

TOKAT VE NEVŞEHİR YÖRELERİNDE YETİŞEN NARİNCE ÜZÜMÜ VE ÜZÜM ŞIRASININ SPONTAN FERMANTASYONU SİRASINDA MAYA POPÜLASYONUNUN PZR–RFLP TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ

Zeynep Dilan ÇELİK¹, Hüseyin ERTEN², Turgut CABAROĞLU²

¹Dr., Çukurova Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, ADANA

²Prof. Dr., Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ADANA

Geliş tarihi / Received: 11.09.2017, Kabul tarihi / Accepted: 20.06.2018

ÖZET

Bu çalışmada, 2015 yılında Tokat ve Nevşehir yörelerinden bağbozumu dönemlerinde hasat edilen Narince üzümlerinin spontan fermantasyonu sırasında ortamda bulunan *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların popülasyonu incelenmiştir. Mayaların moleküler yöntemle tanımlanmasında PZR–RFLP yöntemi kullanılmıştır. PZR yönteminde mayalar öncelikle 5.8S rRNA’larında bulunan ITS gen bölgelerinin boyutlarına göre gruplandırılmış, daha sonra 26S rRNA’larına ait D1/D2 gen bölgeleri ile yapılan dizi analizi sonuçlarıyla mayalar tür düzeyinde tanımlanmışlardır. Narince üzümlerinden ve üzüm şirasının spontan fermantasyonu sırasında ortamdan 189 adet maya izole edilmiştir. Tokat yöresi hasat üzümlerinden yalnızca *H’spora uvarum*, Nevşehir yöresi hasat üzümlerinden ise yalnızca *S. cerevisiae* izole edilmiştir. Narince şirasının spontan fermantasyonu sırasında ise *H’spora uvarum*, *H’spora guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus*, *P. kluyveri*, *I. terricola*, *I. orientalis*, *P. occidentalis*, *L. thermotolerans*, *Metchinikowia* spp. ve *C. zemplinina*, türleri tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Narince, *Saccharomyces cerevisiae*, non–*Saccharomyces*, PZR–RFLP, spontan fermantasyon

DETERMINATION OF YEAST POPULATION BY PCR–RFLP TECHNIQUES ISOLATED FROM SPONTANEOUS FERMENTATION AND NARİNCE GRAPES GROWN IN TOKAT AND NEVŞEHİR

ABSTRACT

In this study *S. cerevisiae* and non–*Saccharomyces* populations were investigated during spontaneous alcoholic fermentation of Narince grapes grown in Tokat and Nevşehir harvested in 2015 vintage. Yeasts were identified by PCR–RFLP analysis of the 5.8 ITS rRNA region and sequence information for the D1/D2 domains of the 26S gene. During spontaneous fermentation of Narince, 189 yeasts were isolated. *H’spora uvarum* was only yeast isolated from Narince grapes obtained from Tokat region, however only *S. cerevisiae* was isolated from Cv. Narince harvested from Nevşehir region. During spontaneous fermentation of Narince grapes *H’spora uvarum*, *H’spora guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus*, *P. kluyveri*, *I. terricola*, *I. orientalis*, *P. occidentalis*, *L. thermotolerans*, *Metchinikowia* spp. and *C. zemplinina* species were identified.

Keywords: Narince, *Saccharomyces cerevisiae*, non–*Saccharomyces*, PCR–RFLP, spontaneous fermentation

GİRİŞ

Şarapta kalite, başta çeşit olmak üzere terroir olarak da adlandırılan üzümlerin yetiştiği bölgenin iklim ve coğrafik yapısına, üzüm ve fermantasyon sırasındaki mikrofloraya, uygulanan üretim tekniğine ve şarabın dinlendirme ve olgunlaşma koşullarına bağlıdır [9]. Üretim sırasında alkol

fermantasyonunu gerçekleştiren mayalar ve fermantasyonun gerçekleştiği koşullar şarabın bileşimi üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Şarabın en önemli kalite parametrelerinden biri olan aroma maddelerinin çoğu bu aşamada oluşmaktadır. Şarap üretiminde pastörizasyon işlemi uygulanmadığından üzümlerin doğal maya florası, koşullara bağlı olarak alkol fermantasyonu üzerinde etkili

olmakta ve bu etki şarabın bileşimine de yansımaktadır. Şarap üretiminde mayaların varlığı ile ilgili ilk çalışmalar 125 yıl önce Louis Pasteur'un öncülüğünde başlamıştır. Pasteur şaraptaki alkol fermentasyonundan mayaların sorumlu olduğunu bulmuştur. Pasteur'den sonra şarap mikrobiyolojisi ile ilgili çalışmalar artarak devam etmiştir [12, 15].

