kalitesi için en zararlı türlerden biridir ve biyokontrolü zordur. Yapılan çalışmada, *U. maydis* CYC 1410 suşundaki KP6 toksininin pH 3,0 ile 4,5 arasında ve 15 °C ile 25 °C değerinde *B. bruxellensis*' e karşı aktif olduğunu ve şarapçılıkta biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceğini saptanmıştır.

1.1.3. Kromozomlarda Kodlanan Katil Maya Sistemleri

Yapılan bazı çalışmalarda katil özelliklerin plazmidlerde bulunduğu belirlenmiştir. Bir halotolerant maya olan *Pichia farinosa*, katil geni [*SMK1*] kromozom üzerinde bulunur ve *S. cerevisiae*'nin K1 toksinine benzeyen toksini kodlar. Bu toksinin ekspresyonu (SMKT: Tuz aracılı katil toksin) NaCl tarafından post-translasyonel kontrollüdür (Meinhardt ve Klassen, 2007).

Halotolerant bir maya olan *Candida nodaensis*'den salgılanan CnKT katil toksini geni kromozomlarda kodlanmıştır. Bu toksin geniş pH aralığı ve sıcaklıkta aktiftir, uzun zaman periyodlarında koruma ve donmaya karşı toleranslıdır. CnKT'nin stabilitesi, yüksek iyonik koşullar altında artar ve aktivitesi sodyum iyonları tarafından uyarılarak kararlılığını etkileyebilir. Bu özellikleri açısından çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda gelecek vadeden bir toksindir (Da Silva ve diğ., 2008).

Kluyveromyces thermotolerans kromozomal DNA'da kodlanmış katil toksini salgılar. Bu toksinin öldürme faaliyeti NaCl varlığına bağlıdır ve katil etki spektrumu genişliği NaCl yoğunluğuna göre değişir (Meinhardt ve Klassen, 2007).

S. cerevisiae suşuna ait katil toksinler kromozomal DNA üzerinde kodlanmıştır. Bu genlerin optimum pH ve termostabiliteyi farklıdır. KHR (öldürücü of heat resistant) geni (20 kDa), IX kromozomu üzerinde kodlanmış ve KHS (öldürücü of heat susceptible) geni (75 kDa) ise V kromozomu üzerinde kodlanmıştır (Magliani ve diğ., 1997; Ciani ve Maccarelli, 2004).

Schwanniomyces occidentalis' in katil toksinlerinin geni kromozomal kodlanmıştır. Chen ve diğ. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada *Schwanniomyces occidentalis*' in katil toksinleri *Saccharomyces cerevisiae* (K1 ve K2), *Saccharomyces capensis* (K3), *T. glabrata* (K4), *Hansenula subpelliculosa* (K5), *Hansenula anomala* (K8) ve *Candida glabrata* katil mayalarına karşı öldürücü iken *Kluyveromyces fragilis* (K6), *Candida valida* (K7), *Williopsis mirakii* (K9) ve *Kluyveromyces lactis* suşları dirençlidir. Bu katil toksin pH 2 ile 5 arasında kararlı ve 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda inaktiftir. Bu toksin, *W. mirakii*' nin K9 toksinine benzerdir.

Hansenula mrakii' nin öldürücü suşu geniş bir spektruma sahip katil toksin üretir. *HMK* (10,7 kDa) geni *Hansenula mrakii*' nin öldürücü toksinlerini kodlar ve bu toksin 88 aminoasitten oluşmuştur. Diğer öldürücü toksinlere göre, daha yüksek sıcaklık ve pH aralığında (pH:2-11) stabildir. *HSK* geni ise *Hansenula saturnus*' un öldürücü toksinlerini kodlamaktadır (Kono, 1993). Farklı katil maya suşlarında, toksin genlerinin nerede bulunduğu Çizelge 1.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Öldürücü fenotip mayalarda ekspresyonun genetik materyali (Manfred ve Breinig, 2002; Ciani ve Maccarelli, 2004; Özçelik ve Altuntaş 2007).

<u>Maya</u>	<u>Genetik materyal</u>	<u>Toksin geni</u>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ds RNA virüsü	<i>M1-</i> , <i>M2-</i> , <i>M28</i>
<i>Hansenula uvarum</i>	ds RNA virüsü	<i>M-dsRNA</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ds RNA virüsü	<i>M-dsRNA</i>
<i>Ustilago. Maydis</i>	ds RNA virüsü	<i>M-dsRNA</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Linear dsDNA plazmidi	<i>pGK11</i>
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Kromozomal	*ND

<u>Maya</u>	<u>Genetik materyal</u>	<u>Toksin geni</u>
<i>Pichia acaice</i>	Linear dsDNA plazmidi	<i>pPac1</i>
<i>Pichia inositovora</i>	Linear dsDNA plazmidi	<i>pPin1</i>
<i>Pichia kluyveri</i>	Kromozomal	ND
<i>Pichia farinosa</i>	Kromozomal	<i>SMK 1</i>
<i>Pichia anomala</i>	Kromozomal	ND
<i>Williopsis mrakii</i>	Kromozomal	HMK
<i>Williopsis saturnus</i>	Kromozomal	ND
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Kromozomal	ND
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Kromozomal	ND
<i>Candida glabrata</i>	Kromozomal	ND

*ND: Gen bölgesi henüz tanımlanmamıştır.

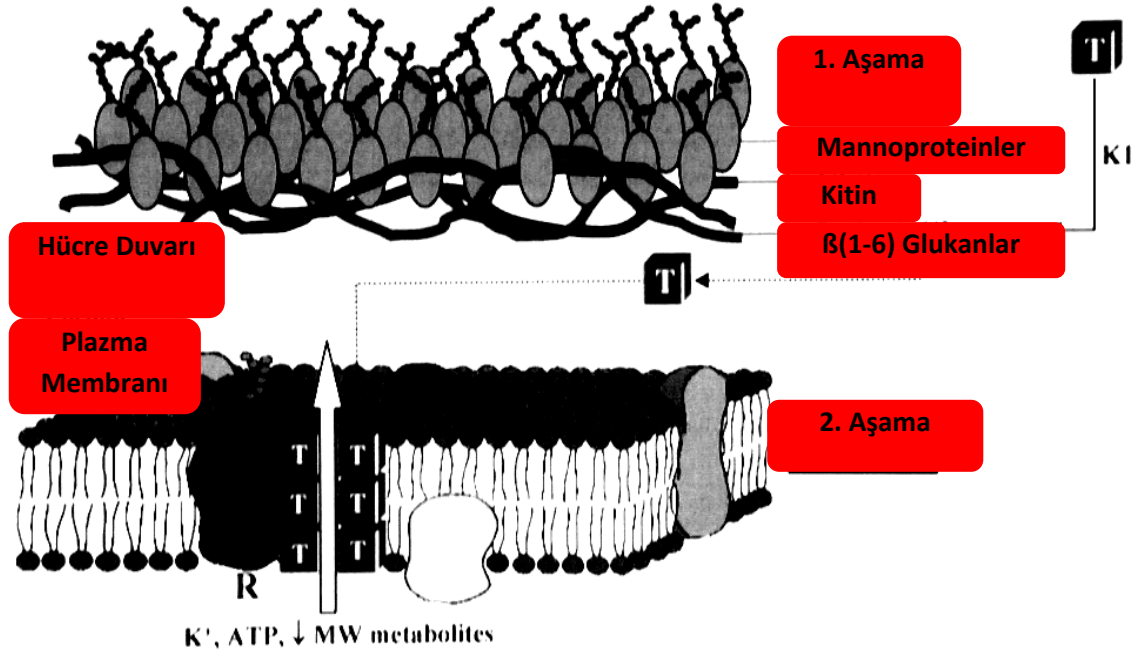
1.2. Katil Toksinlerin Etki Mekanizması

S. cerevisiae katil suşu tarafından üretilen K1 toksini, hücre dışı toksin olup, küçük monomerik bir proteindir. Termostabil ve pH 4,2-4,6'da aktiftir. K1 toksini, logaritmik büyüme fazında hücre dışına salgılanır ve toksine hassas hücrelerdeki glukanlara bağlanarak, hücre membranının geçirgenliğini bozar (Wen- Bao ve diğ., 2000).

Katil toksinlerin etki mekanizmaları farklı olmasına rağmen, tüm viral toksinler (K1, K2, K28), iki aşamalı bir süreçte reseptörleri aracılığıyla hassas maya hücrelerini öldürür. Öldürme; hücre duvarına bağlanma ve hücre zarına etki şeklindedir. Şekil 1.1.' de gösterilmiştir (Mohamudha ve Ayshe Begum, 2010; Kimura, 1993; Doğer, 2004).

Mayaların hücre duvarları % 85-90 oranında polisakkarit ile % 10-15 oranında proteinden oluşur. Maya hücre duvarının başlıca bileşeni β -1,3-glukandır ve % 50 civarında bulunur. β -1,6-D-glukan ise % 15 oranında bulunmaktadır.

Bunun dışında % 0,6-9 arasında kitin içermektedir. Bu dağılım türlere göre oldukça değişkendir. Çizelge 1.4.'de çeşitli katil toksinler için tanımlanan primer reseptörler liste halinde verilmiştir.



Şekil 1.1. Viral toksinlerin (K1, K2, K28) etki mekanizması.

Öldürücü toksinlerin etki mekanizması için büyük ölçüde K1 ve K2 çalışılmıştır. K1 ve K2 için birincil reseptör β -1,6-D-glukan olarak tespit edilmiştir. Oysa K28 için, hücre reseptörü yüksek molekül ağırlıklı K-1,3-mannoproteindir (Kimura, 1993; Schickel ve diğ., 1996; Manfred ve Breinig, 2002; Doğer, 2004; Mohamudha ve Ayshe Begum, 2010). Bu reseptörler, duyarlı suşların hücrelerinde ve katil fenotipin suşlarında çok sayıda bulunur.

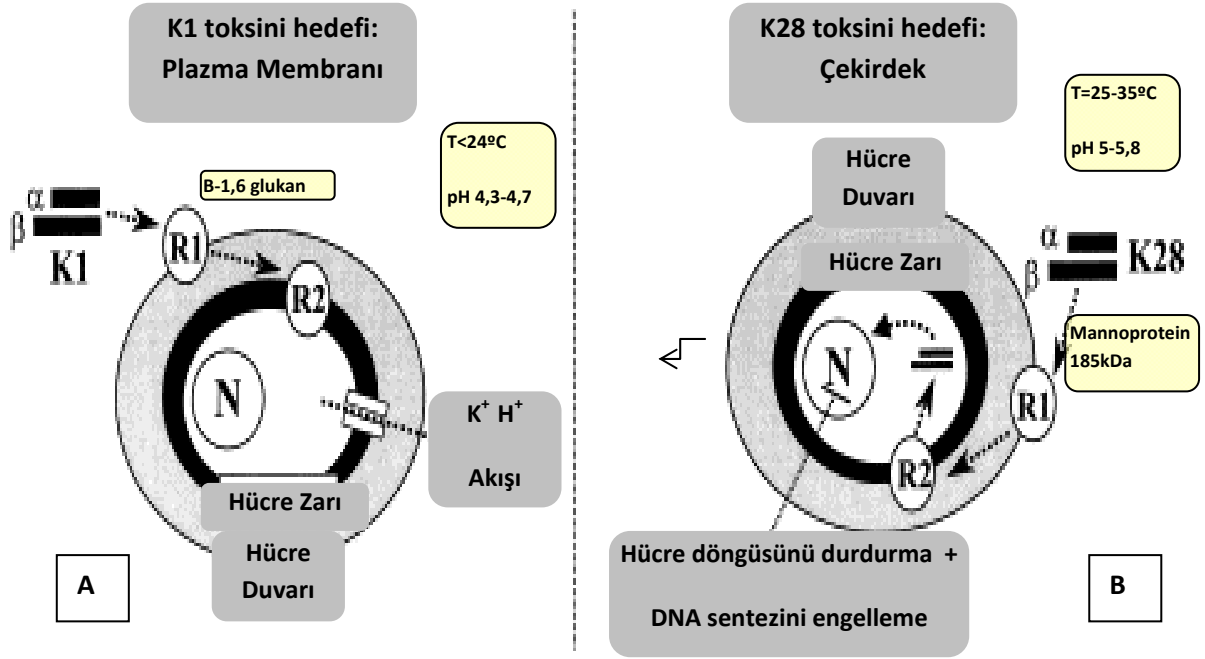
Öldürme işleminde iki aşamalı bir mekanizma vardır. K1 katil toksini ilk olarak mayanın hücre duvarındaki 1-6- β -D-glukan reseptörlerine bağlanır ve bu proses β zinciri tarafından kontrol edilir. Ardından α zinciri hücre zarına etki eder ve düzensiz potasyum akışına, sonra da hücrenin ölümüne neden olur (Manfred ve Breinig, 2002; Anlı, 2005; Sertkaya, 2005; Mohamudha ve Ayshe Begum, 2010).

Çizelge 1.4. Öldürücü toksinler ve hedef hücredeki reseptörleri (Hutchins ve Bussey, 1983; Manfred ve Breinig, 2002; Doğer, 2004; Altıntaş ve Özçelik 2007).

<u>Öldürücü Toksin</u>	<u>Reseptör</u>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K1	β -1,6-D-Glukan
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K2	β -1,6-D-Glukan
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Kitin
<i>Kluyveromyces pHaffii</i>	β -1,3-D-Glukan ve β -1,6-D-Glukan
<i>Pichia acaciae</i>	Kitin
<i>Pichia membrannifaciens</i>	β -1,6-D-Glukan
<i>Williopsis mrakii</i> HM-1	Hücre duvarı β -1,6-D-Glukan
<i>Debaryomyces hansenii</i>	β -1,6-D-Glukan
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	β -1,6-D-Glukan
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KT28	Hücre duvarı mannopteini
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Hücre duvarı mannopteini
<i>Pichia anomala</i> K5	β -1,3-D-Glukan

Katil toksinlerin, hücreye bağlanması zar geçirgenliğinde değişikliğe neden olur ve hücre hasarı meydana gelir. Hücrede belirgin bir şekilde pH azalır, metabolik süreç inhibe olur, potasyum iyonlarının serbest bırakılır ve sonunda hücre ölür. *S. cerevisiae* tarafından salgılanan K1 katil toksinlerinin etki mekanizması Şekil 1.2.A.'daki gibidir (Jacops ve Van Vuuren, 1991; Sesti ve diğ., 2001; Sertkaya, 2005; Rodrigez- Cousiño ve diğ., 2011).

Diğer katil hücre toksinlerinden farklı olarak, *S. cerevisiae* KT28 toksini hücre duvarının mannopteinlerine bağlanır. Hücre membranı ile etkileşim, DNA sentezinin hızlı inhibisyonuna neden olur. Hücre canlılığı yavaşça kaybolur ve hücre bölünmesi döngünün S aşamasında toksin kesilir. Şekil 1.2.B.'deki gibidir (Bussey, 1990; Nikolaou ve diğ., 2006; Manfred ve Breinig, 2002).



Şekil 1.2. *S.cerevisiae* K1 ve K28 mayalarının viral toksinlerin reseptör aracılı eylem modu (Nikolaou ve diğ., 2006).

Pichia kluyveri'ye ait toksin $pH 2,5-4,7$ ile $40^\circ C$ 'nin üzerinde stabildir. *P. kluyveri* toksini, önce hücre duvarına ve daha sonra da hücre membranına bağlanarak etkisini göstermektedir (Magliani ve diğ., 1997). Membrana bağlanması nedeniyle membran bütünlüğü bozulur ve elektrokimyasal potansiyeli tahrip ederek iyon kanalları oluşmasına neden olur. Bu kanallar, fizyolojik katyonlar ve anyonlar için nispeten seçici değildir. Toksin kaynaklı bu kanallar, K^+ ve H^+ dengesinin bozulmasına neden olur (Yabe, 1996; Sesti ve diğ., 2001). Öldürücü hücrelerin toksinlere karşı nasıl bağışıklık kazandığı ise hala bilinmemektedir.

1.3. Katil Mayalar ve Fermantasyon Teknolojisinde Kullanımları

Mikrobiyoloji ve fermantasyon bilimindeki ilerlemeler ile şarap üretimi daha fazla kontrol edilebilmektedir. Bu amaçla; şarabın bileşimini ve kalitesini belirlemede en önemli katkıyı sağlayan etkenlerden biri olarak kabul edilen mayanın, teknolojik özelliklerinin bilinmesi ve kullanılacak suşun şıra bileşimine göre seçilmesi, fermantasyon sırasında maya için uygun koşulların sağlanması önemlidir (Wickner, 1996).

Şarap mayalarının seçiminde; iyi gelişme ve fermantasyon kapasitesi, etanol toleransı ve H₂S, asetat gibi istenmeyen bileşiklerin sınırlı miktarda üretimi gibi özellikler göz önünde bulundurulmaktadır. Bunların yanında; yüksek şeker konsantrasyonuna dayanıklılık, farklı sıcaklık derecelerinde gelişme, şıranın sahip olduğu düşük pH değerinde gelişebilme, farklı şeker türlerini fermente ve asimile edebilme, az miktarda köpük oluşturma, etanol üretimi, gliserin üretimi, şarap endüstrisinde kullanılan çeşitli koruyucu maddelere (SO₂, potasyum sorbat gibi) karşı direnç ve katil aktivite özellikleri de dikkate alınmaktadır (Regadon ve diğ., 1997; Özçelik, 1999; Esteve-Zarzoso, 2000).

Şarap fermantasyonunda katil etkinin büyüklüğü; katil suşların duyarlı suşlara ilk oranına, çevre koşullarına, duyarlı hücrelerin büyüme fazına, nötr (koruyucu) mayaların varlığına, katil maya suşlarının toksinlerinin duyarlı suşlara etkisine, inokulum miktarına ve azot durumuna bağlıdır (Kağan, 1983; Young, 1987; Ramirez ve diğ., 1998).

Starter kültür olarak katil maya seçiminde dikkat edilmesi gereken nokta mayanın kendi doğal çevresinde test edilmesidir. Çünkü katil mayalar büyük ölçekli şarap fermantasyonlarında, yapay besiyeri ortamındaki testlerden daha farklı özellik gösterirler (Rodriguez-Porrata ve diğ., 2008).

Şarap fermantasyonunda, *S.cerevisiae*' nin duyarlı ve katil suşları bir arada bulunursa fermantasyon sırasında duyarlı mayalar, katil mayalar tarafından inhibe edilebilir. Bu durum şarabın kalitesini azaltır (Russel, 1986). Tracey ve diğ. (1986), şarap fermantasyonunun yavaş ilerlediği bir çalışmada, metilen mavisi ile boyanan mayaların % 90'ının ölü hücreler olduğunu ve canlı hücrelerin ise katil özellik gösterdiğini saptamıştır. Katil özellik gösteren *S. cerevisiae* şarap mayalarının, diğer cins ve türdeki mayaları öldürme özelliği taşıması ve genetik yapılarının stabil olmaması nedeniyle şarap fermantasyonlarında nötral mayaların kullanılmasının daha uygun olacağını belirtmiştir.

Şarap ve bira endüstrisinde son yıllardaki eğilim; katil özelliğe sahip, şaraplık kalitesi yüksek bir maya suşu geliştirmektir. Bunun için fermantasyonda ön kültür olarak katil maya kullanılırsa, katil mayalar dominant hale gelir; şarap fermantasyonunda istenmeyen yabancı maya türlerinin gelişmesini önler.

Fermantasyonda istenmeyen bileşiklerin, aşırı H₂S, uçucu asitler ve aroma oluşumunun kontrolünü sağlar. Bir katil maya pozitif enolojik karakteristiklere sahip olursa ve starter kültür olarak kullanılırsa şarap fermantasyonu sorunsuz tamamlanacak ve fermantasyon prosesi kendi kendini koruyabilecektir (Tredoux,1986).

Çeşitli ekolojik çalışmalar, apikulat mayalarının (*Hanseniaspora*, *Kloeckera*) taze sıkılmış meyve sularında ve üzüm yüzeylerinde yaygın olduğunu göstermiştir. Apikulat mayalar, düşük etanol toleransları nedeniyle fermantasyonun başında gözlenen ve mikroskop ile incelendiğinde limon şeklinde görülen mayalardır. Üzüm gibi steril olmayan çevrelerde, apikulat mayalarının büyüme kontrolü genellikle sülfür dioksit tarafından yapılmaktadır. Ancak Dünya Sağlık Örgütü ve Avrupa Ekonomik Topluluğu gibi pek çok kurum, toksik etkileri nedeniyle gıda ürünlerinde antimikrobiyal ajanların kullanımını azaltma ihtiyacını vurgulamıştır. Apikulat mayalarda, fermantasyon öncesi aşamada SO₂ kullanımını ortadan kaldırmak veya üzüm fermantasyonu sırasında kullanımını azaltmak için kontrol ajanı olarak katil toksin kullanımı teşvik edilmektedir (Radler, 1980; Yavaş, 1996).

Jijakli ve diğ. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, narenciye ve elma enfeksiyonlarından sorumlu *Botrytis cinerea*, *Pichia anomala*'nın katil toksinlerine duyarlı bulunmuştur.

Ciani ve diğ. (2004), şarap yapımında apikulat mayalarının kontrolü için *Kluyveromyces pHaffii*'nin toksin üreten suşlarını kullanmıştır. *Kluyveromyces pHaffii* tarafından salgılanan katil toksin (KpKT) şarap yapımında bozulmaya neden olan mayalara karşı aktiftir. Böylece şarap enstitüsünde istenmeyen mikroorganizmaların biyokontrollerinde uygulama potansiyelleri vardır.

Da Silvaa ve diğ. (2008), *Candida nodaensis* tarafından üretilen (CnKT) toksini bulmuştur. Bu toksin oldukça tuzlu gıdaların üretiminde mayalar tarafından bozulmaya karşı kullanılabilir bir toksindir.

1.4. Melas

Melas; şeker üretiminde, maksimum kristal şeker alındıktan sonra geriye kalan ana şuruptur.

Başlıca fermantasyon teknolojisinde en önemli ham maddelerden biri olarak kullanılmasının yanında, üre gibi azotlu bileşiklerle karıştırılarak hayvan yemi olarak da değerlendirilmektedir. Ayrıca melasın içerdiği şekerin kimyasal yoldan ya da iyon değişimi yoluyla kristalleştirilip kazanılması da ticari olarak uygulanmaktadır. Şeker fabrikalarında şeker pancarından kristal şeker elde edilirken; hasat şekli, depolama şartları ve şeker elde etme yöntemine bağlı olarak kristallendirilemeyen en son şurup şeklinde yaklaşık % 4 oranında melas kalır (Ateş, 2007).

Melas; inorganik maddeler, su, şeker ve şeker dışı organik maddelerden oluşan kompleks bir karışımdır. Ortalama % 75-80'i kuru madde ve bu kuru maddenin % 48-52'si toplam şeker ve % 25-28'i şeker dışı maddelerden oluşur. Melasta başlıca şeker olarak sakkaroz bulunur. Şeker dışı maddeler, hücre gelişimini ve fermantasyonu uyarıcı ve baskılayıcı maddelerden oluşur. Örneğin azot fermantasyonu uyarırken, eser miktardaki toksik baskılayıcıdır. Ticari amaçla kullanılan melasta, toplam şeker % 47'den daha az, pH değeri 6,8'den aşağı olmamalı ve SO₂ içeriği % 0,15'i geçmemelidir (Ateş, 2007). Büyük bir bölümü betainden oluşan melastaki toplam azot miktarı % 1,2 - 2,4 arasında bulunmaktadır (Pamir, 1978).

1.5. Şıra

Şıra, üzüm sıkıldıktan sonra işlem görmemiş, fermantasyona hazır üzüm suyu olarak tarif etmiştir. Şarap üretiminde presleme işleminden önce, üzümünden kendiliğinden akan şıranın hiçbir basınç uygulamadan alınması işlemine *şıra alma*; bu şıraya da *ilk şıra* denir (Onat, 2007; Altıntaş, 2007). Salkım saplarının şıraya, daha sonra da fermantasyona karışması halinde, şarapta tanen miktarı yükselir ve kaba bir çöp tadı oluşur. Saplarından ayrılan üzümlerin ise en kısa sürede şırası alınmalıdır. Antik çağda üzümlerin ayakla ezilmesi sonucu elde edilen ilk şıranın birince derecede kaliteli şarap yapımında kullanıldığı, buna da "*prodomus*" veya "*protopos*" dendiği; ayakla ezilen posanın bir kez daha sıkılmasından ikinci derecede şarap elde edildiği, bu işlemde arta kalan posanın kaynatılması sonucunda elde edilen şıradan üçüncü kalitede şarap elde edildiği bilinmektedir (Kimura, 1993).

Ön şıranın alınmasından sonra üzümlerin geriye kalan kabuk ve çekirdek kısımlarına *cibre* ismi verilir. Anlı (2005), cibreyi, üzümün preste sıkıldıktan sonra kalan katı kısmı (posa) olarak tarif etmiştir.

Aktan ve Kalkan (2000)' a göre, 100 litrelik üzüm mayşesi ağırlık olarak 110 kg. hesaplanır ve bunun cibresi ise çeşitlere ve yıllara göre değişmekle beraber 15-26 kg. arasındadır (Onat, 2007).

1.6. Aktif Kuru Mayalar

Aktif kuru mayalar günümüzde dünyanın birçok şarap bölgesinde yayılmıştır. 1962 yılında büyük bir şarap üreticisinin başlattığı kuru aktif maya kullanımı kısa sürede Kaliforniya ve Kuzey Amerika'nın her tarafına yayılmıştır (Yavuzeser, 1986).

1964 yılında ise Avustralya'da preslenmiş maya kullanımı model oluşturmuş, bunu kuru aktif maya kullanımı izlemiştir (Zagorc ve diğ., 2001).

Avrupa' da kuru aktif mayalarla büyük çapta ilk denemeler 1973 yılında başlamış, 1975 yılından itibaren hızla yaygınlaşmıştır. 1977-1978 yılları arasında 20 şarap üreticisi ülkede yapılan anketler, bu ülkelerin 16'sında kuru aktif mayanın yaygın olarak kullanıldığını göstermiştir (Jacobsen, 1985).

