

**Türkiye’de Önemli Yerel Şarap Üretim Bölgelerine Özel Üzüm
Çeşitleri Şıralarında ve Doğal Olarak Fermente Edilmiş
Şaraplarında *Saccharomyces* Haricinde Kalan (non-
Saccharomyces) ve *Saccharomyces* Mayaların Çeşitliliği:
Tespit, Miktar Belirleme, Tanı, Teknolojik ve Moleküler
Karakterizasyon, Multi-Starter Kültür ve Şarap Üretimi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 116O521

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. G. Candan Gürakan Gültekin

Araştırmacı(lar):

Dr. Öğretim Üyesi. Asya Çetinkaya

Bursiyer(ler):

İpek Aktuna

Elnaz Seyed Monir

Gizem Pınar Arslan

Nasim Allahyari

MAYIS 2020

ANKARA

Kısaltmalar

ITS: Ara transkripsiyon bölgesi (Internal transcribed spacer)

ITS bölgesi: ITS1-5.8 r-RNA-ITS2

D1/D2 bölgesi: 26 S r-DNA D1/D2 domain

S: *Saccharomyces*

SC: *Saccharomyces cerevisiae*

NS: Non-*Saccharomyces*

RE: Kısıtlama enzim, kesici enzim, restriksiyon enzimi

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

qPZR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

RT-PZR: Gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu

YPG: Maya ekstraktı pepton glikoz (Yeast extract peptone glucose)

ESA: Etanol sülfat agar

CM: Soğuk maserasyon

NM: Maserasyon

PFGE: Darbeli alan jel elektroforezi

RFLP: Kesim parçası uzunluk polimorfizmi (çeşitliliği)

RAPD: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (randomly amplified polymorphic DNA)

GC-FID: Gaz kromatografisi-alev iyonlaşma dedektörü

GC-MS: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi

LRI: Lineer alıkonma indeksi

OAV: Koku aktivite değeri

ÖNSÖZ

Son yıllarda, şarap yapımı sırasında kendiliğinden gelişen suşların yerel şarap mayşesine daha kolay uyum sağlama potansiyeline sahip olmaları, şaraba tipik koku (flavor), aroma vermeleri ve belirli bölgenin biyoçeşitliliğini yansıtmaları gerekçeleriyle bölgeye özel starter kültür izolasyonu, geliştirilmesi ve şarap yapımında kullanımları tercih edilmektedir.

Proje kapsamında, Türkiye'nin seçtiğimiz yerel üzümlerinden (Kalecik Karası, Öküzgözü, Boğazkere, Dimrit, Emir) starter kültür veya multi-starter kültür üretiminde sanayinin kullanabileceği, endojen fermentative *Saccharomyces cerevisiae* ve non-*Saccharomyces* maya kültürleri elde edilmiş; suşların izolasyonları, gruplandırılarak tanısı, biyoçeşitliliğin ortaya konması, fenonotipik ve genotipik karakterizasyonları gibi çalışmalar tamamlanmış; seçilmiş kültürlerin şarap yapımındaki etkileri belirlenip, ticari kültür mayaları ile kıyaslanabilmiştir.

Dileğimiz kültür koleksiyonumuzdaki izole ve karakterize ettiğimiz ülkemize özgü mayaların endüstride yerini bulması, şarap üretiminde kullanılabilmesi ve projemiz sonunda elde ettiğimiz sonuçların ulusal ve uluslararası literatüre katkıda bulunmasıdır.

TOVAG 116O521 no'lu projemizin gerçekleşmesi ve tamamlanabilmesi, Türkiye Bilimsel Teknolojik Araştırma Kurumu'nun sağladığı destek ile mümkün olabilmiştir, teşekkür ederiz. Ayrıca deneylerimizin son aşamasında, ürettiğimiz kültürler ile şarap yapımında ve analizlerinde destek olan Kavaklıdere Şarapları A.Ş.'ne ve aroma bileşenleri analizlerinin tamamlanmasını sağlayan Prof. Dr. Serkan Selli'ye teşekkür ederiz.

ÖNSÖZ	I
TABLO LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1. Türkiye’de Üzüm Çeşitleri ve Maya Çeşitliliği.....	2
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve non- <i>Saccharomyces</i> Mayalar.....	3
2.3. Non- <i>Saccharomyces</i> Mayalar ve Aroma Bileşenleri	5
2.3.1. <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	6
2.3.2. <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	6
2.3.3. <i>Hanseniaspora uvarum</i>	6
2.3.4. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	6
2.3.5. <i>Wickerhamomyces anomalus</i> (<i>Pichia anomala</i>)	6
2.3.6. <i>Metschnikowia</i> spp.....	7
2.3.7. <i>Lachancea thermotolerans</i> (<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>)	7
2.3.8. <i>Starmerella bacillaris</i> (<i>Candida zemplinina</i>)	7
2.3.9. <i>Williopsis saturnus</i>	7
2.3.10. <i>Torulaspora delbrueckii</i>	8
2.4. Mayaların Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması	9
2.4.1. Sekanslama	9
2.4.2. ITS-RFLP	10
2.4.3. D1/D2-RFLP	11
2.5. Moleküler Tipleme (Genotip Belirleme).....	11
2.5.1. Mitokondriyal DNA Kesim Analizi (Mitokondriyal DNA-RFLP)	12
2.5.2. Karyotipleme	12
2.5.3. RAPD-PZR	13
2.6. Maya Şarap Kültürlerinin Endüstriyel Kullanım İçin Hazırlanması	14
2.7. Enolojik Testler	15
2.8. Aroma Bileşenleri	15
2.9. Duyusal Analizler	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Gereç	16

3.1.1. Üzümlerin Kaynağı ve Üretim.....	16
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Geleneksel (Spontane) Şarap Yapımı.....	16
3.2.1.1. Üzümlerin Saplarından Ayrılması ve Patlatılması	16
3.2.1.2. Maserasyon Aşaması	16
3.2.1.3. Maya Aşılması, Fermantasyon Aşaması ve Sıkılarak Posanın Uzaklaştırılması.....	17
3.2.1.4. Filtrasyon ve Şişeleme.....	18
3.2.1.5. Örneklerin Alınması	21
3.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR)	22
3.3.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) için DNA Ekstraksiyonu...22	
3.3.2. RT-PZR Yöntemi ile Şaraplarda Biyoçeşitliliğin Belirlenmesi.....	22
3.4. Spontane Şaraplardan non- <i>Saccharomyces</i> ve <i>Saccharomyces</i> Maya İzolasyonu	24
3.4.1. Non- <i>Saccharomyces</i> ve <i>Saccharomyces</i> Mayaların İzolasyonu.....	24
3.5. Non- <i>Saccharomyces</i> ve <i>Saccharomyces</i> Mayaların Moleküler Teknikler ile Tanısı	25
3.5.1. 5.8 rDNA-ITS-18S (ITS bölgesi) Sekanslama ile İdentifikasyonu (Moleküler Tanı) ..25	
3.5.2. D1/D2 Domain Sekanslama	25
3.6. Biyokimyasal Karakterizasyon	26
3.6.1. Karbonhidrat Fermantasyon Paternleri.....	26
3.6.2. Fenotipik Karakterizasyon	26
3.6.2.1. Alkol Tolerans Testi	26
3.6.2.2. SO ₂ Direnç Testi	26
3.6.2.3. Sıcaklık Tolerans Testi	26
3.6.2.4. pH Tolerans Testi	27
3.6.2.5. H ₂ S Üretim Testi.....	27
3.7. ITS-RFLP	27
3.7.1. ITS-RFLP için DNA İzolasyonu	27
3.7.2 ITS-PZR Metodu	27
3.7.3. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim	27
3.7.4. Jel Elektroforezi	28
3.8. Suş Seviyesinde Genotipik Farklılıklar.....	28
3.8.1. Darbeli Alan Jel Elektroforezi (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)	28
3.8.1.1. Malzemeler ve Tampon Hazırlama	28
3.8.1.2. PFGE Yöntem	29
3.8.2. RAPD-PZR	30

3.9. Yerel non- <i>Saccharomyces</i> ve Yerel/Ticari <i>Saccharomyces</i> Suşlarının Sıralı İnokülasyonu ile Kalecik Karası Şarap Yapımı	31
3.9.1. Maya Suşları	31
3.9.2. Starter Kültürlerin Hazırlanması ve İnokülasyonu (Biomass Production)	31
3.9.3. Maserasyon ve Fermantasyon Aşaması	32
3.9.4. Malolaktik Fermantasyon	32
3.9.5. Şişeleme	32
3.9.6. Enolojik Analizler	34
3.9.6.1. CO ₂ Analizi	34
3.9.6.2. Oksijen Analizi	34
3.9.6.3. SO ₂ Analizi	34
3.9.6.4. Alkol, İndirgen şeker, Asit, pH, Uçar Asit, Alfa Amino ve Malik Asit Analizleri ...	34
3.9.6.5. Kâğıt Kromatografisi Metodu	34
3.9.7. Şaraplarda Aroma Bileşenleri Analizi	35
3.9.7.1. GC-MS Koşulları	35
3.9.8. Duyusal Analiz	36
3.9.9. İstatistiksel Analizler	36
3.10. Liyofilizasyon	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Spontane/Geleneksel Yöntemler ile Şarap Üretimi	37
4.2. RT-PZR Yöntemi ile Hedef <i>Saccharomyces</i> ve non- <i>Saccharomyces</i> Mayaların Spontan Şıra/Şarap Örneklerinde Saptanması ve Miktar Tayini	38
4.2.1. Mayaların Saptanması (Var/Yok Testi)	38
4.2.2. Starter Olarak Kullanılabilecek Bazı Mayaların Seçilerek RT-PZR ile Miktar Analizlerinin Yapılması	40
4.3. Non- <i>Saccharomyces</i> ve <i>Saccharomyces</i> Maya İzolasyonu	44
4.3.1. <i>Saccharomyces</i> Maya	44
4.3.2. Non- <i>Saccharomyces</i> Maya	44
4.4. Fenotipik Karakterizasyon ve Sekanslama	44
4.4.1. <i>Saccharomyces</i> Suşları	44
4.4.2. Non- <i>Saccharomyces</i> Suşları	45
4.5. Genetik Yöntemler (Sekanslama ve RFLP) ile Tanı (İdentifikasyon)	47
4.5.1. Sekanslama Yöntemleri	47
4.5.1.1. ITS Bölgesinin PZR ile Amplifikasyonu	47
4.5.1.2. D1/D2 Bölgesi Amplifikasyonu	49
4.5.1.3. Sekanslar ve Tanı	49

4.5.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm Analizi (RFLP)	51
4.5.2.1. <i>Saccharomyces</i> Suşlarının Tür Bazında RFLP ile Tanısı.....	51
4.5.2.2. Non- <i>Saccharomyces</i> İzolatlarının RFLP ile Tür Bazında Tanısı.....	55
4.6. RT-PZR ve DNA İzolasyon/Sekans Sonuçlarının Uyumu ve Kıyaslanması	65
4.7. Genotipik Karakterizasyon.....	67
4.7.1. Darbeli Alan Jel Elektroforezi (PFGE)	67
4.7.1.1. Seçilen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Suşlarının PFGE Testi ile Farklılaştırılması	69
4.7.2. RAPD-PZR	83
4.8. Seçilmiş Suşlar ile Çoklu-Kültür Şarap Yapımı	93
4.8.1. Geliştirilen Starter Kültürler ile Üretilen Şaraplarda Enolojik Testler	94
4.8.2 Üretilen Şaraplarda Enolojik Testler	96
4.8.3. Üretilen Şaraplarda Duyusal Analizler	97
4.8.4. Üretilen Şaraplarda Aroma Bileşenleri	101
4.8.5. İzole Edilen non- <i>Saccharomyces</i> Mayaların Starter Kültür Olarak Kullanımı	107
4.9. Liyofilizasyon	109
5. SONUÇ	110
KAYNAKLAR.....	113

TABLO LİSTESİ**SAYFA NUMARASI**

Tablo 2.1. Ülkeler bazında non- <i>Saccharomyces</i> , <i>Saccharomyces</i> popülasyonu belirleme çalışmaları ve yayınlar.....	4
Tablo 2.2. İkili inokülasyonun etkileri	8
Tablo 2.3. Şarap mayalarının ITS bölgesine göre PZR ampikonları.....	9
Tablo 2.4. Literatürde kullanılan tanımlama metotları	10
Tablo 3.1. Üzümlerin alındıkları iller ve zamanlar	16
Tablo 3.2. Kalecik Karası için örneklerin alındığı zaman aralıkları	21
Tablo 3.3. Boğazkere ve Öküzgözü için örneklerin alındığı zaman aralıkları	21
Tablo 3.4. Dimrit için örneklerin alındığı zaman aralıkları.....	21
Tablo 3.5. Emir için örneklerin alındığı zaman aralıkları.....	22
Tablo 3.6. RT-PZR analizi için kullanılan spesifik primerler	23
Tablo 3.7. Kullanılan oligonükleotitler	30
Tablo 3.8. Şarap yapımında kullanılan starter kültürler	31
Tablo 4.1. Üzümlerin alındıkları iller, zamanlar, olgunluk indeksleri ve fermantasyon öncesi kuru madde oranları	37
Tablo 4.2. Kalecik Karası şıra/şarap örneklerinin non- <i>Saccharomyces</i> ve <i>Saccharomyces</i> mayalarının RT-PZR ile saptanması.....	39
Tablo 4.3. Boğazkere, Dimrit ve Öküzgözü şıra örneklerinin RT-PZR ile non- <i>Saccharomyces</i> ve <i>Saccharomyces</i> mayalarının tespiti	39
Tablo 4.4. Emir örneklerinin şıra/şarap non- <i>Saccharomyces</i> ve <i>Saccharomyces</i> mayalarının RT-PZR ile saptanması	40
Tablo 4.5. Dört referans maya türünün standart eğrileri.....	42
Tablo 4.6. Maya türlerinin sayımı için gerçek zamanlı kantitatif PZR kullanan çalışmalar	42
Tablo 4.7. Kalecik Karası örneklerinde dört maya popülasyonunun qPZR ile kantifikasyonu.....	43
Tablo 4.8. Öküzgözü örneklerinde üç maya popülasyonunun qPZR ile kantifikasyonu.....	43
Tablo 4.9. Boğazkere örneklerinde iki maya popülasyonunun qPZR ile kantifikasyonu	43
Tablo 4.10. Dimrit örneklerinde iki maya popülasyonunun qPZR ile kantifikasyonu	43
Tablo 4.11. Teknolojik özellikleri yüksek olup seçilen <i>Saccharomyces</i> izolatlar	45
Tablo 4.12. Seçilen non- <i>Saccharomyces</i> suşlarının fenotipik karakterizasyonu	46
Tablo 4.13. RFLP çalışmalarında kullanılan <i>Saccharomyces</i> suşlar ve kaynakları	51
Tablo 4.14. Cinse göre <i>Saccharomyces</i> mayaların ITS1 ve ITS4 primerleri kullanımı ile elde edilen ITS bölgesi PZR bantları	51
Tablo 4.15. Cinse göre ITS bölgesi bantları, ITS bandı enzimler ile kesimi ve literatür değerleriyle kıyaslanması	55

Tablo 4.16. Araştırmada kullanılan non- <i>Saccharomyces</i> suşlar ve kaynakları	56
Tablo 4.17. Cinse göre mayaların ITS1 and ITS4 primerleri kullanımı ile elde edilen ITS bölgesi PZR bantları	57
Tablo 4.18. <i>DdeI</i> enzimi restriksiyon profili	61
Tablo 4.19. <i>DraI</i> enzimi restriksiyon profili	61
Tablo 4.20. Maya türleri ITS-PZR ürünü restriksiyon enzimleri ile kesimi ve kaynaklar	62
Tablo 4.21. Cinse göre ITS bölgesi bantları, ITS bandı restriksiyon enzimleri ile kesimi	64
Tablo 4.22. Şarap/şıra numunelerindeki <i>Saccharomyces</i> ve non- <i>Saccharomyces</i> maya türlerinin gerçek-zamanlı PZR analiz ve izolasyon/DNA sekans sonuçlarının kıyaslanması	65
Tablo 4.23. ITS ve D1/D2 sekansa göre non- <i>Saccharomyces</i> ve <i>Saccharomyces</i> mayaların tanımlanması ve NCBI erişim numaraları	66
Tablo 4.24. PFGE analizinde kullanılan <i>Saccharomyces</i> maya suşları	68
Tablo 4.25. Elektroforetik karyotiplleme ile farklılaştırılmış <i>S. cerevisiae</i> suşlarının farklı kromozom profilleri	78
Tablo 4. 26. Karyotiplleme ile farklılaştırılmış <i>S. cerevisiae</i> suşlarının kromozom profilleri	79
Tablo 4.27. Bu bölümde kullanılan non- <i>Saccharomyces</i> mayaları listesi ve kaynakları	83
Tablo 4.28. <i>L. thermotolerans</i> suşları için 4 primer kullanımı ile elde edilen paternler	85
Tablo 4. 29. <i>H. uvarum</i> suşları için 4 primer kullanımı ile elde edilen paternler	87
Tablo 4.30. <i>H. opuntiae</i> suşları için 4 primer kullanımı ile elde edilen paternler	88
Tablo 4.31. <i>M. pulcherrima</i> olarak tanımlanan suşlar için 4 primer kullanımı ile elde edilen paternler	91
Tablo 4.32. RAPD-PZR ile çalışılan non- <i>Saccharomyces</i> türlerde klon farklılıkları	91
Tablo 4. 33. Maya türlerinin farklı primerlerin kullanımı ile ortaya çıkan moleküler profilleri ..	92
Tablo 4.34. Kalecik Karası üzümüyle yapılan şaraplarda kullanılan çoklu suşlar	94
Tablo 4.35. Kalecik Karası üzümünden yapılan şarapların enolojik analiz sonuçları	95
Tablo 4.36. Kalecik Karası üzümünden yapılan şarapların son enolojik analiz sonuçlar	96
Tablo 4.37. Şarap standartları	97
Tablo 4.38. Aroma bileşenleri koku eşiği değerleri ve koku tanımları	101
Tablo 4.39: Kalecik Karası şaraplarında aroma bileşenleri (µg/L) analizi (GC-MS) sonuçları	104
Tablo 4.40. Kalecik Karası şaraplarında eşik değerinin üstünde olan aroma bileşenleri	107

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NUMARASI

Şekil 3.1. Fermantasyon aşamasındaki kırmızı şaraplar	18
Şekil 3.2. Şişeleme	18
Şekil 3.3. Kırmızı şarap akım şeması	19
Şekil 3.4. Beyaz şarap akım şeması	20
Şekil.3.5. ITS bölgesi ve D1/D2 domain primerleri	25
Sekil 3.6. ITS bölgesi ve D1/D2 domain	26
Şekil 3. 7. Non- <i>Saccharomyces</i> ve <i>Saccharomyces</i> suşları ile Kalecik Karası şarap yapımı	33
Şekil 4.1. Üzüm şırası ve şarap örneklerinde <i>Hanseniaspora uvarum</i> kantifikasyonu için çizilen standart eğri	41
Şekil 4.2. Üzüm şırası ve şarap örneklerinde <i>Lachancea thermotolerans</i> kantifikasyonu için çizilen standart eğri.	41
Şekil 4.3. Üzüm şırası ve şarap örneklerinde <i>Torulaspora delbrueckii</i> kantifikasyonu için çizilen standart eğri.	41
Şekil 4.4. Üzüm şırası ve şarap örneklerinde <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kantifikasyonu için çizilen standart eğri.	42
Şekil 4.5. PZR jel görüntüleri	47
Şekil 4.6. PZR jel görüntüleri	47
Şekil 4.7. PZR jel görüntüleri	48
Şekil 4.8. PZR jel görüntüleri	48
Şekil 4.9. PZR jel görüntüleri	48
Şekil 4.10. PZR jel görüntüleri	49
Şekil 4.11. Üzüm çeşidine göre izole edilen non- <i>Saccharamoyces</i> mayalar	50
Şekil 4.12. Üzüm çeşidine göre izole edilen non- <i>Saccharamoyces</i> ve <i>Saccharamoyces</i> mayalar	50
Şekil 4.13. <i>Saccharomyces</i> suşlarının PZR sonucu.....	52
Şekil 4.14. <i>HhaI</i> (<i>CfoI</i>) restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü	52
Şekil 4.15. <i>HinI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü	53
Şekil 4.16. <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü	53
Şekil 4.17. <i>HpaII</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü	54
Şekil 4.18. Non- <i>Saccharomyces</i> suşlarının PZR sonucu.....	57
Şekil 4.19. <i>HhaI</i> (<i>CfoI</i>) restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü	58
Şekil 4.20. <i>HinI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü	58
Şekil 4.21. <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü	59
Şekil 4.22. <i>DdeI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü	60

Şekil 4.23. <i>DraI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü	61
Şekil 4.24. <i>Saccharomyces</i> suşlarının PFGE jel görüntüsü	69
Şekil 4.25. <i>Saccharomyces</i> suşlarının PFGE jel görüntüsü	70
Şekil 4.26. <i>Saccharomyces</i> suşlarının PFGE jel görüntüsü	70
Şekil 4.27. <i>Saccharomyces</i> suşlarının PFGE jel görüntüsü	71
Şekil 4.28. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen <i>S. cerevisiae</i> suşlarının PFGE sonucu	72
Şekil 4.29. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen <i>S. cerevisiae</i> suşlarının PFGE sonucu	73
Şekil 4.30. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen <i>S. cerevisiae</i> suşlarının PFGE sonucu	74
Şekil 4.31. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen <i>S. cerevisiae</i> suşlarının PFGE sonucu	75
Şekil 4.32. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen <i>S. cerevisiae</i> suşlarının PFGE sonucu	76
Şekil 4.33. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen <i>S. cerevisiae</i> suşlarının PFGE sonucu	77
Şekil 4.34. CHEF <i>S. cerevisiae</i> kromozomal DNA Markör	78
Şekil 4.35. <i>Lachancea thermotolerans</i> OPA-03 ve M13 primerleri ile amplifikasyon ürünleri	84
Şekil 4.36. <i>Lachancea thermotolerans</i> (ATG) ₅ ve (GTG) ₅ mikrosatelit primerleri ile amplifikasyon ürünleri	85
Şekil 4.37. <i>Hanseniaspora uvarum</i> OPA-03 ve M13 primerleri ile amplifikasyon ürünleri	86
Şekil 4.38. <i>Hanseniaspora uvarum</i> (ATG) ₅ ve (GTG) ₅ mikrosatelit primerleri ile PZR amplifikasyon ürünleri	87
Şekil 4.39. <i>Hanseniaspora opuntiae</i> suşlarının OPA-03 ve M13 primerleri ile PZR amplifikasyon ürünleri	88
Şekil 4.40. <i>Hanseniaspora opuntiae</i> suşlarının (ATG) ₅ ve (GTG) ₅ mikrosatelit primerleri ile PZR amplifikasyon ürünleri	88
Şekil 4.41. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının OPA-03 ve M13 primerleri ile PZR amplifikasyon ürünleri	89
Şekil 4.42. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> suşlarının (ATG) ₅ ve (GTG) ₅ mikrosatelit primerleri ile PZR amplifikasyon ürünleri	90
Şekil 4.43. Kalecik Karası şarapları duyuşal analiz profili (1. grup)	98
Şekil 4.44. L.T-S.C, L.T-Laffort S.C ve S.C şaraplarının duyuşal analizi (1. grup)	99
Şekil 4.45. Kalecik Karası şarapları duyuşal analiz profili (2.grup)	99

ÖZET

Kalecik Karası, Öküzgözü, Dimrit ve Boğazkere sırasıyla Ankara, Elazığ, Kapadokya ve Diyarbakır'ın yerel kırmızı üzümleridir. Buna ek olarak, Emir, Kapadokya'da yetişen yerel beyaz üzümdür. Bu üzümler kendilerine özgü özelliklere sahip oldukları için bu üzümlerdeki maya popülasyonu birbirlerinden farklıdır. Bu çalışmada, bu üzümlerin şıralarından ve şaraplarından değişik maserasyon ve fermantasyon zamanlarında 104 non-*Saccharomyces* (NS) ve 293 *Saccharomyces* (S) maya izole edilmiştir. 104 non-*Saccharomyces* mayanın hepsi sekanslanmıştır. Toplam 293 *Saccharomyces* mayadan (77 sekanslanmış izolat arasından) 29 tanesi yüksek teknolojik özellik taşıyanlar olarak seçilmiştir. Tamamı 181 maya izolatu arasından (104 non-*Saccharomyces* ve 77 *Saccharomyces*) internal transcribed spacer (ara transkripsiyon bölgesi) ITS (ITS1-5.8 rRNA-ITS2) bölgesine ve ribosomal DNA'nın büyük alt ünitesindeki D1/D2 domaini DNA dizilimine göre 17 farklı maya türü tanımlanmıştır: *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Lachancea thermotolerans*, *Solicoccozyma aeria*, *Starmerella bacillaris*, *Metschnikowia aff. fructicola*, *Metschnikowia fructicola*, *Metschnikowia aff. pulcherrima*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia sinensis*, *Metschnikowia aff. chrysoperlae*, *Metschnikowia chrysoperlae*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus*. Aynı zamanda, RT-PZR (eşzamanlı PZR) tekniği şıra ve şaraplarda hedef türlerin tespit edilmesi için kullanılmıştır. Farklı safhalardan alınan şarap numuneleri, türlerin RT-PZR ile tespiti ve izolasyon/sekanslama için kullanılmıştır. İzolasyon/sekans ve RT-PZR, test edilen hedef türlerin birçoğunun belirlenmesinde uyumlu sonuçlar vermiştir. RT-PZR tekniği aynı zamanda şarapların fermantasyonu esnasında, *L. thermotolerans*, *H. uvarum*, *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae* gibi seçilen türlerin miktar belirlenmesinde kullanılmıştır. Bunlara ek olarak, tanımlama sonuçları ITS bölgesi PZR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Kesim Parçası Uzunluk Polimorfizmi) çalışmaları ile teyit edilmiştir. Tanımlanan *Saccharomyces* ve non-*Saccharomyces* izolatların alkol direnci, SO₂ direnci ve H₂S üretimi gibi bazı fenotipik özellikleri de test edilmiştir. Ayrıca moleküler tipleme (PFGE ve RAPD gibi) çalışmalarımız izole edilen suşlar arası farklılıkları ortaya koymuştur.

İlaveten, non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* suşlar ile sıralı inokülasyon ile üretilmiş şaraplarda duyu analizleri ve aroma bileşenleri analizleri yapılmıştır. Kalecik Karası üzümlünde ise *L. thermotolerans* (O9), *M. pulcherrima* (D3), *H. opuntiae* (K2), *W. anomalus* (K41) non-*Saccharomyces* suşlar; *S. cerevisiae* (K71) suşu ile şarap yapımında sıralı starter kültür olarak inoküle edilmiştir. Ayrıca sonuçların kıyaslanması için, ticari maya Laffort *S. cerevisiae* ile küçük ölçekte ve endüstriyel ölçekte yapılan şaraplar da değerlendirilmiştir. Şarapların aroma bileşenleri gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ile analiz edilmiş ve

duyusal analizleri yapılmıştır. Aroma profillerine göre: *Lachancea thermotolerans* ve *Saccharomyces cerevisiae* suşlarımızla ve ayrıca *Metschnikowia pulcherrima* ve *Saccharomyces cerevisiae* suşlarımızla sıralı aşılama yöntemiyle yapılan Kalecik Karası şarapları daha başarılı bulunmuştur. Bununla birlikte duyusal analiz sonuçlarına göre de *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* suşlarımızla yaptığımız Kalecik Karası şarabı diğer non-*Saccharomyces* mayalarla kıyaslandığında daha başarılı olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Non-*Saccharomyces*, *Saccharomyces*, Şarap starter kültürü, Maya tanımlama, Aroma bileşenleri.

ABSTRACT

Kalecik Karası, Öküzgözü, Dimrit and Boğazkere are local red grapes in Ankara, Elazığ, Cappadocia and Diyarbakır, respectively. Moreover, Emir is a local white grape grown in Cappadocia. Yeast populations are different in various types of grapes due to the unique properties of these grapes. In this study, 104 non-*Saccharomyces* and 293 *Saccharomyces* yeasts were isolated at different maceration and fermentation times from the grape's musts and wines made of these grapes. All 104 non-*Saccharomyces* isolates were sequenced. 29 (among 77 sequenced isolates) out of 293 total *Saccharomyces* yeasts were selected as those with high technological properties. Among all 181 (104 non-*Saccharomyces* and 77 *Saccharomyces*) yeast isolates, 17 different species of yeasts were identified by DNA sequencing of internal transcribed spacer (ITS) region (ITS1-5.8 rRNA-ITS2) and/or D1/D2 domain of large subunit ribosomal DNA as: *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Lachancea thermotolerans*, *Solicoccozyma aeria*, *Starmerella bacillaris*, *Metschnikowia aff. fruticola*, *Metschnikowia fruticola*, *Metschnikowia aff. pulcherrima*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia sinensis*, *Metschnikowia aff. chrysoperlae*, *Metschnikowia chrysoperlae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus*. Meanwhile, Real-time PCR (RT-PCR) technique is used to detect target species in grape musts and wine. The wine samples from different stages were used in parallel for both RT-PCR detection and isolation/sequencing of species. Isolation/sequencing results were concordant with the results of the real-time PCR assay in respect to most target species tested. RT-PCR technique was also used to quantify the selected species such as *L. thermotolerans*, *H. uvarum*, *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* during fermentation process of the wines. In addition, identification results were confirmed by ITS region PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) studies. *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* isolates were tested for some phenotypic properties such as alcohol tolerance, SO₂ tolerance and H₂S production. Molecular typing (PFGE and RAPD) studies were also used to differentiate isolates of species at strain level.

In addition, sensory evaluation and aroma compound analysis of wines produced by sequential inoculation with a non-*Saccharomyces* and a *Saccharomyces* strain were performed. Each of *L. thermotolerans* (O9), *M. pulcherrima* (D3), *H. opuntiae* (K2), *W. anomalus* (K41) as non-*Saccharomyces* isolate with *S. cerevisiae* (K71) strain were inoculated sequentially to produce wine from Kalecik Karası grapes. Wines produced with commercial yeast strain (Laffort *S. cerevisiae*) both at industrial scale and small scale were also evaluated to compare the results. Aroma compounds of wines were analyzed by GC-MS (gas

chromatography-mass spectrometry) and aroma profiles of wines were compared with control wines. According to aroma compound analysis, sequential inoculation of our *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* strains (LT-SC) and *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* strains (MP-SC) in Kalecik Karası wines were found successful. Sensory evaluation of wines produced by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* strains was performed and revealed successful results. In fact, the wine made with *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* strains revealed more successful results than the wines made with other non-*Saccharomyces* strains.

Key Words: Non-*Saccharomyces*, *Saccharomyces*, Wine starter culture, Molecular typing, Aroma compound

1. GİRİŞ

Geleneksel şarap üretimi üzüm kabuğundan gelen üzüm suyunun içeriğindeki (endojen) mayalarla kendiliğinden fermantasyonu ile gerçekleştirilir. Ancak standart üretimi sağlayamadığından ve bölgeden bölgeye, yıldan yıla değişen sonucu tahmin etmesi zor ürünler oluşturduğundan, birçok şarap üreticisi üzümün sıkma aşamasından sonra fermantasyonu başlatmak için şıraya (grape must) *S. cerevisiae* suşunu starter kültür olarak eklemektedir. Diğer yandan son yıllarda ticari mayanın şaraba spontane fermantasyon ile sağlanabilen, istenilen özellikleri, örneğin; komplike tat veremediği ve bu şarapların çok standart ve sıradan olduğu düşüncesi hâkim olmuştur. Bu nedenle, araştırmacılar ve şarap üreticileri authochthonous yani kendiliğinden gelişen suşların yerel şarap mayşesine daha kolay uyum sağlaması ve belirli bölgenin biyoçeşitliliğini yansıtmaları gereğiyle bölgeye özel starter kültür izolasyonunu tercih etmeye başlamışlardır (Capece vd., 2010). Bu seçilmiş starter kültürler şaraba tipik koku (flavor) ve aroma vermektedir (Cocolin vd., 2004; Fleet 2003). Dolayısıyla, birçok ülkedeki üzüm bağı bölgelerinde (vineyard) suş izolasyonu ve *Saccharomyces* ve non-*Saccharomyces* maya popülasyon belirleme çalışmaları yapılmış ve yayınlanmıştır. Ayrıca non-*Saccharomyces* suşları, *S. cerevisiae* suşları ile kombinlenerek şarap yapımında spontane fermantasyona benzer ürünler veren daha başarılı kültürler elde edilmiştir. Türkiye'deki üzümlerden elde edilen *S. cerevisiae* ile yapılmış çalışmalar olmakla birlikte (Bağder vd., 2014) non-*Saccharomyces* mayaların ve *S. cerevisiae* dışında kalan *Saccharomyces* türlerini içeren yurtdışı literatürde yer almış çalışmaya nadiren (Çelik vd., 2017) rastlanmıştır.

Bu bilgiler ışığında, projenin amaçları Türkiye'de bulunan yerel üzümlerdeki starter kültür veya multi-starter kültür üretiminde kullanılabilecek endojen fermentative maya türlerinin biyoçeşitliliğinin ortaya konması, non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* mayaların şarap yapımı için starter kültür olarak seçilmesi, tanısı, fenotipik ve genotipik karakterizasyonu olarak belirlenmiştir. Genotipik karakterizasyon için karyotipleme ve RAPD-PZR (Random Amplified Polymorphic DNA) yöntemleri seçilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Türkiye’de Üzüm Çeşitleri ve Maya Çeşitliliği

Fermente edilmiş gıdalar neolitik çağdan bu yana insanlar tarafından tüketilmektedir. Biyomoleküler arkeologlar, neolitik çağda şarap üretiminin olduğuna dair kanıtlara rastlamışlardır. Mezopotamya tarihinde büyük önemi olan şarap üretiminin ülkemizde özellikle 2000’li yılların başlarından itibaren butik şarapçılık anlayışı ile farklı bir duruma geldiği görülmektedir. Avşa Adası’nda yetişen Adakarası, Elazığ-Diyarbakır bölgesine ait olan Boğazkere ve Öküzgözü, Orta Anadolu’da yetişen Kalecik Karası, Çanakkale yöresinde yetişen Karasakız, Bozcaada’ya özel olan Kuntra ve Trakya yöresinde yetişen Papazkarası, Kapadokya bölgesinde yetişen Dimrit ve Emir ülkemizde şaraplık olarak yetiştirilen başlıca ülkemize özel üzüm çeşitleridir. Şarap üretimi geleneksel olarak doğal yollarla bulaşan (spontane) mikroorganizmalar ile yapılmasına karşılık, seri üretimde aynı tadı tutturmak amacıyla starter kültürler başvurulmaktadır. Geleneksel üretimde ekosistemi oluşturan mikroorganizmaların cinsi ve bileşenleri şaraplık üzümün cinsine göre değişmektedir. Bunun sebebi üzümlerin farklı kimyasal bileşenlere sahip olmasıdır. Örneğin; Boğazkere yüksek miktarda tanen içerirken, Öküzgözü daha az tanenli; sonuç olarak da daha yumuşaktır (bu nedenle çoğu zaman kupaj şeklinde kullanımı tercih edilmektedir). Diğer bir deyişle, geleneksel üretimde kültür tek bir mikroorganizma türünden meydana gelmez. Fermantasyon sürecinin farklı evrelerinde rol alan farklı organizmalar geleneksel şarabın alkol seviyesine, sertliğine ve aromasına etki etmektedir.

S. cerevisiae alkol direnci özelliği nedeniyle geleneksel yöntemle üretilen şaraplarda fermantasyonun ileri safhalarında baskın olmaktadır. Ayrıca bazı suşlarının SO₂ direnci nedeniyle de starter kültür olarak kullanımı çok yaygındır. *S. cerevisiae* suşları fermantasyon performansları açısından farklıdır ve şarabın son buke ve kalitesinde önemli rol oynarlar (Cocolin vd., 2004).

Üzüm sırasında ve şarap oluşumu sırasında oluşan kompleks mikrobiyal ekosistem birçok maya barındırmaktadır. Son yıllarda non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* mayalar için ekosistem belirlemesi çalışmaları hız kazanmış, birçok ülkede yapılmış ve SCI yayın olarak basılmış bulunmaktadır. Örneğin İspanya’da kırmızı şaraplık üzümlerin yetiştigi şarap üretim bölgesi Serrenia de Ron’da (Clavijo vd., 2010), Çin’de (Li vd., 2010), Japonya’da (Shinohara vd., 2003), kuzeydoğu Brezilya bölgesi (Santana vd., 2014), yine Brezilya’da (Bezerra-Bussoli vd., 2013), Hindistan’da (Chavan vd., 2009), Almanya’da (Brysch-Herzberg ve Seidel, 2015), Danimarka’da (Lederer vd., 2013), Slovakya’da (Krakova vd., 2012; Zenisova vd., 2014) ve Georgia’da (Vigentini vd., 2016) non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* maya çeşitliliği (diversity) üzerine bölgeye özel biçimde çalışılarak rapor edilmiştir. Türkiye’de de non-

Saccharomyces maya çeşitliliği üzerine son yıllarda çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, Çelik vd. (2017) narince, Tokat üzümü ile çalışarak non-*Saccharomyces* mayaları belirlemiş ve rapor etmişlerdir (Çelik vd., 2017).

2.2. *Saccharomyces cerevisiae* ve non-*Saccharomyces* Mayalar

S. cerevisiae suşları starter kültür olarak ticari açıdan en çok kullanılan maya çeşidini oluşturmaktadır. Bu nedenle en çok çalışılmış organizmadır. Avrupa Birliği Projesinde; 4 Akdeniz ülkesi (Fransa, Yunanistan, İtalya ve İspanya) tarafından şarap bölgelerine göre *S. cerevisiae* isolatlarını moleküler metotlar kullanarak tiplemişler, filogenetik ağaç kullanarak gruplamışlardır (cluster) (Tassou, 2015). Son yıllarda, şarap üretim bölgelerine özel *S. cerevisiae* izolasyonları, tanı ve fenotipik karakterizasyon, moleküler karakterizasyon üzerine birçok çalışma raporlanmıştır. Benzer bir çalışma Türkiye’de yürütülmüş, Türkiye’nin değişik bölgelerinden izole edilen 9 adet *S. cerevisiae* ve 1 adet *S. bayanus* suşu ile tamamlanmış ve yayınlanmıştır. Bu çalışmada bu suşların fermantasyon hızı, H₂S üretimi, killer aktivitesi gibi teknolojik özellikleri rapor edilmiştir (Bağder vd., 2014).

Şarap üretiminde son yıllarda tek maya suşu kullanmak yerine, çoklu starter (multi-starter) kültürlerle kontrollü karışık fermantasyonun tercih edilmesi yönünde bir eğilim görülmektedir. Bu amaçla birçok fermantasyon çalışması yürütülmektedir (Ciani vd., 2015; Comitini vd., 2011; Suzzi vd., 2012). Böylece üretilen şaraplarda mevcut şaraplara göre üstünlük ve özel karakterlerin oluşturulması mümkün olabilmektedir. Geleneksel şarap üretiminde önem verilmesi gereken unsurlardan biri de üzümde ve toprakta bulunan maya çeşitliliğidir (Chavan vd., 2009). Son yıllarda maya çeşitliliğinin önemine vurgu yapan ve çalıştıkları ülkenin ve bölgenin flora bileşenlerini inceleyen çok sayıda makale yayımlanmıştır (Tablo 2.1). Üzümün üzerindeki maya florası spontane yapılan şarabın kalitesini etkilemektedir. Bu nedenle floranın maya çeşitliliği hakkında bilgi sahibi olmak şarap üreticileri için değerlidir (Li vd., 2010). İtalya, Yunanistan, Avusturalya ve Fransa’da şarap üretiminde etkili olan *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* ve *Zygosaccharomyces* gibi türler ile şarabın kalitesi arasındaki ilişki detaylı biçimde incelenmiştir (Chavan vd., 2009).

Tablo 2.1. Ülkeler bazında non-*Saccharomyces*, *Saccharomyces* popülasyonu belirleme çalışmaları ve yayınlar

Kaynak	Bölge	Örneklerin toplandığı kaynak
(Cocolin vd., 2004)	İtalya	Şarap imalathanesi
(Redzepovic vd., 2002)	Hırvatistan	Bağ
(Valero vd., 2007)	Fransa	Bağ
(Martínez vd., 2004)	Güney Amerika	Şarap imalathanesi
(Pramateftaki vd., 2000)	Yunanistan	Bağ
(Settanni vd., 2012)	İtalya	Bağ
(Comi vd., 2000)	İtalya	Şarap imalathanesi
(Vilanova ve Massneuf-pomarede, 2005)	İspanya	Şarap imalathanesi
(Schuller vd., 2004)	Portekiz	Bağ
(Blanco vd., 2006)	İtalya	Bağ
(Salinas vd., 2010)	Şili	Şarap imalathanesi
(Clavijo vd., 2010)	İspanya	Bağ
(Shinohara vd., 2003)	Japonya	Şarap İmalathanesi
(Li vd., 2010)	Çin	Bağ
(Chavan vd., 2009)	Hindistan	Bağ
(Zott vd., 2010)	Fransa	Bağ
(De Ponzzes-Gomes vd., 2014)	Brezilya	Bağ
(Brysch-herzberg ve Seidel, 2015)	Almanya	Bağ
(Nurgel vd., 2005)	Türkiye	Bağ
(Ükelgi, 2011)	Türkiye	Bağ
(Çelik vd., 2017)	Türkiye	Bağ

Pek çok çalışma *Saccharomyces* olmayan türlerden *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Schizosaccaromyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Zygosaccaromyces* ve *Debaryomyces* gibi mayaların fermantasyonun başlangıç evresinde baskın olduğunu göstermektedir. Etanol oranının artmasıyla baskın hale geçen *S. cerevisiae* fermantasyonu tamamlamaktadır (Urso vd., 2008). Fermantasyonun ilerleyen aşamalarında *Candida*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces* ve *Metschnikowia* gibi diğer maya türlerinin izolasyonu da mümkündür (Ciani vd., 2006). Fermantasyonun genelinde alkol direnci gösteren ve baskın olan tür *S. cerevisiae* olduğu için şarap mayası olarak adlandırılmıştır.

Günümüzde fermantasyon, *S. cerevisiae* starter kültürlerinin aşılama ile yapılmaktadır. Bunun başlıca sebebi starter kültür kullanılan fermantasyonun kontrolünün kolay olması ve ortaya çıkan ürünlerin homojen oluşudur (Clavijo vd., 2010). Starter kültür aşılama yöntemi haricinde doğal fermantasyon da uygulanmakta olan bir yöntemdir. Aşılama yolu ile üretilen şaraplarda bazı duyuşal özelliklerde azalma görülmüştür. Doğal fermantasyon yöntemi ile üretilen şaraplarda ise böyle bir sorun ile karşılaşılmamıştır (Blanco vd., 2006). Karışık maya kültürleri kullanılması ise günümüze yakın zamanda ortaya çıkan fikirlerdendir.

Saccharomyces olmayan maya türlerinin aroma çeşitliliğini artırması ve şarap kalitesini artırması nedeniyle bilim çevrelerini kontrollü multi-starter kültür üretimi üzerine çalışmaya yöneltmiştir (Ciani vd., 2006).

Starter kültür üretiminde, suş seçiminde en önemli kriterler suşun; (1) fermantasyon ortamına uygunluğu, (2) şarabın duyusal kalitesine etkisi ve (3) seri üretime uygunluğu olarak sıralanabilir. Bu maya suşlarının izole edilmesinde kullanılan başlıca yöntemler bağlardan ve şaraphanelerden alınmasıdır (Gonzales vd., 2011).

Maya seçiminde öncelikli olarak gözetilen özellik fermantasyon ortamına ve şartlarına uyumluluğudur. Fermantasyon ortamı doğal olarak yüksek osmotik basınca ve düşük pH değerine sahiptir. İlerleyen fermantasyon aşamalarında etil alkol oranı da zamana bağlı olarak artış göstermektedir. Üzümün üzerinde doğal olarak bulunan maya ve bakterilerin baskılanması amacıyla metabisüfit kullanılmaktadır. Bu nedenle seçilecek suşun kükürt dioksit de direncinin olması gereklidir. Kültür fermantasyonun yapıldığı ortama göre değişken sıcaklıklara maruz kalabileceği gibi seri üretimde fermantasyon sebebiyle ortaya çıkan ısı da sıcaklıkta yükselmeye yol açmaktadır. Kültürün değişik sıcaklıklarda aktivitesini sürdürmesi beklenmektedir. Fermantasyonun istenmeyen bir ürünü olan hidrojen sülfür üretmemesi de aranan başka bir özelliktir. Diğer maya türleriyle rekabet içerisinde olacağından killer aktivite ve kısa lag fazı diğer önemli özelliklerdir.

Bu başlık altında incelenen özellikler:

Mayanın;

1. Etanole direnci,
2. Sülfür dioksit direnci,
3. Farklı sıcaklıklarda gelişme becerisi,
4. Hidrojen sülfür üretimi,
5. Değişik pH değerlerine uyumu,
6. Yüksek osmotik basınca dayanıklılığı,
7. Kısa lag fazı ve
8. Killer toksin üretimidir (Arroyo-Lopez vd., 2009; Ciani ve Comitini, 2015; Guimal ve Hedreya, 2011; Guimaraes, vd. 2006; Hernández vd., 2008; Kapsopoulou vd., 2008; Ma ve Liu, 2010; Sundström vd., 2010; Urso vd., 2008; van der Westhuizen vd., 2000).

2.3. Non-*Saccharomyces* Mayalar ve Aroma Bileşenleri

İkinci olarak önemli olan özellik ise şarabın duyusal kalitesini etkileyen aromaların üretimidir. *S. cerevisiae* fermantasyonda öncelikli rolü üstlense de *Saccharomyces* olmayan maya türleri şarabın kalitesini arttıran aroma bileşiklerinin üretiminde daha etkilidir (Ciani vd., 2006).

Non-*Saccharomyces* mayalar ile *S. cerevisiae*'yı birlikte karışık fermantasyona tabi tutan karşılaştırmalı çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlardan bazıları ve sağladığı yararlar rapor edilmiştir (Ciani vd., 2010). Şarap yapımı sırasında en sık rastlanan non-*Saccharomyces* mayalar aşağıda irdelenmektedir (Tablo 2.2).

2.3.1. *Hanseniaspora guilliermondii*

Hanseniaspora cinsi asetat ester üretiminde önde gelir. Viana vd. (2008), 11027 ve 11102 kodlu *H. guilliermondii* suşlarını ester özelliği için şarap yapımında starter kültür olarak kullanmışlardır. Bunun yanı sıra, farklı *H. guilliermondii* suşları şaraba çiçeksi ve meyvemsi aroma veren etil asetat ve 2-feniletil asetatı fazlasıyla üretir (Moreira vd., 2008; Rojas vd., 2003). Ayrıca, bu mikroorganizmanın bazı suşları *S. cerevisiae* gibi alkol toleransına sahiptir. %25 (v/v) alkol seviyesine kadar direnç gösterebilir (Pina vd., 2004).

2.3.2. *Hanseniaspora opuntiae*

H. opuntiae, şarabın duyuşal profilini olumlu bir şekilde şarap aroması vererek etkiler. Bu mikroorganizma *S. cerevisiae* ile beraber inokülasyon yapıldığında şarabın aromasını artırır ve şaraba spesifik profil kazandırır. *H. opuntiae* ve *S. cerevisiae* var. *bayanus* starter kültürleri, Cabernet sauvignon, Chenin Blanc, Rose üzümlerinden yapılan şaraplara tipik şarap aroması vermiştir. Bu şaraplar, tüketiciler tarafından pozitif duyuşal özelliğinden dolayı tercih edilmiştir (Assis vd., 2014).

2.3.3. *Hanseniaspora uvarum*

H. uvarum, şarap yapımında kullanılan bir starter kültürdür. Bu mikroorganizma şekeri tamamen tüketmeden fermantasyonun bitimine (stuck fermantasyon) sebep olsa da bazı araştırmacılar bu mikroorganizmayı *S. cerevisiae* ile beraber ya da ardışık inokülasyon yaparak endüstriyel şarap üretiminde kullanmıştır. Bu kullanım, şarabın uçucu asit bileşiklerinin azalmasını sağlamış ve şaraba organoleptik nitelik vermiştir (Tristezza vd., 2016).

2.3.4. *Rhodotorula mucilaginosa*

Çin'de yapılan bir çalışmaya göre, yüksek seviyede β -glukosidaza sahip *R. mucilaginosa*, glukosidazın C₁₃-norisoprenoidleri ve benzen bileşikleri sayesinde şaraba meyvemsi ve çiçek aroması vermiştir (Hu vd., 2016). Bunun yanı sıra, *R. mucilaginosa* ve *S. cerevisiae* ardışık inokülasyon ile beyaz şarap yapımında starter kültür olarak aroma profilini geliştirmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu fermantasyon sonucunda nerol oksit, belirli etil ve asetat bileşikleri ve (Z)-3-hexene-1-ol bulunmuştur. Bu bileşikler şaraba çilek, kiraz gibi meyve, turuncgil, çiçeksi, tatlı ve asitli meyve aromaları vermiştir (Wang vd., 2017).

2.3.5. *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*)

S. cerevisiae ve *W. anomalus* kültürleri ile yapılan bir çalışmada, bu mikroorganizmaların beraber inokülasyonunun elma şarabının kalitesini pozitif bir şekilde etkilediği gösterilmiştir. Bununla beraber, bu elma şarabının alkol seviyesi tek bir kültür olarak eklenen *S. cerevisiae* ile aynıdır. Bu ikili inokülasyonda, tek bir kültürlü fermantasyondan farklı olarak önemli bir biçimde daha yüksek miktarda alkoller, etil esterler, asetat esterler, ketonlar ve aldehitler gelişmiştir. Bu sonuç, tek kültürlü fermantasyonun üretiminden daha çok istenen bir durumdur (Ye vd., 2014). Yapılan çalışmalar, bazı *W. anomalus* maya suşlarının şarapta bozulmaya yol açabilecek seviyede etil asetat (150 mg/L den daha yüksek miktar) ürettiğini, diğer yandan meyvemsi asetat esterleri oluşturduğunu belirtmektedir.

2.3.6. *Metschnikowia* spp.

Metschnikowia pulcherrima, bu cinsten çok kullanılan bir türdür. Şarapta önemli bir derecede uçucu ve toplam asit miktarını düşürür. *S. cerevisiae* ile beraber inokülasyonunda izoamil asetat, 2-feniletanol ve orta zincirli yağ asitlerinin üretimini pozitif bir yönde etkiler. Ayrıca, şarabın polisakkarit içeriğini artırır (Comitini vd., 2011).

2.3.7. *Lachancea thermotolerans* (*Kluyveromyces thermotolerans*)

L. thermotolerans ve *S. cerevisiae* eş zamanlı ya da ardışık inokülasyonu şarabın asitliğinin gelişmesi ve kalitesinin artması için kullanılır. Bir çalışmada, bu mikroorganizmaların eş zamanlı olarak inokülasyonu gliserol ve 2-feniletanolün geliştiğini gösterilmiştir. Aynı zamanda bu iki mikroorganizmanın starter kültür olarak kullanımı baharat aromasını ve toplam asitliği artırmıştır (Gobbi vd., 2013). *L. thermotolerans*, Chr. Hansen (Viniflora® SYMPHONY) tarafından ticari starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmanın kullanımı beyaz (Riesling, Pinot Blanc, Chardonnay ve Pinot Gris) ve kırmızı (Pinot Noir, Shiraz, Cabernet Sauvignon ve Merlot) üzümlerde aromayı artırmaktadır. Tropikal meyve ve çiçeksi aroma vermektedir (Jolly vd., 2006).

2.3.8. *Starmerella bacillaris* (*Candida zemplinina*)

İtalya'da üzümlerden izole edilen *S. bacillaris* mayalarının moleküler ve fizyolojik karakterizasyonu için bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma, bu mikroorganizmanın düşük miktarda asetik asit ve etanol; yüksek düzeyde gliserol ürettiğini göstermiştir. Bu nedenle, bu mikroorganizma şarap yapımı için *S. cerevisiae* ile birlikte uygulanması için uygundur. Bunun yanı sıra, bu iki kültürün birlikte kullanımı, şaraptaki etanolün azaltılması için kullanılabilir (Englezos vd., 2015).

2.3.9. *Williopsis saturnus*

W. saturnus (*Hansenula saturnus*) önemli düzeyde uçucu esterler, özellikle izoamil asetat ve etil asetat üretir. İzomil asetat, şaraba muz benzeri aroma verir (Wang vd., 2017). Nötr ekim çeşidinin özelliklerinden elde edilen şarapta, *W. saturnus* potansiyel olarak meyvemsi aroma geliştirir. Bu yüzden, *W. saturnus*, *S. cerevisiae* ile birlikte şarap yapımında starter kültür olarak kullanılmıştır. Erten ve Tanguler (2010), Emir şarabına *W. saturnus* ve *S. cerevisiae* mayalarının birlikte inokülasyonu ile ilgili bir çalışma yürütmüşlerdir.

2.3.10. *Torulaspora delbrueckii*

T. delbrueckii şarap aromasına önemli ölçüde katkı sağlar ve şarap üretiminde kullanılmak üzere ticari olarak temin edilebilen ilk non-*Saccharomyces* maya olarak bilinir (Jolly vd., 2014). *T. delbrueckii* beyaz, kırmızı ve köpüklü şaraplarda aroma ve duysal profili geliştirir. Beyaz şarap olan Malvar şaraplarında, çoklu kültür olarak *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae* kullanıldığında aroma bileşenlerinden asetat esterleri ve orta zincirli yağ asitlerini arttırdığı gösterilmiştir (Cordero-Bueso vd., 2013). Tempranillo şaraplarında *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında *T. delbrueckii* suşunun kırmızı şarapları renk yoğunluğu, genel izlenim ve aroma profili açısından geliştirdiği (Belda vd., 2015), Merlot şaraplarında ise meyve aroması vererek duysal açıdan geliştirdiği görülmüştür (Renault vd., 2015). *T. delbrueckii* şarap ve birada alkol konsantrasyonunu azaltmak için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bazı *T. delbrueckii* suşları şarabın bozulmasında rol oynayan mayaları öldürebilen toksinlerin üretimi sebebiyle oldukça önemlidir ve bu konuda birçok araştırma yürütülmektedir (Villalba vd., 2016).

Tablo 2.2. İkili inokülasyonun etkileri (Padilla vd., 2016)

İkili İnokülasyon	Etkileri	İnokülasyon Çeşidi	Kaynaklar
<i>C. zemplinina</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Asetik asiti azaltmak	Ardışık, Eş Zamanlı	(Ciani ve Ferraro, 1998; Rantsiou vd., 2012)
<i>H. guilliermondii</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Asetat ester ve kükürt bileşimini artırmak	Eş Zamanlı	(Moreira vd., 2008)
<i>H. uvarum</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Asetat esterini artırmak	Eş Zamanlı	(Andorrà vd., 2010)
<i>H. vineae</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Etil ester ve asetatı artırmak	Ardışık, Eş Zamanlı	(Medina vd., 2013)
<i>I. orientalis</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Şarabın asitten arındırılması	Eş Zamanlı	(Kim vd., 2008)
<i>L. thermotolerans</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Şarabın asitlendirilmesi	Ardışık, Eş Zamanlı	(Gobbi vd., 2013b)
<i>M. pulcherrima</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Asetik asiti azaltmak ve α -terpineol, etil ester, alkol seviyesini arttırmak	Ardışık, Eş Zamanlı	(Comitini vd., 2011; Zohre ve Erten, 2002)
<i>P. fermentans</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Asetik asiti azaltmak ve alkol seviyesini artırmak	Ardışık, Eş Zamanlı	(Clemente-Jimenez., 2005; Comitini vd., 2011)
<i>T. delbrueckii</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Asetik asiti azaltmak ve alkol seviyesini, etil ester, asetat, linalool ve α -terpineolü arttırmak	Ardışık, Eş Zamanlı	(Azzolini vd., 2015; Comitini vd., 2011)
<i>W. anomalus</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Etil ester ve asetatı artırmak	Ardışık	(Canas vd., 2011)
<i>W. saturnus</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Asetat esterini artırmak	Eş Zamanlı	(Erten ve Tanguler, 2010)
<i>Z. bailii</i> & <i>S. cerevisiae</i>	Etil esterini artırmak	Eş Zamanlı	(Garavaglia vd., 2015)

2.4. Mayaların Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

2.4.1. Sekanslama

Internal transcribed spacer (ITS) bölgesi (Ara transkripsiyon bölgesi), 5.8 rDNA gen kodlamasını, iki yan kodlayıcı olmayan ve değişken bölgeleri (ITS1 ve ITS2) içerir. ITS1 ve ITS2, türler arası yüksek değişkenlik gösterir. Bununla birlikte, intraspesifik polimorfizmi düşüktür. ITS bölgesi ve korunmuş rDNA gen dizileri, mayalar için evrensel primerlerin kullanılmasını mümkün kılmaktadır. ITS bölgesinin sekansı arasındaki farklar maya türlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Christoph ve Thomas, 2001; Villa-Carvajal vd., 2006). Chavan vd. (2009), *Saccharomyces* ve *Saccharomyces* olmayan mayaların rDNA'nın 5.8S ITS dizilimi ile tanımlandığını göstermiştir. ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgesine göre PZR ampikon sekansları her bir tür için farklılık gösterir. Tablo 2.3, bazı şarap mayalarının cins ve tür olarak ampikonları arasındaki farkları göstermektedir (Ghosh, 2017; Pham vd., 2011).

Tablo 2.3. Şarap mayalarının ITS bölgesine göre PZR ampikonları

Mayalar	ITS1-5.8S rDNA-ITS2 PZR Ampikonları (bp)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	390
<i>Metschnikowia aff. pulcherrima</i>	390
<i>Pichia fermentans</i>	445
<i>Starmerella bacillaris</i>	475
<i>Dekkera bruxellensis</i>	468
<i>Dekkera anomala</i>	540
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	600
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	610
<i>Lanchancea thermotolerans</i>	675
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	720
<i>Kluyveromyces lactis</i>	740
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	747
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	749
<i>Torulaspora delbreuckii</i>	798
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	842

Fernandez-Espinar vd. (2000), ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin 18S ve 26S rRNA bölgelerinden daha fazla türler arası farklılık gösterdiğini bildirmiştir. Bu yüzden, yakın türler arasında farklılıklar bu bölgeyle tanımlanabilmektedir.