Üzümler mantar, maya ve bakteriden oluşan kompleks bir mikrofloraya sahiptir. Bu canlı gruplarından parazit mantarlar gibi bazıları yalnızca üzümün yüzeyinde bulunurken diğerleri fermentasyon ortamında da yaşamlarını sürdürerek şarabın mikroflorasını oluştururlar. Mayalar şarap üretimi için şarap mikroflorasına ait en önemli canlı grubunu oluştururlar, Çünkü *Saccharomyces* olmadan kaliteli bir şarap üretmek imkânsızdır. *Saccharomyces*'in yanı sıra birçok *Saccharomyces* spp. olmayan maya türü de şarap üretimine dahil olmakta ve özellikle son yıllarda bunların kültürleri şarap sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır [2, 11, 15]. Fermentasyonu *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspora* ve *Hansenula* cinslerine ait maya türleri başlatır ancak, *S. cerevisiae* üzümde yaygın olarak bulunmamasına rağmen, fermentasyonun ileri aşamalarında yüksek etanol toleransı nedeniyle ortama hakim olur. Günümüzde kullanılan ticari maya suşları genellikle *S. cerevisiae*'ya ait suşlardır [3, 4]. Bölge ve yöre esaslı (terroir) şarap üreten üreticiler alkol fermentasyonunda yöreye özgü endojen *S. cerevisiae* suşlarını kullanmayı tercih etmektedir. Bu suşlar izole edildikleri şarap bölgelerindeki ortam şartlarına daha kolay uyum sağlamakta ve fermentasyon sırasında ortama kolayca hakim olmaktadır ve şaraba yörenin özellikleri taşıyan duyuşal özellikler kazandırmaktadır [14]. Dünya genelinde şarap üretiminde spontan fermentasyondan ziyade ya yöreye özgü çeşitten izole edilen starter kültürler ya da şarap tipine bağlı starter kültürler kullanılmaktadır. Ülkemizde ise alkol fermentasyonu sırasında maya olarak yurt dışında yabancı üzüm çeşitlerinden izole edilmiş ticari maya suşları kullanılmaktadır. Ancak, yöreye özgü kaliteli şaraplar üretebilmek için alkol fermentasyonu sırasında yalnızca üzümün kendi yöresinden

izole edilen endojen mayaların kullanılması gerekir [10, 16].

Ülkemizde yetişen kalite şarap veren beyaz üzüm çeşitlerimizden biri olan Narince (*Vitis vinifera* L.) Tokat ve Amasya çevrelerinde yetiştirilirler. Son yıllarda ise özellikle Nevşehir-Ürgüp yöresinde yayılmaya başlamıştır [5]. Narince, taneleri orta boylu, yuvarlak ve sıkı salkımlardan oluşur. Narince üzümünden yapılan şaraplar ise yeşilimsi sarı renkte olup, zengin aromaya ve genellikle dengeli asitliğe sahip olurlar ve yıllandırmaya uygun şaraplar üretilebilir [5, 17].

Bu çalışmanın amacı, 2015 yılı Tokat ve Nevşehir yöresi Narince üzümlerinin şaraba işlenmesi sırasında maya florasını belirlemek ve moleküler tekniklerle tanımlamaktır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Araştırmada kullanılan Narince üzümleri Tokat (Dimes/Diren şarap işletmesinin bağları) ve Nevşehir/Gülşehir (Kavaklıdere şarap işletmesinin bağları) olmak üzere 2 farklı yöreden sağlanmıştır. Örnek alma işlemi bağbozumu zamanında 15.09.2015 tarihinde Tokat yöresinde, 21.09.2015 tarihinde Nevşehir/Gülşehir yöresinde yapılmıştır. Üzümlerin örneklemesi seçmemeye özen göstererek, sürekli yön değiştirilerek ve değişik yükseklikler olacak şekilde yapılmıştır. Mikrobiyolojik analizler ve fermentasyon denemelerinin kurulması için steril numune poşetlerine aseptik koşullarda makas kullanılarak 12'şer kg örnek alınmıştır.

Metot

Fermentasyon denemelerinin kurulması

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

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

olarak kodlanmıştır. Denemeler her biri 750 ml olacak şekilde 1 L'lik fermantasyon başlıklı steril cam şişelerde ikiye paralelli olarak hazırlanmış ve alkol fermantasyonu 18°C'de gerçekleştirilmiştir.

