

ŞARAP FERMANTASYONLARINDA ENDOJEN ÇOKLU STARTER KÜLTÜRLERİN KULLANILMA OLANAKLARI

Şule Şenses Ergül, Z. Yeşim Özbaş*

Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 16.02.2008

Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 02.03.2008

Kabul tarihi / Accepted: 21.03.2008

Özet

Şarap fermantasyonu genellikle *Saccharomyces cerevisiae* türü mayalar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Şarap fermantasyonu üzerine yapılan çalışmaların bir bölümünün, şarap mayalarının seçimi üzerinde yoğunlaştıkları gözlenmektedir. Seçilen suşların şırayı kuvvetli fermente edebilmelerinin yanısıra şarabın bileşimini ve duyuşal özelliklerini olumlu yönde etkilemeleri de istenmektedir. Tek bir maya suşunun istenen tüm enolojik karakteristikleri birlikte bulundurması mümkün değildir. *S. cerevisiae* suşları tek başlarına starter kültür olarak kullanıldıklarında, alışlagelmiş aroma özelliklerine sahip şarapların üretilebildikleri belirtilmektedir. Bu nedenle şarap mayalarının seçilmeleri sırasında, enolojik olmayan ortamlardan izole edilen *S. cerevisiae* suşları veya *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer almayan mayaları da kapsayacak şekilde çeşitli çalışmaların yapıldığı gözlenmektedir. Ancak bu mayaların tek başlarına starter kültür olarak kullanılmaları, kuvvetli bir fermantasyon gerçekleştiremeyecekleri için tavsiye edilmemektedir. Bunun yerine, karışık endojen kültürlerin kullanılması, istenen özelliklere sahip şarap üretimi için tercih edilmektedir. Bu derlemede, bir bölgeye özgü karakteristiklere sahip şarapların üretilebilmesi için o bölgeden elde edilen endojen şarap mayalarının tek başlarına veya karışık kültürler halinde kullanılma olanakları üzerinde durulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Endojen mayalar, şarap, enolojik özellikler, *Saccharomyces*, şarap mayaları

POSSIBLE UTILIZATION OF ENDOGENIC MULTISTARTER CULTURES IN WINE FERMENTATIONS

Abstract

Wine fermentation is generally achieved by using the species of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. It is observed that some of the recent studies on wine fermentation are focused on the selection of wine yeasts. It is preferred that selected strains ferment the wine vigorously and have favorable influence on the composition and sensorial characteristics of the wine as well. It is not possible for only one yeast strain to possess all of the required oenological characteristics. It is known that only the wines with plain aromatic profiles can be produced when *S. cerevisiae* strains are used alone. For this reason, it is observed that various studies are performed for the selection of wine yeasts, including *S. cerevisiae* strains which are not isolated from oenological environments or non-*Saccharomyces* strains. Nevertheless, the use of these yeasts alone as starter culture is not recommended because of their inability to perform vigorous fermentation. Instead of this, use of multistarter endogenic cultures is preferred for producing wines with desired characteristics. In this review, the possible utilization of endogenic wine yeasts, alone or as multistarter cultures, for production of wines with characteristics specific to the region of isolation, is discussed.

Keywords: Endogenic yeasts, wine, oenological characteristics, *Saccharomyces*

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉ yesim@hacettepe.edu.tr, ☎ (+90) 312 297 7112, 📠 (+90) 312 299 2123

GİRİŞ

Üzüm şirasının şaraba dönüşümü, farklı mikroorganizmaların varlıkları ile karakterize edilen bir fermantasyon işlemi olarak tanımlanmaktadır. Bu dönüşüm sırasında, üzümde ve fabrikada doğal olarak bulunan maya türleri ile küfler, laktik asit ve asetik asit bakterileri arasındaki ekolojik ve biyokimyasal etkileşimlerin rol aldıkları bilinmektedir (1, 2). Üzüm taneleri üzerinde bulunan doğal maya florasının şarap fermantasyonları sırasında önemli role sahip olduğu ve farklı cins, tür ve hatta suşların metabolik aktiviteleri aracılığı ile şarabın duyuşsal kalitesini ve organoleptik özelliklerini etkiledikleri bildirilmektedir (3). Mayaların şarap üretimi sırasında, üzüm şirasındaki şekerlerin alkole dönüşümünden sorumlu oldukları bilinmektedir. Bu fermantasyon sürecinde, heksozların etanol ve karbondioksit dönüşümünün yanısıra, şarabın duyuşsal özelliklerini etkileyen birçok yan ürün de oluşmaktadır. Klasik şarap üretimi sırasında iyi bir fermantasyon gerçekleştirildiğinde kötü kokulu bileşikler üretilemeden şeker fermantasyonunun tamamlandığı görülmektedir (4).