Saccharomyces ve non-*Saccharomyces* mayalar, D1/D2 domain sekans dizilimine göre de tanımlanabilir. D1/D2 domain sekanstaki 600 nükleotidi kapsar (Guadet vd., 1989). 26S büyük alt birim rRNA'nın 5' ucuna yakın olan değişken D2 domainin dizilimi, bu bölgedeki

özellikle *Saccharomyces*, *Pichia* ve *Issatchenkia* gibi heterotallik kardeş türlerini ayırmıştır. Genellikle, belirgin suşların nükleotitlerinin yer değiştirmesi bu alanda %1'den daha az bazdır (Kurtzman ve Robnett, 1998). Bu domainin sekansı, türlerin doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanmasını kolaylaştırmıştır (Hesham vd., 2014). Bu tanımlama metodu, *Saccharomyces* (Hesham vd., 2011), *Kluyveromyces* (Belloch vd., 1998), ve diğer şarap mayaları türleri için kullanılmıştır (Guillamon vd., 1998). Mayaların tanımlanmasında ve karakterize edilmesinde moleküler yöntemlerin doğruluğu kanıtlanmıştır (Li vd., 2010; Fernandez-Espinar vd., 2011). Buna karşılık farklı çalışmalarda farklı moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları Tablo 2.4'te listelenmiştir. Moleküler yöntemler, mayaların tanımlanmasında ve karakterize edilmesinde geleneksel filogenetik özellikleri temel alan tekniklere alternatif olarak kullanılmaktadır. Bu tekniklerin doğruluk payı ve hızı oldukça yüksektir.

Tablo 2.4. Literatürde kullanılan tanımlama metotları

Mikroorganizmalar	Kullanılan Metot	Kaynak
S	ITS Bölgesi ve D1/D2 Domain	(Kallai vd., 2019)
NS	ITS Bölgesi ve D1/D2 Domain	(Brysch-Herzberg ve Seidel, 2015)
NS	ITS Bölgesi	(Mokhtari vd., 2012)
NS	ITS Bölgesi	(Li vd., 2010)
NS ve S	ITS Bölgesi ve D1/D2 Domain	(Tofalo vd., 2009)
NS	ITS Bölgesi	(Zott vd., 2008)
NS	D1/D2 Domain	(Romancino vd., 2008)
NS ve S	ITS Bölgesi	(Rodriguez vd., 2004)
NS ve S	ITS Bölgesi	(Esteve-Zarzoso vd., 2001)
S	ITS Bölgesi	(Fernandez-Espinar vd., 2000)
NS ve S	ITS Bölgesi	(Guillamon vd., 1998)

NS, Non-*Saccharomyces*; S, *Saccharomyces*.

2.4.2. ITS-RFLP

Moleküler çalışmalar genellikle organizmaların biyokimyasal tanısı sonrası tanı sonuçlarını teyit amacıyla yapılmaktadır. rRNA geni büyük alt ünitelerdeki rRNA bölgesi olan internal transcribed spacer (ITS), ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi sekanslanması veya bu bölgenin kesim enzimleri ile parçalanması sonucunda mayalarda güvenilir tanı sağlanmaktadır (Bezerra-Bussoli vd., 2013). Bu sistem ile tür bazında tanı yapılabilir. Mayaların hızlı tanısı için Valencia Üniversitesi tarafından geliştirilen veri bankasında, cins ve tür bazında amplifiye edilen ITS bölgesi fragman büyüklüğü, kesim enzimleri ile elde edilen ITS-bölgesi bantların sayısına ve büyüklüklerine ulaşılabilmektedir (Valencia University, 2020).

Mayaları tür bazında farklılaştırmayı sağlayan ITS-RFLP (Internal Transcribed Spacer-Restriction Fragment Length Polymorphism) metodu kullanılarak, *Saccharomyces* ve non-*Saccharomyces* türlerinin DNA'sı üzerinde bulunan ITS gen bölgesi özel restriksiyon enzimler

ile kesilerek parçalara ayrılır ve jel elektroforezi uygulanarak restriksiyon profilleri elde edilir. Elde edilen bu profiller her bir maya türüne özgü olduğu için bu yöntem sayesinde mayalar tür bazında ayırt edilebilmektedir (Jeyaram vd., 2008). ITS-RFLP yöntemi hızlı ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle *Saccharomyces* ve non-*Saccharomyces* mayaların tanımlanmasında sıkça tercih edilen moleküler bir tekniktir (Fernandez-Espinar vd., 2000).

RFLP yöntemi şarap yapımında çok önemli yeri olan *Saccharomyces sensu stricto* (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* ve *S. pastorianus*) grubunun tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Pham vd., 2011). Bunun yanında, RFLP yöntemi *Saccharomyces sensu lato* (*S. kunashirensis*, *S. martiniae*, *S. rosinii*, *S. spencerorum*, *S. transvaalensis* vb.) grubuna ait türleri ve İspanyol şarabının (şeri) yıllanmasında rol oynayan *Saccharomyces* flor mayalarının da kesin olarak tanımlanmasına izin vermektedir (Fernandez-Espinar vd., 2000).

2.4.3. D1/D2-RFLP

RFLP yönteminde 5.8S-ITS bölgesi kullanılabileceği (Fernandez-Espinar vd., 2000) gibi 18S ve 26S rRNA bölgeleri de kullanılabilmektedir. Zanol vd. (2010) 26S rDNA bölgesinde D1/D2 bölgesini içeren 1100 bp'lik bölgenin PZR ile çoğaltılması sonrası, *MseI* *HaeIII*, *CfoI* restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle oluşan RFLP profillerinin, önolojik maya türlerinin tanımlanmasında başarılı bir metot olduğunu göstermişlerdir.

2.5. Moleküler Tipleme (Genotip Belirleme)

Moleküler karakterizasyonda kullanılan bazı teknikler PFGE, mitokondriyel DNA kesim analizi, RAPD-PZR, sekanslamadır (Bernardi vd., 2008). Bu moleküler yöntemlerden literatürde genotipik karakterizasyon için sıklıkla kullanılanlar ile yapılan bazı çalışmalar Tablo 2.5'te sıralanmıştır. Bu çalışmaların değişik amaçları olabilmektedir. Örneğin, izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının ticari suş olmadığı, yeni tanımlandığı kanıtlanmalıdır. Patentleme amaçlı olarak da bu çalışmalar önem taşımaktadır. Ayrıca, bir türe ait suşların genotipik farklılıklarını ve/veya biyofarklılıklarını göstermek amacıyla da kullanılmaktadır. Bu nedenlerle farklı moleküler teknikler kullanılabilmektedir. Suş seviyesinde farklılıklar bu çalışmalarla ortaya konmaktadır. Bu metotlardan bazıları şöyledir:

Tablo 2.5. Çalışmalarda kullanılan moleküler karakterizasyon teknikleri

Kaynak	Moleküler Analizler
(Keyamura ve Hishida., 2020)	PFGE
(Kallai vd., 2019)	PFGE, RAPD-PZR, Mikrosatelit-primed PZR, interdelta
(Granchi vd., 2019)	mtDNA-RFLP
(Pai vd., 2018)	PFGE
(Hage ve Houseley., 2013)	PFGE
(Wang vd., 2012)	PFGE
(Viel vd., 2017)	mtDNA-RFLP, mikrosatelit analizi
(De Benedictis vd., 2011)	RAPD-PZR, mikro- ve minisatelit analizi
(Sergio Echeverrigaray vd., 2013)	RAPD-PZR, PZR-RFLP
(Pfliegler vd., 2014)	RAPD-PZR, mikro- ve minisatelit analizi
(González-Arenzana vd., 2017)	RAPD-PZR
(Sabate vd., 2002)	PZR-RFLP, mtDNA-RFLP
(Feghali vd., 2019)	Mikrosatelit analizi
(Tofalo vd., 2009)	PZR-RFLP, RAPD-PZR
(Cocolin vd., 2004)	RAPD-PZR, PFGE, SAU-PZR
(Fernandez-Espinar vd., 2001)	RAPD-PZR, PFGE, mtDNA-RFLP
(Giusto vd., 2006)	RAPD-PZR, PZR-TTGE
(Redžepović vd., 2002)	PZR-RFLP, ITS
(De Araújo Vicente vd., 2006)	PZR-RFLP, ITS
(Bernardi vd., 2008)	PFGE, PZR-PFLP, mtDNA-RFLP
(Valero vd., 2007)	PZR-RFLP, ITS
(Christine vd., 2007)	PFGE, PZR-PFLP
(Daran-Lapujade vd., 2003)	RAPD-PZR, PFGE
(Martínez vd., 2004)	PZR-RFLP, mtDNA-RFLP
(Manzano vd., 2005)	PZR-TTGE
(Ryu vd., 1998)	PFGE
(Pramateftaki vd., 2000)	PZR-RFLP, mtDNA-RFLP, ITS
(Gil-Lamaignere vd., 2003)	PFGE, PZR-RFLP, SAU-PZR

2.5.1. Mitokondriyal DNA Kesim Analizi (Mitokondriyal DNA-RFLP)

Mitokondriyal DNA kesim analizi ile ticari suşlar ve kendiliğinden fermantasyona bırakılan üzüm şirasından izole edilen suşlar kıyaslanabilmektedir (Santana vd., 2014). Bu yöntemde mitokondriyal DNA kesim enzimleri ile kesilmekte ve oluşan fragmanların analizi elektroforez ile yapılmaktadır.

2.5.2. Karyotipleme

Karyotipleme, bir organizmanın tüm kromozomlarını sıralama ve organizmanın kromozomlarının genom çapında görüntüsünü elde etme işlemidir. Elektroforetik karyotipleme, kromozomal DNA'ların büyüklüğüne göre agaroz jel üzerinde ayrılması anlamına gelir. Kromozomların sayısına ve büyüklüğüne bağlı olarak, her suşa özgü bir profil elde edilir (Zimmermann ve Fournier, 1996). PFGE kullanılarak *Saccharomyces* cinsi içinde farklı kromozom büyüklükleri tespit edilebilir. Petersen vd. 1999 yılında yapmış oldukları çalışmalarında, *Saccharomyces castelli* ve *Saccharomyces direnensis* türünde 9, *Saccharomyces servazzii* ve *Saccharomyces unisporus* türünde 12, *Saccharomyces exiguus*

türünde 16 ve *Saccharomyces kluyveri* türünde 7 kromozom olduğunu bulmuşlardır (Petersen vd., 1999).

S. cerevisiae genomu, 16 kromozom (Schwartz ve Cantor, 1984, Peter vd., 2018) üzerine dağılmış yaklaşık 12,156,677 baz çifti ve 6,275 genden oluşmuştur (Keyamura ve Hishida, 2020). *Saccharomyces* ticari suşlarında ve diğer mayalarda karyotip değişiklikleri rapor edilmiştir (Johnston ve Mortimer, 1986; Hage ve Houseley, 2013; Pai vd., 2018; Kallai vd., 2019). Tokaj (Macaristan) şaraplarından izole edilen 17 *S. cerevisiae* suşlarında farklı profiller gösterilmiştir (Kallai vd., 2019). *S. cerevisiae* suşlarında DNA replikasyon çatalı ilerlemesi ve DNA çift zincirli kopmaları (DSB'ler) PFGE yöntemi ile izlenmiştir (Keyamura ve Hishida, 2020).

2.5.3. RAPD-PZR

Geçtiğimiz yıllarda PZR tabanlı moleküler yöntemleri kullanan pek çok makale yayımlanmıştır. Bu çalışmalarda RAPD-PZR'nin modern yöntemlerle üretilen şarapta fermantasyonun takibinde ya da maya popülasyonlarının karakterize edilmesinde kullanıldığı görülmektedir. Şarap mikrobiyolojisinde ayrıca Amarone şaraplarından izole edilen suşlarının çeşitliliğinin tespitinde kullanılmıştır (Cocolin vd., 2004).

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (gelişigüzel çoğaltılmış polimorfik DNA) ve mikrosatelit, suş topluluklarında biyoçeşitlilik çalışmaları için kullanılan PZR-bazlı metotlardır (Pfliegler vd., 2014; Banilas vd., 2016). PZR parmak izi tekniklerinin hızlı, hassas ve güvenilir biçimde taksonomide, epidemiyolojide ve hastalıkların teşhisinde etkili olarak yararlı olduğu rapor edilmiştir (Meyer ve Mitchell, 1995).

Rastgele nükleotitlerden oluşan primerlerin (6-10 bp) kullanımı ile uygulanan ve işlevi bilinmeyen polimorfik DNA fragmantlarının çoğalmasını sağlayan RAPD analizi (Meyer ve Mitchell, 1995), gen haritası, taksonomi ve filojenik çalışmalarda polimorfizmin (çok biçimlilik) yani farklılıkların tanısında kullanılan bir tekniktir (Capece vd., 2003). Mikrosatelitler veya Simple Sequence Repeats (SSRs) (basit sekans tekrarları) ise, çoğu ökaryot genomunda 6 bp'ye kadar uzunluğu olan art arda tekrarlanan kısa DNA dizilim motifleridir. Tekrarlanan dizilimlerdeki farklılıklar (mini ve mikrosatelit dizilimleri) DNA parmak izi çalışmalarında 1985'den beri kullanılmaktadır. Mikro ve minisatelit gen dizilimlerindeki farklılıklar, bu bölgelerin analizlerini, birbirine çok yakın suşların belirlenmesi için ideal bir araç yapmaktadır. Minisatelit DNA, farklı bölgelerde (loci) tekrarlanan 15-30 bp uzunluğunda sekans motiflerinden oluşmaktadır (örneğin; M13 primeri ile çoğaltılmaktadır). Diğer yandan, mikrosatelitler, 2-10 bp uzunluğunda, kısa art arda sıralanmış, DNA dizilim motifinin tekrarlarıdır (örneğin ATG motifi 5 kez tekrarlanarak 15 bp uzunluğunda (ATG₅) primerini oluşturmaktadır) ve 100 kezden fazla bu DNA bölgesini çoğaltabilmektedirler. Ökaryotik genomda dağılmışlardır (Couto vd., 1996;

Lieckfeldt vd.,1993; Walczak vd., 2007; Pfliegler vd., 2014; Banilas vd., 2016). Mini ve mikrosatelit primerleri ile çoğaltılan hedef DNA dizilimin bağlanma bölgesi arasındaki %100 homoloji ve primerlerin boyutunun daha uzun (15-17 bp) olması, primer ve hedef bölgesinin bağlanmasını daha güçlü hale getirerek PZR parmak izi sonuçlarının daha kısa primerleri (6-10 bp) olan RAPD tekniğinden daha güvenilir olmasını sağlamaktadır. Gonzales-Arenzana (2016) RAPD primerleri ile *L. thermotolerans* ve *M. pulcherrima* suşlarını ayırabilmişlerdir.

Birçok çalışmada *Saccharomyces sensu stricto* grubunun *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* ve *S. paradoxus* olmak üzere dört farklı taksondan oluştuğu belirtilirken; son zamanlarda bu türlere ek olarak, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* ve *S. mikatae* türleri de bu gruba dahil edilmiştir (Naumov vd., 2000). *Saccharomyces sensu stricto* grubu çok yakından ilişkili türlerden oluştuğu için bu türler arasında farklılaştırma yapmak zordur. RAPD-PZR yöntemi çok sayıda polimorfik lokusun çoğatılmasını sağlayarak genetik farklılığı az olan türler arasında farklılaşmayı sağlamaktadır. Bu nedenle, RAPD-PZR *Saccharomyces sensu stricto* grubunun en yaygın suşlarını oluşturan ve yakın türler olan *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* ve *S. pastorianus* türlerini ayırt etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Fernandez-Espinar vd., 2003).

2.6. Maya Şarap Kültürlerinin Endüstriyel Kullanım İçin Hazırlanması

Son olarak istenilen karakteristiği gösteren mayaların endüstride kullanılabilecek özelliklere sahip olması beklenilmektedir. Endüstriyel starter kültür üretimine uygunlukta aranan özellikler arasında (1) melastan büyük miktarlarda üretiminin yapılabilmesi ve (2) kurutma işlemine uygun olması sayılabilir.

Aktif kuru mayalar, kurutularak pasif hale getirilmiş tekrar aktive edilebilen mayalardır. Mayaların nem oranı %70'ten %5-8 oranına düşürülmektedir ve kurutma işlemi aktifleşme özelliğini korumak amacıyla çok dikkatli uygulanmaktadır (Bayrock ve Ingledew, 1997). Kurutma işlemi için endüstride tercih edilen farklı yöntemler bulunmasına rağmen en verimli yöntemin belirlenmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu yöntemler; dondurarak kurutma, püskürtmeli kurutma, akışkan yataklı kurutma ve düşük sıcaklıkla ısı kurutmadır (Tsaousi vd., 2008). Yöntemlerin verimliliği analiz edilmiş, dondurarak kurutma yöntemi sonucunda maya hücrelerinin %8 oranında canlı kaldığı ve akışkan yataklı kurutma yöntemi ile %30 oranında maya hücrelerinin geri kazanımının mümkün olduğu bulunmuştur (Mille vd., 2005; Miyamoto-Shinohara vd., 2006). Yapılan farklı çalışmalarda püskürtmeli kurutma işleminin süt ürünleri endüstrisinde kullanımının daha uygun olduğu görülmüştür (Morgan vd., 2006). Diğer yandan Ale vd. (2015) liyofilizasyonun canlı hücreleri yüksek sayıda korumak için kolay bir yol olduğunu ve mayşeye toz formunda eklemenin yapılacak işlemleri azalttığını vurgulamışlardır.

2.7. Enolojik Testler

Şaraplara fermantasyon sırasında ve şişeleme öncesi bazı testler uygulanmaktadır. Bu testler üretim esnasında oluşabilecek hataları önlemek ve düzeltmek amacıyla düzenli olarak uygulanır. Fermantasyon süresince (1) bulanıklık, (2) öz kütle, (3) alkol oranı, (4) kükürt dioksit miktarı, (5) karbon dioksit miktarı, (6) pH, (7) toplam asit miktarı, (8) toplam şeker miktarı kontrol edilir (Jacobson, 2006). Şişeleme öncesi yapılan testler ise (1) bulanıklık, (2) serbest kükürt dioksit, (3) karbon dioksit miktarı olarak sıralanabilir. Bunların dışında tadım yolu ile duyu analizler de yapılmaktadır. Şarap üretiminde uygulanan bu testler hammadde olan üzümü ve üretimin başarısını test etmeye yönelik analizlerdir.

2.8. Aroma Bileşenleri

Şarabın birincil aroması üzümlerden, ikincil aromaları ise şarap fermantasyonu sırasında non-*Saccharomyces* maya kullanımı ile ester ve diğer aroma bileşenlerinin oluşumundan elde edilir. Non-*Saccharomyces* mayalar, fermantasyon boyunca şarapta bulunarak fermantasyonun seyrini ve ortaya çıkan şarabın aroma profilini etkileyerek şarabın lezzetine katkıda bulunurlar (Jolly vd., 2003). Non-*Saccharomyces* mayaların kullanılmasının yanı sıra kullanılan üzüm çeşidi de şarabın aroma profili için oldukça önemlidir. Selli vd. (2004) çalışmalarında Kalecik Karası üzümünden üretilen şaraplarında alkoller, esterler, karbonil bileşenler, laktonlar, asitler ve fenoller gibi şarabın aroma profilini geliştiren birçok bileşen olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, bu bileşenlerin %90'ından fazlasının şarabın aroma profiline önemli ölçüde katkı sağlayan alkoller ve esterlerin oluşturduğunu ve şarabın aroma profilini zenginleştirdiğini belirtmişlerdir.

2.9. Duyusal Analizler

Moreira vd. (2016) kırmızı şaraplarda yillandırmanın, uçucu bileşenler ve duyu analizler üzerindeki etkisini rapor etmişlerdir. Türkiye'de de kaliteli şaraplık üzüm çeşitleri ve şarap tadım detayları irdelenmiştir (Anlı, 2010). Öküzgözü şaraplarda sıkma işleminin duyu özellikler üzerine etkileri çalışılmış (Tetik ve Selli, 2018) ve duyu analiz sonuçları örümcek ağı diyagramında (radar grafik) gösterilmiştir. Yine, Öküzgözü şaraplarında soğuk maserasyon işleminin antosiyaninler üzerine etkisi çalışılmış ve duyu analiz sonuçları verilmiştir (Kelebek vd., 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Üzümlerin Kaynağı ve Üretim

Proje önerisinde belirtildiği üzere Kalecik Karası, Öküzgözü, Boğazkere, Dimrit ve Emir 5 farklı üzüm çeşidinden 5 farklı şarap üretimi yapılmıştır. Üzümler Tablo 3.1'de gösterilen zamanlarda ve illerden toplanmıştır:

Tablo 3.1. Üzümlerin alındıkları iller ve zamanlar

Üzüm Çeşidi	Alındığı İl	Alındığı Zaman
Kalecik Karası	Ankara (Kalecik Bölgesi)	11.09.2017
Dimrit	Kapadokya, Nevşehir	19.09.2017
Emir	Kapadokya, Nevşehir	29.09.2017
Öküzgözü	Elazığ	01.10.2017
Boğazkere	Elazığ	01.10.2017

Kalecik Karası, Öküzgözü, Boğazkere, Dimrit ve Emir üzümlerinin yukarıdaki tabloda belirtilen illerden 24 saatin altında Ankara'ya ulaşması sağlanmıştır.

40'ar kiloluk üzüm numunelerinden şarap yapımı başlatılmıştır. Üzüm çeşitlerine Kalecik Karası K, Dimrit D, Öküzgözü O, Boğazkere B, Emir E olarak kodlama yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Geleneksel (Spontane) Şarap Yapımı

3.2.1.1. Üzümlerin Saplarından Ayrılması ve Patlatılması

Gelen üzümler saplarından ayrılmış ve patlatılmıştır. Bu aşamada, çekirdeklere zarar vermeden patlatmaya önem verilmiştir. Böylelikle, çekirdeğin acılığının şıraya bulaşması engellenmiştir. Her bir üzüm çeşidi patlatıldıktan hemen sonra üçe ayrılarak şarap üretim süreci başlamıştır. İlk iki paralel geleneksel yöntemle şarap üretimi için kullanılmış, son paralel hacimce %10'luk stok solüsyon hesaplanarak SO₂ derişimi 30 mg/L olacak şekilde potasyum metabisülfite eklenerek ticari yöntem için ayrılmıştır. Geleneksel şaraplar yanında ticari suşların kullanımı ile farklı şaraplar elde edilmiştir. Bu aşamada iki paralel kullanılmasının amacı herhangi bir şekilde oluşabilecek kontaminasyonu engellemektir. Ticari yöntemle yapmanın amacı da pozitif kontrolü sağlamaktır. Bu aşamada her bir üzüm çeşidinden numune alınarak hem özgül ağırlık, pH, sıcaklık, briks, kuru madde tayini, hem de gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) için total genomik DNA izolasyonu ve maya izolasyonu yapılmıştır.

3.2.1.2. Maserasyon Aşaması

Şarap yapımında iki çeşit maserasyon aşaması uygulanmıştır: Biri soğuk maserasyon, diğeri de normal maserasyondur (cibre fermentasyonu). Soğuk maserasyonun uygulanmasının amacı aroma bakımından şarabı zenginleştirmektir (Hierro vd., 2006). Bu yüzden şıralar önce 4 gün boyunca 4°C’de bekletilmiş ve her gün özgül ağırlığı ölçülmüştür. 4. günün sonunda özgül ağırlığı ölçülüp numune alındıktan sonra 20°C’de normal maserasyon aşamasına bırakılmıştır. Bu süreç boyunca sıcaklık klima yardımıyla 20°C’ye sabitlenmiştir.

Her iki maserasyon aşamasında, küf ürememesi ve şıranın oksijen alması için günde iki defa karıştırılmıştır.

3.2.1.3. Maya Aşılama, Fermantasyon Aşaması ve Sıkılarak Posanın Uzaklaştırılması

Geleneksel yöntemle üretilen şaraplarda herhangi bir aşılama işlemi uygulanmamıştır. Sadece pozitif kontrol için yaptığımız ticari şaraplara maya aşılama yapılmıştır. Maya aşılama sırasında Chr. Hansen markasının Merit adlı saf *S. cerevisiae* starter kültürü kullanılmıştır. 4°C’de bekleyen bu starter kültür alınıp 1 g maya/4 L şıra ölçüsüne göre tartılarak önce 35°C’de 10 dakika saf suyla aktive edilmiştir. Daha sonra eklenecek şıradan biraz alınıp yine 35°C’de 20 dakika bekletilerek mayanın şıraya adapte olması sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda maya şıraya ilave edilmiştir.

Kırmızı üzümler, özgül ağırlık 1.010 ile 1.020 arasına geldiğinde maserasyon aşaması sonlandırılıp şıra tülbent yardımıyla hafifçe sıkılmıştır. Posadan uzaklaşan şıra, 8 litrelik cam kavanozlara alınıp oksijen girişini engellemek için kabın ağzı hava kilidi ile kapatılmıştır. Bundan sonra oksijensiz ortamda alkolik fermentasyon başlamıştır ve 25°C’deki oda sıcaklığında özgül ağırlığı 990 olana kadar bu süreç devam etmiştir. Üzümdeki tüm şeker alkole dönüşmüştür.

Beyaz üzümlerin ise ilk ölçümleri yapıldıktan sonra direkt tülbent yardımı ile sıkılarak oksijensiz ortamda alkolik fermentasyonun başlaması için cam kavanozlara alınıp hava kilidi ile ağzı kapatılmıştır. 24 saat sonra cam kavanozların dibindeki tortudan kurtulmak amacıyla şıra, sifonlama yöntemi ile başka cam kaplara alınmıştır. 18°C’de özgül ağırlığı 990 olana kadar alkolik fermentasyon devam etmiştir. Ticari maya kullanılarak yapılan beyaz şaraplar için Laffort markasının Zymoflore VL1 Vin Blanc adlı *S. cerevisiae* kültürü kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Fermantasyon aşamasındaki kırmızı şaraplar

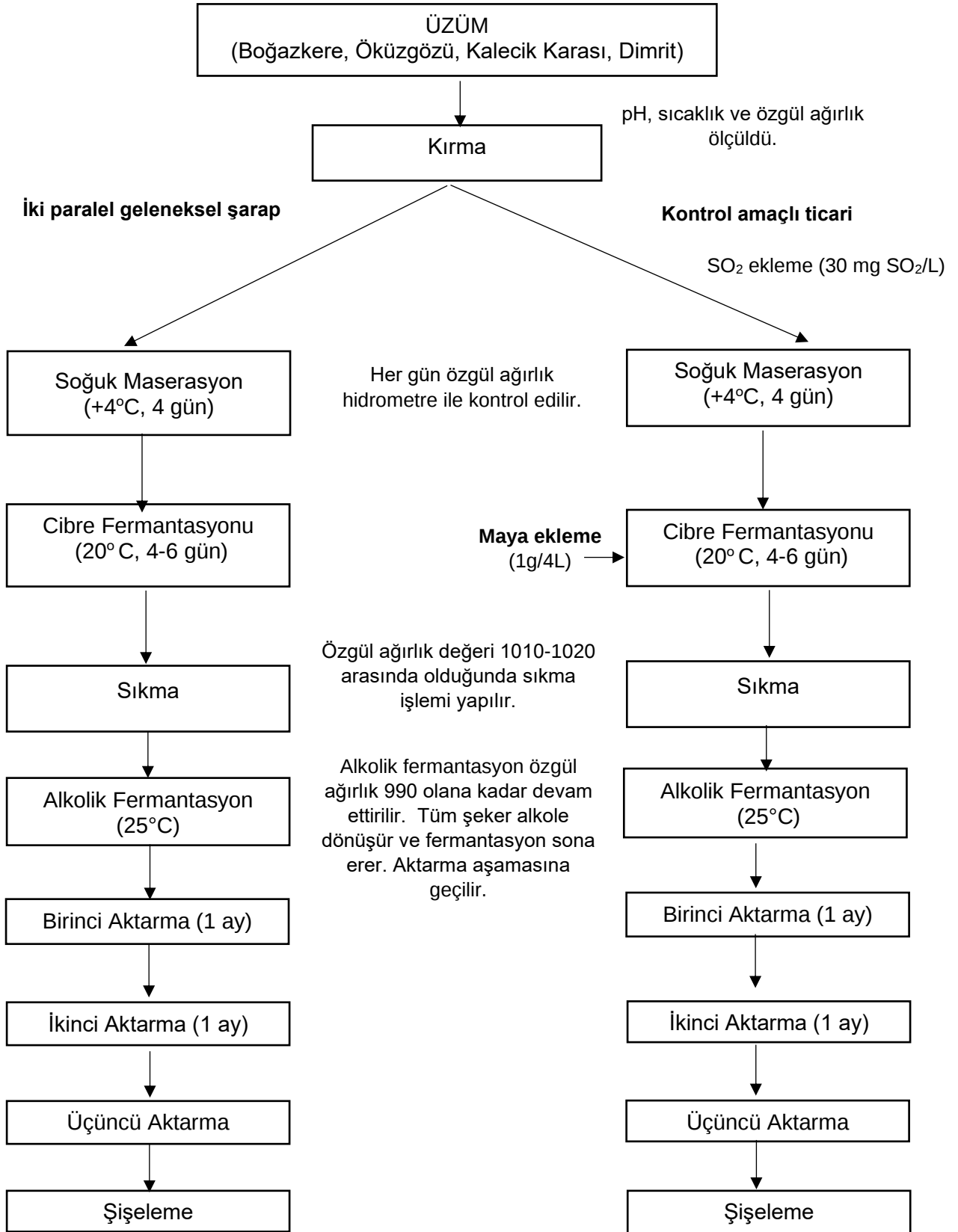
3.2.1.4. Filtrasyon ve Şişeleme

Şarabın berraklaştırılması için birer ay süre ile toplamda 3 defa sifonlama yöntemi ile filtrasyon uygulanmıştır. Filtrasyon işleminden sonra şaraplar yine sifonlama yöntemi ile yeşil şişelere alınıp mantar kapakları takılmıştır.



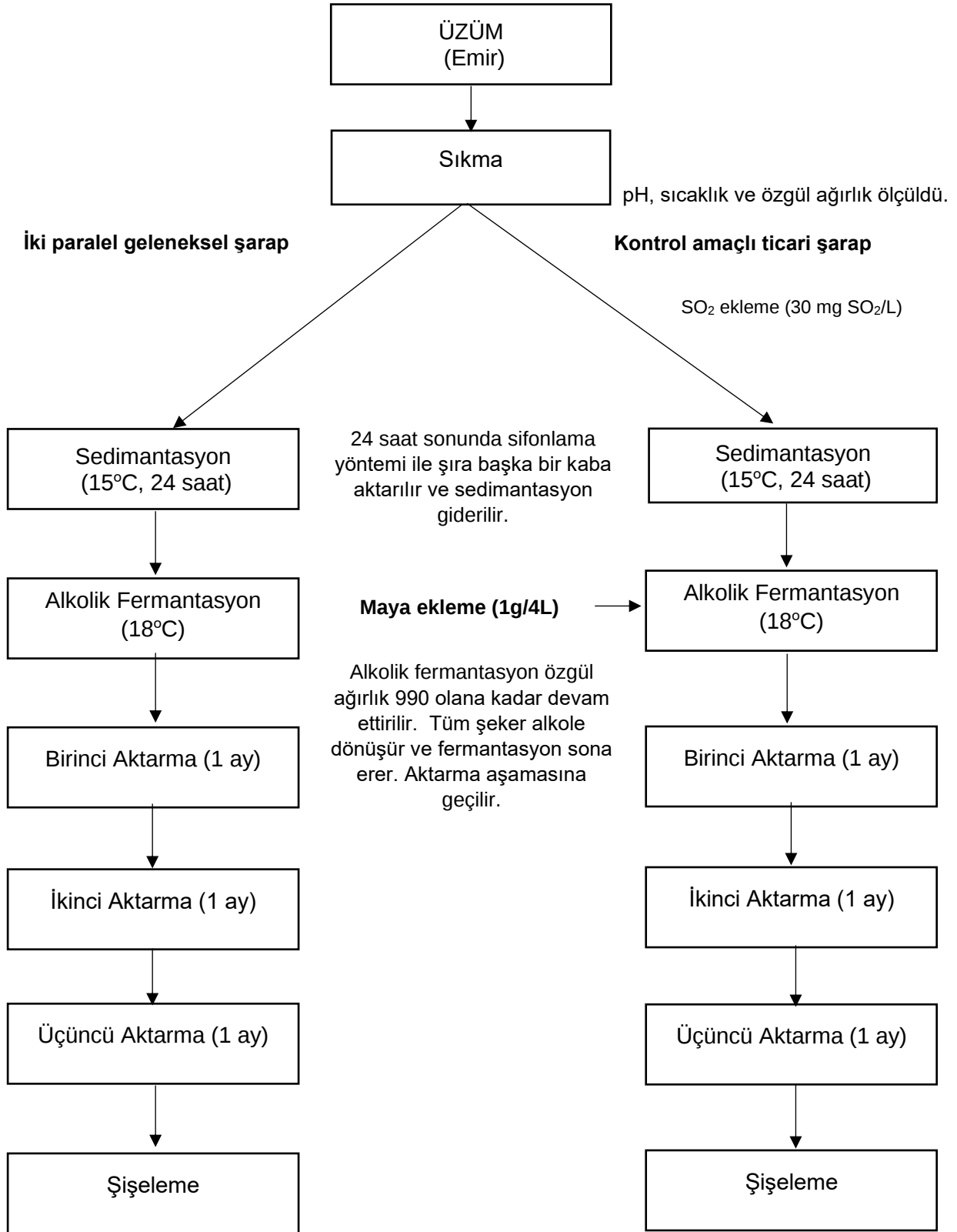
Şekil 3.2. Şişeleme

KIRMIZI ŞARAP AKIM ŞEMASI



Şekil 3.3. Kırmızı şarap akım şeması

BEYAZ ŞARAP AKIM ŞEMASI



Şekil 3.4. Beyaz şarap akım şeması

3.2.1.5. Örneklerin Alınması

Mayaların izolasyonu için her bir paralel geleneksel şarap örneklerinden 15 mL numune alındı (Her bir set için 5 mL, toplamda 3 set örnek alındı). Gerçek zamanlı PZR için her bir geleneksel şarap örneğinden 200 mL numune alındı (Tablo 3.2, 3.3, 3.4, 3.5). Analizde kullanılmayan numuneler önlem olarak -20°C' de saklanmıştır (Tristezza vd., 2014).

Tablo 3.2. Kalecik Karası için örneklerin alındığı zaman aralıkları

Geleneksel Şarap Paralel I		Geleneksel Şarap Paralel II		Ticari Şarap	
Zaman	Miktar	Zaman	Miktar	Zaman	Miktar
Soğuk maserasyonun 0. günü	200 mL+ 15 mL	Soğuk maserasyonun 0. günü	200 mL+ 15 mL	Alkolik fermantasyonun 4. haftası	200 mL
Soğuk maserasyonun 4. günü	200 mL+ 15 mL	Soğuk maserasyonun 4. günü	200 mL+ 15 mL		
Cibre fermantasyonun 2. günü	200 mL+ 15 mL	Cibre fermantasyonun 2. Günü	200 mL+ 15 mL		
Cibre fermantasyonun 4. günü	200 mL+ 15 mL	Cibre fermantasyonun 4. Günü	200 mL+ 15 mL		
Alkolik fermantasyonun 2. haftası	200 mL+ 15 mL	Alkolik fermantasyonun 2. Haftası	200 mL+ 15 mL		
Alkolik fermantasyonun 4. haftası	400 mL+ 15 mL	Alkolik fermantasyonun 4. Haftası	400 mL+ 15 mL		

Tablo 3.3. Boğazkere ve Öküzgözü için örneklerin alındığı zaman aralıkları

Geleneksel Şarap Paralel I		Geleneksel Şarap Paralel II		Ticari Şarap	
Zaman	Miktar	Zaman	Miktar	Zaman	Miktar
Soğuk maserasyonun 0. günü	200 mL +15 mL	Soğuk maserasyonun 0. günü	200 mL+ 15 mL	Alkolik fermantasyonun 4. haftası	200 mL
Soğuk maserasyonun 4. günü	200 mL +15 mL	Soğuk maserasyonun 4. günü	200 mL+ 15 mL		
Cibre fermantasyonun 6. Günü	200 mL +15 mL	Cibre fermantasyonun 6. Günü	200 mL+ 15 mL		
Alkolik fermantasyonun 2. Haftası	200 mL +15 mL	Alkolik fermantasyonun 2. Haftası	200 mL+ 15 mL		
Alkolik fermantasyonun 4. Haftası	400 mL +15 mL	Alkolik fermantasyonun 4. Haftası	400 mL+ 15 mL		

Tablo 3.4. Dimrit için örneklerin alındığı zaman aralıkları

Geleneksel Şarap Paralel I		Geleneksel Şarap Paralel II		Ticari Şarap	
Zaman	Miktar	Zaman	Miktar	Zaman	Miktar
Soğuk maserasyonun 0. günü	200 mL+ 15 mL	Soğuk maserasyonun 0. günü	200 mL+ 15 mL	Alkolik fermantasyonun 4. haftası	200 mL
Soğuk maserasyonun 4. günü	200 mL+ 15 mL	Soğuk maserasyonun 4. günü	200 mL+ 15 mL		
Cibre fermantasyonun 4. günü	200 mL+ 15 mL	Cibre fermantasyonun 4. günü	200 mL+ 15 mL		
Alkolik fermantasyonun 2. haftası	200 mL+ 15 mL	Alkolik fermantasyonun 2. haftası	200 mL+ 15 mL		
Alkolik fermantasyonun 4. haftası	400 mL+ 15 mL	Alkolik fermantasyonun 4. haftası	400 mL+ 15 mL		

Tablo 3.5. Emir için örneklerin alındığı zaman aralıkları

Geleneksel Şarap Paralel I		Geleneksel Şarap Paralel II		Ticari Şarap	
Zaman	Miktar	Zaman	Miktar	Zaman	Miktar
Fermantasyonun 0. günü	200 mL+ 15 mL	Fermantasyonun 0. günü	200 mL+ 15 mL	Fermantasyonun 4. haftası	200 mL
Fermantasyonun 1. haftası	200 mL+ 15 mL	Fermantasyonun 1. haftası	200 mL+ 15 mL		
Fermantasyonun 2. haftası	200 mL+ 15 mL	Fermantasyonun 2. haftası	200 mL+ 15 mL		
Fermantasyonun 3. haftası	200 mL+ 15 mL	Fermantasyonun 3. haftası	200 mL+ 15 mL		
Fermantasyonun 4. haftası	400 mL+ 15 mL	Fermantasyonun 4. haftası	400 mL+ 15 mL		

3.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR)

3.3.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) için DNA Ekstraksiyonu

DNA izolasyonu, genomik DNA izolasyonu sağlayan kit yardımıyla üretici firmanın belirlediği protokole göre gerçekleştirilmiştir (GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit, EUR_x, Cat. no. E3580, EUR_x, Poland). DNA izolasyonları için 2 mL üzüm şırası veya şarap numunesi kullanılmıştır. RT-PZR deneylerinde kullanım sonrası DNA -20°C'de saklanmıştır.

3.3.2. RT-PZR Yöntemi ile Şaraplarda Biyoçeşitliliğin Belirlenmesi

Biyoçeşitliliğin belirlenmesi için şaraplarda olabilecek ve starter kültür olarak kullanılabilecek *Saccharomyces* ve non-*Saccharomyces* mayalar belirlenmiş ve bu mayalar için kullanılacak primerler belirlenerek sipariş edilmiştir. Tespit edilmek istenen maya çeşitleri için kullanılan primerlerin dizisi, bağlanma sıcaklığı ve kaynaklar Tablo 3.6'de verilmiştir.

RT-PZR reaksiyonları için 25 µL reaksiyon karışımı hazırlanmıştır (1X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus ROX (Solis BioDyne, Estonya), ileri ve geri primer (100 nM), DNA (2 µl)). Toplam 25 µL hacim elde etmek için ultra saf su ilave edilmiştir. Her reaksiyon karışımı, ABI 7500 RT-PZR sistemi (Applied Biosystems, ABD) üzerine polipropilen optik 96 oyuklu plakalara yüklenmiştir. Her reaksiyon iki kez gerçekleştirilmiştir. Her primer seti (Tablo 3.6) için farklı bağlanma sıcaklığı (°C) kullanılmıştır. Karışımın sıcaklığı 2 dakika boyunca 50°C'ye ve daha sonra 10 dakika boyunca 95°C'ye kadar yükseltilmiş, ardından 15 saniye boyunca 95°C'de 40 döngü denatürasyon ve 1 dakika boyunca 54-66°C'de bağlanma/ekstansiyon yapılmıştır. Her kuyucuk için, 500-660 nm dalga boyu aralığında üst üste gelen spektrumlar oluşturularak yeşil floresan ışık emisyonu gerçek zamanlı olarak kaydedilmiş ve veriler özel yazılımla otomatik olarak analiz edilmiştir (SDS versiyon 1.3.1, Applied Biosystems). Analizler

için tespit eşik döngüsü, C_T , floresan ile ilgili birimler kullanılmıştır. Erime eğrisi analizleri, her deney için 60°C ila 95°C arasındaki floresansın 0.5°C'lik artışlarla sürekli olarak izlenmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6. RT-PZR analizi için kullanılan spesifik primerler

Maya Türleri	Primerler Adı	Primerler Sekansı (5'- 3')	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Kaynak
<i>Candida glabrata</i>	CG-5fw GC-3bw	GAGGGTGTCTAGTTCTTTGT GTGAGCTGCGAGAGTC	56	Diaz vd., 2013
<i>Candida zemplinina</i>	CZ-2 CAST	CTTGGGTGTCGAAAGGCG CAATATGCGTTCAAAAATTCAAT	62	Zott vd., 2010
<i>Candida zeylanoides</i>	CZ-5fw CZ-3bw	CGATGAGATGCCCAATTCCA GAAGGGAACGCAAAATACCAA	58	Diaz vd., 2013
<i>Hanseniaspora</i> spp.	Hauf 2L Hauf 2R	CCCTTTGCCTAAGGTACG CGCTGTTCTCGCTGTGATG	62	Zott vd., 2010
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	HU-5fw HU-3bw	GGCGAGGGATACCTTTTCTCTG GAGGCGAGTGCATGCAA	59	Diaz vd., 2013
<i>Issatchenkia orientalis</i>	ISA 1 ISA 2	GTTTGAGCGTCGTTTCCATC AGCTCCGACGCTCTTACAC	62	Zott vd., 2010
<i>Lachancea thermotolerans</i>	LTH2-F LTH2-R	CGCTCCTTGTTGGGTGGGGAT CTGGGCTATAACGCTTCTCC	60	Garcia vd., 2017
<i>Metschnikowia</i> spp.	Mt8F Mt8R	TTCTCACCCTCGTAAGACTACC CGGACCCAAATCTCTTCAAATT	66	Wang vd., 2020
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MPL3 MPR3	CTCTCAAACCTCCGTTTG GATATGCTTAAGTTCAGCGGG	60	Zott vd., 2010
<i>Pichia fermentans</i>	PF-5fw PF-3bw	TTGCCTATGCTCTGAGGCC TCCATGTGCGGCGCAAT	61	Diaz vd., 2013
<i>Pichia kluyveri</i>	PK-5fw PK-3bw	AGTCTCGGGTTAGACGT GCTTTTCATCTTTCCTTCACA	55	Diaz vd., 2013
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	RM-5fw RM-3bw	GCGCTTTGTGATACATTTTC CCATTATCCATCCCGGAAAA	54	Diaz vd., 2013
<i>Saccharomyces</i> spp.	SC 1 SC 2	GAAAACTCCACAGTGTGTTG GCTTAAGTGC GCGGTCTTG	63	Zott vd., 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SC-5fw SC-3bw	AGGAGTGCGGTTCTTTCTAAAG TGAAATGCGAGATTCCCCCA	59	Diaz vd., 2013
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Tods L2 Tods R2	CAAAGTCATCCAAGCCAGC TTCTCAAACAATCATGTTTGTTAG	63	Zott vd., 2010
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	PA-5fw PA-3bw	ACGTCATAGAGGGTGAGAAT AAACACCAAGTCTGATCTAATG	57	Diaz vd., 2013

Candida zemplinina (*Starmerella bacillaris*); *Lachancea thermotolerans* (*Kluyveromyces thermotolerans*); *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*).

Absolut kantifikasyon için standart materyal gerekmektedir. Bu nedenle, bilinen bir kopya sayısına (RNA, cDNA, plazmid DNA, genomik DNA) veya mikroorganizma sayısına sahip materyal, standart bir eğri için seyreltme serisi oluşturmak suretiyle seyreltilir. Miktar tayini yapılmak istenen örnekler ile standart dilüsyon serilerinin eşik döngüsü (threshold cycle, C_T) karşılaştırılır ve bilinmeyen örneklerin miktarını tahmin etmek için kullanılır. Absolut kantifikasyon sayıları büyük ölçüde standardın doğruluğuna bağlıdır. Ayrıca, örneklerin amplifikasyon verimliliği ve standartların amplifikasyon verimliliği aynı olmalıdır. Son olarak, aynı reaksiyon koşulları, bilinmeyen örneklerin yanı sıra standartlara da uygulanmalıdır. Bu

nedenle, bir standardın eşik çevrim değerleri, her bir deneyde numunelerinkilerle birlikte belirlenir (Hierro vd., 2006; Feckler vd., 2017).

Üzüm sırasında ve şarap örneklerinde hedef non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* mayalarının miktarını belirlemek ve spesifik ve güvenilir veriler elde etmek için kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Standart eğri konstrüksiyonu için, Almanya'daki Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) firmasından temin edilen dört referans maya suşu *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae* kullanılmıştır. Dört referans maya suşunun aktifleştirilmesinden sonra, YPG besiyerinde büyütülen *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae* kültürleri, 4000x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar atılmış ve peletler steril pepton tamponunda yeniden süspanse edilmiştir. Yıkama aşamasını iki kez tekrardan sonra, peletler 2 mL filtre ile sterilize edilmiş ve kırmızı üzüm suyunda yeniden süspanse edilmiştir. Bu kültürler daha sonra filtre ile sterilize edilmiş kırmızı üzüm suyunda (daha önce 0.2 µm'lik bir filtreden geçirilerek) seri olarak seyreltilmiştir. Her 10 kat dilüsyondan 100 µL YPG agar besiyerine ekim yapılmıştır ve her dilüsyonda mililitre başına koloni oluşturma birimleri (kob) elde etmek için 25°C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. DNA, tekrar yukarıda açıklandığı gibi üreticinin protokolüne göre GeneMATRIX DNA Saflaştırma Kiti (EURx, Polonya) kullanılarak 2 mL paralel dilüsyonlardan izole edilmiştir. Elde edilen DNA, daha sonra yukarıda belirtilen qPZR reaksiyonlarında kullanılmıştır. Bilinmeyen örneklerin kantifikasyonu ve amplifikasyon veriminin belirlenmesi için standart eğriler oluşturulmuştur (bu seyreltme serilerinden DNA üzerinde gerçekleştirilen qPZR reaksiyonlarının C_T değerlerini log hücre sayısı mL^{-1} 'e karşı çizerek). Tüm standart eğriler en az iki bağımsız deneyi temsil etmiştir.

Standart eğriler, maya hücrelerinin seyreltme serilerinin DNA'sı üzerinde gerçekleştirilen qPZR'lerin döngü eşik (C_T) değerlerinin, log hücre sayıları mL^{-1} 'e karşı çizilmesiyle oluşturulmuştur.

Dört farklı suş *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae*, kırmızı şarapta seri olarak seyreltilerek standart eğrilerin yapımı için kullanılmıştır. Amplifikasyon verimliliği (efficiency; E), standart eğrideki regresyon hattının eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Etkililik (efficiency; E), $E=10^{-1/\text{eğim}}$ ve $E(\%)=(E-1)*100$ formülü ile bulunmuştur (Pfaffl, 2001). -3.32'ye yakın bir eğim optimal kabul edilmiştir, %100 PZR amplifikasyon verimliliğini göstermektedir.

3.4. Spontane Şaraplardan non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* Maya İzolasyonu

3.4.1. Non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* Mayaların İzolasyonu

Belirtilen zamanlarda alınan numuneler seyreltilmiş, sonrasında iki farklı besiyere ekimi yapılmıştır. Bu aşamada non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* mayalar için farklı besiyerler kullanılmıştır.

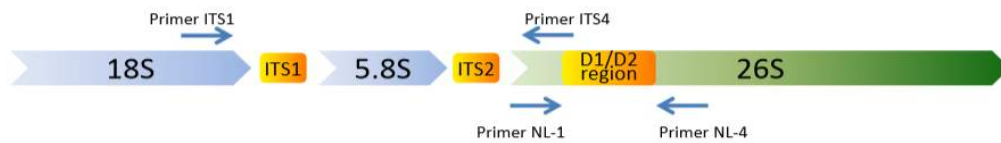
Besiyerlerden bir tanesi non-*Saccharomyces* için seçici diğeri ise *Saccharomyces* için seçicidir. Non-*Saccharomyces* için seçici olan besiyerlerden biri lizin besiyeri (Van Der Aa Kühle ve Jespersen, 1998) diğeri ise sikloheksimid, bifenil ve kloramfenikol eklenerek oluşturulan maya ekstraktı-pepton-glikoz (yeast extract-peptone-glucose (YPG)) agarıdır (Zott vd., 2010). Non-*Saccharomyces* maya izolasyonu aşamasında fark edilen ve literatürde de değinilen küf üremesi sorunları lizin agar kullanımı ile giderilmiştir.

Saccharomyces için seçici olarak kullanılan besiyer ise ethanol sülfat agarıdır (ESA) (Kish vd., 1983; Heard ve Fleet, 1985). Bu besiyerlerde büyüyen mikroorganizmalar maya ekstraktı-pepton-glikoz (YPG) agarında iki defa pürifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. En son aşamada, elde edilen tek kolonilerin sıvı besiyere ekimi yapılmış ve %15 gliserol solüsyonu olacak şekilde stok kültürler oluşturulup -80°C'ye konulmuştur.

3. 5. Non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* Mayaların Moleküler Teknikler ile Tanısı

3.5.1. 5.8 rDNA-ITS-18S (ITS bölgesi) Sekanslama ile İdentifikasyonu (Moleküler Tanı)

Elde edilen izolatların öncelikle DNA izolasyonu yapılmıştır. Bunun için EurX Gene Matrix DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Daha sonra elde edilen DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (ABD) cihazında spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. PZR çalışmalarında evrensel primer olan ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılmıştır.

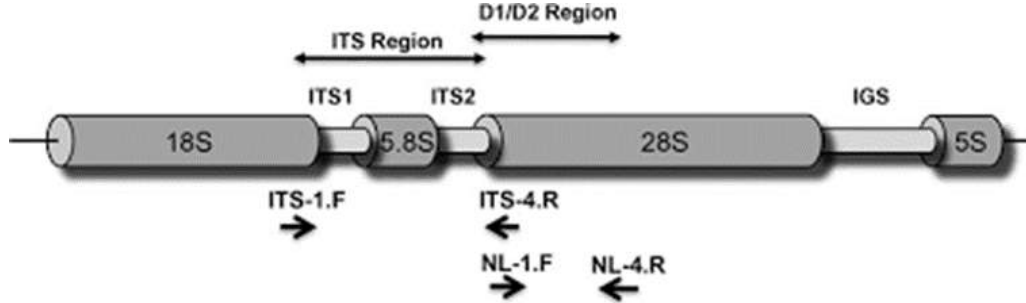


Şekil.3.5. ITS bölgesi ve D1/D2 domain primerleri (Morata vd., 2018)

Kullanılan primer (Internal transcribed spacer ((ITS) bölge primerleri) dizileri aşağıda verilmiştir: ITS1 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' ve ITS4 5'TCCTCCGCTTTATTGATATGC 3' (Chavan vd., 2009, White vd., 1990). PZR koşulları ise şöyledir; 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 35 döngü boyunca (95°C'de 45 saniye boyunca denatürasyon, 57°C'de 45 saniye boyunca bağlanma ve 72°C'de 60 saniye boyunca ekstansiyon), 72°C'de 5 dakika boyunca final ekstansiyonu, sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PZR tamamlanmıştır.

3.5.2. D1/D2 Domain Sekanslama

D1/D2 domain bölgesi sekanslanması için NL-1
5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3' ve NL-4 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'
primerleri kullanılmıştır (O'Donnell, 1993).



Şekil 3.6. ITS bölgesi ve D1/D2 domain (Romanelli vd., 2014)

26 S D1/D2 bölgesi sekansı metinde bundan sonra D1/D2 domain sekans olarak kısaltılacaktır.

3.6. Biyokimyasal Karakterizasyon

3.6.1. Karbonhidrat Fermantasyon Paternleri

4.5 g/L maya ekstraktı ve 7.5 g/L pepton distile su içinde çözülmüş 100 mL besiyerinde 4 mL olacak şekilde bromotimol stok solüsyondan (50 mg/75mL) yeşil rengi vermek üzere eklenmiştir. Besiyerinin otoklavlaması sonrası filtrasyon ile steril edilmiş 7.8 g/L glikoz, sükroz, maltoz, mannitol ve laktoz her besiyerine ayrı olacak şekilde eklenmiştir. Mikrotitre plakalardaki kuyucuklardaki 100 µL şeker besiyerine 10 µL mikroorganizma olacak şekilde inoküle edilmiştir. Mikrotitre plakalar 25°C'de 3 gün inkübe edilmiştir. Yeşil renkten sarıya renk değişikliği gözlenmiştir (Kurtzman vd., 2011; Ru vd., 2017).

3.6.2. Fenotipik Karakterizasyon

Mikroorganizmalar etanol, SO₂ direncine ve H₂S üretmemesine göre elimine edilerek, daha sonra uygun izolatlar karbonhidrat testine tabi tutulmuştur.

3.6.2.1. Alkol Tolerans Testi

10⁶ CFU/mL sayısına ulaşan mikroorganizmalar %0, 10, 13, 15 (v/v) etanol içeren YPG sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. 3 gün 30°C'de etüvde bekletilmiştir (Guimaraes vd., 2006).

3.6.2.2. SO₂ Direnç Testi

10⁶ CFU/mL sayısına ulaşan mikroorganizmalar 0, 50, 100, 150, 200 mg/L SO₂ içeren YPG sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. 3 gün 30°C'de etüvde bekletilmiştir (Bağder, 2014).

3.6.2.3. Sıcaklık Tolerans Testi

24 saat boyunca aktifleşen mikroorganizmalar YPG sıvı besiyerine alınıp 28°C, 37°C, 45°C sıcaklığındaki inkübatörlerde 72 saat bekletilmiştir (Guimarães vd., 2006).

3.6.2.4. pH Tolerans Testi

24 saat boyunca aktifleşen mikroorganizmalar pH değeri 3, 4 ve 6 olan YPG sıvı besiyerlerine konulup 28°C'de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Bağder, 2014).

3.6.2.5. H₂S Üretim Testi

Aktifleştirilen mikroorganizmalar BIGGY (Bismuth Sulfite Glucose Glycine Yeast) agarına ekimi yapılmıştır. 3 gün 30°C'de inkübatörde kalmıştır. H₂S üretim durumlarına, BIGGY agardaki kolonilerin renklerine göre karar verilmiştir, 1: beyaz, 2: krem, 3: açık kahverengi, 4: kahverengi, 5: koyu kahverengi, 6: siyah (Sipiczki vd., 2001). Pozitif kontrol olarak *Candida* spp. Kullanılmıştır.

Toplam 293 adet *Saccharomyces* maya izolatu için etanol direnci, SO₂ direnci ve H₂S üretimi gibi enolojik karakterizasyon (Vigentini vd., 2016) çalışmalarına başlanmıştır. Bu özelliklere göre belirlenen *Saccharomyces* izolatları seçilerek biyokimyasal tanımlar ve teyit etmek amaçlı genotipik tanımlamalar gerçekleştirilmiştir.

3.7. ITS-RFLP

3.7.1. ITS-RFLP için DNA İzolasyonu

Mayaların genomik DNA'sı, üreticinin talimatları izlenerek Bakteri ve Maya DNA İzolasyon Kiti (EurX GeneMatrix) kullanılarak izole edilmiştir. Her numune için DNA konsantrasyonu Thermos Scientific Nanodrop 2000 (ABD) ile belirlenmiştir.

3.7.2 ITS-PZR Metodu

ITS gen bölgesi, ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') ve ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. 5x FIREPol® Master Mix (Solis Bio Dyne), ITS1 ve ITS4 primerleri (10 pmol / µL), su ve DNA örneği içeren 50 µL reaksiyon karışımı hazırlanarak DNA amplifikasyonu uygulanmıştır. PZR koşulları; 95°C'de 12 dakika başlangıç denatürasyonu; 30 döngü boyunca (95°C'de 1 dakika boyunca denatürasyon, 56°C'de 1 dakika boyunca bağlanma, 72°C'de 2 dakika boyunca ekstansiyon), 72°C'de 7 dakika boyunca final ekstansiyonu, sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PZR tamamlanmıştır.

3.7.3. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim

PZR ile çoğaltılan ITS gen bölgesi *Saccharomyces* ve non-*Saccharomyces* türlerine uygun olan restriksiyon enzimleri ile (*Hae*III, *Hin*fl, *Cfo*I (*Hha*I), *Hpa*II, *Dde*I ve *Dra*I) kesilmiştir. Bu işlem için, tampon çözeltisi (10X ONE Buffer), 100X BSA (Bovine Serum Albumin),

restriksiyon enzimi, su ve PZR ürünü kullanılarak 50 µL karışım hazırlanmıştır ve enzimlerin optimum sıcaklığı olan 37°C'de 1-2 saat arası inkübe edilerek PZR ürünlerini kesme işlemi tamamlanmıştır (Pham vd., 2011).

3.7.4. Jel Elektroforezi

PZR ve RFLP sonucunda elde edilen DNA parçalarını analiz etmek için jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır ve DNA parçaları jel üzerinde yürütülerek büyüklüklerine göre ayrılmıştır. PZR sonucunda elde edilen parçalar %2'lik (w/v) agaroz jel kullanılarak 100 V'da 75 dakika yürütülmüştür. RFLP sonucunda elde edilen parçalar ise %3'lük (w/v) agaroz jel kullanılarak 100 V'da 85 dakika yürütülmüştür (Esteve-Zarzoso vd., 1999). 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne) markör olarak kullanılmıştır. Bantları boyamak ve UV altında görünür hale getirmek için jel yürütüldükten sonra etidyum bromür ve su karışımında 45 dk bekletilmiş ve saf suda 30 dk bekletilerek yıkama yapılmıştır. Bu süre sonunda jel UV ışık altında incelenmiş ve Quantity One programı yardımıyla jel fotoğrafları elde edilmiştir.

3.8. Suş Seviyesinde Genotipik Farklılıklar

3.8.1. Darbeli Alan Jel Elektroforezi (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) yüksek boyutlu DNA'ları veya kromozomları agaroz jelde ayırıştıran bir yöntemdir. Kromozomların ayırıştırılması karyotipleme olarak bilinmektedir (Hage ve Houseley, 2013). PFGE yöntemi suş farklılıklarını ortaya koymaktadır. *Saccharomyces sensu stricto* mayaları kromozomları bu yöntem ile farklılaştırılabilmektedir (Raspor vd., 2001; Kallai vd., 2019).