Şıralarda yapılan genel analizler

Şırada, SÇKM, toplam asit, pH [13] analizleri yapılmıştır.

Üzümlerde ve fermantasyon sırasında yapılan mikrobiyolojik analizler

Üzümlerde bulunan maya sayımı Combina ve ark. [6]'na göre besiyeri üzerine yayma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyonun gidişi günlük sıcaklık ve yoğunluk ölçümleri ile izlenmiştir. Alkol fermantasyonun başında (yoğunluk %100 iken-F₁), ortasında (yoğunluk %50 iken-F₂) ve sonunda (yoğunluk %1'in altına düştüğünde-F₃) steril kaplara örnekler alınmıştır. Fermantasyon ortamında bulunan mayaların sayımı, izolasyonu ve saflaştırılması Esteve-Zarzoso ve ark. [8] ve Fleet ve Heard [9]'e göre yapılmıştır.

Toplam maya sayımında Maya Özütü Peptonlu Dekstroz (YEPD, Sigma) besiyeri kullanılmıştır ve petriler 28°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. *Saccharomyces* cinsi mayaların sayımında %10 etil alkol ve %0.015 sodyum metabisülfite içeren YPD besiyeri kullanılmış ve petriler 28°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. *Saccharomyces* spp. cinsi olmayan mayaların sayımında Lizin agar (Oxoid) kullanılmış ve petriler 28°C'de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerlerine bakteri gelişimini önlemek için 0.1 g/L *oxotetracycline* (Sigma) ve küf gelişimini önlemek için 2 g/L sodyum propionate (Alfa Aesar) ilave edilmiştir.

Maya izolatlarının tanımlanması

Tokat ve Nevşehir yörelerinden 850 adet maya izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. İzole edilip saflaştırılan mayalar YPD agardaki koloni özelliklerine göre gruplandırılmış ve her gruptan en az 1 izolat olacak şekilde 200 adet izolat genetik yöntemlerle tanımlamaları yapılmak üzere seçilmişlerdir. Mayaların moleküler yöntemle tanımlanması Esteve-Zarzoso ve ark. [7], Kurtzman ve Robnett [11]'e göre 3 aşamada gerçekleştirilmiş detayları aşağıda açıklanmıştır.

Mayaların DNA İzolasyonu: Mayalardan DNA izolasyonu InstaGene Matrix (Bio-Rad, Hercules, Kaliforniya, ABD) kiti kullanarak yapılmıştır.

5.8S ITS Gen Bölgesinin Çoğaltılması: İlk aşamada 5.8S ITS rRNA bölgesi ITS1 (5'-TCC GTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-T CCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri kullanılarak PZR'da çoğaltılmıştır. Bu amaçla tüplere toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su, DNA (50-100 mg/µl), Tampon (10x inc 25 mM MgCl₂), dNTP (25 mM), MgCl₂ (25 mM), Primer ITS1 (100 mM), Primer ITS4 (100 mM) ve Taq (50 U/mM) konulmuştur. Döngü 95°C'de 5 dakika denatürasyon aşaması ile başlayıp 94°C'de 1 dk ve 55°C'de 2 dk 35 döngü yapıp 72°C'de 2 dk ve 72°C'de 10 dakika ile sonuçlandırılmıştır. PZR ürünlerinin elektroforezi %1.5 agaroz içeren jellerde yapılmıştır. PZR ürünlerinin boyutu 100 bp'lik DNA markörü yardımıyla saptanmıştır.

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm Analizi (RFLP): İkinci aşamada 5.8S ITS PZR ile çoğaltılan DNA, restriksiyon enzimleriyle (HhaI, Hae III ve HinfI) kesilmiştir. Tüplere toplam reaksiyon hacmi 12.5 µl olacak şekilde H₂O, tampon (10X) ve Miks A için enzim CfoI (HhaI, 10U/µl), Miks B için enzim Hae III (BSURI, 10U/µl), Miks C için enzim HinfI (10U/µl) konularak karışımlar hazırlanmış ve 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine önce 7.5 µL miks ve sonra 5 µl PZR ürünü konularak santrifüj edilmiştir. Daha sonra örnekler 37°C'lik su banyosunda 10-16 saat bekletilmiştir. RFLP ürünlerinin elektroforezi %2 agaroz ve %1.5 TBE içeren jellerde yapılmış, jeller 120 V'da 1.5 saat kadar koşulmuştur. RFLP-PZR ürününün boyutunu belirlemek için 50 bp'lik "DNA markör" kullanılmıştır. Farklı restriksiyon enzimleri kesimi sonucu yakın restriksiyon fragmentı veren izolatlar aynı gruba alınmış ve her grubu temsilen 1 veya 2 örnekte 26S rRNA bölgesi sekanslanmaya gönderilmiştir.