Aktif kuru maya ve gerçek maya kültürünü birbirinden ayırmak için şu tanımlamalar yardımcı olabilir: Aktif kuru maya, yaşayabilir bir maya hücresi kaynağıdır. Gerçek maya kültürü ise, fermente olmuş bir kültürdür. Aktif kuru mayalar, uzun yıllar hiçbir bulaşma riski taşımadan saklanabilmekte ve aktivitesini uzun süre koruyabilmektedir. Üstelik bu suşlar şıraya doğrudan doğruya aşılabilen ve belli bir gelişme periyoduna gerek duyulmamaktadır (Radler, 1980).

Kuru aktif mayalar homojen olmaları ve stabil yapıları nedeniyle güvenli bir fermantasyon gerçekleştirirler. Üretimden sonra uzun süre saklanabilir Larue ve diğ. (1979) göre, kuru aktif mayalar anaerobik koşullarda süspansiyon halindeki mayalara oranla şekeri daha aktif olarak parçalayabilmektedir.

Bidan ve diğ. (1981), aynı konsantrasyonda maya içeren sıvı ve kuru maya katılan şarapları incelemiş ve birbirine çok yakın sonuçlara ulaşmıştır. Belirlenmiş koşullarda seleksiyone sıvı ve kuru maya suşları benzer performans gösterirler.

Öte yandan yapılan çalışmalar kuru mayalarda durağan fazın süspansiyon sıvı mayalara göre daha uzun olduğunu göstermiştir. Ancak bu araştırmacılar denemelerini yalnızca *Schizosaccharomyces* cinsine ait mayalarla gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmalar kuru mayaların daha hızlı fermantasyon yaptığını göstermiştir.

1.7. Fermantasyon

Fermantasyon olayı karmaşık, çok basamaklı biyokimyasal prosestir. Bu dönüşümün olması için çok sayıda farklı enzimlere ve mayaların da bu enzimleri üretmeleri için uygun koşulların sağlanmasına gereksinim vardır (Anonim, 1979; Gençosman, 2006).

Alkol fermantasyonu mayanın şarap oluşturmasında önemli bir aktivitedir. Mayalar bu olayı birçok mekanizmayı aynı anda kullanarak gerçekleştirir. Bu mekanizmalar: üzüm suyu bileşenlerinin kullanılması, etanol ile birlikte üzüm suyu içinde yer alan katı maddelerden şarap tadını oluşturan bileşiklerin ekstrakte edilmesini sağlayan çözücülerin üretilmesi, şarap içinde yer alan üzüm suyu bileşiklerinin şarabın içeriğini oluşturan bileşiklere dönüşmesini sağlayan enzimlerin üretilmesi, şarap tadını oluşturan birçok sekonder bileşiklerin (asitler, alkoller, esterler, aldehitler, ketonlar vs.) üretilmesi ve fermantasyon sonunda ölmüş olan maya hücrelerinin otolitik sindirimidir. Şıraya katılan mayalar öncelikle ortamdaki mevcut oksijeni ve bir miktar şekeri kullanarak çoğalırlar. Bu aşamada sadece maya hücresi üretilir. Çok büyük miktarda maya hücresi üretmek için oksijen gereklidir. Fermantasyon başlangıç aşamasında mayaların sayısında artış devam ederken bir yandan da oksijen tüketildiği için anoksik koşullar gelişmeye başlar ve mayalar ihtiyaç duydukları enerjiyi hazırlanan şıra ortamındaki karbonhidratları metabolize ederek sağlarlar. Fermantasyonda ilk olarak glikoliz ile glukoz piruvik aside dönüştürülür (Anonim, 1979; Gençosman, 2006).

Mayalar pirüvatı önce sitoplazmasındaki pirüvat dekarboksilaz enzimi aracılığı ile dekarboksile etmek suretiyle asetaldehite, daha sonrada asetaldehiti alkol dehidrojenaz enzimi ile indirgemek suretiyle etil alkole dönüştürürler (Anonim, 1979; Gençosman, 2006).

Fermentasyon esnasında oluşan CO₂ ve alkol maya için atık maddelerdir ve belirli konsantrasyonların üstünde toksiktirler. Ortamdaki şekerlerin tükenmeye başlaması ile mayalar fermantörlerin dip kısmına doğru çökmeye başlarlar, bu olay sedimentasyon olarak tanımlanır. Besinin tamamen tükenmesi ile beraber liziz başlar. Otoliz olayı şarapta önemli derecede maya tadı bırakır. Bu durumun önüne geçmek için fermentasyonun bitişi takip edilir ve belirli aralıklarla aktarım işlemi yapılır (Pamir, 1985; Gençosman, 2006).

Şarabın bozulmasında önemli rol oynayan mikroorganizmaların başında bazı asetik asit bakterileri ve laktik asit bakterileri gelmektedir. Laktik asit bakterilerinin şarapta gelişmesine etki eden birçok faktör vardır. Bunlar arasında pH, SO₂ ve etanol en önemli faktörlerdendir. Şarabın doğal yapısı içinde tanımlanan bakteriler *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*'tur. Bunlar arasında bozulmaya sebep olan türler ise *L. brevis*, *L. fructivorans*, *P. domnosus*, *L. oenos*, *L. hilgardii*, *O. oeni* ve *Bacterium mannitopoeum*'dur. Bu bakterilerin faaliyeti sonucu şarabın uçar asit miktarı artar, acılaşıma, dönme ve sünme hastalıkları, kötü koku, biyojen amin ve etil karbonat oluşumu gözlenir (Rosini, 1983).

Genel olarak şarap yapımında kullanılan üzüm şırası bileşimi nedeniyle, birçok mikroorganizmanın, özellikle mayaların gelişebileceği uygun bir ortamdır (Pursley, 1999). Üzüm şırası mayalar tarafından fermentasyona uğratıldığında birincil ürünler olarak etil alkol ve karbondioksit oluşur. Bu ürünler yanında, miktar olarak az fakat tat ve koku üzerinde etkili, yüksek alkoller, esterler, karbonil bileşikleri ve organik asitler gibi ikincil ürünler yani aroma maddeleri de üretilir (Mateo ve diğ., 1991).

Şarapta tat - koku üzerine etkili bileşiklerin büyük ölçüde, alkol fermentasyonu sırasında oluşan; asetaldehit, yüksek alkoller, yağ asitleri, esterler ve gliserin gibi yan ürünler oldukları belirtilmektedir (Bostancı, 2004). Bu yan ürünler arasında derişimi en yüksek olanın gliserin olduğu ve son yıllarda şaraptaki gliserin üretimi üzerindeki çalışmaların arttığı bildirilmektedir. Gliserinin, uçucu bir madde olmaması nedeni ile şarabın aromasını etkilemediği ancak, şarabın tadını geliştirdiği belirtilmektedir. Şarapta istenen tatlılığın sağlanmasında yüksek gliserin derişiminin faydalı olduğu bildirilmiştir (Ewart, 1997).

Tamamlanmamış fermantasyon, sırada bulunan şekerlerin tamamı tüketilmeden fermantasyonun durması olarak tanımlanır. Yavaş fermantasyonlar ise, düşük oranda şeker kullanımının olduğu fermantasyon olarak tanımlanır. Bu tarz fermantasyonlar şarap üreticileri için önde gelen fermantasyon problemleridir. Şarapta kalıntı şekerin bulunması, şarapta dengeyi bozarak herhangi bir zamanda fermantasyonu yeniden başlatabilecek bir durumdur. Fermantasyon problemleri genel olarak birkaç faktörün kombinasyonu ile ortaya çıkan kompleks problemlerdir (Scanes ve diğ., 1998). Başlangıçtaki yüksek şeker konsantrasyonu, limit miktardaki besin elementleri, etil alkol toksisitesi, ekstrem sıcaklık değerleri, fungusit ve pestisit kalıntıları gibi faktörler fermantasyon oranına etki ederek tamamlanmamış fermantasyona ve yavaş fermantasyonun oluşmasına neden olabilir (Şenses Ergül, 2009).

1.7.1. Fermantasyon Ortamında Mayalar

Şarap yapımında alkol fermantasyonu, spontan olarak ya da saf maya kullanılarak gerçekleştirilir. Spontan koşullarda, fermantasyon genellikle (*Kloeckera* spp./*Hanseniaspora* spp.) ve *Candida* spp. tarafından başlatılır ve alkol miktarı arttıkça bu mayaların sayısı azalır. Fermantasyon etil alkole daha dayanıklı ve şekeri çabuk parçalayan *S. cerevisiae* tarafından tamamlanır (Berry, 1995; Farkas, 1998; Gençosman, 2006).

Bugüne kadar üzerinde en çok çalışılan ve biyokimyasal özellikleri en iyi anlaşılan maya olarak belirtilen *Saccharomyces cerevisiae*, gıda ve alkollü içkiler endüstrisinde ticari öneme sahip bir mikroorganizmadır. Bu mayanın, fermente alkollü içkiler ve ekmek üretiminde, gıda artıklarının değerlendirilmesinde ve gıda katkı maddelerinin üretiminde kullanılabildiği bildirilmektedir. Bunun yanı sıra, *S. cerevisiae*'nin probiyotik özellik taşıması ve bozulmuş bazı gıdalardan da izole edilebilmesi de bu mayanın gıda endüstrisindeki önemini ortaya koymaktadır (Fleet ve Heard, 1993; 2002).

Günümüzde, *S. cerevisiae* özellikle fermente ürünlerdeki kullanımı ile öne çıkmaktadır. Fermente alkollü içkilerde bu mayanın aroma üzerine olumlu etkiye bulunduğu ve son ürün kalitesini önemli ölçüde etkilediği belirtilmektedir. *S. cerevisiae*, şarap fermantasyonlarında da ana mikroorganizma olarak bilinmektedir.

Bu maya, heksozlardan etil alkol ve karbondioksit ile, gliserol, ester, aldehit, asit ve çeşitli alkollerini içeren yan ürünler üretmektedir. Bu ürünlerin şarabın duyuşal özelliklerini geliştirdikleri ve miktarlarının kullanılan suşaya bağılı olarak değışebileceğı bildirilmektedir (Karasu, 2002).

Şarap üretilen bir bölgedeki spontan popülasyon dinamiğı, karakteristik özelliklere sahip şarap üretimi için göz önünde bulundurulması gereken koşullar hakkında bilgi sağlar. Belirli bir bölgedeki şaraba işlenen üzümlerden izole edilen mayalar endojen mayalardır. Bu mayalar, spesifik çevre koşullarına ve substratlara daha iyi adapte olur (Güven, 2003).

Saf maya kullanımının, şarabın bileşim ve kalitesini etkileyen önemli bir faktör olduğı kabul edildiğinden, maya suşları arasında teknolojik ve biyokimyasal farklılıklar araştırılarak, şarap üretimi için en iyi maya suşlarının bulunması konusunda çalışılmaktadır.

Şarap üretiminde kullanılacak *S. cerevisiae* suşlarının bazı özellikler taşıması istenmektedir. Yüksek fermantasyon derecesi, yüksek ve düşük ısıya dayanıklılık, küükürde, yüksek alkol derişimine, yüksek şeker derişimine dayanıklılık, az köpük oluşturma özelliğı, şarapta özel tat ve koku maddelerinin oluşturulması, istenmeyen koku veren bileşiklerin oluşturulmaması, kap cidarına tutunma ve dibe kolay çökebilme gibi özellikler istenilen özelliklerden başlıcalarıdır (Wickner, 1996; Vilojen ve Heard, 2000). Sınıflandırmada 500 kadar maya türü vardır, ancak bunlardan yaklaşık 15-20 tanesi şarap yapımında önemlidir (Farkas, 1998; Gençosman, 2006).

1.7.2. Şarap Fermantasyonlarında Endojen Mayaların Kullanımı

Uzun süre üzüm bağı olarak kullanılan bir çevrede yıllar boyunca bağı toprakları mikrofloralarında daha üstün nitelikli *Saccharomyces* türlerinin yerleştikleri ve diğeryabani mayaları elimine edilmiş olabileceklery belirtilmektedir. Bu durumda spontan fermantasyon yolu ile özel karaktere sahip üstün nitelikli kaliteli şarap elde edilebilir (Bostancı, 2004).

Şarap üretiminde özel olarak seçilmiş maya türlerinin kullanılması ile birçok ülkede çok iyi sonuçlar alınmaktadır.

Son yıllarda, İspanya gibi geleneksel şarap üretimi yapan ülkelerde, kontrollü şıra fermantasyonu için özel olarak seçilmiş, yerel maya türlerinin kullanımında artış vardır. Şıra fermantasyonu amacıyla ticari mayalar da kullanılmasına rağmen yerel suşların kullanımı daha etkindir. Yerel maya suşlarının, çevresel koşullara daha iyi adapte olabilmeleri nedeni ile yarışçıl özellikleri daha fazladır. Bu nedenle yerel maya suşları fermantasyon sırasında baskın florada yer alabilir ve şarabın oluşumunda en önemli biyolojik etmen olabilir. Uygun özelliklere sahip endojen maya türlerinin seçilmesi ile, belirli bir bölge üzümünden tipik duyuşsal nitelikler taşıyan şaraplar üretilmektedir. Seçilen bu maya suşlarının, endüstriyel şarap üretimi için bazı teknolojik özellikleri taşımaları gerekmektedir. Bu özellikler ise; üretilecek şarap çeşidi ile birlikte uzmanların görüşlerine bağlı olarak değişir (Scanes ve diğ., 1998; Ergül ve Özbaş 2009).

1.7.3. Alternatif Şarap Mayalarının Seçimi ve Karışık Starter Kültür Kullanımı

Şarap üretimi amacı ile seçilen *S. cerevisiae* suşları diğer mayalardan; üzüm suyunu (şırayı) kuvvetli fermente edebilme, ortamda çok az miktarda fermente olmamış şeker bırakma ve yüksek etanol derişimine sahip şarap üretebilme özellikleri ile ayırt edilmektedir. Bu mayalar ile genellikle belirli aromatik profile sahip şaraplar üretilmektedir (Soden ve diğ., 2000). *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer almayan maya türleri giderek artan oranda, ABD ve Avustralya' daki ticari şarap üretimlerinde kullanılmaktadır. Bu uygulama, sonucu tahmin edilemeyen ve genellikle bu nedenle problem oluşturan spontan fermantasyon yöntemine karşı iyi bir seçenektir. *Saccharomyces* cinsi dışındaki bu mayalar, şarapta endojen olarak bulunmaları nedeniyle belirli bir bölgeye özgü şarapların kendilerine özgü karakteristiklerinin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır (Scanes ve diğ., 1998; Özçelik ve Denli, 1999; Soden ve diğ., 2000; Ergül ve Özbaş 2009).

Yapılan son çalışmalarda *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer almayan maya türlerinin duyuşsal özelliklerinde oluşturdıkları farklılıklar vurgulanmaktadır (Garcia ve diğ., 2000; Ergül ve Özbaş 2009). Bazı araştırmacılar bu farklılıkları, *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer almayan mayaların esteraz, glukozidaz, lipaz, proteaz ve selülaz gibi enzimleri üretmeleri ile ilişkilendirmektedir.

Bu enzimler üzümdeki öncül bileşiklerle etkileşime girip şarap aromasında çeşitliliği sağlayan aroma aktif bileşiklerinin üretimini sağlar. Şarap mayası olarak bilinen *S. cerevisiae*'nin ise; hücre dışı enzim üretme özelliği zayıftır. Bu nedenle üzüm florasında bulunan ve hücre dışı hidrolitik enzim üretme özelliğine sahip maya türleri şarap üretimi açısından önem taşır (Egli ve diğ., 1998; Ergül ve Özbaş 2009).

Saccharomyces cinsi dışındaki endojen şarap mayaları genellikle yüksek derişimde esterler, yüksek alkoller, aldehitler ve gliserin gibi şarabın duysal profilini belirleyen bileşikler üretmektedir. Bu tür bileşiklerin üretimi farklı maya türlerine göre değişkenlik gösterir. Örneğin *C. stellata* ve *K. apiculata* türleri yüksek derişimde gliserin, *C. colliculosa* türü ise yüksek derişimde asetaldehit ve n-propanol üretir. Malik asidi parçalama yeteneği, özellikle asitliği oldukça yüksek olan ve soğuk iklime sahip bölgelerde üretilen şaraplar için tercih edilen bir özelliktir. Şarap kültürü olarak kullanılan *S. cerevisiae* suşları ise, genellikle üzüm suyunda bu düzeyde etkin bir asitliği giderme özelliği gösterememektedir (Soden ve diğ., 2000; Rainieri ve Pretorius, 2000; Ergül ve Özbaş 2009).

S. cerevisiae'nin yanı sıra üzüm suyu ve şaraptan kolaylıkla izole edilen *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer alan mayalar, genellikle *Saccharomyces uvarum* türüne aittir. Bu suşlar 6-10 °C'de kuvvetli fermantasyon yeteneklerine sahiptir. Bu açıdan soğukta muhafaza edilen üzüm sularında fermantasyonun başlamasından sorumludurlar. Bu mayaların en önemli enolojik karakteristikleri malik asit sentezleme yetenekleridir. Malik asit miktarındaki artış, üzüm suyu asitliğinin yetersiz olduğu, sıcak iklime sahip bölgelerde üretilen şarapların asitliğinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Bunun yanısıra suşların, düşük derişimde asetik asit ve yüksek derişimde gliserin ve süksinik asit üreterek şarapların aromatik profillerinin geliştirilmesinde önemli role sahip oldukları ifade edilmektedir (Scanes, 1998; Ergül ve Özbaş 2009).

Soden ve diğ. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, *C. stellata*'nın bir suşu ile aşılanan üzüm suyundan elde edilen şarapta gliserin, asetik asit ve etil asetat derişimlerinde artış gözlenmiştir. Elde edilen şarap *S. cerevisiae* kullanılarak üretilen bir başka şarap ile duysal özellikleri açısından karşılaştırıldığında; *C. stellata* ile üretilenin daha yoğun bal, kayısı, lahana turşusu ve etil asetat aromasına sahip olduğu belirtilmektedir. Bu şarabın ıhlamur, muz ve çiçek aromalarının ise daha az olduğu rapor edilmektedir (Ergül ve Özbaş 2009).

Garcia ve diğ. (2000) tarafından yapılan bir araştırmada, *Debaryomyces vanriji* türüne ait bir maya suşunun yüksek düzeydeki p-glukozidaz enzimi ile şaraptaki aroma bileşiklerini arttırdığı ifade edilmektedir.

Ciani ve Maccarelli (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, *Tp. Delbrueckii*, *C. stellata*, *Hsp. uvarum* ve *Kluyveromyces apiculata* türleri enolojik özellikleri açısından incelenmiştir. Çalışmada, özellikle *Tp. delbrueckii* ve *C. stellata* türü mayalar şarabın fermantasyonunu ve aromatik özelliklerini olumlu yönde etkilemiştir. Apikulat mayaları ise; yüksek miktarda aseton, etil asetat üretmiş ve şarap aromasını olumsuz etkilemiştir (Ergül ve Özbaş 2009).

Ciani ve diğ. (2006) tarafından yapılan bir başka çalışmada, *Hsp. uvarum*, *Tp. delbrueckii* ve *Kly. thermotolerans* türleri *S. cerevisiae* ile birlikte karışık starter kültür olarak kullanılmıştır. Yüksek şeker içeriğine sahip üzüm şıralarında gerçekleştirilen çalışmada, karışık kültürlerin kullanıldığı denemelerde *S. cerevisiae*'nin saf kültürleri ile yapılan denemelere göre daha iyi düzeyde fermantasyon davranışı ve şarap bileşimi gözlenmiştir. Buna karşılık aynı çalışmada *Tp. delbrueckii* ve *Kly. thermotolerans* kültürlerinin sıralı olarak kullanıldığı denemelerin ağırlaşmış fermantasyon ile sonuçlandığı, *Hsp. uvarumun* kullanıldığı denemelerin ise; etil asetat içeriğinde kabul edilemeyecek düzeyde artışa neden olduğu ifade edilmektedir.

2. MATERYAL ve YÖNTEMLER

2. 1. Materyaller

2.1.1. Maya Suşları

Şarap yapımında kullanılacak şarap mayası suşlarının öldürücü aktivite testi için, Çizelge 2.1.' de gösterilen çeşitli mayalar yayma mayaları olarak kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Yayma mayaları.

SUŞLAR	GENOTİP	ORJİN
EX33	[K1-0; K2-0; K28-0; <i>Klus</i> -0]	J. A. ^a Regodóna. *D.O. Ribera del Guadiana
EX73	<i>L-A M-2</i> [K2+]	J. A. ^a Regodóna. D.O. Ribera del Guadiana
F166	<i>L-A-HNB M-1</i> [K1+]	J.C. ^b Ribasb. D.O. Ribera del Guadiana
F182	<i>L-A M-28</i> [K28+]	J. C. ^b Ribasb. D.O. Ribera del Guadiana

a J. A. Regodón, Analitik kimya bölümü, Extremadura Üniversitesi, Badajoz, İspanya.

b J. C. Ribas, Mikrobioloji Enstitüsü, CSIC/Salamanca Üniversitesi, İspanya.

* D.O. (Denominación de Origen: Orjinin tayini) Ribera del Guadiana bölgesi.

Şarap yapımı için kullanılan şarap mayaları ve orjinleri Çizelge 2.2.' de gösterilmiştir. Bu suşlar fermantatif özelliklerindeki farklılıklar nedeniyle seçilerek farklı üreticilerden temin edilmiştir.

Çizelge 2.2. Maya üretimi için kullanılan şarap mayası suşları.

SUŞLAR	ORJİN
EX88 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Heral S.L. şirketinden satın alındı. (Almendralejo, İspanya)
E7AR1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Heral S.L. şirketinden satın alındı. (Almendralejo, İspanya)
ROD 23 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Heral S.L. şirketinden satın alındı. (Almendralejo, İspanya)
EX1160 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Spontan şıra fermantasyonundan izole edilmiştir. (Extramadura, İspanya)
CH126 (<i>Torulaspota delbrueckii</i>)	Üzüm bağının toprağından izole edilmiştir. (Extramadura, İspanya)
EX1178 (<i>Torulaspota delbrueckii</i>)	İncirin spontan fermantasyonundan izole edilmiştir. (Extramadura, İspanya)
EX1180 (<i>Torulaspota delbrueckii</i>)	İncirin spontan fermantasyonundan izole edilmiştir. (Extramadura, İspanya)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Lallemmand S.A. şirketinden satın alındı.
BP4412	(Toulouse, Fransa)

2.1.2. Kültür Besiyerleri

2.1.2.1 YEPD Besiyerleri

Rutin ekimler için Adams ve diğ. (1998)'e göre YEPD-sıvı (Yeast Extract Peptone Dextrose) ve YEPD-agar besiyeri kullanılmıştır. YEPD-agar besiyeri, YEPD-sıvı besiyerine % 1-2 oranında agar ve sikloheksimide dirençli mayaların gelişimini sağlamak için (katil mayalar) 2 µg/mL konsantrasyonda sikloheksimid ilavesi ile hazırlanır. YEPD-sıvı içeriği Çizelge 2.3.' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Rutin ekimler için kullanılan YEPE-sıvı besiyerinin içeriği.

Bileşenin Adı	Miktarı
Maya ekstraktı (% 1)	10 g
Pepton (% 2)	20 g
Glikoz (% 2)	20 g
Distile Su	1000 mL

Besiyeri 121°C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2.2 Spor Oluşturma Besiyeri

Spor oluşturma amacı ile kullanılan besiyerinin içeriği Çizelge 2.4.' de gösterilmiştir. Besiyeri 121°C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Çizelge 2.4. Spor oluşumuna bakmak için kullanılan besiyerinin içeriği.

Bileşenin Adı	Miktarı
Potasyum Asetat (% 1)	10 g
Maya Ekstraktı (% 0,1)	1 g
Glikoz (% 0.05)	0,5 g
Agar (% 2)	20 g
Distile Su	1000 mL

2.1.2.3 Katil Özellik Belirleme Besiyeri (Maya Ekstrakt Pepton Dekstroz-Metilen Mavisi Agar= YEPE-MMA)

Mayaların katil özelliklerini gözlemlemek için yapılan öldürücü aktivite testi düşük pH aralığında (pH 4.0, 4.7) yapılmıştır. pH 4.0' de öldürücü aktivite testi için, sitrat (1M, pH 4) ile tamponlu % 2 bakto-agar ile birlikte YEPE besiyeri kullanılmıştır. YEPE-agar besiyerine % 0,5' lik metilen mavisi solüsyonu % 10 oranında eklenerek inhibisyon zonu gözlenmiştir.

Fosfat-sitrat tamponu (1M, pH 4), 500 mL steril suya 96,1 g sitrat eklenerek ve K_2HPO_4 ile pH 4' e ayarlanarak hazırlanmıştır. pH 4,7' de öldürücü aktivite testi için ise, K_2HPO_4 (1M) ile pH 4,7' ye ayarlanmıştır.

2.1.2.4 Tomato Juice Agar

Şırada *Lactobacillus* türlerinin tespiti için kullanılmıştır. Tomato juice agar hazırlamak için; Oxoid marka CM0113 kodlu dehidre besiyeri üretici firma talimatına uygun olarak, 52 g/L' si damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.2.5 MRS Agar

Şırada *Lactobacillus* türlerinin tespiti için kullanılmıştır. MRS katı besiyerini hazırlamak için; Scharlau marka MD21 kodlu dehidre besiyeri üretici firma talimatına uygun olarak 68,2 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.2.6 GYC Agar

Şırada asetik asit bakterilerinin tespiti için kullanılan GYC agarın içeriği Çizelge 2.5.' de gösterilmiştir. Besiyeri 121°C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan GYC- Agar petripleri 24 saat 30°C' de tutulduktan sonra kullanılmıştır.

Çizelge 2.5. GYC-agarın içeriği.