Üzüm şirası fermantasyonlarının ortam koşulları; yüksek şeker içeriği (140-260 g/L), düşük pH değeri (3.0-3.5), anaerobik ortam, sülfür varlığı (40-80 mg/L) ve genellikle sınırlı miktardaki azot ve lipid içeriği ile karakterize edilmektedir. Alkol fermantasyonunun istenen şekilde tamamlanmasının ise; üzüm suyu bileşimindeki çeşitliliğe bağlı olduğu belirtilmektedir. Şıradaki bulunan bileşenlerin mayanın fermantasyon kapasitesini etkileyebileceği ve duran fermantasyonlara ya da şarap kalitesini kötü etkileyebilecek bileşiklerin yüksek miktarda oluşmasına neden olabileceği bildirilmektedir. Son yıllarda, üzüm şirasının fermantasyonu sırasında maya fizyolojisi ve mayaların çeşitli besinsel ve çevresel faktörlere verdikleri cevaplar konusundaki çalışmalarda önemli artışlar olduğu gözlenmektedir. Bu çalışmalar sayesinde alkol fermantasyonlarının daha iyi yönlendirilebildiği görülmektedir. Ancak üretimi geliştirmek ve suş seçimindeki veya genetik mühendislikteki hedefleri daha iyi tanımlayabilmek için daha fazla bilgiye gereksinim olduğu da ifade edilmektedir (4).

Üzümlerdeki maya ekolojisi

Üzüm ve şarap ekosistemi ile ilişkili oldukları belirtilen mayalar 16 farklı maya cinsi içerisinde sınıflan-

dırılmaktadırlar. Bunlar; *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota* ve *Zygosaccharomyces* cinsleridir (3, 5-7). Üzümler, şarap üretilen ortamlarda bulunan mayaların en önemli kaynağı olarak kabul edilmektedirler. Buna bağlı olarak üzümde gerçekleşen ekolojik etkileşimler şaraphanede gözlenen maya türü dağılımını doğrudan etkilemektedir. Üzüm tanelerindeki maya florası ve yükü; üzüm çeşidi, üzümün hasat zamanındaki olgunluğu, sıcaklık ve yağış miktarı gibi iklim koşulları, üzüm bağının coğrafi yeri, üzümün yetiştirildiği toprak çeşidi, üzümdeki fiziksel hasar durumu ve antifungal uygulamaları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (3, 8, 9). Olgunlaşmamış üzüm tanelerinde genellikle çok az sayıda (10^1 - 10^3 kob/g) mayaya rastlanmaktadır. Fakat bu sayının üzüm olgunlaştıkça ve hasat dönemine yaklaşıldıkça 10^4 - 10^6 kob/g düzeyine ulaştığı belirtilmektedir. Olgunlaşma sırasında şekerlerin üzümün iç dokularından yüzeye doğru sızarak veya difüze olarak maya gelişmesini teşvik ettiği ifade edilmektedir. Olgunlaşmamış üzümde *Rhodotorula*, *Cryptococcus* ve *Candida* türleri ile maya benzeri bir küf olan *Aureobasidium pullulans*'ın daha çok bulunduğu belirtilmektedir (9).