26S rRNA Dizi Analizi: Üçüncü aşamada 26S rRNA'nın D1/D2' alanının çoğaltılması NL1(5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAA AG3') ve NL 4(5'GGTCCGTGTTTCAAGA CGG3') primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde tüplere steril distile su, DNA (50-100 mg/µl), Tampon (10X), dNTP (25 mM),

MgCl₂ (25 mM), Primer NL 1 (100 mM), Primer NL 4 (100 mM) ve Taq (50 U/mM) konmuştur. 26S bölgesi için PZR döngüsü 95°C'de 5 dakika denatürasyon aşaması ile başlayıp 95°C'de 1 dk ve 52°C'de 45 saniye 30 döngü yapıp 72°C'de 1 dk ve 72°C'de 7 dakika uzama ile sonuçlandırılmıştır. PZR ürünlerinin elektroforezi için %2 agaroz, TBE 1X içeren jel hazırlanmıştır. 100 bp marker ve PZR ürünleri 120 V'da 1.5 saat kadar jelde koşturulmuştur. 26S rRNA-PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi pozitif sonuç veren 26s rRNA-PZR ürünü sekans analizi için BM yazılım (Macrogen, Hollanda)'a gönderilmiştir. Maya izolatlarının 26S rRNA gen bölgelerinin sekanslanması sonucunda elde edilen DNA dizi sonuçları "BioEdith Sequence Alignment Editor" (Hall, 1999) programı kullanılarak düzenlenmiş ve BLAST programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analizler

Şıraların genel bileşimi verilerine varyans analizi (IBM SPSS 20) uygulanmış ve önemli bulunan farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Narince şıralarının genel bileşimi

Tokat ve Nevşehir yörelerinden elde edilen Narince şıralarının genel bileşimi Çizelge 1'de verilmiştir. Tokat ve Nevşehir yörelerinden elde edilen şıraların suda çözünür kuru madde (SÇKM) miktarları sırasıyla 20.4 ile 23.8 briks değerlerinde bulunmuştur Tokat ve Nevşehir yöresi şıralarının toplam asit değerleri tartarik asit cinsinden sırasıyla 5.44 ve 5.62 g/L, pH değerleri ise sırasıyla 3.18 ve 3.33 bulunmuştur.

Narince üzümü ve üzüm şırasının fermantasyonu sırasındaki maya florası

Tokat ve Nevşehir yörelerine ait üzümlerde ve fermantasyon denemelerinde toplam maya, *S. cerevisiae* cinsi maya ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sayımları yapılmıştır. Narince üzümlerinin maya florası Şekil 1'de verilmiştir. Toplam maya sayısı, *Saccharomyces* cinsine giren ve *Saccharomyces* spp. dışındaki mayaların

sayısını göstermektedir. Tokat ve Nevşehir yörelerine ait Narince üzümlerinde toplam maya sayısı sırasıyla 4.1 log kob/ml ile 5.2 log kob/ml *S. cerevisiae* cinsi mayalar sırasıyla 1 log kob/ml ile 1.3 log kob/ml, *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar ise sırasıyla 3.7 log kob/ml ile 4.5 log kob/ml bulunmuştur.

Sağlıklı bir üzüm tanesinde bağbozumundan hemen önce Toplam maya popülasyonu 10³-10⁵ kob/ml'dir [9]. Her iki yöreye ait üzümlerde maya popülasyonu bu değerler arasında bulunmuştur.

Fermantasyon başında *S. cerevisiae* cinsi maya popülasyonu 2.5 log kob/ml ile 4.79 log kob/ml arasında değişmiştir. Fermantasyon ortasında *S. cerevisiae* cinsi maya popülasyonu artmış ve 5 log kob/ml ile 6.5 log kob/ml arasında değişmiştir. Fermantasyon sonunda ise *S. cerevisiae* cinsi maya popülasyonu 4.15 log kob/ml ile 6.7 log kob/ml arasında değişmiştir (Şekil 2).