3.8.1.1. Malzemeler ve Tampon Hazırlama

- Steril deiyonize su
- Saf su
- Yeast Extract Peptone Glucose sıvı besiyeri (YPD; 10 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton ve 20 g/L glikoz).
- YPG agar (10 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 20 g/L glikoz ve 20 g/L agar, ortofosforik asit kullanılarak pH 4.5'e ayarlanmıştır).
- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)
- Tris (hidroksimetil) aminometan (Tris bazı)
- Borik asit
- Sodyum hidroksit
- Sodyum fosfat (0.01 M)
- N-Sodyum Lauroil Sarkosinat
- %50 Gliserol

- Proteinaz K: Steril deiyonize su içinde 20 mg/mL çözelti hazırlanmıştır ve -20°C'de saklanmıştır.
- Litikaz (50 KU)
- %9 beta-merkaptotanol
- 10X Tris-Borate-EDTA (TBE) stok solüsyon: 108 g tris, 55 g borik asit, 7.5 g EDTA ve 1 L deiyonize su iyice karıştırılmıştır ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlanmıştır.
- 1X TBE tampon çözelti: 50 mL 10X TBE ve 450 mL steril deiyonize su karıştırılmıştır.
- 1 M tris stok solüsyonu: 121.14 g tris bazı, 800 mL H₂O içinde çözöldü. Konsantre HCl eklenerek pH istenen değere ayarlanmıştır. Çözelti, pH'a son ayarlamaları yapmadan önce oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Solüsyonun hacmi, ddH₂O ile 1 L'ye ayarlanmıştır. Solüsyon, 15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanmıştır.
- 1 M EDTA, pH 7.5; 0.5 M EDTA, pH 9.0; 0.05 M EDTA, pH 7.5.
- LET tampon çözelti: 0.5 M EDTA, 0.01 M Tris, pH 7.5.
- NDS tampon çözelti: 0.5 M EDTA, 0.01 M Tris, pH 7.5, %1 (w/v) N-Sodyum Lauroil Sarkosinat sodyum.
- Low-melting-point (LMP) agaroz (%2 in 1X TBE) (DNA plug hazırlanması için)
- %2 LMP agaroz
- %1 LMP agaroz
- Yürütme tampon çözeltisi: 110 mL 10X TBE tamponu ve 2090 mL deiyonize su karıştırılmıştır.
- 10 mg/mL thiourea solüsyonu: 0.5 g thiourea ve 50 mL steril deiyonize su karıştırılmıştır.
- 0.5 µg/mL etidyum bromür solüsyonu (stok solüsyon 1 mg/mL).
- Contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) DNA markörü (*S. cerevisiae*, Bio-Rad).

3.8.1.2. PFGE Yöntem

6 mL'lik YPD sıvı besiyerinde 36-48 saat büyütölmüş *S. cerevisiae* 8000 rpm'de 5 dakika santriföj edilmiştir ve çökelti 300 µl 0.05 M EDTA, pH 8 içinde yeniden süspanse edilmiştir. 1 mg/mL litikaz (Sigma) içeren 100 µl sodyum fosfat solüsyonuna (0.01 M), gliserol %50 (v/v) eklenmiştir ve 45°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. 600 µl %2 LMP agarozu tüplere eklenmiştir ve blok (plug) modöllerı dökölmüştür. Oda sıcaklığında katılaştırıldıktan sonra, *S. cerevisiae* hücrelerini içeren agaroz blokları modölden çıkarılarak ve %9 (v/v) merkaptotanol içeren LET tampon çözelti ile 37°C'de gece boyunca karıştırılmıştır. Plaklar NDS'de proteinaz K (1 mg/mL, Sigma) ile muamele edilerek 12-18 saat 50°C'de inkübe edilmiştir. Bloklar 3 kez 15'er dakika yıkanmıştır. 5 mL 0.5 M EDTA (pH 9.0) bloklara eklenmiş ve bloklar 4°C'de

saklanmıştır. PFGE, CHEF sistemi (Bio-Rad) ile DNA'lar analiz edilmiştir. Kesilmiş *S. cerevisiae* blok parçacıkları agaroz jele (%1) yerleştirilerek, 24 saat 14°C'de tampon çözelti içinde başlangıç ve final zamanı 60 ve 120 s olarak değişen vuruşlar kullanılarak 6 V/cm voltajda yürütülmüştür. Sonraki işlem olarak jel 0.5 µg/mL etidyum bromür içeren 1X TBE ile 45 dakika boyanmıştır ve boya, agaroz jeli distile su içinde 30 dakika bekleterek akıtılmıştır. Jel UV ışığı altında fotoğraflanmıştır (Cocolin vd., 2004).

Markör olarak 225-2,200 kilobaz *S. cerevisiae* kromosomal DNA boyutlu (catalog number; 170-3605, Bio-Rad) CHEF kullanılmıştır. Bu markörün yaklaşık DNA boyutları 225, 285, 365, 450, 565, 610, 680, 750, 785, 825, 945, 1,020, 1,125, 1,600 ve 2,200 kb'dir (Şekiller ve bulgular tartışma bölümünde gösterilmiştir).

3.8.2. RAPD-PZR

Mayaların DNA'ları EurX Gene Matrix Bacterial & Yeast DNA Isolation Kit (E3580) ile üretici firma tarafından verilen direktiflerle izole edildikten sonra 10'lu primer (OPA-03), yabancı faj genomundan minisatelit primeri M13 (Pfliegler vd., 2014) ve 2 mikrosatelit primeri ATG₅ ve (GTG)₅ ile RAPD-PZR çalışmaları yapılmıştır (Tablo 3.7) (Walczak vd., 2007; Bujdosó vd., 2001b). PZR reaksiyonları 30 µL reaksiyon karışımı, 18.4 µL distile su, 0.5 µL *Taq* DNA polimeraz (5 U; Solis BioDyne), 0.6 µL 100 mM primer, 3 µL 10X tampon çözelti (Solis BioDyne) [0.8 M Tris-HCl, 0.2 M (NH₄)₂SO₄, %0.2 w/v Tween-20], 2 mL 25 mM MgCl₂ ve 0.5 µL 4 mM dioksinükleozit trifosfat (dNTP) karışımı (Walczak vd., 2007) (Bujdosó vd., 2001a) ile yapılmıştır.

Mikrosatelit-PZR yönteminde kullanılan prosedür ile RAPD-PZR tekniğinde kullanılan prosedür aynıdır (Bujdosó vd., 2001a). DNA amplifikasyonu aşağıda belirtilen protokol ile sürdürülmüştür. Başlangıç olarak, 94°C'de 5 dakika bekledikten sonra, denatürasyon 94°C'de 1 dakika, bağlanma (annealing) üretici firmanın önerdiği primere özel bağlanma sıcaklığında 1 dakika olarak uygulanmıştır (Table 3.7). Daha sonra 0.6°C/s ile 72°C'ye çıkılmış ve 72°C'de 2 dakika beklenmiştir. 35 döngü uygulanarak işlem tamamlanmıştır. Reaksiyon döngülerinin sonunda, PZR ürünü %2'lik agaroz jele yüklenmiştir ve 0.5 mg/mL etidyum bromür ile boyanarak DNA bantları UV ışığı altında incelenmiştir.

Tablo 3.7. Kullanılan oligonükleotitler

Primer	Sekans	T _m (°C)	Uygulama	Kaynak
OPA03	5'-AGTCAGCCAC3'	32°C	RAPD-PZR	Bujdosó G vd., 2001a
M13	5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'	55°C	Minisatelit-PZR	De Benedictis vd., 2011; Bovo vd., 2009; Pfliegler vd., 2014
(ATG) ₅	5'-ATGATGATGATGATG-3'	38°C	Mikrosatelit-PZR	De Benedictis vd., 2011
(GTG) ₅	5'-GTGGTGGTGGTGGT-3'	52°C	Mikrosatelit-PZR	De Benedictis vd., 2011

3.9. Yerel non-Saccharomyces ve Yerel/Ticari Saccharomyces Suşlarının Sıralı İnokülasyonu ile Kalecik Karası Şarap Yapımı

3.9.1. Maya Suşları

L. thermotolerans O9, *W. anomalus* K41, *M. pulcherrima* D3 ve *H. opuntiae* K2 olmak üzere dört tane seçilmiş yerel non-Saccharomyces suşu ve iki tane *S. cerevisiae* suşu: *S. cerevisiae* K71 ve ticari *S. cerevisiae* (Laffort, RB2) mayası Kalecik Karası üzümünden elde edilen şıraya sıralı olarak inoküle edilmiştir (Tablo 3.8). Bununla beraber, sadece ticari *S. cerevisiae* (Laffort, RB2) mayası kullanılarak kontrol şarabı yapılmıştır.

Tablo 3.8. Şarap yapımında kullanılan starter kültürler

Şaraplar	non-Saccharomyces Suş			Saccharomyces Suş		
	Suş Adı	İsimlendirme		Suş Adı	İsimlendirme	
1.L.T + S.C	<i>L. thermotolerans</i>	O9	OB 4CM NS4	<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2
2.L.T + Laffort S.C	<i>L. thermotolerans</i>	O9	OB 4CM NS4	Laffort <i>S. cerevisiae</i>	RB2	RB2
3.W.A + S.C	<i>W. anomalus</i>	K41	KA 0CM S1	<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2
4.M.P + S.C	<i>M. pulcherrima</i>	D3	DA 0CM NS3	<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2
5.H.O + S.C	<i>H. opuntiae</i>	K2	KA 0CM NS2	<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2
6.S.C	-	-	-	<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2
7.Laffort S.C	-	-	-	Laffort <i>S. cerevisiae</i>	RB2	RB2

K, Kalecik Karası; O, Öküzgözü; D, Dimrit üzüm çeşitleri; A, A paralel; B, B paralel; CM, soğuk maserasyon; NM, maserasyon.

3.9.2. Starter Kültürlerin Hazırlanması ve İnokülasyonu (Biomass Production)

Mayalar, YPG besiyeri (10 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton ve 20 g/L glikoz) içeren 200 mL'lik erlenmeyerde 2-3 gün 30°C sıcaklıkta inkübe edilerek aktive edilmiştir. İnkübasyondan sonra maya toplamak için erlenmeyerler tuzlu su çözeltisi (%0.9'luk NaCl (w/v)) ile yıkanmıştır (Minnaar vd., 2019). Maya örnekleri tuzlu su çözeltisi (%0.9'luk NaCl (w/v)) eklenerek 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üst sıvı (supernatant) dökülerek uzaklaştırılmış ve çökelti (pellet) saf su ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra maya hücre sayımı (yeast plate count protocol) yapılmıştır (Tournas vd., 2001) ve mayalar şarap yapımında starter kültür olarak kullanılmıştır. Ticari *S. cerevisiae* (Laffort, RB2) mayası (aktif kuru maya) üreticinin talimatları doğrultusunda saf su eklenerek aktive edilmiştir.

L. thermotolerans, *W. anomalus*, *M. pulcherrima* ve *H. opuntiae* suşları sırasıyla 5.4×10^5 , 8.2×10^5 , 4.6×10^4 ve 6.2×10^5 CFU/mL oranında 0. günde Kalecik Karası üzüm şıralarına inoküle edilmiştir. 2. gün ise non-Saccharomyces suşları bulunan bu kavanozlara 3×10^6 CFU/mL *S. cerevisiae* K71 suşu inoküle edilmiştir (sıralı inokülasyon, 1. kavanozda L.T+S.C, 3. kavanozda W.A+S.C, 4. kavanozda M.P+S.C, 5. kavanozda H.O+S.C). Bununla

birlikte, 3×10^6 CFU/mL *S. cerevisiae* K71 suşu, 0. günde 6. kavanozdaki Kalecik Karası üzüm şirasına inoküle edilmiştir.

Saf su eklenerek aktive edilen ticari *S. cerevisiae* (Laffort, RB2) mayası üreticinin talimatları doğrultusunda 0.3 g maya/L şıra oranında 2. gün 2. kavanozdaki *L. thermotolerans* suşu bulunan Kalecik Karası üzüm şirasına inoküle edilmiştir. Bununla birlikte, kontrol şarabı için, 0. gün ticari *S. cerevisiae* (Laffort, RB2) mayası 0.3 g maya/L şıra oranında 7. kavanoza eklenmiştir (Tablo 3.8). Tüm şaraplar iki paralel olarak hazırlanmıştır.

3.9.3. Maserasyon ve Fermantasyon Aşaması

Maserasyon aşamasında (0-3. günler) şaraplar 20-23°C'de tutulmuş, günde üç kez havalandırma işlemi yapılarak cibrenin ıslanması sağlanmıştır. Her gün, özgül ağırlık (hidrometre ile) ve briks (refraktometre ile) değerleri kontrol edilmiştir. Toplam asit ve pH gibi diğer enolojik analizler ise WineScan™ (FOSS, Danimarka) cihazıyla yapılmıştır. Özgül ağırlık 1.040 g/m³ olduğunda *S. cerevisiae* suşu eklenmiş (2. gün) ve fermantasyonun devamı sağlanmıştır. Özgül ağırlık 1.025 g/m³ altına düştüğünde ise birinci aktarma (sifonlama) yapılarak cibre şaraptan ayrılmıştır. Bu aşamada sıkma işlemi yapılmamış ve sadece serbest şarap kısmı alınmıştır. Şaraplar cam kavanozlara alınarak hava kilidi takılmış ve oksijen girişi engellenmiştir. Şaraplar 25°C'de tutularak alkolik fermantasyon devam etmiştir. Özgül ağırlığın 1.000 g/m³ altına düşmesiyle alkolik fermantasyon tamamlanmış (13.gün) ve alkol, toplam asit, pH, uçar asit, indirgen şeker analizleri yapılmıştır.

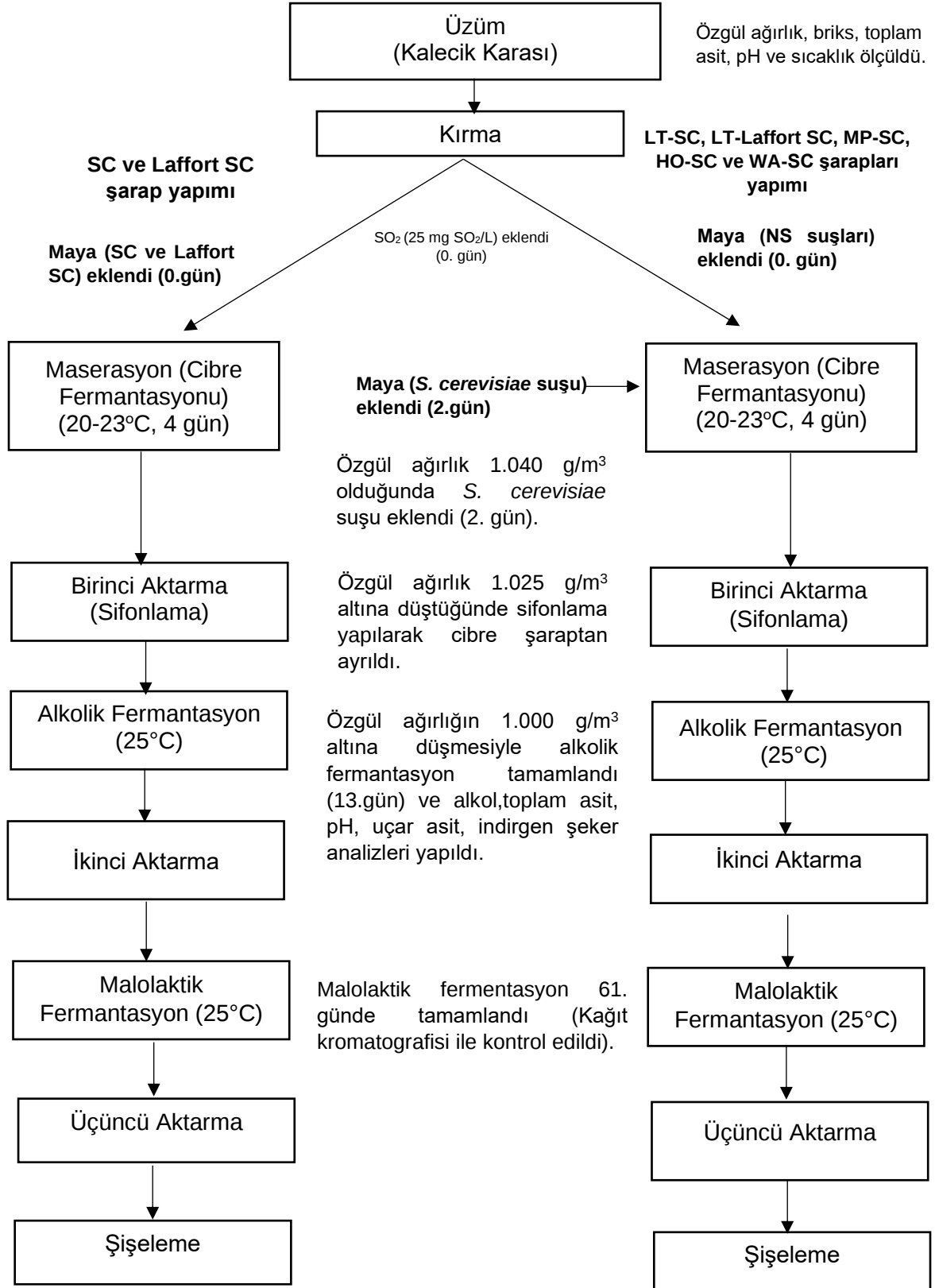
3.9.4. Malolaktik Fermantasyon

Şarapların alkol fermantasyonu tamamlandıktan sonra tortu kısmını uzaklaştırmak için ikinci aktarma yapılarak malolaktik fermantasyonun gerçekleşmesi için 20-25°C'de tutulmaya devam edilmiştir. Malolaktik fermantasyonun devam edip etmediği kağıt kromatografisi yöntemi ile kontrol edilmiştir.

3.9.5. Şişeleme

61. günde kağıt kromatografisi yöntemi uygulandığında şaraplarda malik asit tespit edilememiş ve şaraplar malolaktik fermantasyonu tamamlamıştır. Üçüncü aktarma yapıldıktan sonra şaraplar şişelenerek mantar tıpaları kapatılmıştır (Şekil 3.7).

KIRMIZI ŞARAP AKIM ŞEMASI



Şekil 3. 7. Non-Saccharomyces ve Saccharomyces suşları ile Kalecik Karası şarap yapımı

3.9.6. Enolojik Analizler

3.9.6.1. CO₂ Analizi

CO₂ analizi, CarboQC (Anton Paar) cihazı ile yapılmıştır. Analiz için 75 cl hacimli şarap şişesi PFD örnek doldurma ünitesine (Anton Paar) numune alma ucu şişenin içine denk gelecek şekilde yerleştirilmiş ve 150 mL şarap numunesi kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu g/L CO₂ olarak elde edilmiştir.

3.9.6.2. Oksijen Analizi

Oksijen analizi, oksimetre HQ30d (HACH) ile yapılmıştır. Oksimetrenin probu 75 cl hacimli şarap şişesine daldırılarak analiz yapılmıştır. Oksimetrenin ekranından okunan değer (x) için $(x / 0.9711) - 0.363$ işlemi kullanılarak düzeltme yapılmış ve analiz sonucu mg/L oksijen olarak belirlenmiştir.

3.9.6.3. SO₂ Analizi

SO₂ analizi FIAstar 5000 Analyzer cihazı ile yapılmıştır. Cihazın DNTB (dinitro benzoik asit), seyreltik HCl çözeltisi, saf su ve iki adet tampon çözeltisi olmak üzere beş tane haznesi vardır. 0.74 g sodyum disülfid ve 50 mL %99 etanole 500 mL olana kadar saf su eklenerek bir karışım elde edilmiştir. Bu karışım standart SO₂ çözeltileri hazırlamak için kullanılmıştır. %10, 20, 40, 80, 140 ve 200 SO₂ çözeltisi hazırlamak için elde edilen karışımdan sırasıyla 1, 2, 4, 8, 14 ve 20 mL alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu standart çözeltileri içeren referans tüpler de şarap numuneleri ile beraber cihazın örnek haznesine yerleştirilmiştir. 'Sofia' programı kullanılarak analiz sonuçları mg/L olarak elde edilmiştir.

3.9.6.4. Alkol, İndirgen şeker, Asit, pH, Uçar Asit, Alfa Amino ve Malik Asit Analizleri

Kavaklıdere Şarapları A.Ş. yardımıyla WineScan™ (FOSS) Auto Equipment cihazı (Type 79067, Danimarka) ve Foss Integrator yazılımı kullanılarak şarapların alkol, indirgen şeker, asit, pH, uçar asit, alfa amino ve malik asit analizleri yapılmıştır. Analiz için 10-15 mL şarap numunesi tüplere doldurularak örnek haznesine sırayla yerleştirilmiş ve prob otomatik olarak numunenin içine batarak sırasıyla her numunenin analizini gerçekleştirmiştir. Start Foss Integrator yazılımı sayesinde alkol, indirgen şeker, asit, pH, uçar asit, alfa amino ve malik asit analizlerinin sonuçları elde edilmiştir.

3.9.6.5. Kâğıt Kromatografisi Metodu

Şarapların şişelenmesinden önce malolaktik fermantasyonun devam edip etmediğini tespit etmek amacıyla kâğıt kromatografisi metodu kullanılmıştır. Filtre kâğıdının alt kısmına şarap numunelerinden birkaç damla birbirlerine karışmayacak mesafede, sırasıyla uygulanmıştır. Filtre kâğıdı, brom krezol yeşili indikatörü içeren çözeltiliye batırılarak belli bir

süre beklendikten sonra çıkarılmış ve kağıt kurumaya bırakılmıştır. Filtre kağıdının üzerinde beliren sarı noktalar şarap numunesinde malik asitin var olduğunu yani malolaktik fermentasyonun devam ettiğini göstermektedir.

3.9.7. Şaraplarda Aroma Bileşenleri Analizi

3.9.7.1. GC-MS Koşulları

Aroma bileşenleri sıvı-sıvı ekstraksiyon metodu ile elde edilmiştir ve tanımlaması gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (Agilent-6890 GC ve 5973 MSD) ile yapılmıştır. 45 mL şarap numunesi, 40 µg 4-nonanol (iç standart) ve 50 mL yüksek saflıkta diklorometan ile karıştırılmış ve bu karışım azot gazı altında 45 dakika (4-5°C) manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu işlem tamamlandığında karışım 5500 rpm'de 15 dakika (0°C) santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra diklorometan ve aromatik ekstrakt içeren kısım ayrılmıştır ve içerisindeki su sodyum sülfat kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, bu karışım vigreux damıtma kolonunda 40°C sıcaklıkta 1 mL'ye kadar konsantre edilmiştir. Bu işlemden sonra tekrar azot gazı altında 0.5 mL'ye kadar konsantre edilmiştir. Aroma bileşenlerini belirlemek için ekstraktlar GC-FID, GC-MS cihazlarına enjekte edilmiştir. Her bir numune için 3 tekrar yapılmıştır (Selli vd., 2007).

Aroma bileşenleri analizi gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (Agilent-6890N ve 5975B VL MSD) ile yapılmıştır. Miktar tayini için alev iyonlaşma dedektörlü (FID) gaz kromatografisi (Agilent 6890N) kullanılmıştır. DB-WAX kapiler kolon (60 m x 0.25 mm x 0.4 µm) aroma bileşenlerinin ayrımı için kullanılmıştır. Program, enjektör sıcaklığı 220°C, dedektör sıcaklığı 250°C, kolon sıcaklığı 60°C olarak başlatılmış ve 3 dakikalık bekleme süresinin sonunda dakikada 2°C artarak 220°C'ye yükseltildikten sonra dakikada 3°C artarak 245°C'ye çıkacak ve 20 dakika bu sıcaklıkta sabit tutulacak şekilde ayarlanmıştır. Dedektör ve enjektör sıcaklıkları 250°C, akış hızı 1.5 mL/dk olarak ayarlanmıştır. He gazı taşıyıcı olarak kullanılmış ve 3 µL numune enjekte edilmiştir (Selli vd., 2007).

Aroma bileşenlerinin belirlenmesinde kütle spektrometresi (Agilent-5975B VL MSD) kullanılmıştır. Koşullar gaz kromatografisi ile aynıdır. Tarama yapmak için koşullar ayarlanmış (iyonlaşma enerjisi 70 eV, iyon kaynağı sıcaklığı 250°C ve kuadropol sıcaklığı 120°C) ve 29-350 kütle/yük arasında her saniye ölçüm alınmıştır. Standart çözelti kullanılarak ya da aroma bileşenleri kütüphanesi (Wiley 9.0, NIST-11, ve Flavor.2L) kullanılarak piklerin tanısı yapılmıştır. Aroma bileşenlerinin konsantrasyonları iç standart yöntemiyle hesaplanmıştır (Selli vd., 2007) ve kullanılan formül aşağıda verilmiştir. Analizler 3 tekrar olarak yapılmıştır.

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

(C_i , Bileşiğin konsantrasyonu; A_i , Bileşiğin pik alanı; A_{st} , İç standart pik alanı, C_{st} , İç standart konsantrasyonu (40 µg/50 mL); RF, Cevap faktörü; HF, Hesaplama faktörü (örnek miktarının L'ye çevrilmesi için faktör)).

3.9.8. Duyusal Analiz

Potansiyel starter maya izolatları ile üretilen Kalecik Karası şaraplarının duyusal analizi 5-7 kişiden oluşan 2 panel grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu gruplar; ilki 6 kişilik şarap tadımında tecrübeli panelist grup, ikincisi ise 5 kişilik Kavaklıdere Şarapları fabrikası eğitilmiş uzman grup olmak üzere toplamda 11 kişidir.

3.9.9. İstatistiksel Analizler

Şarapların aroma bileşenleri için Tek Yönlü Varyans Analizi uygulanmış ve önemli görülen farklılıklar Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir. Varyans analizinde Minitab programı kullanılmıştır.

3.10. Liyofilizasyon

Kültürlerde liyofilizasyon ve sodyum glutamatın etkisini belirlemek amacıyla, liyofilizasyon ortamında yağı alınmış süt tozu (%10), sodyum glutamat (%2) olacak şekilde ortam hazırlanmış liyofilizatörde dondurularak vakum altında kurutulmuştur. Hücre sayımları kob/mL olarak yapılmıştır. Sonuçlar canlı hücre yüzdesi (veya canlı hücre kaybı) olarak liyofilizasyon öncesi başlangıç hücre sayısına kıyasla belirlenmiştir (Polomska vd., 2012).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu projede ülkemizin üç farklı bağından getirilen farklı yerel üzümlerden izole edilecek suşların ekonomik açıdan verimliliklerini değerlendirmek başlıca hedeftir. Suşların maruz kalacakları stres kaynaklarına tepkileri ve dirençlerini gözlemleyerek şarap ve benzeri alkollü içecek üretiminde kullanılabilir olanları ekonomiye kazandırmak ve ülkemizin İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgeleri'ndeki maya çeşitliliği konusunda yapılacak çalışmalara zemin hazırlanması amaçlanmıştır.

Yerel üzüm çeşitleri Kapadokya (Emir, Dimrit), Elazığ (Öküzgözü, Boğazkere üzümleri), Kalecik (Kalecik Karası) bölgelerinden toplanmıştır. İlk aşamada şırada önemli non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* maya analizi, gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiştir. Bu aşamada *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Metschnikowia* gibi yararlı non-*Saccharomyces* maya cinslerinin türleri ve *Saccharomyces* türleri hedef alınmıştır ve klasik besiyer yöntemleri ile bu mayaların izolasyonları yapılmıştır. İkinci aşamada izole edilen mayaların tanıları biyokimyasal ve moleküler metotlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üçüncü aşamada, tanısı yapılan izolatların fenotipik ve genotipik karakterizasyonu belirlenmiştir. Morfolojik özellikleri belirlenen ve teknolojik olarak verimli olarak nitelendirilen suşlar; RAPD-PZR, PFGE ve DNA sekanslama yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Dördüncü aşamada ise karakterize edilen suşlardan starter kültür olarak ikili ve sıralı olarak kullanmak üzere seçimler yapılmıştır. Beşinci ve son aşamada ise genetik paternleri gözlemlenen suşlar ile oluşturulan kültürlerden (tek veya ikili kültür) üretilen şarapların enolojik özellik ve duyu analizi testlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Enolojik testler olarak, üretilen şaraplardaki tatlılık, L-malik asit miktarı, etil alkol konsantrasyonu, indirgen şeker miktarı, uçur asit ve asetik asit miktarı ve hidrojen sülfür miktarları ölçülmüştür.

4.1. Spontane/Geleneksel Yöntemler ile Şarap Üretimi

Türkiye'ye özel 5 ayrı üzümünden yapılan şıra ve/veya geleneksel üretim şarapları, starter kültür olarak kullanılabilecek hedef mikroorganizmaların izolasyonu için hazırlandı.

Tablo 4.1. Üzümlerin alındıkları iller, zamanlar, olgunluk indeksleri ve fermantasyon öncesi kuru madde oranları (%)

Üzüm Çeşidi	Alındığı İl	Alındığı Zaman	Olgunluk İndeksi	Fermantasyon Öncesi Kuru Madde Oranı (%)
Kalecik Karası	Ankara (Kalecik Bölgesi)	11.09.2017	22	18
Dimrit	Kapadokya, Ürgüp	19.09.2017	22	15
Emir	Kapadokya, Ürgüp	29.09.2017	18	21
Öküzgözü	Elazığ	01.10.2017	26	25
Boğazkere	Elazığ	01.10.2017	21	16

Üretilen şarap örneklerinden eş zamanlı olarak “izolasyonlar” ve “RT-PZR ile saptama ve miktar tayinleri” yapılmıştır.

4.2. RT-PZR Yöntemi ile Hedef *Saccharomyces* ve non-*Saccharomyces* Mayaların Spontan Şıra/Şarap Örneklerinde Saptanması ve Miktar Tayini

Saccharomyces türleri, sağlıklı üzümün yüzeyinde düşük miktarda bulunmasına rağmen, *S. cerevisiae*, fermantasyon işlemi sırasında dominant mikroorganizma olarak yer alır ve önolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte, son on yılda, şarap kalitesinin gelişmesine katkıda bulundukları gerekçesiyle non-*Saccharomyces* mayaların şarap yapımında önemi ve bu mayaların şarap yapımında kullanımları ile ilgili çalışmalar hızla artmaktadır (Zott vd., 2010; Masneuf-Pomarede vd., 2016; Garcia vd., 2017). *Saccharomyces* ve non-*Saccharomyces* maya cinsleri (örneğin, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Issatchenkia* ve *Dekkera*) ve türler dahil olmak üzere, üzüm ve geleneksel olarak üretilen şarap ortamlarında heterojen popülasyonu temsil ederler (Zott vd., 2010; Garcia vd., 2017).

Bu nedenle projemiz kapsamında, gerçek zamanlı PZR yöntemleri ile alkolik fermantasyon öncesinde ve sırasında şarapta bulunan *Saccharomyces* ve non-*Saccharomyces* mayaların tespit edilmesine ve seçilen bir *S. cerevisiae* ve üç non-*Saccharomyces* türünün (*Hanseniaspora uvarum*, *Lachancea thermotolerans* ve *Torulaspora delbrueckii*) miktarlarının belirlenmesine karar verilmiştir. Miktar tayini için seçilen non-*Saccharomyces* mayalar, şarapta istenen özellikleri oluşturma potansiyellerinin yüksek olması nedeniyle seçilmişlerdir. Soğuk maserasyon, maserasyon ve alkolik fermantasyon sırasında üzüm şıraları ve şarap örnekleri alınmıştır.

Almanya'nın Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) firmasından temin edilen dört referans maya suşu; *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae*, şarap numunelerinde qPZR ile miktar ölçülmesi için standart eğri oluşturulmasında kullanılmıştır.

4.2.1. Mayaların Saptanması (Var/Yok Testi)

Tespit çalışmaları, ayrıca, üzüm çeşitlerinden üretilen ürünlerde maya çeşitliliğini (biyoçeşitlilik) göstermekte önemli rol oynamaktadır. Türe özel primerlerin kullanımı ile yapılan qPZR yöntemi ile şaraplarda taranan ve varlığı tespit edilen *Saccharomyces* ve non-*Saccharomyces* mayaların çeşitleri Tablo 4.2, 4.3 ve 4.4'te üzüm çeşidine göre verilmiştir. Amplifikasyon grafikleri, gerçek zamanlı PZR deneyinin süresi boyunca PZR ürününün oluşmasını göstermektedir. Amplifikasyon grafikleri, her örnekten gelen florasan sinyalinin döngü sayısına karşı çizilmesi ile oluşturulmaktadır. Kalecik Karası, Boğazkere, Dimrit, Öküzgözü ve Emir üzümlerinde bulunabilecek mayalar için spesifik primerler Tablo 3.6'da

verilirken her bir maya için oluşan erime eğrileri ve amplifikasyon grafikleri Ek 1 ve 2'de verilmiştir. Fermantasyonun belirli aşamalarında yapılan RT-PZR sonuçlarına göre var/yok testleri sonucunda birçok non-*Saccharomyces* maya varlığı farklı şaraplarımızda belirlenmiş ve sonuçlar, aşağıda Tablo 4.2, 4.3 ve 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Kalecik Karası şıra/şarap örneklerinin non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* mayalarının RT-PZR ile saptanması

Maya türleri	Kalecik Karası						
	Numune alımı (Gün)						
	0 (CM)	2 (CM)	4 (CM)	2 (M)	4 (M)	18 (2F)	32 (4F)
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	+	+	+	-
<i>Candida zemplinina</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lachancea thermotolerans</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Metschnikowia</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia fermentans</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	+	+	+	+	+	+

CM, soğuk maserasyon; M, maserasyon (cibre fermantasyonun); 2F, alkolic fermantasyonun ikinci haftası; 4F, alkolic fermantasyonun dördüncü haftası; Pozitif (+), tespit edildi; negatif (-) tespit edilmedi.

Tablo 4.3. Boğazkere, Dimrit ve Öküzgözü şıra örneklerinin RT-PZR ile non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* mayalarının tespiti

Maya türleri	Boğazkere			Dimrit			Öküzgözü		
	Numune alımı (Gün)								
	0(CM)	4(CM)	6(M)	0(CM)	4(CM)	4(M)	0(CM)	4(CM)	6(M)
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Candida zemplinina</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lachancea thermotolerans</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Metschnikowia</i> spp.	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia fermentans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pichia kluyveri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CM, soğuk maserasyon; M, maserasyon (cibre fermantasyonun); Pozitif (+), tespit edildi; negatif (-) tespit edilmedi.

Tablo 4.4. Emir örneklerinin şıra/şarap non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* mayalarının RT-PZR ile saptanması

Maya türleri	Emir				
	Numune alımı (Hafta)				
	0 (F)	1 (F)	2 (F)	3 (F)	4 (F)
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-	-
<i>Candida zemplinina</i>	-	-	-	-	-
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora</i> spp.	+	+	+	+	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	+	+	+	+
<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	+	+	+	+
<i>Lachancea thermotolerans</i>	-	-	-	-	-
<i>Metschnikowia</i> spp.	-	-	-	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-	-	-	-	-
<i>Pichia fermentans</i>	-	-	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i>	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp.	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	+
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	+	+	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	+	+	+	+

F, fermentasyon haftası; Pozitif (+), tespit edildi; negatif (-) tespit edilmedi.

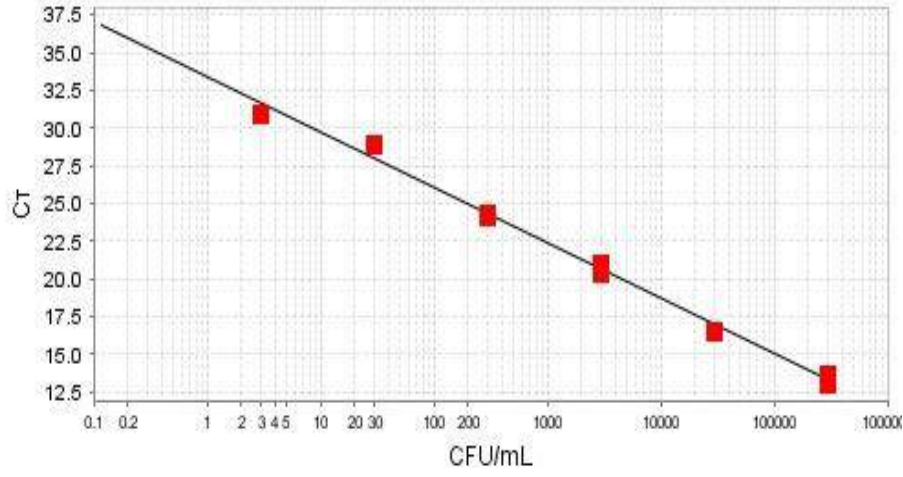
Sonuçlara göre non-*Saccharomyces* maya çeşitliliği özellikle soğuk maserasyon ve maserasyon aşamalarında oldukça fazladır. Var/Yok tespiti için yapılan RT-PZR çalışmaları sonucunda elde edilen erime eğrileri ve amplifikasyon grafikleri Ek 1 ve 2'de verilmektedir.

4.2.2. Starter Olarak Kullanılabilecek Bazı Mayaların Seçilerek RT-PZR ile Miktar

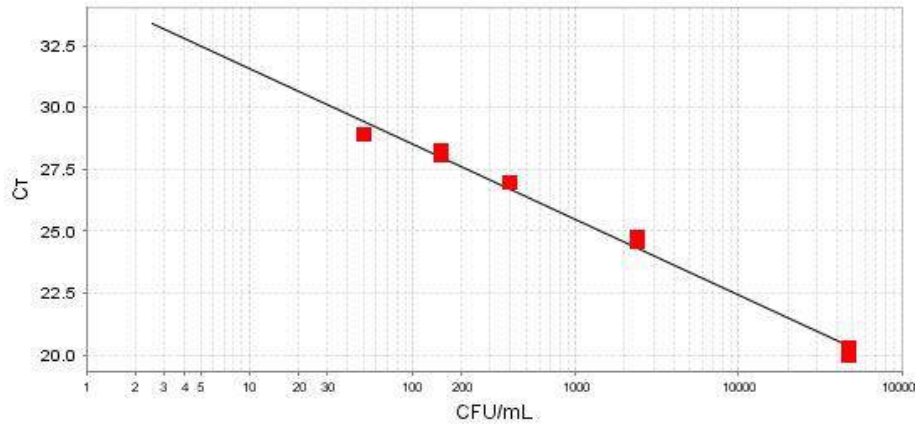
Analizlerinin Yapılması

Bu bölümde literatürdeki taramalarımız sonucunda ve ön deneylerimiz sonucunda şarabın kokusunu tadını olumlu etkileyebilecek ve starter kültür olarak kullanabileceğimiz non-*Saccharomyces* türleri seçilmiştir. İdentifikasyonu yapılan maya çeşitlerimize ve starter olarak kullanmayı planladığımız maya çeşitlerine göre *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum* ve *Lachancea thermotolerans* miktar tayini için seçilmiştir ve bu organizmaların kantifikasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Literatürde kantifikasyon çalışmaları, şarapta genellikle tek bir organizma için yayınlanmıştır. Örneğin şarapta *Oenococcus oeni* için (Pinzani vd., 2004), yine şarapta *Dekkara bruxellensis* için (Phister ve Mills, 2003); şarap ve şırada *Hansenispora* türleri için (Phister vd., 2007) miktar çalışmaları yürütülmüştür.

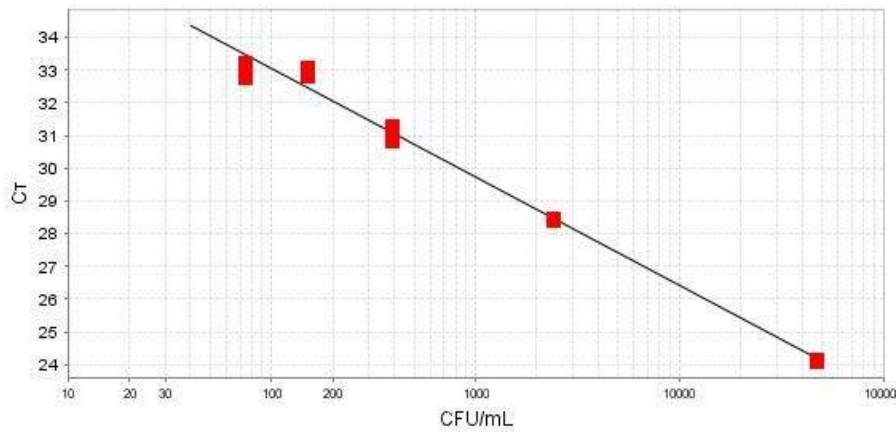
Dört farklı suş *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae*, kırmızı şarapta seri olarak seyreltilerek standart eğrilerin yapımı için kullanılmıştır (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, ve 4.4). Amplifikasyon verimliliği (efficiency; E), standart eğrideki regresyon hattının eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Etkililik (efficiency; E), $E = 10^{-1/\text{eğim}}$ ve $E (\%) = (E-1) * 100$ formülü ile bulunmuştur (Pfaffl, 2001). -3.32'e yakın bir eğim optimal kabul edilir, %100 PZR amplifikasyon verimliliği göstermektedir (Tablo 4.5). Sonuçlar aşağıda verilmiştir:



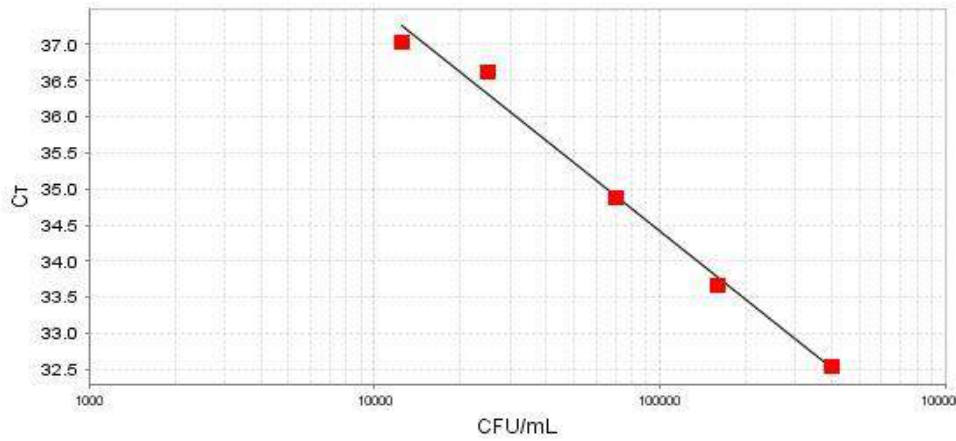
Şekil 4.1. Üzüm şırası ve şarap örneklerinde *Hanseniaspora uvarum* kantifikasyonu için çizilen standart eğri



Şekil 4.2. Üzüm şırası ve şarap örneklerinde *Lachancea thermotolerans* kantifikasyonu için çizilen standart eğri.



Şekil 4.3. Üzüm şırası ve şarap örneklerinde *Torulaspora delbrueckii* kantifikasyonu için çizilen standart eğri.



Şekil 4.4. Üzüm şırası ve şarap örneklerinde *Saccharomyces cerevisiae* kantifikasyonu için çizilen standart eğri.

Tablo 4.5. Dört referans maya türünün standart eğrileri

Maya türleri	Regresyon değeri	Eğim	Kesişim	Verimlilik (%)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0.993 ± 0.00	-3.659 ± 0.05	33.330 ± 0.41	87.6 ± 8.90
<i>Lachancea thermotolerans</i>	0.991 ± 0.00	-3.043 ± 0.04	34.568 ± 0.61	113.1 ± 3.72
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	0.990 ± 0.00	-3.315 ± 0.01	39.652 ± 0.05	100.2 ± 0.45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.989 ± 0.00	-3.145 ± 0.08	50.134 ± 0.61	107.9 ± 5.29

H. uvarum, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae* standart eğrilerinin regresyon değeri (R^2), eğimleri, kesişim ve amplifikasyon verimlilikleri (E%) qPZR analizi ile belirlenmiştir. Üçlü qPZR amplifikasyonlarının ortalama ± standart sapması gösterilmiştir. Testin verimliliği, $E = 10^{-1/\text{eğim}}$ ve $E (\%) = (E-1) \times 100$ formülü ile hesaplanmıştır.

Kalecik Karası, Boğazkere, Dimrit, Öküzgözü şıra ve şarap örneklerinde bulunan *S. cerevisiae* ve üç non-*Saccharomyces* mayanın (*H. uvarum*, *L. thermotolerans* ve *T. delbrueckii*) soğuk maserasyon (CM), maserasyon (M) ve alkolik fermantasyon sırasında qPZR ile miktarları belirlenmiştir (Tablo 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10). Miktar tayinleri *L. thermotolerans* için Garcia vd. (2017) tarafından, *T. delbrueckii* için Zott vd. (2010), Diaz vd. (2013) ve Garcia vd. (2017) tarafından, *H. uvarum* için Hierro vd. (2007) ve *S. cerevisiae* için Hierro vd. (2007), Zott vd. (2010), Diaz vd. (2013), Garcia vd. (2017) ve Wang vd. (2020) tarafından yapılmıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Maya türlerinin sayımı için gerçek zamanlı kantitatif PZR kullanan çalışmalar

Çalışılan maya türleri	Kaynak
<i>Hanseniaspora</i> spp.	(Phister vd., 2007)
<i>H. uvarum</i> , <i>S. cerevisiae</i>	(Hierro vd., 2007)
<i>H. uvarum</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>S. cerevisiae</i>	(Zott vd., 2010)
<i>H. uvarum</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>S. cerevisiae</i>	(Diaz vd., 2013)
<i>L. thermotolerans</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>S. cerevisiae</i>	(Garcia vd., 2017)
<i>S. cerevisiae</i>	(Wang vd., 2020)

Tablo 4.7. Kalecik Karası örneklerinde dört maya popülasyonunun qPZR ile kantifikasyonu *

Kalecik Karası							
Maya türleri	Numune alımı (Gün)						
	0 (CM)	2 (CM)	4 (CM)	2 (M)	4(M)	18 (2F)	32 (4F)
<i>H. uvarum</i>	9.1×10 ² ± 1.6×10 ²	7.5×10 ¹ ± 5.8×10 ¹	2.6×10 ¹ ± 0.1×10 ¹	8.7×10 ³ ± 4.4×10 ²	3.3×10 ³ ± 1.2×10 ²	1.2×10 ² ± 0.9×10 ¹	5.4×10 ¹ ± 0.8×10 ¹
<i>L. thermotolerans</i>	1.2×10 ¹ ± 0.1×10 ¹	1.2×10 ¹ ± 0.5×10 ¹	2.6×10 ¹ ± 0.4×10 ¹	3.8×10 ¹ ± 1×10 ¹	0.3×10 ¹ ± 0.1×10 ¹	ND	ND
<i>T. delbrueckii</i>	3.2×10 ¹ ± 0.4×10 ¹	9.5×10 ¹ ± 1×10 ¹	1.4×10 ² ± 1.9×10 ¹	6×10 ² ± 5.9×10 ¹	1.4×10 ² ± 2.4×10 ¹	0.3×10 ¹ ± 0.1×10 ¹	ND
<i>S. cerevisiae</i>	6.9×10 ² ± 3.3×10 ¹	6×10 ² ± 1×10 ²	6×10 ² ± 9.6×10 ¹	9.8×10 ³ ± 6.5×10 ¹	8.6×10 ³ ± 1.6×10 ¹	8.2×10 ² ± 6.7×10 ¹	7.7×10 ² ± 1.4×10 ¹

* Değerler CFU/mL ± standart sapma olarak verilmiştir.

CM, soğuk maserasyon; M, maserasyon (cibre fermentasyonu); 2F, alkolik fermentasyonun ikinci haftası; 4F, alkolik fermentasyonun dördüncü haftası; ND, tespit edilmedi.

Tablo 4.8. Öküzgözü örneklerinde üç maya popülasyonunun qPZR ile kantifikasyonu*

Öküzgözü			
Maya türleri	Numune alımı (Gün)		
	0 (CM)	4 (CM)	6 (M)
<i>H. uvarum</i>	3.8×10 ¹ ± 0.1×10 ¹	2.6×10 ¹ ± 0.2×10 ¹	1.9×10 ¹ ± 0.2×10 ¹
<i>L. thermotolerans</i>	2.8×10 ¹ ± 0.1×10 ¹	4.8×10 ¹ ± 0	8.8×10 ¹ ± 0
<i>S. cerevisiae</i>	9.8×10 ¹ ± 1×10 ¹	1.7×10 ² ± 2.4×10 ¹	3.8×10 ² ± 1.1×10 ²

* Değerler CFU/mL ± standart sapma olarak verilmiştir.

CM, soğuk maserasyon; M, maserasyon (cibre fermentasyonu).

Tablo 4.9. Boğazkere örneklerinde iki maya popülasyonunun qPZR ile kantifikasyonu*

Boğazkere			
Maya türleri	Numune alımı (Gün)		
	0 (CM)	4 (CM)	6 (M)
<i>H. uvarum</i>	3.1×10 ¹ ± 0.4×10 ¹	3.8×10 ¹ ± 1×10 ¹	2.2×10 ¹ ± 1.6×10 ¹
<i>S. cerevisiae</i>	1.7×10 ² ± 0.8×10 ¹	1.6×10 ² ± 1.2×10 ¹	1.9×10 ² ± 2.7×10 ¹

* Değerler CFU/mL ± standart sapma olarak verilmiştir.

CM, soğuk maserasyon; M, maserasyon (cibre fermentasyonu).

Tablo 4.10. Dimrit örneklerinde iki maya popülasyonunun qPZR ile kantifikasyonu *

Dimrit			
Maya türleri	Numune alımı (Gün)		
	0 (CM)	4 (CM)	4 (M)
<i>H. uvarum</i>	9.2×10 ¹ ± 0.8×10 ¹	1.8×10 ² ± 4.1×10 ¹	3×10 ² ± 1.6×10 ¹
<i>S. cerevisiae</i>	1.5×10 ² ± 0.9×10 ¹	1.6×10 ² ± 0.4×10 ¹	5×10 ² ± 6.7×10 ¹

* Değerler CFU/mL ± standart sapma olarak verilmiştir.

CM, soğuk maserasyon; M, maserasyon (cibre fermentasyonu).

Standart eğrilere göre ilgili non-*Saccharomyces* mayaların miktar tayini yapılmıştır. Buna göre *T. delbrueckii* maya miktarı Kalecik Karası üzümü sırasında artan miktarlarda bulunmuş, şarap oluşumu ile fermentasyonun ilerleyen safhalarında miktarda azalma gözlenmiştir. Kalecik Karası dışında bu mayaya diğer üzüm çeşitlerinden yapılan şaraplarda rastlanmamıştır. *L. thermotolerans* tüm üzüm çeşitlerinde az miktarlarda tespit edilmiştir. *H.*

uvarum miktarında soğuk maserasyon sırasında azalma, maserasyon sırasında artış, fermantasyon sırasında ise yeniden yavaş bir düşme gözlenmiştir. *S. cerevisiae* mayasında ise en fazla sayı maserasyonun ikinci gününde elde edilmiş, daha sonrasında ise sayıda kaydedilir bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak, bu miktarda azalma da gözlenmemiştir. Literatürde benzer sonuçlar (Hierro vd., 2007; Diaz vd., 2013) rapor edilmiştir.

qPZR ile seçilen mayaların miktar tayininde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu yöntem ile takip edilmek istenen suşun maserasyon ve fermantasyon sürelerince miktar tayinlerinin başarı ile yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

4.3. Non-Saccharomyces ve Saccharomyces Maya İzolasyonu

Proje, 293 *Saccharomyces* maya ve 104 non-*Saccharomyces* maya olmak üzere, toplam 397 maya izolatu ile tamamlanmıştır.

4.3.1. Saccharomyces Maya

Saccharomyces maya olarak 293 suş izole edilmiştir. Saflaştırılmış suşlar her üzüm çeşidinden yapılan şarap örneği için olacak şekilde fenotipik özelliklere göre gruplandırılmış ve bu gruplardan 77 izolat sekanslama yöntemi ile tanı için seçilmiştir.

4.3.2. Non-Saccharomyces Maya

104 non-*Saccharomyces* maya izole edilmiştir.

4.4. Fenotipik Karakterizasyon ve Sekanslama

4.4.1. Saccharomyces Suşları

İzole edilen 293 *Saccharomyces* suşun fenotipik karakterizasyon sonuçları üzüm çeşidi bazında Ek 3'te verilmiştir. Toplam 293 *Saccharomyces* mayadan 77 tanesi; izolasyon besiyeri, şarap yapımında kullanılan üzüm çeşidi, üretimin evresi (soğuk maserasyon, maserasyon, fermantasyon) alkol toleransı ve/veya H₂S üretimi gibi kriterler dikkate alınarak seçilmiş ve sekanslanmıştır. Bu 77 *Saccharomyces* mayalarına ait ITS ve/veya D1/D2 sekansları ve NCBI erişim numaraları (Accession number) Ek 5'te verilmiştir.

Ayrıca, 77 *Saccharomyces* izolat arasından 29 adet yüksek teknolojik özelliklere sahip suş; H₂S üretimi düşük (1,2 veya 3), etanol direnci yüksek (en az %13 (v/v)) ve *S. cerevisiae* türüne özel karbonhidrat fermantasyon paterni (karbonhidrat fermantasyonunda sükröz ve maltoz pozitif, mannitol ve laktoz negatif büyüme gösterir) özelliklerine göre seçilmiş ve *Saccharomyces cerevisiae*-starter kültür koleksiyonuna eklenmiştir (Tablo 4.11). Ek 3'teki tablolarda bu 29 suş gölgelendirme ile işaretlenmiştir.

Tablo 4.11. Teknolojik özellikleri yüksek olup seçilen *Saccharomyces* izolatlar

	Alkol Toleransı (%)				SO ₂ Toleransı (mg/L)			Sıcaklık Toleransı (°C)				pH Toleransı		Karbonhidrat Fermantasyon Testi				H ₂ S Üretimi		Tanılama	
	10	13	15	50	100	150	200	28	37	45	6	4	3	Sükroz	Maltoz	Mannitol	Laktoz	ITS	D1/D2		
KA 32NM S2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	w	-	1	Nd	+	
KB 4NM S2	+	+	w	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1	+	Nd	
KB 4NMS10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
KA 4NM S2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	Nd	+	
EA 1W NS5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1	+	Nd	
EA 1W NS6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1	+	Nd	
EB 1W NS1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1	+	Nd	
EB 1W NS7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1	+	Nd	
EB 3W S5	+	+	w	+	+	+	+	+	+	-	w	+	w	+	+	-	-	1	Nd	+	
EA 0W NS5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
EB 0W NS1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
EA 1W NS10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
EB 1W NS2	+	+	w	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
EB 1W NS3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
EB 1W NS9	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
EA 2W NS1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
EA 0W NS9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
OA 0CM NS3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
OB 4CM S1*	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	3	Nd	+	
OB 4CM S2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	3	Nd	Nd	
BA 0CM NS3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1	+	Nd	
BA 0CM NS5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1	+	Nd	
BB 4CM S10	+	+	w	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	w	-	-	2	Nd	+	
BB 0CM NS6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
BA 4CM NS6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	+	Nd	
DA 4NM S1	+	+	w	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1	Nd	+	
DA 4CM S1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	w	2	Nd	+	
DA 4CM S3	+	w	w	+	+	+	+	+	+	-	w	w	-	+	+	w	w	2	Nd	+	
DA 4CM S8	+	+	w	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	2	Nd	+	
Ticari	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	3	Nd	+	

KA: Kalecik Karası Üzümünden Yapılan Şarabın A Paraleli, KB: Kalecik Karası Üzümünden Yapılan Şarabın B Paraleli, OA: Öküzgözü Üzümünden Yapılan Şarabın A Paraleli, OB: Öküzgözü Üzümünden Yapılan Şarabın B Paraleli, BA: Boğazkere Üzümünden Yapılan Şarabın A Paraleli, BB: Boğazkere Üzümünden Yapılan Şarabın B Paraleli, DA: Dimrit Üzümünden Yapılan Şarabın A Paraleli, DB: Dimrit Üzümünden Yapılan Şarabın B Paraleli, EA: Emir Üzümünden Yapılan Şarabın A Paraleli, EB: Emir Üzümünden Yapılan Şarabın B Paraleli, OCM: Soğuk Maserasyonun 0. Günü, 4CM: Soğuk Maserasyonun 4. Günü, 4NM: Normal Maserasyonun 4. Günü, 32NM: Normal Maserasyonun 32. Günü (fermantasyonun sonu), 0W: 0. Hafta, 1W: 1. Hafta, 2W: 2. Hafta, 3W: 3. Hafta, 4W: 4. Hafta; S: *Saccharomyces*; +: pozitif büyüme, w: az büyüme, - negatif büyüme; Kolonilerin rengi 1: beyaz, 2: krem, 3: açık kahverengi, 4: kahverengi, 5: koyu kahverengi, 6: siyah; nd: Karar verilmemiştir; *:Rastgele seçilen *Saccharomyces cerevisiae* deneme amaçlı şarap yapımında kullanılmıştır; Ticari: Ticari *Saccharomyces cerevisiae* suşu.

4.4.2. Non-Saccharomyces Suşları

104 non-Saccharomyces suşlar için veri tabanı oluşturan sonuçlar Ek 4'te verilmiştir. Sekanslama ile tanımlanan 104 adet suş içinden her üzüm çeşidinden ve her spp (tür)'den bulunduracak şekilde suşlar seçilmiş ve H₂S üretimi düşük olan izolatlarda diğer teknolojik özellikler belirlenmiştir. 104 adet suş için 2 ayrı metot ile sekanslama sonuçları ve NCBI erişim numaraları (Accession number) Ek 5'te verilmiştir. D1/D2 sekanslama her türün teyit edilmesi amacıyla veya şüpheli sonuçlar durumunda belirlenmiştir.

Tablo 4.12'de 104 suş arasından çalışmalarımız için kullanacağımız, birden fazla izole edilebilen suşlarda, en az ikişer tane olmak üzere, daha düşük H₂S üretimi ve daha yüksek alkol toleransı olmak üzere, seçilen suşları gösterilmektedir. *Rhodotorula mucilaginosa* yalnızca bir tane olarak izole edildiği için, tek bir suş olarak tabloda yer almıştır.