Bağda, mayaların topraktan üzüme çeşitli böcekler (*Drosophila* spp., bal arısı, yaban arısı, vb.) veya rüzgar aracılığı ile taşınabildikleri bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan tüm çalışmalarda, sağlıklı üzümdeki mayaların *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apiculata* türleri ile *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula* cinsleri içerisinde yer alan oksidatif türler oldukları bildirilmektedir. Bu maya popülasyonunun %60'dan fazlasını *K. apiculata* veya onun askospor oluşturan telemorfu olan *Hsp. uvarum* türlerinin oluşturdukları belirtilmektedir. Buna karşılık *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer alan fermantatif türlerin, özellikle *Saccharomyces cerevisiae*'nın sağlıklı, hasar görmemiş üzümde oldukça düşük sayılarda buldukları ifade edilmektedir. Hasar görmüş üzümün ise; en önemli *S. cerevisiae* kaynaklarından biri olduğu rapor edilmektedir (8, 9). Yapılan çalışmalarda *S. cerevisiae*'nin bağ toprağı ve olgun üzümün yüzeylerinden çok zor izole edilebildiği belirtilmektedir. *S. cerevisiae* suşlarının üzüm tanelerinin yüzeylerinde düşük sayıda bulunmaları nedeni ile

direkt ekim yöntemleri ile izole edilmelerinin güç olduğu, ancak ön zenginleştirme işlemi uygulandığında izole edilebildikleri rapor edilmektedir. Spontan endüstriyel fermantasyonlardan sorumlu *S. cerevisiae*'nin kaynağı, hala tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Üzüm florasında az sayıda bulunmaları, bazı araştırmacılar tarafından doğal kaynaklarının şarap fabrikaları olduğu şeklinde yorumlanmaktadır. Bunun nedeni olarak da *S. cerevisiae*'nin fabrika duvarlarından ve aletlerin yüzeylerinden sıkça izole edilmeleri gösterilmektedir (9). Diğer taraftan Mortimer ve Posinelli (10), üzüm tanelerinin zengin *S. cerevisiae* kaynağı olduklarını ve şırada 10^2 - 10^3 hücre/mL düzeyinde başlangıç aşılama miktarı oluşturabildiklerini rapor etmektedirler. Bu sonuç, *S. cerevisiae* hücrelerinin kaynağının bağ olabileceği fikrini desteklemektedir. Enolojik koşullara ve uygulamalara bağlı olarak, her bir maya kaynağının önemi oldukça değişmektedir. Hasat yöntemi (elle veya mekanik olarak), sıcaklık, taşıma-aktarma süresi, SO_2 miktarı ve işleme yöntemi gibi birçok faktörün üzümlerdeki maya florasının dinamiği ve dolayısıyla şarap aroması üzerinde etkisi bulunmaktadır (7, 11). Her ne koşulda olursa olsun, üzümün hasat edilmesinden birkaç gün sonra, şarap üretim ekipmanları ve şekerle kaplı tüm yüzeylere *S. cerevisiae*'nin yerleştiği ve bu nedenle de alet-ekipmandan kaynaklanan aşılamanın/kontaminasyonun önem taşıdığı belirtilmektedir (7).

Alkol fermantasyonu

Mayalar, şarap fermantasyonu sırasında gerçekleştirdikleri alkol fermantasyonu ile şarap aromasının oluşumundaki en önemli aktivitelerini yerine getirmektedirler. Mayalar bu etkiyi, sahip oldukları çeşitli mekanizmalar yolu ile gerçekleştirmektedirler. Bu mekanizmalar arasında; (i) üzüm suyu bileşenlerini kullanma, (ii) üzüm yapısından aroma bileşenlerini ekstrakte etmeye yardımcı olan etanol ve diğer çözücülerini üretme, (iii) aroması nötral üzüm bileşenlerini aroma aktif bileşenlere dönüştüren enzimleri üretme, (iv) birçok aroma aktif ikincil metabolitleri üretme ve (v) ölü maya hücrelerinin otolitik olarak parçalanmasını sağlama yer almaktadır. Şarap fermantasyonu, farklı maya türleri ve suşlarının birlikte gelişmeleri ve biyokimyasal aktiviteleri ile oluşan karmaşık bir ekosistemdir. Bu mayaların kaynağının (i) üzüm florası, (ii) şaraphane yüzeyleri ile çevresi (örneğin hava, böcekler) ve

(iii) eğer kullanılıyorsa eklenen starter kültür olabileceği belirtilmektedir (9).