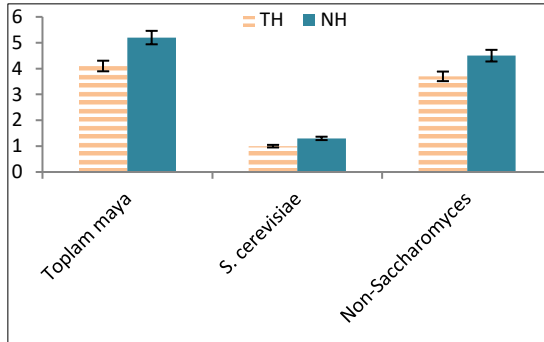
Tokat ve Nevşehir yörelerine ait denemelerin fermantasyon başında *S. cerevisiae* cinsi maya popülasyonu tortu alma işlemi uygulanmamış denemelerde en yüksek bulunmuş, tortu alma işlemi uygulanmış olan denemelerde ise beklendiği gibi düşük sayıda belirlenmiştir. Fermantasyon ortasında *S. cerevisiae* cinsi maya popülasyonu artmış be bu artış en çok NB denemesinde olmuş onu sırasıyla NA denemesi takip etmiştir. *S. cerevisiae* üzümde yaygın olarak bulunmamasına rağmen, fermantasyonun ileri aşamalarında yüksek etanol toleransı nedeniyle ortama hakim olur [8]. Fermantasyon sonunda ise Tokat durultmalı ve durultmasız denemeler hariç bütün denemelerde popülasyon azalmıştır.

Fermantasyon denemeleri sırasında, fermantasyon başında *Saccharomyces* spp cinsi dışındaki maya popülasyonu 2.5 log kob/ml ile 5.39 log kob/ml arasında değişmiştir. Fermantasyon ortasında popülasyon artmış ve 5.1 log kob/ml ile 6.38 log kob/ml arasında değişmiştir. Fermantasyon sonunda ise *Saccharomyces* spp olmayan TA denemesinde sayılamazken, diğer denemelerde ve 0.3 log kob/ml ile 1.5 log kob/ml arasında bulunmuştur. Fermantasyon sırasında *Saccharomyces* spp. dışındaki mayaların popülasyonu ortam şartlarına göre 10⁶-10⁷ kob/ml'ye çıkabilir [16].

Çizelge 1. Narince şıralarının genel bileşimi
Table 1. Composition of Narince musts

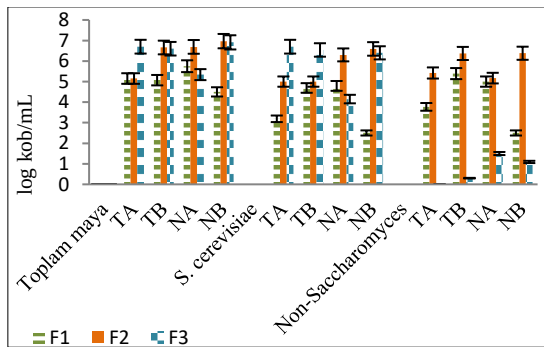
Genel Analizler	Tokat	Nevşehir	F
SÇKM (Briks)	20.06±0.0b	23.80±0.0a	*
pH	3.18±0.1b	3.33±0.1a	*
Toplam Asit (g/L)**	5.44±0.1b	5.62±0.0a	*

F: varyans analizine göre farklılık durumu; * $p < 0.05$ önem düzeyinde önemli; **tartarik asit cinsinden
F: significance at which means differ as shown using analysis of variance, * $p < 0.05$ level, ** as tartaric acid



Şekil 1. Narince üzümünde bulunan maya sayıları (TH: Tokat yöresi hasat üzümü, NH: Nevşehir yöresi hasat üzümü)

Figure 1. Yeast population of Narince grapes (TH: Vintage grape from Tokat, NH: Vintage grape from Nevşehir)



Şekil 2. Fermantasyon ortamında bulunan mayaların sayıları

Figure 2. Yeast population of during fermentation

Şarabın fermantasyonu, üzümde ve şaraphane ortamında doğal olarak bulunan birçok maya türünün dahil olduğu kompleks bir mikrobiyal prosestir. Fermantasyonu alkol toleransı düşük olan zayıf fermentatif özellikteki *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspora* ve *Hansenula* türlerine ait

Saccharomyces spp. dışındaki mayalar başlatırlar [8].