Bileşenin Adı	Miktarı
Maya ekstraktı (% 1)	10 g
$CaCO_3$ (% 0,004)	4 g
Glikoz (% 5)	50 g
Agar (% 2)	20 g
Distile su	1000 mL

2.1.2.7 Melas Ortamı

Şeker pancarı fabrikasının yan ürünü olan melas, Heral S.L. (Almendralejo, İspanya) şirketinden temin edilmiştir. Mayaların çoğalması için kullanılan melas ortamı Çizelge 2.6.'daki gibi hazırlanmıştır. A ve B solüsyonları 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra B karışımı A karışımına aseptik koşullar altında ilave edilerek melas ortamı hazırlanmıştır.

Çizelge 2.6. Mayaların çoğalması için hazırlanan melas ortamı (pH 4,0)

	Bileşenin Adı	Miktarı
A Solüsyonu	Maya ekstraktı	5 g
	Amonyum fosfat	0,75 g
	Magnezyum sülfat	0,7 g
	Distile su	900 mL
B Solüsyonu	pH	4,0
	Melas	100 mL

2.1.2.8. Şıra

Beyaz şarap yapımı için kullanılan şıra, Tierra de Barros bölgesi İspanya'dan 2009 mahsülü *Cigüentes* cinsi beyaz üzümünden elde edilmiştir.

Kırmızı şarap yapımı için kullanılan şıra, Tierra de Barros bölgesi İspanya'dan 2010 mahsülü *Cabernet sauvignon* türü kırmızı üzümünden elde edilmiştir.

Beyaz üzüm şirasında fermantasyon aktivatörü Actimax Bio (Agrovin SA, Spain) kullanılmıştır. Şıranın mikrobiyal kontrolü için Velcorin (Sigma, Germany) kullanılmıştır.

2.1.3. Gram Boyamada Kullanılan Kimyasallar

Gram boyamada kullanılan solüsyonlar Atlas ve diğ. (1995)'e göre hazırlanmıştır.

2.1.3.1. Kristal Viyolet Solüsyonu

Çizelge 2.7. Kristal viyolet solüsyonu içeriği.

Bileşenin Adı	Miktarı	
Kristal Viyolet (%90 boya içeren)	2 g	} A Solüsyonu
Etanol (%95 v/v)	20 mL	
Amonyum okzalit	0,8 g	} B Solüsyonu
Distile Su	80 mL	

Kullanılan kristal violet solüsyonu; Aynı ayrı hazırlanan A ve B solüsyonları birleştirilip, iyice karıştırılıp ve filtre edilerek hazırlanmıştır.

2.1.3.2. Gram İyodür Solüsyonu

Çizelge 2.8. Gram iyodür solüsyonu içeriği.

Bileşenin Adı	Miktarı (300 mL' de)
Potasyum iyodür	2 g
İyot	1 g

Kullanılan Gram iyodür solüsyonu; potasyum iyodür ve iyotun bir kap içerisinde iyice ezilerek karıştırılması ve yavaş yavaş su eklenmesi ile hazırlanmıştır. Koyu renk şişelerde muhafaza edilerek kullanılmıştır.

2.1.3.3. Safranin Solüsyonu

Çizelge 2.9. Safranin solüsyonu içeriği.

Bileşenin Adı	Miktarı
Safranin O	0,25 g
Etanol (%95 v/v)	10 mL
Deiyonize Su	100 mL

Safranin 10 mL etanol içerisinde iyice çözülmüş ve üzerine 100 mL deionize su eklenmiştir, iyice karıştırılarak birkaç gün dinlenmesi sağlanmıştır. Kullanılmadan önce filtreden geçirilerek boyama için hazır hale getirilmiştir.

2.1.4. Araştırmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler

Çizelge 2.10. Araştırmalarda kullanılan araç ve gereçler.

Cihaz Adı	Marka ve Model	Kullanım Amacı
İnkübatör (20°C)	Trade Rayda	Mayaların rutin büyümesi ve katil testi
İnkübatör (30°C)	P. Selecta	Mayaların rutin büyümesi ve katil testi
İnkübatör (37°C)	Membert	Mayaların rutin büyümesi ve katil testi
Orbital çalkalayıcı	Optik Ivymen System	YEPD-sıvı' da maya üretimi
Otoklav	Trade Raypa Sterilclav-75	Sterilizasyon
Mikrosantrifüj	Sigma	Mayaların santrifüjü

Cihaz Adı	Marka ve Model	Kullanım Amacı
Spektrofotometre	PHarmacio Biotech Ultrospec-1000	Mayaların üreme ve büyüme kinetiğini inceleme
Işık Mikroskobu	Nikon, Eclipse E600	Spor oluşumunu inceleme
Hassas Terazı	Kern PCB 1000-1	Mayaların ıslak ve kuru ağırlık ölçümü
Vorteks	Velp	Homojenizasyon
Termometre	Selecta-95100	Şırada ve şarapta sıcaklık ölçümü
Refraktometre	Zuzi	Şırada ve şarapta briks ölçümü
Dansimetre	Nahita 71355150	Şırada ve şarapta yoğunluk ölçümü
pHmetre	Crison pHmeter Basic-20	Şırada ve şarapta pH ölçümü
Kamera	Zeiss, Axiocam HRc	Resim çekme
Işık Mikroskobu	Olimpus CH20	Tomurcuk, canlı ve ölü hücre hücre sayımı

2.2. Yöntemler

2.2.1. Katil Mayaların Tespitine Yönelik Çalışmalar

2.2.1.1. Saflık Kontrolü

Stoklardan alınan *Saccharomyces cerevisiae* türüne ait EX88, E7AR1, EX1160, ROD23 suşlarının, *Torulaspota delbrueckii* CH126, EX1178, EX1180 ve ticari suş *Torulaspota delbrueckii* BP44122'nin saflık kontrolü YEPD-Agar'da tek koloni düşürme tekniği ile yapılmıştır.

2.2.1.2. Katil Toksin Testi

Mayaların birbiri üzerindeki etkisini ve öldürücü aktivitesini gözlemlemek için katil toksin testi Kaiser ve diğ. (1994)' e göre yapılmıştır. Bunun için aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

- 1- Kontrol amaçlı kullanılan *S. cerevisiae*' ye ait EX33, EX73, F166 ve F182 suşları, YEPD-sıvı besiyerine 30 °C' de 180 rpm' de 48 saat inkübe edilir.
- 2- Çizelge 3.2.' deki *S. cerevisiae* türüne ait EX88, E7AR1, EX1160 ROD23 suşları, *T. delbrueckii* CH126, EX1178, EX1180 ve ticari suş *T. delbrueckii* BP44122 suşları ise YEPD-agar besiyerinde nokta ekim yöntemiyle ekildikten sonra 30 °C' de 48 saat inkübe edilir.
- 3- YEPD-sıvı besiyerinde gelişen suşların her birinden 100 µl alınır ve YEPD - MM Agar içeren petrilere L baget ile yayılır.
- 4- Yayma ekim yapılan YEPD - MM Agar petrilерinin üzerine, YEPD Agar' da inkübe edilmiş olan mayalardan nokta ekimler yapılır. Kontrol olarak ise Çizelge 3.1.' deki kontrol suşlarından da nokta ekimler yapılır.
- 5- Tüm petri kutuları 20 °C 1-5 gün inkübe edilir.
- 6- İnkübasyon süresi sonunda nokta ekim yapılan maya suşlarına ait kolonilerin etrafında inhibisyon zonunun varlığı katil maya testi için pozitif sonuçtur.

2.2.2. Şarap Yapımı Öncesi Mayalar Üzerinde Yapılan Analizler

Endüstriyel boyutta bir üretimin planlanması aşamasında üretilecek veya katalizör olarak kullanılacak mikroorganizmanın en uygun tür olduğunun belirlenmesi, mikroorganizmanın fizyolojik özelliklerinin tespiti, ortam faktörlerine bağlı değişimi ve teknolojik açıdan en uygun reaktörün şekillendirilmesi gerekir. Bu nedenle fermantasyon öncesi çeşitli parametreler incelenmiştir.

2.2.2.1. Şarap Yapımında Kullanılacak Mayaların Büyüme Eğrisinin Çıkarılması

48 saatlik aktif *S. cerevisiae* türüne ait EX88, E7AR1, EX1160 ROD23 suşları, *T. delbrueckii* türüne ait CH126, EX1178, EX1180 suşları ve ticari suş *T. delbrueckii* BP44122 şarap mayalarından, 1 öze alınarak 5 mL YEPD-sıvı besiyeri içerisine inoküle edilmiştir ve 30 °C'de 180 rpm' de 24 saat gelişmeye bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, aktif kültürlerden 1 mL ve 5 mL alınarak 50 mL YEPD-sıvı besiyerine inoküle edilmiş 30 °C'de 180 rpm' de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Günde 2 kez örnek alınarak 600 nm' deki absorbans değerleri ölçülmüştür.

Substratın biyokütle değişimi üzerine etkisini incelemek için, 1 mL (inokülasyon oranı sabit) substrat olarak YEPD-sıvısı yerine 50 mL melas ortamı kullanılmış ve 30 °C'de 180 rpm' de 5 gün inkübe edilmiştir. Günde 2 kez örnek alınarak 600 nm' deki absorbans değerleri ölçülmüştür.

2.2.2.2. Şarap Yapımında Kullanılacak Mayaların Canlı Hücre Sayımı ve Toplam Hücre Sayımı

Her bir şarap mayası için toplam hücre, ölü hücre ve tomurcuklanma sayısı Thoma lamı ile belirlenmiştir. Çizelge 2.2' deki mayaların 10^{-2} ' lik dilüsyonlarından sayım yapılmıştır. Ölü ve canlı mayaları ayırt edebilmek için 5 µl metilen mavisi ile boyama yapılmıştır ve ölü olan hücreler boyayı içine aldığı için mikroskopta mavi renkte, canlı hücreler ise şeffaf olarak görülmüştür.

Canlı hücre sayımı için kullanılan diğer bir yöntem koloni sayımıdır. Bunun için 10^{-5} oranına kadar seyreltme devam etmiştir ve 100 µl' si ile YEPD-agar besiyerine yayma ekim yapılarak 24-48 saat 30 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan koloniler sayılmıştır. Bu sayım şarap yapımı sırasında büyüme eğrisinin çıkarılmasında (koloni sayısı) kullanılmıştır.

2.2.2.3. Şarap Yapımında Kullanılacak Mayaların Biyokütle Tayini

Biyokütle tayini için, 50 mL YEPD-sıvı (% 2 ve % 10 inokulum olmak üzere) ve 50 mL melas ortamına (% 2 inokulum olmak üzere) *S. cerevisiae* türüne ait EX88, E7AR1, EX1160 ROD23 suşları, *T. delbrueckii* CH126, EX1178, EX1180 suşları ve ticari suş *T. delbrueckii* BP44122 ekilerek 30 °C' de 180 rpm 150 saat inkübe edilmiştir. Maya hücreleri önceden darası alınmış olan santrifüj tüplerinde 3500 rpm' de 3 dakika santrifüjlenerek toplanmıştır. Kalan sıvının vakum ile alınmasından sonra tartım yapılmıştır. Dara farkı düşürülerek ıslak ağırlık belirlenmiştir.

Kuru ağırlık tayini için, ıslak ağırlıkları hesaplanan örnekler 40 °C' de 1 hafta kurumaya bırakılmıştır. Ağırlığın sabitlenip sabitlenmediği 2-3 hafta boyunca kontrol edilmiştir. Net kuru ağırlık tartım sonucunda belirlenmiştir.

2.2.3. ŞIRA ÜZERİNDE YAPILAN ANALİZLER

2.2.3.1. pH Tayini

Fermantasyona başlamadan önce, beyaz üzüm ve kırmızı üzüm şiralarının pH' ı doğrudan pHmetre kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.3.2. Spesifik Yoğunluk ve Briks Tayini

Şıranın yoğunluğunu ölçmek için densimetre kullanılmıştır. Briks tayini için, el tipi refraktometre kullanılmıştır.

2.2.3.3. Sıcaklık Tayini

Şıranın sıcaklığını ölçmek için termometre kullanılmıştır.

2.2.4. Şarap Fermantasyonu

Şarap yapımı öncesi mayalar üzerinde yapılan analiz sonuçlarına göre; *S. cerevisiae* türüne ait E7AR1 suşunun, *Torulaspota delbrueckii* türüne ait CH126, EX1180 suşunun ve ticari bir maya olan *Torulaspota delbrueckii* BP4412' nin şarap yapımında kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca saf kültür kullanılmadan spontan olarak da şarap yapılmıştır.

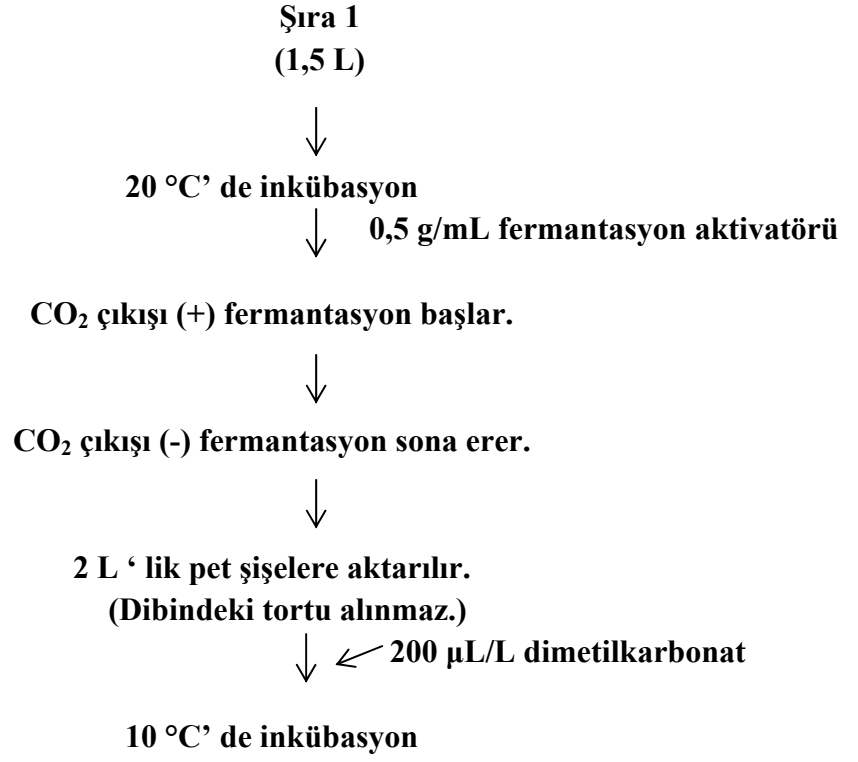
Seçilen şarap mayaları sırasıyla beyaz üzüm şirasına 30 mL ve kırmızı üzüm şirasına 15 mL inoküle edilerek fermantasyona bırakılmıştır. Sadece beyaz üzüm şirası için 0,5 g/mL fermantasyon aktivatörü kullanılmıştır.

Fermantasyonun başladığının göstergesi olan CO₂ gaz çıkışı başlama ve sonlanma süreleri kalitatif olarak izlenmiştir. Fermantasyonun gidişi şeker ve sıcaklık ölçümleriyle izlenerek şeker oranı sıfır olana kadar devam ettirilmiştir. Ağırlık değişiminin olmaması ve CO₂ çıkışının sona ermesiyle fermantasyonun tamamlandığına karar verilmiştir. Oluşan şarap (dibindeki tortuyu almadan) paslanmaz çelik bir huni yardımıyla 2 L' lik pet şişelere aktarılmıştır. Şişelemeden sonra bozulmayı engellemek için koruyucu olarak 200 µL/L dimetilkarbonat kullanılmıştır. Şişeler 10 °C'deki buzdolabında saklanmıştır. Bu sayede ölü olan mikroorganizmaların ve şarap partiküllerinin dibe çökmesi sağlanmıştır.

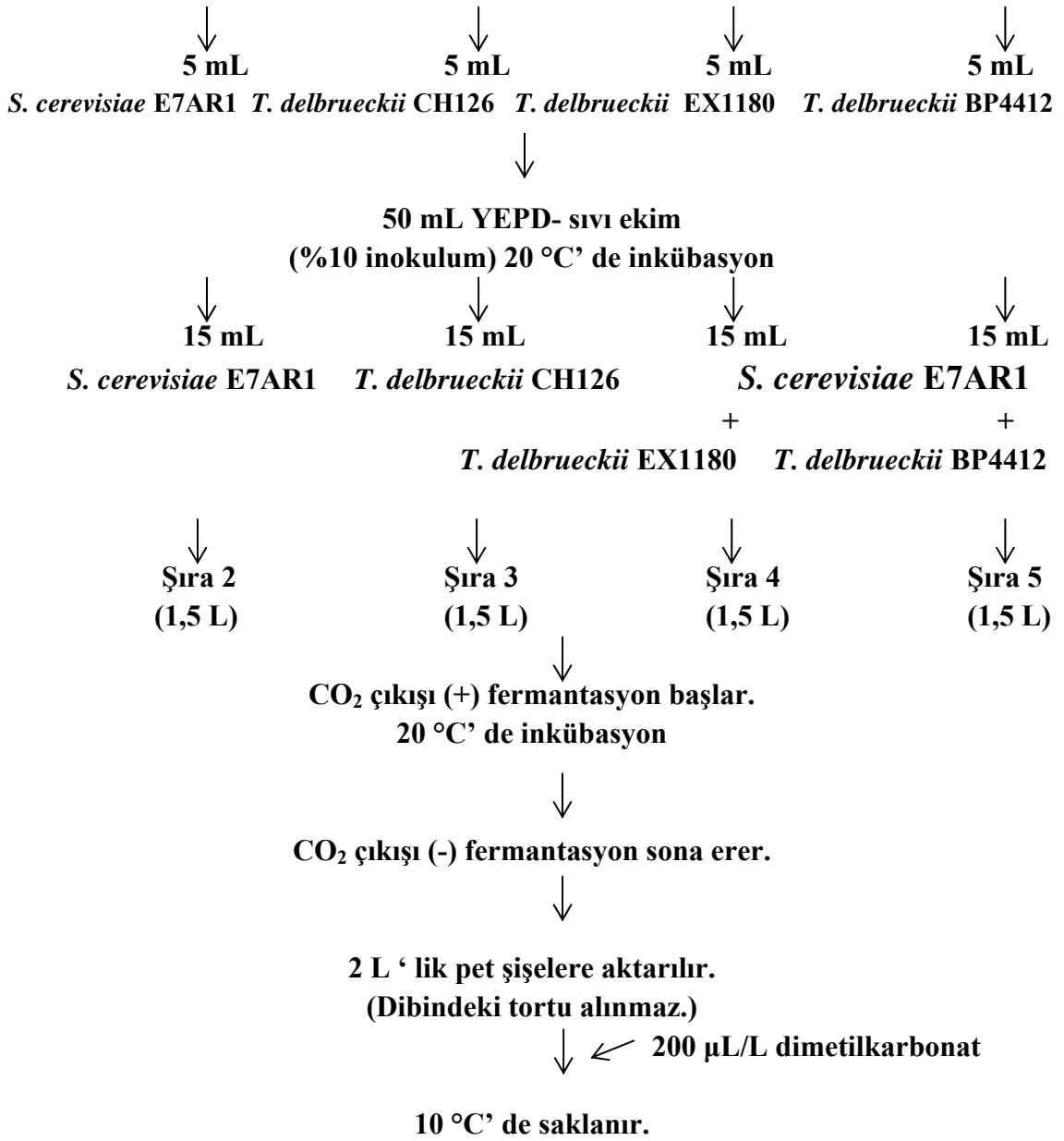
Çizelge 2.11. Şıralara uygulanan mayalar.

Şıra	Dimetilkarbonat	Fermantasyon Aktivatörü	Kullanılan Mayalar
1	Kullanılmadı.	Beyaz üzüm şırası; 0.5 g/mL Kırmızı üzüm şırası; -	-
2	Kullanılmadı.	Beyaz üzüm şırası; - Kırmızı üzüm şırası; -	+E7AR1 (<i>S. cerevisiae</i>)
3	Kullanılmadı.	Beyaz üzüm şırası; - Kırmızı üzüm şırası; -	+CH126 (<i>T. delbrueckii</i>)
4	Beyaz üzüm; 300 µL/L Kırmızı üzüm; 600 µL/L	Beyaz üzüm şırası; - Kırmızı üzüm şırası; -	+EX1180 (<i>T. delbrueckii</i>) + E7AR1 (<i>S. cerevisiae</i>)
5	Beyaz üzüm; 300 µL/L Kırmızı üzüm; 600 µL/L	Beyaz üzüm şırası; - Kırmızı üzüm şırası; -	+ <i>T. delbrueckii</i> BP4412 + E7AR1 (<i>S. cerevisiae</i>)

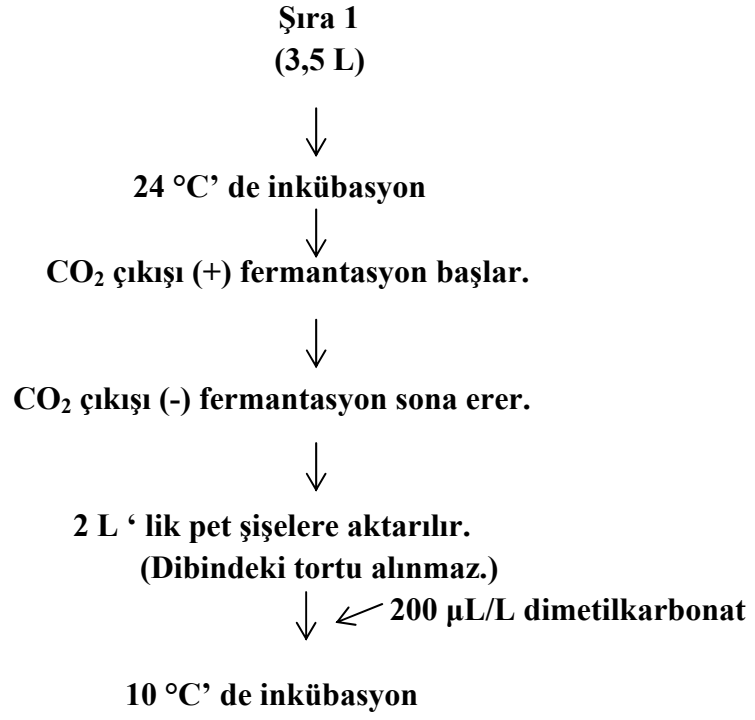
Çizelge 2.12. Beyaz üzüm sırasında spontan fermantasyon çalışması.



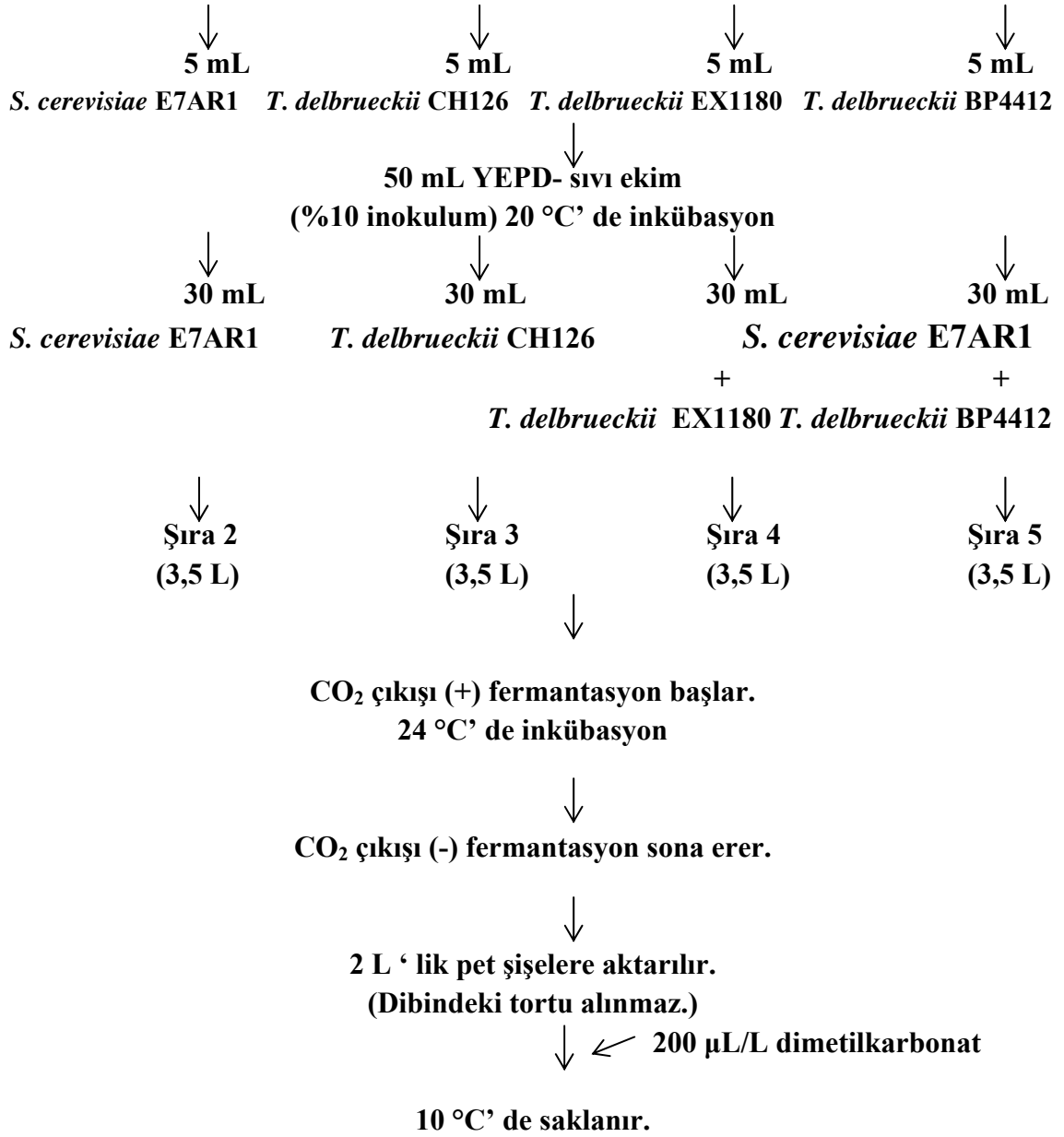
Çizelge 2.13. Beyaz üzüm şirasında mayalar ile fermantasyon çalışması.