Geleneksel; spontan şarap fermantasyonu, başlangıçta üzüm şirasında bulunan şarap mayaları tarafından gerçekleştirilmektedir. Üzüm şirasında gerçekleşen spontan alkol fermantasyonu, temel şarap mayası olarak kabul edilen *S. cerevisiae*'nin dışında, üzümde, şırada ve şarapta bulunan ve şarap aromasına katkıda bulunan farklı maya cinsleri ve türlerinin sıra ile katıldıkları karmaşık bir işlem olarak tanımlanmaktadır (12). Şarap mayaları, özellikle *S. cerevisiae* ve onunla ilişkili türlerin üzüm şirasındaki şekerlerin fermantasyonunda önemli role sahip oldukları bilinmektedir. *S. cerevisiae* üzüm şirasında güçlü fermantasyon kapasitesine sahip olduğu ve hoş bir fermantasyon bukesi üretebildiği için şarap fermantasyonlarında tercih edilmekte ve genellikle "şarap mayası" olarak adlandırılmaktadır. Fermantasyon bir kez başladığında, oluşan anaerobik koşullar şıradaki seçici özelliklere katkıda bulunmakta ve küfler ile asetik asit bakterileri gibi fermantatif metabolizmaya sahip olmayan mikroorganizmalar inhibe olmaktadır. Fermantasyon ilerledikçe şırada bulunan besin öğeleri tükenmekte ve etanol derişimi artarak etanole duyarlı türlerin inhibisyonu gerçekleşmektedir. 20. yy'da şarap üretilen çeşitli bölgelerde gerçekleştirilen araştırmalarda, şıra mikroflorasında *S. cerevisiae*'nin yanısıra diğer maya türlerinin de bulunduğu rapor edilmektedir. *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Candida*, *Metschnikowia* ve *Debaryomyces* cinsi mayaların, üzümün yanısıra şıradan da sıklıkla izole edildikleri bildirilmektedir (4, 6, 7, 9).

Alkol fermantasyonunun ilk aşamalarında düşük fermantasyon güçleri ile karakterize edilen *Saccharomyces* cinsi dışındaki maya türleri baskın olmaktadır. Üzüm şirasının spontan yolla fermantasyonu sırasında, *Hsp. uvarum* (= *K. apiculata*) gibi apiculate mayalarının başlangıçta çok miktarda bulunduğu ve fermantasyonu başlattıkları ifade edilmektedir (7, 13). Ayrıca *Metschnikowia pulcherrima* (= *Candida pulcherrima*), *Debaryomyces hansenii* (= *Candida famata*), *Candida stellata*, *Pichia* spp., *Issatchenkia* spp., *Kluyveromyces* spp. gibi mayaların da fermantasyonun başlangıcına önemli düzeyde katıldıkları ve sayılarının 10^6 - 10^7 kob/mL'ye ulaştığı bildirilmektedir. Apiculate mayalarının, genellikle *S. cerevisiae*'nin daha kolay geliştiği %3-5 etanol düzeyine ulaşınca kadar fermantasyonda baskın durumda oldukları ifade edilmektedir.

Fermantasyonun sonraki aşamalarında apiculate mayalarının yerini *S. cerevisiae*'nin almasının, apiculate mayalarının düşük etanol toleransları ve sırada bulunan bütün şekerleri fermente edememeleri ile ilgili olduğu bildirilmektedir (6, 7, 9, 14, 15). Bu koşullar altında etanolü daha çok tolere edebilen ve yüksek şeker derişimine sahip ortamlarda daha yarışıl gelişme gösterebilen *S. cerevisiae* suşları ile onunla ilgili türlerin daha baskın mayalar olarak ortaya çıktıkları (10^7 - 10^8 kob/mL) ve fermantasyon işlemini tamamladıkları bilinmektedir. Fermantasyonun sonlarına doğru *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces uvarum*, *Hansenula anomala* ve *Pichia fermentans* gibi maya türlerinin de ortamda buldukları bildirilmektedir (9, 12, 13). Ayrıca *Torulasporea delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces ludwigii*, *M. pulcherrima* ve bazı *Schizosaccharomyces* ve *Brettanomyces* türleri gibi birçok mayanın da bu koşullarda gelişebildikleri ifade edilmektedir (7). Düşük sıcaklıkta fermantasyon gibi bazı enolojik uygulamaların, *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların fermantasyona katılımını arttırabileceği belirtilmektedir (4, 6, 12). 15-20 °C'nin altındaki fermantasyonlarda bu mayaların etanole duyarlılıklarının azaldığı ve özellikle *Hanseniaspora* ve *Candida* türlerinin fermantasyona katılımlarının arttığı bildirilmektedir. Bu tür durumlarda bu mayaların fermantasyonun sonuna kadar *S. cerevisiae* ile birlikte baskın florada yer alabildikleri ve şarap aroması üzerinde daha çok etkileri olduğu ifade edilmektedir. (9, 16).