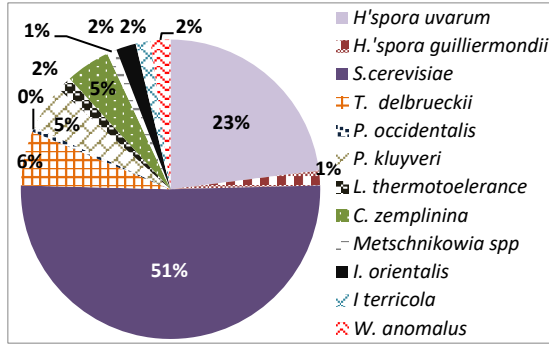
Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen mayaların dağılımı

Maya izolatlarına ait DNA dizi analizi sonuçları BLAST programı kullanılarak değerlendirilmiş ve BLAST sonuçlarına göre 189 adet izolat maya olarak tanımlanmış ve bunlardan 6 tanesi üzümlerden geriye kalan 183 tanesi ise fermantasyon ortamından izole edilmiştir. *H'spora uvarum*, *H'spora guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *I. orientalis*, *I. terricola*, *P. occidentalis*, *P. kluyveri*, *L. thermotolerans*, *C. zemplinina* *Metschnikowia* spp. ve *W. anomalus* olmak üzere 9 cinse ait 12 tür belirlenmiştir ve en fazla izole edilen tür *S. cerevisiae* olmuş, onu *H'spora uvarum* ve diğer türler takip etmiştir (Şekil 4).

Tokat yöresinden izole edilen mayaların genel dağılımı Şekil 5'de verilmiştir. Tokat yöresinden en fazla izole edilen tür *S. cerevisiae* olmuş ve onu *H'spora uvarum* takip etmiştir.

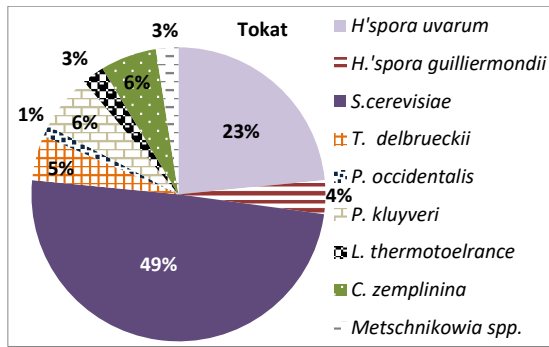
Tokat yöresi Narince üzümlerinden ve fermantasyon denemeleri sırasında fermantasyonun farklı aşamalarında izole edilen mayaların tür düzeyindeki dağılımları ise Şekil 6'da sütun grafiğinde verilmiştir. Üzümlerde yalnızca *H'spora uvarum* izole edilmiştir. Fermantasyon denemeleri sırasında, fermantasyon başında (F₁) *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum*, *H'spora guilliermondii*, *C. zemplinina*, *P. occidentalis*, *P. kluyveri* ve *Metschnikowia* spp. izole edilmiş, *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların ortama hakim olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon ortasında (F₂)'de ise *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum* ortama hakim olmaya başlamış, *C. zemplinina* türü mayaların sayısı artmış ve bunların yanında *L. thermotolerans* ve *T. delbrueckii* maya türleri de izole edilmiştir. F₃'de ise yalnızca *S. cerevisiae* izole edilmiş ve ortamda baskın maya türü olarak bulunmuştur.

Nevşehir yöresinden izole edilen mayaların genel dağılımı Şekil 7'de verilmiştir. Nevşehir yöresinden en fazla izole edilen tür *S. cerevisiae* olmuş ve onu *H'spora uvarum* takip etmiştir.



Şekil 4. Tokat ve Nevşehir yörelerinden izole edilen mayaların tür düzeyindeki dağılımı

Figure 4. Distribution of yeast isolated from Tokat and Nevşehir at species level