Çizelge 2.14. Kırmızı üzüm şirasında spontan fermantasyon çalışması.



Çizelge 2.15. Kırmızı üzüm şirasında mayalar ile fermantasyon çalışması.



2.2.5. Fermantasyon Sırasında Yapılan Analizler

2.2.5.1. Canlı Hücre Sayımı ve Toplam Hücre Sayımı

Fermantasyon sırasında periyodik olarak (fermantasyonun başı, ortası ve sonunda) canlı hücre sayımı yapılarak, fermantasyon ortamında üreme kinetiği gözlenmiştir. Toplam hücre sayımı ve canlı hücre sayımı 3.2.2.2. numaralı yöntemdeki gibi yapılmıştır. Sayım sonucu, üzüm suyu aşılama kullanılan kültür ortamındaki canlı hücre sayısını (KOB/mL.) vermektedir.

2.2.5.2. Spesifik Yoğunluk, Briks ve Sıcaklık Tayini

Fermantasyon hergün aynı saatte briks, yoğunluk ve sıcaklık ölçümleriyle takip edilmiştir. Yoğunluğu ölçmek için densimetre, briks ölçümünde volümü % 0-25 olan refraktometre, sıcaklık tayininde termometre kullanılmıştır.

2.2.5.3. Gram Boyama

Şarapta ekşimeye ve bozulmaya neden olan bakterilerin gözlenmesi için, Gram boyama Atlas ve diğ. (1995)'e göre uygulanmıştır. Şıraları her birinden (şıra 1, 2, 3, 4, 5) yayma preparat hazırlandıktan sonra, havada kurutulup ve ısı ile fikse edilmiştir. Lamların üzeri hazırlanan “Kristal Viyole” boya solüsyonu ile tamamen kaplanmıştır. Bir dakika muamele edildikten sonra ve su ile yıkanmıştır. Fazla su akıtılıp, üzerlerine “Gram İyodür” solüsyonu döküldükten bir dakika sonra su ile yıkanmıştır, kurutma kağıdı ile fazla nemi alınmıştır. Preparat 20-30 saniye % 95'lik etanol ile muamele edildikten sonra su ile yıkanmıştır. Fazla su alındıktan sonra “Safranin” ile preparatın yüzeyi tamamen kaplanmıştır ve 30 saniye muamele edilmiştir. Preparat su ile yıkanmış ve kurutulmuştur.

Daha sonra immersiyon yağı ile 100X büyütme objektif kullanılarak ışık mikroskopta incelenerek sonuçlar kaydedilmiştir.

2.2.6. Duyusal Analiz

Amerine ve diğ. 1965' e göre, şarapların duyusal analizinde "20 puan" ve tercih testi yapılmıştır. Analizler 3 kişilik seçilmiş üyelerden oluşan uzman bir panelist grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. 20 puan sistemi, bazı uluslararası yarışmalarda uygulanan yöntemlerden biridir. Bu yöntemlerde, panelistler şarapları, şarabın çeşitli özelliklerini göz önünde bulundurarak dört farklı kritere göre değerlendirmişlerdir ve 20 tam puan üzerinden Şekil 3.16' daki formda belirtilen sınırlar içerisinde puanlamışlardır.

Çizelge 2.16. Duyusal analiz formu.

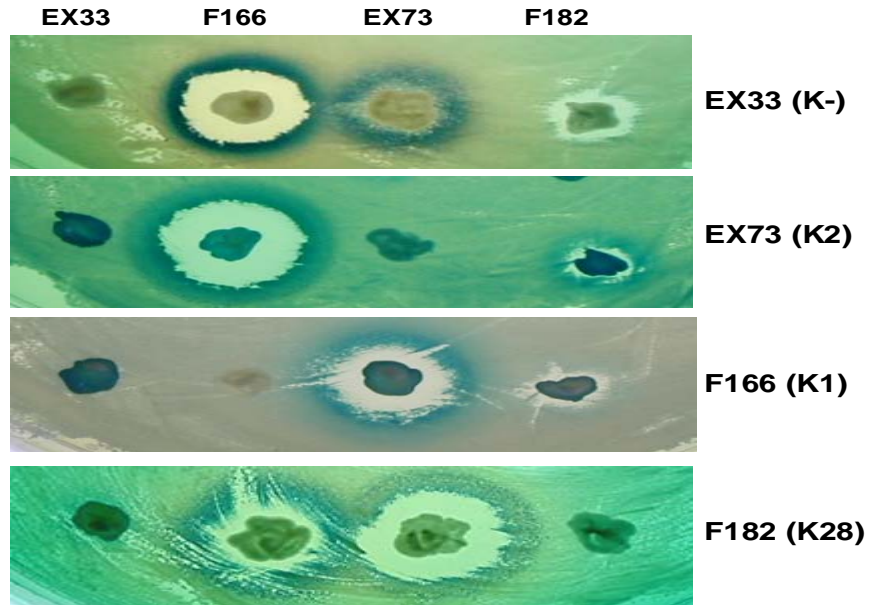
Panelistin Adı, Soyadı		:		
Panel Tarihi		:		
Duyusal Özellik	Puan	ÖRNEK		
Duyusal Özellik	Puan	1	2	3
Renk	0-2			
Berraklık	0-2			
Koku	0-4			
Tat ve Genel İzlenim	0-12			
Toplam	0-20			
Örnekleri tercihinize göre sıralayınız.				

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen bulgular üç başlık altında verilmiştir. İlk yapılan çalışma şarap yapımı için kullanılacak öldürücü mayaların özelliklerinin belirlenmesine yöneliktir. Elde edilen bulgulara dayanarak seçilen şarap mayalarının fermantasyon öncesi YEPD-sıvı besiyerinde ve melas içerisinde gelişme ve üreme durumu çeşitli parametrelerle incelenmiştir. Uygun şarap mayaları tespit edildikten sonra bu mayalarla üretilen beyaz ve kırmızı şarap kalitesi incelenmiştir.

3.1. Yayma Mayalarının Kontrolü Ve Katil Maya Özelliğinin Belirlenmesi

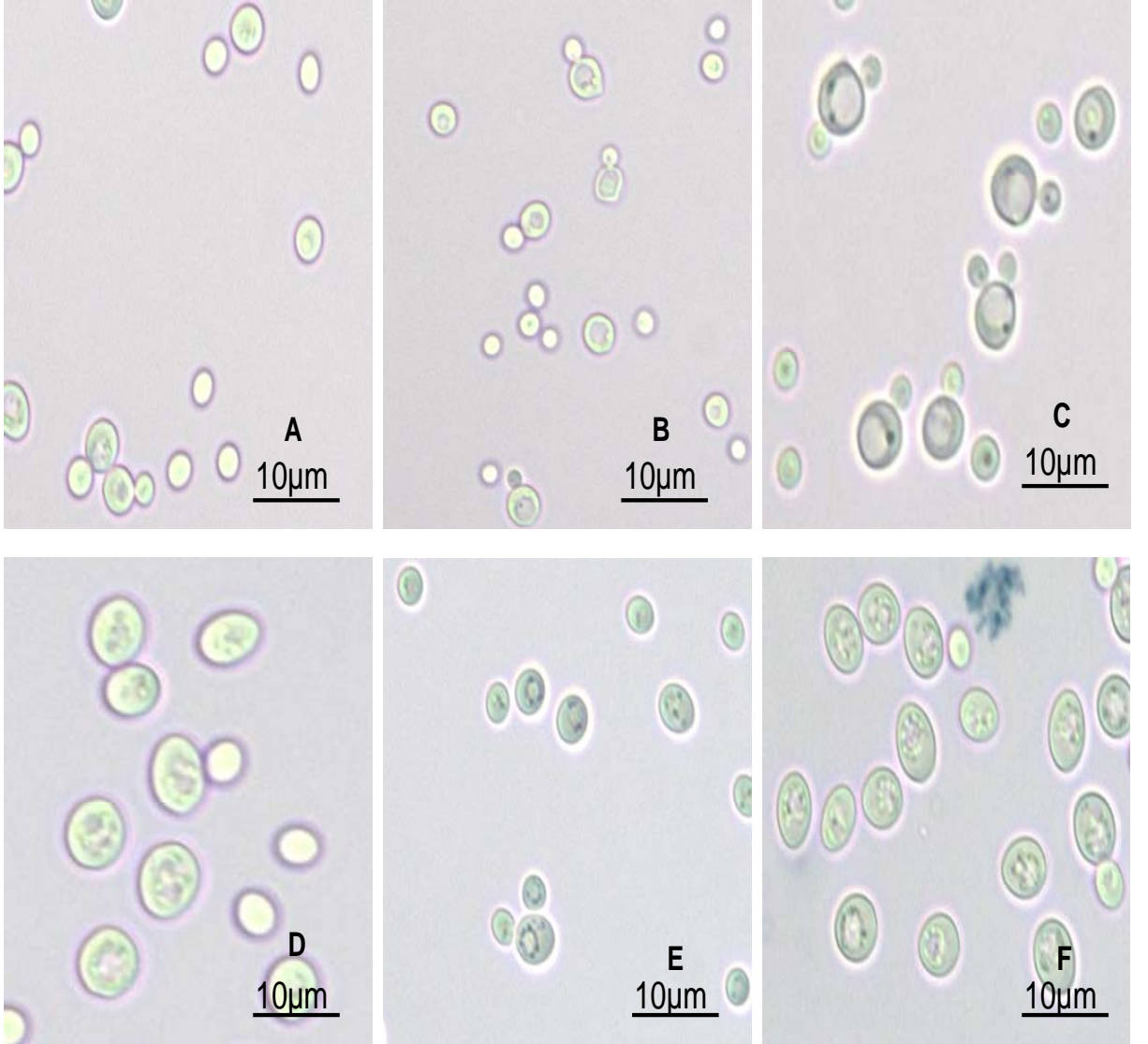
Şarap fermantasyonunda öldürücü mayaların tespiti için, kullanılacak olan yayma mayaları (*S. cerevisiae* EX33, EX73, F166 ve F182) öncelikle birbirine karşı kontrol edilmiştir. Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Bilinen fenotiplerle, mayaların 20 °C' de pH 4' de test plağı. Görüntünün üst kısmındaki sıralı mayalar, test edilmek için aşılana mayaları; sağda gösterilen mayalar ise petrinin tabanına yayılan yayma mayalarını ifade etmektedir. EX33 (duyarlı ve katil değil), EX73 (K2), F166 (K1), F182 (K28).

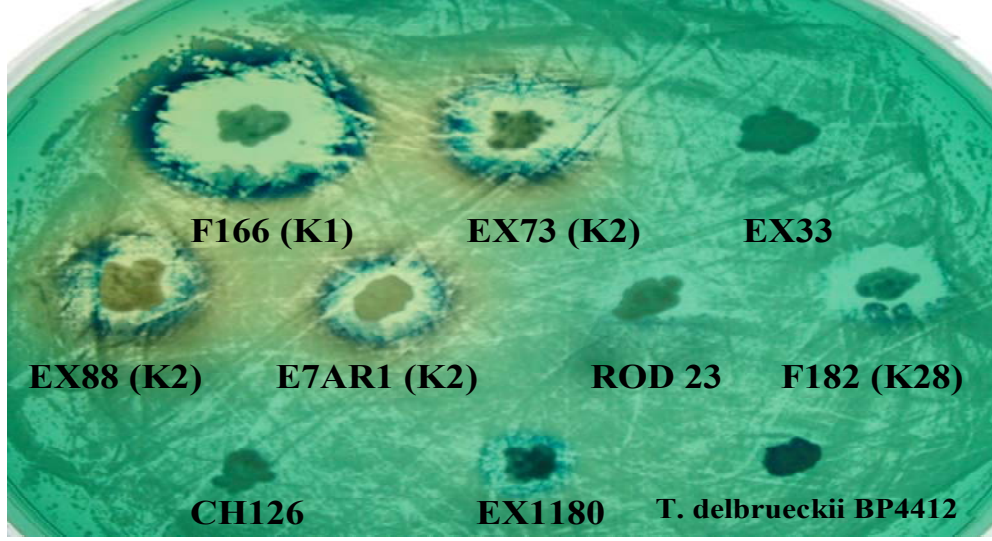
S. cerevisiae EX33 suşu yayma maya olarak kullanıldığında, kendisi hariç denenen diğer 3 maya suşuna karşı duyarlıdır. En yüksek duyarlılığı sırasıyla *S. cerevisiae* F166, *S. cerevisiae* EX73 ve *S. cerevisiae* F182 suşlarına karşı gösterdiği belirlenmiştir. *S. cerevisiae* EX73 suşu yayma maya olarak kullanıldığında, *S. cerevisiae* F166 ve *S. cerevisiae* F182 toksinlerine duyarlı, kendi toksinlerine ise bağışiktir. *S. cerevisiae* EX33 suşu *S. cerevisiae* EX73 mayasına karşı duyarlı ve katil değildir. *S. cerevisiae* F166 yayma mayası kendi toksinlerine bağışık, *S. cerevisiae* EX73, *S. cerevisiae* F182 suşlarına karşı duyarlı ve *S. cerevisiae* EX33 suşuna karşı katil bir türdür. *S. cerevisiae* F182 toksini ise kendisi hariç diğer *S. cerevisiae* F166, *S. cerevisiae* EX73 suşlarına karşı duyarlı, *S. cerevisiae* EX33 suşuna karşı katil etki göstermiştir. Bu denemede sonuç olarak yayma mayalarında en duyarlı suşun *S. cerevisiae* EX33, en az duyarlı suşun ise *S. cerevisiae* F 166 olduğu belirlenmiştir.

Şarap fermantasyonu için kullanılacak şarap mayalarının öldürücü toksin varlığına bakmak için pH 4,7 ve 20 °C’ de katil testi yapılmıştır. İzolasyonu ve tanımlanması önceki çalışmada yapılmış olan *S. cerevisiae* türüne ait EX88, E7AR1, ROD23 suşları, *T. delbrueckii* CH126, EX1180 ve ticari olarak sağlanan *T. delbrueckii* BP4412 suşunun katil toksin testi; *S. cerevisiae* EX33 (K-) yayma mayası kullanılarak yapılmıştır. Negatif kontrol olarak *S. cerevisiae* EX33, pozitif kontrol olarak *S. cerevisiae* F166, *S. cerevisiae* EX73 ve *S. cerevisiae* F182 suşları kullanılmıştır. Şekil 3.2’ de şarap mayalarının mikroskopik görüntüsü yer almaktadır. Deneme sonucunda *T. delbrueckii* BP4412 suşunun katil özellik göstermediği, *S. cerevisiae* E7AR1, *S. cerevisiae* EX88, *S. cerevisiae* ROD23 ve *T. delbrueckii* EX1180, *T. delbrueckii* CH126, katil toksin ürettiği belirlenmiştir. Şekil 3.3’ de elde edilen sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Şarap mayalarının mikroskopik görüntüsü.

A: *T. delbrueckii* EX1180, **B:** *T. delbrueckii* CH126, **C:** *T. delbrueckii* BP4412, **D:** *S. cerevisiae* E7AR1, **E:** *S. cerevisiae* EX88, **F:** *S. cerevisiae* ROD23



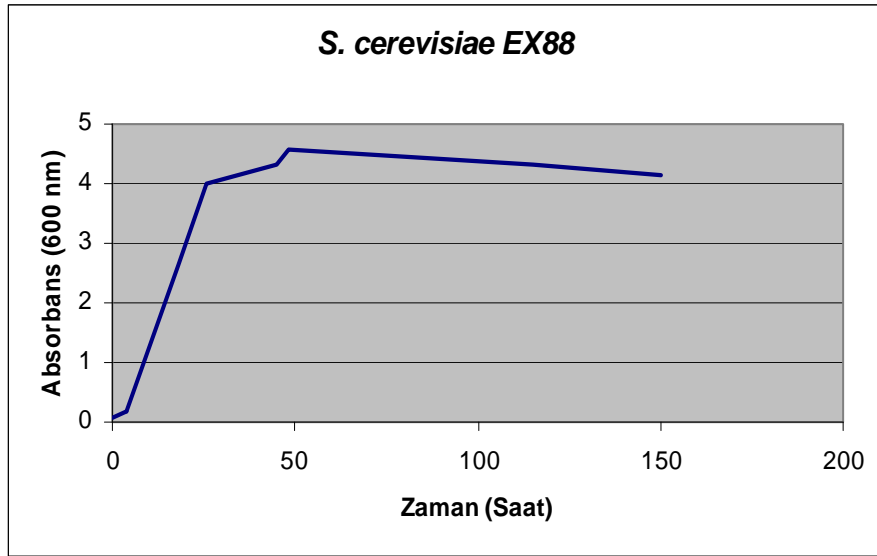
Şekil 3.3. Şarap yapımında kullanılacak mayaların yayma mayası *S. cerevisiae* EX33 kullanılarak katil testi. *S. cerevisiae* F166 (K1); + Kontrol, *S. cerevisiae* EX73 (K2); + Kontrol, *S. cerevisiae* F182 (K28); + Kontrol, *S. cerevisiae* EX33 (K-); - Kontrol

3.2. Şarap Yapımı Öncesi Mayalar Üzerinde Yapılan Analizler

Mikrobiyoloji bilimindeki ve teknolojisindeki ilerlemeler günümüzde şarap üreticisine, üretimi daha fazla kontrol edebilme olanağı vermiştir. Şarabın bileşimini ve kalitesini belirlemede en önemli katkıyı sağlayan etkenlerden biri olan mayanın teknolojik özelliklerinin bilinerek; şıra bileşimine göre seçilmesi, fermantasyon sırasında maya için uygun koşulların yaratılması ya da çevresel koşulların uyarlanması ile yüksek kalitede ürünler verecek şekilde yönlendirilmesi gerekmektedir.

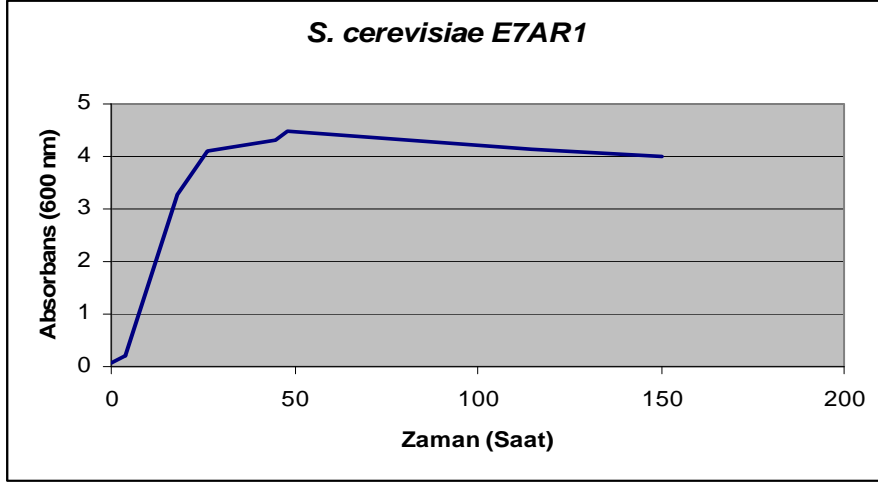
Şarap yapımında kullanılmak amacı ile maya seçimi için katil özelliğinin belirlenmesinin yanında büyüme hızı da ölçülmüştür. Büyüme eğrileri YEPD-sıvı besiyeri ve melas ortamında 30 °C' de 180 rpm' de 48 saat inkübasyon süresince absorbans değerinin ölçülmesi ile oluşturulmuştur. Büyüme eğrileri % 2 ve % 10 (v/v) olmak üzere iki farklı inokulum oranı için yapılmıştır. Absorbans değerleri ölçülürken 1'den yüksek olan ölçümler için seyreltme yapılmıştır. Elde edilen değer seyreltme faktörü ile çarpılarak elde edilen absorbans değerleri ile zamana karşı büyüme eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen eğrilerden her suş için belirtilen koşullardaki ikilenme süreleri de hesaplanmıştır.

Şekil 3.4.' de *S. cerevisiae* EX88 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* EX88 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 50. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 2,42 saattir.



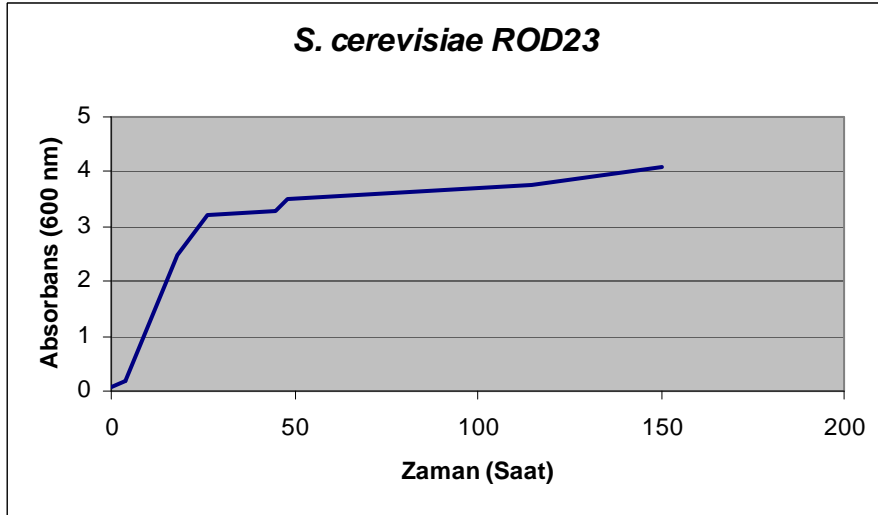
Şekil 3.4. *S. cerevisiae* EX88 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.5.' de *S. cerevisiae* E7AR1 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* E7AR1 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 40. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 1,96 saattir.



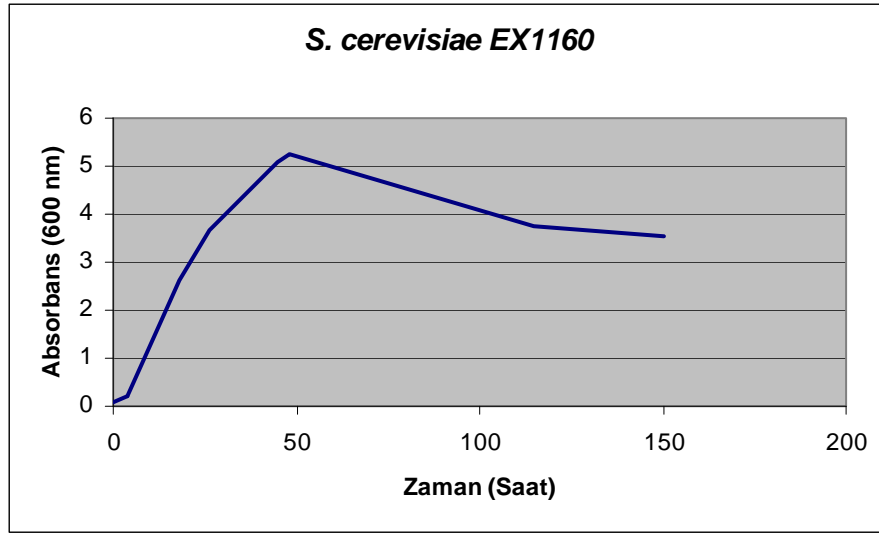
Şekil 3.5. *S. cerevisiae* E7AR1 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.6.' da *S. cerevisiae* ROD23 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* ROD23 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 40. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 2,03 saattir.



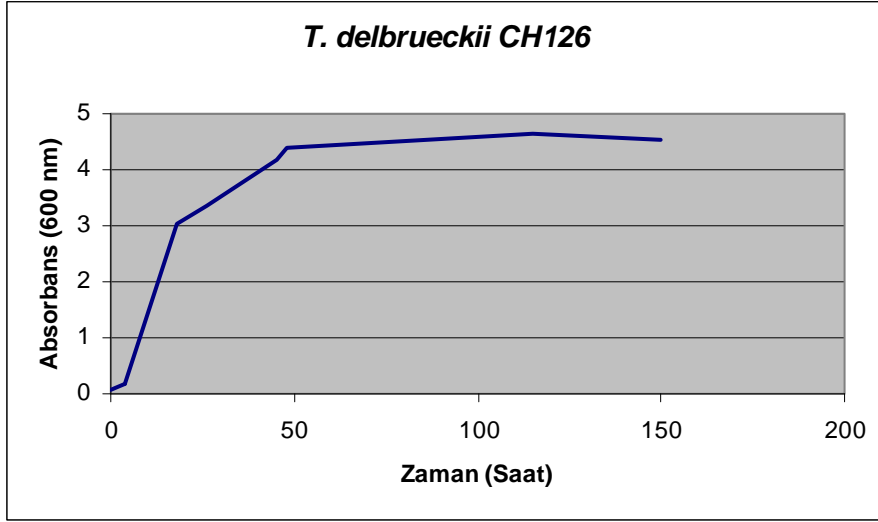
Şekil 3.6. *S. cerevisiae* ROD23 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.7.'de *S. cerevisiae* EX1160 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* EX1160 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 50. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 2,12 saattir.



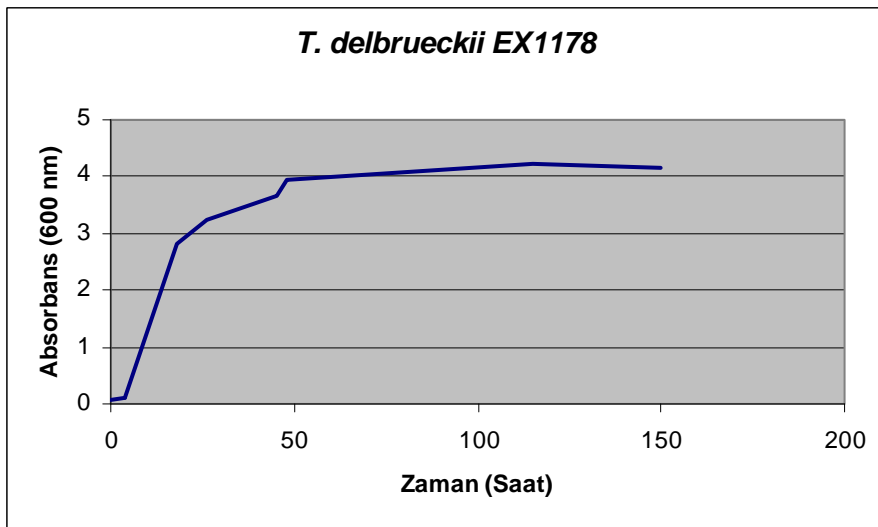
Şekil 3.7. *S. cerevisiae* EX1160 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.8.'de *T. delbrueckii* CH126 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* CH126 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 40. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 2,04 saattir.