Saccharomyces cinsi dışındaki maya türlerinin fazla miktarda gelişmelerinin ise; şarapların kimyasal bileşimi ve duyuşsal kalitesi üzerinde etkileri olabileceği bildirilmektedir. Bu mayaların, 10^6 - 10^7 hücre/mL düzeyine erişebildikleri için fermantasyona katılabildikleri ve *Saccharomyces* mayalarının gelişme kinetiklerini ve metabolizmalarını etkileyebildikleri bildirilmektedir. *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların aerobik gelişmenin yanı sıra anaerobik gelişme de gösterebildikleri ve fermantasyon sırasında ortamda bulunarak besinsel öğeler için *Saccharomyces* cinsi mayalar ile rekabet ettikleri, etanol ve karbondioksitin yanı sıra şarabın son bukesi üzerinde etkili yüksek alkoller, esterler, asitler ve karbonil bileşikler olarak bilinen ikincil bileşikler üretebildikleri bilinmektedir. (12, 15). Ancak *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların yüksek miktarda asetik asit, etil asetat veya diğer uygun olmayan bileşikler üreterek şarap kalitesini olumsuz yönde etkileyebilecekleri de ifade

edilmektedir. Buna karşılık bazı şarap üreticileri, yabancı mayaların şarap aromasına katkıda bulunabileceklerini düşünerek spontan fermantasyon uygulamasına devam etmektedirler (12).

Mayaların şarap kalitesi açısından önemleri anlaşıldıktan sonra, tek bir hücreden üretilen mayaların izolasyonu için yeni bir teknik geliştirme yoluna gidilmiştir. 1890 yılında, Muller-Thurgau tarafından yapılan bir çalışmada saf bir maya kültürü üzüm suyuna aşlanarak şarap üretildiği belirtilmektedir (7). Daha sonraki aşamalarda ise; maya suşlarının seçilmesi ve fermantasyonlarda starter kültür olarak kullanılmak üzere ticarileştirilmesinin gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu şekilde elde edilen bir starter kültür kulanılarak şarap kalitesinin sürdürülebilirliğinin geliştiği ifade edilmektedir. Otuz yıla yakın bir süredir Avusturalya, Güney Afrika ve ABD gibi şarap üreticisi ülkelerde, geleneksel şarap üretim tekniğinin modifiye edilerek, özellikle büyük kapasiteli şarap üretimlerinde üzüm suyuna *S. cerevisiae* kültürü aşılama tekniğinin kullanıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, çoğu şarap üreticisinin hala spontan yol ile şarap üretimini tercih ettikleri görülmektedir. Ayrıca Avrupa'daki şarap fabrikalarında doğal fermantasyonla üretimin devam ettiği ve dünyadaki şarapların %80'inin bu yöntemle üretildiği belirtilmektedir (7).

Starter kültür kullanılarak yönlendirilmiş şarap fermantasyonlarının en önemli olumsuz özellikleri arasında, çok sayıda ticari şarap mayası olmasına rağmen bu kültürler kullanıldığında alışıl gelmiş özelliklere sahip şarap üretilmesi yer almaktadır. Ticari maya suşları ile orta kalitede şarap üretilebildiği ve bu mayaların özel coğrafi bölgelerden izole edilen mayalara özgü aromatik özellikler geliştiremedikleri belirtilmektedir. Bu sorunu çözebilecek şarap mayalarının geliştirilmesi ve seçimi üzerine yapılan çalışmaların ise hala devam ettikleri gözlenmektedir (3, 7).