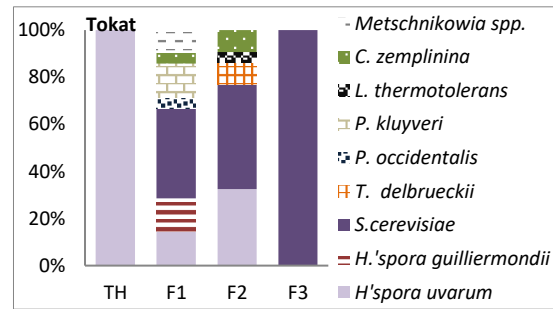


Şekil 5. Tokat yöresinden izole edilen mayaların tür düzeyinde dağılımı

Figure 5. Distribution of yeast isolated from Tokat region at species level

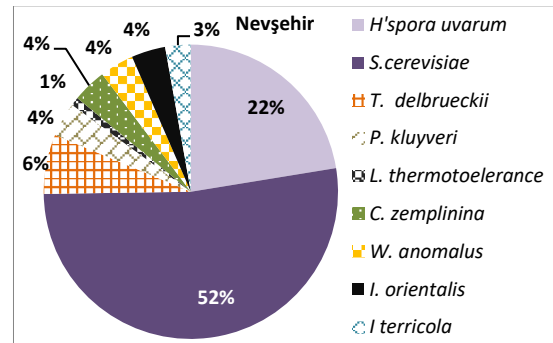
Nevşehir yöresi Narince üzümünden ve fermantasyon denemeleri sırasında fermantasyonun farklı aşamalarında izole edilen mayaların tür düzeyindeki dağılımları ise Şekil 8'de sütun grafiğinde verilmiştir. Hasat üzümünde yalnızca *S. cerevisiae* izole edilmiştir. Fermantasyon denemeleri sırasında, fermantasyon başında (F₁) *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum*, *T. delbrueckii*, *C. zemplinina*, *P. kluyveri*, *L. thermotolerans*, *I. terricola*, *I. orientalis* ve *W. anomalus* izole edilmiş ve fermantasyon başında *Saccharomyces* spp. olmayan mayalar ortama hakim olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon ortası ve fermantasyon sonunda *S. cerevisiae* ortama hakim olmaya başlamış ve onun yanında *H'spora uvarum* ve *T. delbrueckii* türleri de izole edilmiştir.

Tokat ve Nevşehir yörelerinin maya dağılımı karşılaştırıldığında Tokat yöresinden 7 cins izole edilirken, Nevşehir yöresinden 8 cins izole edilmiştir. Tokat yöresi üzümünde yalnızca *H'spora uvarum* izole edilmiş, Nevşehir yöresi üzümünde ise yalnızca *S. cerevisiae* izole edilmiştir. Fermantasyon denemeleri sırasında F₁'de her iki yörede de *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum*, *C. zemplinina* ve *P. kluyveri* izole edilmiştir.



Şekil 6. Tokat yöresi üzümünden ve fermantasyon denemeleri sırasında izole edilen mayaların dağılımı (F₁: fermantasyon başı; F₂: fermantasyon ortası; F₃: fermantasyon sonu)

Figure 6. Distribution of yeasts isolated from Tokat region grapes and spontaneous fermentation (F₁: beginning of fermentation; F₂: middle of fermentation; F₃: end of fermentation)

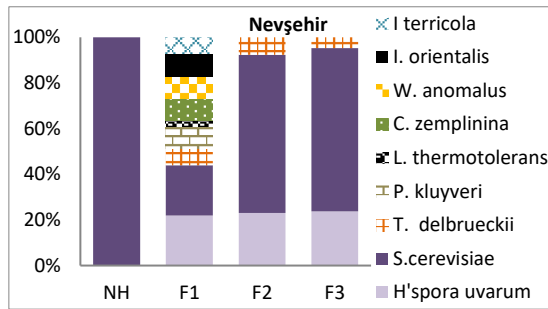


Şekil 7. Nevşehir yöresinden izole edilen mayaların tür düzeyinde dağılımı

Figure 7. Distribution of yeast isolated from Nevşehir region at species level

Tokat yöresinde Nevşehir'den farklı olarak *Metschnikowia* spp., *P. occidentalis*, *H. guilliermondii* türleri izole edilmiştir.

Nevşehir yöresinden ise Tokat yöresinden farklı olarak *L. thermotolerans*, *I. orientalis*, *I. terricola*, *W. anomalus* ve *T. delbrueckii* türleri izole edilmiştir. F₂'de her iki yörede de *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum* ve *T. delbrueckii* türleri izole edilmiştir. Tokat yöresinden ise Nevşehir'den farklı olarak *C. zemplinina* ve *L. thermotolerans* türleri de izole edilmiştir. F₃'de ise her iki yörede de *S. cerevisiae* ortama hakim olmuş, Nevşehir yöresinden Tokat'tan farklı olarak *H'spora uvarum* ve *T. delbrueckii* türleri de izole edilmiştir. Fermantasyon denemeleri sırasında tortu alma işlemi uygulanmamış denemelerdeki *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların sayısı ve çeşidi tortu alma işlemi uygulanmış denemelere göre daha fazla bulunmuştur.