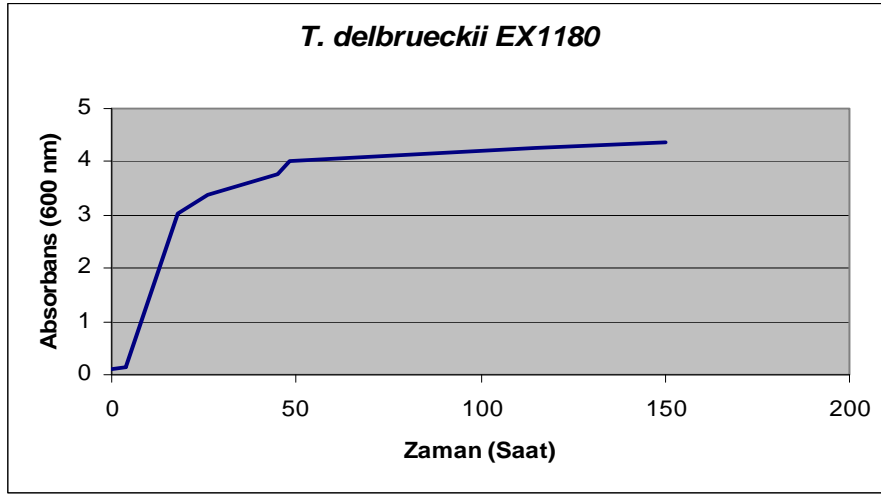
Şekil 3.8. *T. delbrueckii* CH126 suşuna ait mayaların YEPD-sıvı besiyerinde büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.9.' da *T. delbrueckii* EX1178 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* EX1178 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 40. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 2,35 saattir.



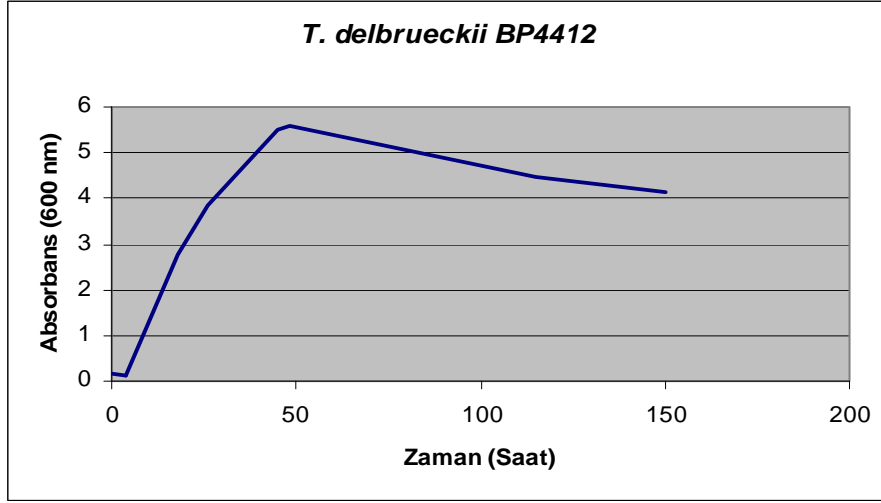
Şekil 3.9. *T. delbrueckii* EX1178 suşuna ait mayaların YEPD-sıvı besiyerinde büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.10.' da *T. delbrueckii* EX1180 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* EX1180 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 40. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 1,82 saattir.



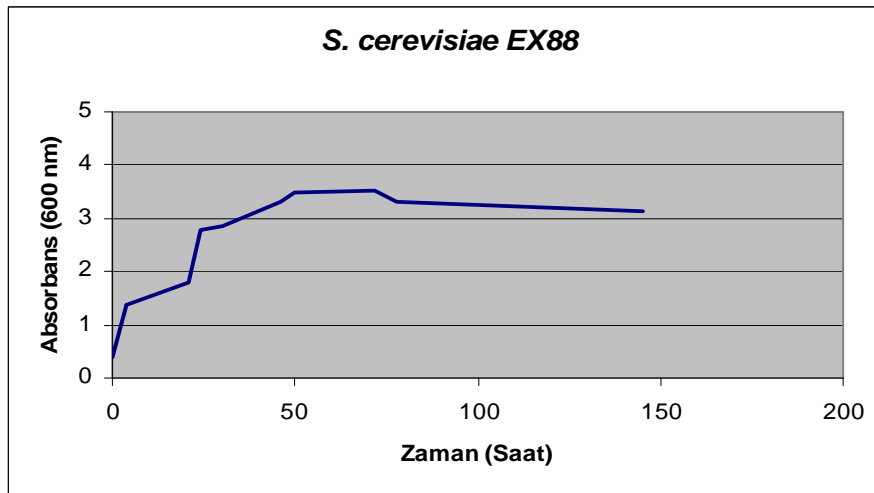
Şekil 3.10. *T. delbrueckii* EX1180 suşuna ait mayaların YEPD-sıvı besiyerinde büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.11.' da *T. delbrueckii* BP4412 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* BP4412 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 50. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 1,47 saattir.



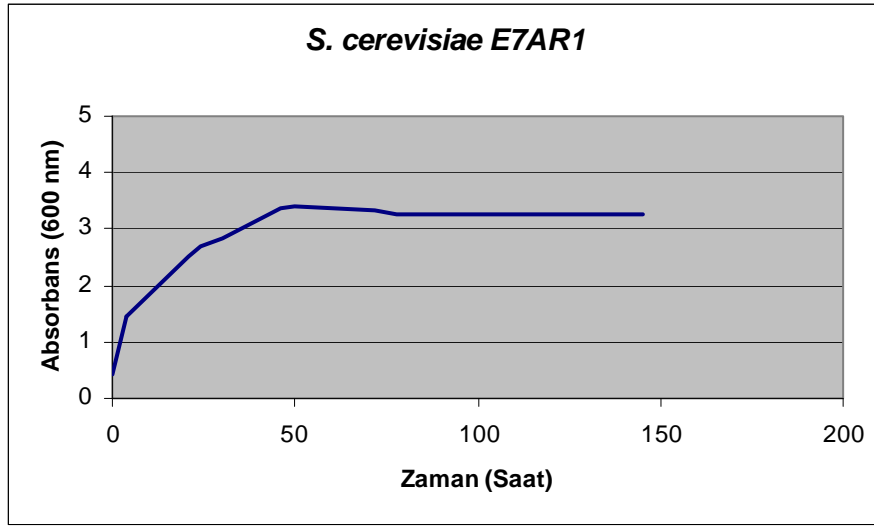
Şekil 3.11. *T. delbrueckii* BP4412 suşuna ait mayaların YEPD-sıvı besiyerinde büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Büyüme eğrilerinin çıkarılmasında kullanılan YEPD-sıvı besiyerine inokulum oranının etkisinin belirlenmesi için % 10 inokulum kullanılarak ekimler yapılmıştır. Şekil 3.12.' de *S. cerevisiae* EX88 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* EX88 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 50. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 13,86 saattir.



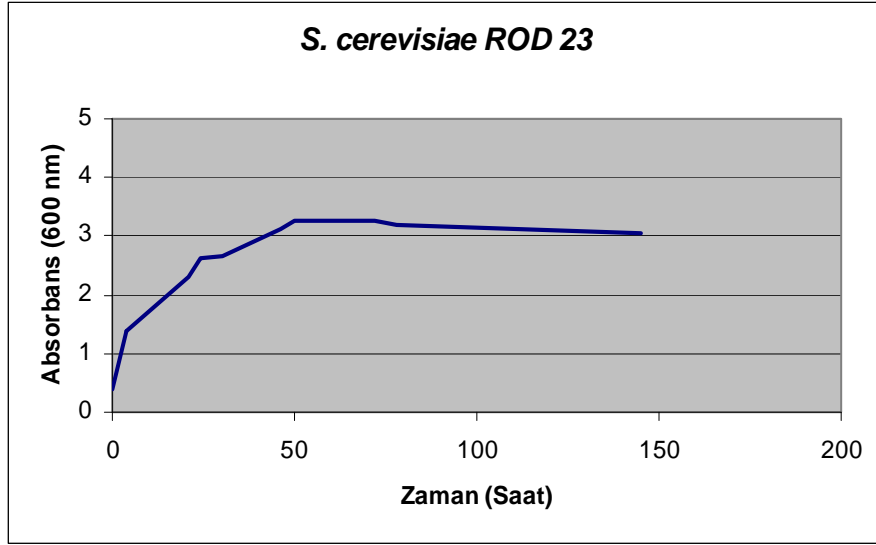
Şekil 3.12. *S. cerevisiae* EX88 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 10 inokulum oranı).

Şekil 3.13.' de *S. cerevisiae* E7AR1 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* E7AR1 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 50. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 11,27 saattir.



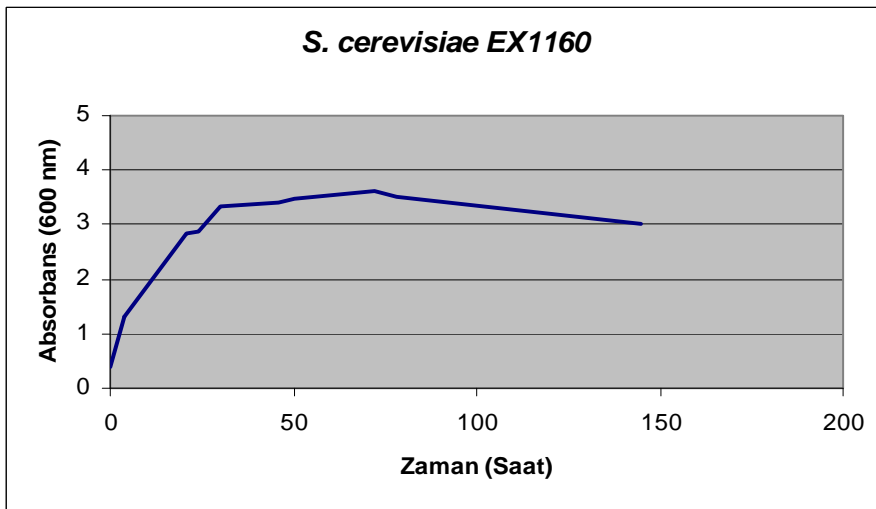
Şekil 3.13. *S. cerevisiae* E7AR1 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 10 inokulum oranı).

Şekil 3.14.' de *S. cerevisiae* ROD23 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* ROD23 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 40. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 11,31 saattir.



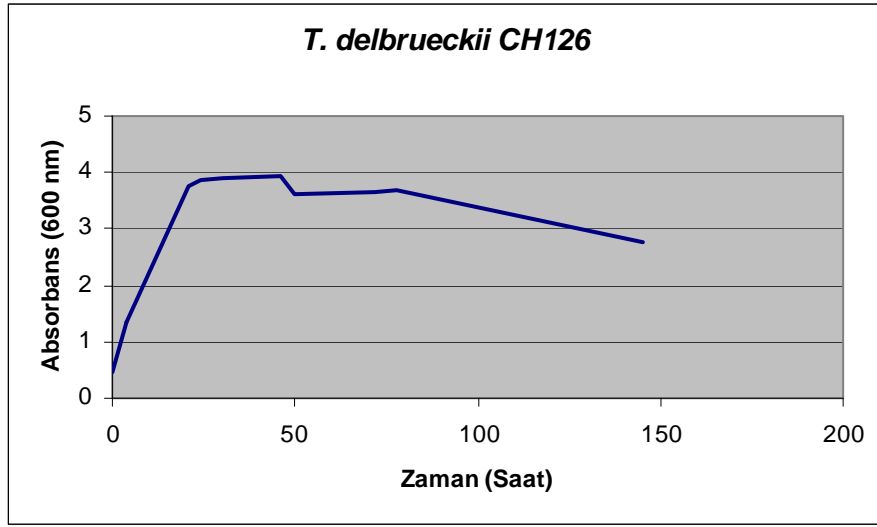
Şekil 3.14. *S. cerevisiae* ROD23 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 10 inokulum oranı).

Şekil 3.15.' de *S. cerevisiae* EX1160 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* EX1160 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 35. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 8,57 saattir.



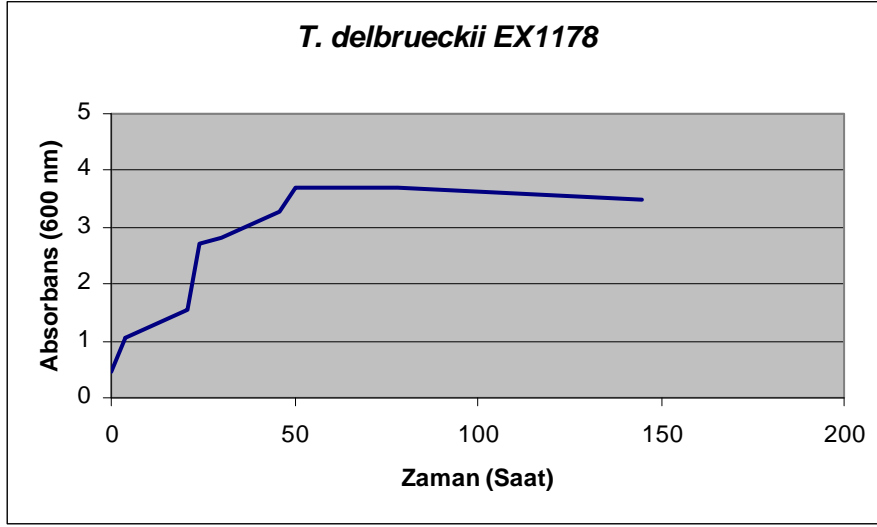
Şekil 3.15. *S. cerevisiae* EX1160 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 10 inokulum oranı).

Şekil 3.16.' da *T. delbrueckii* CH126 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* CH126 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 30. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 6,57 saattir.



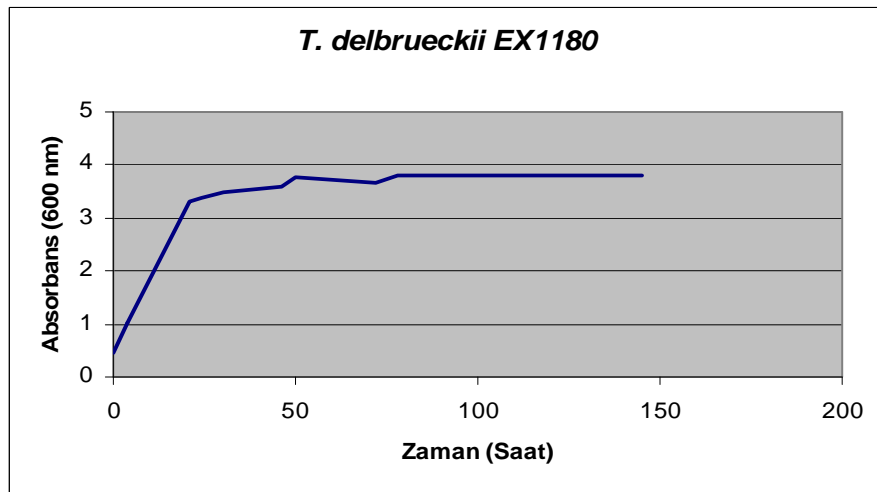
Şekil 3.16. *T. delbrueckii* CH126 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 10 inokulum oranı).

Şekil 3.17.' de *T. delbrueckii* EX1178 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* EX1178 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 40. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 9,03 saattir.



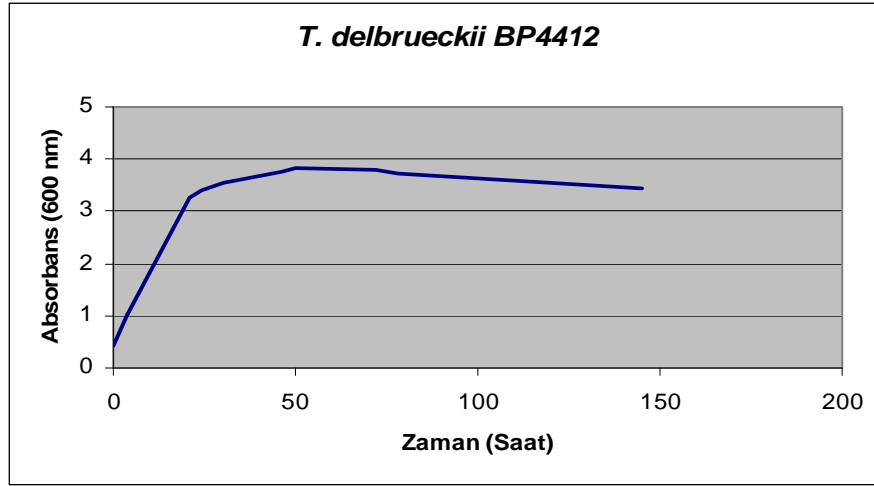
Şekil 3.17. *T. delbrueckii* EX1178 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 10 inokulum oranı).

Şekil 3.18.' de *T. delbrueckii* EX1180 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* EX1180 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 30. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 5,78 saattir.



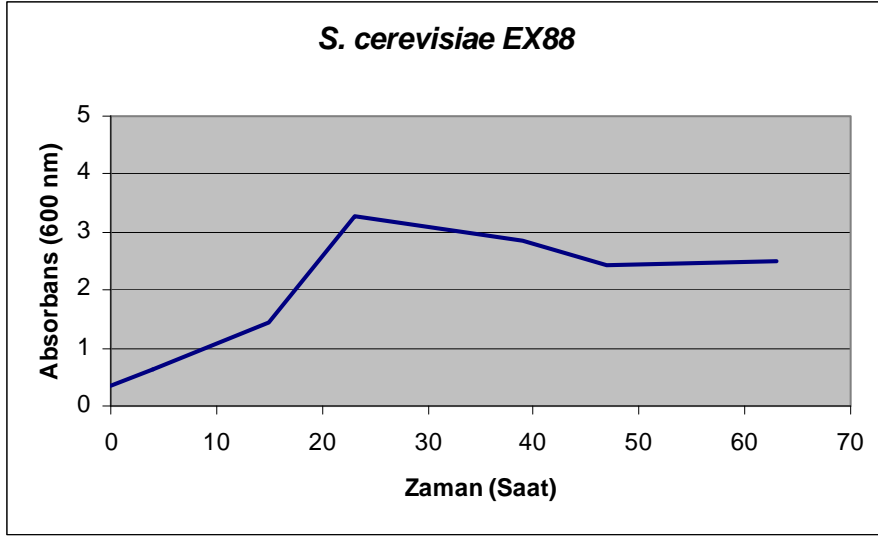
Şekil 3.18. *T. delbrueckii* EX1180 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 10 inokulum oranı).

Şekil 3.19.' de *T. delbrueckii* BP4412 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* BP4412 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 30. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer YEPD-sıvı besiyerinde 5,83 saattir.



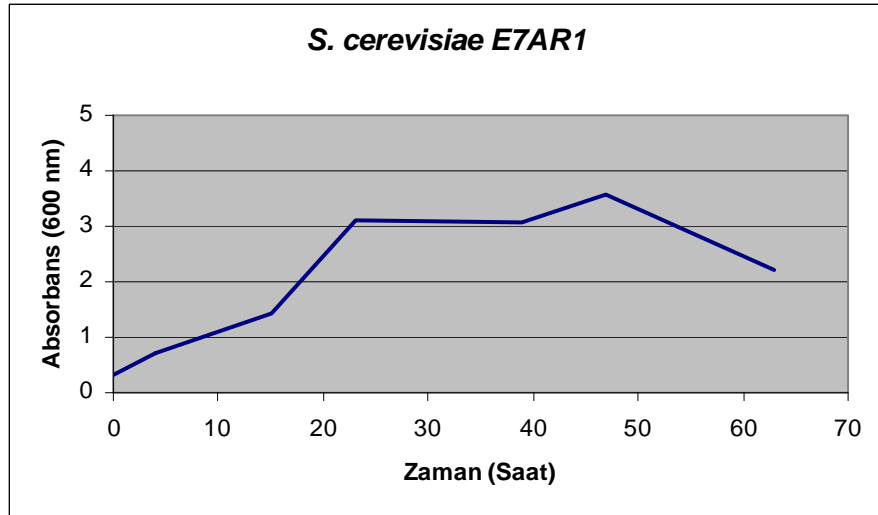
Şekil 3.19. *T. delbrueckii* BP4412 suşuna ait YEPD-sıvı besiyerindeki büyüme eğrisi (% 10 inokulum oranı).

Substratın biyokütle değişimi üzerine etkisini incelemek için, önceki çalışmadaki inokülasyon oranı (V% 2) sabit tutulup substrat olarak YEPD-sıvı yerine melas kullanılmıştır. Şekil 3.20.' de *S. cerevisiae* EX88 suşuna ait melas besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* EX88 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 25. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer melas besiyerinde 3,88 saattir.



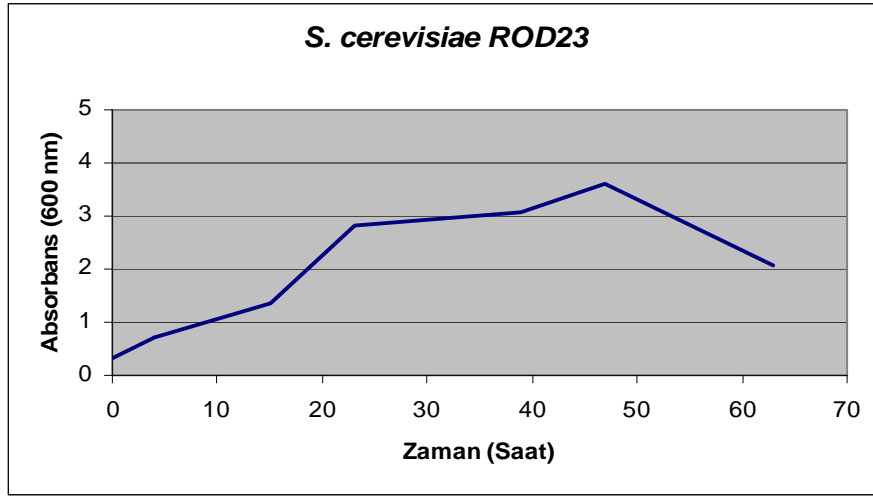
Şekil 3.20. *S. cerevisiae* EX88 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.21.' de *S. cerevisiae* E7AR1 suşuna ait melas besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* E7AR1 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 25. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer melas besiyerinde 3,00 saattir.



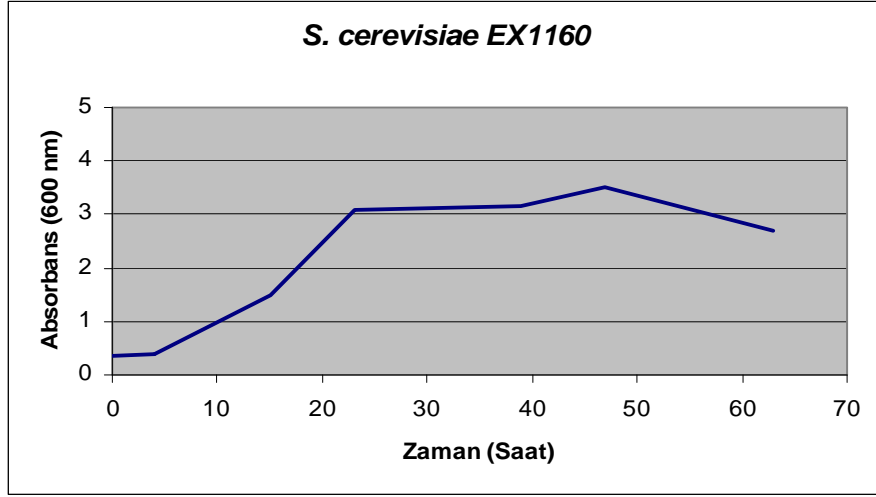
Şekil 3.21. *S. cerevisiae* E7AR1 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.22.' de *S. cerevisiae* ROD23 suşuna ait melas besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* ROD23 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 25. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer melas besiyerinde 4,12 saattir.



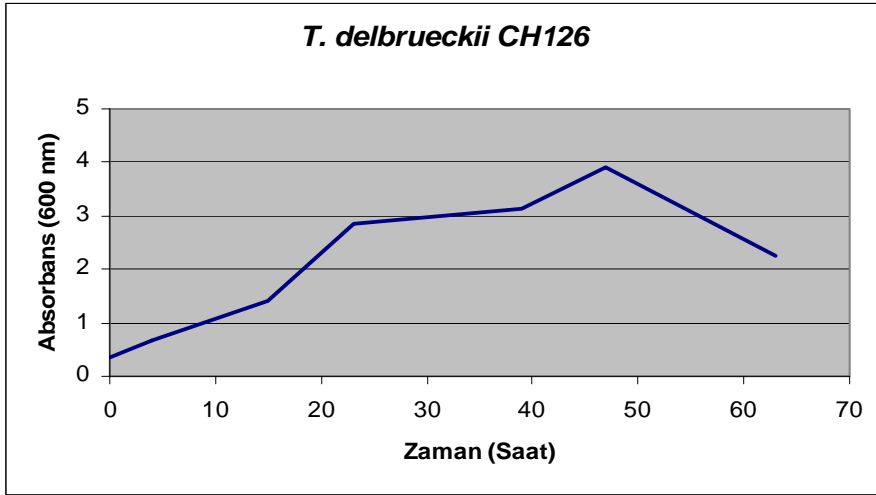
Şekil 3.22. *S. cerevisiae* ROD23 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.23.' de *S. cerevisiae* EX1160 suşuna ait melas besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *S. cerevisiae* EX1160 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 25. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer melas besiyerinde 3,28 saattir.