Tablo 4.12. Seçilen non-*Saccharomyces* suşlarının fenotipik karakterizasyonu

Non- <i>Saccharomyces</i>	İsimlendirme		Alkol Toleransı (%)				SO ₂ Toleransı (mg/L)			H ₂ S Üretimi	Tanılama	
			10	13	15	50	100	150	200		ITS	D1/D2
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	K1	KA 0CM NS1	-	-	-	+	+	+	+	3	+	nd
	K5	KA 0CM NS5	-	-	-	+	+	+	+	4	+	+
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	K2	KA 0CM NS2	-	-	-	+	+	+	+	3	+	nd
	K10	KB 0CM NS5	vw	vw	vw	+	+	+	+	3	+	nd
	K20	KB 4CM NS5	+	-	-	+	+	+	+	4	+	nd
	K21	KA 2NM NS1	+	-	-	+	+	+	-	2	+	nd
	K40	KB 4NM NS9	+	-	-	+	+	+	+	4	+	nd
	K60	KB 2NM NS9								4	+	nd
	K63	KA 4NM NS5	-	-	-	+	+	+	+	2	+	nd
	K64	KA 4NM NS7	+	-	-	+	+	+	-	4	+	nd
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	K9	KB 0CM NS4	-	-	-	+	+	+	+	3	+	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	K13	KA 4CM NS3	+	vw	-	+	+	+	+	3	+	nd
	K25	KA 2NM NS9	w			+	+	+	+	6	+	+
	K26	KB 2NM NS2	+	w	-	+	+	+	+	5	+	nd
	K70	KB 4NM NS10	+	-	-	+	+	+	-	ng	+	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	K41	KA 0CM S1	-	-	-	+	+	+	+	3	+	nd
	K42	KB 0CM S5	+	+	+	+	+	+	+	ng	+	nd
<i>Metschnikowia aff. fructicola</i>	K43	KA 4CM S1	-	-	-	-	-	-	-	ng	+	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	E11	EA 1W NS1	-	-	-	+	+	+	+	3	+	nd
	E14	EA 1W NS4	vw	vw	vw	+	+	+	+	3	+	nd
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	E37	EA 0NM NS8	-	-	-	+	+	+	+	3	+	nd
<i>Lachancea thermotolerans</i>	O6	OA 4CM NS3								4	+	nd
	O9	OB 4CM NS4	-	-	-	+	+	+	+	3	+	nd
	O16	OA 0CM NS7								5	+	nd
	O22	OB 0CM NS6								5	+	nd
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	O37	OA 4CM S3	+	+	w	+	+	+	+	3	+	+
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	O5	OA 4CM NS2	vw	vw	vw	+	+	+	+	3	+	nd
	O7	OA 4CM NS4	+	+	+	+	+	+	+	4	+	+
<i>Solicoccozyma aerea</i>	B4	BA 0CM NS4	-	-	-	+	w	w	W	5	+	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	B10	BB 0CM NS2	w	w	-	+	+	+	+	4	+	nd
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (ITS)	B11	BB 0CM NS3								5	+	
<i>Metschnikowia aff. pulcherrima</i> (D1/D2)												+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (ITS)	B33	BB 4CM NS8	-	-	-	+	+	+	+	3	+	
<i>Metschnikowia aff. fructicola</i> (D1/D2)												+
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i> (ITS)	D2	DA 0CM NS2	+	+	+	+	+	+	+	ng	+	
<i>Metschnikowia aff. pulcherrima</i> (D1/D2)												+
<i>Metschnikowia sinensis</i> (ITS)	D3	DA 0CM NS3	-	-	-	+	+	+	+	3	+	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (D1/D2)												+
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i> (ITS)	D8	DB 0CM NS4								4	+	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (D1/D2)												+
<i>Metschnikowia aff. chrysoperlae</i> (ITS)	D15	DB 4CM NS3	-	-	-	+	+	+	+	4	+	
<i>Metschnikowia fructicola</i> (D1/D2)												+
<i>Starmerella bacillaris</i>	D10	DA 4CM NS2	w	w	-	+	+	+	+	4	+	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	D11	DA 4CM NS3	-	-	-	+	+	+	+	2	+	nd
	D12	DA 4CM NS4	-	-	-	+	+	+	+	3	+	nd
	D4	DA 0CM NS4								4	+	nd
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	D6	DB 0CM NS2								4	+	nd

KA: Kalecik Karası Üzümünden Yapılan Şarabın A Paraleli, KB: Kalecik Karası Üzümünden Yapılan Şarabın B Paraleli; OA: Öküzgözü Üzümünden Yapılan Şarabın A Paraleli, OB: Öküzgözü Üzümünden Yapılan Şarabın B Paraleli; BA: Boğazkere Üzümünden Yapılan Şarabın A Paraleli, BB: Boğazkere Üzümünden Yapılan Şarabın B Paraleli; DA: Dimrit Üzümünden Yapılan Şarabın A Paraleli, DB: Dimrit Üzümünden Yapılan Şarabın B Paraleli; EA: Emir Üzümünden Yapılan Şarabın A Paraleli, EB: Emir Üzümünden Yapılan Şarabın B Paraleli; 0CM: Soğuk Maserasyonun 0. Günü, 4CM: Soğuk Maserasyonun 4. Günü, 2NM: Normal Maserasyonun 2. Günü, 4NM: Normal Maserasyonun 4. Günü, 6NM: Normal Maserasyonun 6. Günü, 0W: 0. Hafta, 1W: 1. Hafta, 2W: 2. Hafta, 3W: 3. Hafta, 4W: 4. Hafta; NS: Non-*Saccharomyces* ; +: pozitif büyüme, w: az büyüme, vw: çok az büyüme, -: negatif büyüme, Kolonilerin rengi 1: beyaz, 2: krem, 3: açık kahverengi, 4: kahverengi, 5: koyu kahverengi, 6: siyah; ng: Biggy Agarda büyümemiştir; nd: Karar verilmemiştir.

4.5. Genetik Yöntemler (Sekanslama ve RFLP) ile Tanı (İdentifikasyon)

4.5.1. Sekanslama Yöntemleri

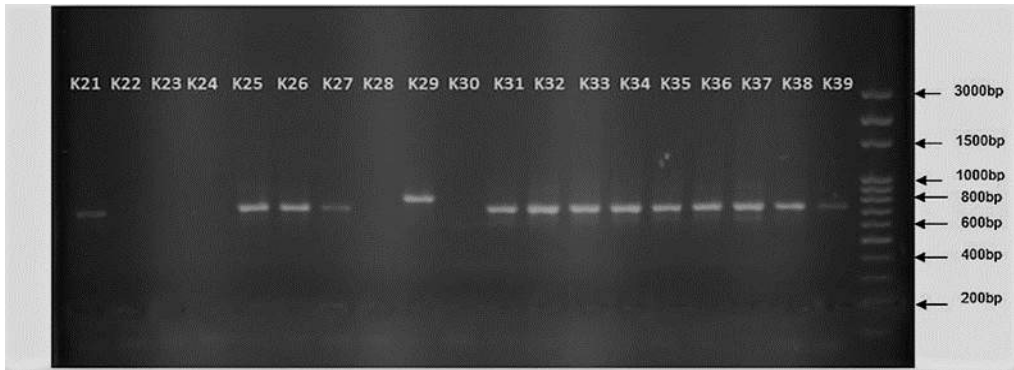
4.5.1.1. ITS Bölgesinin PZR ile Amplifikasyonu (Sekanslanacak Bantlarının Elde Edilmesi)

Hedef gen bölgesini çoğaltmak için tek aşamalı PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bazı PZR jel görüntüleri Şekil 4.5-4.10'da verilmiştir. PZR ürünlerinin, ileri ve geri yönlü primerlerin yardımıyla sekanslaması yapılmıştır. Mayaların sekanslama işlemleri BM Laboratuvar Sistemleri tarafından yapılmıştır. Maya türlerinin sekans sonuçları Ek 5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. PZR jel görüntüleri

K3, *Hanseniaspora uvarum* (747bp); K4, tanımlanamadı; K5, *Hanseniaspora guilliermondii* (749 bp); K6, tanımlanamadı; K7-8, *Hanseniaspora opuntiae*; K9, *Rhodotorula mucilaginosa* (610 bp); K10-12, *Hanseniaspora opuntiae*; K13, *Hanseniaspora uvarum* (747 bp); K14, tanımlanamadı; K15-20, *Hanseniaspora opuntiae* (K, Kalecik Karası üzümünden izole edilen maya).



Şekil 4.6. PZR jel görüntüleri

K21, *Hanseniaspora opuntiae*; K22-24, tanımlanamadı; K25-26, *Hanseniaspora uvarum* (747 bp); K27, *Hanseniaspora opuntiae*; K28, tanımlanamadı; K29, *Saccharomyces cerevisiae* (842 bp); K30, tanımlanamadı; K31, *Hanseniaspora guilliermondii* (749 bp); K32, *Hanseniaspora opuntiae*; K33, *Hanseniaspora guilliermondii* (749 bp); K34-35, *Hanseniaspora opuntiae*; K36, *Hanseniaspora guilliermondii* (749 bp); K37-38, *Hanseniaspora opuntiae*; K39, *Hanseniaspora guilliermondii* (749 bp). (K, Kalecik Karası üzümünden izole edilen maya).



Şekil 4.7. PZR jel görüntüleri

K40, *Hanseniaspora opuntiae*; K41-42, *Wickerhamomyces anomalus* (600 bp); K43, *Metschnikowia* spp.; K44-47, *Saccharomyces cerevisiae* (842 bp); K48-K50, *Saccharomyces cerevisiae* (K, Kalecik Karası üzümünden izole edilen maya).



Şekil 4.8. PZR jel görüntüleri

D1, tanımlanamadı; D2*, *Metschnikowia* spp.; D3*, *Metschnikowia sinensis*; D4, *Metschnikowia pulcherrima* (390 bp); D5, tanımlanamadı; D6, *Metschnikowia chrysoperlae*; D7, tanımlanamadı; D8*, *Metschnikowia* spp.; D9, tanımlanamadı; D10, *Starmerella bacillaris* (475 bp); D11-14, *Metschnikowia pulcherrima*; D15*, *Metschnikowia* spp.; O14-23, *Lachancea thermotolerans*; O24, *Saccharomyces cerevisiae*; O25, *Lachancea thermotolerans* (675 bp); E35-36, *Saccharomyces cerevisiae* (842 bp); E37, *Wickerhamomyces anomalus* (600 bp); E38-41, *Saccharomyces cerevisiae* (D, Dimrit üzümünden izole edilen maya; O, Öküzgözü üzümünden izole edilen maya; E, Emir üzümünden izole edilen maya). (*) Bu mikroorganizmalar D1/D2 domainine göre daha doğru bir şekilde tanımlanmıştır.



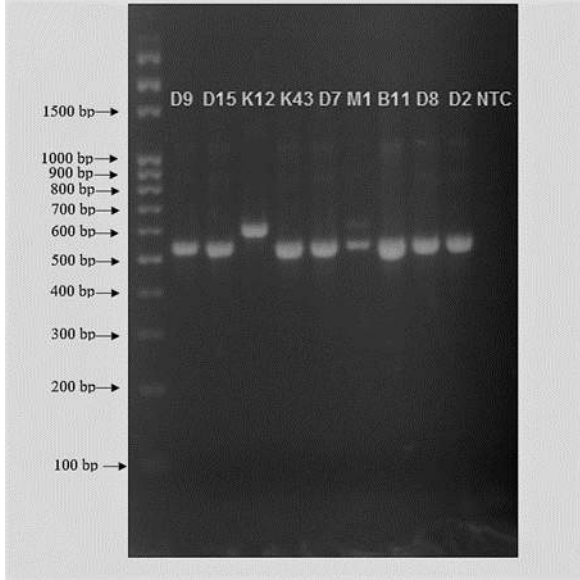
Şekil 4.9. PZR jel görüntüleri

O11, *Lachancea thermotolerans* (675 bp); O12, *Saccharomyces cerevisiae* (842 bp); O13-36, *Lachancea thermotolerans*; B1, tanımlanamadı; B2-3, *Saccharomyces cerevisiae*; B12, *Metschnikowia pulcherrima* (390 bp); B5-9, *Saccharomyces cerevisiae*; B10, *Metschnikowia pulcherrima*; B11*, *Metschnikowia* spp.; B4, *Solicoccozyma aeria*; B13-14, *Saccharomyces cerevisiae*; B15, *Metschnikowia pulcherrima*; B16, *Saccharomyces cerevisiae* (O, Öküzgözü üzümünden izole edilen maya; B, Boğazkere üzümünden izole edilen maya).

(*) Bu mikroorganizmalar D1/D2 domainine göre daha doğru bir şekilde tanımlanmıştır.

4.5.1.2. D1/D2 Bölgesi Amplifikasyonu (Sekanslanacak Bantların Elde Edilmesi)

Proje kapsamında ITS bölgesi ile tanı yapılması planlanmıştır. Ancak bazı şüpheli durumlar için D1/D2 bölgesi sekanslanmasının uygun olacağı düşünülerek bazı suşlar için bu bölgenin PZR amplifikasyonları sonrası sekansları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.10. PZR jel görüntüleri

D9, tanımlanamadı; D15, *Metschnikowia fructicola*; K12, *Hanseniaspora opuntiae*; K43, *Metschnikowia aff. fructicola*; D7, tanımlanamadı; M1, *Metschnikowia aff. fructicola*; B11, *Metschnikowia aff. pulcherrima*; D8, *Metschnikowia pulcherrima*; D2, *Metschnikowia aff. pulcherrima*

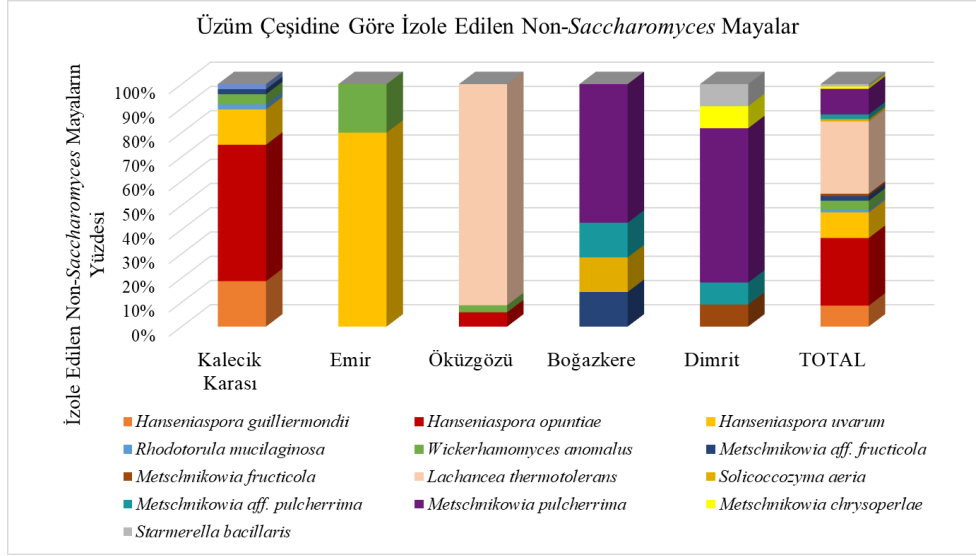
4.5.1.3. Sekanslar ve Tanı

Amplifikasyonu yapılan DNA bantları elute edilerek sekanslanmıştır (BM Laboratuvar Sistemleri Ltd. Şti.). Sekanslar ve NCBI erişim numaraları non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* maya suşları için EK 5'de verilmiştir. Sekanslanan 77 izolata da *S. cerevisiae* olarak tanı konmuştur. Yalnızca K48 ve B35 suşları ITS bölgesi sekansına göre *Saccharomyces cf. cerevisiae*/*S. paradoxus* olarak tanımlandırılırken, D1/D2 domain sekansına göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanmıştır. Bu suşlar için kesin sonuç RFLP çalışması ile elde edilmiş ve D1/D2 sekans sonucunun doğruluğu kanıtlanmıştır.

Non-*Saccharomyces* izolatlar ise *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Lachancea thermotolerans*, *Solicoccozyma aeria*, *Metschnikowia aff. fructicola*, *Metschnikowia fructicola*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia aff. pulcherrima*, *Metschnikowia sinensis*, *Metschnikowia chrysoperlae*, *Metschnikowia aff. chrysoperlae*, *Starmerella bacillaris* olarak tanımlanmıştır.

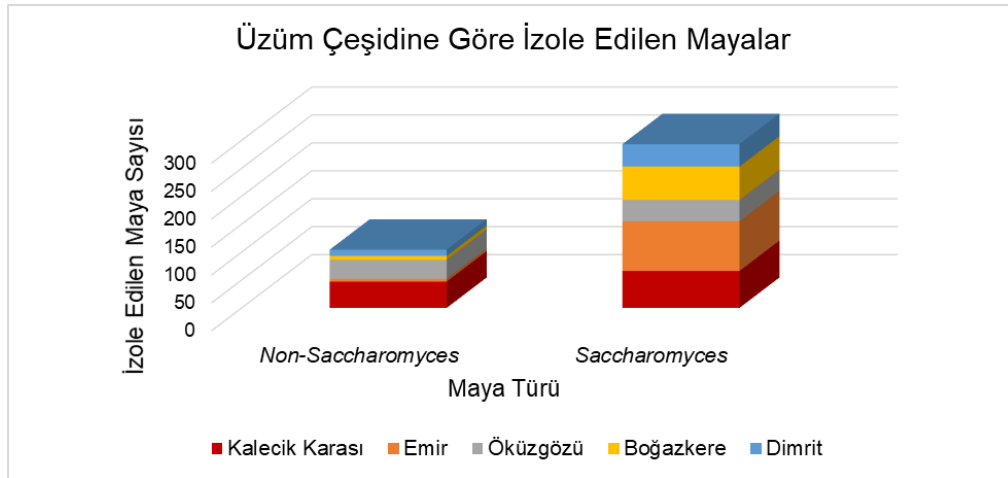
Sekanslama sonuçlarına göre elde üzüm çeşidine özel mayaların dağılımı aşağıda şekilde gösterilmektedir (Şekil. 4.11). *Metschnikowia* spp. suşları, tartışmalı (ITS sekansına

göre NCBI'da aynı benzerlik oranında birden fazla tür ile eşleşme) sonuçlar sebebiyle hem ITS bölgesine hem de D1/D2 domaine göre tanımlanmıştır. Literatürde *Metschnikowia* spp. tanımlanmasında zorlukla karşılaştıldığı ve D1/D2 domaine göre tanımların daha doğru olduğu ilgili çalışmalar vardır (Hesham vd., 2014). Bu çalışmaların doğrultusunda aşağıdaki grafikte *Metschnikowia* spp. D1/D2 domaine göre tanımlamaları verilmiştir.



Şekil 4.11. Üzüm çeşidine göre izole edilen non-Saccharomyces mayalar

Non-Saccharomyces mikroorganizmalar çoğunlukla alkolik fermentasyon başlamadan önce izole edilmiştir. Bunun sebebi *Saccharomyces* türünün baskın gelip şarapta etanol miktarını artırmasıdır. Artan etanol miktarına direnemeyen non-Saccharomyces mayalar yok olmaktadır (Heard vd., 1985; Esteve-Zarzoso vd., 1998). Şekil 4.12'de non-Saccharomyces mayaların ve *Saccharomyces* mayaların üzüm çeşidine göre değişen miktarları gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Üzüm çeşidine göre izole edilen non-Saccharomyces ve Saccharomyces mayalar

4.5.2. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm Analizi (RFLP)

4.5.2.1. *Saccharomyces* Suşlarının Tür Bazında RFLP ile Tanısı

Bu bölümde RFLP çalışmalarında kullanılan suşlar ve suşların elde edildiği kaynaklar Tablo 4.13'de gösterilmektedir.

Tablo 4.13. RFLP çalışmalarında kullanılan *Saccharomyces* suşlar ve kaynakları

Suşlar	Sekans Adları	Lab Adları	Kaynak (Üzüm çeşidi, üzümün toplandığı il, ülke, yıl)
<i>S. cerevisiae</i>	CH	CH	Chr. Hansen (MERIT™)
<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2	Kalecik Karası, Ankara, Türkiye, 2017
<i>S. cerevisiae</i>	K49	KB 4NM S2	Kalecik Karası, Ankara, Türkiye, 2017
<i>S. cerevisiae</i>	E16	EA 1W NS6	Emir, Nevşehir (Kapadokya), Türkiye, 2017
<i>S. cerevisiae</i>	E21	EB 1W NS1	Emir, Nevşehir (Kapadokya), Türkiye, 2017
<i>S. cerevisiae</i>	O12	OA 0CM NS3	Öküzgözü, Elazığ, Türkiye, 2017
<i>S. cerevisiae</i>	B3	BA 0CM NS3	Boğazkere, Elazığ, Türkiye, 2017
<i>S. cerevisiae</i>	B36	BB 4CM S10	Boğazkere, Elazığ, Türkiye, 2017
<i>S. cerevisiae</i>	D16	DA 4NM S1	Dimrit, Nevşehir (Kapadokya), Türkiye, 2017
<i>S. cerevisiae</i>	D17	DA 4CM S3	Dimrit, Nevşehir (Kapadokya), Türkiye, 2017
<i>S. cf. cerevisiae</i> *	B35	BA 6NM NS2	Boğazkere, Elazığ, Türkiye, 2017
<i>S. cf. cerevisiae</i> *	K48	KA 4NM S8	Kalecik Karası, Ankara, Türkiye, 2017
<i>S. bayanus</i>	-	<i>S. bayanus</i>	DSMZ

A, A paralel; B, B paralel; K, Kalecik Karası; E, Emir; O, Öküzgözü; B, Boğazkere; D, Dimrit; 0CM, Soğuk maserasyon 0.gün; 4CM, Soğuk maserasyon 4.gün; 4NM, Normal maserasyon 4.gün; 6NM, Normal maserasyon 6.gün; 32NM, Normal maserasyon 32.gün; 1W, 1. Hafta; DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH; *, D1/D2 sekanslama sonucuna göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanmıştır.

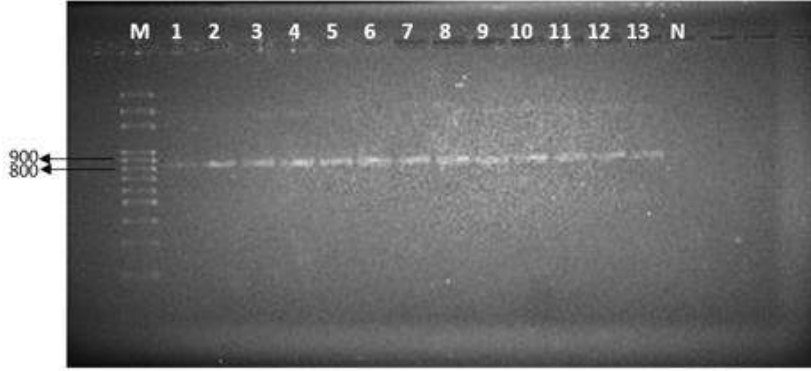
Sonuçlarımızda tüm *Saccharomyces* izolatlarımızda 850 bp'lik bantların oluşması nedeniyle, literatürde 850 bp bantları olan *Saccharomyces* türleri dikkate alınmıştır. ITS bölgesinin çoğaltılması sonrası referans suşlarımızın oluşturduğu fragment büyüklükleri ve literatürde ITS bölgesi 850 bp amplifikasyon vermesi beklenen türler Tablo 4.14'te verilmiştir.

Tablo 4.14. Cinse göre *Saccharomyces* mayaların ITS1 ve ITS4 primerleri kullanımı ile elde edilen ITS bölgesi PZR bantları

Maya cinsleri	Bizim çalışma (bp)	Referansa göre (bp)	Kaynak
<i>S. cerevisiae</i>	850	850	(Pando vd., 2010)
<i>S. paradoxus</i>	ND	850	(Fernandez-Espinar vd., 2001)
<i>S. bayanus</i>	850	850	(Pando vd., 2010)
<i>S. cariocanus</i>	ND	850	(Naumova vd., 2013)
<i>S. kudriavzevii</i>	ND	850	(Pando vd., 2010)
<i>S. mikatae</i>	ND	850	(Pando vd., 2010)
<i>S. pastorianus</i>	ND	850	(Pando vd., 2010)

ND, tespit edilmedi.

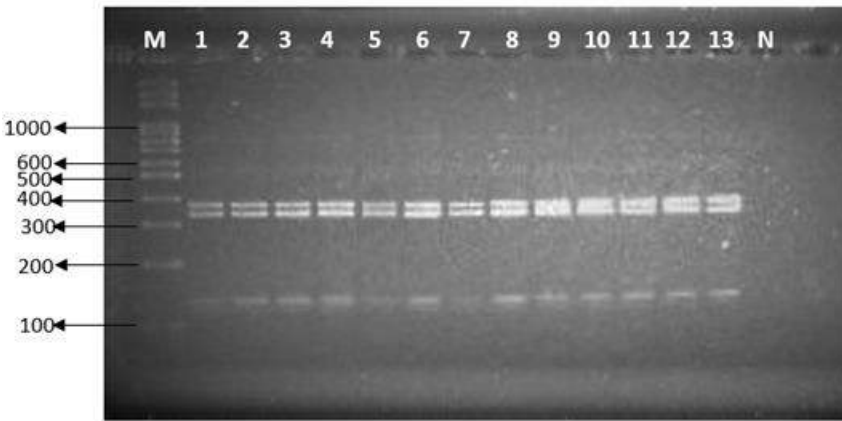
Çalışılan izolatların *Saccharomyces* cinsine ait olduğu, elde edilen bantın 850 bp olması ile saptanmıştır (Şekil 4.13), bu sonuç literatür ile uyumludur. Ancak, tür bazında, *S. cerevisiae*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* and *S. bayanus* türlerinde de ITS-PZR fragmant büyüklüğü 850 bp olduğundan ve sekans sonuçlarımızda *S. paradoxus* gibi tanılar olduğundan, tür bazında ayırım yapma gereği doğmuştur.



Şekil 4.13. *Saccharomyces* suşlarının PZR sonucu

M, 100 bp Markör; 1, Chr. Hansen *S. cerevisiae*; 2, KA 32 NM S2, *S. cerevisiae*; 3, KB 4NM S2, *S. cerevisiae*; 4, EA 1W NS6, *S. cerevisiae*; 5, EB 1W NS1, *S. cerevisiae*; 6, ÖA 0CM NS3, *S. cerevisiae*; 7, BA 0CM NS3, *S. cerevisiae*; 8, BB 4CM S10, *S. cerevisiae*; 9, DA 4NM S1, *S. cerevisiae*; 10, DA 4CM S3, *S. cerevisiae*; 11, BA 6NM NS2, *S. cerevisiae* (*S. paradoxus*, ITS sekans sonucuna göre); 12, KA 4NM S8, *S. cerevisiae* (*S. paradoxus*, ITS sekans sonucuna göre); 13, DSMZ *S. bayanus*; N, Negatif kontrol.

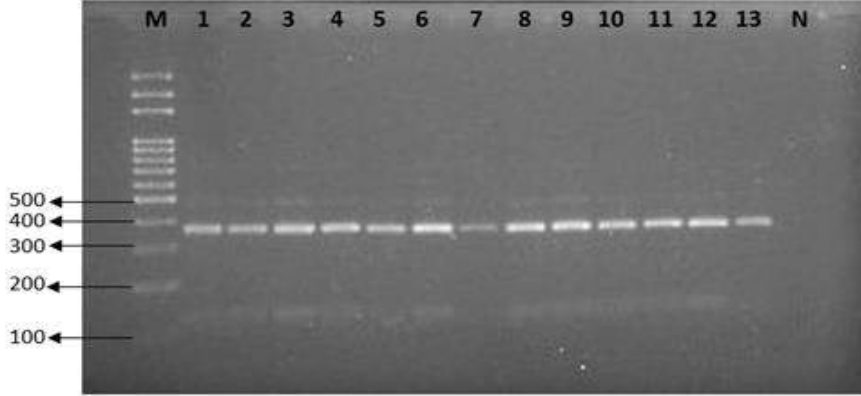
Saccharomyces için *HhaI* (*CfoI*) restriksiyon enzimi ile RFLP tekniği uygulandığında, kesilen fragmantların büyüklüğü 140+320+380 bp olarak elde edilmiştir (Şekil 4.14). *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* ve *S. bayanus* türlerinin *HhaI* restriksiyon profilleri arasında bir fark olmadığı için bu türler *HhaI* enzimi ile ayırt edilememiştir (Pham vd., 2011).



Şekil 4.14. *HhaI* (*CfoI*) restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü

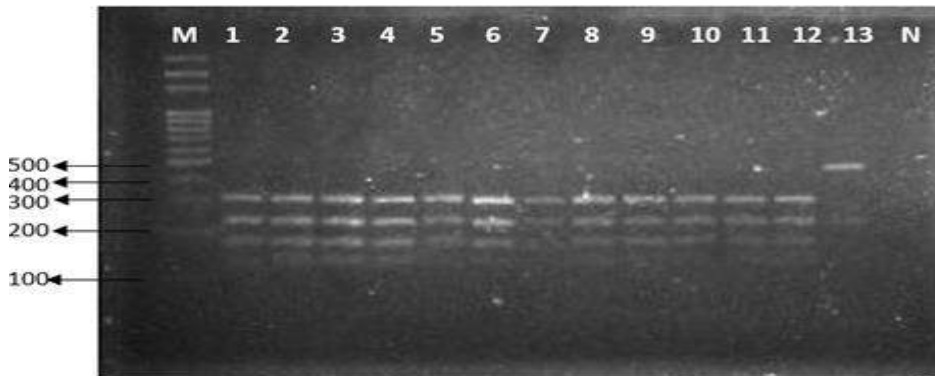
M, 100 bp Markör; 1, Chr. Hansen *S. cerevisiae*; 2, KA 32 NM S2, *S. cerevisiae*; 3, KB 4NM S2, *S. cerevisiae*; 4, EA 1W NS6, *S. cerevisiae*; 5, EB 1W NS1, *S. cerevisiae*; 6, OA 0CM NS3, *S. cerevisiae*; 7, BA 0CM NS3, *S. cerevisiae*; 8, BB 4CM S10, *S. cerevisiae*; 9, DA 4NM S1, *S. cerevisiae*; 10, DA 4CM S3, *S. cerevisiae*; 11, BA 6NM NS2, *S. cerevisiae* (*S. paradoxus*, ITS sekans sonucuna göre); 12, KA 4NM S8, *S. cerevisiae* (*S. paradoxus*, ITS sekans sonucuna göre); 13, DSMZ *S. bayanus*; N, Negatif kontrol.

Şekil 4.15'da görülebileceği gibi *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* ve *S. bayanus* türleri *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesildiğinde fragmanların büyüklüğü 120+380 bp olarak elde edilmiştir. Bu profil literatürdeki profile (110+380 bp) uygun olmasına rağmen üç tür de aynı restriksiyon profiline sahip olduğu için *HinfI* enzimi ile bu türler birbirinden ayırt edilememiştir (Pando vd., 2010).



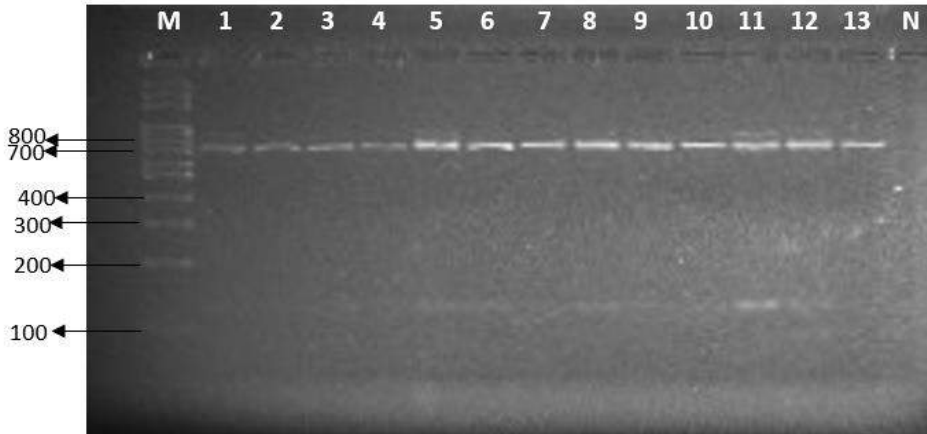
Şekil 4.15. *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü
M, 100 bp Markör; 1, Chr. Hansen *S. cerevisiae*; 2, KA 32 NM S2, *S. cerevisiae*; 3, KB 4NM S2, *S. cerevisiae*; 4, EA 1W NS6, *S. cerevisiae*; 5, EB 1W NS1, *S. cerevisiae*; 6, ÖA 0CM NS3, *S. cerevisiae*; 7, BA 0CM NS3, *S. cerevisiae*; 8, BB 4CM S10, *S. cerevisiae*; 9, DA 4NM S1, *S. cerevisiae*; 10, DA 4CM S3, *S. cerevisiae*; 11, BA 6NM NS2, *S. cerevisiae* (*S. paradoxus*, ITS sekans sonucuna göre); 12, KA 4NM S8, *S. cerevisiae* (*S. paradoxus*, ITS sekans sonucuna göre); 13, DSMZ *S. bayanus*; N, Negatif kontrol.

S. cerevisiae ve *S. paradoxus* için *HaeIII* enziminin profili 120+180+220+310 bp olarak elde edilmiştir ve bu sonuç literatüre uygundur (Fernandez-Espinar vd., 2001). Fakat bu iki tür aynı profile sahip olduğu için *HaeIII* enzimi ile ayırt edilememiştir. Öte yandan, *S. bayanus* için *HaeIII* restriksiyon profili diğerlerinden farklı bir profile sahiptir (125+230+495 bp). Şekil 4.16'da *S. bayanus* türünün bu enzim kullanılarak *S. cerevisiae* ve *S. paradoxus*'tan ayırt edilebildiği görülmektedir.



Şekil 4.16. *HaeIII* restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü
M, 100 bp Markör; 1, Chr. Hansen *S. cerevisiae*; 2, KA 32 NM S2, *S. cerevisiae*; 3, KB 4NM S2, *S. cerevisiae*; 4, EA 1W NS6, *S. cerevisiae*; 5, EB 1W NS1, *S. cerevisiae*; 6, ÖA 0CM NS3, *S. cerevisiae*; 7, BA 0CM NS3, *S. cerevisiae*; 8, BB 4CM S10, *S. cerevisiae*; 9, DA 4NM S1, *S. cerevisiae*; 10, DA 4CM S3, *S. cerevisiae*; 11, BA 6NM NS2, *S. cerevisiae* (*S. paradoxus*, ITS sekans sonucuna göre); 12, KA 4NM S8, *S. cerevisiae* (*S. paradoxus*, ITS sekans sonucuna göre); 13, DSMZ *S. bayanus*; N, Negatif kontrol.

S. cerevisiae ve *S. bayanus* için *Hpa*II enziminin referans restriksiyon profili 125+725 bp iken *S. paradoxus* için 850 bp'dir (Fernandez-Espinar, 2000). Böylece, *S. paradoxus* suşlarını *Hpa*II enzimi kullanarak *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* türlerinden ayırmak mümkün olabilmektedir. Şekil 4.17'de *Hpa*II RE ile kesilen izolatlarımız ile yürütülen jelde, *S. paradoxus* türünün *Hpa*II restriksiyon profilinin *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* türlerinden farklı elde edilmesi beklenirken, ITS bölgesi sekans sonuçlarına göre *S. paradoxus* olarak tanımlanmış olan suşların da bu enzim ile 125+725 bantlarına parçalanmış olduğu gözlemlenmiştir. Buna göre, jelde 11 ve 12. sırada yer alan B35 (BA 6NM NS2) ve K48 (KA 4NM S8) kodlu mikroorganizmaların *S. paradoxus* türüne ait olmadığı ve *S. cerevisiae* türüyle aynı restriksiyon profiline sahip olduğu gözlemlenmiştir. Böylece, B35 (BA 6NM NS2) ve K48 (KA 4NM S8) mayalarının D1/D2 gen bölgesi dizilimine uygun olarak *S. cerevisiae* türüne ait oldukları sonucuna varılmıştır. Kesim sonuçlarının tümü, referans sonuçlar ile birlikte Tablo 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.17. *Hpa*II restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü

M, 100 bp Markör; 1, Chr. Hansen *S. cerevisiae*; 2, KA 32 NM S2, *S. cerevisiae*; 3, KB 4NM S2, *S. cerevisiae*; 4, EA 1W NS6, *S. cerevisiae*; 5, EB 1W NS1, *S. cerevisiae*; 6, ÖA 0CM NS3, *S. cerevisiae*; 7, BA 0CM NS3, *S. cerevisiae*; 8, BB 4CM S10, *S. cerevisiae*; 9, DA 4NM S1, *S. cerevisiae*; 10, DA 4CM S3, *S. cerevisiae*; 11, BA 6NM NS2, *S. cerevisiae* (*S. paradoxus*, ITS sekans sonucuna göre); 12, KA 4NM S8, *S. cerevisiae* (*S. paradoxus*, ITS sekans sonucuna göre); 13, DSMZ *S. bayanus*; N, Negatif kontrol.

Tablo 4.15. Cinse göre ITS bölgesi bantları, ITS bandı enzimler ile kesimi ve literatür değerleriyle kıyaslanması

RE	Maya türleri	Bizim çalışma (bp)	Referansa göre (bp)	Kaynak
<i>HhaI</i>				
	<i>S. cerevisiae</i>	140+320+380	150+32+375 385, 365	Fernandez-Espinar vd., 2001 Pando vd., 2010
	<i>S. paradoxus</i>	150+340+385	150 + 325 +375	Fernandez-Espinar vd., 2001
	<i>S. bayanus</i>	150+340+385	150 + 325 +375 385, 365	Fernandez-Espinar vd., 2001 Pando vd., 2010
	<i>S. cariocanus</i>	-	-	-
	<i>S. kudriavzevii</i>	-	385, 365	Pando vd., 2010
	<i>S. mikatae</i>	-	385, 365	Pando vd., 2010
	<i>S. pastorianus</i>	-	375+325+150 385, 365	Fernandez-Espinar vd., 2001 Pando vd., 2010
<i>HaeIII</i>				
	<i>S. cerevisiae</i>	310+220+180+120	325+230+170+125	Fernandez-Espinar vd., 2001
	<i>S. paradoxus</i>	310+220+180+120	325+230+170+125	Fernandez-Espinar vd., 2001
	<i>S. bayanus</i>	500+220+120	495+230+125	Pham vd., 2011
	<i>S. cariocanus</i>	-	320+230+170+130	Naumova vd., 2013
	<i>S. kudriavzevii</i>	-	500, 220, 145	Pando vd., 2010
	<i>S. mikatae</i>	-	500, 220, 145	Pando vd., 2010
	<i>S. pastorianus</i>	-	495+230+125	Pham vd., 2011
<i>HinfI</i>				
	<i>S. cerevisiae</i>	380+120	365, 155	Guillamon vd., 1998
	<i>S. paradoxus</i>	380+130	365,155	Guillamon vd., 1998
	<i>S. bayanus</i>	380+130	365,155	Pando vd., 2010
	<i>S. cariocanus</i>	-	-	-
	<i>S. kudriavzevii</i>	-	365,155	Pando vd., 2010
	<i>S. mikatae</i>	-	365,155	Pando vd., 2010
	<i>S. pastorianus</i>	-	365,155	Guillamon vd., 1998
<i>HpaII</i>				
	<i>S. cerevisiae</i>	730+120	725+125	Fernandez-Espinar vd., 2001
	<i>S. paradoxus</i>	740+130	850	Fernandez-Espinar vd., 2001
	<i>S. bayanus</i>	740+130	725+125	Fernandez-Espinar vd., 2001
	<i>S. cariocanus</i>	-	850	Naumova vd., 2013
	<i>S. kudriavzevii</i>	-	730+120	Naumova vd., 2013
	<i>S. mikatae</i>	-	850	Naumova vd., 2013
	<i>S. pastorianus</i>	-	725+125	Fernandez-Espinar vd., 2001

4.5.2.2. Non-Saccharomyces İzolatlarının RFLP ile Tür Bazında Tanısı

Non-Saccharomyces izolatlarımız ile yapılan RFLP çalışmaları, sonuçlarımızın teyit edilmesi ve tür bazında farklılaştırmaların sağlanması amacı ile yürütülmüştür. RFLP çalışmaları için seçilen izolatlarımız Tablo 4.16'da gösterilmiştir.

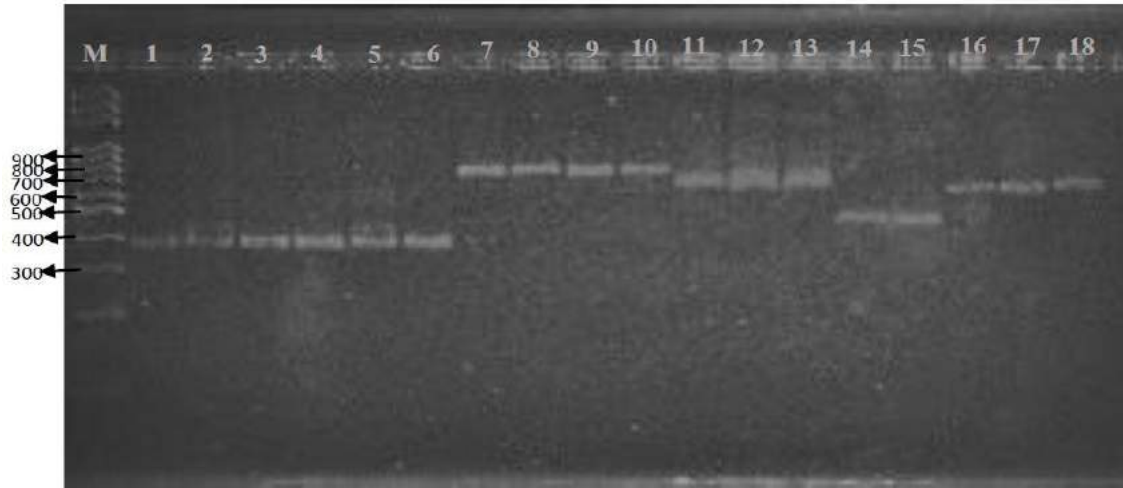
Tablo 4.16. Araştırmada kullanılan non-*Saccharomyces* suşlar ve kaynakları

Suşlar	Sekans Adları	Lab Adları	Kaynak (Üzüm çeşidi, üzümün toplandığı il, ülke, yıl)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	M.p	M.p	DSMZ
<i>Metschnikowia sinensis</i>	D3*	DA 0CM NS3	Dimrit, Kapadokya, Türkiye, 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	B10	BB 0CM NS2	Boğazkere, Elazığ, Türkiye, 2017
<i>Metschnikowia aff. pulcherrima</i>	B11*	BB 0CM NS3	Boğazkere, Elazığ, Türkiye, 2017
<i>Metschnikowia fructicola</i>	D15*	DB 4CM NS3	Dimrit, Kapadokya, Türkiye, 2017
<i>Metschnikowia aff. fructicola</i>	B33*	BB 4CM NS8	Boğazkere, Elazığ, Türkiye, 2017
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	H.u	DSMZ
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	K13	KA 4CM NS3	Kalecik Karası, Ankara, Türkiye, 2017
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	K1	KA 0CM NS1	Kalecik Karası, Ankara, Türkiye, 2017
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	K2	KA 0CM NS2	Kalecik Karası, Ankara, Türkiye, 2017
<i>Lachancea thermotolerans</i> (<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>)	-	L.t	DSMZ
<i>Lachancea thermotolerans</i>	O9	OB 4CM NS4	Öküzgözü, Elazığ, Türkiye, 2017
<i>Lachancea thermotolerans</i>	O16	OA 0CM NS7	Öküzgözü, Elazığ, Türkiye, 2017
<i>Candida spp.</i>	-	C	DSMZ
<i>Starmerella bacillaris</i> (<i>Candida zemplinina</i>)	D10	DA 4CM NS2	Dimrit, Kapadokya, Türkiye, 2017
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	K9	KB 0CM NS4	Kalecik Karası, Ankara, Türkiye, 2017
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (<i>picha anomala</i>)	K41	KA 0CM S1	Kalecik Karası, Ankara, Türkiye, 2017
<i>Solicoccozyma aerea</i> (<i>Cryptococcus aerius</i>)	B4	BA 0CM NS4	Boğazkere, Elazığ, Türkiye, 2017

DSMZ, German collection of microorganisms and cell cultures GmbH; DA, Dimrit üzümü A paralel şarap; BB, Boğazkere üzümü B paralel şarap; DB, Dimrit üzümü B paralel şarap; KA, Kalecik Karası üzümü A paralel şarap; OB, Öküzgözü üzümü B paralel şarap; OA, Öküzgözü üzümü A paralel şarap; KB, Kalecik Karası üzümü B paralel şarap; BA, Boğazkere üzümü A paralel şarap; 0CM, Soğuk maserasyon 0. gün; 4CM, Soğuk maserasyon 4. gün.

*D1/D2 sekanslama ile farklı tür olarak tanımlanmıştır: D3, *Metschnikowia pulcherrima*; B11, *Metschnikowia aff. pulcherrima*; D15, *Metschnikowia fructicola*; B33, *Metschnikowia aff. fructicola*

ITS bölgesinin ITS1 ve ITS4 primerlerinin kullanımı ile çoğaltılması sonrasında elde edilen bantlar fotoğraflanmıştır (Şekil 4.18). Jel görüntüsünde, non-*Saccharomyces* suşların PZR bantlarının 390 bp ile 750 bp arasında değişen boyutlarda olduğu görülmektedir. Aynı cinse ait türler aynı büyüklükte PZR ürünü vermektedir. Cinsler arası farklılıklar gözlenebilmekte, ancak aynı cinse ait türler birbirinden ayırt edilememektedir. Elde edilen bant büyüklükleri referanslar ile uyumludur (Tablo 4.17).



Şekil 4.18. Non-Saccharomyces suşlarının PZR sonucu

M, 100bp Markör; 1, referans suş *Metschnikowia pulcherrima* (DSMZ); 2, *Metschnikowia pulcherrima* (D1/D2) *Metschnikowia sinensis* (ITS) D3 (DA 0CM NS3); 3, *Metschnikowia pulcherrima* B10 (BB 0CM NS2); 4, *Metschnikowia aff. pulcherrima* B11 (BB 0CM NS3); 5, *Metschnikowia fructicola* D15 (DB 4CM NS3); 6, *Metschnikowia aff. fructicola* B33 (BB 4CM NS8); 7, referans suş *Hanseniaspora uvarum* (DSMZ); 8, *Hanseniaspora guilliermondii* K1 (KA 0CM NS1); 9, *Hanseniaspora opuntiae* K2 (KA 0CM NS2); 10, *Hanseniaspora uvarum* K13 (KA 4CM NS3); 11, referans suş *Lachancea thermotolerans* (DSMZ); 12, *Lachancea thermotolerans* O9 (OB 4CM NS4); 13, *Lachancea thermotolerans* O16 (OA 0CM NS7); 14, reference strain *Candida spp.*(DSMZ); 15, *Candida zemplinina* (*Starmerella bacillaris*) D10 (DA 4CM NS2); 16, *Rhodotorula mucilaginosa* K9 (KB 0CM NS4); 17, *Wickerhamomyces anomalus* K41 (KA 0CM S1); 18, *Solicoccozyma aerea* B4 (BA 0CM NS4).

Tablo 4.17. Cinse göre mayaların ITS1 and ITS4 primerleri kullanımı ile elde edilen ITS bölgesi PZR bantları

Maya cinsleri	Bizim çalışma (bp)	Referans'a göre (bp)	Kaynak
<i>Metschnikowia</i> spp.	390	400	Sabate vd., 2002
<i>Hanseniaspora</i> spp.	750	750	Garofalo vd., 2016
<i>Lachancea</i> spp.	690	700	Garofalo vd., 2016
<i>Candida</i> spp.	475	475	Garofalo vd., 2016
<i>Rhodotorula</i> spp.	620	640	Sabate vd., 2002
<i>Wickerhamomyces</i> spp.	620	650	Bautista-Gallego vd., 2011
<i>Solicoccozyma</i> spp.	650	-	-

Diğer taraftan, ITS bölgesi PZR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesildiğinde, türler arasındaki farklılıklar ortaya konulabilmektedir.

Non-Saccharomyces izolatlarımız için *HhaI* (*CfoI*) restriksiyon enzimi ile RFLP tekniği uygulandığında, literatüre uygun sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte, bu enzimin kesimi ile *Metschnikowia* ve *Hanseniaspora* birbirinden ayırt edilemezken *Metschnikowia* ve *Hanseniaspora* diğer 5 türden (*L. thermotolerans*, *S. bacillaris*, *R. mucilaginosa*, *W. anomalus* ve *S. aerea*) ayırt edilebilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. *HhaI* (*CfoI*) restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü

M, 100bp Markör; 1, referans suş *Metschnikowia pulcherrima* (DSMZ); 2, *Metschnikowia pulcherrima*(D1D2)/*Metschnikowia sinensis* (ITS) D3 (DA 0CM NS3); 3, *Metschnikowia pulcherrima* B10 (BB 0CM NS2); 4, *Metschnikowia aff. pulcherrima* B11 (BB 0CM NS3); 5, *Metschnikowia fructicola* D15 (DB 4CM NS3); 6, *Metschnikowia aff. fructicola* B33 (BB 4CM NS8); 7, referans suş *Hanseniaspora uvarum* (DSMZ); 8, *Hanseniaspora guilliermondii* K1 (KA 0CM NS1); 9, *Hanseniaspora opuntiae* K2 (KA 0CM NS2); 10, *Hanseniaspora uvarum* K13 (KA 4CM NS3); 11, referans suş *Lachancea thermotolerans* (DSMZ); 12, *Lachancea thermotolerans* O9 (OB 4CM NS4); 13, *Lachancea thermotolerans* O16 (OA 0CM NS7); 14, reference strain *Candida spp.*(DSMZ); 15, *Candida zemplinina* (*Starmerella bacillaris*) D10 (DA 4CM NS2); 16, *Rhodotorula mucilaginosa* K9 (KB 0CM NS4); 17, *Wickerhamomyces anomalus* K41 (KA 0CM S1); 18, *Solicoccozyma aerea* B4 (BA 0CM NS4)

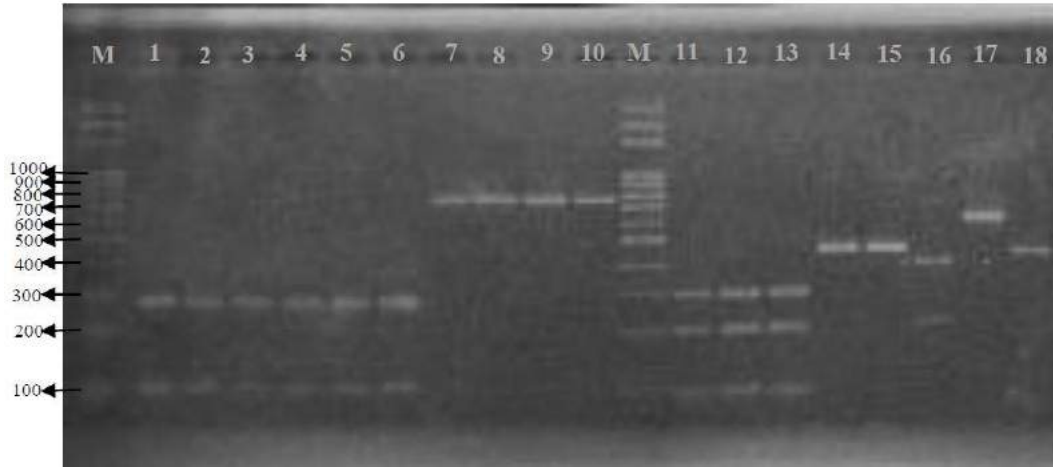
HinfI enzimi 4 tane referans suşu (DSM *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, *L. thermotolerans* ve *Candida spp.*) içeren toplam 18 non-*Saccharomyces* için kullanılmıştır. Şekil 4.20'de görüldüğü gibi *L. thermotolerans*, *S. bacillaris*, *R. mucilaginosa*, *W. anomalus* ve *S. aerea* tür bazında ayırt edilebilmiştir, fakat *Metschnikowia* ve *Hanseniaspora* cinslerine ait mayalar ayırt edilememiştir.



Şekil 4.20. *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü

M, 100bp Markör; 1, referans suş *Metschnikowia pulcherrima* (DSMZ); 2, *Metschnikowia pulcherrima*(D1D2)/*Metschnikowia sinensis* (ITS) D3 (DA 0CM NS3); 3, *Metschnikowia pulcherrima* B10 (BB 0CM NS2); 4, *Metschnikowia aff. pulcherrima* B11 (BB 0CM NS3); 5, *Metschnikowia fructicola* D15 (DB 4CM NS3); 6, *Metschnikowia aff. fructicola* B33 (BB 4CM NS8); 7, referans suş *Hanseniaspora uvarum* (DSMZ); 8, *Hanseniaspora guilliermondii* K1 (KA 0CM NS1); 9, *Hanseniaspora opuntiae* K2 (KA 0CM NS2); 10, *Hanseniaspora uvarum* K13 (KA 4CM NS3); 11, referans suş *Lachancea thermotolerans* (DSMZ); 12, *Lachancea thermotolerans* O9 (OB 4CM NS4); 13, *Lachancea thermotolerans* O16 (OA 0CM NS7); 14, reference strain *Candida spp.*(DSMZ); 15, *Candida zemplinina* (*Starmerella bacillaris*) D10 (DA 4CM NS2); 16, *Rhodotorula mucilaginosa* K9 (KB 0CM NS4); 17, *Wickerhamomyces anomalus* K41 (KA 0CM S1); 18, *Solicoccozyma aerea* B4 (BA 0CM NS4)

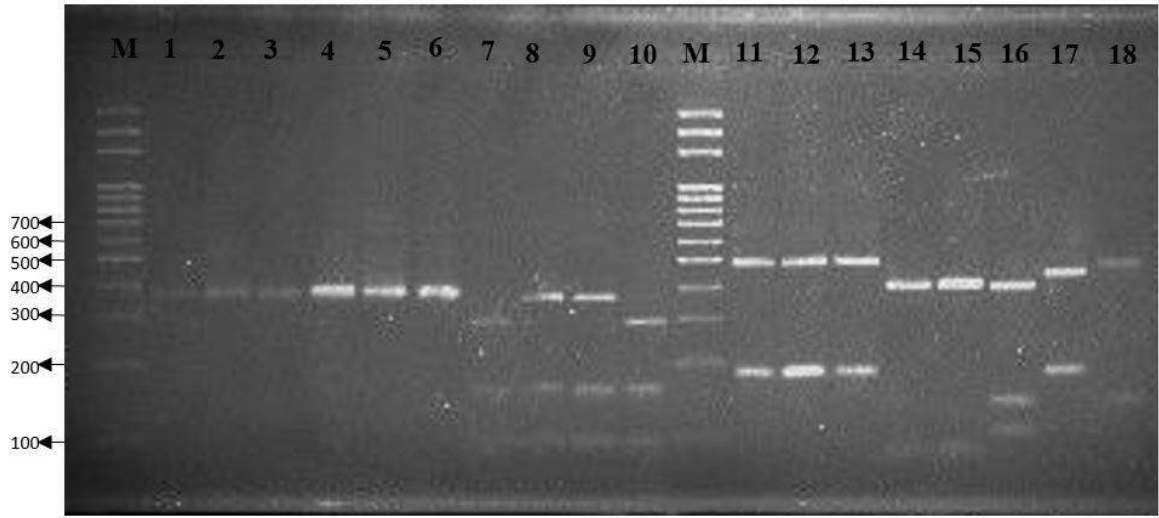
Şekil 4.21 non-*Saccharomyces* mayaların *HaeIII* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen profili göstermektedir. Bu analiz sonucunda 7 farklı restriksiyon profili 2 cinse (*Metschnikowia*, *Hanseniaspora*) ve 5 türe (*Lachancea thermotolerans*, *Starmerella bacillaris*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus* ve *Solicoccozyma aeria*) aittir. Bununla birlikte, *HaeIII* enzimi ile *Metschnikowia* ve *Hanseniaspora* cinslerine ait türlerin aynı profili gösterdiği, türler arası ayırt edici bant profili gösteremedikleri tespit edilmiştir. Cins bazında ayırım sağlanırken, türler arası ayırım sağlanamamıştır.



Şekil 4.21. *HaeIII* restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü

M, 100bp Markör; 1, referans suş *Metschnikowia pulcherrima* (DSMZ); 2, *Metschnikowia pulcherrima* (D1/D2) *Metschnikowia sinensis* (ITS) D3 (DA 0CM NS3); 3, *Metschnikowia pulcherrima* B10 (BB 0CM NS2); 4, *Metschnikowia aff. pulcherrima* B11 (BB 0CM NS3); 5, *Metschnikowia fructicola* D15 (DB 4CM NS3); 6, *Metschnikowia aff. fructicola* B33 (BB 4CM NS8); 7, referans suş *Hanseniaspora uvarum* (DSMZ); 8, *Hanseniaspora guilliermondii* K1 (KA 0CM NS1); 9, *Hanseniaspora opuntiae* K2 (KA 0CM NS2); 10, *Hanseniaspora uvarum* K13 (KA 4CM NS3); 11, referans suş *Lachancea thermotolerans* (DSMZ); 12, *Lachancea thermotolerans* O9 (OB 4CM NS4); 13, *Lachancea thermotolerans* O16 (OA 0CM NS7); 14, reference strain *Candida spp.* (DSMZ); 15, *Candida zemplinina* (*Starmerella bacillaris*) D10 (DA 4CM NS2); 16, *Rhodotorula mucilaginosa* K9 (KB 0CM NS4); 17, *Wickerhamomyces anomalus* K41 (KA 0CM S1); 18, *Solicoccozyma aeria* B4 (BA 0CM NS4)

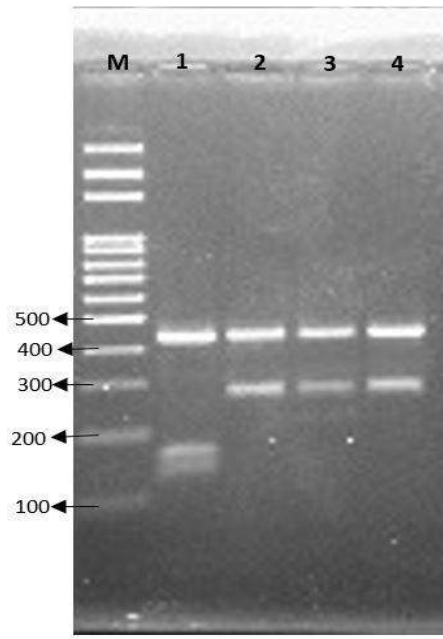
DdeI restriksiyon enzimi non-*Saccharomyces* mayalar için *H. uvarum* türüne ait olan mayaları (300+180+95 bp), *H. guilliermondii* (360+180+100 bp) ve *H. opuntiae* (360+180+100 bp) türlerinden ayırt etmek amacıyla kullanılmıştır (Şekil 4.22). *H. guilliermondii* ve *H. opuntiae* türleri *DdeI* enzimi ile ayırt edilemediği için, bu iki türü birbirinden ayırt edebilmek için *DraI* enzimi kullanılmıştır (Nisiotou vd., 2007).