Şekil 8. Nevşehir yöresi üzümlelerinden ve fermantasyon denemeleri sırasında izole edilen mayaların dağılımı (F₁: fermantasyon başı; F₂: fermantasyon ortası; F₃: fermantasyon sonu)

Figure 8. Distribution of yeasts isolated from Tokat region grapes and spontaneous fermentation (F₁: beginning of fermentation; F₂: middle of fermentation; F₃: end of fermentation)

SONUÇLAR

Narince üzümünde 6 adet ve fermantasyon ortamında 183 adet maya tanımlanmıştır. Tanımlanan mayaların 79 adedi Tokat yöresinden 104 adedi ise Nevşehir yöresinden izole edilmiştir. Tanımlanan türler *S. cerevisiae*, *H'spora uvarum*, *H'spora guilliermondii*, *T. delbrueckii*, *W. anomalus*, *P. kluyveri*, *I. terricola*, *I. orientalis*, *P. occidentalis*, *L. thermotolerans*, *Metchinikowia* spp. ve *C. zemplinina*'dır.

Nevşehir yöresi şıranın spontan fermantasyonunda, beklendiği gibi fermantasyon başında *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların ortama hakim olduğu belirlenmiştir. Tokat yöresinde ise fermantasyon başında *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* spp. olmayan mayaların birbirine yakın oranlarda ortamda bulunduğu saptanmıştır. Fermantasyonun ilerleyen aşamalarında ise her iki yörede de *S. cerevisiae* mayaları ortama hakim olmuş ve fermantasyonu bitirmiştir. Nevşehir yöresinde Tokat'tan farklı olarak fermantasyon sonunda *H'spora uvarum* ve *T. delbrueckii* türleri de ortamda bulunmuştur. Tortu alma işleminin maya çeşitliliğini ve sayısını etkilediği belirlenmiş, *Metschnikowia* spp., *L. thermotolerans*, *I. terricola*, *I. orientalis* türlerinin yalnızca tortu alınmamış denemelerden izole edildiği belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK (214O173 No'lu Proje) tarafından desteklenmiştir. Ayrıca çalışmayı destekleyen Kavaklıdere ve Diren Şaraplarına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Anonim, 2005. Community Methods for Analysis of Wines, EEC No 2676/90.
2. Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. The Microbial Ecology of Wine Grape Berries. International Journal of Food Microbiology, 153:243–259.
3. Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine—A Review, South African Journal of Enology and Viticulture, 21:27–49.
4. Bisson, L.F., Joseph, C.M.L., 2009. Yeast. Biology of Microorganisms on Grapes, in Mus and in Wine. Editörler: König, H., Unden, G., Fröhlich, J. Hiedelberg: Springer.
5. Canbaş, A., 2008. Şarap Teknolojisi Ders Notları. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği, Adana
6. Combina, M., Elia, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C., 2005. Dynamics of Indigenous Yeast Populations

- during Spontaneous Fermentation of Wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 99:237–243.
7. Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of Yeasts by RFLP Analysis of the 5.8S rRNA Gene and Two Ribosomal Internal Transcribed Spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49:329–337.
 8. Esteve-Zarzoso B., Gostincar, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A., 2002. Selection and Molecular Characterization of Wine Yeasts Isoalted from the ‘El Penedes Area (Spain), *Food Microbiology*, 17:553–562.
 9. Fleet, G.H., Heard, G.M., 2002. Yeasts Growth during Fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Editör: Fleet, G.H. New York: Taylor & Farancis.
 10. Francesca, N., Chiurazzi, M., Romano, R., Aponte, M., Settani, L., Moschetti, G., 2010. Indigenous Yeast Communities in the Enviroment of ‘Rovello Bianco’ Grape Variety and Their use in Commercial White Wine Fermentation, *World Journal of Microbiology and Biotechnolgy* 26:337–351.
 11. 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*, 73:331–371
 12. Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the Origins of Wine Yeasts. *Research in Microbiology*, 150:199–204.
 13. OIV, 2009. International Organization of Vine and Wine, *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. Edition 2015, Vol.2.
 14. Perez-Coello, M.S., Briones Perez, A. I., Ubeda Iranzo, J. F., Martin Alvarez, P. J., 1999. Characteristics of Wines Fermented With Different *S. cerevisiae* Strains Isolated From the La Mancha region, *Food Microbiology*, 16:563–573.
 15. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., 2006a. The Microbiology of Wine and Vinifications. *Handbook of Enology Vol:1*. Ed.: Ribéreau Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. United Kingdom: John Wiley & Sons.
 16. Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003. Function of Yeast Species and Strain in Wine Flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86:169–180.
 17. Selli, S., Canbaş, A., Cabaroğlu, T., Erten, H., Lepoutre, J.P., Günata, Z., 2006. Effect of Skin Contact on the Free and Bound Aroma Compounds of the White *Vitis vinifera* L. cv. Narince, *Food Control*, 17:75–82.