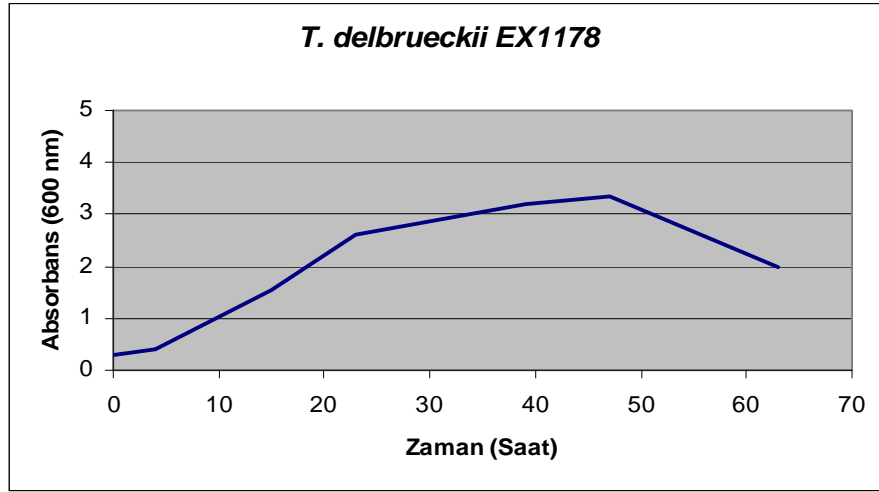
Şekil 3.23. *S. cerevisiae* EX1160 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.24.' de *T. delbrueckii* CH126 suşuna ait melas besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* CH126 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 25. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer melas besiyerinde 4,50 saattir.



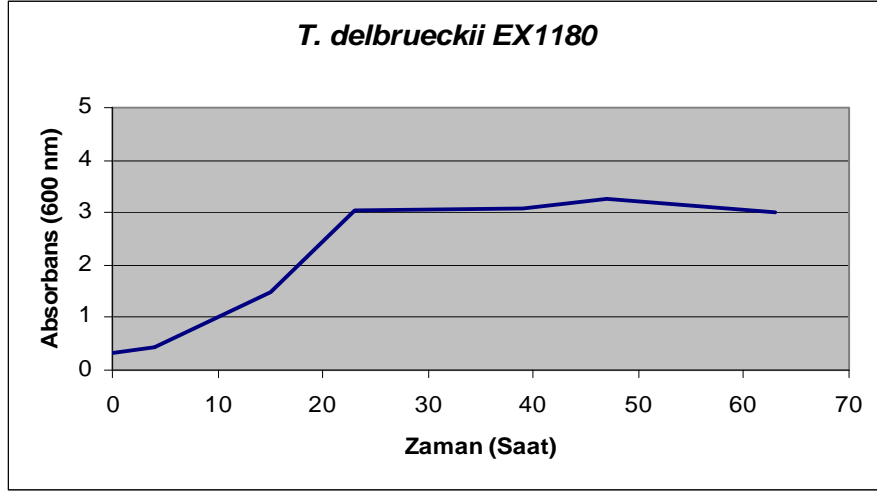
Şekil 3.24. *T. delbrueckii* CH126 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.25.' de *T. delbrueckii* EX1178 suşuna ait melas besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* EX1178 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 25. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer melas besiyerinde 3,50 saattir.



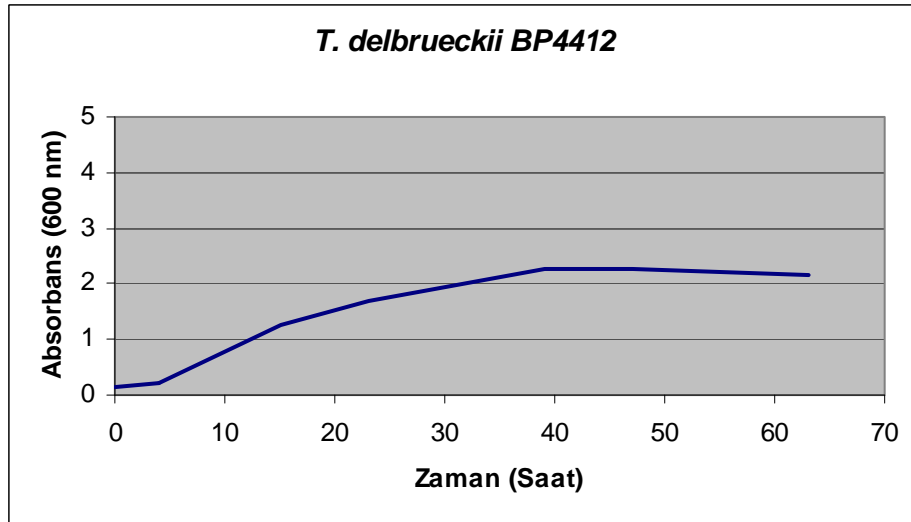
Şekil 3.25. *T. delbrueckii* EX1178 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.26.' da *T. delbrueckii* EX1180 suşuna ait melas besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* EX1180 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 25. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer melas besiyerinde 3,60 saattir.

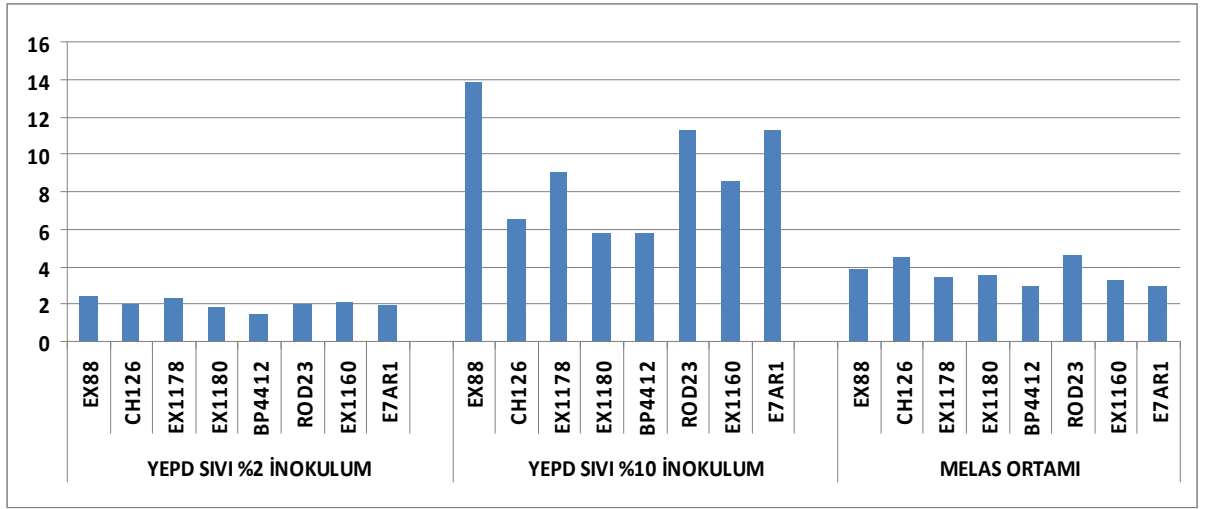


Şekil 3.26. *T. delbrueckii* EX1180 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).

Şekil 3.27.' de *T. delbrueckii* BP4412 suşuna ait melas besiyerindeki büyüme eğrisi gösterilmiştir. Yaklaşık 4 saatlik lag fazdan sonra *T. delbrueckii* BP4412 suşu logaritmik büyüme fazına geçmiştir ve bu faz 25. saatin sonuna kadar sürmüştür. Logaritmik faz değerleri ile ikilenme zamanı hesaplanmıştır. Bu değer melas besiyerinde 3,00 saattir.



Şekil 3.27. *T. delbrueckii* BP4412 suşuna ait melas ortamında büyüme eğrisi (% 2 inokulum oranı).



Şekil 3.28. Mayaların YEPD-sıvı besiyeri ve melas ortamında ikilenme süreleri.

Fermantasyon öncesi YEPD-sıvı besiyeri ve melas ortamında gelişme ve üreme durumu incelenen mayalar arasında biyokütle artışı, hızı ve katil özellikleri bakımından *S. cerevisiae* E7AR1 suşu, *T. delbrueckii* CH126, *T. delbrueckii* EX1180 ve *T. delbrueckii* BP4412 suşları şarap yapımında kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.3. ŞİRA ANALİZLERİ

3.3.1. pH Tayini

pH, pHmetre (Crison pHmeter Basic-20) kullanılarak ölçülmüştür. Beyaz üzüm sırasında pH 3,46 iken kırmızı üzüm sırasında pH 3,5 olarak okunmuştur.

3.3.2. Spesifik Yoğunluk ve Briks Tayini

Spesifik yoğunluk dansimetre (Nahita 71355150) ile ölçülmüştür. Şıranın yoğunluk değerinde dansimetre diagramında karşılık gelen değeri 20 °C' de kırmızı üzüm şırası için 1094 g/L beyaz üzüm şırası için 1055 g/L olarak okunmuştur. Şırada çözünür şeker tayini için el tipi refraktometre kullanılmıştır (Grenier, ölçüm aralığı: % 0-25 Vol, % 0-40 Briks).

Kırmızı üzüm şırası için Briks 22 (% şeker, w/w) iken beyaz şarap şırası için Briks 13,8' dir. Genelde kırmızı üzüm suyu 14 ile 24 arasında Briks değerlerine sahiptir. Fermantasyon sırasında her 1 Briks % 0,535 alkole çevrilir.

Bu çalışmada ölçülen kırmızı üzüm şırasındaki % 22' lik şekerin Briks skalasına göre fermantasyon sonucunda oluşacak alkol miktarının % 11,0-12,0 aralığında, beyaz üzüm şırası için ölçülen 13,8 Briks' in ise % 7,0- 7,5 aralığında olması beklenmiştir.

3.4. Fermantasyon Sırasında Yapılan Analizler

3.4.1. Sıcaklık Değişimleri

Şarap fermantasyonu oda koşullarında gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon esnasında sıcaklık artışı şırası üzüm kabuklarından renk ve aroma eldesini sağlarken, mayaların ölümüne ve fermantasyon miktarının düşmesine neden olabilir. Bunun önüne geçmek için fermantasyon başlangıcında, ortasında ve sonunda sıcaklık ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen sıcaklık dereceleri Çizelge 3.1.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Fermantasyon süresince gözlenen sıcaklık değişimleri.

Şıra	1. Şıra		2. Şıra		3. Şıra		4. Şıra		5. Şıra	
Fermantasyon Mayası Suşları	Spontan		<i>S. cerevisiae</i> E7AR1		<i>T.delbrueckii</i> CH126 (Velcorin)		<i>T.delbrueckii</i> EX1180 + <i>S. cerevisiae</i> E7AR1		<i>T.delbrueckii</i> BP4412 + <i>S. cerevisiae</i> E7AR1	
Tip / Süre	K*	B**	K	B	K	B	K	B	K	B
Fermantasyon Başlangıcı	20° C	20° C	20° C	20° C	20° C	20° C	20° C	20° C	20° C	20° C
Fermantasyon Ortası	24° C	18° C	24° C	18° C	24° C	20° C	24° C	18° C	24° C	19° C
Fermantasyon Sonu	22,5° C	18° C	24° C	18° C	24° C	20° C	23° C	18° C	24° C	19° C

*: Kırmızı üzüm şırası, **: Beyaz üzüm şırası

3.4.2. Briks Tayini

Fermentasyon süresince şıra ortamındaki şeker miktarının değişimi ölçülmüştür. Sonuçlar, Çizelge 3.2.' de gösterilmiştir. Kırmızı üzüm şirasında şeker tüketim miktarı spontan fermentasyonda % 63,63, *S. cerevisiae* E7AR1' de % 64,91, *T. delbrueckii* CH126' da % 64,58, *T. delbrueckii* EX1180 + *S. cerevisiae* E7AR1 çoklu starter kültürde % 56,92, *T. delbrueckii* BP4412 + *S. cerevisiae* E7AR1 çoklu starter kültürde % 64,90 olarak hesaplanmıştır.

Beyaz üzüm şirasında ise şeker tüketim kapasitesinin spontan fermentasyonda % 56,52, *S. cerevisiae* E7AR1' da % 69,69, *T. delbrueckii* CH126' da % 68,88, *T. delbrueckii* EX1180 + *S. cerevisiae* E7AR1 çoklu starter kültüründe % 68,75, *T. delbrueckii* BP4412 + *S. cerevisiae* E7AR1 % 71,59 oranında olduğu hesaplanmıştır. Seçilen şarap mayalarının, şeker tüketim kapasitesinin beyaz üzüm şirasında daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuçlar, Çizelge 3.2.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Fermentasyon süresince şıralardaki briksin fermentasyon boyunca değişimi.

Mayalar	Şıra Tipi	Fermentasyon Başlangıcı Briks (g/100mL)	Fermentasyon Ortası Briks (g/100mL)	Fermentasyon Sonu Briks (g/100mL)	% Şeker Tüketimi
1. Spontan	Kırmızı	22	15,5	8	%63,63
	Beyaz	13,8	13,8	6	%56,52
2. E7AR1	Kırmızı	22,8	14,8	8	%64,91
	Beyaz	13,2	10,8	4	%69,69
3. CH126	Kırmızı	24	16,5	8,5	%64,58
	Beyaz	13,5	6 g	4,2	%68,88
4. EX1180 +E7AR1	Kırmızı	26	19	11,2	%56,92
	Beyaz	16	5,8	5	%68,75
5.T.delbrueckii BP4412+E7AR1	Kırmızı	22,8	15,6	8,8	%64,90
	Beyaz	17,6	7,8	5	%71,59

3.4.3. Üzüm Şirasında Spesifik Yoğunluk Tayini

3.4.3.1. Kırmızı Üzüm Şirasında Spesifik Yoğunluk Tayini

Seçilmiş şarap mayalarıyla yapılan denemelerde alkol fermantasyonunun şırada spesifik yoğunluk takibiyle yapılmıştır. Spontan gerçekleşen fermantasyonda spesifik yoğunluk değerleri fermantasyonun başından itibaren çok yavaş bir şekilde azalmaya başlamış ve fermantasyon kırmızı üzüm şirasında 10 gün sürmüştür. Fermantasyon sonunda spesifik yoğunluk değerleri 999 g/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3.).

İnokulum olarak *S. cerevisiae* E7AR1 mayasının kullanımıyla etil alkol fermantasyonu hızlı bir şekilde başlamış ve 3. güne kadar yoğunlukta çok hızlı bir azalma gözlenmiştir. 3. günden itibaren spesifik yoğunluktaki azalma yavaşlamış ve 6 günlük fermantasyon sonunda yoğunluk değerleri 994 g/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3.).

İnokulum olarak *T. delbrueckii* CH126 mayası kullanılarak yapılan etil alkol fermantasyonu hızlı bir şekilde başlamış ve 3. güne kadar yoğunlukta çok hızlı bir azalma gözlenmiştir. 3. günden itibaren yoğunluktaki azalma yavaşlamış ve 6 günlük fermantasyon sonunda yoğunluk değerleri 996 g/L olarak belirlenmiştir.

T. delbrueckii EX1180 + *S. cerevisiae* E7AR1 çoklu starter kültürleri ile yapılan karışık inokülasyonlarda, fermantasyon saf kültürlere göre daha yavaş gerçekleşmiştir. (Çizelge 3.3.). Fermantasyon, yoğunluk değeri 1 g/L'in altına düştüğü zaman tamamlanmaktadır. Fermantasyon süreci 29. günde tamamlanmıştır. *T. delbrueckii* BP4412 + *S. cerevisiae* E7AR1 çoklu starter kültürleri ile yapılan karışık inokülasyonlarda, fermantasyon saf kültürlere göre daha yavaş gerçekleşmiş olmasına rağmen EX1180+E7AR1 kültürüne göre daha hızlıdır. Fermantasyon 8. günde tamamlanmış ve fermantasyon sonrası gözlenen yoğunluk 1006 g/L' dir (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. Kırmızı üzüm şirasının fermantasyonu sırasındaki yoğunluk değişimi.

Fermantasyon Zamanı (Gün)	Spontan	<i>S.cerevisiae</i> E7AR1	<i>T.delbrueckii</i> CH126	<i>T.delbrueckii</i> EX1180 + <i>S.cerevisiae</i> E7AR1	<i>T.delbrueckii</i> BP4412 + <i>S.cerevisiae</i> E7AR1
0	1094 g/L	1100 g/L	1110 g/L	1112 g/L	1097 g/L
1	1090 g/L	1075 g/L	1090 g/L	1098 g/L	1090 g/L
2	1067 g/L	1044 g/L	1055 g/L	1081 g/L	1067 g/L
3	1047 g/L	1020 g/L	1027 g/L	1065 g/L	1048 g/L
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	1011 g/L	994 g/L	996 g/L	1026 g/L	1016 g/L
7	1007 g/L	-	995 g/L	1022 g/L	1011 g/L
8	1004 g/L	-	-	1020 g/L	1006 g/L
9	1000 g/L	-	-	1017 g/L	-
10	999 g/L	-	990 g/L	1015 g/L	-
14	996 g/L	-	-	-	998 g/L
17	-	-	-	1006 g/L	-
20	-	-	-	1004 g/L	-
24	-	-	-	1003 g/L	-
29	-	-	-	1002 g/L	-

3.4.3.2. Beyaz Üzüm Şirasında Spesifik Yoğunluk Tayini

Spontan gerçekleşen fermantasyonda yoğunluk değerleri fermantasyonun başından itibaren çok yavaş bir şekilde azalmaya başlamış ve fermantasyon beyaz üzüm şirasında kırmızı üzüm şirasına göre daha uzun sürmüştür. 10. günün sonundaki yoğunluk değerleri 1009 g/L olarak belirlenmiştir. Bu değer kırmızı üzüm şirasında 999 g/L' dir (Çizelge 3.4.).

S. cerevisiae E7AR1 mayasının kullanımıyla etil alkol fermantasyonu hızlı bir şekilde başlamış ve 3. güne kadar yoğunlukta çok hızlı bir azalma gözlenmiştir. 3. günden itibaren yoğunlukta azalma yavaşlamış ve 6 günlük fermantasyon sonunda yoğunluk değerleri 998 g/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4.).

T. delbrueckii CH126 mayasının kullanımıyla etil alkol fermantasyonu hızlı bir şekilde başlamış ve 3. güne kadar yoğunlukta çok hızlı bir azalma gözlenmiştir. 3. günden itibaren yoğunluktaki azalma yavaşlamış ve 6 günlük fermantasyon sonunda yoğunluk değerleri 995 g/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4.).

T. delbrueckii EX1180+ *S. cerevisiae* E7AR1 çoklu starter kültürleri ile yapılan karışık inokülasyonlarda, fermantasyon saf kültürlere göre daha yavaş gerçekleşmiştir. Yoğunluk değerleri fermantasyonun başında çok daha yavaş bir şekilde azalırken 3. günden itibaren yoğunluktaki azalma hızlanmıştır. 9. günde fermantasyon sonlanmaya başlamış, 9. ve 10. günün sonundaki yoğunluk değeri 980 g/L ve 970 g/L olarak bulunmuştur (Çizelge 3.4.).

T. delbrueckii BP4412+ *S. cerevisiae* E7AR1 çoklu starter kültürleri ile yapılan karışık inokülasyonlarda, fermantasyon 8. günde tamamlanmış ve fermantasyon sonrası gözlenen yoğunluk oranı 999'dur (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. Beyaz üzüm şirasının fermantasyonu sırasındaki yoğunluk değişimi.

Fermantasyon Zamanı (Gün)	Spontan	<i>S.cerevisiae</i> E7AR1	<i>T.delbrueckii</i> CH126	<i>T.delbrueckii</i> EX1180 + <i>S.cerevisiae</i> E7AR1	<i>T.delbrueckii</i> BP4412 + <i>S.cerevisiae</i> E7AR1
0	1055 g/L	1052 g/L	1055 g/L	1065 g/L	1071 g/L
1	1055 g/L	1039 g/L	1035 g/L	1062 g/L	1073 g/L
2	1060 g/L	1029 g/L	1015 g/L	1057 g/L	1071 g/L
3	1056 g/L	1015 g/L	1000 g/L	1046 g/L	1060 g/L
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	1050 g/L	998 g/L	996 g/L	1000 g/L	1015 g/L
7	1040 g/L	-	995 g/L	950 g/L	1007 g/L
8	1029 g/L	-	-	-	999 g/L
9	1020 g/L	-	-	980 g/L	-
10	1009 g/L	995 g/L	-	970 g/L	-
14	996 g/L	-	-	-	998 g/L

3.4.4. Kırmızı Üzüm Şirasında Fermantasyon Süresince Genel Değişimler

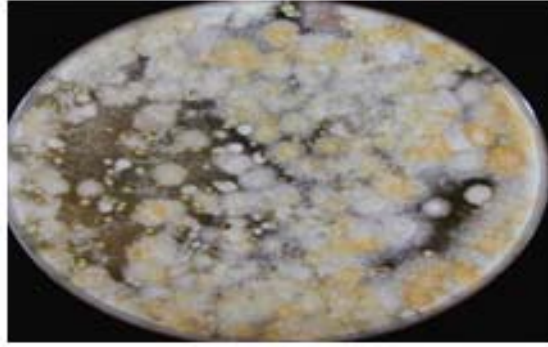
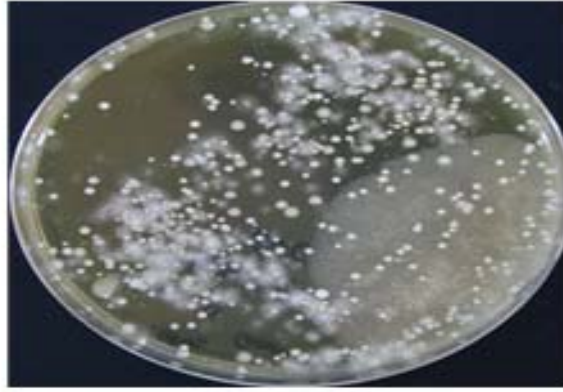
Kırmızı üzüm şirasının spontan yolla gerçekleştirilen fermantasyonda, fermantasyonun başında % 59 oranında apikulat mayaları gözlenmiştir (Şekil 3.29.). Bu mayalar *S. cerevisiae*'nin daha kolay geliştiği % 3-5 etanol düzeyine kadar fermantasyonda baskın olup fermantasyonu başlatmışlardır. Fermantasyonun ortasında bu mayalarının oranı % 41' e düşmüştür. Üzüm suyu içerisindeki şeker tüketiminin sabitlendiğinin gözlenmesiyle fermantasyonun bittiğine karar verilmiştir. Fermantasyon 14 gün sürmüştür.

S. cerevisiae suşuna ait E7AR1 ile yapılan fermantasyonda, CO₂ çıkışı ilk günde fermantasyon ortamındaki köpürme ile gözlenmiştir. Briks tüketimi fermantasyonun 2. gününde maksimuma ulaşmıştır. Üzüm suyu içerisindeki şeker tüketimi ve şıranın yoğunluğu 6. günde sabitlenmiştir (Şekil 3.31.).

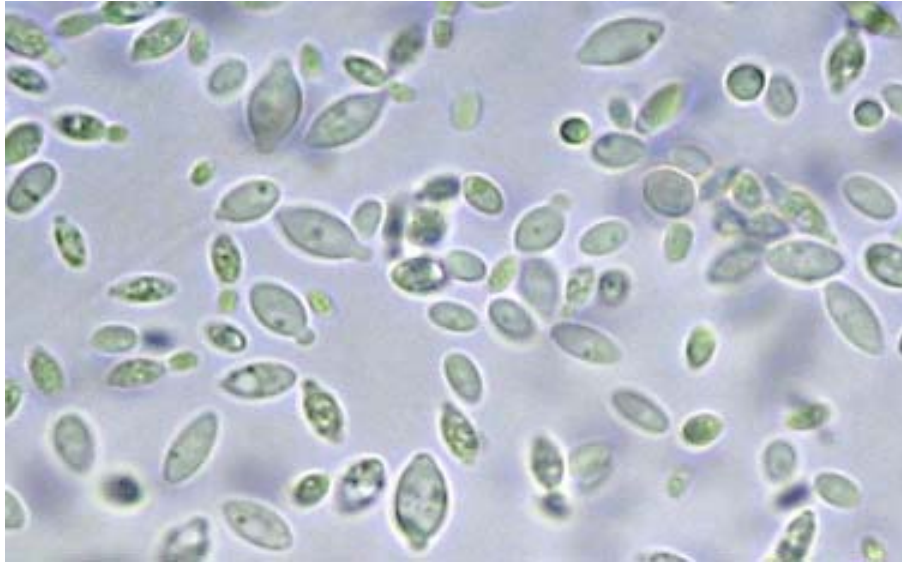
Saf *T. delbrueckii* CH126 suşunda fermantasyonun 2. gününe kadar Briks tüketimi ve fermantasyon hızı çok yüksektir. Fermantasyon 10. günde tamamlanmıştır (Şekil 3.31.).

T. delbrueckii EX1180 suşu ve *S. cerevisiae* E7AR1 suşu ile yapılan karışık kültürlerde fermantasyon hızı saf kültürlerle göre daha yavaştır. Fermantasyonun 3. gününde fermantasyonu sorunsuz tamamlamak için şıraya E7AR1 eklenmiştir. Fermantasyon, şeker tüketiminin durduğunun gözlenmesiyle 29. günde bitmiştir (Şekil 3.31.).