Şekil 4.22. *Ddel* restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü

M, 100bp Markör; 1, referans suş *Metschnikowia pulcherrima* (DSMZ); 2, *Metschnikowia pulcherrima*(D1D2)/ *Metschnikowia sinensis* (ITS) D3 (DA 0CM NS3); 3, *Metschnikowia pulcherrima* B10 (BB 0CM NS2); 4, *Metschnikowia aff. pulcherrima* B11 (BB 0CM NS3); 5, *Metschnikowia fructicola* D15 (DB 4CM NS3); 6, *Metschnikowia aff. fructicola* B33 (BB 4CM NS8); 7, referans suş *Hanseniaspora uvarum* (DSMZ); 8, *Hanseniaspora guilliermondii* K1 (KA 0CM NS1); 9, *Hanseniaspora opuntiae* K2 (KA 0CM NS2); 10, *Hanseniaspora uvarum* K13 (KA 4CM NS3); 11, referans suş *Lachancea thermotolerans* (DSMZ); 12, *Lachancea thermotolerans* O9 (OB 4CM NS4); 13, *Lachancea thermotolerans* O16 (OA 0CM NS7); 14, reference strain *Candida spp.*(DSMZ); 15, *Candida zemplinina* (*Starmerella bacillaris*) D10 (DA 4CM NS2); 16, *Rhodotorula mucilaginosa* K9 (KB 0CM NS4); 17, *Wickerhamomyces anomalus* K41 (KA 0CM S1); 18, *Solicoccozyma aerea* B4 (BA 0CM NS4)

Ddel enzimi, *H. uvarum*'u *H. guilliermondii* ve *H. opuntiae*'dan ayırt ederken, *H. guilliermondii* ve *H. opuntiae* aynı paterni göstermektedir. Bu durumda *Dral* restriksiyon enzimi *H. guilliermondii* ve *H. opuntiae* türlerini ayırt etmek için kullanılmıştır. Nisiotou ve Nychas (2007) çalışmalarında *Dral* restriksiyon enzimi ile *H. guilliermondii* ve *H. opuntiae* türlerini ayırt edebilmişlerdir. Bizim çalışmamızda da Şekil 4.23'te görülebileceği gibi *Dral* enzimi ile 3 farklı tür için, 2 farklı restriksiyon profili elde edilmiştir. Benzer biçimde, *Ddel* ve *Dral* enzimlerinin *H. guilliermondii* ve *H. uvarum* türlerini de iki aşamada birbirinden ayırt edebildiği gözlemlenmiştir. Böylelikle, iki aşamada (iki enzim: *Ddel* ve *Dral* kullanımı ile ikiye iki kıyaslamalar ile) 3 ayrı türü birbirinden ayırt etmek mümkün olmaktadır.



Şekil 4.23. *DdeI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş PZR ürünlerinin jel görüntüsü
M, 100bp Markör; 1, *Hanseniaspora guilliermondii* K1 (KA 0CM NS1); 2, *Hanseniaspora opuntiae* K2 (KA 0CM NS2); 3, referans suş *Hanseniaspora uvarum* (DSMZ); 4, *Hanseniaspora uvarum* K13 (KA 4CM NS3)

Tablo 4.18. *DdeI* enzimi restriksiyon profili

Tür Adı	Tür Kodu	AP* referans	AP	Restriksiyon Profili (bp)		
				Bizim çalışma	Referansa göre	Kaynak
<i>H. guilliermondii</i>	K1	750	750	360+180+100	360+180+85+70+50	Nisiotou ve Nychas, 2007
<i>H. opuntiae</i>	K2	750	750	360+180+100	360+180+85+70+50	Nisiotou ve Nychas, 2007
<i>H. uvarum</i> (DSMZ)	H.u	750	750	300+180+100	300+180+95+90+85	Garofalo vd., 2016
<i>H. uvarum</i>	K13	750	750	300+180+100	300+180+95+90+85	Garofalo vd., 2016

* Amplification Pattern (PZR ürünü fragmant büyüklüğü)

Tablo 4.19. *DdeI* enzimi restriksiyon profili

Tür Adı	Tür Kodu	AP* referans	AP	Restriksiyon Profili (bp)		
				Bizim çalışma	Referansa göre	Kaynak
<i>H. guilliermondii</i>	K1	750	750	420+150+130	420+150+130+30	Nisiotou ve Nychas, 2007
<i>H. opuntiae</i>	K2	750	750	420+300	420+300+30	Nisiotou ve Nychas, 2007
<i>H. uvarum</i> (DSMZ)	H.u	750	750	420+300	-	-
<i>H. uvarum</i>	K13	750	750	420+300	-	-

* Amplification Pattern (PZR ürünü fragmant büyüklüğü)

Tablo 4.20'de türler arası farklılıkları ortaya koymak amacı ile çalışılan maya türlerinde, ITS bölgesi PZR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesimleri sonucunda elde edilen fragmantlar ve benzer sonuçlar elde eden referans çalışmalar verilmiştir.

Tablo 4.20. Maya türleri ITS-PZR ürünü restriksiyon enzimleri ile kesimi ve kaynaklar

RE	Maya türleri	Çalışma sonuçlarımız (bp)	Referansa göre (bp)	Kaynak
HaeIII				
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	280+100	280+100	Sabate vd., 2002
	<i>Metschnikowia sinensis</i>	280+100	-	-
	<i>Metschnikowia aff. pulcherrima</i>	280+100	-	-
	<i>Metschnikowia fructicola</i>	280+100	300+100	Tofalo vd., 2011
	<i>Metschnikowia aff. fructicola</i>	380+280+100	-	-
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	750	Garofalo vd., 2016
	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	750	750	Garofalo vd., 2016
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	750	750	Garofalo vd., 2016
	<i>Lachancea thermotolerans</i>	310+215+90	310+215+90+90	Garofalo vd., 2016
	<i>Candida zemplinina</i>	475	475	Garofalo vd., 2016
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	405+215	425 +215	Sabate vd., 2002
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	620	625	Bautista-Gallego vd., 2011
	<i>Solicoccozyma aeria</i>	480	410	Kwasna vd., 2010
HhaI (CfoI)				
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	200+100	205+100+95	Sabate vd., 2002
	<i>Metschnikowia sinensis</i>	200+100	-	-
	<i>Metschnikowia aff. pulcherrima</i>	200+100	-	-
	<i>Metschnikowia fructicola</i>	200+100	298+100	Tofalo vd., 2011
	<i>Metschnikowia aff. fructicola</i>	200+100	-	-
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	320+105	320+310+105	Garofalo vd., 2016
	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	320+105	320+310+105	Garofalo vd., 2016
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	320+105	320+310+120	Garofalo vd., 2016
	<i>Lachancea thermotolerans</i>	310+290	315+285+95	Garofalo vd., 2016
	<i>Candida zemplinina</i>	215+110	215+110+80+60	Garofalo vd., 2016
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	320+240	320+240+80	Sabate vd., 2002
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	580	575	Esteve-Zarzoso vd.,1999
	<i>Solicoccozyma aeria</i>	380+250+180	420+200+150	Kwaśna vd., 2010
HinfI				
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	200	200	Arroyo vd., 2010
	<i>Metschnikowia sinensis</i>	200	-	-
	<i>Metschnikowia aff. pulcherrima</i>	200	-	-
	<i>Metschnikowia fructicola</i>	200	200+200	Tofalo vd., 2011

Tablo 4.20.'nin devamı

RE	Maya türleri	Çalışma sonuçlarımız (bp)	Referansa göre (bp)	Kaynak
Hinfl				
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	340 +190+170	340+190+170+60	Nisiotou ve Nychas, 2007
	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	340+190+170	340+190+170+60	Nisiotou ve Nychas, 2007
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	340+190+170	340+190+170+60	Garofalo vd., 2016
	<i>Lachancea thermotolerans</i>	350	355+354	Garofalo vd., 2016
	<i>Candida zemplinina</i>	250	235+235	Garofalo vd. 2016
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	340+220	340+225+75	Garofalo vd., 2016
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	320	325+325	Sabate vd., 2002
	<i>Solicoccozyma aerea</i>	370+300	-	Gallego vd., 2011
Ddel				
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	390	-	-
	<i>Metschnikowia sinensis</i>	390	-	-
	<i>Metschnikowia aff. pulcherrima</i>	390	-	-
	<i>Metschnikowia fructicola</i>	390	-	-
	<i>Metschnikowia aff. fructicola</i>	390	-	-
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	300+180+100	300+180+95+90+85	Garofalo vd., 2016
	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	360+180+100	360+180+85+70+50	Nisiotou ve Nychas, 2007
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	360+180+100	360+180+85+70+50	Nisiotou ve Nychas, 2007
	<i>Lachancea thermotolerans</i>	500+190	-	-
	<i>Candida zemplinina</i>	410+65	-	-
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	410+150+110	-	-
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	450+190	-	-
	<i>Solicoccozyma aerea</i>	500+150	-	-
DraI				
	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	420+150+130	420+150+130+30	Nisiotou ve Nychas, 2007
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	420+300	420+300+30	Nisiotou ve Nychas, 2007
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	420+300	-	-

RE, restriksiyon enzimi; *Candida zemplinina* (*Starmerella bacillaris*); *Solicoccozyma aerea* (*Cryptococcus aerius*).

Tablo 4.21. Cinse göre ITS bölgesi bantları, ITS bandı restriksiyon enzimleri ile kesimi

PCR ürünü (bp)			Restriksiyon fragmantları (bp)									
Maya türleri	Bizim çalışma	Ref	<i>HaeIII</i>		<i>DdeI</i>		<i>HhaI (CfoI)</i>		<i>HinfI</i>		<i>DraI</i>	
			Bizim çalışma	Ref	Bizim çalışma	Ref	Bizim çalışma	Ref	Bizim çalışma	Ref	Bizim çalışma	Ref
<i>M. pulcherrima</i>	390	400	280+100	280+100	390	-	205+100	205+100+95	200	200	-	-
<i>M. sinensis</i>	390	-	280+100	-	390	-	200+100	-	200	-	-	-
<i>M. aff. pulcherrima</i>	390	-	280+100	-	390	-	200+100	-	200	-	-	-
<i>M. fructicola</i>	390	400	280+100	300+100	390	-	200+100	298+100	200	200+200	-	-
<i>M. aff. fructicola</i>	390	-	380+280+100	-	390	-	200+100	-	200	-	-	-
<i>H. uvarum</i>	750	750	750	750	300+180+100	300+180+95+90+85	320+105	320+310+105	340+190+170	340+190+170+60	-	-
<i>H. guilliermondii</i>	750	750	750	750	360+180+100	360+180+85+70+50	320+3105	320+310+105	340+190+170	340+190+170+60	420+150+130	420+150+130+30
<i>H. opuntiae</i>	750	750	750	750	360+180+100	360+180+85+70+50	320+105	320+310+120	340+190+170	340+190+170+60	420+300	420+300+30
<i>L. thermotolerans</i>	690	700	310+210+95	310+215+90	500+190	-	310+290	315+285+95	350	355+354	-	-
<i>C. zemplinina</i>	475	475	475	475	410+65	-	215+110	215+110+80+60	250	235+235	-	-
<i>R. mucilaginos</i>	620	640	405 +215	425 +215	410+150+110	-	320+240	320+240+80	340+220	340+225+75	-	-
<i>W. anomalus</i>	620	650	620	625	450+190	-	580	575	320	325+325	-	-
<i>Solicoccozyma aerea</i>	650	-	480	410	500+150	-	380+250+180	420+200+150	370+300	-	-	-

4.6. RT-PZR ve DNA İzolasyon/Sekans Sonuçlarının Uyumu ve Kıyaslanması

Bu bölümde RT-PZR sonuçları ile izolasyon/sekaslama sonuçlarımızda belirlenen mayaların kıyaslanması amaçlanmıştır. Sonuçlar, izole edilen türlerin, RT-PZR tespiti ile uyumlu olduğunu göstermektedir (Tablo 4.22). Dolayısıyla, RT-PZR tekniğinin maya popülasyonlarının belirlenmesinde etkili olarak kullanılabileceği saptanmıştır. Tablo 4.23'te, ayrıca non-*Saccharomyces* mayaların hangi yöntem (ITS veya D1/D2 sekanslama) ile tanımlandığı belirtilmiştir.

Tablo 4.22. Şarap/şıra numunelerindeki *Saccharomyces* ve non-*Saccharomyces* maya türlerinin gerçek-zamanlı PZR analiz ve izolasyon/DNA sekans sonuçlarının kıyaslanması

Üzüm çeşitleri										
Maya türleri	Kalecik Karası		Boğazkere		Dimrit		Öküzgözü		Emir	
	RT-PZR	İzolasyon/ DNA sekansı	RT-PZR	İzolasyon/ DNA sekansı	RT-PZR	İzolasyon/ DNA sekansı	RT-PZR	İzolasyon/ DNA sekansı	RT-PZR	İzolasyon/ DNA sekansı
<i>Candida glabrata*</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Candida zemplinina</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora</i> spp.	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Lachancea thermotolerans</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Metschnikowia</i> spp.	+	+/-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Metschnikowia pulcherimia</i>	-	-	-	+/-	-	-/+	-	-	-	-
<i>Pichia fermentans</i>	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Pozitif (+), tespit edildi; negatif (-), tespit edilmedi; Pozitif/negatif (+/-); (-/+), ITS ve D1/D2 sekanslama tekniğine göre sırasıyla değişken; **Starmarella bacillaris*.

T. delbrueckii, RT-PZR ile saptanmış ve miktar tayini yapılmak için kullanılmıştır. Ancak izolasyon deneylerimizde izole edilememiştir.

Metschnikowia türleri Kalecik Karası, Boğazkere ve Dimrit üzümlerinde RT-PZR ile tespit edilmiş ve buna uygun olarak suş izolasyonu/DNA sekansı sonuçlarında da elde edilerek pozitif olarak belirlenmiştir.

Diğer yandan *M. pulcherrima* türü RT-PZR sonuçlarımızda tespit edilemezken, izolasyon/sekans sonuçlarında sekanslama yöntemine göre değişen sonuçlar vermiş olduğundan (EK 5) Tablo 4.22'de sekans tekniğine göre +/- veya -/+ değişken ifadesi kullanılmıştır. Tablo 4.23'te ITS ve D1/D2 sekans sonuçlarına göre; değişen *Metschnikowia* türleri ve değişiklik göstermeyen diğer türler gösterilmiştir.

Tablo 4.23. ITS ve D1/D2 sekansa göre non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* mayaların tanımlanması ve NCBI erişim numaraları

İsim	Bölge	Benzerlik	BLAST Sonucu	Erişim Numarası	Bölge	Benzerlik	BLAST Sonucu	Erişim Numarası
K5	ITS	100%	<i>H. guilliermondii</i>	MN796432	D1/D2 Domain	100%	<i>H. guilliermondii</i>	MN817269
K9	ITS	100%	<i>R. mucilaginosa</i>	MN796435	D1/D2 Domain	100%	<i>R. mucilaginosa</i>	MN817270
K12	ITS	100%	<i>H. opuntiae</i>	MN796438	D1/D2 Domain	100%	<i>H. opuntiae</i>	MN817271
K25	ITS	100%	<i>H. uvarum</i>	MN796446	D1/D2 Domain	100%	<i>H. uvarum</i>	MN817272
K35	ITS	99%	<i>H. opuntiae</i>	MN796454	D1/D2 Domain	100%	<i>H. opuntiae</i>	MN817273
K43	ITS	-	Tanımlanamadı	-	D1/D2 Domain	99%	<i>M. aff. fruticola</i>	MN817274
K48	ITS	100%	<i>S. cf. cerevisiae</i>	MN796466	D1/D2 Domain	100%	<i>S. cerevisiae</i>	MN817275
K62	ITS	100%	<i>H. opuntiae</i>	MN796474	D1/D2 Domain	100%	<i>H. opuntiae</i>	MN817276
K65	ITS	99%	<i>H. opuntiae</i>	MN796477	D1/D2 Domain	99%	<i>H. opuntiae</i>	MN817277
K70	ITS	98%	<i>H. uvarum</i>	MN796482	D1/D2 Domain	98%	<i>H. uvarum</i>	MN817278
O1	ITS	99%	<i>L. thermotolerans</i>	MN796519	D1/D2 Domain	99%	<i>L. thermotolerans</i>	MN817282
O7	ITS	100%	<i>H. opuntiae</i>	MN796525	D1/D2 Domain	100%	<i>H. opuntiae</i>	MN817283
O37	ITS	100%	<i>W. anomalus</i>	MN796555	D1/D2 Domain	100%	<i>W. anomalus</i>	MN817284
B4	ITS	100%	<i>Solicoccozyma aeria</i>	MN796558	D1/D2 Domain	99%	<i>Solicoccozyma aeria</i>	MN817288
B11	ITS	98%	<i>M. pulcherrima</i>	MN796565	D1/D2 Domain	99%	<i>M. aff. pulcherrima</i>	MN817289
B33	ITS	99%	<i>M. pulcherrima</i>	MN796583	D1/D2 Domain	100%	<i>M. aff. fruticola</i>	MN817290
B35	ITS	100%	<i>S. cf. cerevisiae</i>	MN796585	D1/D2 Domain	100%	<i>S. cerevisiae</i>	MN817291
D2*	ITS	100%	<i>M. chrysoperlae</i>	-	D1/D2 Domain	99%	<i>M. aff. pulcherrima</i>	MN817293
D3	ITS	94%	<i>M. sinensis</i>	MN796586	D1/D2 Domain	99%	<i>M. pulcherrima</i>	MN817294
D8	ITS	95%	<i>M. chrysoperlae</i>	MN796589	D1/D2 Domain	99%	<i>M. pulcherrima</i>	MN817295
D10	ITS	100%	<i>Starmerella bacillaris</i>	MN796590	D1/D2 Domain	100%	<i>Starmerella bacillaris</i>	MN817296
D15	ITS	97%	<i>M. aff. chrysoperlae</i>	MN796595	D1/D2 Domain	99%	<i>M. fruticola</i>	MN817297

K, Kalecik Karası şirasından/şarabından izole edilen maya; O, Öküzgözü şirasından/şarabından izole edilen maya; B, Boğazkere şirasından/şarabından izole edilen maya; D, Dimrit şirasından/şarabından izole edilen maya; *, Sekans sırasında tanımlanamayan oligonükleotitlerden dolayı NCBI'dan erişim numarası (accession number) alınamamıştır.

4.7. Genotipik Karakterizasyon

4.7.1. Darbeli Alan Jel Elektroforezi (PFGE)

Darbeli alan jel elektroforezi (PFGE) yüksek boyutlu DNA'ları veya kromozomları agaroz jelde ayırıştırarak bir yöntemdir. Kromozomların ayırıştırılması karyotipleme olarak bilinmektedir (Hage ve Houseley, 2013). PFGE suş farklılıklarını ortaya koymaktadır. *Saccharomyces sensu stricto* mayaları kromozomları bu yöntem ile farklılaştırılabilir (Raspor vd., 2001).

S. cerevisiae suşları arasında oluşabilecek elektroforetik karyotipler farklı profiller oluşturarak suşlar arası farklılaştırma sağlandığı rapor edilmiştir (Sebastiani vd., 2004). RFLP ve karyotipleme metodlarının biyofarklılaştırmada en etkili yöntemler olarak seçildiği çalışmada RAPD, bir diğer metod olarak kullanılmıştır.

Tokaj (Macaristan) şaraplarından izole edilen 17 *S. cerevisiae* suşlarında farklı profiller (yüksek çeşitlilik) gösterilmiştir (Kallai vd., 2019). Ayrıca, *S. cerevisiae* suşlarında DNA replikasyon çatalı ilerlemesi ve DNA çift zincirli kopmaları (DSB'ler) PFGE yöntemi ile izlenebilmiştir (Keyamura ve Hishida, 2020).

Projemizde PFGE optimizasyon çalışmalarımız *S. cerevisiae* kromosomal DNA ile tamamlanmış ve 30 adet seçilmiş yüksek teknolojik özellikleri olan *S. cerevisiae* suşları (Tablo 4.11; 4.24) için karyotipler belirlenmiştir.

Tablo 4.24. PFGE analizinde kullanılan *Saccharomyces* maya suşları

Maya suşları	DNA Sekanslamada ID Numarası	Laboratuvar koleksiyonundaki ID Numarası	Kaynak			
			Üzüm sırası/ şarap	Şehir	Ülke	İzolasyon tarihi
<i>S. cerevisiae</i>	S13*	S13*	Kalecik Karası	Kalecik -Ankara	Türkiye	2016
<i>S. cerevisiae</i>	S15*	S15*	Kalecik Karası	Kalecik -Ankara	Türkiye	2016
<i>S. cerevisiae</i>	S16*	S16*	Kalecik Karası	Kalecik -Ankara	Türkiye	2016
<i>S. cerevisiae</i>	B2	BA 0CM NS2	Boğazkere	Elazığ	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	B3	BA 0CM NS3	Boğazkere	Elazığ	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	B5	BA 0CM NS5	Boğazkere	Elazığ	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	B6	BA 0CM NS6	Boğazkere	Elazığ	Türkiye	2017
<i>S. cf. cerevisiae</i> ¹	B35	BA 6NM NS2	Boğazkere	Elazığ	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	B36	BB 4CM S10	Boğazkere	Elazığ	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	D16	DA 4NM S1	Dimrit	Kapadokya- Nevşehir	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	D17	DA 4CM S3	Dimrit	Kapadokya- Nevşehir	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	K44	KB 4CM S5	Kalecik Karası	Kalecik -Ankara	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	K45	KA 2NM S6	Kalecik Karası	Kalecik -Ankara	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	K46	KB 2NM S4	Kalecik Karası	Kalecik -Ankara	Türkiye	2017
<i>S. cf. cerevisiae</i> ¹	K48	KA 4NM S8	Kalecik Karası	Kalecik -Ankara	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	K49	KB 4NM S2	Kalecik Karası	Kalecik -Ankara	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2	Kalecik Karası	Kalecik -Ankara	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	O10	OB 4CM NS5	Öküzgözü	Elazığ	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	O12	OA 0CM NS3	Öküzgözü	Elazığ	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	O24	OA 4CM NS5	Öküzgözü	Elazığ	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	O39	OB 4CM S1	Öküzgözü	Elazığ	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	E1	EA 0NM NS1	Emir	Kapadokya- Nevşehir	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	E2	EA 0NM NS2	Emir	Kapadokya- Nevşehir	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	E4	EA 0NM NS4	Emir	Kapadokya- Nevşehir	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	E5	EA 0NM NS5	Emir	Kapadokya- Nevşehir	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	E16	EA 1W NS6	Emir	Kapadokya- Nevşehir	Türkiye	2017
<i>S. cerevisiae</i>	E21	EB 1W NS1	Emir	Kapadokya- Nevşehir	Türkiye	2017
<i>M. chrysoperlae</i>	S14*	S14*	Emir	Kapadokya- Nevşehir	Türkiye	2016
<i>S. cerevisiae</i>	CH	CH	MERIT™ Chr. Hansen, Danimarka			
<i>S. cerevisiae</i>	S17	S17	Fermicru AR2 <i>S. cerevisiae</i> No. LO122, Hollanda			
<i>S. cerevisiae</i>	S18	S18	German Hauswein Starter 38409LM, Almanya			

B, Boğazkere; D, Dimrit; K, Kalecik Karası; O, Öküzgözü; E, Emir üzüm çeşitleri; A, A paralel; B, B paralel; CM, soğuk maserasyon; NM, maserasyon; CH, Ticari *S. cerevisiae* (Christian Hansen, MERIT™); PFGE, Darbeli Alan Jel Elektrofrez.

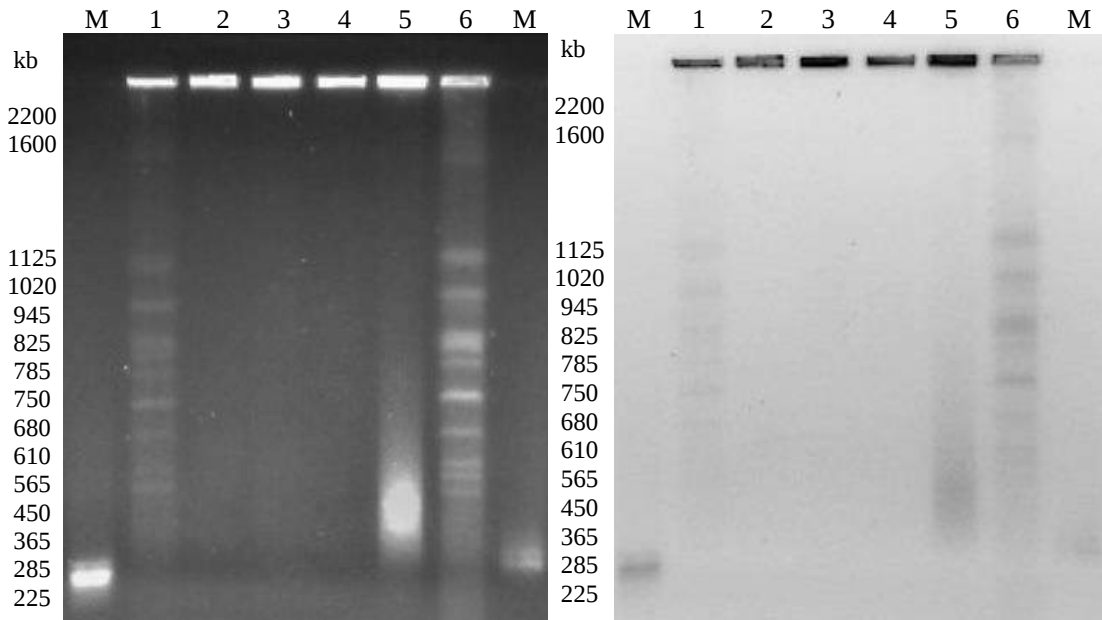
* Çağrı Çavdaroglu tarafından izole edilmiştir (Physiological traits of *S. cerevisiae* strains isolated from traditional wines in Turkey, MS thesis 2017).

¹, D1 / D2 sekanslama sonucuna göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanmıştır.

4.7.1.1. Seçilen *Saccharomyces cerevisiae* Suşlarının PFGE Testi ile Farklılaştırılması

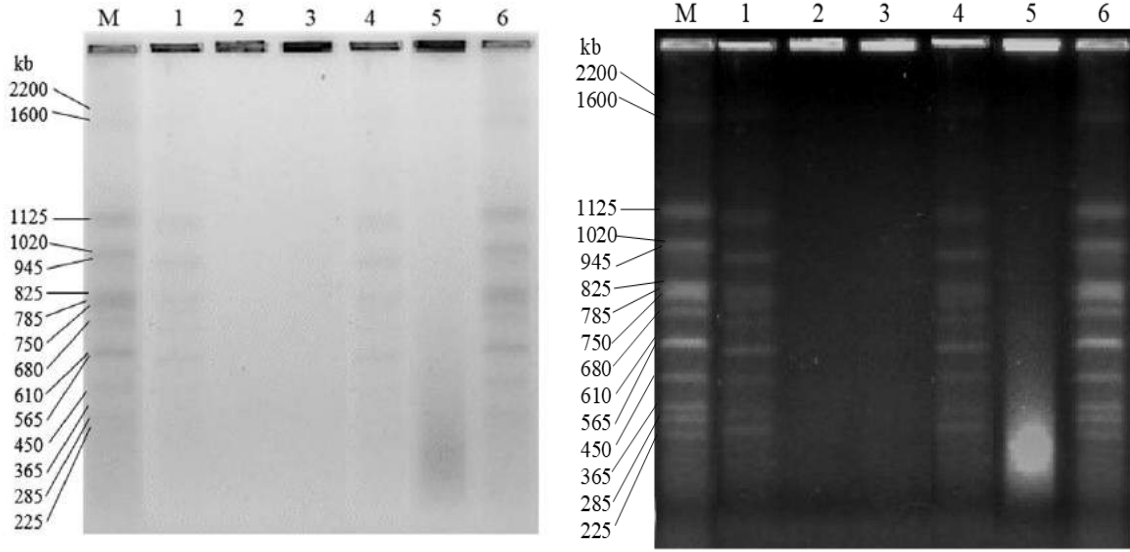
Voltaaj, switch aralığı (interval), jelin yürütme süresi, jelin agaroz konsantrasyonu, jelin yürütme sıcaklığı ve alternatif elektrik alanının açısı gibi birçok faktörün PFGE jellerindeki DNA yürütmesinde etkili olduğu bilinmektedir (Birren vd., 1989). Bu faktörler arasında, switch aralığı, voltaaj ve yürütme süresi DNA yürütmesini önemli ölçüde etkiler ve kolayca kontrol edilebilir. Büyük DNA moleküllerini ayırmak için düşük voltaaj ve uzun switch aralığı gereklidir. Voltaaj ve switch aralığı, belirli boyuttaki kromozomların etkili bir şekilde ayrılması için ters bir ilişkiye sahiptir (Gunderson ve Chu, 1991). *S. cerevisiae* kromozomlarını ayırmak için en uygun koşulları belirlemek amacıyla sistematik olarak switch aralığı ve voltaaj değiştirilmiştir. İlk denemelerde, agaroz jele (1%) *S. cerevisiae* pluglarının kesilmiş parçacıkları yüklenir ve jel, yürütme tampon çözeltisinde 4.5 V/cm kullanarak, başlangıç ve son switch'ler 60 ve 145 saniye olacak şekilde, 22-27 saat 14°C'de yürütülür (Şekil 4.26, 4.27, 4.28, 4.30 ve 4.31). Optimizasyon çalışmalarımızda bu protokol, *Saccharomyces* izolatlarının (Tablo 4.24) PFGE jel görüntülerinde birbirinden yeterli derecede ayrışmayan kromozom görüntüleri oluşturmuştur.

Saccharomyces izolatlarının kromozomlarını belirgin şekilde ayıran protokol için optimum şartlar %1 agaroz jelde 24 saat, 14°C'de tampon çözelti içinde 60 saniye aralıklarla elektrik vererek (switch), 6 V/cm voltaaj olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.24, 4.25, 4.29, 4.32, 4.33).



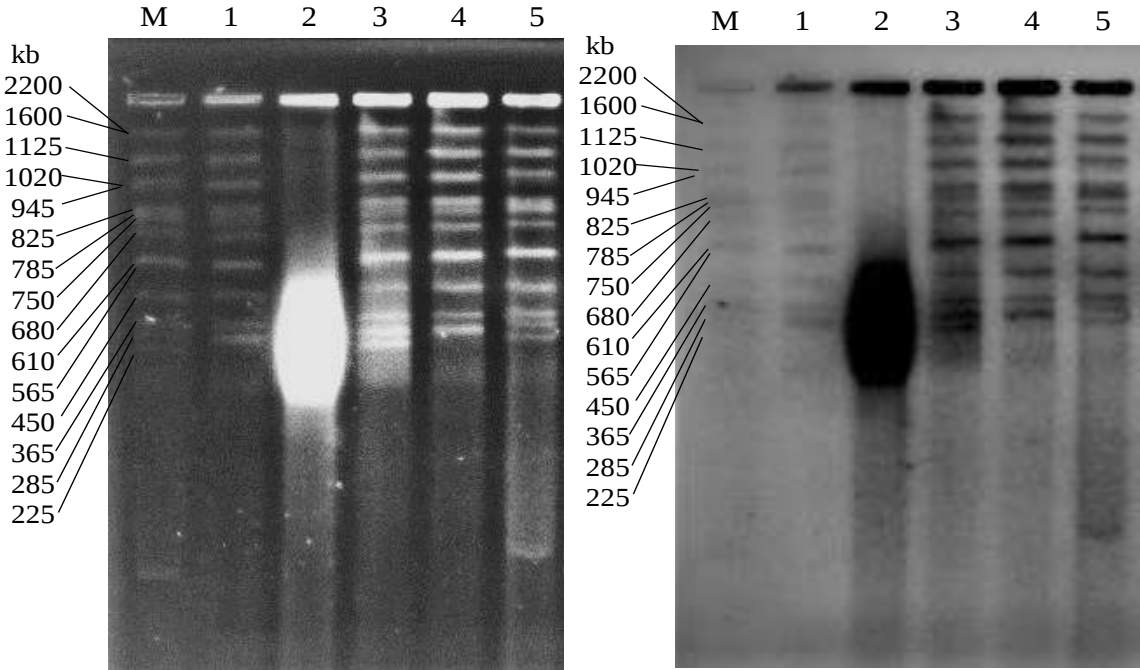
Şekil 4.24. *Saccharomyces* suşlarının PFGE jel görüntüsü

1, *S. cerevisiae* S13; 2, *Metschnikowia chrysoperlae* S14 (negatif kontrol); 3, *S. cerevisiae* S15; 4, *S. cerevisiae* S16; 5, *S. cerevisiae* S17; 6, *S. cerevisiae* S18; M, CHEF DNA Markör *S. cerevisiae* (Bio-Rad). Agaroz jele (1%) *S. cerevisiae* pluglarının kesilmiş parçacıkları yüklenir ve jel, yürütme tampon çözeltisinde 6 V/cm, kullanarak, başlangıç ve son switch'ler 60 ve 120 saniye olacak şekilde, 24 saat 14°C de yürütülür.



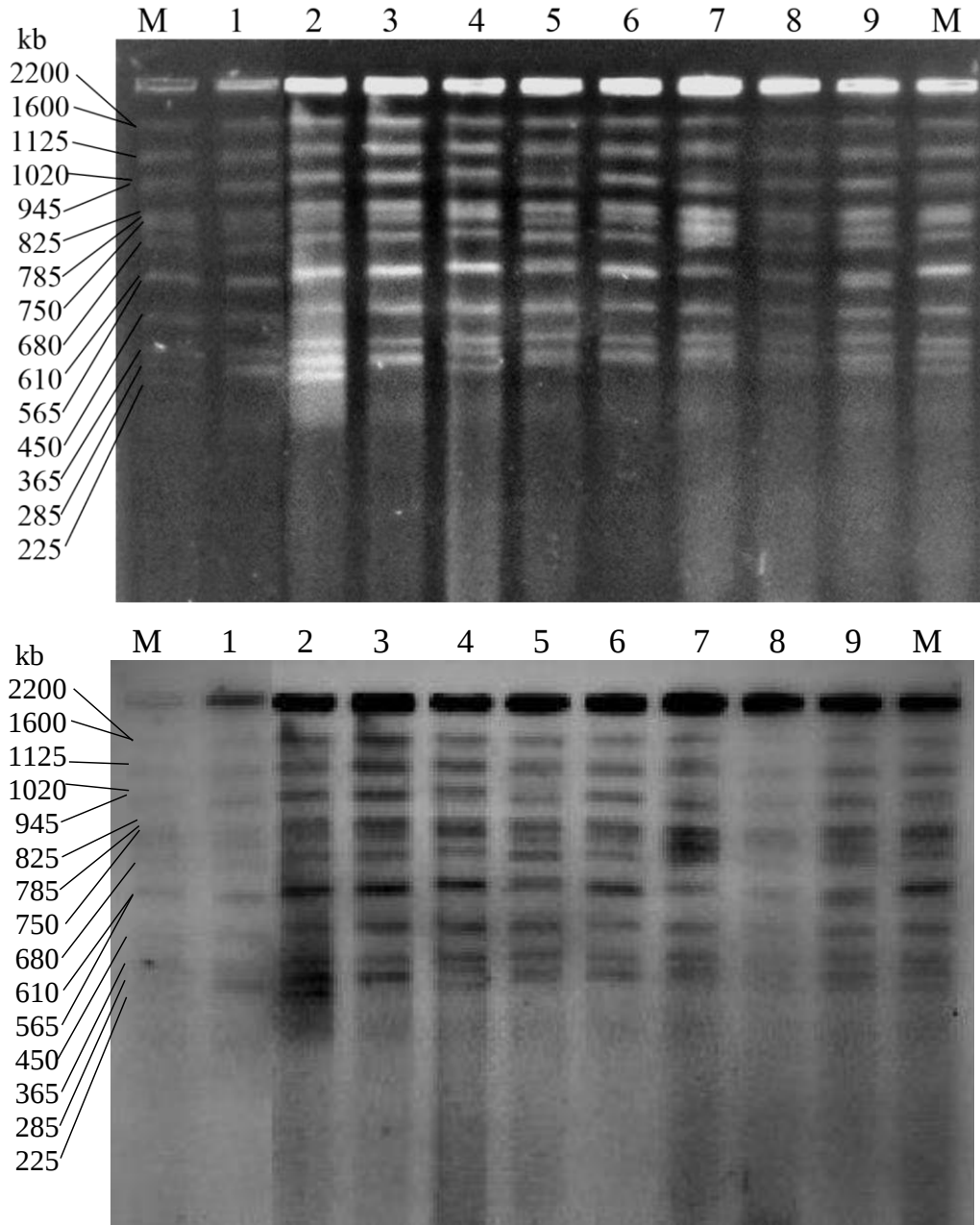
Şekil 4.25. *Saccharomyces* suşlarının PFGE jel görüntüsü

1, *S. cerevisiae* S13; 2, *Metschnikowia chrysoperlae* S14 (negatif kontrol); 3, *S. cerevisiae* S15; 4, *S. cerevisiae* S16; 5, *S. cerevisiae* S17; 6, *S. cerevisiae* S18; M, CHEF DNA Markör, *S. cerevisiae* (Bio-Rad). Agaroz jeli (1%) *S. cerevisiae* pluglarının kesilmiş parçacıkları yüklenir ve jel, yürütme tampon çözeltisinde 6 V/cm, kullanarak, başlangıç ve son switch'ler 60 ve 120 saniye olacak şekilde, 24 saat 14°C de yürütülür.



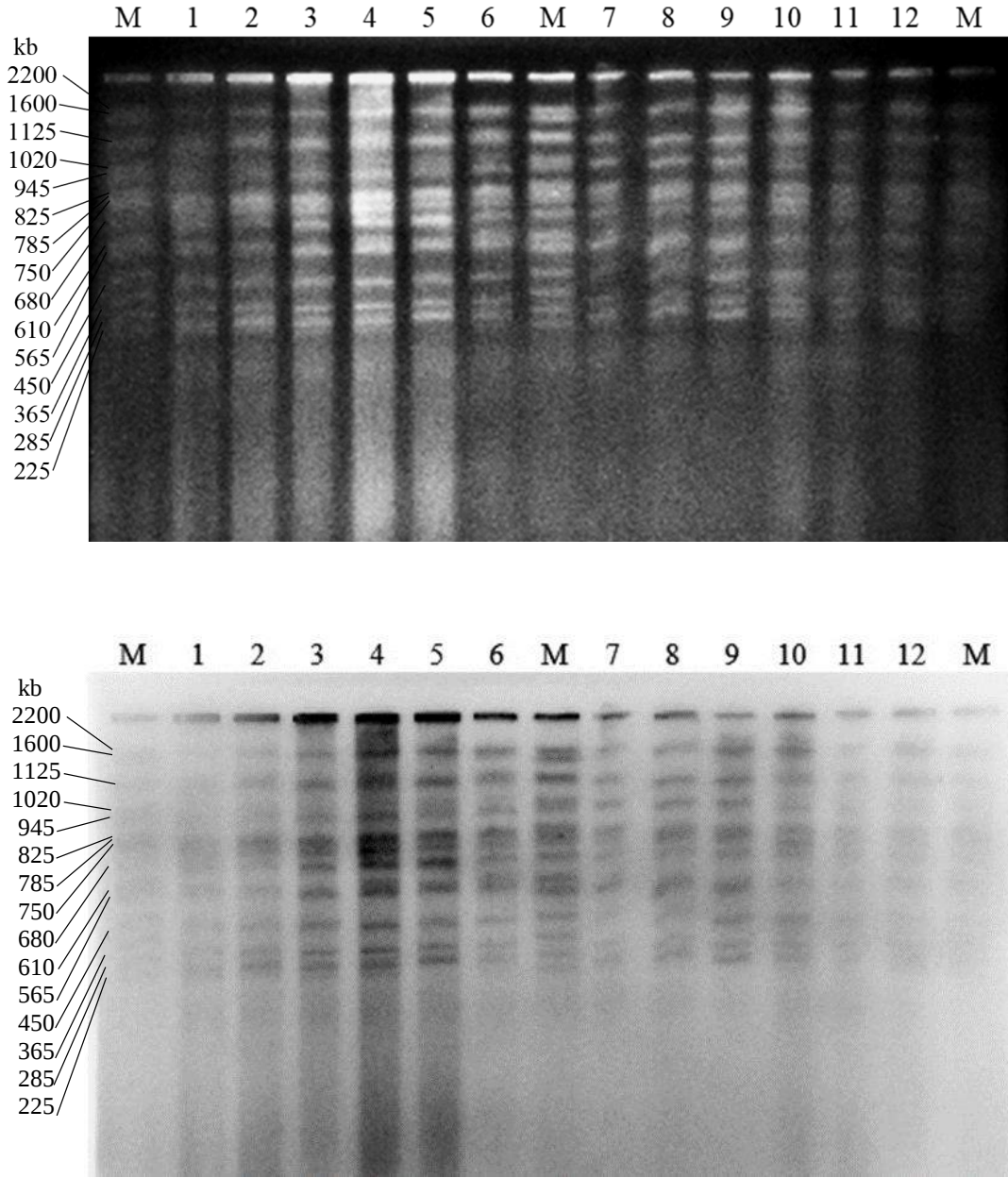
Şekil 4.26. *Saccharomyces* suşlarının PFGE jel görüntüsü

1, *S. cerevisiae* S13; 2, *Metschnikowia chrysoperlae* S14 (negatif kontrol); 3, *S. cerevisiae* S15; 4, *S. cerevisiae* S16; 5, *S. cerevisiae* S18; M, CHEF DNA Markör, *S. cerevisiae* (Bio-Rad). Agaroz jeli (1%) *S. cerevisiae* pluglarının kesilmiş parçacıkları yüklenir ve jel, yürütme tampon çözeltisinde 4.5 V/cm, kullanarak, başlangıç ve son switch'ler 60 ve 145 saniye olacak şekilde, 22 saat 14°C de yürütülür.

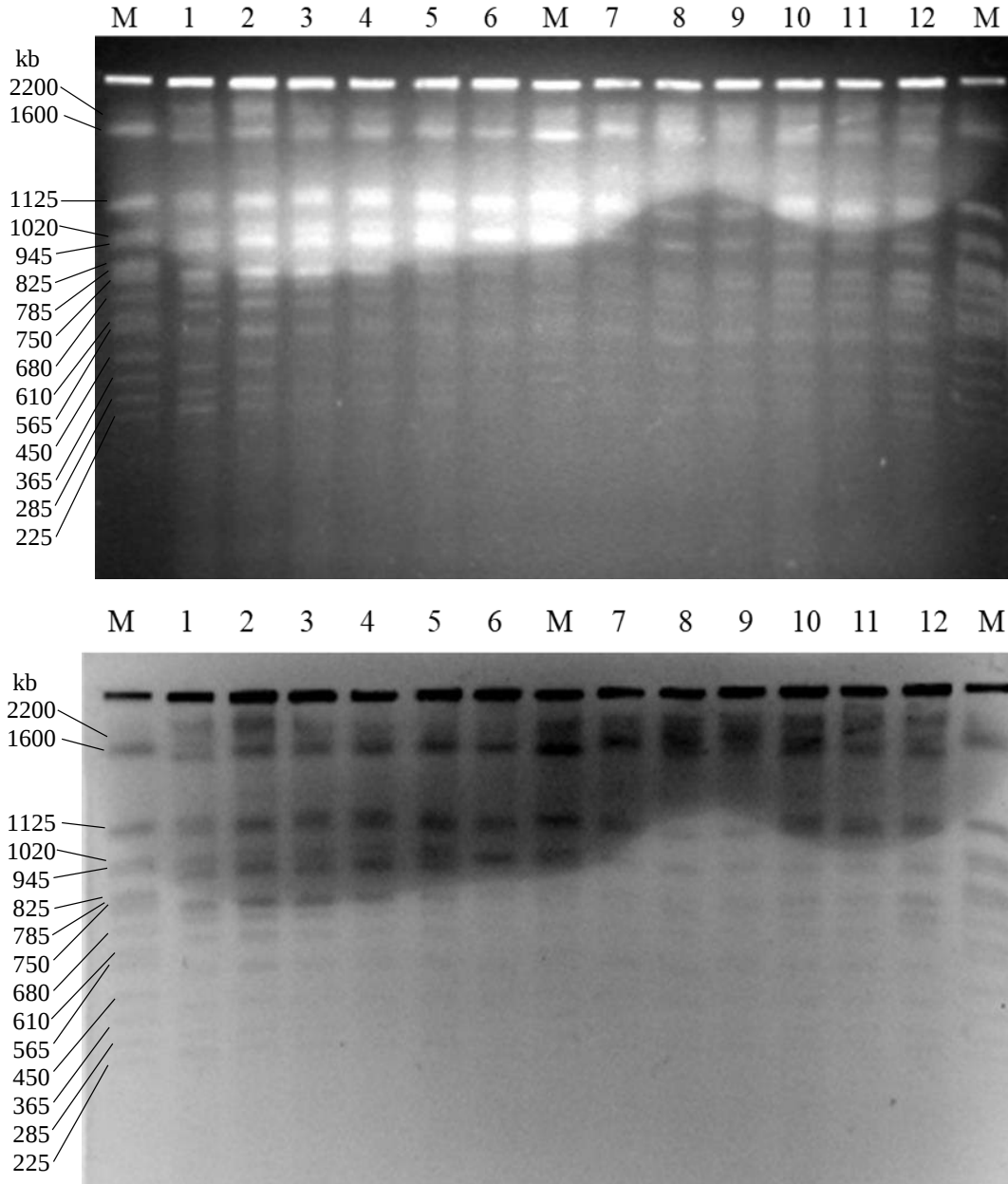


Şekil 4.27. *Saccharomyces* suşlarının PFGE jel görüntüsü

1, *S. cerevisiae* S13; 2, *S. cerevisiae* S15; 3, *S. cerevisiae* S16; 4, *S. cerevisiae* S18; 5, *S. cerevisiae* B2; 6, *S. cerevisiae* O10; 7, *S. cerevisiae* E1; 8, *Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus* K48; 9, *Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus* B35; M, CHEF DNA Markör, *S. cerevisiae* (Bio-Rad). Agaroz jele (1%) *S. cerevisiae* pluglarının kesilmiş parçacıkları yüklenir ve jel, yürütme tampon çözeltisinde 4.5 V/cm, kullanarak, başlangıç ve son switch'ler 60 ve 145 saniye olacak şekilde, 24 saat 14°C de yürütülür.

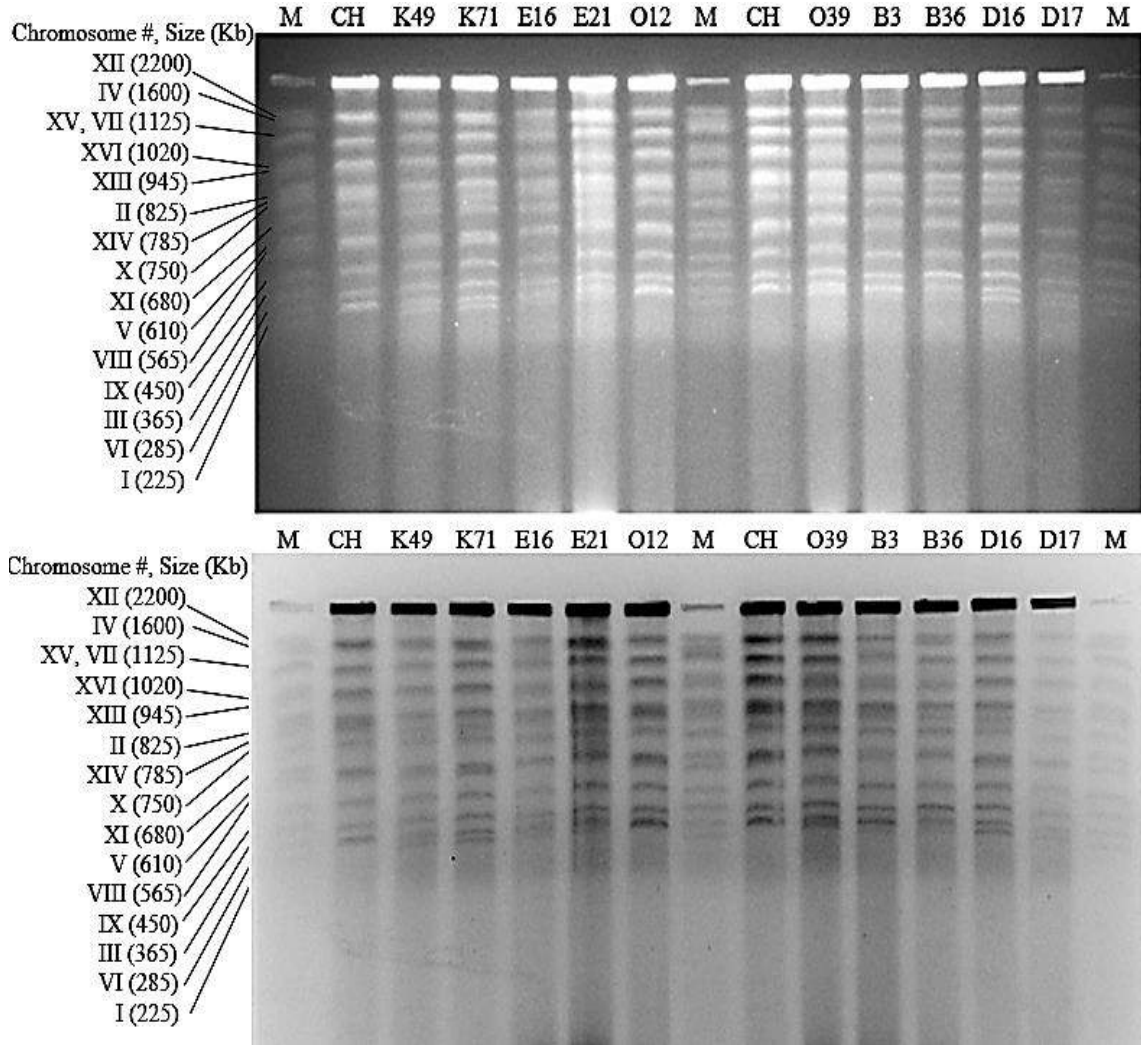


Şekil 4.28. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının PFGE sonucu
1, *S. cerevisiae* B2; 2, *S. cerevisiae* B3; 3, *S. cerevisiae* B5; 4, *S. cerevisiae* K29; 5, *S. cerevisiae* K44; 6, *S. cerevisiae* K45; 7, *S. cerevisiae* O10; 8, *S. cerevisiae* O12; 9, *S. cerevisiae* O24; 10, *S. cerevisiae* E1; 11, *S. cerevisiae* E2; 12, *S. cerevisiae* E4; M, CHEF DNA Markör, *S. cerevisiae* (Bio-Rad). Agaroz jeli (1%) *S. cerevisiae* pluglarının kesilmiş parçacıkları yüklenir ve jel, yürütme tampon çözeltisinde 4.5 V/cm, kullanarak, başlangıç ve son switch'ler 60 ve 145 saniye olacak şekilde, 24 saat 14°C de yürütülür.



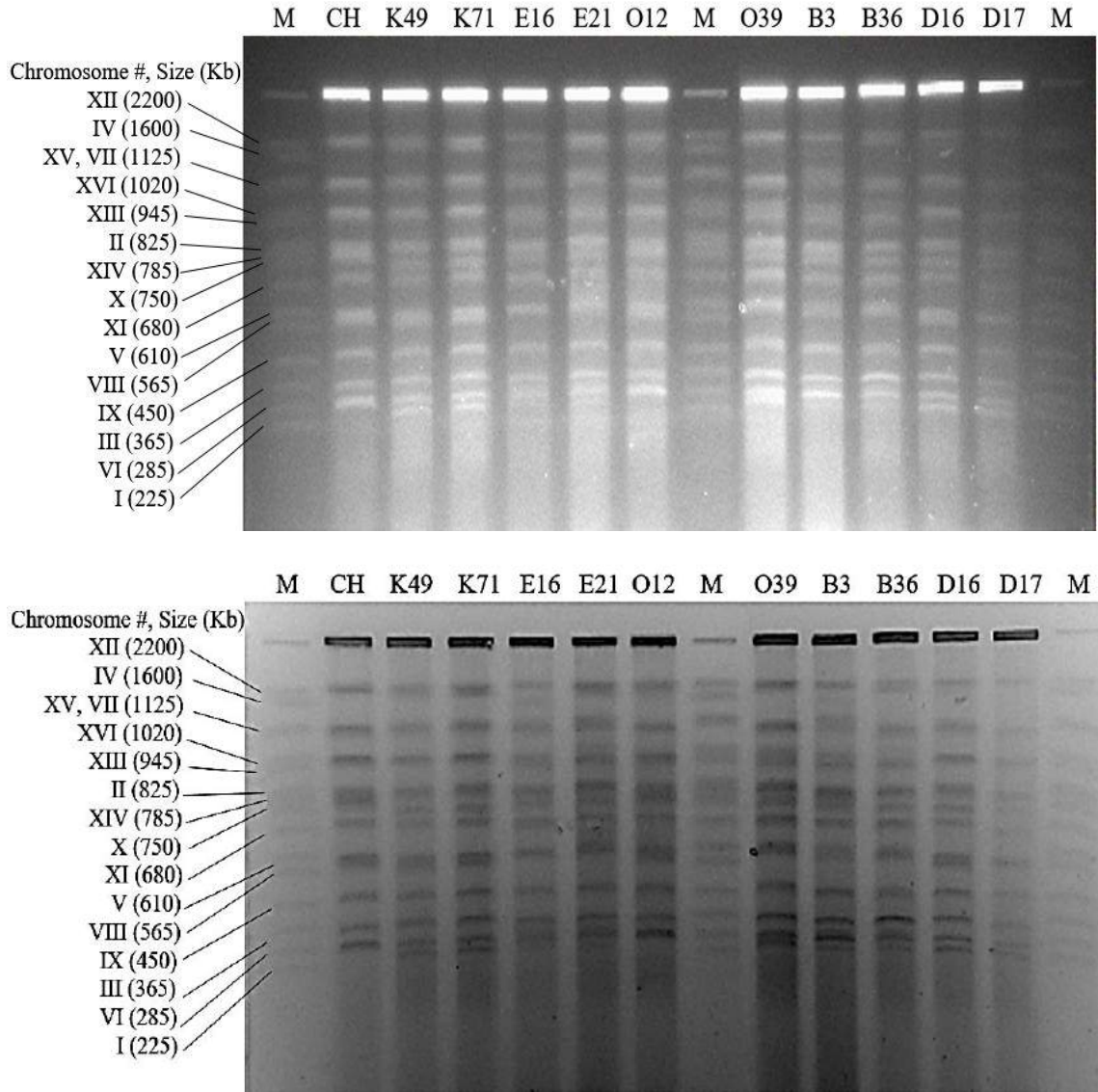
Şekil 4.29. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının PFGE sonucu.

1, *S. cerevisiae* B3; 2, *S. cerevisiae* B5; 3, *S. cerevisiae* B6; 4, *S. cerevisiae* K44; 5, *S. cerevisiae* K45; 6, *S. cerevisiae* K46; 7, *S. cerevisiae* O10; 8, *S. cerevisiae* O12; 9, *S. cerevisiae* O24; 10, *S. cerevisiae* E2; 11, *S. cerevisiae* E4; 12, *S. cerevisiae* E5; M, CHEF DNA Markör, *S. cerevisiae* (Bio-Rad). Agaroz jeli (1%) *S. cerevisiae* pluglarının kesilmiş parçacıkları yüklenir ve jel, yürütme tampon çözeltisinde 6 V/cm, kullanarak, başlangıç ve son switch'ler 60 ve 120 saniye olacak şekilde, 24 saat 14°C de yürütülür.



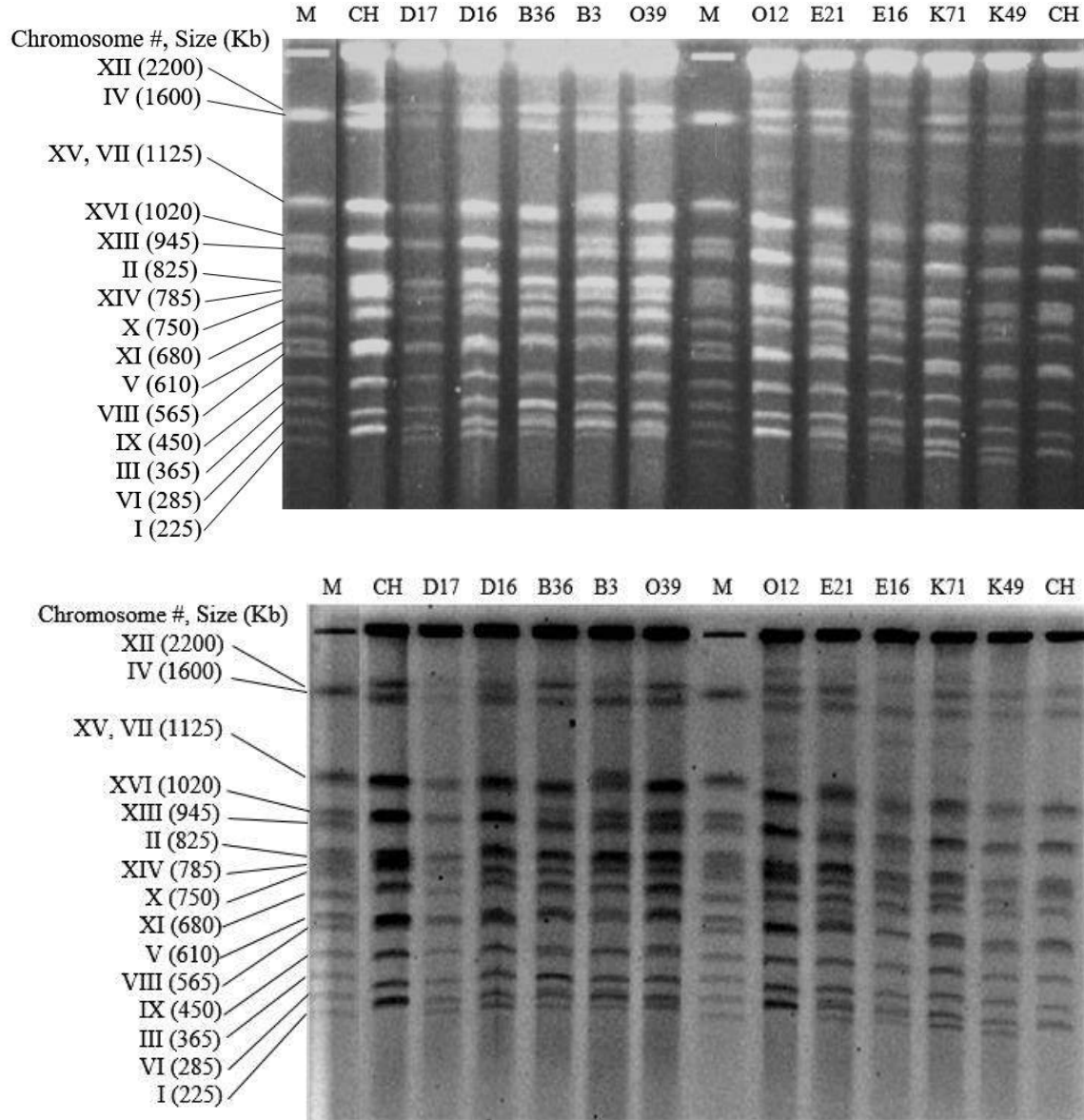
Şekil 4.30. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının PFGE sonucu.