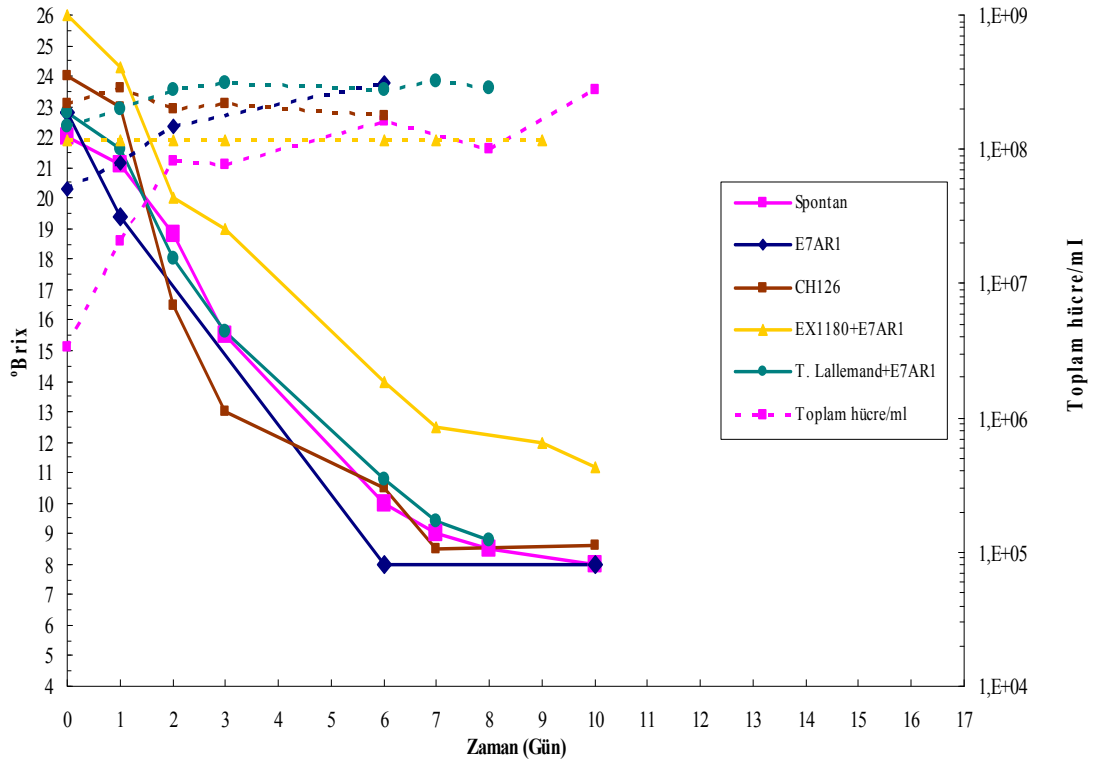
T. delbrueckii BP4412 suşu ve *S. cerevisiae* E7AR1 suşu ile yapılan karışık kültürlerde fermantasyonun 3. gününe kadar toplam hücre sayısı yükselmemiştir. Bunun sebebi, *S. cerevisiae* E7AR1 suşunun katil toksininin *T. delbrueckii* BP4412 suşunu öldürmesidir. Fermantasyonun tamamlanması için 3. gün üzüm şirasına E7AR1 suşu inoküle edilerek fermantasyonun uygun bir şekilde tamamlanması sağlanmıştır (Şekil 3.31.). Fermantasyon 14. gün sonlanmıştır. Fermantasyon süresince bir kontaminasyon gözlenmemiştir.



Şekil 3.29. Kırmızı üzüm şirasının spontan fermantasyonundan YEPD Agar besiyerine yapılan yayma plaka ekimi.



Şekil 3.30. Kırmızı üzüm şirasının spontan fermantasyonunda gözlenen apikulat mayalarının mikroskopik görüntüsü.



Şekil 3.31. Kırmızı üzüm şirasında fermantasyon ve toplam hücre sayısı değişimi.

3.4.5. Beyaz Üzüm Şirasında Fermantasyon Süresince Genel Değişimler

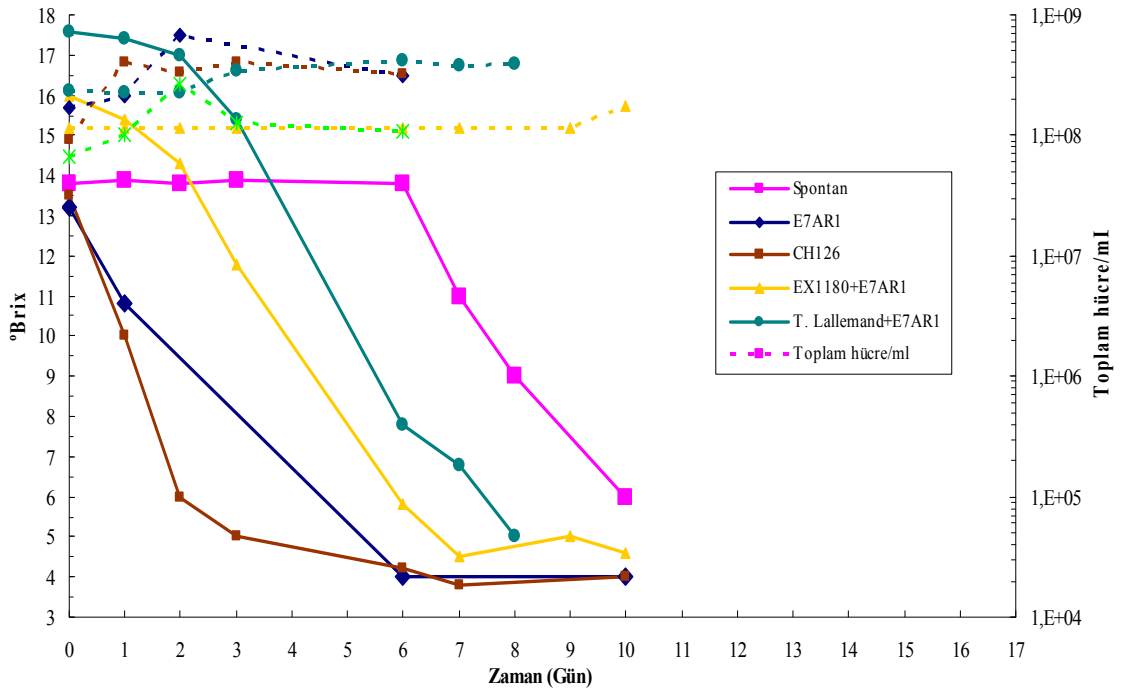
Fermantasyon boyunca, şarap mayaları tarafından tüketilen toplam şeker miktarı ve fermantasyon ortamında üreme hızına bakılmıştır. Beyaz üzüm şirasının spontan olarak gerçekleştirilen fermantasyonda fermantasyon hızı yavaştır ve fermantasyon 14. günde sonlanmıştır (Şekil 3.32).

S. cerevisiae E7AR1 suşu ile yapılan fermantasyonda, CO₂ çıkışı 1. günde fermantasyon ortamındaki köpürme ile gözlenmiştir. 6. günde üzüm suyu içerisindeki şeker tüketiminin sabitlendiğinin gözlenmesiyle fermantasyonun bittiğine karar verilmiştir (Şekil 3.32.).

Saf *T. delbrueckii* CH126 suşunda fermantasyonun 2. gününe kadar şeker tüketimi ve fermantasyon hızı çok yüksektir. Fermantasyon 7. günde tamamlanmıştır (Şekil 3.32.). Fermantasyon süresince bir kontaminasyon gözlenmemiştir.

T. delbrueckii EX1180 suşu ve *S. cerevisiae* E7AR1 suşu ile yapılan karışık kültürlerde fermantasyonun 3. gününde üzüm şirasında *S. cerevisiae* E7AR1 suşu hakimdir. Fermantasyon, şeker tüketiminin durduğunun gözlenmesiyle 7. günde bitmiştir (Şekil 3.32.).

T. delbrueckii BP4412 ve *S. cerevisiae* E7AR1 suşu ile yapılan karışık kültürlerde toplam hücre sayısı fermantasyonun 2. gününe kadar artmamıştır. Fermantasyonun 3. gününde üzüm şirasında *S. cerevisiae* E7AR1 suşunun hakim olduğu ve hücrelerin ölmeye başladığı gözlenmiştir (Şekil 3.32.). Bunun sebebi *S. cerevisiae* E7AR1 suşunun sahip olduğu katil toksinleri ile BP4412 suşunu öldürmesidir.



Şekil 3.32. Beyaz üzüm şirasında fermantasyon ve toplam hücre sayısı değişimi.

3.4.6. Üzüm Şırasında Fermantasyon Süresince Laktik Asit Bakterisi ve Asetik Asit Bakterilerindeki Genel Değişimler

Kırmızı ve beyaz üzüm şırasında spontan fermantasyonun 1. gününde laktik asit bakterileri gözlenmiştir. Asetik asit bakterisi ise fermantasyon süresince gözlenmemiştir.

3.4.7. Duyusal Analiz

Şarapların duyusal analizi 3 kişilik seçilmiş üyelerden oluşan bir jüri tarafından bazı uluslararası yarışmalarda uygulanan puanlama sistemine göre 20 puan üzerinden ve tercih yöntemine göre yapılmıştır. Duyusal analizlerden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5.' de verilmiştir.

Kırmızı şarap örnekleri arasında renk ve berraklık bakımından önemli bir fark bulunmamaktadır. Genel olarak şarap, kırmızı ve kızılılık rengindedir. Koku, tat ve genel izlenim bakımından ise 1 ve 2 numaralı şaraplar diğer şaraplara tercih edilmiştir. Kırmızı üzüm meyve aroması hakimdir.

Çizelge 3.5. Kırmızı şaraptaki duyusal analiz sonuçları.

Duyusal Kriterler	1	2	3	4	5
	Spontan	<i>S.cerevisiae</i> E7AR1	<i>T.delbrueckii</i> CH126	<i>T.delbrueckii</i> EX1180 + <i>S.cerevisiae</i> E7AR1	<i>T.delbrueckii</i> BP4412 + <i>S.cerevisiae</i> E7AR1
Renk (0-2)	1,80	1,95	1,87	1,85	1,92
Berraklık (0-2)	1,87	1,90	1,85	1,80	1,75
Koku (0-4)	2,90	3,45	3,00	2,90	3,00
Tat ve Genel İzlenim (0-12)	11,50	11,25	11,20	10,00	9,80
Toplam (0-20)	18,07	18,55	17,92	16,55	16,47



Şekil 3.33. Duyusal analiz aşamasında kırmızı şaraplar.

Beyaz şarap örneklerinde spontan fermantasyon ve saf maya kültürleri ile yapılan şaraplar (1, 2 ve 3), 4 ve 5' e berraklık ve renk açısından tercih edilmiştir. 5 numaralı şarapta bulanık bir görünüm vardır. Spontan fermantasyon ve saf kültürlerle yapılan şaraplar berrak altın rengindedir. Koku, tat ve genel izlenim bakımından en iyi sonuç 2 numaralı şarap denemesinde elde edilmiştir.

Çizelge 3.6. Beyaz şaraptaki duyusal analiz sonuçları.

Duyusal Kriterler	1	2	3	4	5
	Spontan	<i>S.cerevisiae</i> E7AR1	<i>T.delbrueckii</i> CH126	<i>T.delbrueckii</i> EX1180 + <i>S.cerevisiae</i> E7AR1	<i>T.delbrueckii</i> BP4412 + <i>S.cerevisiae</i> E7AR1
Renk (0-2)	1,70	1,90	1,80	1,85	1,92
Berraklık (0-2)	1,85	1,95	1,85	1,80	1,30
Koku (0-4)	2,90	3,45	3,00	2,90	2,80
Tat ve Genel İzlenim (0-12)	11,50	11,80	10,50	10,00	9,50
Toplam (0-20)	17,95	19,1	17,15	16,55	15,52



Şekil 3.34. Duyusal analiz aşamasında beyaz şaraplar.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Şarapta fermantasyon sırasında alkol oranının yükselmesi çoğu mikroorganizma için sınırlayıcı olmaktadır ve bozulmadan sorumlu organizmalar genel olarak bazı *Saccharomyces* suşları ile *Saccharomyces* olmayan mayalardır. Bozulma etkisi olarak depolanan şaraplarda film oluşumu, şişelenmiş şaraplarda bulanıklılık, çökelti ve gaz, üretim esnasında koku ve tat kayıpları sayılabilir. Bu etkilerden kurtulmak için şarap üretimine uygun saf kültürler kullanılmaktadır ya da spontan şarap yapımında iyi özellikli maya sayısının artırılması ile avantaj yaratılmaktadır (Loureiro ve Malfeito- Ferreira, 2003). Her iki durumda da eğer iyi şarap üreticisi maya suşu diğer mayaların gelişimi engelleyecek toksinler salgıyorsa, zararlı mayaları öldürürse, üretim için çok yararlı olacaktır. Bu nedenle katil suş geliştirme ve katil fenotipin ortaya çıkarılması önemlidir. Çalışmamızda öncelikli olarak çeşitli literatürde katil fenotip özellik gösterdiği belirlenen suşların hangisinin yayma maya olarak kullanılacağına ilişkin anlaşılması için test edilmiştir.

Şarap fermantasyonunda öldürücü mayaların tespiti için, kullanılacak olan yayma mayaları ile yapılan sonuçlar literatürde belirtildiği gibi *S. cerevisiae* fenotipleri ve özellikleri ile uyumludur (Bendova, 1986; Magliani ve diğ., 1997; Sertkaya, 2005; Yener, 2006). *S. cerevisiae* EX33 katil toksin üretmeyen duyarlı bir suşdur. *S. cerevisiae* F166 (K1) katil bir suş olup, *S. cerevisiae* EX73 (K2) ve *S. cerevisiae* F182 (K28) suşuna karşı duyarlıdır, bu suşlar tarafından salgılanan katil toksin *S. cerevisiae* F166 (K1) suşu için öldürücüdür. *S. cerevisiae* EX73 (K2) katil bir suş olup, *S. cerevisiae* F166 (K1) suşu ve *S. cerevisiae* F182 (K28) suşuna karşı duyarlıdır, bu suşlar tarafından salgılanan katil toksin *S. cerevisiae* EX73 (K2) suşu için öldürücüdür. *S. cerevisiae* F182 (K28) katil bir suşdur, *S. cerevisiae* F166 (K1) suşu ve *S. cerevisiae* EX73 (K2) suşuna karşı duyarlıdır ve bu suşlar tarafından salgılanan katil toksin *S. cerevisiae* F182 (K28) suşu için öldürücüdür. *S. cerevisiae* EX33 diğer mayalara karşı öldürücü etki göstermemiştir ve duyarlı bir suşdur. Bu nedenle önceden izole edilerek tanımlanmış olan ve şarap yapımında kullanılacak mayaların seçilmesinde yayma maya olarak kullanılmıştır.

S. cerevisiae EX33 suşu yayma maya olarak kullanıldığında; *T. delbrueckii* BP4412 suşunun katil özellik göstermediği, *S. cerevisiae* E7AR1, *S. cerevisiae* EX88, *S. cerevisiae* ROD23 ve *T. delbrueckii* EX1180, *T. delbrueckii* CH126 katil toksin ürettiği belirlenmiştir. *T. delbrueckii* BP4412 suşu ticari olarak sağlanan maya üreticisi bir suşdur. İlginç olarak şarap yapımında kullanılan çoğu ticari maya suşu üzümlerden değil uzun yıllardır kullanılan şarapHane ortamından ve ekipmanların üzerinden izole edilmektedir (Le Jeune ve diğ., 2006). Çalışmamızda kullanılan suşlar ise ticari olarak sağlanan *T. delbrueckii* BP4412 hariç, bağlardan üzümlerin üzerinden izole edilerek tanımlanmıştır. Şarap yapımında immobilize maya kullanımı da alternatif bir üretim şeklidir. Immobilize ve serbest aynı maya suşu ile yapılan şarap fermantasyonunda aroma, koku ve şarap kalitesi olarak duyu analizlerde hiçbir fark olmadığı belirtilmiştir. Çalışmamızda saf serbest mayalar ve spontan şarap üretimi yapılmıştır (Komaitisa ve diğ., 2003).

Öldürücü toksinler peptid yapısında bileşenlerdir. Sadece şarap üreticisi mayalar tarafından değil aynı zamanda şarapta bozulmaya neden olan *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* ve *Zygosaccharomyces* suşları tarafından da üretilmektedir (Marcos ve diğ., 2007; Susanne ve diğ., 2009). Bu nedenle katil toksin üretimi iyi şarap mayası seçiminde tek başına yeterli bir özellik değildir. Diğer özellikleri ile birlikte değerlendirilmelidir. *T. delbrueckii* BP4412 herhangi bir katil fenotip özellik göstermemesine rağmen şarap mayası olarak değerli bir suşdur.

Katil özellik gösteren maya kullanmak yerine toksik özellik gösteren peptidi izole ederek şarap üretiminde kullanmak alternatif bir yaklaşım olabilir. Yapılan çalışmalarda bu peptidler izole edilerek *S. cerevisiae*, *Z. bailii* ve *Z. bisporus* kültürlerinin gelişimine etkisi incelenmiştir. *S. cerevisiae*'nin en yüksek toleransı gösterdiği belirlenmiştir (Marcos ve diğ., 2007). Bu da özellikle spontan fermantasyonda *Saccharomyces* dışındaki mayaların gelişiminin engellenmesinde kullanılabileceği anlamına gelmektedir.

Katil özelliklerinin belirlenmesinin yanında şarap üretiminde kullanılacak olan mayaların büyüme eğrileri çıkarılarak ikilenme süreleri hesaplanmıştır. % 2 inokulum oranı ile YEPD sıvı besiyerinde yapılan büyüme eğrileri çalışmalarında *S. cerevisiae* E7AR1 suşunun ikilenme süresi 1,96 saat olarak hesaplanmıştır.

Bu suşun *Saccharomyces* suşları içinde en kısa ikilenme süresine sahip olduğu belirlenmiştir. Kısa ikilenme süresi hızlı alkol üretimi ve şarap fermantasyonu anlamına gelmektedir. Bu da şarap fermantasyonu için bu suşun tercih edilmesinin nedenlerinden biridir. Büyüme eğrilerinin çıkarılmasına yönelik % 2 inokulum ile YEPD sıvı besiyerinde yapılan çalışmada denenen tüm suşlarda yaklaşık 4 saatlik uyum fazı gözlenmiştir. Logaritmik büyüme fazı ise 35 - 45 saat sürmüştür.

% 10 inokulum oranı ile YEPD sıvı besiyerinde yapılan büyüme eğrileri çalışmalarında *S. cerevisiae* E7AR1 suşunun ikilenme süresi 11,27 saat olarak hesaplanmıştır ve *Saccharomyces* suşları içinde EX1160 suşundan sonra (8,57 saat) en kısa ikilenme süresine sahip olduğu belirlenmiştir. Büyüme eğrilerinin çıkarılmasına yönelik % 10 inokulum ile YEPD sıvı besiyerinde yapılan çalışmada denenen tüm suşlarda yaklaşık 4 saatlik uyum fazı gözlenmiştir. Logaritmik büyüme fazı ise 25 - 50 saat sürmüştür.

Yüksek inokulum oranının etkilerini belirlemek için optimum pH ve sıcaklık koşulları belirlenmelidir. Kumar ve diğ. 2009 tarafından yapılan çalışmada inokulum oranının etanol ve gliserol üretimine etkisi incelenmiştir. Gliserol, etanol ve CO₂'den sonra şarap fermantasyonunda en çok üretilen yan üründür. Tek olarak inokulum oranının arttırılmasının etanol verimini düşürdüğü belirlenmiştir. Etanol üretiminin düşmesi kullanılan *S. cerevisiae* suşunun yavaş üremesi, yani ikilenme süresinin artması ile açıklanmaktadır (Kumar ve Prakasam, 2009). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da yüksek inokulum oranında uzun ikilenme süreleri elde edilmiştir. Bu nedenle % 2 inokulum kullanılmıştır. Fermantasyonun optimizasyonu sıcaklık, pH değerleri ve inokulum oranlarının birlikte incelenmesi ile yapılmalıdır.

Üzüm şırası için belirtilen optimum pH değeri 3-3,8 aralığındadır (Zuzuarregui ve Olmo, 2004). Yapılan çalışmada, beyaz üzüm şırasında pH 3,46 iken kırmızı üzüm şırasında pH 3,5 olarak okunmuştur. Düşük pH' larda şıra ortamının kontamine olma riski minimum olup, mayalar bu pH değerinde fermantasyonu sürdürmüşlerdir

Melas ortamında % 2 inokulum oranı ile yapılan büyüme eğrileri çalışmalarında *S. cerevisiae* E7AR1 suşunun ikilenme süresi 3 saat olarak hesaplanmıştır en kısa ikilenme süresine sahip olduğu belirlenmiştir. Melas oldukça kompleks bir ortamdır.

Bu nedenle parçalanması daha zordur. İkilene zamanlarının artması normal olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 ve *Hanseniaspora guilliermondii* NCYC 2380 suşlarına ait büyüme eğrileri sentetik üzüm suyu ortamında çıkarılmıştır. 30 günlük inkübasyonda ölçümler günlük olarak yapılmıştır. Uyum fazı gözlenmemiştir. Uyum fazı ekim ile ölçüm alınan ilk nokta olan 1. gün arasında tamamlanmıştır. 4 günlük logaritmik büyüme fazından sonra, stasyoner faz yaklaşık 20 gün sürmüştür ve sonrasında ölüm fazına girmiştir (Perez-Nevado ve diğ., 2006). Bu çalışmayı şarap fermantasyonu ile karşılaştırmak sentetik üzüm suyunun substrat olarak şıraya daha yakın olması nedeni ile daha doğrudur.

Kırmızı ve beyaz şarap yapımında; *T. delbrueckii* EX1180+*S.cerevisiae* E7AR1 ile *T. delbrueckii* BP4412+*S. cerevisiae* E7AR1 ko-kültürleri ile yapılan çalışmalarda şarap üretimi saf kültürlerle göre daha uzun sürmüştür. Bunun nedeni olarak her iki üretimde de kullanılan *S. cerevisiae* E7AR1 suşun toksin üretimi olabilir. Benzer şekilde şarapta spontan fermantasyonda alkol oranının temel sınırlayıcı faktör olduğu genel olarak kabul edilmesine rağmen, yapılan çalışmalarda fermantasyon süresince ortamda bulunan mayaların çeşitliliğindeki azalmanın alkolden değil, ortamdaki bazı mayaların sentezlediği peptid yapısındaki öldürücü toksinlerden kaynaklandığı belirlenmiştir. *Hanseniaspora guilliermondii* ve *Saccharomyces cerevisiae* ko-kültüründe her iki mayanın üreme durumları incelenmiş ve zamanla *Hanseniaspora guilliermondii*'nin baskılandığı gözlenmiştir. Alkol oranının mayanın gelişimini engeleyecek seviyede olmadığı etken faktörün *S. cerevisiae* tarafından üretilen peptidler olduğu belirlenmiştir (Perez-Nevado, 2007).

Spontan şarap fermantasyonunda başlangıçta *S. cerevisiae* sayıları tipik olarak azdır, apikulat mayalar baskındır fakat zamanla durum tersine dönmektedir. Catania ve diğ. (2005)' ya göre bu durum artan alkol miktarı ile ilgilidir. Çalışmamızda spontan fermantasyondaki maya değişimi mikroskopik olarak incelenmiştir ve fermantasyonun ilerlemesi ile apikulat maya oranının azaldığı gözlenmiştir.

Spesifik yoğunluk tayini şarapın sonlandırılma zamanının belirlenmesinde kullanılan parametrelerden biridir. Genellikle 990 g/L değerine ulaşması beklenir bazı çalışmalarda 1000 g/L'nin altına düşmesi yeterlidir. Spesifik yoğunluktaki düşüş maya suşlarına bağlı olarak değişmekle beraber kullanılan üzüm çeşidine göre de değişmektedir. Diğer bir deyişle fermantasyonun tamamlanması kullanılan maya suşu kadar üzüm çeşidine de bağlıdır.

Torrensa ve diğ. (2008) tarafından yapılan çalışmada, yoğunluk değerinin kullanılan üzüme bağlı olarak, 10-14 günde ticari maya suşları ile istenilen seviyeye düştüğü belirlenmiştir. Çalışmamızda kırmızı üzüm sırasında, beyaz üzüm sırasında göre daha kısa sürede spesifik yoğunluk değişimi gözlenmiştir. Kırmızı şarap fermantasyonunda *S. cerevisiae* E7AR1 en kısa sürede (6 günde) istenilen değere ulaşmıştır. *T. delbrueckii* EX1180+*S.cerevisiae* E7AR1 ko-kültürü ile yapılan fermantasyonda ise 29 gün sonunda arzu edilen değere ulaşamamıştır. Beyaz şarap fermantasyonunda *S. cerevisiae* E7AR1 (6 günde) istenilen değere ulaşmıştır. Beyaz şarap fermantasyonunda *T. delbrueckii* CH126 suşu da oldukça başarılı sonuç vermiştir 6 gün sonunda fermantasyon tamamlanmıştır. *T. delbrueckii* BP4412+*S.cerevisiae* E7AR1 ko-kültürü ile yapılan fermantasyonda ise 14 gün sonunda arzu edilen değere ulaşılmıştır. Şarap yapımında *S. cerevisiae* E7AR1 suşunun pek çok çalışmada kullanılan ticari maya suşundan daha hızlı fermantasyonu tamamladığı görülmektedir.

Şaraplarda istenmeyen mikroorganizmaların büyümesinin engellenmesinde kimyasal madde olarak özellikle kükürt dioksit (SO₂) kullanılmaktadır. Fakat sağlık riskleri ve mümkün oldukça doğal ve katkı maddesi içermeyen ürün kullanımına yönelik eğilim, koruyucu kullanımında artan kısıtlamalar nedeni ile dünya genelinde SO₂ kullanımı azaltılmaya çalışılmaktadır (Marcos ve diğ., 2007). Çalışmamızda koruyucu olarak Avrupa Birliği ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından güvenli olarak sınıflandırılan dimetilkarbonat kullanılmıştır.

Beyaz şaraplarda bulanıklık karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. Kolloidal stabilite ve beyaz şarabın berraklığında proteinler çok az konsantrasyonlarda bulunsalar bile anahtar rol oynarlar. Şarapta proteinler genellikle üzümlerden ve otolize olmuş mayalardan kaynaklanır. Şarapın instabilitesi protein dışındaki pH, etanol miktarı, polisakkarit, polifenol, flavonol, sülfat ve metal iyonları gibi faktörlere de bağlıdır. Bulanıklılık gideriminde bentonit dünya genelinde kullanılmaktadır.