1, Commercial *S. cerevisiae* (Christian Hansen, MERIT™); 2, *S. cerevisiae* K49; 3, *S. cerevisiae* K71; 4, *S. cerevisiae* E16; 5, *S. cerevisiae* E21; 6, *S. cerevisiae* O12; 7, Commercial *S. cerevisiae* (Christian Hansen, MERIT™); 8, *S. cerevisiae* O39; 9, *S. cerevisiae* B3; 10, *S. cerevisiae* B36; 11, *S. cerevisiae* D16; 12, *S. cerevisiae* D17; M, CHEF DNA Markör, *S. cerevisiae* (Bio-Rad). Agaroz jeli (1%) *S. cerevisiae* pluglarının kesilmiş parçacıkları yüklenir ve jel, yürütme tampon çözeltisinde 4.5 V/cm, kullanarak, başlangıç ve son switch'ler 60 ve 145 saniye olacak şekilde, 22 saat 14°C de yürütülür.



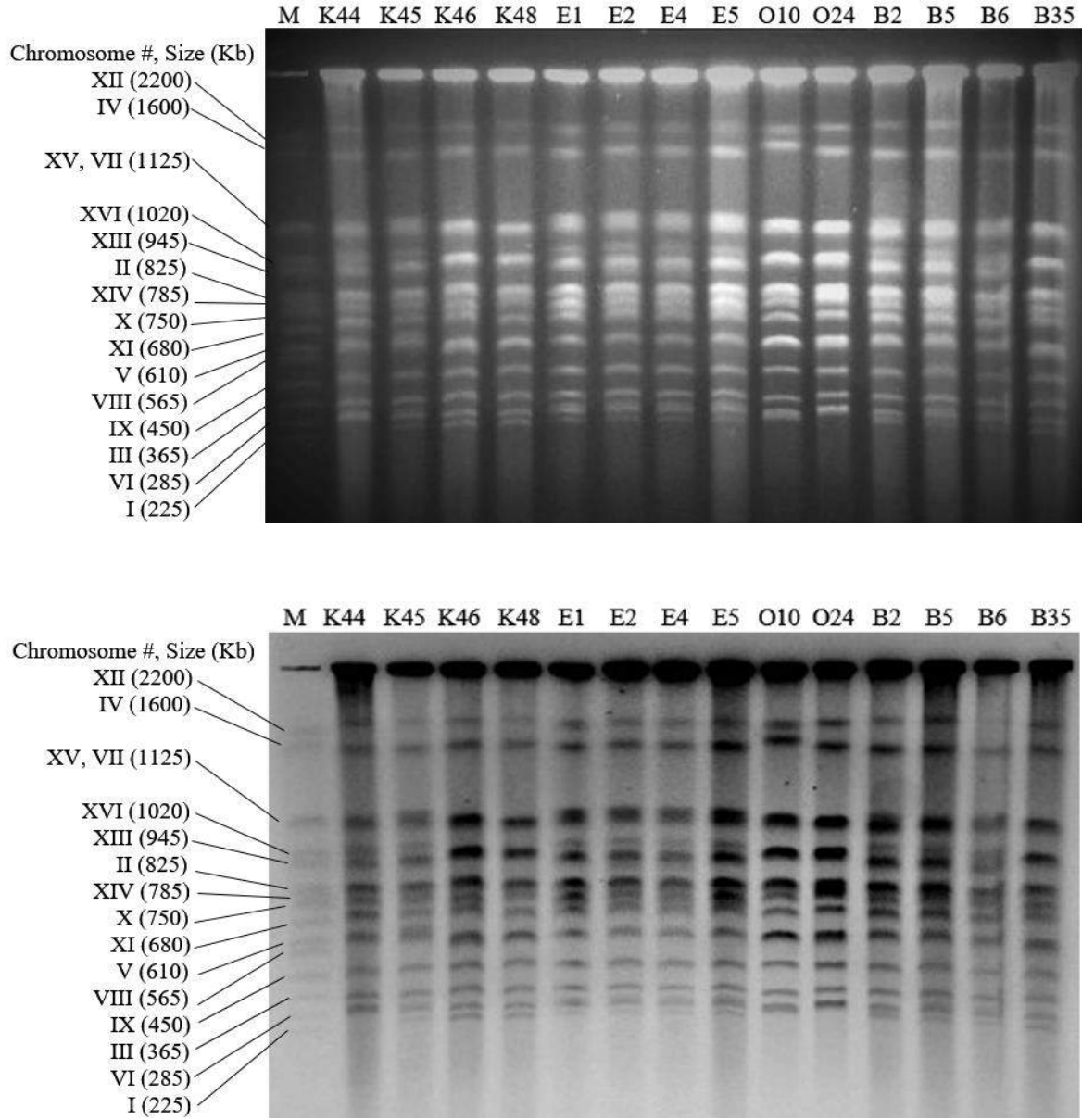
Şekil 4.31. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının PFGE sonucu.

CH, Commercial *S. cerevisiae* (Christian Hansen, MERIT™); M, CHEF DNA Size Markör, *S. cerevisiae* (Bio-Rad). Agaroz jeli (1%) *S. cerevisiae* pluglarının kesilmiş parçacıkları yüklenir ve jel, yürütme tampon çözeltisinde 4.5 V/cm, kullanarak, başlangıç ve son switch'ler 60 ve 145 saniye olacak şekilde, 27 saat 14°C de yürütülür.



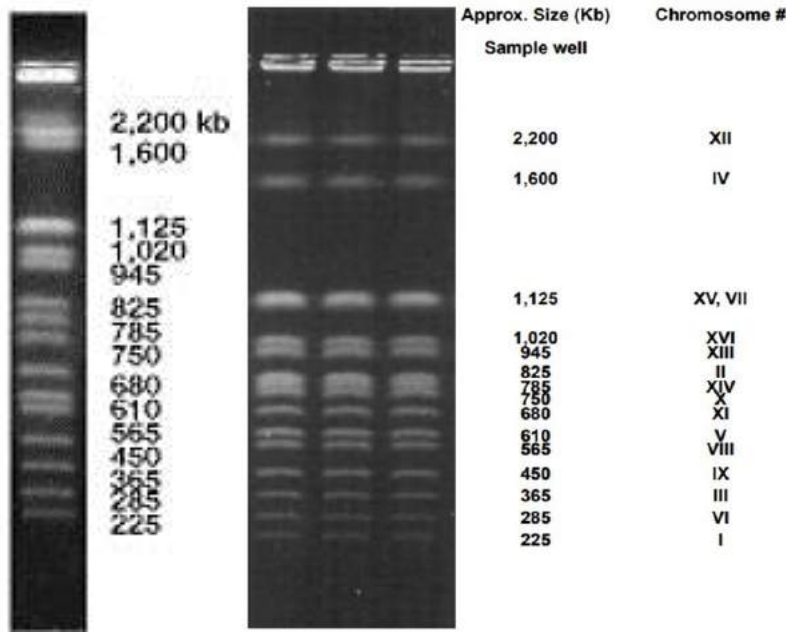
Şekil 4.32. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının PFGE sonucu.

CH, Ticari *S. cerevisiae* (Christian Hansen, MERIT™); M, CHEF DNA Markör, *S. cerevisiae* (Bio-Rad). Agaroz jeli (1%) *S. cerevisiae* pluglarının kesilmiş parçacıkları yüklenir ve jel, yürütme tampon çözeltisinde 6 V/cm, kullanarak, başlangıç ve son switch'ler 60 ve 120 saniye olacak şekilde, 24 saat 14°C de yürütülür.



Şekil 4.33. Boğazkere (B), Kalecik Karası (K), Öküzgözü (O) ve Emir (E) üzümlerinden farklı şarap yapım aşamalarında izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının PFGE sonucu.

M, CHEF DNA Size Markör, *S. cerevisiae* (Bio-Rad). Runs were performed for 24 h at 14 °C in running buffer, using a voltage of 6 V/cm, and an initial and final switch of 60 and 120 s, respectively. Agaroz jeli (1%) *S. cerevisiae* pluglarının kesilmiş parçacıkları yüklenir ve jel, yürütme tampon çözeltisinde 6 V/cm, kullanarak, başlangıç ve son switch'ler 60 ve 120 saniye olacak şekilde, 24 saat 14°C de yürütülür.



Şekil 4.34. CHEF *S. cerevisiae* kromozomal DNA Markör (katalog numarası; 170-3605) YNN295 suşu yaklaşık 225-2,200 kilobaz çift DNA büyüklüğü (Bio-Rad).

Genotipik karakterizasyon için seçilen yöntemlerden biri PFGE yöntemidir. Her bir üzüm örneğinden seçilen *S. cerevisiae* suşunun (toplamda 25 *S. cerevisiae* izolatu) ve koleksiyonumuzda bulunan proje harici 5 adet *S. cerevisiae* izolatu ile toplamda 30 adet *S. cerevisiae* izolatu için PFGE paternleri belirlenmiştir. Tüm izolatlarımız *S. cerevisiae* referans suşu (Biorad) ile benzer patern göstermiştir. Ancak bazı farklı profiller dikkat çekmiştir (Tablo 4.25).

Tablo 4.25. Elektroforetik karyotipleme ile farklılaştırılmış *S. cerevisiae* suşlarının farklı kromozom profilleri

Kromozom profilleri	<i>S. cerevisiae</i> suşlar *
Profil 1	S15, S18, K46, K48, B35, D17
Profil 2	E1, E2, E4, E5, B2, B5, B6, B36, O39
Profil 3	K44
Profil 4	O12, O24, CH, S13, S16
Profil 5	O10
Profil 6	K71, K49, D16
Profil 7	K45
Profil 8	B3
Profil 9	E21
Profil 10	E16

B, Boğazkere; D, Dimrit; K, Kalecik Karası; O, Öküzgözü; E, Emir üzüm çeşitleri

* *S. cerevisiae* suşlarının ID numaralandırması tablo 4.24'te gösterilmiştir.

Bantların durumuna göre formüle edilen profiller aşağıda Tablo 4.26 da gösterilmektedir.

Tablo 4. 26. Karyotipleme ile farklılaştırılmış *S. cerevisiae* suşlarının kromozom profilleri

Profiller	<i>S. cerevisiae</i> suşlar*	Yaklaşık kromozom DNA boyutu (Kb) ve sayısı															
		2200 XII	1600 IV	1125 XV	1125 VII	1020 XVI	945 XIII	825 II	785 XIV	750 X	680 XI	610 V	565 VIII	450 IX	365 III	285 VI	225 I
Profil 1	S15, S18, K46, K48, B35, D17	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Profil 2	E1, E2, E4, E5, B2, B5, B6, B36, O39	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+f
Profil 3	K44	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Profil 4	S13, S16, O12, O24, CH	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+s	-
Profil 5	O10	+	>1600	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+f
Profil 6	K71, K49, D16	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Profil 7	K45	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	>610,+	-	+	+	+	+f
Profil 8	B3	+	+	>1125	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+f
Profil 9	E21	+	+	>1125	+	+	+	+	+	+	+	>610,+	-	+	+	+	+
Profil 10	E16	>2200	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

B, Boğazkere; D, Dimrit; K, Kalecik Karası; O, Öküzgözü; E, Emir üzüm çeşitleri; f, faint (silik); s, kesin (sharp).

* *S. cerevisiae* suşlarının ID numaralandırması tablo 4.24'te gösterilmiştir.

Profil 1:

Bu profil S15, S18, K46, K48, B35, D17 izolatlarında izlenmiştir. Bu profilde 1020+945 (Kb) bantları yerine yaklaşık 1000 Kb bölgesinde tek bant olarak izlenmiştir. Ayrıca 365+285+225 (Kb) bantları 3 bant olarak izlenmektedir;

2200, 1600, (1000), 610, (365+285+225) Kb.

Profil 2:

Bu profil E1, E2, E4, E5, B2, B5, B6, B36, O39 izolatlarında izlenmiştir. Bu profilde 1020+945 (Kb) bantları 2 bant halinde izlenmekte ve 365+285+225 (Kb) bantları, (365+285) 2 bant +250 faint (silik) (Kb) bant olarak izlenmektedir. Markörde de gözlenen 1020+945 (Kb) bantları, 2 tane olarak tespit edilmiştir;

2200, 1600, (1020+945), 610, (365+285+225 faint) Kb.

Profil 3:

Bu profil K44 izolatlarında izlenmiştir. Bu profilde 1020+945 (Kb) bantları, 2 bant halinde izlenmekte ve alt bantlarda (365+285+225) 3 yerine 2 bant gözlenmiş, 225 (Kb) bantı izlenmemiştir;

2200, 1600, (1020+945), 610, (365+285) Kb.

Profil 4:

Bu profil S13, S16, O12, O24, CH izolatlarında izlenmiştir. Bu profilde 1020+945 (Kb) bantları yerine yaklaşık 1000 Kb bölgesinde tek bant olarak izlenmiştir ve alt bantlarda (365+285+225) 3 yerine 2 kesin (sharp) bant gözlenmiş. Profil 1'den 1000 Kb tek bant izlenen suşlardan 225 Kb lik bantın olmaması ile ayrıştırılmıştır;

2200, 1600, (1000), 610, (365+285 kesin) Kb.

Profil 5:

Bu profil O10 izolatında izlenmiştir. O10 izolatında 1600 Kb seviyesindeki bant da daha yukarıda 1800 Kb civarında izlenmiştir (bu özelliğe sahip tek suş). Bu da O10 için tek başına 5. profili oluşturmuştur. Bu profilde 1020+945 (Kb) bantları yerine yaklaşık 1000 Kb bölgesinde tek bant olarak izlenmiştir ve 365+285+225 (Kb) bantları, (365+285) 2 bant+250 faint (silik) (Kb) bant olarak izlenmektedir. O10 izolatında markör referans mayaya benzer patern gözlenmiştir;

2200, 1800, (1000), 610, (365+285+225 faint) Kb.

Profil 6:

Bu profil K71, K49, D16 izolatlarında izlenmiştir. Bu profilde 1020+945 (Kb) bantları yerine yaklaşık 1000 Kb bölgesinde tek bant olarak izlenmiştir. 610+565 (Kb) bantları, 2 bant halinde izlenmektedir. Ayrıca 365+285+225 (Kb) bantları 3 bant olarak izlenmektedir; 2200, 1600, (1000), (610+565), (365+285+225) Kb.

Profil 7:

Bu profil K45 izolatında izlenmiştir. Bu profilde 1020+945 (Kb) bantları, 2 bant halinde izlenmekte ve 610 (Kb) bandı, 2 bant (610+620) Kb halinde izlenmektedir. 365+285+225 (Kb) bantları, (365+285) 2 bant +250 faint (silik) (Kb) bant olarak izlenmektedir; 2200, 1600, (1020+945), (610+620), (365+285+225 faint) Kb

Profil 8:

Bu profil B3 izolatında izlenmiştir. Bu profilde 1125 (Kb) bandı, 2 bant (1200+1125) Kb halinde izlenmektedir. 1020+945 (Kb) bantları, 2 bant halinde izlenmektedir. 365+285+225 (Kb) bantları, (365+285) 2 bant +250 faint (silik) (Kb) bant olarak izlenmektedir; 2200, 1600, (1200+1125), (1020+945), 610, (365+285+225 faint) Kb.

Profil 9:

Bu profil E21 izolatında izlenmiştir. Bu profilde 1125 (Kb) bandı, 2 bant (1200+1125) Kb halinde izlenmektedir. 1020+945 (Kb) bantları, 2 bant halinde izlenmektedir. 610 (Kb) bandı, 2 bant (640+610) Kb halinde izlenmektedir. Ayrıca 365+285+225 (Kb) bantları 3 bant olarak izlenmektedir; 2200, 1600, (1200+1125), (1020+945), (640+610), (365+285+225) Kb.

Profil 10:

Bu profil E16 izolatında izlenmiştir 2200 (Kb) bandının olmaması (daha büyük boyutlu bir bant gözlenmiştir) bu suşun özel bir profil oluşturmaya neden olmuştur. Bu profilde 1020+945 (Kb) bantları, 2 bant halinde izlenmekte ve 365+285+225 (Kb) bantları 3 bant olarak izlenmektedir; 2400, 1600, (1020+945), 610, (365+285+225) Kb.

Şekil 4.32 ve 4.33'te 2200 (Kb) bandı bütün örneklerimizde markör referans maya banttı yukarıda gözlenmektedir ve 1600 (Kb) bandı bütün örneklerimizde markör referans maya banttı daha aşağıda gözlenmektedir. Sadece O10 izolatında 1600 Kb seviyesindeki bant daha yukarıda 1800 Kb civarında izlenmiştir (bu özelliğe sahip tek suş).

Markör referans mayada 1125 (Kb) bandı tek olarak gözlenmiş olduğu halde B3 ve E21 izolatlarında 2 bant (1200+1125 Kb) gözlenmiştir (Şekil 4.32).

Şekil 4.32 ve 4.33'te S15, S18, K46, K48, B35, D17, K71, K49, D16, O10, O12, O24 ve CH izolatlarında 1020+945 (Kb) büyüklüğündeki bantlar tek bant olarak tespit edilmiştir, 1000 Kb büyüklüğünde gözlenmektedir. E1, E2, E4, E5, E16, E21, B2, B3, B5, B6, B36, O39, K44, K45, S13, S16 izolatlarında 1020 ve 945 (Kb) büyüklüğündeki bantlar gözlenmiştir.

610 ve 565 (Kb) bantları K71, K49, D16, izolatlarında ayrılmış (Şekil 4.32) diğer örneklerimizde ayrılmamakta, bununla birlikte markör referans maya da ayrılmaktadır.

K45 (Şekil 4.33) ve E21 (Şekil 4.32) izolatlarında 610 (Kb) bandı, 2 bant halinde izlenmektedir. Diğer örneklerimizde tek bant gözlenmiştir.

Paternal arasındaki farkların izolatların menşei olan üzüm çeşitleri ile bağlantılı olmadığı tespit edilmiştir. Kromozomal polimorfizm *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* gibi cinslerin türlerinin ayırt edilmesini sağlamaktadır. Elektroforetik karyotipler türe özgü olmakla beraber bazı türlere ait suşlarda da polimorfizm gözlemlendiğini rapor etmişlerdir (Belloch vd.,1998). Kromozom büyüklüğündeki polimorfizm bazı *S. cerevisiae* izolatlarının bantlarının mobilitesinde çok az bir fark yaratabilmektedir. Bu fark ise suşlar arası farklılıkların ortaya konmasında kullanılabilmektedir. Sebastiani vd. (2004), *S. cerevisiae* suşları için için 9 farklı karyotip bulduklarını rapor etmişlerdir. Tokaj (Macaristan) şaraplarından izole edilen 17 *S. cerevisiae* suşunun karyotip analiz sonuçlarında da farklı profiller (yüksek çeşitlilik) gösterilmiştir (Kallai vd., 2019). Proje bulgularımız, karyotipleme yöntemiyle elde edilen suş çeşitliliği ile suşların izole edildiği bölgeler arasında bir korelasyon olmadığını göstermektedir. Ancak suşlar arası farklılıkları ortaya konmuştur.

4.7.2. RAPD-PZR

RAPD-PZR çalışmaları için non-*Saccharomyces* mayalar seçilmiştir. Tablo 4.27 bu bölümde kullanılan 19 non-*Saccharomyces* mayanın listesini ve kaynaklarını göstermektedir.

Tablo 4.27. Bu bölümde kullanılan non-*Saccharomyces* mayaları listesi ve kaynakları

Maya suşları	Sekans ismi	Lab ismi	Kaynak (şehir, ülke, tarih)
<i>Lachancea thermotolerans</i>	-	L. t	DSMZ
<i>Lachancea thermotolerans</i>	O6	OA 4CM NS3	Elazığ, Türkiye, 2017
<i>Lachancea thermotolerans</i>	O9	OB 4CM NS4	Elazığ, Türkiye, 2017
<i>Lachancea thermotolerans</i>	O16	OA 0CM NS7	Elazığ, Türkiye, 2017
<i>Lachancea thermotolerans</i>	O22	OB 0CM NS6	Elazığ, Türkiye, 2017
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	H. u	DSMZ
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	E11	EA 1W NS1	Nevşehir, Türkiye, 2017
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	E14	EA 1W NS4	Nevşehir, Türkiye, 2017
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	K13	KA 4CM NS3	Ankara, Türkiye, 2017
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	K25	KA 2NM NS9	Ankara, Türkiye, 2017
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	O5	OA 4CM NS2	Elazığ, Türkiye, 2017
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	O7	OA 4CM NS4	Elazığ, Türkiye, 2017
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	K2	KA 0CM NS2	Ankara, Türkiye, 2017
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	K60	KB 2NM NS9	Ankara, Türkiye, 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	M. p	M.p	DSMZ
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	B10	BB 0CM NS2	Diyarbakır, Türkiye, 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	B11*	BB 0CM NS3	Diyarbakır, Türkiye, 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	B33*	BB 4CM NS8	Diyarbakır, Türkiye, 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	D4	DA 0CM NS4	Kapadokya, Türkiye, 2017
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	D12	DA 4CM NS4	Kapadokya, Türkiye, 2017
<i>Metschnikowia sinensis</i>	D3*	DA 0CM NS3	Kapadokya, Türkiye, 2017
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	D8*	DB 0CM NS4	Kapadokya, Türkiye, 2017

DSMZ, German collection of microorganisms and cell cultures GmbH (Germany); OA, Öküzgözü üzümlerinden yapılan şarabın A paraleli; OB, Öküzgözü üzümlerinden yapılan şarabın B paraleli; KB, Kalecik Karası üzümleri şarabı B paraleli; BB, Boğazkere üzümleri B paraleli; DA, Dimrit üzümleri şarabı A paraleli; DB, Dimrit üzümleri şarabı B paraleli; 0CM, Soğuk maserasyon 0.gün; 4CM, soğuk maserasyon 4.gün Maserasyon; 1.W, fermentasyonun 1. Haftası; 2NM, Normal maserasyonun 2.günü.

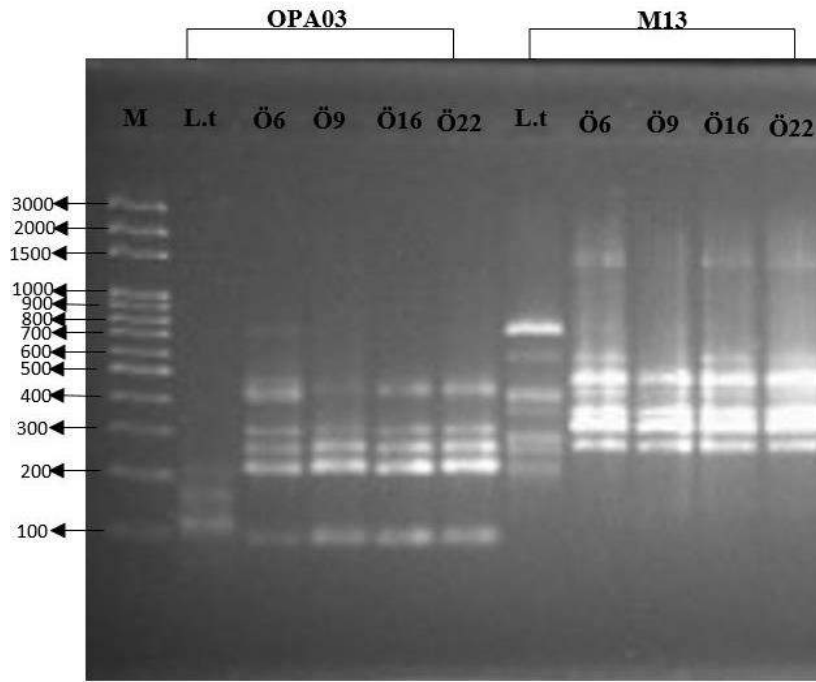
*D1/D2 domain sequencing ile farklı tanımlanan suşlar: B11, *Metschnikowia aff. pulcherrima*; B33, *Metschnikowia aff. fructicola*; D3, *Metschnikowia pulcherrima*; D8, *Metschnikowia pulcherrima*.

4 farklı primer (Tablo 3.7), seçilmiş 3 cins (*Lachancea*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*) ve 4 tür (*L. thermotolerans*, *H. uvarum*, *H. opuntiae*, *M. pulcherrima*) seviyesindeki suşların farklılaştırılması amacıyla kullanılmıştır. Aynı veya farklı üzüm şıra ve şaraplarından izole edilen suşlarda genotipik farklılıkların olup olmadığını araştırmak için RAPD veya Mikrosatelit parmak izi çalışmaları yürütülmüştür.

***Lachancea thermotolerans* Suşlar**

4 *L. thermotolerans* izolatu, suşlar arasındaki genetik farklılıkları göstermek için, 4 farklı primerin kullanımı ile RAPD-PZR ile incelemeye alınmıştır.

Şekil 4.35'te görüldüğü gibi primer OPA-03 ile 2 farklı patern oluşmuştur. Paternlerden biri DSMZ referans suşunu diğer 4 izolattan ayırmıştır. Diğer patern 700 bp seviyesindeki bant varlığı ile O6 suşunu, diğer izolatlardan O9, O16, O22'yi ayırmıştır. OPA-03 700 bp ile O6'yı ayırmıştır. M13 ise 1500 ve 600 bp ile O9'u ayırmıştır.

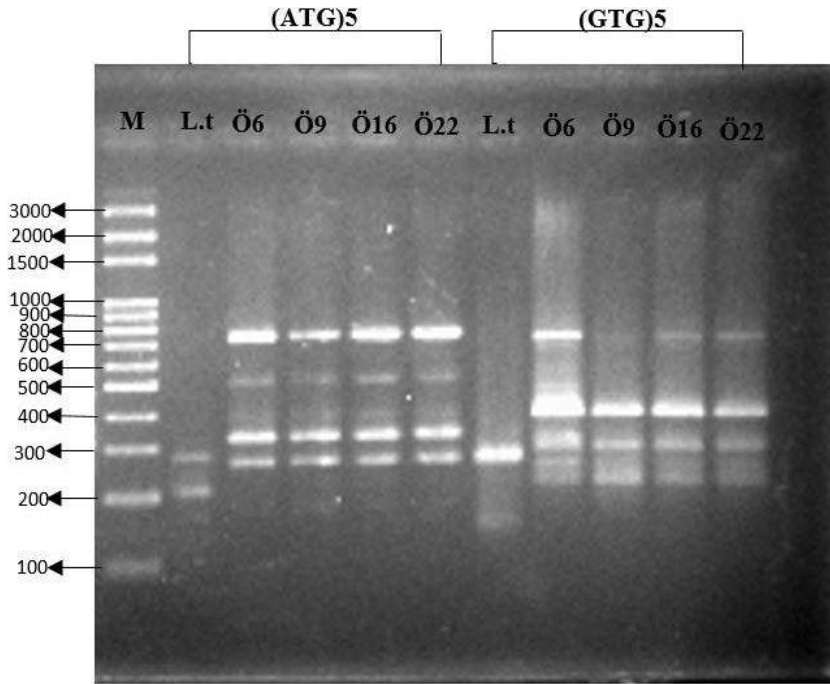


Şekil 4.35. *Lachancea thermotolerans* OPA-03 ve M13 primerleri ile amplifikasyon ürünleri M, 100bp Markör; L.t, referans suş *Lachancea thermotolerans* (DSMZ); O6 (DA 0CM NS3), *Lachancea thermotolerans*; O9 (BB 0CM NS2), *Lachancea thermotolerans*; O16 (BB 0CM NS3), *Lachancea thermotolerans*; O22 (DB 4CM NS3), *Lachancea thermotolerans*.

M13 primeri ise referans suşu diğer 4 izolattan farklılaştıran bir profil oluşturmuştur. M13 primeri, ayrıca O9 suşunu 600 bp ve 1500 bp bantlarının kaybolmuş olması ile O6, O16, O22 izolatlarından ayırmıştır.

Her 2 primer (M13, OPA-03) de referans DSMZ suşunu seçmiş olduğumuz şarap izolatlarından farklılaştırmıştır. Çalışılan toplam 4 *L. thermotolerans* izolatu içinden; OPA-03 primeri O6 izolatını, M13 ise O9 izolatını diğer izolatlardan ayırmıştır.

(ATG)₅ ve (GTG)₅ mikrosatelit primerlerinin kullanımı ile elde edilen sonuçlar da DSMZ suşunun, izolatlarımızdan farklılığını teyit edici niteliktedir. Şekil 4.36'da (ATG)₅ primerinin DSMZ suşu dışında, seçilen izolatlarımız arasında herhangi bir özel patern oluşturmadığı görülmektedir. Diğer taraftan, (GTG)₅ primeri O6 izolatu yaklaşık 420 bp ve 500 bp seviyesindeki bantlar ile diğerlerinden (O9, O16, O22) farklı bir patern göstermiştir.



Şekil 4.36. *Lachancea thermotolerans* (ATG)5 ve (GTG)5 mikrosatelit primerleri ile amplifikasyon ürünleri

M, 100bp moleküler Markör; L.t, referans suş *Lachancea thermotolerans* (DSMZ); Ö6 (DA 0CM NS3), *Lachancea thermotolerans*; Ö9 (BB 0CM NS2), *Lachancea thermotolerans*; Ö16 (BB 0CM NS3), *Lachancea thermotolerans*; Ö22 (DB 4CM NS3), *Lachancea thermotolerans*.

Fotoğraflarda elde edilen paternler kullanılarak tablolar hazırlanmıştır. Aynı patern tipleri aynı harf kodu ile temsil edilmektedir. Son kolondaki veriler genel paterni gösterip, her bir primer ile elde edilen sonuçların kombinasyonu ile elde edilmiştir. Patern tipleri yeni kombinasyonuna farklı harf verilmektedir (Tablo 4.28).

Tablo 4.28. *L. thermotolerans* suşları için 4 primer kullanımı ile elde edilen paternler

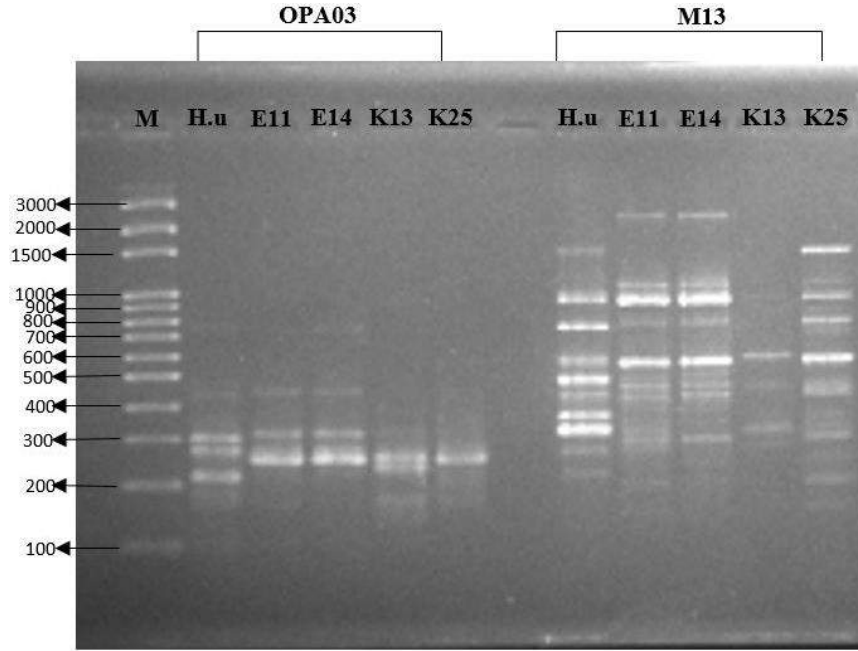
Suş	RAPD primerleri	Mini- and Mikrosatelit primerleri			Patern kombinasyonu
	OPA-03	M13	(ATG) ₅	(GTG) ₅	
O6	A	A	A	A	A
O9	B	B	A	B	B
O16	B	A	A	B	C
O22	B	A	A	B	C

Sonuç olarak, O6 ve O9, diğer izolatlardan (O16 ve O22) farklı olarak işaretlenmiştir.

***Hanseniaspora uvarum* Suşlar**

PZR amplifikasyonu sonrası, *H. uvarum* türleri 4 primer ile çalışılmıştır. DSMZ referans suşu 4 farklı *H. uvarum* şarap izolatımızdan farklı patern vermiştir.

Primer OPA-03 kullanımı sonrası, 4 farklı izolat için (E11, E14, K13, K25) 3 farklı profil gözlemlenmiştir. E11 ve E14 birbirlerine benzer profil oluşturmuştur. Diğer yandan, primer 13 kullanımı ile 4 izolat da kendilerine özel profiller ile birbirlerinden farklı bulunmuştur (Şekil 4.37).

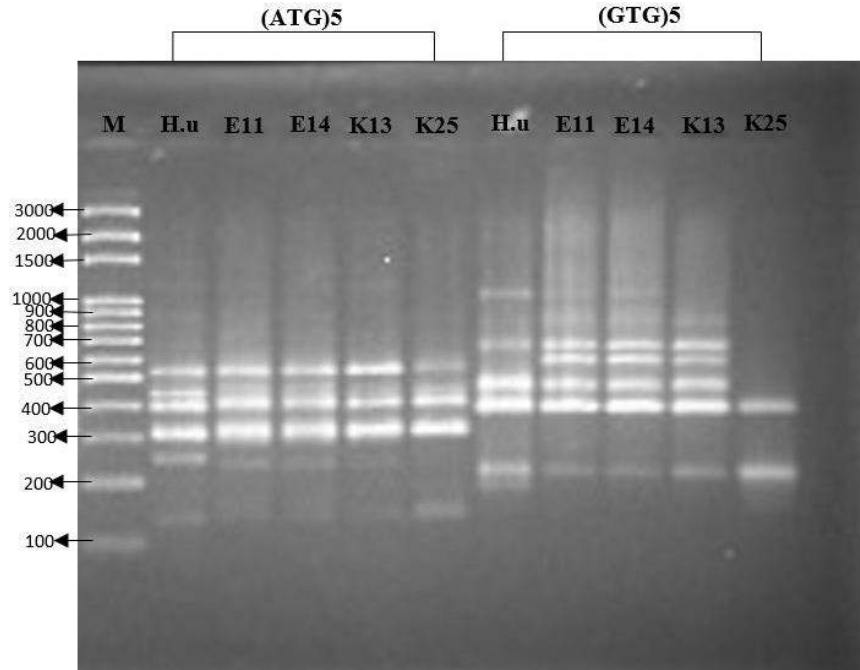


Şekil 4. 37. *Hanseniaspora uvarum* OPA-03 ve M13 primerleri ile amplifikasyon ürünleri M, 100bp moleküler Markör; H.u, referans suş *Hanseniaspora uvarum* (DSMZ); E11 (EA 1W NS1), *Hanseniaspora uvarum*; E14 (EA 1W NS4), *Hanseniaspora uvarum*; K13 (KA 4CM NS3), *Hanseniaspora uvarum*; K25 (KA 2NM NS9), *Hanseniaspora uvarum*

Şekil 4.38'de (ATG)₅ ve (GTG)₅ primerleri ile oluşan paternler görülmektedir, (ATG)₅ primeri DSMZ referans suşu, E11, E14 ve K13 izolatları için aynı paterni göstermiştir. Yalnızca K25 izolatu paterni bir bant eksiklik (250 bp) ile farklı patern göstererek (ATG)₅ ile diğer 3 izolattan ve referans suşundan ayrılmıştır.

(GTG)₅ primeri tarafından bir eksik bant (600 bp) ve 180 bp'lik ek bir bant ile oluşan patern, HU referans suşunu diğer 3 izolattan (E11, E14, K13) farklı kılmış ve referans suş için farklı bir profil belirlenmesine neden olmuştur.

(GTG)₅ primeri E11 ve E14 suşlarında aynı sayı ve büyüklükte bantlar oluştururken, K13 izolatındaki 1000 bp bantının yokluğu, bu suşu diğer E izolatlarından ayırmıştır. Suş K25 de yalnızca 2 bant (200 ve 400 bp) izlenmesi ile farklı bir patern ortaya koymuştur. Sonuç olarak mikrosatelit primerlerinden (ATG)₅ primeri yalnızca K25 izolatını ayırırken, (GTG)₅ primeri 3 patern ile 4 adet *H. uvarum* izolatını E11, E14, K13 ve K25 birbirinden ayırmıştır.



Şekil 4.38. *Hanseniaspora uvarum* (ATG)₅ ve (GTG)₅ mikrosatelit primerleri ile PZR amplifikasyon ürünleri

M, 100bp Markör; H.u, referans suş *Hanseniaspora uvarum* (DSMZ); E11 (EA 1W NS1), *Hanseniaspora uvarum*; E14 (EA 1W NS4), *Hanseniaspora uvarum*; K13 (KA 4CM NS3), *Hanseniaspora uvarum*; K25 (KA 2NM NS9), *Hanseniaspora uvarum*.

Tablo 4. 29. *H. uvarum* suşları için 4 primer kullanımı ile elde edilen paternler.

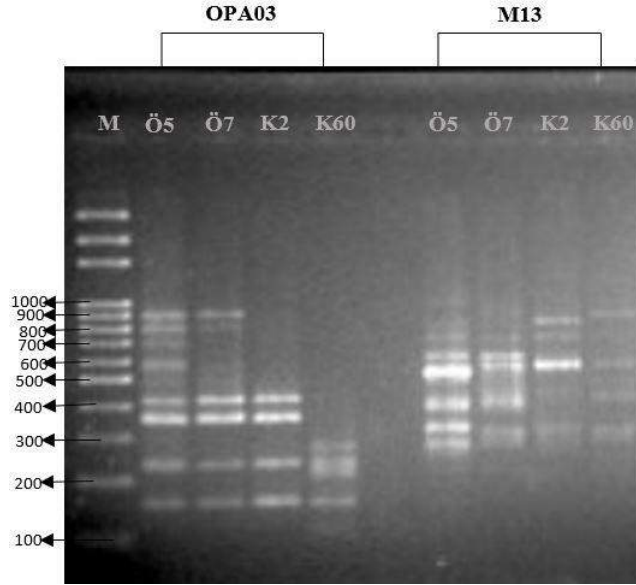
Suş	RAPD primerleri	Mini ve Mikrosatelit primerleri			Patern kombinasyonu
	OPA-03	M13	(ATG) ₅	(GTG) ₅	
E11	A	A	A	A	A
E14	A	B	A	A	B
K13	B	C	A	B	C
K25	C	D	B	C	D

Hanseniaspora opuntiae Suşlar

Birçok maya türü için birçok moleküler teknik geliştirilmiş olmasına rağmen, bilginiz dahilinde, *H. opuntiae* suşları için şimdiye kadar biyoçeşitlilik belirleme geliştiren bir çalışılmaya rastlanmamıştır. Bu projede 4 *H. opuntiae* RAPD-PZR ile farklılaştırılmaya çalışılmış ve geniş çeşitlilik saptanmıştır.

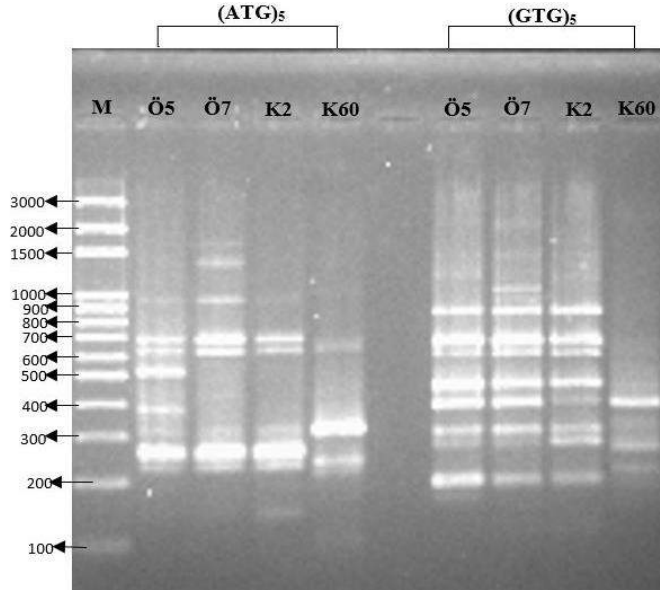
Jel fotoğrafında (Şekil 4. 39) görüldüğü gibi, RAPD primerleri (OPA-03 and M13) ile 4 suş için birbirinden farklı farklı paternler gözlenmiştir.

Mikrosatelit primerleri (ATG)₅ and (GTG)₅ ile yürütülen RAPD-PZR da 4 suşu birbirinden ayırmıştır (Şekil 4.40) (Tablo 4.30).



Şekil 4.39. *Hanseniaspora opuntiae* suşlarının OPA-03 ve M13 primerleri ile PZR amplifikasyon ürünleri

M, 100bp Markör; O5 (OA 4CM NS2), *Hanseniaspora opuntiae*; O7 (OA 4CM NS4), *Hanseniaspora opuntiae*; K2 (KA 0CM NS2), *Hanseniaspora opuntiae*; K60 (KB 2NM NS9), *Hanseniaspora opuntiae*



Şekil 4.40. *Hanseniaspora opuntiae* suşlarının (ATG)₅ ve (GTG)₅ mikrosatelit primerleri ile PZR amplifikasyon ürünleri

M, 100bp Markör; O5 (OA 4CM NS2), *Hanseniaspora opuntiae*; O7 (OA 4CM NS4), *Hanseniaspora opuntiae*; K2 (KA 0CM NS2), *Hanseniaspora opuntiae*; K60 (KB 2NM NS9), *Hanseniaspora opuntiae*

Tablo 4.30. *H. opuntiae* suşları için 4 primer kullanımı ile elde edilen paternler.

Suş	RAPD primerleri		Mini ve Mikrosatelit primerleri		Patern kombinasyonu
	OPA-03		M13	(ATG) ₅ (GTG) ₅	
O5	A		A	A	A
O7	B		B	B	B
K2	C		C	C	C
K60	D		D	D	D

***Metschnikowia pulcherrima* Suşlar**

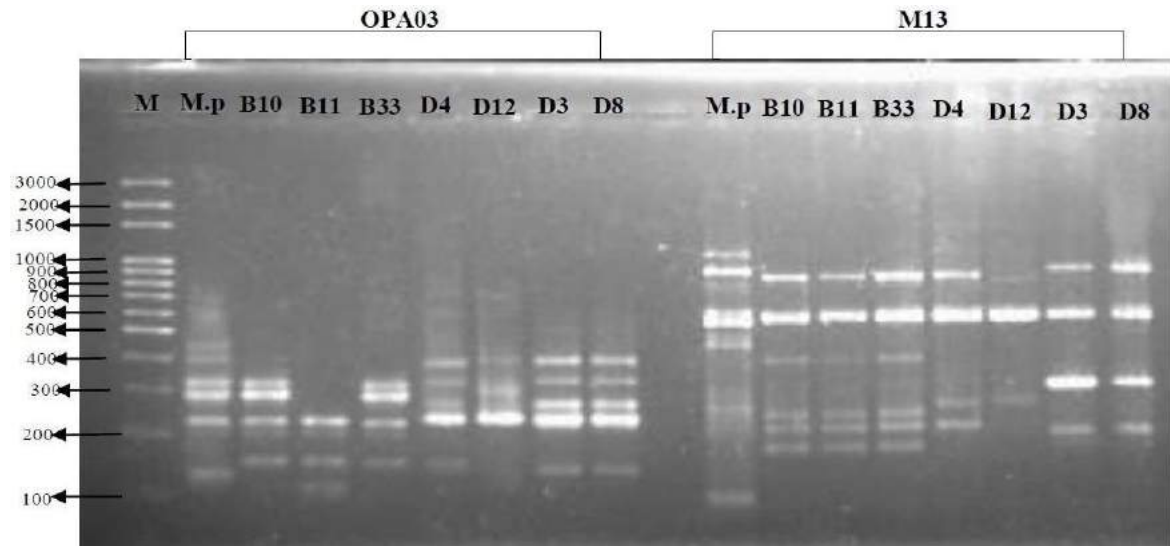
M. pulcherrima 7 suşu biyoçeşitliliği saptamak için çalışılmıştır. ITS sekansına göre, B10, B11, B33, D4 ve D12 *M. pulcherrima* türüne aittir. D1/D2 domain sekansına göre ise, bu 7 izolattan sadece D3 ve D8 *M. pulcherrima*'dır. Bununla beraber, D3 suşu ITS bölgesi sekansına göre *M. sinensis* olarak, D8 ise *M. chrysoperlae* olarak tanımlanmıştır.

RAPD-PZR sonuçlarında, B10 ve B33 izolatları, 4 primerin tümü ile aynı paterni göstermiştir. Aynı şekilde, D3 ve D8'de de aynı patern gözlenmiştir. Referans *M. pulcherrima* (DSMZ) 7 izolattan da farklı bir patern ortaya çıkarmıştır (Tablo 4.31). İlginç bir bulgu olarak, bizim sekans sonuçlarımıza göre; DSMZ *M. pulcherrima* suşu ITS bölgesi sekansına göre *M. aff. pulcherrima*, D1/D2 sekans analizine göre ise *M. pulcherrima* olarak tanımlanmıştır (EK 5).

ITS'e göre *M. pulcherrima* olarak tanımlanmış 5 suş, OPA03 toplam olarak 4 farklı patern oluşturmuştur.

M13 primeri ise, 3 (D3, D8 hariç) farklı patern grubu oluşturmuştur: 1. Grup: B10, B11, B33 suşları aynı paterni göstermektedir, 2. Grup: D4 ve 3. Grup: D12.

D1/D2 domain sekansına göre *M. pulcherrima* olarak tanımlanan diğer 2 suş, D3 ve D8, aynı paterne sahiptirler ve birlikte ayrı bir grup oluşturmaktadırlar. Böylelikle, OPA-03 (5 suş için, 4 farklı patern) primerinin, M13 (5 suşta 3 farklı profil) primerine göre daha fazla ayırıcı gücü olduğu sonucuna varılmıştır. D1/D2 domain bölgesi ile tanımlanmış suşların (D3, D8 suşlarının) hiçbir primer tarafından farklılaştırılamadığı saptanmıştır (Şekil 4.41).



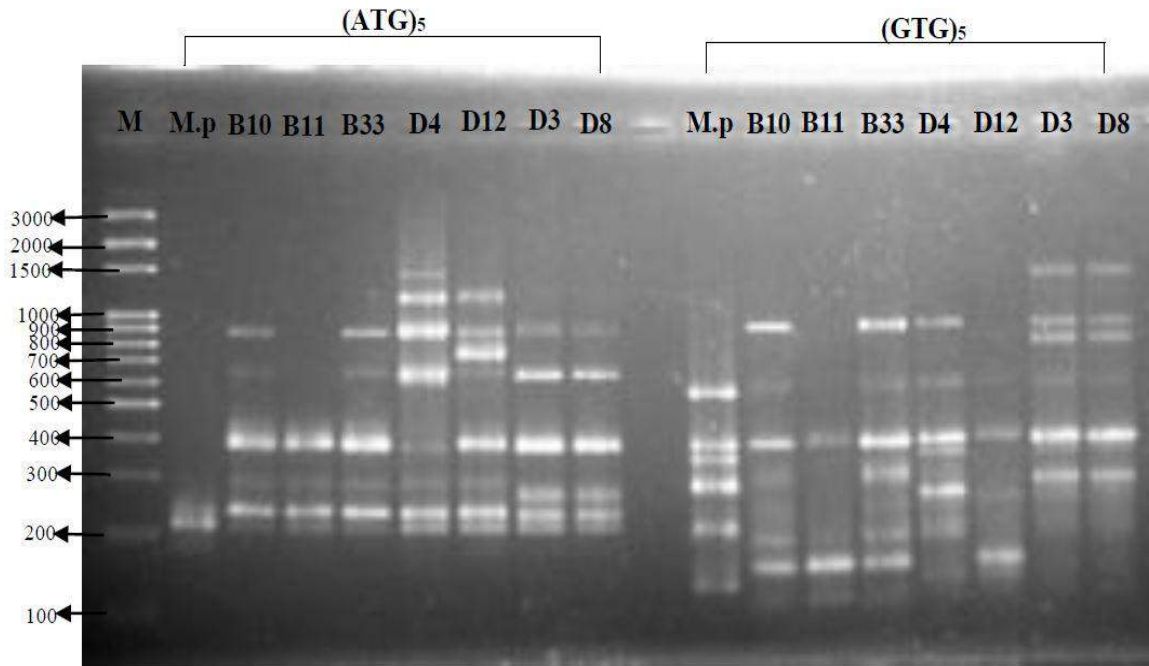
Şekil 4.41. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının OPA-03 ve M13 primerleri ile PZR amplifikasyon ürünleri

M, 100bp moleküler Markör; M.p referans suş *Metschnikowia pulcherrima* (DSMZ); B10 (BB 0CM NS2), *Metschnikowia pulcherrima* (ITS); B11 (BB 0CM NS3), *Metschnikowia pulcherrima* (ITS), *Metschnikowia aff. pulcherrima* (D1/D2); B33 (BB 4CM NS8), *Metschnikowia pulcherrima* (ITS), *Metschnikowia aff. pulcherrima* (D1/D2); D4 (DA 0CM NS4), *Metschnikowia pulcherrima* (ITS); D12 (DA 4CM NS4), *Metschnikowia pulcherrima* (ITS); D3 (DA 0CM NS3), *Metschnikowia sinensis* (ITS), *Metschnikowia pulcherrima* (D1/D2); D8 (DB 0CM NS4), *Metschnikowia chrysoperlae* (ITS), *Metschnikowia pulcherrima* (D1/D2)

Mikrosatelit primerlerinin her ikisi de ((ATG)₅ ve (GTG)₅) çalışılan 5 suşta, ITS bölgesi sekanslamasına göre tanımlanmış 4 farklı *M. pulcherrima* suşu olarak farklılaştırmıştır (Şekil 4.42). B10 ve B33 suşlarının aynı paterne sahip olması bu suşların aynı suş olması ihtimalini güçlendirmiştir. B11, D4 and D12 suşlarının herbiri ayrı patern oluşturmuştur. Benzer şekilde, D1/D2 domainine göre tanımlanmış *M. pulcherrima* D3 ve D8 suşlarının da aynı paterni gösteren profil oluşturdukları belirlenmiştir.

Genel olarak, OPA-03, (ATG)₅ and (GTG)₅ primerlerinin, M13 ile kıyaslandığında 5 *M. pulcherrima* suşunu 4'e ayırarak daha fazla ayırıcı gücünün olduğu kararına varılmıştır.

4 primerin kullanımı ile ITS bölgesi sekansı ile sırasıyla *M. sinensis* ve *M. chrysoperlae*; D1/D2 sekansı ile ise *M. pulcherrima* olarak tanımlanan 2 suşun (D3, D8) her daim aynı paterni gösterdiği ve dolayısıyla aynı suşa ait olmaları ihtimalinin yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 4.31).



Şekil 4.42. *Metschnikowia pulcherrima* suşlarının (ATG)₅ ve (GTG)₅ microsatelit primerleri ile PZR amplifikasyon ürünleri

M, 100bp moleküler Markör; M.p referans suş *Metschnikowia pulcherrima* (DSMZ); B10 (BB 0CM NS2), *Metschnikowia pulcherrima* (ITS); B11 (BB 0CM NS3), *Metschnikowia pulcherrima* (ITS), *Metschnikowia aff. pulcherrima* (D1/D2); B33 (BB 4CM NS8), *Metschnikowia pulcherrima* (ITS), *Metschnikowia aff. pulcherrima* (D1/D2); D4 (DA 0CM NS4), *Metschnikowia pulcherrima* (ITS); D12 (DA 4CM NS4), *Metschnikowia pulcherrima* (ITS); D3 (DA 0CM NS3), *Metschnikowia sinensis* (ITS), *Metschnikowia pulcherrima* (D1/D2); D8 (DB 0CM NS4), *Metschnikowia chrysoperlae* (ITS), *Metschnikowia pulcherrima* (D1/D2).

Tablo 4.31. *M. pulcherrima* olarak tanımlanan suşlar için 4 primer kullanımı ile elde edilen paternler.

Suş	RAPD primerleri	Mini ve Mikrosatelit primerleri			Patern kombinasyonu
	OPA03	M13	(ATG) ₅	(GTG) ₅	
B10	A	A	A	A	A
B11	B	A	B	B	B
B33	A	A	A	A	A
D4	C	B	C	C	C
D12	D	C	D	D	D
D3*	C	D	E	E	E
D8*	C	D	E	E	E

*D3, D8 suşları D1/D2 sekansına göre *M. pulcherrima* olarak tanımlanmıştır (diğer tüm suşlar ITS bölgesi sekansına göre *M. pulcherrima* olarak tanımlanmıştır).

Bu sonuçlara göre B11 in diğer B suşlarından farklı bir suş olduğu ortaya konmuştur.

Bu çalışmada, dört primerin sonuçlarının kombinasyonu, 4 *L. thermotolerans* izolatını 2 farklı klona, 4 *H. uvarum* izolatını 4 farklı klona, 4 *H. opuntiae* izolatını 4 klona, 7 *M. pulcherrima* izolatını 5 farklı klona (Tablo 4.32) ayırmıştır. Kullanılan teknik, çalışılan suşları her primer (OPA-03, M13, (ATG)₅ ve (GTG)₅) ile farklı profillere ayırmıştır (Tablo 4.33).

Tablo 4.32. RAPD-PZR ile çalışılan non-*Saccharomyces* türlerde klon farklılıkları

Türler	Çalışılan izolatlar	Her bir primer ile oluşan patern sayısı				Klon sayısı
		OPA03	M13	ATG	GTG	
<i>L. thermotolerans</i>	4	2	2	1	2	2
<i>H. uvarum</i>	4	3	4	2	3	4
<i>H. opuntiae</i>	4	4	4	4	4	4
<i>M. pulcherrima</i>	7	4	4	5	5	5

Tablo 4. 33. Maya türlerinin farklı primerlerin kullanımı ile ortaya çıkan moleküler profilleri

Maya suşları	Maya kodları	RAPD Primer		Mikrosatelit Primerleri	
		OPA03	M13	(ATG) ₅	(GTG) ₅
<i>L. thermotolerans</i>					
	DSMZ	215+170+120	730+600+390+ 350+260+240+ 215	280+220	270+170
	Ö6	700+450+400+ 270+250+215+95	1500+600+500+ 400+350+275+ 270+250	750+510+400+ 350+270	750+500+450+ 400+320+260+ 250
	Ö9	400+270+250+ 215+95	500+400+350+ 275+270+250	750+510+400+ 350+270	750+400+320+ 260+250
	Ö16	400+270+250+ 215+95	1500+600+500+ 400+350+275+ 270+250	750+510+400+ 350+270	750+400+320+ 260+250
	Ö22	400+270+250+ 215+95	1500+600+500+ 400+350+275+ 270+250	750+510+400+ 350+270	750+400+320+ 260+250
<i>H. uvarum</i>					
	DSMZ	750+450+300+ 280+220+180	1500+1000+800+6 00+500+450+ 350+310+260+ 230	530+450+400+ 300+250+150	1000+700+460+4 00+220+180
	E11	750+450+310 +250	2800+1200+1000+ 820+600+500 +480+450+300	530+450+400 +300+250+150	1000+900+700 +600+460+400+2 20
	E14	750+450+310 +250	2800+1200+1000+ 820+600+500+ 480+450+300	530+450+400+ 300+250+150	1000+900+700+6 00+460+400+220
	K13	310+250+240 +160	1100+610+480+ 320+280	530+450+400+ 300+250+150	900+700+620+ 460+400+220
	K25	250	1500+1300+1000+ 820+610+480+ 300+220+180	530+450+400+ 300+150	400+220
<i>H. opuntiae</i>					
	Ö5	900+830+700+ 600+500+430+ 380+250+180	1000+850+750+ 650+590+410+ 350+280	950+700+650 +510+390+320+ 280+240	1500+1300+900+ 700+600+480+40 0+320+290+210+ 180
	Ö7	900+830+430+ 380+250+180	750+650+600+ 410+350	1700+1400+950+7 00+650+440+320+ 280+240	2000+1500+ 1100+900+700+6 00+480+400+320 +290+210
	K2	430+380+250+ 180	850+750+600+ 350	700+650+320+ 280+240+150	900+700+600+ 480+400+320+ 290+210
	K60	280+250+180	860+600+450+ 350	650+320+240	480+400+350+ 290+250
<i>Metschnikowia spp.</i>					
<i>M. pulcherrima</i>	DSMZ	450+400+310+28 0+220+ 200+130	1100+900+800+ 600+590+450+ 250+100	250+220+180	550+400+350+ 280+250+200+ 120
<i>M. pulcherrima</i>	B10	310+280+220 +200+150	850+600+400+ 220+210+180	900+650+400+ 300+250+220	900+550+400+ 300+180+150
<i>M. pulcherrima</i>	B11*	220+200+150+ 120	850+600+400+ 220+210+180	400+300+250+ 220	400+150+110
<i>M. pulcherrima</i>	B33*	310+280+220+ 200+150	850+600+400+ 220+210+180	900+650+400+ 300+250+220	900+550+400+ 300+180+150
<i>M. pulcherrima</i>	D4	400+320+270+ 220+150	850+600+270+ 210	1500+1200+900+6 50+400+300+250+ 220	900+550+400+ 350+270+180+ 130
<i>M. pulcherrima</i>	D12	400+290+220	850+600+270	1200+900+700+65 0+400+300+ 250+220	550+400+270+ 150
<i>M. sinensis</i>	D3*	400+320+270+ 220+150	900+600+300+ 210	900+650+400+ 270+250+200	1500+900+800+5 50+400+300
<i>M. chrysoperlae</i>	D8*	400+320+270+ 220+150	900+600+300+ 210	900+650+400+ 270+250+200	1500+900+800+5 50+400+300

DSMZ; German collection of microorganisms and cell cultures GmbH (Germany); * D1/D2 domain sekanslama ile farklı tanımlanan suşlar: B11, *Metschnikowia aff. pulcherrima*; B33, *Metschnikowia aff. fructicola*; D3, *Metschnikowia pulcherrima*; D8, *Metschnikowia pulcherrima*.

Bu çalışmada, RAPD ve mikrosatelit primerlerinin farklı üzüm bağlarının üzümlerinden izole edilen maya suşlarında biyoçeşitliliğin belirlenmesinde kullanılabileceği belirlenmiştir. Farklı RAPD ve mikrosatelit primerleri suşları birbirinden ayırmak için kullanılmıştır. Primerlerin farklı suşları ayırma özelliği türe özeldir. Örneğin (ATG)₅, *L. thermotolerans* suşları için özel bir profil oluşturmamaktadır, dolayısıyla en az ayırıcı primerdir. Diğer 3 primer O6 ve O9'u diğer suşlardan ayırmıştır. M13 primerinin *L. thermotolerans* türleri arasındaki ayırıcı özelliği Gonzalez vd. (2017) tarafından rapor edilmiştir.

H. uvarum suşlarının farklılaştırılması için M13 en iyi primer olarak tespit edilmiştir. Çalışılan dört adet suşun hepsini birbirinden ayırt edebilmek mümkün olmuştur. (ATG)₅ ise bir özel patern ile en az ayırıcı gücü olan primer olarak belirlenmiştir.

(ATG)₅, (GTG)₅, OPA03 ve M13 primerleri Cadez vd. (2002) tarafından *Hanseniaspora (Kloeckera)* suşlarının kümelem (cluster) analizinde kullanılmıştır. Bujdoso vd. (2001a) RAPD primeri OPA03'ün *H. uvarum* suşlarının ayrıştırılmasında etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Literatürde *H. opuntiae* türü suşlarını ayırıcı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmamızda 4 farklı primerin kullanımı ile *H. opuntiae* suşlarının klon karakterizasyonu bu suşların birbirleri arasında farklılığın yüksek olduğunu göstermiştir. Kullanılan dört primer de, dört *H. opuntiae* suşunu birbirinden ayırt edebilmiştir: hem farklı üzüm çeşidinden (Öküzgözü ve Kalecik Karası) izole edilen, hem de aynı üzüm çeşidinden izole edilen suşlar farklı bulunmuştur.

M13 ve OPA03 primerleri, *M. pulcherrima*'nın çalışılan 7 izolatının 4'ünü ayırabilmiştir. Diğer iki mikrosatelit primeri ise 7 *M. pulcherrima* suşundan 5'ini farklılaştırmıştır. M13 primeri ile *M. pulcherrima*'nın farklılaştırılması Gonzalez vd. (2017) tarafından da rapor edilmiştir.

4.8. Seçilmiş Suşlar ile Çoklu-Kültür Şarap Yapımı

Geleneksel şaraplar yanında ticari suşların kullanımı ile de şaraplar üretilmiştir. Şarap yapımında kullanılan *Saccharomyces* suşlarının farklılıkları, farklı tat ve aroma profillerinin oluşmasına neden olmaktadır (Bisson, 2012). Ayrıca non-*Saccharomyces* suşları da bu farklılıkları artırmaktadır. Kalecik Karası üzümleri seçilmiş suşların denenmesinde kullanılmış, şarap üretimlerimiz gerçekleşmiştir. Kavaklıdere Şarapları A.Ş. ile iş birliği çerçevesinde, ticari mayalar ile üretilen Kavaklıdere fabrika üretimi Kalecik Karası şaraplarını, paralel biçimde suşlarımız ile üretilen şaraplar ile kıyaslanma imkanı bulunmuştur. Şaraplar, patlatılmış Kalecik Karası üzümlerine starter kültürlerin sıralı inokülasyonu ile hazırlanmıştır.

Buna göre kullanılan suşlarımız aşağıda Tablo 4.34'te gösterilmektedir.

Tablo 4.34. Kalecik Karası üzümüyle yapılan şaraplarda kullanılan çoklu suşlar

Şaraplar	non-Saccharomyces Suş				Saccharomyces Suş	
	Suş Adı	İsimlendirme		Suş Adı	İsimlendirme	
1.L.T + S.C	<i>L. thermotolerans</i>	O9	OB 4CM NS4	<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2
2.L.T + Laffort S.C	<i>L. thermotolerans</i>	O9	OB 4CM NS4	Laffort <i>S. cerevisiae</i>	RB2	RB2
3.W.A + S.C	<i>W. anomalus</i>	K41	KA 0CM S1	<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2
4.M.P + S.C	<i>M. pulcherrima</i>	D3	DA 0CM NS3	<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2
5.H.O + S.C	<i>H. opuntiae</i>	K2	KA 0CM NS2	<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2
6.S.C	-	-	-	<i>S. cerevisiae</i>	K71	KA 32NM S2
7.Laffort S.C	-	-	-	Laffort <i>S. cerevisiae</i>	RB2	RB2

K, Kalecik Karası; O, Öküzgözü; D, Dimrit üzüm çeşitleri; A, A paralel; B, B paralel; CM, soğuk maserasyon; NM, maserasyon.

Kalecik Karası üzümünden elde edilen şıranın özgül ağırlığı Nurgel vd. (2005) tarafından 1.080-1.100 g/m³ olarak belirlenmiş ve yaklaşık 5-7 gün içinde fermentasyon sonucunda bu değerin 1.000 g/m³ altına düştüğünü belirtmişlerdir. Bizim şarap yapımında kullandığımız şıranın özgül ağırlığı 1.092 g/m³ olarak ölçülmüş ve beşinci gün bu değer 1.000 g/m³ altına düşmüştür. Selli vd. (2001) Kalecik Karası üzümünden elde edilen şıranın briks değerini 22.8 olarak ölçerken, bizim kullandığımız şıranın briks değeri 22.7 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, Selli vd. (2001) şıranın toplam asitliğinin tartarik asit cinsinden 8.3 g/L olduğunu belirtirken şıraların asitliğinin 3-15 g/L (tartarik asit cinsinden) arasında olabileceğini vurgulamışlardır. Bizim kullandığımız şıranın toplam asitliği tartarik asit cinsinden 5.82 g/L olarak ölçülmüştür ve bu değer literatürdeki değerlerle uyumludur. Ayrıca, Selli vd. (2004) Kalecik Karası üzümünden elde edilen şarabın toplam asitlik değerini (tartarik asit cinsinden) 5.0 ve 5.9 g/L olarak belirlemişlerdir. Yerel suşlarla yaptığımız şarapların (L.T-S.C, M.P-S.C, W.A-S.C, H.O-S.C ve S.C) toplam asitliği 4.90-5.36 g/L arasında değişim gösterirken ticari maya kullanılan LT-Laffort S.C ve Laffort S.C şaraplarının toplam asitliği 4.74 ve 4.13 g/L olarak bulunmuştur. Türk Gıda Kodeksi'nde ise toplam asitliğinin tartarik asit cinsinden en az 3 g/L olması gerektiği belirtilmiştir (Anonim, 2009) ve bütün şaraplarımız bu kriteri sağlamaktadır. Şıranın pH değeri ise 3.73 olarak bulunurken şarap örneklerinde pH değerleri; yerel suşlar kullanılan şaraplarda (L.T-S.C, M.P-S.C, W.A-S.C, H.O-S.C ve S.C) 3.60-3.71, ticari maya kullanılan şaraplarda (L.T-Laffort S.C ve Laffort S.C) 3.77 ve 3.96 olarak bulunmuştur. Selli vd. (2004), Kalecik Karası üzümünden elde edilen şıranın pH değerinin 3.5-3.6, fermentasyondan sonra ise 3.4-3.6 arasında olduğunu belirtmişlerdir. Değerler arasındaki bu farklılıklar hasat zamanı, toprağın nem içeriği ve mineral bileşimi gibi faktörlerden kaynaklanabilmektedir (Boulton vd., 1999).

4.8.1. Geliştirilen Starter Kültürler ile Üretilen Şaraplarda Enolojik Testler

Kalecik Karası şarapları enolojik analizleri WineScan™ (FOSS) cihazıyla yapılmıştır ve sonuçlar Tablo 4.35 ve 4.36'de gösterilmiştir.

Tablo 4.35. Kalecik Karası üzümünden yapılan şarapların enolojik analiz sonuçları

Kalecik Karası Üzümü	Gün	Özgül Ağırlık (g/m ³)	Özgül Ağırlık Alkol (%v)	Briks	Briks Alkol (%v)	Toplam Asit (g/L tartarik asit)	Etanol (%v/v)	pH	Alfa Amino (mg/L)	İndirgen Şeker (g/L)	Uçar Asit (g/L asetik asit)	Malik Asit (g/L)
Y7 Kavaklıdere Şarabı (Büyük Ölçekli)	0	1.092	13.16	22.7	13.24	5.82	-	3.73	328	-	-	-
		-	-	-	-	4.74	13.5	3.75	-	2.3	0.41	-
	1. L.T+ SC	1.092	13.16	22.7	13.24	5.82	-	3.73	328	-	-	-
	1	1.087	12.41	21.0	12.08	6.73	-	3.55	258	-	-	-
	2	1.040	-	13.6	7.18	7.81	-	3.41	249	-	-	-
	3	1.025	-	11.1	5.58	7.81	-	3.43	279	-	-	-
	4	1.002	-	7.4	-	7.5	-	3.48	298	-	-	-
	5	0.993	-	-	-	5.82	13.9	3.81	-	3.5	0.26	3.02
	13	0.993	-	-	-	6.73	12.8	3.54	-	2.4	0.22	2.77
	61*	-	-	-	-	4.90	13.0	3.71	-	2.2	0.40	-
	2.L.T+Laffort SC	1.092	13.16	22.7	13.24	5.82	-	3.73	328	-	-	-
	1	1.083	11.81	21.0	12.08	6.28	-	3.39	251	-	-	-
	2	1.040	-	13.7	7.54	7.65	-	3.46	266	-	-	-
3. W.A+ SC	3	1.026	-	11.5	5.84	7.65	-	3.48	289	-	-	-
	4	1.002	-	7.6	-	7.35	-	3.53	306	-	-	-
	5	0.994	-	-	-	6.58	12.9	3.61	-	5.4	0.23	2.82
	13	0.993	-	-	-	6.43	13.2	3.62	-	2.3	0.24	2.78
	61*	-	-	-	-	4.74	13.4	3.77	-	2.2	0.40	-
	0	1.092	13.16	22.7	13.24	5.82	-	3.73	328	-	-	-
	1	1.089	12.71	21.3	12.28	6.73	-	3.56	269	-	-	-
	2	1.039	-	13.3	6.99	7.96	-	3.42	211	-	-	-
	3	1.024	-	11.0	5.52	8.11	-	3.43	290	-	-	-
	4	1.001	-	7.3	-	7.65	-	3.48	300	-	-	-
	5	0.994	-	-	-	6.89	12.3	3.54	-	3.9	0.18	2.90
	13	0.993	-	-	-	6.73	12.7	3.55	-	2.4	0.21	2.91
	61*	-	-	-	-	5.05	12.8	3.70	-	2.3	0.38	-
4. M.P+ SC	0	1.092	13.16	22.7	13.24	5.82	-	3.73	328	-	-	-
	1	1.087	12.41	21.0	12.08	6.43	-	3.48	265	-	-	-
	2	1.040	-	13.6	7.18	7.81	-	3.39	208	-	-	-
	3	1.026	-	11.3	5.71	8.11	-	3.41	280	-	-	-
	4	1.002	-	7.4	-	7.65	-	3.45	294	-	-	-
	5	0.995	-	-	-	7.04	12.3	3.52	-	4.9	0.20	2.66
	13	0.993	-	-	-	6.58	12.3	3.52	-	2.4	0.22	2.55
	61*	-	-	-	-	5.36	12.7	3.62	-	2.5	0.37	-
	0	1.092	13.16	22.7	13.24	5.82	-	3.73	328	-	-	-
	1	1.092	13.16	21.8	12.62	6.73	-	3.57	282	-	-	-
	2	1.042	-	14.0	7.44	8.11	-	3.37	205	-	-	-
	3	1.027	-	11.5	5.84	8.26	-	3.38	279	-	-	-
	4	1.003	-	7.6	-	7.81	-	3.43	288	-	-	-
5. H.O+ SC	5	0.995	-	-	-	7.04	12.3	3.49	-	5.4	0.18	2.84
	13	0.993	-	-	-	6.89	12.7	3.50	-	2.3	0.20	2.81
	61*	-	-	-	-	5.36	12.8	3.63	-	2.2	0.37	-
	0	1.092	13.16	22.7	13.24	5.82	-	3.73	328	-	-	-
	1	1.084	11.96	20.7	11.87	6.58	-	3.44	260	-	-	-
	2	1.037	-	13.0	6.79	7.96	-	3.38	213	-	-	-
	3	1.023	-	10.8	5.39	7.96	-	3.40	279	-	-	-
	4	1.004	-	7.7	-	7.81	-	3.42	291	-	-	-
	5	0.996	-	-	-	7.19	12.2	3.48	-	7.8	0.20	2.68
	13	0.993	-	-	-	7.04	12.5	3.48	-	2.7	0.22	2.68
	61*	-	-	-	-	5.36	12.7	3.60	-	2.5	0.41	-
	0	1.092	13.16	22.7	13.24	5.82	-	3.73	328	-	-	-
	1	1.077	10.92	19.9	11.34	6.58	-	3.51	235	-	-	-
6. SC	2	1.026	-	11.7	5.96	7.19	-	3.59	273	-	-	-
	3	1.016	-	10.1	4.95	7.19	-	3.61	336	-	-	-
	4	0.999	-	7.4	-	6.89	-	3.67	342	-	-	-
	5	0.994	-	-	-	6.89	12.5	3.52	-	4.1	0.18	2.86
	13	0.992	-	-	-	5.66	14.1	3.82	-	2.0	0.29	2.97
	61*	-	-	-	-	4.13	14.2	3.96	-	2.3	0.52	-
	0	1.092	13.16	22.7	13.24	5.82	-	3.73	328	-	-	-
	1	1.077	10.92	19.9	11.34	6.58	-	3.51	235	-	-	-
	2	1.026	-	11.7	5.96	7.19	-	3.59	273	-	-	-
	3	1.016	-	10.1	4.95	7.19	-	3.61	336	-	-	-
	4	0.999	-	7.4	-	6.89	-	3.67	342	-	-	-
	5	0.994	-	-	-	6.89	12.5	3.52	-	4.1	0.18	2.86
	13	0.992	-	-	-	5.66	14.1	3.82	-	2.0	0.29	2.97
	61*	-	-	-	-	4.13	14.2	3.96	-	2.3	0.52	-
7. Laffort SC	0	1.092	13.16	22.7	13.24	5.82	-	3.73	328	-	-	-
	1	1.077	10.92	19.9	11.34	6.58	-	3.51	235	-	-	-
	2	1.026	-	11.7	5.96	7.19	-	3.59	273	-	-	-
	3	1.016	-	10.1	4.95	7.19	-	3.61	336	-	-	-
	4	0.999	-	7.4	-	6.89	-	3.67	342	-	-	-
	5	0.994	-	-	-	6.89	12.5	3.52	-	4.1	0.18	2.86
	13	0.992	-	-	-	5.66	14.1	3.82	-	2.0	0.29	2.97
	61*	-	-	-	-	4.13	14.2	3.96	-	2.3	0.52	-

*Son şarap analizi (61. Gün, şişeleme günü); **S.C, *Saccharomyces cerevisiae* K71 (KA 32NM S2); L.T, *Lachancea thermotolerans* O9 (ÖB 4CM NS4); W.A, *Wickerhamomyces anomalus* K41 (KA 0CM S1); M.P, *Metschnikowia pulcherrima* D3 (DA 0CM NS3); H.O, *Hanseniaspora opuntiae* K2 (KA 0CM NS2); Laffort S.C (RB2). ***0. günde, non-*Saccharomyces* mayaların (L.T, W.A, M.P, H.O) inokülasyonu yapılmıştır. 2. gün, *Saccharomyces cerevisiae* K71 inoküle edilmiştir (sequential inoculation).

4.8.2 Üretilen Şaraplarda Enolojik Testler

Tablo 4.36. Kalecik Karası üzümünden yapılan şarapların son enolojik analiz sonuçları

Kalecik Karası Şarapları	Serbest SO ₂ (mg/L)	Toplam SO ₂ (mg/L)	CO ₂ (mg/L)	O ₂ (mg/L)	Etanol (%v/v)	Toplam Asitlik (g/L tartarik asit)	pH	Uçar Asit (g/L asetik asit)	İndirgen Şeker (g/L)
1. LT+ SC	25	46	436	4.09	13.0	4.90	3.71	0.40	2.2
2.LT+Laffort SC	32	59	352	4.25	13.4	4.74	3.77	0.40	2.2
3. WA+ SC	37	67	432	3.71	12.8	5.05	3.70	0.38	2.3
4. MP+ SC	40	71	433	3.32	12.7	5.36	3.62	0.37	2.5
5. HO+ SC	41	71	423	3.83	12.8	5.36	3.63	0.37	2.2
6. SC	47	77	413	3.47	12.7	5.36	3.60	0.41	2.5
7.Laffort SC	39	73	225	3.20	14.2	4.13	3.96	0.52	2.3

*S.C, *Saccharomyces cerevisiae* K71 (KA 32NM S2); L.T, *Lachancea thermotolerans* O9 (ÖB 4CM NS4); W.A, *Wickerhamomyces anomalus* K41 (KA 0CM S1); M.P, *Metschnikowia pulcherrima* D3 (DA 0CM NS3); H.O, *Hanseniaspora opuntiae* K2 (KA 0CM NS2); Laffort S.C (RB2)

Şarap standartları Tablo 4.37'de verilmiştir. Buna göre, Avrupa Standartı ve Türk Gıda Kodeksi'nde, kırmızı şaraplar için kükürt dioksit miktarının en fazla 150 mg/L olması gerektiği görülmektedir. (Tablo 4.37). Şaraplarımızın son aşamada, şişelemeden önce yapılan analizine göre toplam SO₂ içeriği 46 ile 77 mg/L arasındadır (Tablo 4.36). Bu nedenle, şarapların SO₂ miktarları yönetmeliklere göre kabul edilebilir sınır içindedir. Ayrıca, Avrupa standartlarında CO₂ içeriği için maksimum sınır 3 g/L iken, Türk Gıda Kodeksi'nde 2 g/L ve US standartında 3,92 g/L olarak belirlenmiştir. Şaraplarımızın CO₂ içeriği 0.225 g/L ile 0.436 g/L arasındadır ve bu değerler standartlarla tutarlıdır. Buna ek olarak, Avrupa standartı ve Türk Gıda Kodeksi'nde alkol içeriğinin %15'ten (v/v) az olması gerektiği, US standartında ise %14'ten (v/v) az olması gerektiği belirtilmiştir. Şaraplarımız arasında en yüksek alkol oranına sahip olan %14.2 (v/v) ile ticari *S. cerevisiae* (LAFFORT) mayası ile yapılan şaraptır. Bu değer Avrupa standartı ve Türk Gıda Kodeksi'ne göre kabul edilebilir sınır içindedir fakat US standartında belirtilen değerden biraz daha fazladır. En az alkol içeriğine sahip şaraplar, *S. cerevisiae* ile yapılan S.C ve *M. pulcherrima* ve *S. cerevisiae* ile yapılan M.P-S.C şaraplarıdır. Avrupa standartı ve US standartında şarabın toplam asitliğinin tartarik asit cinsinden 3 g/L'den az olmaması gerektiği belirtilirken Türk Gıda Kodeksi'ne göre ise 3.5 g/L'den az olmamalıdır. Şarapların toplam asitliği (tartarik asit cinsinden) 4.13 ile 5.36 g/L arasında değişmektedir. Bu nedenle, şarapların asitliği standartlara göre kabul edilebilir sınır içindedir. Ribéreau-Gayon vd. (2006) uçar asit miktarı 0.72 g/L'nin altında ise bunu duyuşsal analizde tespit etmenin kolay olmadığını, ancak bu eşiğin üzerinde ise şarabın aromasını kötü yönde etkilediği ve aromanın bozulmaya başladığını

belirtmiştir. Uçar asiti oluşturan en önemli etkenlerden birisi asetik asit miktarıdır ve asetik asit seviyesi 0.90 g/L'nin üzerinde olduğunda, sert ve acı son tatlar tespit edilebilir. Bununla birlikte, US standartında kırmızı şaraplar için maksimum uçar asitlik 1.4 g/L asetik asit ve Avrupa standartı ve Türk Gıda Kodeksi'nde 1.2 g/L asetik asit olarak belirlenmiştir. Şaraplarımız için en yüksek uçar asit değeri 0.52 g/L olup, ticari *S. cerevisiae* (LAFFORT) ile yapılan şaraba aittir ve diğer şaraplar için 0.37 ile 0.41 g/L arasındadır. Bu değerler, standartlarda belirtilen maksimum uçar asitlik sınırından daha düşük olduğu için kabul edilebilir sınır içindedirler. Ayrıca, 0.90 g/L eşiğinin altında olduklarından, şaraplar acı ve ekşi son tatlara sahip değildir. Şarapların pH değeri, üzümün türü, hasattaki olgunluk derecesi, mevsim, olgunlaşma sırasında toprağın nem içeriği ve mineral bileşimi gibi birçok faktöre bağlıdır. İstenilen pH değeri kırmızı şaraplar için 3.0-3.3 aralığında bulunmaktadır. Bununla birlikte, aşırı olgunlaşmış üzümler, serin havadan dolayı uzun süren büyüme dönemleri ve erken yağış görülmemesi gibi çeşitli etkenler şarapların pH değerinin 3.5-4.0 aralığında olmasına neden olmaktadır (Boulton vd., 1999). Laffort mayası kullanılan LT-Laffort SC ve Laffort SC şarapları en yüksek pH değerlerine sahip iken diğer şarapların pH değerinin 3.60-3.71 aralığında olduğu görülmektedir.

Tablo 4.37. Şarap standartları

	Avrupa Standartı ⁽¹⁾	Türk Gıda Kodeksi ⁽²⁾	US Standartı ⁽³⁾
Alkol	%15 (v/v) 'den az	%9<ve <%15 (v/v)	%14 (v/vs) 'den az
Kükürt dioksit	Kırmızı Şarap: 150 mg/L Beyaz Şarap: 200 mg/L	Kırmızı Şarap: 150 mg/L Beyaz Şarap: 200 mg/L	Maksimum miktar 350 ppm (parts per million)
Uçar Asit	Kırmızı Şarap: 20 mEq/L 'den az (=1.20 g/L asetik asit) Beyaz Şarap: 18 mEq/L 'den az (=1.08 g/L asetik asit) Maksimum miktar 3 g/L	Kırmızı Şarap: 20 mEq/L 'den az (=1.20 g/L asetik asit) Beyaz Şarap: 18 mEq/L 'den az (=1.08 g/L asetik asit) Maksimum miktar 2 g/L	Kırmızı Şarap: 23.31 mEq/L 'den az (=1.40 g/L asetik asit) Beyaz Şarap: 19.98 mEq/L 'den az (=1.20 g/L asetik asit) Maksimum miktar 3.92 g/L
Karbon dioksit Asitlik	En az 3 g/L, tartarik asit cinsinden	En az 3,5 g/L, tartarik asit cinsinden	En az 3 g/L, tartarik asit cinsinden

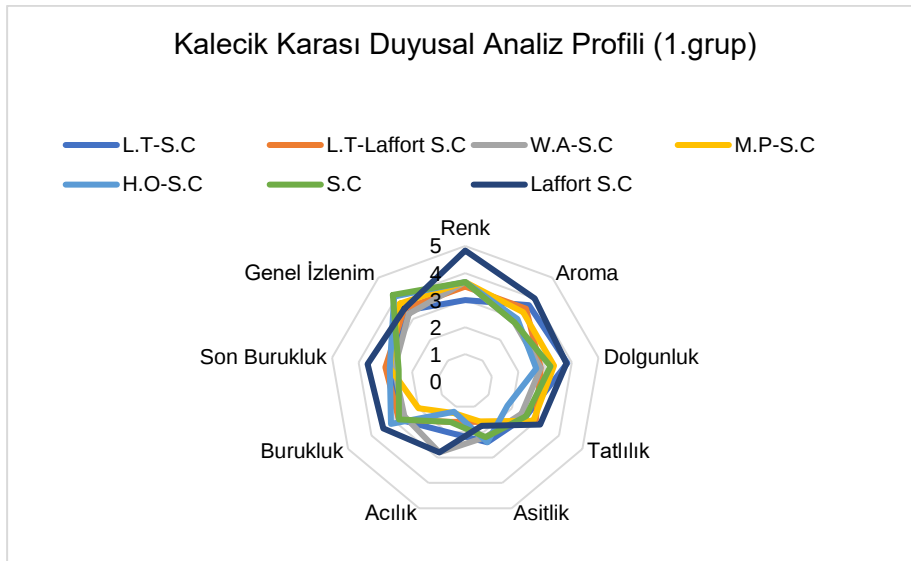
1, EU Commission; 2, Türk Gıda Kodeksi Şarap Tebliği (2009, 2013); 3, CFR, Electronic Code of Federal Regulations

4.8.3. Üretilen Şaraplarda Duyusal Analizler

Şarapların duyusal analizi tecrübeli degüstatörlerden oluşan altı kişilik (1. grup) ve beş kişilik (2. grup) iki grup tarafından gerçekleştirilmiştir. Duyusal analiz, renk, aroma, dolgunluk, tatlılık, asitlik, acılık, burukluk, son burukluk ve genel izlenim olmak üzere 9 farklı kritere dayanmaktadır. Degüstatörler şarap örneklerini bu kriterlere göre 0 (zayıf) ila 5 (güçlü) arasında değerlendirmiştir. Test edilen şarapların duyusal analiz profilleri, Excel Office 365 tarafından radar grafiklerinde oluşturulmuştur. Büyük ölçekli şaraplardan alınan örnekler de

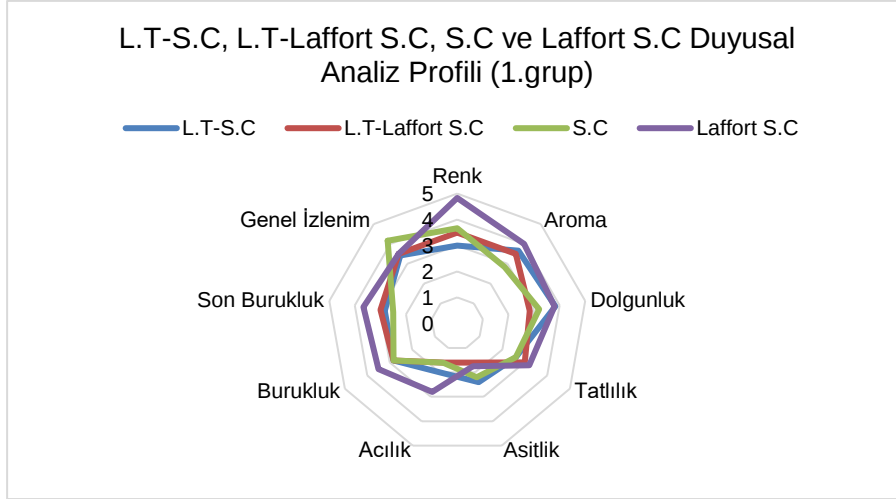
kontrol amaçlı analizlerde duyu analize tabi tutulmuştur. Ancak, koşullar aynı olmadığı için radar grafiklere dahil edilmemiştir.

Şekil 4.43'te 1. grup ile gerçekleştirilen duyu analizin sonuçları radar grafikte gösterilmiştir. Bu grafikte ticari maya (LAFFORT) kullanılarak yapılan Laffort S.C şarabının renk, aroma, burukluk ve son burukluk kriterlerinde diğer şaraplara göre daha iyi olarak değerlendirildiği görülmektedir. *L. thermotolerans* (O9) ve *S. cerevisiae* (K71) suşları kullanılarak yapılan L.T-S.C şarabı ve ticari (LAFFORT) maya kullanılarak yapılan Laffort S.C şarabının dolgunluğu diğerlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, Laffort S.C şarabının tatlılığı diğerlerinden daha yüksek olarak değerlendirilmiştir. *W. anomalus* (K41) ve *S. cerevisiae* (K71) suşlarıyla yapılan W.A-S.C şarabının ve Laffort S.C şarabının acılığı daha yüksek bulunmuştur. *H. opuntiae* (K2) ve *S. cerevisiae* (K71) suşları kullanılarak yapılan H.O-S.C şarabı ve L.T-S.C şarabının asiditesi diğerlerine kıyasla daha yüksek olarak değerlendirilmiştir. Bu farklılıklara rağmen, *S. cerevisiae* (K71) suşuyla yapılan S.C şarabının genel izlenim skoru diğerlerinden daha yüksektir.



Şekil 4.43. Kalecik Karası şarapları duyu analizi profili (1. grup)

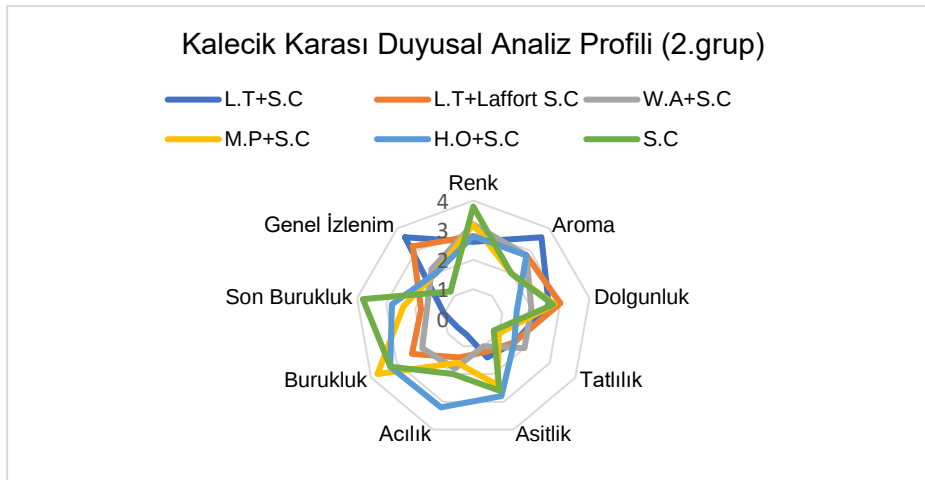
Şekil 4.44'te öne çıkan şaraplar daha belirgin olarak detaylandırılmıştır. Laffort S.C şarabının tatlılığı daha fazla bulunurken, L.T-S.C şarabının asitliği daha yüksek olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, burukluk açısından Laffort S.C şarabı daha buruk bulunmuş ve son burukluğu da daha yüksek olarak değerlendirilmiştir. *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* suşlarıyla yapılan L.T-S.C şarabı ve Laffort S.C şarabı, aroma ve dolgunluk kriterlerine göre daha çok beğeni almıştır (Şekil 4.44). Öte yandan, Laffort S.C şarabı renk kriterinde, *S. cerevisiae* suşuyla yapılan S.C şarabı ise genel izlenim kriterinde daha yüksek puanlar almıştır (Şekil 4.44).



Şekil 4.44. L.T-S.C, L.T-Laffort S.C ve S.C şaraplarının duyusal analizi (1. grup)

Ticari (LAFFORT) maya ile yapılan Laffort S.C şarabı, renk, aroma, dolgunluk, burukluk ve son burukluk kriterlerinde daha iyi bulunmuştur. S.C şarabının acılığı, Laffort S.C şarabından daha düşük bulunmuştur. Birçok kriterle göre, ticari maya (LAFFORT) ile yapılan Laffort S.C şarabının skoru, *S. cerevisiae* suşuyla yapılan S.C şarabından yüksek olmasına rağmen S.C şarabının genel izlenim skoru diğerlerinden daha yüksektir (Şekil 4.44).

Şekil 4.45'te 2. grup ile gerçekleştirilen duyusal analizin sonuçları radar grafikte gösterilmiştir. Analiz Kavaklıdere Şarap fabrikalarının beş uzman degüstatörü tarafından gerçekleştirilmiştir. Radar grafiği her bir kategori için beş kişinin ortalaması baz alınarak ve büyük ölçekli şarap hariç tutularak oluşturulmuştur. Ayrıca ticari maya (LAFFORT) kullanılarak yapılan Laffort S.C şarabı tortulu olduğu belirtilerek değerlendirilmeye alınmamıştır. Grafikte *S. cerevisiae* suşuyla yaptığımız S.C şarabının, renk ve son burukluk açısından daha arzu edilir özellikler gösterdiği görülmektedir. Ayrıca, *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* suşlarıyla yapılan L.T-S.C şarabının, aroma ve genel izlenime göre diğerlerine göre daha iyi bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.45. Kalecik Karası şarapları duyusal analiz profili (2.grup)

L. thermotolerans suşu ve ticari maya (LAFFORT) kullanılarak yapılan L.T-Laffort SC şarabı dolgunluk kriterinde diğerlerinden daha iyi olarak değerlendirilmiştir. *W. anomalus* ve *S. cerevisiae* suşlarıyla yapılan W.A-S.C şarabının tatlılığı diğerlerinden daha yüksek bulunurken, *H. opuntiae* ve *S. cerevisiae* suşları kullanılarak yapılan H.O-S.C şarabının acılığı ve asitliği diğerlerinden daha yüksek olarak değerlendirilmiştir. Ek olarak, *M. pulcherrima* (D3) ve *S. cerevisiae* (K71) suşları kullanılarak yapılan M.P-S.C şarabının burukluğu diğer şaraplardan daha yüksek bulunmuştur.

Büyük ölçek şarap (üretim koşullarının aynı olmaması sebebiyle büyük ölçek duyu analizi sonuçları grafiklere dahil edilmemiştir), 2. grup değerlendirmelerde diğer şaraplara kıyasla daha ön plana çıkmıştır. Bununla beraber, büyük ölçekli kontrol şarap ve L.T-S.C suşları ile yapılan şarap, genel izlenimde, yakın seyretilmişlerdir. Ayrıca aroma kriterinde büyük ölçeğin hemen arkasından gelmiştir. Geliştirilen L.T-S.C suşların, büyük ölçekli üretimde daha başarılı sonuçlar vereceği düşünülmektedir. Büyük ölçekli üretimlerde küçük hacimli üretimlere göre daha kontrollü üretim sağlanabilmektedir (Jolly vd., 2014).

İki grubun duyu analizi sonuçları kıyaslandığında çeşitli farklılıklar olduğu görülmektedir. 1. grubun duyu analizi sonuçlarıyla oluşturulan radar grafiğinde (Şekil 4.43), ticari maya (LAFFORT) kullanılarak yapılan Laffort S.C şarabının renk, aroma, burukluk ve son burukluk açısından daha arzu edilir özellikler taşıdığı görülmektedir. 2. grubun sonuçlarını gösteren Şekil 4.45'deki radar grafiği, *S. cerevisiae* suşuyla yapılan S.C şarabının renk ve son burukluk kategorilerinde, *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* suşlarıyla yapılan L.T-S.C şarabının aroma kategorisinde ve *M. pulcherrima* ve *S. cerevisiae* suşlarıyla yapılan M.P-S.C şarabının burukluk kategorisinde diğerlerine göre daha öne çıktığını göstermektedir. Buna ek olarak, 1.grup genel izlenime göre *S. cerevisiae* suşumuzla yapılan S.C şarabı diğer tüm şaraplara göre en iyi olarak değerlendirilirken, 2. grup izole edilen suşlarımız ile yapılan şaraplar arasında *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* suşlarıyla yapılan L.T-S.C şarabını en iyi olarak değerlendirmektedir. L.T-S.C ile yapılan şarap aromada da en yüksek puanı almıştır. *M. pulcherrima* ve *S. cerevisiae* suşlarıyla yapılan M.P-S.C şarabının burukluğu diğerlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Şarapların tatlılık skoru arasında önemli bir fark yoktur. Asitliği en yüksek bulunan şarap ise *H. opuntiae* ve *S. cerevisiae* suşları kullanılarak yapılan H.O-S.C şarabı olmuştur. Genel izlenime göre ise *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* suşlarıyla yapılan L.T-S.C şarabı (büyük ölçek şaraba da en yakın olarak) en iyi olarak değerlendirilmiştir. Bu durum, potansiyel starter olarak SC (K71) suşunun L.T ile birlikte, ticari olarak kullanılabileceğini ve teknolojik kalitesi yüksek şarap üretilmek için denemeye değer olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

4.8.4. Üretilen Şaraplarda Aroma Bileşenleri

Tablo 4.38'de aroma bileşenlerinin koku eşik değeri ve koku tanımları verilmiştir. Sonuçlar bu değeri göz önünde bulundurularak yorumlanmıştır.

Tablo 4.38. Aroma bileşenleri koku eşik değeri ve koku tanımları

Aroma Bileşeni	Koku Eşik (µg/L)	Koku Tanımı
Alkoller		
1-Propanol	306000 ⁽⁵⁾	Alkol, olgun meyvemsi ⁽⁵⁾
İzobütil Alkol	40000 ⁽²⁾	Alkol, şarap, tırnak cilası ⁽²⁾
1-Bütanol	150000 ⁽²⁾	İlaç/kimyasal, alkol ⁽²⁾
İzoamil alkol	60000 ⁽²⁾	Viski, tırnak cilası ⁽²⁾
3-Etoksi-1-propanol	200 ⁽⁵⁾	Meyvemsi ⁽⁵⁾
Metionol	500 ⁽⁴⁾	Pişmiş sebze ⁽⁴⁾
Benzil Alkol	200000 ⁽⁵⁾	Tatlı, meyvemsi ⁽⁵⁾
Feniletil Alkol	10000 ⁽²⁾	Gül, polen, parfüm ⁽²⁾
1-Pentanol	64000 ⁽⁵⁾	Badem, sentetik, balzamik ⁽⁵⁾
2,3 Bütandiol	150000 ⁽⁵⁾	Meyvemsi ⁽⁵⁾
1-Heptanol	1000 ⁽²⁾	Otsu, tatlı ⁽²⁾
(E)-3-Hexen-1-ol	400 ⁽⁷⁾	Çim ⁽⁶⁾
3-Penten-2-ol	Bulunamadı	Bulunamadı
Esterler		
Etil laktat	150000 ⁽⁴⁾	Asit, ilaç/kimyasal, çilek ⁽⁴⁾
Etil oktanoat	5 ⁽²⁾	Meyvemsi, ananas, armut, çiçek ⁽²⁾
Etil-3-hidroksibütirat	20000 ⁽⁴⁾	Yeşil üzüm, marshmallow ⁽⁴⁾
Dietil suksinat	6000 ⁽²⁾	Hafif meyvemsi, şarap ⁽²⁾
Etil-4-hidroksibutanoat	Bulunamadı	Bulunamadı
Monoetil suksinat	Bulunamadı	Bulunamadı
Etil hekzanoat	5 ⁽²⁾	Çiçeksi, meyvemsi ⁽²⁾
Asetatlar		
İsoamil asetat	30 ⁽²⁾	Muz, meyvemsi, tatlı ⁽²⁾
Feniletil asetat	250 ⁽²⁾	Hoş, çiçeksi ⁽²⁾
Aldehydes		
Nonanal	2.8 ⁽³⁾	Narenciye, çiçeksi ⁽³⁾
Keton		
2,3-Bütandion	100 ⁽¹⁾	Krema, tatlı ⁽¹⁾
Asitler		
Bütanoik asit	10000 ⁽⁵⁾	Ekşimiş, tatlı ⁽⁵⁾
Hekzanoik asit	3000 ⁽²⁾	Peynir, yağlı ⁽²⁾
Oktanoik asit	1000 ⁽²⁾	Peynir, yağ asidi, ekşimiş, ağır ⁽²⁾

Tablo 4.38.'nin devamı

Aroma Bileşeni	Koku Eşiği (µg/L)	Koku Tanımı
Propanoik asit	8100 ⁽⁴⁾	Peynir ⁽⁴⁾
Nonanoik asit	3000 ⁽⁵⁾	Yağlı
İzovalerik asit	33.4 ⁽¹⁾	Baharat, peynir ⁽¹⁾
Asetik asit	200000 ⁽⁵⁾	Keskin, sirke ⁽⁵⁾
İzobütirik asit	2300 ⁽²⁾	Peynir, yağlı, ekşimiş ⁽²⁾
Heptanoik asit	Bulunamadı	Tatlı, peynir ⁽⁵⁾
Laktonlar		
γ-Bütürolakton	35000 ⁽⁸⁾	Tatlı, yağlı ⁽³⁾
Pantolakton	1600 ⁽³⁾	Karamel ⁽³⁾
Fenoller		
2-Metoksi-4-vinilfenol	380 ⁽³⁾	Karabiber, baharat, karanfil ⁽³⁾
C6 Bileşikler		
2-Hexanol	Bulunamadı	Bulunamadı
1-Hexanol	8000 ⁽⁷⁾	Otsu, yağlı, reçineli, çiçeksi, yeşil, kesilmiş çimen ⁽⁴⁾
Diğer Bileşenler		
Gayakol	75 ⁽³⁾	Dumansı, yanık, tatlı ⁽³⁾
Asetoin	150000 ⁽⁵⁾	Yağlı, krema ⁽⁵⁾
Siringol	Bulunamadı	Bulunamadı
Dietil dl-malat	760000 ⁽⁵⁾	Aşırı olgunlaşmış, şeftali, çimen ⁽⁵⁾

1, Gómez-Míguez vd., 2007; 2, Wang vd., 2017; 3, Rocha vd., 2004; 4, Arcari vd., 2017; 5, Welke vd., 2014; 6, Tang vd., 2019; 7, Tao vd., 2010; 8, Escudero vd., 2007.

GC-MS sonuçlarına göre L.T-S.C, W.A-S.C, H.O-S.C ve büyük ölçekli şaraplarda toplam 40 aroma bileşeni belirlenirken L.T-Laffort S.C, M.P-S.C ve Laffort S.C şaraplarında 41 ve S.C şarabında toplam 42 aroma bileşeni tespit edilmiştir (Tablo 4.39). Bu bileşenleri alkoller, esterler, asetatlar, aldehitler, ketonlar, asitler, fenoller, C6 bileşikler ve gayakol, asetoin ve siringol gibi diğer bileşen oluşturmaktadır. Aroma bileşenlerinin toplam konsantrasyonu L.T-S.C için 220.80 mg/L, L.T-Laffort S.C için 130.60 mg/L, W.A-S.C için 139.38 mg/L, M.P-S.C için 194.09 mg/L, H.O-S.C için 148.61 mg/L, S.C için 164.52 mg/L, Laffort S.C için 139.96 mg/L ve büyük ölçek için 222.99 mg/L olarak bulunmuştur.

Bütün şaraplar için alkol ve ester bileşenlerinin konsantrasyonu diğer bileşenlere oranla daha fazladır. Yüksek alkoller, şeker metabolizmasının ara ürünü olarak, anabolik reaksiyonlar sonucunda veya amino asitlerden Ehrlich reaksiyonu ile üretilmektedir (Molina vd., 2007). Yüksek alkol konsantrasyonu 300 mg/L'den düşük ise yüksek alkol bileşenleri şarabın arzu edilen aromaya sahip olmasına katkıda bulunurlar. Fakat konsantrasyon 400 mg/L'yi aştığında yüksek alkoller aromaya negatif yönde etki ederler (Çelik vd., 2017). Toplam alkol miktarı L.T-S.C için 178.17 mg/L, L.T-Laffort S.C için 109.08 mg/L, W.A-S.C için 117.78 mg/L, M.P-S.C için 163.63 mg/L, H.O-S.C için 122.17 mg/L, S.C için 126.85 mg/L, Laffort S.C için 106.03 mg/L

ve büyük ölçek için 183.52 mg/L olarak bulunmuştur. Toplam alkol miktarı en yüksek olan şarap ticari maya (LAFFORT) kullanılarak yapılan büyük ölçekli şaraba aittir. Alkol bileşenleri içinden izobütil alkol, izoamil alkol, feniletil alkol ve 2,3-butanediol en yüksek miktara sahiptir. Bütün şaraplar için izoamil alkolün OAV (odour activity value) değeri 1'den büyüktür ve bu bileşen viski aroması vermektedir (Wang vd., 2017). Meyve aroması veren 3-Etoksi-1-propanol bileşeni L.T-S.C ve M.P-S.C şaraplarında daha yüksektir ve diğer şarapların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında önemli ölçüde farklı olduğu görülmüştür. Pişmiş sebze aroması veren metionol bileşeni (Arcari vd., 2017) miktarının Laffort S.C ve büyük ölçekli şarapta eşik değerinden fazla olduğu görülmüştür (OAV>1). Gül aroması veren feniletil alkol bileşeni (Wang vd., 2017) büyük ölçekli şarapta en yüksek miktarda bulunmuştur ve bu sonuç diğerlerine göre önemli ölçüde farklıdır. Bununla birlikte, L.T-Laffort ve Laffort S.C şarabında feniletil alkol bileşeni istatistiksel açıdan önemli sayılabilecek ölçüde az miktardadır.

Tablo 4.39: Kalecik Karası şaraplarında aroma bileşenleri (µg/L) analizi (GC-MS) sonuçları

	LRI	L.T-S.C	L.T-LAFFORT SC	W.A-S.C	M.P-S.C	H.O-S.C	S.C	LAFFORT S.C	Büyük ölçek
Alkoller									
1-Propanol	1031	5009.67±78.28 ^{AB}	4432.28±6.58 ^{BC}	3698.92±323.06 ^{CD}	5699.71±490.82 ^A	3228.35±93.77 ^{DE}	2130.58±20.10 ^F	3936.96±333.74 ^{CD}	2877.70±279.96 ^E
İzobütıl Alkol	1098	12294.49±1090.15 ^A	7641.89±58.26 ^C	7572.80±301.90 ^{CD}	11982.30±585.01 ^A	7763.52±35.70 ^C	7814.82±188.11 ^C	6209.69±572.47 ^D	9566.70±50.42 ^B
1-Bütanol	1151	370.92±24.42 ^A	213.54±13.36 ^C	222.05±5.74 ^{BC}	373.77±21.08 ^A	185.10±11.89 ^{CD}	156.92±3.01 ^D	335.83±23.25 ^A	263.62±13.58 ^B
İzoamil Alkol	1236	137484.29±1300.00 ^A	81466.08±573.99 ^B	89834.49±4273.67 ^B	123212.00±10072.80 ^A	92641.06±943.12 ^B	97752.90±2906.98 ^B	81802.48±2731.32 ^B	138465.85±2559.95 ^A
3-Etoksi-1-propanol	1389	353.90±34.31 ^A	229.54±10.67 ^{CD}	244.69±12.72 ^C	298.83±16.75 ^B	228.99±1.82 ^{CD}	186.00±9.05 ^{DE}	244.45±16.8 ^C	175.15±7.57 ^E
Metionol	1721	345.77±33.66 ^C	141.86±8.55 ^F	277.78±5.51 ^{DE}	314.24±26.20 ^{CD}	222.74±3.56 ^E	269.63±7.79 ^{DE}	597.54±47.08 ^A	461.36±7.39 ^B
Benzil Alkol	1853	259.06±13.85 ^{AB}	158.54±2.46 ^D	204.72±7.53 ^C	208.77±8.67 ^C	254.61±1.88 ^{AB}	238.18±0.56 ^B	278.30±18.11 ^A	203.27±9.33 ^C
Feniletil Alkol	1916	14640.96±959.43 ^B	9005.38±127.12 ^E	11333.99±551.85 ^D	14553.40±1057.07 ^B	12567.99±82.79 ^{CD}	13749.40±278.82 ^{BC}	6910.12±548.40 ^F	25215.71±42.83 ^A
1-Pentanol	1262	73.77±4.20 ^{AB}	74.48±7.36 ^A	58.79±2.88 ^C	74.56±5.68 ^A	61.99±4.27 ^{BC}	60.00±3.56 ^{CD}	53.25±2.66 ^{CD}	44.92±0.45 ^D
2,3 Bütandiol	1517	7118.75±641.78 ^A	5573.90±50.01 ^{CD}	4150.14±219.89 ^E	6670.09±168.49 ^{AB}	4879.57±99.57 ^{DE}	4365.95±123.88 ^E	5467.19±379.90 ^{CD}	6095.24±25.37 ^{BC}
1-Heptanol	1421	45.06±1.23 ^A	25.88±1.93 ^C	33.95±1.57 ^B	47.41±3.83 ^A	27.23±1.19 ^C	27.53±0.59 ^C	38.05±3.43 ^B	23.16±1.85 ^C
(E)-3-Hexen-1-ol	1384	40.63±1.20 ^B	36.12±2.62 ^B	27.00±0.84 ^C	40.67±3.59 ^B	16.88±1.50 ^E	18.58±0.30 ^{DE}	78.13±1.12 ^A	22.76±0.58 ^{CD}
3-Penten-2-ol	1160	129.06±12.40 ^B	78.55±4.44 ^D	116.19±0.61 ^B	152.93±13.79 ^A	91.13±4.26 ^{CD}	82.70±1.29 ^D	79.37±5.70 ^D	107.00±10.55 ^{BC}
Toplam		178166.3	109078	117775.5	163628.7	122169.2	126853.2	106031.4	183522.4
Esterler									
Etil laktat	1363	13333.15±999.26 ^A	5574.21±0.86 ^E	823.22±464.63 ^C	6858.18±368.74 ^D	7653.74±94.56 ^{CD}	10540.00±273.03 ^B	7577.71±349.23 ^{CD}	10286.18±274.24 ^B
Etil oktanoat	1412	250.97±1.35 ^B	167.93±7.70 ^C	194.90±9.45 ^C	280.51±24.40 ^{AB}	177.68±0.91 ^C	299.90±3.83 ^A	196.44±0.80 ^C	247.28±20.85 ^B
Etil-3-hidroksibütirat	1472	617.26±40.99 ^A	388.93±29.94 ^E	425.27±29.32 ^{DE}	471.25±1.83 ^{CD}	422.35±1.36 ^{DE}	516.02±26.42 ^{BC}	564.90±50.74 ^{AB}	360.90±2.00 ^E
Dietil suksinat	1701	4387.67±287.06 ^A	141.85±8.55 ^D	2197.26±108.80 ^C	2424.54±161.04 ^C	2168.59±16.74 ^C	3286.93±83.98 ^B	1768.45±73.72 ^D	1795.21±38.14 ^D
Etil-4-hidroksibutanoat	1819	1665.43±57.72 ^B	1377.99±21.12 ^{CD}	1346.73±121.88 ^{CDE}	1291.80±82.44 ^{DE}	1283.69±14.42 ^{DE}	1194.38±71.80 ^E	1510.39±5.05 ^{BC}	2662.05±8.39 ^A
Monoetil suksinat	2350	4021.55±363.53 ^B	1521.25±82.29 ^D	2434.73±159.76 ^C	2669.62±203.52 ^C	2394.36±77.93 ^C	4978.08±135.86 ^A	2864.48±126.90 ^C	1700.70±103.88 ^D
Etil hekzanoat	1241	360.39±14.78 ^B	251.91±20.61 ^E	241.14±7.99 ^E	425.46±12.04 ^A	238.10±4.57 ^E	323.22±0.68 ^C	251.07±7.25 ^E	290.30±10.22 ^D
Toplam		24636.42	9424.07	7663.25	14421.36	14338.51	21138.53	14733.44	17342.62
Asetatlar									
İsoamil asetat	1132	1365.88±117.87 ^C	808.12±16.70 ^C	847.38±43.04 ^C	2077.11±134.56 ^B	817.10±20.01 ^C	1349.30±15.09 ^C	2266.36±151.44 ^A	2344.87±48.23 ^B
Feniletil asetat	1827	113.95±10.55 ^B	70.28±1.44 ^B	101.62±3.17 ^B	156.78±7.58 ^B	84.43±3.35 ^B	133.27±2.63 ^B	4665.57±193.72 ^A	249.60±4.62 ^B
Toplam		1479.83	878.4	949	2233.89	901.53	1482.57	6931.93	2594.47
Aldehitler									
Nonanal	1658	70.71±3.55 ^A	22.52±0.41 ^D	38.65±2.78 ^C	49.15±2.86 ^B	41.12±1.79 ^C	66.76±4.03 ^A	23.37±1.02 ^D	26.50 ±0.39 ^D

Tablo 4.39.'nin devamı

Keton									
2,3-Bütandion	984	1447.80±119.22 ^A	751.98±42.17 ^D	937.30±51.33 ^{BC}	1465±74.99 ^A	873.978±19.73 ^{BCD}	1014.31±23.75 ^B	818.70±35.16 ^{CD}	985.44±46.35 ^{BC}
Asitler									
Bütanoik asit	1604	Nd	171.97±13.85 ^A	Nd	Nd	Nd	75.01±6.34 ^B	Nd	Nd
Hekzanoik asit	1832	1888.27±108.11 ^{BC}	1159.05±56.33 ^E	1567.87±43.76 ^D	2096.83±173.82 ^{AB}	1452.54±5.22 ^D	2245.28±14.21 ^A	1446.56±27.88 ^D	1633.19± 37.94 ^{CD}
Oktanoik asit	2106	1733.05±27.44 ^B	1619.92±3.74 ^B	1742.88±151.11 ^B	2204.52±182.84 ^A	1510.44±29.83 ^B	2579.14±236.35 ^A	1490.84±113.10 ^B	1728.56±119.96 ^B
Dekanoik asit	2231	166.85±1.98 ^C	164.43±13.00 ^C	355.49±14.75 ^A	331.31±21.87 ^A	229.19±2.19 ^B	360.26±18.87 ^A	130.06±2.13 ^C	1728.55±12.18 ^B
Propanoik asit	1508	140.13±11.11 ^A	90.32±4.08 ^D	121.75±1.25 ^{ABC}	138.85±8.18 ^{AB}	99.22±2.61 ^{CD}	106.84±8.51 ^{CD}	143.27±14.32 ^A	116.32±4.23 ^{BC}
Nonanoik asit	2157	366.26±28.90 ^D	1008.80±39.27 ^B	1308.40±59.41 ^A	704.55±27.79 ^C	249.78±11.91 ^E	677.12±36.16 ^C	298.86±5.86 ^{DE}	300.46±5.65 ^{DE}
İzovalerik asit	2717	228.06±15.06 ^C	136.67±11.89 ^E	176.30±5.12 ^D	229.06±0.31 ^C	176.18±8.89 ^D	206.90±1.17 ^C	270.62±8.70 ^B	388.10±10.56 ^A
Asetik asit	1403	4286.47±427.67 ^A	2508.60±16.69 ^{BC}	2170.41±83.39 ^C	2873.72±184.58 ^B	2227.14±37.36 ^C	2935.98±34.25 ^B	2479.89±207.94 ^{BC}	4136.34±239.20 ^A
İzobütirik asit	1579	377.05±34.99 ^{AB}	271.24±7.43 ^C	266.95±2.05 ^C	359.55±29.82 ^{AB}	266.10±10.72 ^C	301.03±29.70 ^C	319.67±14.67 ^{BC}	385.39±12.28 ^A
Heptanoik asit	1934	Nd	Nd	Nd	77.06±2.07 ^A	Nd	60.76±5.96 ^B	26.72±1.71 ^C	Nd
Toplam		9186.14	7131	7710.05	9015.45	6210.59	9548.32	6606.49	10416.91
Laktonlar									
γ-Bütirolakton	1592	2736.66±198.91 ^A	1266.49±24.67 ^D	1835.79±108.08 ^C	339.38±21.98 ^C	1866.20±18.75 ^C	2332.62±54.64 ^B	1232.35±112.89 ^D	1943.12±64.36 ^C
Pantolakton	2034	115.91±3.41 ^B	86.11±2.28 ^{CD}	87.43±2.08 ^{CD}	50.40±0.91 ^{DE}	79.37±1.78 ^{DE}	101.14±9.15 ^{BC}	59.44±0.20 ^E	178.07±17.57 ^A
Toplam		2852.57	1352.6	1923.22	389.78	1945.57	2433.76	1291.79	2121.19
Fenoller									
2-Metoksi-4-vinilfenol	2168	168.60±3.51 ^C	108.14±8.76 ^D	132.58±10.95 ^{CD}	433.77±39.32 ^A	158.98±0.14 ^C	22.20±1.02 ^B	155.29±2.09 ^{CD}	136.29±7.20 ^{CD}
C6 bileşikler									
2-Hexanol	1313	69.65 ±3.21 ^A	56.64±3.06 ^B	51.75±4.63 ^B	74.78±1.85 ^A	77.42±1.57 ^A	72.23±1.29 ^A	37.54±0.64 ^C	72.77±6.54 ^A
1-Hexanol	1372	508.96±35.50 ^A	363.66±13.17 ^{BCD}	294.82±25.95 ^D	406.32±27.32 ^{BC}	347.69±20.03 ^{CD}	402.26±7.47 ^{BC}	513.57±41.45 ^A	435.77±15.61 ^B
Toplam		578.61	420.3	346.57	481.1	425.11	474.49	551.11	508.54
Diğer Bileşenler									
Gayakol	1840	147.02±9.36 ^B	95.59±0.64 ^{CD}	100.97±5.81 ^{CD}	147.66±7.52 ^B	85.78±2.08 ^D	109.48±2.25 ^C	170.86±15.35 ^A	95.06±3.15 ^{CD}
Asetoin	1291	1880.80±146.31 ^C	1328.24±85.74 ^D	1669.55±117.00 ^C	1795.42±115.91 ^C	1244.38±73.57 ^D	1140.81±19.63 ^D	2672.80±155.64 ^B	5170.01±167.02 ^A
Siringol	2854	453.20±36.61 ^A	217.37±7.32 ^C	298.89 ±21.33 ^B	364.97±32.90 ^B	364.76±23.84 ^B	478.80±26.62 ^A	185.29±2.94 ^C	300.96±20.74 ^B
Dietil dl-malat	2041	95.38±7.31 ^A	46.30±1.49 ^D	76.63±0.96 ^{BC}	91.25±8.03 ^{AB}	87.98±3.75 ^{AB}	84.84±8.26 ^{AB}	35.67±1.90 ^D	64.08±4.62 ^C
Toplam		2576.4	1687.5	2146.04	2399.3	1782.9	1813.93	3064.62	5630.11
TOPLAM		220803	130602.6	139381	194092	148609.3	164524.8	139957	222994.2

*S.C, *Saccharomyces cerevisiae* K71 (KA 32NM S2); L.T, *Lachancea thermotolerans* O9 (ÖB 4CM NS4); W.A, *Wickerhamomyces anomalus* K41 (KA 0CM S1); M.P, *Metschnikowia pulcherrima* D3 (DA 0CM NS3); H.O, *Hanseniaspora opuntiae* K2 (KA 0CM NS2); Laffort S.C (RB2). LRI: Lineer Alıkona İndeksi. ^{A,B,C,D,E,F}: p<0.05 önem düzeyinde önemli. Nd:bulunamadı

Esterler fermentasyon sırasında oluşan bileşenlerdir ve genç şarapların bir özelliği olarak kabul edilir (Rocha, 2004). Toplam ester miktarı L.T-S.C için 24.64 mg/L, L.T-Laffort S.C için 9.42 mg/L, W.A-S.C için 7.66 mg/L, M.P-S.C için 14.42 mg/L, H.O-S.C için 14.34 mg/L, S.C için 21.14 mg/L, Laffort S.C için 14.73 mg/L ve büyük ölçek için 17.34 mg/L olarak bulunmuştur. En yüksek ester bileşenine sahip olan şarabın *L. thermotolerans* suşuyla yapılan L.T-S.C şarabı olduğu görülmektedir. Şaraplara meyvemsi, ananas, armut ve çiçeksi aromalar veren etil oktanoat bileşeninin ve meyvemsi, çiçeksi aroma veren etil hekzanoat bileşeninin (Wang vd., 2017) bütün şaraplar için OAV değeri 1'in üzerindedir. Etil-4-hidroksibutanoat ve monoetil suksinat şaraplarda yüksek miktarda olmasına rağmen koku eşiği literatürde bulunamadığından OAV değeri hesaplanamamıştır.