En önemli sınırlandırıcı faktör ise proteinlere spesifik olmamasıdır, şarapta negatif yüklüdür ve pozitif yüklü bileşenleri tutarak çökmesini ve berraklaşmayı sağlar. Bu esnada diğer pozitif yüklü bileşikler de yakalayabilir. Bu durum berraklaşma sağlasa da tat ve kokuda azalmaya ve şarabın kalitesinin düşmesine neden olabilir bu nedenle çalışmamızda kullanımı tercih edilmemiştir (Milena ve diğ., 2012).

Çalışmamızda hem kırmızı hem de beyaz şarapta yapılan duyu analizlerde berraklık puanlamasında en düşük puanı *T. delbrueckii* BP4412 + *S. cerevisiae* E7AR1 ko-kültürü ile üretilen şarap almıştır. Başlangıçta her iki mayanın da üremeye başladığı fakat üremenin artması ve logaritmik fazın ilerlemesi ile *S. cerevisiae* E7AR1 suşunun toksik peptidleri ürettiği ve fermantasyon ortamına salgıladığı sonuçta *T. delbrueckii* BP4412 hücrelerinin lizise uğradığı ve bunun da bulanıklığı arttırdığı düşünülmektedir.

T. delbrueckii suşları şarap üretimi gibi yüksek şeker içeren üretimlerde *S. cerevisiae* suşlarından daha düşük oranda asetik asit üretmektedir. *S. cerevisiae* ile yapılan fermantasyonlarda asetik asit miktarında zaman zaman yasal sınırların aşıldığı görülmektedir. Bu nedenle son yıllarda *T. delbrueckii* ile şarap fermantasyonunun yapılması yönünde artan bir eğilim vardır (Masneuf-Pomarede ve diğ., 2008). Çalışmamızda elde edilen şaraplarda duyu olarak asitlik tat ve kokusu alınmamıştır. pH değerleri beklenen sınırlar içindedir.

Şarap yapımında ve satışında en önemli parametre müşteri memnuniyetidir. Tat ve koku kullanılan üzüm çeşidine, şarap yapımı ve olgunlaştırma sürecine bağlı olarak değişmektedir. Spontan fermantasyonda standardize edilemeyen ürün elde etme riskine karşı saf kültürlerin ve özellikle ko-kültürlerin kullanımı önem kazanmaktadır. Yapılan çalışmada 3 farklı *Saccharomyces cerevisiae* suşu ile saf olarak ve ko-kültür ile şarap üretimi gerçekleştirilmiştir ve duyu analizler yapılmıştır. Üç suşun kullanıldığı üretim duyu analizlerde yüksek ester bileşiklerine, çiçeksi aromaya ve uçucu tiollere sahip olması nedeni ile en düşük puanı almıştır (Francis ve diğ., 2010). Tat ve aromanın oluşumunda sıcaklığında etkisi olduğu belirlenmiştir (Torrensa ve diğ., 2008; Molina ve diğ., 2009). Yaptığımız çalışmada da benzer şekilde ko-kültür fermantasyon ürünleri en düşük puanı almıştır. Burada ilginç olan her iki üretimde de spontan fermantasyon ürününün daha yüksek puan almış olmasıdır. Çalışmamızda sıcaklığın aroma ve tat üzerine etkisine bakılmamıştır.

Şarap fermantasyonu sonunda kalan tortu, şaraptan çeşitli toksinlerin özellikle okratoksin A, pestisitler ve istenmeyen diğer bileşenlerin uzaklaştırılmasında önemlidir. Pek çok bilim adamı şarapta üzümle kıyaslandığında düşük miktarda okratoksin A bulunmasını tortu ile uzaklaştırılmasına bağlamaktadır. Bununla beraber tortu ve şarap arasındaki temas tat ve aromanın oluşumunda önemlidir. Bu nedenle çoğu fermantasyonda kalan son tortu son ambalajlamaya kadar uzaklaştırılmamaktadır (Chassagne, 2005; Perez-Serradilla ve diğ., 2008). Çalışmamızda bu nedenle duyu analizi öncesinde dipte kalan tortu uzaklaştırılmamıştır.

Geleneksel olarak spontan fermantasyonda duyu olarak yüksek kaliteli ürün elde edilmesi son yıllarda fermantasyon ortamındaki *Saccharomyces* dışındaki mayaların ürettiği tat ve koku bileşikleri ile açıklanmaktadır. Bu mayaların çoğu yüksek alkol konsantrasyonuna dayanmamaktadır. Bunların arasında *T. delbrueckii* suşları dikkat çekmektedir (Zott ve diğ., 2011).

Bulanıklık dışında özellikle beyaz şaraplarda kahverengileşme de önemli bir problemdir ve depolama süresince ortaya çıkarak pazarlama şansını azaltmaktadır. Bu problem genel olarak üretilen fenolik bileşiklere bağlıdır (Lopez-Toledano ve diğ., 2006). Çalışmamızda depo koşullarının ve süresinin etkisine yönelik deneme yapılmamıştır.

Sonuç olarak, şarap fermantasyon hızı ve duyu analizi sonuçları incelendiğinde en yüksek verimin *S. cerevisiae* E7AR1 suşundan elde edildiği görülmektedir. Bu suş kullanılarak yapılacak optimizasyon çalışmalarını takiben, depo koşullarının ve süresinin etkisi ile üretilen toksinin kimyasal yapısının belirlenmesi, suşun ticarileştirilmesinde yararlı olacaktır ve daha sonraki çalışmalar için önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aktan, N. ve Kalkan, H., 2000. *Şarap Teknolojisi*. Kavaklıdere Eğitim Yayınları, 4, s. 613.
- Altuntaş, G. Ve Özçelik, E. F., 2007. Killer Özellikli Mayaların Etki Mekanizmaları ve Endüstride Yol Açtıkları Sorunlar. *Gıda*, 32, 4, s. 205-212.
- Anonymous, 1979. III. Enquete sur les propositions de M. Radler concernant les levures seches actives. *Bull. O.I.V.* 52, No. 582, p.706-709.
- Anlı, E., 2005. *Ansiklopedik Şarap Sözlüğü*. (Türkçe, İngilizce, Fransızca). Kavaklıdere Eğitim Yayınları, Ankara. s. 260.
- Ateş K., 2007. Melastan etil alkol eldesi ve biyodizel üretiminde kullanımı (Yüksek Lisans Tezi). Selçuk Üniversitesi, Konya. s. 4-5.
- Atlas, R.M., Parks, L.C., Brown, A.E., 1995. Laboratory Manual of Experimental Microbiology, Mosby-Year Book, St. Louis, Missouri, ISBN: 0-8151-0324-7, p. 565
- Bendova, O., 1986. The killer phenomenon in yeasts. *Folia Microbiol.*, 31, p. 422-433.
- Berry, D.R., 1995. Alcoholic Beverage Fermentations, Fermented Beverage Production, eds. A.G.H., Lea, J.R., Pigott, Blackie London, p. 32-61.
- Breinig, F., Tipper, D.J. and Schmitt, M.J. 2002. Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell* 108, p. 395-405.
- Bostancı, R., 2004. *Şarap Hakkında Her Şey*. Kavaklıdere Eğitim Yayınları. Ankara. s. 299.
- Bostian, K.A., Hopper, J.E., Rogers, D.T., Tipper, D., 1980. Translational analysis of the killer-associated virus-like particle ds RNA genome of *Saccharomyces cerevisiae*: M-dsRNA encodes toxin. *Cell*, 19, p. 403-414.
- Bussey, H. *et al.*, 1990. Genetic and molecular approaches to syntesis and action of the yeast killer toxin. *Experientia*, 46, p. 193-200.
- Catania, C., Gangac A. and Martinez C., 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza. *International Journal of Food Microbiology*, 99, p. 237- 243.
- Ciani, M. and Maccarelli, F., 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine- making. *World J. Microbiol. Biotech.*, 14, p. 199-203.
- Ciani, M. and Maccarelli, F., 2004. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and chracterization. *Microbiol.* 150, p. 2535-2541.
- Ciani, M., Beco, L. and Comitini, F., 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, 108, p. 239-245.
- Chassagne, D., 2005. Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chemistry* 91, p. 39-44.

- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Heras-Vázquez, F.J.L., Rodríguez-Vico, F., 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microb.*, 21, p. 149-155.
- Çelik, H., 2006. Üzüm Çeşit Kataloğu. *Sunfidan A.S. Meslek Kitapları Serisi 3 Ankara. s.165.*
- Da Silva, G.A., 1996. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italico grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. *Appl.Microbiol. Biotechnol.*, 46, p. 112–121.
- Da Silva, S., Calado, S., Lucas, C. and Aguiar, C., 2008. Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* Killer toxin, CnKT. *Microbiological Research* 163 (2): 243
- Delfini, C. and Formica, J.V., 2001. *Wine Microbiology Science and Technology*, Marcel Dekker, Inc., Italy. p. 490,
- Dequin, S., 2001. The Potential of Genetic Engineering for Improving Brewing, Wine-Making and Baking Yeasts. *Appl.Microbiol.*, 33, p. 112-117.
- Doğer, E., 2004. *Antik Çağda Bağ ve Şarap*. İletişim Yayınları, Çağaloğlu 34122, İstanbul, s. 198.
- Egli, C.M., Edinger, W.D., Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J.Appl. Microbiol.*, 85, p. 779-789.
- Ergül, Ş. Ş., Özbaş, Y., 2009. Şarap Fermantasyonlarında Endojen Çoklu Starter Kültürlerin Kullanılma Olanakları, *GIDA* 34 (3): s. 183-19.1
- Esteve-Zarzoso. B., Gostinçar, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A., 2000. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from “El Penedes” area (Spain). *Food Microb.*, 17, p. 553-562.
- Ewart, A., 1997. White Wines, Fermented Beverage Production. A.G.H., Lea, J.R. Piggots (eds), *Great Britain*, p. 97-119.
- Farkas, J., 1998. *Technology and Biochemistry of Wine,vol:1*, Gordon and Breach, New York, p. 258-279.
- Fleet, G., and Heard, G.M., 1993. Yeasts Growth During Fermentation, In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. G.M., Fleet, *Harwood Academic Press.Chur.*, Switzerland, p. 27-54.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M., 2002. Yeasts-Growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, GH Fleet (eds), p. 27-54, Taylor&Francis Inc, London.
- Francis, L., Ellena, S. King., Robyn, L. Kievit., 2010. The effect of multiple yeasts co-inoculations on Sauvignon Blanc wine aroma composition, sensory properties and consumer preference. *Food Chemistry*, 122, p. 618–626.
- Garcia, A., Dalau, L., Samson, A., Aguera E., Agosin, E., Gunata, Z., 2000. Influence of a mixed culture of *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 220 p.
- Gençosman, A., 2006. Bal Şarabı Üretimi İçin Maya Seçimi Ve Fermantasyon Koşullarının Optimizasyonu (Yüksek Mühendislik Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Ankara, s. 77.
- Goto, K., Iwase, Y., Kichise, K., Kitano, K., Totuka, A., Obata, T. and Hara, S., 1990. Isolation and properties of a chromosome-dependent KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.*, 54, p. 505–509.

- Magliani, W., Conti Stefania, Gerloni M., 1997. Yeast Killer Systems. *Clinical Microbiology Reviews* 10 (3), p. 369–400.
- Manfred J., Breinig F., 2002. The viral killer system in yeast from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews* 26, p. 257-276.
- Marcos Jose, F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés S., Manzanares, P., 2007. Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 118, p. 318–325
- Marquina, D., Santos A., Peinado J.M., 2002. Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol* 5, p. 65–71.
- Masneuf-Pomarède, I., Bely, M., Stoeckle, P., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122, p. 312–320.
- Mateo, J.J., Jimenez, M., Huerta, T., Pastor, A., 1991. Contribution of Different Yeasts Isolated From Musts of Monastrel Grapes to the Aroma of Wine. *Int. J. Food Microbiology*, 14, p. 153-160.
- Meinhardt, F., Klassen, R., 2007. Microbial Linear Plasmids. *Microbiology Monographs* 7. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Milena, L., Dordoni, R., Giribaldi M., Violetta, M., 2012. Heat-unstable protein removal by different bentonite labels in white wines. *Food Science and Technology*, Accepted.
- Mohamudha, R. and Ayesha Begum J., 2010. Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* on sensitive yeast and fungal pathogens, p.127-129.
- Molina, Ana M., Guadalupe, V., Varela C., Swiegers, Jan H., 2009. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. *Food Chemistry*, 117, p. 189–195.
- Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Boulompasi, E., Tzanetakis, N., 2006. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oneological characteristics and vinification results. *Food Microbiol.*, 23, p. 205-211.
- Onat I., 2007. Şaraplık üzüm çeşitlerinde kaliteli şarap üretimine en uygun şıra oranının belirlenmesi (Yüksek lisans tezi). Trakya Üniversitesi, Tekirdağ, s. 5-6.
- Özçelik, F., Türkmen, U. ve Ateş, S., 1996. Farklı bölgelerden izole edilen şarap mayalarının killer özelliklerinin belirlenmesi. *Tr. J. of Biology*, 20, p. 241-249.
- Özçelik, F. ve Denli, Y., 1999. Şarap mayalarının teknolojik özellikleri. *Gıda*, 24(6), p. 385-389.
- Özçelik, F. Ve Altuntaş, E., 2007. Killer Özellikli Mayaların Etki Mekanizmaları Ve Endüstride Yol Açtıkları Sorunlar
- Paluszynski, John P., Klassen, R., Meinhardt, F., 2007. *Appl Environ Microbiol.* 73(13) p. 4373–4378.
- Pamir, M.H., 1978. *Teknik ve Endüstriyel Mikrobiyoloji*. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, 681, A.Ü. Basımevi, Ankara.
- Pamir, H., 1985. Fermantasyon Mikrobiyolojisi, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, s. 264-265.

- Magliani, W., Conti Stefania, Gerloni M., 1997. Yeast Killer Systems. *Clinical Microbiology Reviews* 10 (3), p. 369–400.
- Manfred, J., Breinig F., 2002. The viral killer system in yeast from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews* 26, p. 257-276.
- Marcos Jose, F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés S., Manzanares, P., 2007. Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 118, p. 318–325
- Marquina, D., Santos A., Peinado J.M., 2002. Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol* 5, p. 65–71.
- Masneuf-Pomarède, I., Bely, M., Stoeckle, P., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122, p. 312–320.
- Mateo, J.J., Jimenez, M., Huerta, T., Pastor, A., 1991. Contribution of Different Yeasts Isolated From Musts of Monastrel Grapes to the Aroma of Wine. *Int. J. Food Microbiology*, 14, p. 153-160.
- Meinhardt, F., Klassen, R., 2007. Microbial Linear Plasmids. *Microbiology Monographs* 7. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Milena, L., Dordoni, R., Giribaldi M., Violetta, M., 2012. Heat-unstable protein removal by different bentonite labels in white wines. *Food Science and Technology*, Accepted.
- Mohamudha, R. and Ayesha Begum J., 2010. Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* on sensitive yeast and fungal pathogens, p.127-129.
- Molina, Ana M., Guadalupe, V., Varela C., Swiegers, Jan H., 2009. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. *Food Chemistry*, 117, p. 189–195.
- Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Boulompasi, E., Tzanetakis, N., 2006. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oneological characteristics and vinification results. *Food Microbiol.*, 23, p. 205-211.
- Onat, I., 2007. Şaraplık üzüm çeşitlerinde kaliteli şarap üretimine en uygun şıra oranının belirlenmesi (Yüksek lisans tezi). Trakya Üniversitesi, Tekirdağ, s. 5-6.
- Özçelik, F., Türkmen, U. ve Ateş, S., 1996. Farklı bölgelerden izole edilen şarap mayalarının killer özelliklerinin belirlenmesi. *Tr. J. of Biology*, 20, p. 241-249.
- Özçelik, F. ve Denli, Y., 1999. Şarap mayalarının teknolojik özellikleri. *Gıda*, 24(6), p. 385-389.
- Özçelik, F. Ve Altuntaş, E., 2007. Killer Özellikli Mayaların Etki Mekanizmaları Ve Endüstride Yol Açtıkları Sorunlar
- Paluszynski, John P., Klassen, R., Meinhardt, F., 2007. *Appl Environ Microbiol.* 73(13) p. 4373–4378.
- Pamir, M.H., 1978. *Teknik ve Endüstriyel Mikrobiyoloji*. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, 681, A.Ü. Basımevi, Ankara.
- Pamir, H., 1985. Fermantasyon Mikrobiyolojisi, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, s. 264-265.
- Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., Girio, F., 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 108, p. 336–345.

- Pérez-Serradilla, J.A., Luque de Castro, M.D., 2008. Role of lees in wine production: *Food Chemistry* 111, p. 447–456.
- Pommier, P., Strehaiano, P., and Delia, M.L., 2005. Modelling the growth dynamics of interacting mixed cultures: a case of amensalism. *Inter. J. of Food Microbiol.*, 100, p. 131-139.
- Pursley, S.D., 1999. The Making of Mead, U.S.A., p. 28-39.
- Radler, F., 1980. Les Facteurs, Killer des levures. *Bull. O.I.V.* 53, No. 593-594.568-572.
- Rainieri, S., Pretorius, I.S., 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.* 50, p. 15-31.
- Ramírez, M., Pérez, F., Regodón, J.A., 1998. A simple and reliable method for hybridization of homothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, p. 5039–5041.
- Regodon, J.A., Perez, F., Valdes, M.E., De Miguel, C., Ramirez, M., 1997. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microb.* 14, p. 247-254.
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., and Ramirez, M., 2011. A New Wine *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin (Klus), Encoded by a Double-Stranded RNA Virus, with Broad Antifungal Activity Is Evolutionarily Related to a Chromosomal Host Gene, *Appl Environ Microbiol.* 77(5), p. 1822–1832.
- Rodríguez-Porrata B., Novo M., Guillamón J., Rozès N., Mas A., Otero RC., 2008. Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 126, p. 116-122.
- Rosini, G., 1983. The occurrence of killer characters in yeasts. *Can. J. Microbiol.* 29, p. 1462-1464.
- Russel, I., 1986. Killer yeast identification. *ASBC Journal* 44(3), p. 123-125.
- Santos, A., Navascués E, Bravo E, Marquina D., 2011. *Ustilago maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology* 145, p. 147–154.
- Scanes, K.T., Hohmann, S., Prior, B.A., 1998. Glycerol Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Its Relevance to Wine. A review, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 19 (1), p. 17-24.
- Schickel, J., Helmig, C., Meinhardt, F., 1996, *Kluyveromyces lactis* killer system: analysis of cytoplasmic promoters of the linear plasmid. *Nucleic Acids Research* 24(10), p. 1879–1886.
- Schmitt, M.J. *et al.*, 1996. Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiolog* 142, p. 2655-2662.
- Schmitt, M. J., and Breinig, F., 2002. The viral killer system in yeast from molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev.* 748(1), p. 20.
- Schmitt, M. J., and Breinig, F., 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, p. 212-221.
- Şenses Ergül, Ş. ve Özbaş, Z., 2009. Şarap Fermentasyonlarında Endojen Çoklu Starter Kültürlerin Kullanılma Olanakları, *Gıda* 34(3), s.183-191.
- Sertkaya, A., 2005. Investigation of cytotoxic effect of K5 type yeast killer protein on sensitive microbial cells (The Degree of Master of Science). Middle East Technical University, Ankara. 87s.
- Sesti, F., Shih, T.M., Nikolaeva, N. and Goldstein, S.A.N., 2001. Immunity to K1 killer toxin: internal TOK1 blockade. *Cell* 105, p. 637-644.

- Shimizu, K., 1993. Killer yeast. In: Fleet G.H. (Ed.) *Wine Microbiology and Biotechnology* p. 243–263. Harwood Academic Publishers, Newark, NJ.
- Soares, G.A.M. and Sato, H.H., 1999. Killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L active against Fleischman and Itaiquara commercial brands of yeast. *Rev. Microbiol.*, 30(3), Sao Paulo July/Sept.
- Soden, A., Francis, I.L., Oakey, H., Henschke, P.A., 2000. The effect of cofermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 6: (In press).
- Stark, M. J. R., Boyd, A., Mileham, A. J., Romanos, M. A., 1990. The plasmid encoded killer system of *Kluyveromyces*. *A review, Yeast*, 6, p. 1-29.
- Stefanie, J., Tiggemann M., Meinhardt F., 2006. Yeast autonomous linear plasmid pGKL2: ORF9 is an actively transcribed essential gene with multiple transcription start points. *FEMS Microbiol. Lett.*, 255, p. 321–327.
- Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., Van Rensburg, P., 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by *non-Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.*, 91, p. 182-190.
- Susanne, L., Umiker L., N., Arneborg, N., 2009. Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa* and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. *Charles G. Edwards Food Microbiology* 26, p. 915–921.
- Suzuki, C. *et al.*, 1999. P-Type ATPase *spf1* mutants show a novel resistance mechanism for the killer toxin SMKT. *Molecular Microbiology*, 32(34), p. 813-823.
- Tredoux, H.G., Tracey, R.P. and Tromp, A., 1986. Killer factor in wine yeasts and its effects on fermentation. *S. Afr. J. Enol Vitic.*, 7(2), p. 105-112.
- Tsutomu, F., Esteban, R., 2010. Yeast Double-stranded RNA Virus L-A Deliberately Synthesizes RNA Transcripts with 5'-Diphosphate *J. Biol. Chem.* 23; 285(30), p. 22911–22918.
- Torrens, J., Urpía, P., Vichib, S., López-Tamames, E., 2008. Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine, *International Journal of Food Microbiology* 124, p. 48–57.
- Türkmen, U., 1993. Farklı bölgelerden izole edilen şarap mayalarının killer özelliklerinin belirlenmesi. *Ank. Üniv. Gıda Bil. ve Tek. Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi*, s. 37.
- Türkiye 9. Gıda Kongresi. 24-26 Mayıs 2006. Çanakkale Onsekiz Mart Üniv., Müh-Mim. Fak., Gıda Müh. Böl., Çanakkale.
- Van Vuuren, H.J.J. and Wingfield, B.D., 1986. Killer yeast-cause of stuck fermentation in a wine cellar. *S. Afr. J. Enol Vitic.*, 7(2), p.113-118.
- Viljoen, B.J., Heard, G.M., 2000. *Saccharomyces cerevisiae*, Encyclopedia of Food Microbiology. R.K. Robinson, C.A., Batt, P.D. Patel (Eds), *Great Britain*, p. 1918-1914.
- Vondrejs, V., Janderova, B., Valasek, L., 1996. Yeast zymosin K1 and its explanation in genetic manipulations. *Folia Microbiol.*, 41, p. 5-9.
- Yabe, T. *et al.*, 1996. HKR1 encodes a cell surface protein that regulates both cell wall beta-glucan synthesis and budding pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 178(2), p. 477-483.

- Yavaş, İ., Anlı, R. E., 1996. şırada saf kültür sıvı ve kuru maya kullanımının şarap bukesi ve bileşimi üzerine etkisi.
- Yavuzeser, A., 1986. şarap Teknolojisinde Kullanılan Araç ve Gereçler. *Türkiye şarap Yarişması*, rgp, s. 96.
- Yener, B., 2006. Determination of antimicrobial spectrum of K9 type yeast killer toxin and its cell killing activity, The degree of master, The Middle East Technical University, Ankara, s. 7-8.
- Young, T.W., 1987. Killer yeasts. In: Rose A.H., Harrison JS (Eds) *The Yeasts*, vol. 2 (pp 131–164). Academic Press, London.
- Zagorc, T., Maraz, A., Cadez, N., Povhe Jemec, K., Peter, G., Resnik, M., Nemanic, J. and Raspor, P., 2001. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiol.*, 18, p. 441-451.
- Zott, K., Thibon, C., Bely M., Masneuf-Pomarede, I., 2011. The grape must non-Saccharomyces microbial community: Impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology* 151, p. 210–215.
- Zuzuarregui, A., Olmo, M., 2004. Expression of Stress Response Genes in Wine Strains with Different Fermentative Behavior. *FEMS Yeast Research*, 4, p. 699-710.
- Wen-Bao, C., Yuh-Feng, H., Shung-Chang, J. Ve Shenq-Chyi C., 2000. Isolation, Purification and Characterization of a Killer Protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *App. And Env. Mic.*, Dec.2000, p.5348-5352.
- Wickner, R.B., 1979. The killer dsRNA plasmids of yeast. *Plasmid*, 2, p. 303-3229.
- Wickner, R.B., 1996. Double-stranded RNA Viruses of *S.cerevisiae*. *Microbiol.Rew.*, 60(1), p. 250-265.

EK 1

KİMYASALLAR

Maya ekstraktı
Bakto-pepton
Bakto-agar
Bakto-glikoz
Sitrik asit
Metilen mavisi
Potasyum asetat
Hidrojen klorür
Sodyum klorür
Etanol
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)
MRS-agar
GYC-agar
Fermantasyon aktivitörü
Siklohesimid
Tomato Juice agar
Sodyum Dodesil Sülfat
Dimetilkarbonat (Velcorin)

SATICILARI

Cultimed, İspanya
Cultimed, İspanya
Cultimed, İspanya
Panreac, İspanya
Panreac, İspanya
Panreac, İspanya
Panreac, İspanya
Panreac, İspanya
Panreac, İspanya
Panreac, İspanya
Scharlau, İspanya
Scharlau, İspanya
Agrovin S.A., İspanya
Sigma, Almanya
Oxoid, İngiltere
Prolabo, İspanya
Lanxess, Almanya

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Ahsen AFYONCU

Doğum Yeri ve Yılı: Ankara, 1988

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce, İspanyolca



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Saime Salih Konca Lisesi, 2005

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi, 2009

Yüksek Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Antalya Anadolulab, Ana Mikrobiyoloji, Gıda ve Çevre Laboratuvar Hizmetleri, 2011.

Yurt Dışı Deneyim ve Yıl: İspanya Extramadura Üniversitesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, 2010-2011. (Öğrenci Değişim Programı)