Toplam asetat miktarı L.T-S.C için 1.48 mg/L, L.T-Laffort S.C için 0.88 mg/L, W.A-S.C için 0.95 mg/L, M.P-S.C için 2.23 mg/L, H.O-S.C için 0.90 mg/L, S.C için 1.48 mg/L, Laffort S.C için 6.93 mg/L ve büyük ölçek için 2.59 mg/L olarak bulunmuştur. İsoamil asetat bileşeni şaraplarda muz, meyvemsi ve tatlı aromaları vermektedir (Wang vd., 2017) ve bu bileşenin OAV değeri bütün şaraplar için 1'den büyüktür. Feniletil asetat bileşeni ise şarabın hoş ve çiçeksi aromasını oluşturmaktadır (Wang vd., 2017) ve Laffort S.C şarabında yüksek miktarda bulunmuştur. Laffort S.C şarabının sonucu diğer şaraplara göre istatistiksel açıdan önemli ölçüde farklıdır.

Aldehitler grubundan nonanal bileşeni şaraba narenciye ve çiçeksi aromalar vermektedir (Rocha vd., 2004) ve OAV değeri bütün şaraplar için 1'den büyüktür. Bununla birlikte bu bileşenin konsantrasyonu *L. thermotolerans* suşuyla yapılan L.T-S.C şarabında ve *S. cerevisiae* suşu kullanılan S.C şarabında en yüksektir ve istatistiksel açıdan diğerlerine göre önemli ölçüde farklıdır.

Keton grubuna ait 2,3-Bütandion (diasetil) bileşeninin konsantrasyonun yüksek olması (5-7 mg/L'yi aşan) istenmeyen bir durum iken, 1-4 mg/L aralığında şarapta arzu edilen bir tereyağ veya krema aroması vermektedir (Bartowsky, 2004). 2,3-Bütandion miktarı L.T-S.C için 1.45 mg/L, L.T-Laffort S.C için 0.75 mg/L, W.A-S.C için 0.94 mg/L, M.P-S.C için 1.47 mg/L, H.O-S.C için 0.87 mg/L, S.C için 1.01 mg/L, Laffort S.C için 0.82 mg/L ve büyük ölçek için 0.99 mg/L olarak belirlenmiştir. Bütün şaraplarda bu aroma bileşeninin miktarı eşik değerinin üzerindedir (OAV>1) ve şaraplardaki tereyağ, krema aromasını oluşturur (Gomez-Míguez vd., 2007).

Fermentasyon sırasında enzimatik olarak oluşan yağ asitleri, aroma bileşiklerinin önemli bir grubunu oluşturmaktadır ve şaraba meyvemsi, yağlı, ekşimiş ve ağır aromalar ve peynir aroması vermektedir. Yağ asitlerinin miktarı koku eşiğinin altındaysa, şarabın aroma profiline katkı sağlayabilirken bu eşiğin üzerinde şarabın aromasında olumsuz etkilere neden olur (Liu vd., 2019). Bütün şaraplar için peynir aroması veren oktanoik asit (Wang vd., 2017) ve baharat

aroması veren izovalerik asit (Gómez-Míguez vd., 2007) miktarı koku eşiğinden fazla bulunmuştur (OAV >1).

Fenollerden 2-Metoksi-4-vinilfenol bileşeni *M. pulcherrima* ve *S. cerevisiae* suşlarıyla yapılan M.P-S.C şarabında tespit edilmiştir ve bu şaraba baharat ve karabiber aroması vermiştir (Rocha vd., 2004).

Şaraplarda gayakol, asetoin, siringol ve dietil dl-malat gibi diğer bileşenler de tespit edilmiştir. Bu bileşenlerden dumansı aromaya sahip gayakol bileşeninin (Rocha vd., 2004) miktarı bütün şaraplarda eşik değerinin üstündedir (OAV>1). Gayakol, meyve ve şarapların dumandan ne ölçüde etkilendiğini değerlendirmede gösterge olarak kullanılmaktadır. Gayakol düşük seviyelerde şarabın odunumsu ve dumansı aromasına katkı sağlarken yüksek seviyelerde bulunması istenmeyen bir durumdur (Singh vd., 2011).

Tablo 4.40'ta potansiyel starter mayalar ve ticari mayalar ile üretilen şaraplarda eşik değerin üzerinde bulunan aroma bileşenleri gösterilmektedir. Bu aroma bileşenleri tüm şaraplarda tespit edilmiştir.

Tablo 4.40. Kalecik Karası şaraplarında eşik değerinin üstünde olan aroma bileşenleri

Aroma Bileşeni	Lineer Alıkonma İndeksi (LRI)	Koku Eşiği (µg/L)	Koku Aktivite Değeri (OAV)	Koku Tanımı
Alkoller				
İzoamil Alkol	1236	60000 ⁽²⁾	>1	Viski, tırnak cilası ⁽²⁾
Esterler				
Etil oktanoat	1412	5 ⁽²⁾	>1	Meyvemsi, ananas, armut, çiçeksi ⁽²⁾
Etil hekzanoat	1241	5 ⁽²⁾	>1	Çiçeksi, meyvemsi ⁽²⁾
Asetatlar				
Isoamil asetat	1132	30 ⁽²⁾	>1	Muz, meyvemsi, tatlı ⁽²⁾
Aldehitler				
Nonanal	1658	2.8 ⁽³⁾	>1	Narenciye, çiçeksi ⁽³⁾
Keton				
2,3-Bütandion	984	100 ⁽¹⁾	>1	Krema, tatlı, tereyağ ⁽¹⁾
Asitler				
Oktanoik asit	2106	1000 ⁽²⁾	>1	Peynir, yağ asidi, ekşimiş, ağır ⁽²⁾
İzovalerik asit	2717	33.4 ⁽¹⁾	>1	Baharat, peynir ⁽¹⁾
Diğer Bileşenler				
Gayakol	1840	7.5 ⁽³⁾	>1	Dumansı, yanık, tatlı ⁽³⁾

1, Gómez-Míguez vd., 2007; 2, Wang vd., 2017; 3, Rocha vd., 2004; LRI, Lineer Alıkonma İndeksi; OAV, Koku Aktivite Değeri.

4.8.5. İzole Edilen non-Saccharomyces Mayaların Starter Kültür Olarak Kullanımı

H. guilliermondii mikroorganizmasının şarap yapımında kullanımı 1-propanol, 2-feniletıl asetat ve 3-(metiltiyo) propiyonik asitin daha yüksek miktarda konsantrasyonunun sağlarken etil hekzanol, pentanoik asit, serbest bağırsız yağ asitleri, 2-methyltetrahydrothiophen-3-one ve asetik asit-3-(metiltiyo) propil esterinin daha düşük konsantrasyonda olmasını sağlar. Bu durum,

S. cerevisiae ile starter kültür olarak birlikte kullanımında şarabın aroma bakımından pozitif gelişmesine katkı sağlar (Moreira vd., 2011).

H. opuntiae mikroorganizmasının starter kültür olarak hem tek başına hem de *S. cerevisiae* ile birlikte kullanımı şarabın duyu kalitesini artırarak şarabın aroma potansiyelini pozitif yönde daha da artırmıştır. Tüketici tarafından da bu mikroorganizma kullanılarak yapılan şaraplar tercih edilmiştir. (Assis vd., 2014)

H. uvarum mayaların bazı suşlarının, yüksek seviyede etanol ve uçucu asit üretiminden dolayı, şarabı aroma açısından kötü etkilediği rapor edilmiştir (Jolly vd., 2006). Ancak, bazı suşlarının ise *S. cerevisiae* ile birlikte starter kültür olarak kullanılıp şarabı aroma açısından pozitif etkilediği gözlenmiştir (Tristezza vd., 2016). Diğer bir çalışmada ise etil asetat konsantrasyonunu artırarak meyvemsi aromayı katıp şarabın istenen yapısını oluşturmada olduğu ileri sürülmüştür (Ciani vd., 2006).

R. mucilaginosa yüksek β -glükosidaz aktivitesi ile meyveli ve çiçeksi aroma sağlar (Hu vd., 2016). Özellikle *S. cerevisiae* ile birlikte kullanıldığı beyaz şarap yapımında bazı önemli aroma bileşenlerinin seviyesi artış göstermiştir. Bu önemli aroma bileşenlerinden bazıları nerol oksit (portakal çiçeği aroması), izoamil alkol, etil asetat, etil bütirat, orta zincirli yağ asitleri (hekzanoik asit, oktanoik asit, dekanik asit), benzil alkol, feniletil alkol ve bifeniletil asetatdır (Wang vd., 2017).

W. anomalus mikroorganizması, sadece *S. cerevisiae* kullanımına göre karşılaştırıldığında, tek başına starter kültür olarak kullanıldığında 6 kat, *S. cerevisiae* ile birlikte kullanıldığı zaman 3 kat daha fazla etil asetat üretir. Ama tek başına starter kültür olarak kullanımında etil kaprilat, 3-etoksi-propanol kimyasalları üretemez. *S. cerevisiae* ile birlikte kullanımında ise daha fazla propanol, izobütanol ve izoamil alkol üretir. Bunun yanı sıra, ürettiği asetik asit miktarı sadece *S. cerevisiae* kullanımına göre daha düşüktür. Ayrıca asetoin üretimi, birlikte starter kültür olarak kullanıldığında düşmektedir. *W. anomalus* mikroorganizması şaraba 2-feniletil asetat gibi istenen aroma bileşenleri vermektedir. 2-feniletil asetat şaraba gül aroması veren kimyasal olarak geçmektedir. (Lombard, 2016).

L. thermotolerans mikroorganizması şarabın son yapısı pH'ı düşürerek toplam asiditeyi geliştirir (Mora vd., 1990; Kapsopoulou vd., 2007). Bu yüzden bu mikroorganizma L-laktik asit üreticisi olduğundan şarap için doğal asitlendirici bir etkidir. Bunun yanı sıra, *S. cerevisiae* ile birlikte kullanımında uçucu asit miktarını düşürürken gliserol, 2-fenil etanol ve polisakkarit miktarını artırmaktadır (Comitini vd., 2011). Chr. Hansen markası Concerto isimli ürünü ile *L. thermotolerans* mikroorganizmasını starter kültür olarak satışını yapmaktadır. Bu ürünün özelliği şarapta laktik asit üretimini sağlamak ve spesifik olarak taze çilek aroması vermektedir (Chr. Hansen, 2018).

4.9. Liyofilizasyon

Yağsız süt tozu ve donmaya karşı koruyucu olan (kriyoprotektan) sodyum glutamat ortamında, liyofilizasyon öncesi ve sonrası *L. thermotolerans* ve *M. pulcherrima* için yapılan sayımlarda hücre kaybının sırasıyla %22 ve 29 olduğu bulunmuştur.

Bu sonuç bu ortamda liyofilizasyonun maya hücrelerinin saklanması ve endüstriyel üretim için dondurup-kurutulmasında kullanılabileceğini göstermiştir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, Türkiye'nin 3 farklı şehrinden toplanan (Ankara, Elazığ, Kapadokya) 5 farklı üzüm çeşidinden (Kalecik Karası, Öküzgözü, Boğazkere, Dimrit ve Emir) geleneksel şaraplar yapılmıştır. Bu üzümlerden geleneksel (spontane) yöntemler ile üretilen şarapların yapımı sırasındaki safhalardan (soğuk maserasyon, maserasyon, fermantasyon) toplamda 397 maya (293 *Saccharomyces* ve 104 non-*Saccharomyces* maya) izole edilmiş ve kültür koleksiyonumuza eklenmiştir. Eş zamanlı olarak izolasyon yapılan şıra ve şaraplar soğuk maserasyon, maserasyon ve fermantasyon süreçlerinde yenilikçi teknolojilerden biri olan gerçek zamanlı RT-PZR ile analiz edilmiştir. RT-PZR kullanımı ile farklı üzüm şaraplarında hedef mayaların var/yok test sonuçları etkili olarak belirlenmiştir. İzole edilen suşlar ise tanısı yapıldıktan sonra RT-PZR sonuçları ile kıyaslanmıştır.

RT-PZR analizinde: baskın ve şarap yapımında önemli olan 14 non-*Saccharomyces* maya (*Candida glabrata*, *Candida zemplinina*, *Candida zeylanoides*, *Hanseniaspora* spp, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia orientalis*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia* spp., *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*) belirlenmiş ve *Saccharomyces* mayalar (*Saccharomyces* spp, *S. cerevisiae*) da gruba eklenerek bu mayaların tanısında kullanılacak primerler sentezlenmiş ve RT-PZR ile soğuk maserasyon, maserasyon, fermantasyon süreçlerinde şarap örneklerinde tespit edilmesi hedeflenmiştir.

İzolasyon/sekans ile tanımlama için; izole edilen 293 *Saccharomyces* mayadan 77 tanesi izolasyon besiyeri, şarap yapımında kullanılan üzüm çeşidi, üretimin evresi (soğuk maserasyon, maserasyon, fermantasyon) alkol toleransı ve/veya H₂S üretimi gibi kriterler dikkate alınarak seçilmiş ve sekanslaması yapılmıştır. ITS bölgesi sekans sonuçlarına göre *S. cerevisiae* ve *S. cf. cerevisiae/paradoxus* türleri tanımlanmıştır. *S. cf. cerevisiae/paradoxus* izolatları D1/D2 bölgesi sekansına göre *S. cerevisiae* olarak saptanmıştır. Ayrıca, 77 *Saccharomyces* suş arasından 29 adet yüksek teknolojik özelliklere sahip suş belirlenmiş ve *Saccharomyces cerevisiae* potansiyel şarap mayası starter kültür koleksiyonuna seçilmiştir.

104 adet non-*Saccharomyces* suşu, ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi (ITS1–5.8S rRNA–ITS2) ve/veya 26S rRNA geni, D1/D2 domain bölgesi sekansına göre tanımlanmıştır. Sekans sonuçlarına göre 7 farklı cins ve tür bazında ise *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*), *Lachancea thermotolerans*, *Solicoccozyma aeria*, *Starmerella bacillaris* (*Candida zemplinina*) ve *Metschnikowia* spp. türleri elde edilmiştir. *Metschnikowia* spp.; ITS bölgesine göre, *M. pulcherrima*, *M. chrysoperlae*, *M. sinensis*, *M. aff. chrysoperlae* tanımlanırken D1/D2 domaine göre, *Metschnikowia aff. fructicola*, *M. aff. pulcherrima*, *M. pulcherrima*, *M. fructicola* olarak tanımlanmıştır.

Elde edilen izolasyon/sekanslama ve RT-PZR sonuçları kıyaslanmıştır. İzolasyon/Sekans sonuçları *C. zemplinina* (*Starmerella bacillaris*), *Hanseniaspora* spp., *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *Metschnikowia* spp., *R. mucilaginosa*, *W. anomalus* (*Pichia anomala*) ve *S. cerevisiae* tespitinde RT-PZR sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Diğer yandan *M. pulcherrima* yalnızca izolasyon/sekans metodu ile tespit edilirken, *C. glabrata*, *I. orientalis*, *P. fermentans*, *P. kluyveri*, *T. delbrueckii* maya türleri yalnızca RT-PZR ile belirlenmiştir. *Candida zeylanoides* ne gerçek zamanlı PZR ne de izolasyon/sekans metodu ile bulunmuştur.

H. guilliermondii, *H. opuntiae*, *M. aff. chrysoperlae*, *M. chrysoperlae*, *M. aff. fructicola*, *M. fructicola*, *M. aff. pulcherrima*, *M. sinensis*, *S. aeria* ve *S. cf. cerevisiae/paradoxus* maya türleri ise yalnızca izolasyon/sekans ile belirlenmiştir. Bu maya türleri için literatürde, geliştirilmiş özel primerler olmamasından dolayı proje kapsamında RT-PZR analizi planlanmamıştır.

Non-*Saccharomyces* suşlarında fenotipik ve teknolojik özelliklere baktığımızda, genellikle, düşük alkol (%10'dan az) ve yüksek SO₂ (200 mg/L) toleransı, orta ya da yüksek seviyede H₂S üretimi bulunmuştur. Diğer yandan, bazı non-*Saccharomyces* suşlarda (OA 4CM S3 *W. anomalus*, OA 4CM NS4 *H. opuntiae*, KB 0CM NS5 *W. anomalus*, DA 0CM NS2 *M. aff. pulcherrima*) yüksek alkol toleransı (%15 v/v) ve KA 2NM NS1 (*H. opuntiae*), KA 4NM NS5 (*H. opuntiae*) ve DA 4CM NS3 (*M. pulcherrima*) izolatlarında düşük H₂S üretimi de bulunmuştur.

Sonuç olarak, Türkiye'deki yerel non-*Saccharomyces* ve *Saccharomyces* maya popülasyonları hızlı yöntemle belirlenmiş, klasik yöntem ile izole edilip tanımlanmıştır. Ayrıca RFLP yöntemi ile de mayaların birçoğunda, tür bazında tanımlamaların etkin biçimde yapılabildiği teyit edilmiştir.

Bunlara ek olarak, proje kapsamında seçtiğimiz bazı türlere ait suşların PFGE ve RAPD genotipleme yöntemleri ile birbirlerine benzerlikleri veya farklılıkları araştırılmıştır. PFGE yöntemi *S. cerevisiae* suşlarının farklılıklarını ortaya koymuştur. Elektroforetik karyotipleme ile 30 *S. cerevisiae* suşunda, 10 farklı kromosomal profil ortaya konmuştur. Bu profiller şöyledir: profile 1 (S15, S18, K46, K48, B35, D17), profile 2 (E1, E2, E4, E5, B2, B5, B6, B36, O39), profile 3 (K44), profile 4 (S13, S16, O12, O24, CH), profile 5 (O10), profile 6 (K71, K49, D16), profile 7 (K45), profile 8 (B3), profile 9 (E21) ve profile 10 (E16). RAPD-PCR tekniği de seçtiğimiz non-*Saccharomyces* türlerde suşların farklılaştırılmasında başarılı sonuçlar vermiştir. Kullanılan primerlere göre değişen suş farklılıklarının patentlemede kullanılabileceği belirlenmiştir.

Potansiyel starter mayalar ile şarap üretimi için Kalecik Karası üzümü seçilmiş ve yapılan şaraplarda arzu edilen aroma maddeleri üretildiği saptanmıştır. Özellikle, *L.*

thermotolerans suşu için aroma bileşenleri istenen özellikler taşımaktadır. Aroma maddeleri sonuçlarına göre *S. cerevisiae* suşunun ve non-*Saccharomyces* suşlarının şarabın aroma profiline ticari maya kadar katkı sağlayabildiği ve istenilen aroma bileşenlerini oluşturabildiği saptanmıştır. Aroma bileşenleri analizine göre bütün şaraplarda alkol ve ester bileşenlerinin konsantrasyonu diğer bileşenlere oranla daha fazla bulunmuştur. Yüksek alkollerden meyve aroması veren 3-Etoksi-1-propanol bileşeni LT-SC ve MP-SC şaraplarında daha yüksek miktardadır. Şaraba meyvemsi ve çiçeksi aromalar veren ester bileşenleri LT-SC şarabında, narenciye ve çiçeksi aromalara sahip nonanal bileşeni ise LT-SC ve SC şaraplarında yüksek miktarda bulunmuştur. Diğer şaraplardan farklı olarak baharat aroması veren 2-Metoksi-4-vinilfenol bileşeni MP-SC şarabında yüksek miktarda tespit edilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde LT-SC şarabının aromatik açıdan diğer şaraplara kıyasla daha iyi olduğu görülmüştür.

Duyusal analiz beş ve altı kişiden oluşan iki grup halinde gerçekleştirilmiştir. İki grubun sonuçlarında çeşitli farklılıklar bulunmaktadır. Birinci grubun sonuçlarına göre ticari maya (LAFFORT) kullanılarak yapılan Laffort S.C şarabı renk, aroma ve burukluk açısından daha çok beğenilirken, genel izlenime göre *S. cerevisiae* K71 izolat suşuyla yapılan S.C şarabı en iyi olarak seçilmiştir. Bununla birlikte, ikinci grup S.C şarabını renk ve son burukluk açısından daha çok beğenirken, genel izlenime göre *L. thermotolerans*'ın non-*Saccharomyces* olarak eklenmiş olduğu LT-SC şarabının Kavaklıdere uzman grubu tarafından aroması güçlü olarak belirlenmiş ve genel izlenimde ticari suş ile yapılan şaraba yakın puan alması dikkat çekmiştir. Kavaklıdere şarap tadım uzmanları tarafından bu şarabın büyük ölçekli ticari şaraba yakın olarak değerlendirilmesi, potansiyel starter olan *S. cerevisiae* K71 suşunun *L. thermotolerans* ile birlikte ticari olarak kullanılabileceğini ve teknolojik kalitesi yüksek şarap üretilabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır. Ayrıca 1. grup ile yapılan panel sonuçları da *S. cerevisiae* K71 suşunun yalnız başına da starter kültür olarak kullanımı sonucunda ortaya çıkan şarapların beğeni kazanabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla gelecekte bu suşlar (SC K71 ve LT-SC) ile büyük ölçekli denemeler uygun olacaktır. Bu suşlara ek olarak kültür koleksiyonumuzdaki diğer izolatların ve kombinasyonların denenmesi gelecekte yeni potansiyel starterlerin geliştirilmesine olanak verebilecektir. Aynı üzüm çeşidinden izole edilen suşlar projemiz kapsamında çalışılan ve önerilen RAPD veya Mikrosatelit sistemleri ile farklılaştırılabilir ve/veya gruplanabilir.

Bu projenin sonucunda ülkemizde endemik olarak yetişen şaraplık üzüm çeşitlerine yüksek uyumluluk gösterecek suşların izolasyonu başarılmıştır. Bu suşlardan butik ya da seri üretim şarapçılığı teşvik edecek starter kültürlerin geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Ale C.E., Otero, M.C., Pasteris, S.E. 2015. "Freeze-drying of wine yeasts and *Oenococcus oeni* and selection of the inoculation conditions after storage", Journal of Bioprocessing and Biotechnology, 5 (8), 1-8.
- Andorra, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamon, J. M., Esteve-Zarzoso, B. 2010. "Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations", European Food Research and Technology, 231, 215–224.
- Anlı E., 2010. Şarap tadımı (1. Basım). İstanbul:İnkılap kitabevi.
- Anonim, 2009. Türk Gıda Kodeksi Şarap Tebliği, Resmi Gazete Sayı 27131, 4 Şubat 2009. Tebliğ No: 2008/67.
- Anonim, 2013. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, Resmi Gazete Sayı 28693, 30 Haziran 2013.
- Arcari, S. G., Caliori, V., Sganzerla, M., Godoy, H. T. 2017. "Volatile composition of Merlot red wine and its contribution to the aroma: optimization and validation of analytical method", Talanta, 174, 752-766.
- Arroyo, T., Cordero, G., Serrano, A., Valero, E. 2010. "β-glucosidase production by non-*saccharomyces* yeasts isolated from vineyard", Expression of Multidisciplinary Flavour Science.
- Arroyo-Lopez, F. N., Orlić, S., Querol, A., Barrio, E. 2009. "Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid", International Journal of Food Microbiology, 131, 120–127.
- Assis, M. O., Santos, A. P., Rosa, C. A., Mamede, M. E. 2014. "Impact of a non-*Saccharomyces* yeast isolated in the equatorial region in the acceptance of wine aroma", Food and Nutrition Sciences, 05(09), 759-769.
- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., Zapparoli, G. 2015. "Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*", World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(2), 277–293.
- Bağder Elmaci, S., Özçelik, F., Tokatli, M., Çakir, I. 2014. "Technological properties of indigenous wine yeast strains isolated from wine production regions of Turkey", Antonie van Leeuwenhoek, 105(5), 835–847.

- Banilas, G., Sgouros, G., Nisiotou, A. 2016. "Development of microsatellite markers for *Lachancea thermotolerans* typing and population structure of wine-associated isolates", *Microbiological Research*, 193(2016), 1–10.
- Bartowsky, E. J., Henschke, P. A. 2004. "The "buttery" attribute of wine diacetyl desirability, spoilage and beyond", *International Journal of Food Microbiology*, 96(3), 235-252.
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernandez, A., Arroyo-Lopez, F. N. 2011. "Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications", *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), 89–96.
- Bayrock, D., Ingledew, W.M. 1997. "Fluidized bed drying of baker's yeast: Moisture levels, drying rates, and viability changes during drying", *Food Research International*, 30(6), 407–415.
- Belda, I., Navascues, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., Benito, S. 2015. "Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1911–1922.
- Belloch, C., Barrio, E., Garcia, M. D., Querol, A. 1998. "Phylogenetic Reconstruction of the Yeast Genus *Kluyveromyces*: Restriction Map Analysis of the 5.8S rRNA Gene and the Two Ribosomal Internal Transcribed Spacers", *Systematic and Applied Microbiology*, (21), 266–273.
- Bernardi, T. L., de Melo Pereira, G. V., Cardoso, P. G., Dias, E. S., Schwan, R. F. 2008. "*Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: Identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP)", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2705–2712.
- Bezerra-Bussoli, C., Baffi, M. A., Gomes, E., Da-Silva, R. 2013. "Yeast diversity isolated from grape musts during spontaneous fermentation from a brazilian winery", *Current Microbiology*, 67, 356–361.
- Birren, B. W., Hood, L., Lai, E. 1989. "Pulsed field gel electrophoresis: studies of DNA migration made with the programmable, autonomously-controlled electrode electrophoresis system", *Electrophoresis*, 10(5-6), 302–309.
- Bisson, L. F. 2012. "Geographic origin and diversity of wine strains of *Saccharomyces*", *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(2), 165-176.

- Blanco, P., Ramilo, a., Cerdeira, M., Orriols, I. 2006. "Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain)", *Antonie van Leeuwenhoek*, 89, 351–357.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. 1999. *Principles and practices of winemaking*. US:Springer.
- Bovo, B., Andrichetto, C., Carlot, M., Corich, V., Lombardi, A., Giacomini, A. 2009. "Yeast population dynamics during pilot-scale storage of grape marcs for the production of grappa, a traditional italian alcoholic beverage", *International Journal of Food Microbiology*, 129(3), 221–28.
- Brysch-Herzberg, M., Seidel, M. 2015. "Yeast diversity on grapes in two German wine growing regions", *International Journal of Food Microbiology*, 214, 137–144.
- Bujdoso, G., Egli, M. C., Henick-Kling, T. 2001a. "Characterization of *Hanseniaspora* (Kloeckera) Strains isolated in finger lakes wineries using physiological and molecular techniques", *Food Technology and Biotechnology*, 39(2), 83–91.
- Bujdoso, G., Egli, M. C., Henick-Kling, T. 2001b. "Inter- and intra-specific differentiation of natural wine strains of *Hanseniaspora* (Kloeckera) by physiological and molecular methods", *Food Technology and Biotechnology* 39(1), 19–28.
- Cadez, N., Raspor, P., de Cock, A.W.A.M., Boekhout. T., Smith, M. T. 2002. "Molecular identifcation and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*", *FEMS Yeast Research*, 279–289.
- Cañas, P. M. I., García, A. T. P., Romero, E. G. 2011. "Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulaspora*) and *Saccharomyces* yeast", *VITIS- Journal of Grapevine Research*, 50(4), 177–182.
- Capece, A., Salzano, G., Romano, P. 2003. "Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species", *International Journal of Food Microbiology*, 84(1), 33–39.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Pietrafesa, R., Massari, C., Poeta, C., Romano, P. 2010. "Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation", *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 187-192.

- Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D. P., Deshpande, M. V. 2009. "Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India", *Food Microbiology*, 26(8), 801-808.
- Chr. Hansen. 2018. "Concerto", <https://www.chr-hansen.com/en/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/product-cards/concerto>. Son erişim tarihi: 9 Haziran 2020.
- Christine, L. J., Marc, L., Catherine, D., Claude, E., Jean-Luc, L., Michel, A., Isabelle, M. P. 2007. "Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*", *FEMS Yeast Research*, 7, 540–549.
- Christoph, M. E., Thomas, H. K. 2001. "Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region", *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(3), 241–246.
- Ciani, M., Ferraro, L. 1998. "Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines", *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 247–254.
- Ciani, M., Beco, L., Comitini, F. 2006. "Fermentation behavior and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations", *International Journal of Food Microbiology*, 108, 239–245.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. 2010. "Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking", *FEMS Yeast Research*, 10, 123–133.
- Ciani, M., Comitini, F. 2015. "Yeast interactions in multi-starter wine fermentation", *Current Opinion in Food Science*, 1, 1–6.
- Clavijo, A., Calderón, I. L., Paneque, P. 2010. "Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region", *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 241–245.
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico, F. 2005. "Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation", *International Journal of Food Microbiology*, 98(3), 301–308.
- Cocolin, L., Pepe, V., Comitini, F., Comi, G., Ciani, M. 2004. "Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries", *FEMS yeast research*, 5(3), 237–245.

- Comi, G., Maifreni, M., Manzano, M., Lagazio, C., Cocolin, L. 2000. "Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy)", *International Journal of Food Microbiology*, 58, 117–121.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. 2011. "Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*", *Food Microbiology*, 28(5), 873-882.
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Mariano-Cabellos J., Gil-Diaz M., Arroyo T. 2013. "Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.)", *European Food Research and Technology*, 236, 193–207.
- Couto, M. M. B., Eijmsa, B., Hofstra, H., Veld, J. H., Vossen, J. M. B. M. 1996. "Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains", *Applied and Environmental Microbiology* 62(1), 41-46.
- Çelik, Z. D., Erten, H., Darici, M., Cabaroğlu, T. 2017. "Molecular characterization and technological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of *Vitis vinifera* L.cv. Narince grape must grown in ancient wine making area Tokat, Anatolia", *BIO Web of Conferences*, 9, 02017.
- Daran-Lapujade, P., Daran, J. M., Kötter, P., Petit, T., Piper, M. D. W., Pronk, J. T. 2003. "Comparative genotyping of the *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains S288C and CEN.PK113-7D using oligonucleotide microarrays", *FEMS Yeast Research*, 4, 259–269.
- De Araújo Vicente, M., Fietto, L. G., De Miranda Castro, I., Gonçalves Dos Santos, A. N., Coutrim, M. X., Brandão, R. L. 2006. "Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of "cachaça" the Brazilian sugarcane spirit", *International Journal of Food Microbiology*, 108, 51–59.
- De Benedictis, M., Bleve, G., Tristezza, M., Tufariello, M., Grieco, F. 2011. "An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures", *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(2), 189–200.
- De Ponzzes-Gomes, C. M. P. B. S., de Mélo, D. L. F. M., Santana, C. A., Pereira, G. E., Mendonça, M. O. C., Gomes, F. C. O., Rosa, C. A. 2014. "*Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts in grape varieties of the São Francisco Valley", *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 411–416.

Diaz, C., Molina, A. M., Nähring, J., Fischer, R. 2013. "Characterization and dynamic behavior of wild yeast during spontaneous wine fermentation in steel tanks and amphorae", *BioMed Research International*, 2013, 1-13.

Echeverrigaray, S., Randon, M., da Silva, K., Zacaria, J., Delamare, A. P. L. 2013. "Identification and characterization of non-*Saccharomyces* spoilage yeasts isolated from brazilian wines", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(6), 1019–1027.

Electronic Code of Federal Regulations. "Alcohol, Tobacco Products and Firearms". <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/textdx?SID=599804bef7b2f8300cecf22442b27af0&node=27:1.0.1.1.2&rngn=div5>. Son erişim tarihi: 3 Haziran 2020.

Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., Cocolin, L. 2015. "Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations", *International Journal of Food Microbiology*, 199, 33–40.

Erten, H., Tanguer, H. 2010. "Influence of *Williopsis saturnus* yeasts in combination with *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation", *Letters in Applied Microbiology*, 50(5), 474–479.

Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., Ferreira, V. 2007. "Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4501–4510.

Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A. 1998. "The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking", *International Microbiology*, 143- 148.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. 1999. "Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.

Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M. J., Ramón, D., Querol, A. 2001. "Molecular characterisation of *Hanseniaspora species*", *Antonie van Leeuwenhoek*, 80(1), 85–92.

European Commission. "EU regulation 606/2009 on rules governing categories of grapevine products, oenological practices and applicable restrictions", <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A32009R0606>, Son erişim tarihi: 6 Aralık 2019.

Feckler, A., Schrimpf, A., Bundschuh, M., Bärlocher, F., Baudy, P., Cornut, J., Schulz, R. 2017. "Quantitative real-time PCR as a promising tool for the detection and quantification of leaf-

associated fungal species – A proof-of-concept using *Alatospora pulchella*”, PLOS ONE, 12(4), e0174634.

Feghali, N., Albertin, W., Tabet, E., Rizk, Z., Bianco, A., Zara, G., Masneuf-Pomarede, I., Budroni, M. 2019. “Genetic and phenotypic characterisation of a *Saccharomyces cerevisiae* population of ‘merwah’ white wine”, Microorganisms, 7(11), 492.

Fernandez-Espinar, M., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E. 2000. “RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: A fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts”, Antonie van Leeuwenhoek, 78(1), 87–97.

Fernandez-Espinar, M. T., López, V., Ramón, D., Bartra, E., Querol, A. 2001. “Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques”, International Journal of Food Microbiology, 70(1-2), 1–10.

Fernandez-Espinar, M. T., Barrio, E., Querol, A. 2003. “Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex”, Yeast, 20, 1213-1226.

Fernandez-Espinar, M. T., Llopis, S., Querol, A., Barrio, E. 2011. “Molecular identification and characterization of wine yeasts”, Molecular Wine Microbiology, 111-141.

Fleet, G. H. 2003. “Yeast interactions and wine flavour”, International Journal of Food Microbiology, 86, 11–22.

Garavaglia, J., Schneider, R. de C. de S., Camargo Mendes, S. D., Welke, J. E., Zini, C. A., Caramão, E. B., Valente, P. 2015. “Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 as a co-starter in wine fermentation for the improvement of ethyl esters production”, Microbiological Research, 173, 59–65.

Garcia, M., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J.M., Arroyo, T. 2017. “Yeast monitoring of wine mixed or sequential fermentations made by native strains from D.O. “Vinos de Madrid” using Real-Time Quantitative PCR”, Frontiers in Microbiology, 8(2520), 1-15.

Garofalo, C., Tristezza, M., Grieco, F., Spano, G., Capozzi, V. 2016. “From grape berries to wine: population dynamics of cultivable yeasts associated to “Nero di Troia” autochthonous grape cultivar”, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(4), 1–10.

Gaudet J., Julien J., Lafay, JF., Brygoo Y. 1989. “Phylogeny of some *Fusarium* species as determined by large-subunit rRNA sequences comparison”, Molecular Biology and Evolution, 6, 224-227.

Ghosh, S. 2017. "Metagenomic screening of cell wall hydrolases, their anti-fungal activities and potential role in wine fermentation", Stellenbosch University.

Gil-Lamaignere, C., Roilides, E., Hacker, J., Müller, F.-M. C. 2003. "Molecular typing for fungi-a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods", *Clinical Microbiology and Infection*, 9(3), 172–185.

Giusto, C., Iacumin, L., Comi, G., Buiatti, S., Manzano, M., Brew, J. I. 2006. "PCR-TTGE and RAPD-PCR Techniques to Analyze *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis* Isolated from Craft Beers", *Journal Of The Institute Of Brewing and Distilling*, 112, 340–345.

Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. 2013. "*Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine", *Food Microbiology*, 33(2), 271–281.

Gomez-Miguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., Heredia, F. J. 2007. "Volatile components of Zalema white wines", *Food Chemistry*, 100(4), 1464-1473.

Gonzales, R., Munoz, R., Carascosa, A. 2011. *Molecular Wine Microbiology* (1. Basım). London: Academic Press.

González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A. R. 2017. "Genetic and phenotypic intraspecific variability of non-*Saccharomyces* yeasts populations from La Rioja winegrowing region (Spain)", *Journal of Applied Microbiology*, 122(2), 378–388.

Granchi, L., Ganucci, D., Buscioni, G., Mangani, S., Guerrini, S. 2019. "The biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* in spontaneous wine fermentation: the occurrence and persistence of winery-strains", *Fermentation*, 5, 86.

Guimal, Z. J. a, Hedreyda, C. T. 2011. "Microsatellite and RAPD Analysis of Six Local Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*", *Philippine Science Letters*, 4(2), 122–130.

Guimarães, T. M., Moriel, D. G., Machado, I. P., Picheth, C. M. T. F., Bonfim, T. M. B. 2006. "Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest", *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(1), 119-126.

Guillamon, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. 1998. "Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region", *Archives of Microbiology*, 169(5), 387–392.

- Gunderson, K., Chu, G. 1991. "Pulsed-field electrophoresis of megabase-sized DNA", *Molecular and Cellular Biology*, 11(6), 3348–3354.
- Hage, A. E., Houseley, J. 2013. "Resolution of budding yeast chromosomes using pulsed-field gel electrophoresis", *Methods in Molecular Biology*, 1054, 195–207.
- Heard, G. M., Fleet, G. H. 1985. "Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines", *Applied and Environmental Microbiology*, 50(3), 727-728.
- Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E., Perez-Nevado, F. 2008. "Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives", *International Journal of Food Microbiology*, 121, 178–188.
- Hesham, A. E., Hashem, M. M. 2011. "Molecular genetic identification of yeast strains isolated from egyptian soils for solubilization of inorganic phosphates and growth promotion of corn plants", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 55–61.
- Hesham, A. E. L., Wambui, V., Ogola J.O., H., Maina, J. M. 2014. "Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences", *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(1), 37–43.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Gonzalez, A., Mas, A., Guillamon, J. M. 2006. "Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine", *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7148-7155.
- Hierro, N., Gonzalez, A., Mas, A., Guillamon, J. M. 2006. "Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: Effect of grape ripeness and cold maceration", *FEMS Yeast Research*, 6(1), 102-111.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Guillamon, J. M., 2007. "Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR", *FEMS Yeast Res.* 7, 1340-1349.
- Hu, K., Zhu, X., Mu, H., Ma, Y., Ullah, N., Tao, Y. 2016. "A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: Its application potential in wine aroma enhancement", *Letters in Applied Microbiology*, 62(2), 169-176.
- Jacobson, J.L. 2006. *Introduction to wine laboratory practices and procedures* (1. Basim). New York: Springer Science and Business Media Inc.

- Jeyaram, K., Singh, W. M., Capece, A., Romano, P. 2008. "Molecular identification of yeast species associated with "Hamei" - A traditional starter used for rice wine production in Manipur, India", *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 115-125.
- Johnston, J. R., Mortimer, R. K. 1986. "Electrophoretic karyotyping of laboratory and commercial strains of *Saccharomyces* and other yeasts", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36, 569–572.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P.H., Pretorius, I. S. 2003. "The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality", *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), 55-62.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., Pretorius, I. S. 2006. "The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production", *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 15-39.
- Jolly, N. P., Varela, C., Pretorius, I. S. 2014. "Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered", *FEMS Yeast Research*, 14(2), 215–237.
- Kallai, Z., Pfliegler, W. P., Mitercsak, J., Szendei, G., Sipiczki, M. 2019. "Preservation of diversity and oenological properties of wine yeasts during long-term laboratory maintenance: A study of strains of a century-old Tokaj wine yeast collection", *Lwt (Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie)*, 101, 789–798.
- Kapsopoulou, K., Barouti, E., Makrioniti, A., Kostaki, K. 2008. "Occurrence of *Saccharomyces cerevisiae* killer yeasts in wine-producing areas of Greece", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1967–1971.
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., Nerantzis, E. 2007. "Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 735-739.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A. 2010. "Öküzgözü üzümlerinden kırmızı şarap üretiminde soğuk maserasyon uygulamasının antosiyaninler üzerine etkisi", *Tarım Bilimleri Dergisi*, 16, 287-294.
- Keyamura, K., Hishida, T. 2020. "Monitoring of DNA Replication and DNA Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)", *Methods in Molecular Biology*, 2119, 123–133.
- Kim, D. H., Hong, Y. A., Park, H. D. 2008. "Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine", *Biotechnology Letters*, 30(9), 1633–1638.

- Kish, S., Sharf, R., Margalith, P. 1983. "A note on a selective medium for wine yeasts", *Journal of Applied Microbiology*, 55(1), 177-179.
- Krakova, L., Chovanová, K., Ženišová, K., Turcovská, V., Brežná, B., Kuchta, T., Pangallo, D. 2012. "Yeast diversity investigation of wine-related samples from two different Slovakian wine-producing areas through a multistep procedure", *LWT (Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie) Food Science and Technology*, 46(2), 406–411.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. 1998. "Identification and phylogeny of *ascomycetous* yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences", *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4), 331–371.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. 2011. "The Yeasts, a Taxonomic Study". USA:Elsevier Science.
- Kwaśna, H., Bateman, G. L., Ward, E. 2010. "Microbiota in wheat roots evaluated by cloning of ITS1/2 rDNA and sequencing", *Journal of Phytopathology*, 158(4), 278–287.
- Lederer, M. A., Nielsen, D. S., Toldam-Andersen, T. B., Herrmann, J. V., Arneborg, N. 2013. "Yeast species associated with different wine grape varieties in Denmark", *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 63(1), 89–96.
- Li, S. S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J. Y., Yan, B., Han, B. Z., Reeves, M. 2010. "Yeast species associated with wine grapes in China", *International Journal of Food Microbiology*, 138(1–2), 85–90.
- Lieckfeldt, E., Meyer, W., Börner, T. 1993. "Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting", *Journal of Basic Microbiology*, 33(6), 413–425.
- Liu, P. T., Duan, C. Q., Yan, G. L. 2019. "Comparing the effects of different unsaturated fatty acids on fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* and aroma compounds during red wine fermentation", *Molecules*, 24(3), 538.
- Lombard, J. 2016. "Characterisation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Kazachstania aerobia*: Investigating fermentation kinetics and aroma production", Stellenbosch University.
- Ma, M., Liu, Z. L. 2010. "Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 829-845.
- Manzano, M., Cocolin, L., Lacumin, L., Cantoni, C., Comi, G. 2005. "A PCR-TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) technique to assess differentiation among

enological *Saccharomyces cerevisiae* strains", International Journal of Food Microbiology, 101, 333–339.

Martínez, C., Gac, S., Lavín, a., Ganga, M. 2004. "Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America", Journal of Applied Microbiology, 96, 1161–1168.

Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Marullo, P., Albertin, W. 2016. "The genetics of non-conventional wine yeasts: current knowledge and future challenges", Frontiers in Microbiology, 6:1563.

Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., Carrau, F. 2013. "Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*", Food Chemistry, 141(3), 2513–2521.

Meyer, W., Mitchell, T. G. 1995. "Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: Strain variation in *Cryptococcus neoformans*", Electrophoresis, 16(1), 1648–1656.

Mille, Y., Girard, J. P., Beney, L., Gervais, P. 2005. "Air drying optimization of *Saccharomyces cerevisiae* through its water-glycerol dehydration properties", Journal of Applied Microbiology, 99(1985), 376–382.

Minnaar, P. P., du Plessis, H. W., Jolly, N. P., van der Rijst, M., du Toit, M. 2019. "Non-*Saccharomyces* yeast and lactic acid bacteria in Co-inoculated fermentations with two *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: A strategy to improve the phenolic content of Syrah wine", Food chemistry:X, 4, 100070.

Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T., Nakahara, T. 2006. "Survival curves for microbial species stored by freeze-drying", Cryobiology, 52, 27–32.

Mokhtari, M., Etebarian, H. R., Razavi, M., Heydari, A., Mirhendi, H. 2012. "Identification of yeasts isolated from varieties of apples and citrus using PCR-fragment size polymorphism and sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region", Food Biotechnology, 26(3), 252–265.

Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., Agosin, E. 2007. "Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds", Applied Microbiology and Biotechnology, 77(3), 675–687.

Mora, J., Barbas, J.I., Mulet, A. 1990. "Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*", American Journal of Enology and Viticulture, 41, 156-159.

- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M. A., González, C., Suárez Lepe, J. A. 2018. "*Lachancea thermotolerans* applications in wine technology", *Fermentation*, 4(53).
- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I. 2008. "Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must", *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 231–238.
- Moreira N., Lopes, P., Ferreira, H., Cabral, M., Guades de Pinho, P. 2016. "Influence of packaging and aging on the red wine volatile composition and sensory attributes", *Food Packaging and Shelf Life*, 8, 14-23.
- Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J., Hogg, T., Vasconcelos, I. 2011. "Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications", *Food Control*, 22(5), 662-667.
- Morgan, C. a., Herman, N., White, P. a., Vesey, G. 2006. "Preservation of micro-organisms by drying; A review", *Journal of Microbiological Methods*, 66, 183–193.
- Naumov, G. I., James, S. A., Naumova, E. S., Louis, E. J., Roberts, I. N. 2000. "Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 77, 2782-2858.
- Naumova, E. S., Sadykova, A. Z., Martynenko, N. N., Naumov, G. I. 2013. "Molecular genetic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* distillers' yeasts", *Microbiology*, 82(2), 175–185.
- Nisiotou, A. A., Nychas, G. J. E. 2007. "Yeast populations residing on healthy or Botrytis-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece", *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2765–2768.
- Nurgel, C., Erten, H., Canbaş, A., Cabaroğlu, T., Selli, S. 2005. "Yeast flora during the fermentation of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Emir and Kalecik karası grown in Anatolia", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1187-1194.
- O'Donnell, K. 1993. "Fusarium and its near relatives", In: Reynolds DR and Taylor JW (Eds) *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, 225-233.
- Padilla, B., Gil, J. V., Manzanares, P. 2016. "Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity", *Frontiers in Microbiology*, 7(411), 1–20.

- Pai, C. C., Walker, C., Humphrey, T. C. 2018. "Using pulsed-field gel electrophoresis to analyze *Schizosaccharomyces pombe* chromosomes and chromosomal elements", Cold Spring Harbor protocols, 2018(4), 10.1101/pdb.prot092023.
- Pando, R., Querol, A., Suárez, B. 2010. "Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias", Food Microbiology, 27(4), 503-508.
- Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J. X., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freil, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J. M., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., Liti, G., Schacherer, J. 2018. "Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates", Nature, 556(7701), 339–344.
- Petersen, R. F., Nilsson-tillgren, T., Pijkur, J. 1999. "Karyotypes of *Saccharomyces sensu lato* species", International Journal of Systematic Bacteriology, 49, 1925–1931.
- Pfaffl, M. W. 2001. "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR", Nucleic Acids Research, 29(9).
- Pfliegler, W. P., Horváth, E., Kállai, Z., Sipiczki, M. 2014. "Diversity of *Candida zemplinina* isolates inferred from RAPD, micro/minisatellite and physiological analysis", Microbiological Research, 169(5–6), 402–410.
- Pham, T., Wimalasena, T., Box, W. G., Koivuranta, K., Storgårds, E., Smart, K. A., Gibson, B. R. 2011. "Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery "wild" yeast contaminants", Journal of the Institute of Brewing, 117(4), 556-568.
- Phister, T. G., Mills, D. A. 2003. "Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine", Applied and Environmental Microbiology, 69(12), 7430–7434.
- Phister, T.G., Rawsthorne, H., Joseph, C.M.L., Mills, D.A. 2007. "Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Hanseniaspora* species from wine and juice", American Journal of Enology and Viticulture, 58, 229-233.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., Hogg, T. 2004. "Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*-Influence of different culture conditions", Food Microbiology, 21(4), 439–447.
- Pinzani, P., Bonciani, L., Pazzagli, M., Orlando, C., Guerrini, S., Granchi, L. 2004. "Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR", Letters in Applied Microbiology, 38, 118-124.

Polomska, X., Wojtatowicz, M., Zarowska, B., Szoltysik, M., Chrzanowska, J. 2012. "Freeze Drying Preservation of yeast adjunct cultures for cheese production", *Journal of Food Nutrition and Science*, 62 (3), 143-150.

Pramateftaki, P. V., Lanaridis, P., Typas, M. A. 2000. "Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: A case study with strains from two vine-growing areas of Greece", *Journal of Applied Microbiology*, 89, 236–248.

Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Cocolin, L. 2012. "*Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations", *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1987–1994.

Raspor P., Mozina S.S., Cadez N. 2001. "Identification of Yeasts from the Grape/Must/Wine System", *Food Microbiology Protocols*, 14, 243-257.

Redžepović, S., Orlić, S., Sikora, S., Majdak, a., Pretorius, I. S. 2002. "Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards", *Letters in Applied Microbiology*, 35, 305-310.

Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J-C., Bely, M. 2015. "Increase of fruity aroma during mixed *T.delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement", *International Journal of Food Microbiology*, 207, 40–48.

Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A, Dubourdieu. 2006. *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications* (2. Basım). İngiltere: John Wiley and Sons Ltd.

Rocha, S. M., Rodrigues, F., Coutinho, P., Delgadillo, I., Coimbra, M. A. 2004. "Volatile composition of Baga red wine: Assessment of the identification of the would be impact odourants", *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 257-262.

Rodriguez, M. E., Lopes, C. A., Van Broock, M., Valles, S., Ramon, D., Caballero, A. C. 2004. "Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities", *Journal of Applied Microbiology*, 96, 84–95.

Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., Manzanares, P. 2003. "Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations", *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 181–188.

Romancino, D. P., Maio, S. Di, Muriella, R., Oliva, D. 2008. "Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy)", *Journal of Applied Microbiology*, 105, 2248–2254.

Romanelli, A. M., Fu, J., Herrera, M. L., Wickes, B. L. 2014. "A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification", *Mycoses*, 57(10), 612–622.

Ru, M., Bernal-Grande, M.C., Cordero-Bueso, G., Hughes-Herrera, D. 2017. "A microtiter plate assay as a reliable method to assure the identification and classification of the veil-forming yeasts during sherry wines ageing", *Fermentation*, 3(58), 1-10.

Ryu, S. L., Mikata, K., Murooka, Y., Kaneko, Y. 1998. "A simple PCR method for distinguishing *Saccharomyces cerevisiae* from its sibling species by amplification of the RPL2 region", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(3), 249–252.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M. 2002. "Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA", *Microbiological Research*, 157(4), 267–274.

Salinas, F., Mandaković, D., Urzua, U., Massera, a., Miras, S., Combina, M., Martínez, C. 2010. "Genomic and phenotypic comparison between similar wine yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* from different geographic origins", *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1850–1858.

Santana, C. A., Pereira, G. E., Mendonça, M. O. C., Gomes, F. C. O., Oliveira, E. S., Jr, A. M. B., Rosa, C. A. 2014. "*Saccharomyces cerevisiae* and non- *Saccharomyces* yeasts in grape varieties of the São Francisco Valley", *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 411–416.

Schuller, D., Valero, E., Dequin, S., Casal, M. 2004. "Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains", *FEMS Microbiology Letters*, 231, 19–26.

Schwartz, D.C., Cantor, C.R. 1984. "Separation of yeast chromosome-sized dnas by pulsed field gradient gel electrophoresis", *Cell*, 37, 67-75.

Sebastiani, F., Pinzauti, F., Casalone, E., Rosi, I., Fia, G., Polsinelli, M., Barberio, C. 2004. "Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Sangiovese grapes of Chianti area", *Annals of Microbiology*, 54(4), 415-426.

Selli, S., Cabaroğlu, T., Canbaş, A. 2001. "Kalecik Karası sırasındaki serbest aroma maddelerinin tayininde iki farklı ekstraksiyon yönteminin kıyaslanması", *Gıda*, 26(6), 443-448.

Selli, S., Cabaroglu, T., Canbas, A., Erten, H., Nurgel, C., Lepoutre, J. P., Gunata, Z. 2004. "Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karası grown in central Anatolia", *Food Chemistry*, 83(2), 207-213.

Selli, S., Canbas, A., Varlet, V., Kelebek, H., Prost, C., Serot, T. 2007. "Characterization of the most odor-active volatiles of orange wine made from a Turkish cv. Kozan (*Citrus sinensis* L. Osbeck)", *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(1), 227-234.

Settanni, L., Sannino, C., Francesca, N., Guarcello, R., Moschetti, G. 2012. "Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(6), 606–614.

Shinohara, T., Furuya, H., Yanagida, F., Miki, T. 2003. "*Saccharomyces cerevisiae* Strains from the Wine Producing Area in Yamanashi, Japan", *Microbiology and Culture Collections*, 19(2), 69–80.

Singh, D. P., Chong, H. H., Pitt, K. M., Cleary, M., Dokoozlian, N. K., Downey, M. O. 2011. "Guaiacol and 4-methylguaiacol accumulate in wines made from smoke-affected fruit because of hydrolysis of their conjugates", *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(2), 13-21.

Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I., Antunovics, Z. 2001. "Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery", *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 97-105.

Sundström, L., Larsson, S., Jönsson, L. J. 2010. "Identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in the resistance to phenolic fermentation inhibitors", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161, 106–115.

Suzzi, G., Schirone, M., Sergi, M., Marianella, R. M., Fasoli, G., Aguzzi, I., Tofalo, R. 2012. "Multistarter from organic viticulture for red wine Montepulciano d'Abruzzo production", *Front Microbiol* 3:135

Tassou, C. "Multi-strain indigenous yeast and bacterial starters for 'wild-ferment' wine production". Community Research and Development Information Service (CORDIS). <https://cordia.europa.eu/project/id/315065> Son erişim tarihi: 2015.

Tang, K., Xi, Y. R., Ma, Y., Zhang, H. N., Xu, Y. 2019. "Chemical and sensory characterization of Cabernet sauvignon wines from the Chinese Loess Plateau region", *Molecules*, 24(6), 1122.

Tao, Y., Zhang, L. 2010. "Intensity prediction of typical aroma characters of cabernet sauvignon wine in Changli County (China)", *LWT (Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie) Food Science and Technology*, 43(10), 1550-1556.

Tetik, M.A. Selli, S. 2018. "Öküzgözü şaraplarında sıkma işleminin genel bileşim ve duyuşal özellikler üzerine etkisi", *Ç.U. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* 35, 691-100.

- Tofalo, R., Chaves-López, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G. E., Torriani, S., Paparella, A., Suzzi, G. 2009. "Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must", *International Journal of Food Microbiology*, 130, 179-187.
- Tofalo, R., Schirone, M., Telera, G. C., Manetta, A. C., Corsetti, A., Suzzi, G. 2011. "Influence of organic viticulture on non-*Saccharomyces* wine yeast populations", *Annals of Microbiology*, 61(1), 57–66.
- Tournas, V., Stack, M. E., Mislivec, P. B., Koch H. A., Bandler, R. 2001. Hypertext Source: Bacteriological Analytical Manual (8. Basım).
- Tristezza, M., Fantastico, L., Vetrano, C., Bleve, G., Corallo, D., Grieco, F. 2014. "Molecular and technological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from natural fermentation of susumaniello grape must in Apulia, Southern Italy", *International Journal of Microbiology*, 2014, 1-11.
- Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., Grieco, F. 2016. "The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production", *Frontiers in Microbiology*, 7, 670.
- Tsaousi, K., Dimitrellou, D., Koutinas, A. A. 2008. "Low-temperature thermal drying of *Saccharomyces cerevisiae* starter culture for food production", *Food Chemistry*, 110, 547–553.
- Urso, R., Rantsiou, K., Dolci, P., Rolle, L., Comi, G., Cocolin, L. 2008. "Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods", *FEMS Yeast Research*, 8, 1053–1062.
- Ükelgi, N. 2011. "Isolation, identification and characterization of wine yeast species from grapes of three different vineyards in Turkey", Sabancı University.
- Valencia University. "A quick yeasts identification method", <http://www.yeast-id.org>. Son erişim tarihi: 4 Haziran 2020.
- Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., Dequin, S. 2007. "Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts", *FEMS Yeast Research*, 7(1999), 317–329.
- Van der Aa Kühle, A., Jespersen, L. 1998. "Detection and identification of wild yeasts in lager breweries", *International Journal of Food Microbiology*, 43(3), 205-213.

- Van der Westhuizen, T. J., Augustyn, O. P. H., Pretorius, I. S. 2000. "Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the coastal regions of the western cape in South Africa", *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1), 3-9.
- Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S., Manzanares, P. 2008. "Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits", *Food Microbiology*, 25(6), 778–785.
- Viel, A., Legras, J. L., Nadai, C., Carlot, M., Lombardi, A., Crespan, M., Migliaro, D., Giacomini, A., Corich, V. 2017. "The geographic distribution of *Saccharomyces cerevisiae* isolates within three italian neighboring winemaking regions reveals strong differences in yeast abundance, genetic diversity and industrial strain dissemination", *Frontiers in Microbiology*, 8, 1595.
- Villalba, M.L., Saez, J.S., del Monaco, S., Lopes, C. A., Sangorrin, M. P. 2016. "TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts", *International Journal of Food Microbiology*, 217, 94–100.
- Villa-Carvajal, M., Querol, A., Belloch, C. 2006. "Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene", *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 90(2), 171–181.
- Vilanova, M., Massneuf-pomarède, I. 2005. "Characterization of yeast strains from Rías Baixas (NW Spain) and their contribution to the fermentation of Albariño wine", *Annals of Microbiology*, 55(1), 2005.
- Vigentini, I., Maghradze, D., Petrozziello M., Bonello, F., Mezzapelle, V., Valdetara, F., Failla, O., Foschino, R. 2016. "Indigenous Georgian wine-associated yeasts and grape cultivars to edit the wine quality in a precision oenology perspective", *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-13.
- Walczak, E., Czaplińska, A., Barszczewski, W., Wilgosz, M., Wojtatowicz, M., Robak, M. 2007. "RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of *Candida* genus yeasts isolated in brewing", *Food Microbiology*, 24(3), 305–312.
- Wang, Q. M., Liu, W. Q., Liti, G., Wang, S. A., Bai, F. Y. 2012. "Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity", *Molecular ecology*, 21(22), 5404–5417.

- Wang, X. C., Li, A. H., Dizi, M., Ullah, N., Sun, W. X., Tao, Y. S. 2017. "Evaluation of aroma enhancement for "Ecolly" dry white wines by mixed inoculation of selected *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae*", Food Chemistry, 228, 550-559.
- Wang, X, Glawe, D.A., Weller, D.M., Okubara, P.A. 2020. "Real-time PCR assays for the quantification of native yeast DNA in grape berry and fermentation extracts", Journal of Microbiological Methods, 168, 1-10.
- Welke, J. E., Zanusi, M., Lazzarotto, M., Alcaraz Zini, C. 2014. "Quantitative analysis of headspace volatile compounds using comprehensive two-dimensional gas chromatography and their contribution to the aroma of Chardonnay wine", Food Research International, 59, 85-99.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetic". PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, 315–322.
- Ye, M., Yue, T., Yuan, Y. 2014. "Effects of sequential mixed cultures of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* on apple cider fermentation", FEMS Yeast Research, 14(6), 873–882.
- Zanol, G. C., Baleiras-Couto, M. M., Duarte, F. L. 2010. "Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification", Ciencia e Tecnica Vitivinicola, 25(2), 75–85.
- Zenisova, K., Chovanova, K., Chebenova-Turcovska, V., Godalova, Z., Krakova, L., Kuchta, T., Pangallo, D., Brezna, B. 2014. "Mapping of wine yeast and fungal diversity in the small Carpathian wine-producing region (Slovakia): evaluation of phenotypic, genotypic and culture –independent approaches", Annals of Microbiology, 64: 1819-1828.
- Zimmermann, M., Fournier, P. 1996. Electrophoretic karyotyping of yeasts. Nonconventional yeasts in biotechnology, Berlin: Springer.
- Zohre, D. E., Erten, H. 2002. "The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation", Process Biochemistry, 38(3), 319–324.
- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I. 2010. "Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR", Food Microbiology, 27(5), 559-567.

Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I. 2008. "Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking", International Journal of Food Microbiology, 125, 197-203.