Şarap fermantasyonlarında endojen mayaların kullanımı

Şarap üretilen bir bölgedeki spontan popülasyon dinamiği, karakteristik özelliklere sahip şarap üretimi için göz önünde bulundurulması gereken koşullar hakkında bilgi sağlayabilmektedir. Belirli bir bölgedeki şaraba işlenen üzümlerden izole edilen endojen mayaların spesifik çevre koşullarına ve substratlara daha iyi adapte olabildikleri bildirilmektedir (14). Uzun süre bağlık olarak kullanı-

lan bir çevrede yıllar boyunca bağ topraklarının mikrofloralarında daha çok üstün nitelikli *Saccharomyces* türlerinin yerleştikleri ve diğer yabancı mayaların elimine edilmiş olabilecekleri belirtilmektedir. Bu durumda spontan fermantasyon yolu ile özel karaktere sahip üstün nitelikli kaliteli şarap elde edilebileceği ifade edilmektedir (13).

Şarap üretiminde özel olarak seçilmiş maya türlerinin kullanılması ile birçok ülkede çok iyi sonuçlar alındığı belirtilmektedir. Saflaştırıldıktan sonra karakterize edilerek, şarap fabrikalarının kültür koleksiyonuna katılan mayalar ile üretilen son ürünlerin kalitesinin, spontan fermantasyon yolu ile üretilenlerden daha iyi olduğu ifade edilmektedir. Son yıllarda, İspanya gibi geleneksel şarap üretimi yapan ülkelerde, kontrollü şıra fermentasyonu için özel olarak seçilmiş, yerel maya türlerinin kullanımında artış olduğu ifade edilmektedir. Şıra fermentasyonu amacıyla ticari mayaların da kullanılabilmesine rağmen yerel suşların kullanımının daha etkin olduğu bildirilmektedir. Yerel maya suşlarının, çevresel koşullara daha iyi adapte olabilmeleri nedeni ile yarışçıl özelliklerinin daha fazla olduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle yerel suşların fermantasyon sırasında baskın florada yer alabilecekleri ve şarabın oluşumundan sorumlu en önemli biyolojik etmen olabilecekleri ifade edilmektedir. Uygun özelliklere sahip endojen maya türlerinin seçilmesi ile, belirli bir bölge üzümlerinden tipik duysal nitelikler taşıyan şarapların üretilebileceği belirtilmektedir. Seçilen bu maya suşlarının, endüstriyel şarap üretimi için önemli bazı teknolojik özellikleri taşımaları gerekmektedir. Bu özelliklerin ise; üretilecek şarap çeşidi ile birlikte uzmanların görüşlerine bağlı olarak değişebileceği ifade edilmektedir (17).

Mikrobiyoloji ve fermantasyon bilimlerindeki ilerlemeler ile, artık şarap üretimini daha fazla kontrol edebilme olanaklarının geliştiği ifade edilmektedir. Bu amaçla; (i) şarabın bileşimini ve kalitesini belirlemede en önemli katkıyı sağlayan etkenlerden biri olarak kabul edilen, mayanın teknolojik özelliklerinin bilinmesi ve (ii) kullanılacak suşun şıra bileşimine göre seçilmesi (iii) fermantasyon sırasında maya için uygun koşulların yaratılması ya da çevresel koşulların uyarlanması ile mayanın arzulan ürünleri verecek şekilde yönlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir (18). Şarap mayalarının seçiminde temel olarak güçlü gelişme ve fermantasyon kapasitesi, etanol toleransı ve H₂S, asetat gibi istenmeyen

bileşiklerin sınırlı miktarda üretimi gibi özellikler göz önünde bulundurulmaktadır. Bunların yanında; yüksek şeker konsantrasyonuna dayanıklılık, farklı sıcaklık derecelerinde gelişme, şıranın sahip olduğu düşük pH değerinde gelişebilme, farklı şeker türlerini fermente ve asimile edebilme, düşük miktarda köpük oluşturma, etanol üretimi, gliserin üretimi, şarap endüstrisinde kullanılan çeşitli koruyucu maddelere (SO₂, potasyum sorbat gibi) karşı direnç ve killer aktivite özellikleri de dikkate alınmaktadır (2, 17-21). Mayaların enzim aktivitelerinin belirlenmesinin de üretilecek şarapların karakteristik özelliklerini geliştirebilecek önemli teknolojik özellikler arasında yer aldığı belirtilmektedir. Şarap üretiminde önem taşıyan başlıca enzim grupları arasında ise; proteazlar, glukonazlar ve glukozidazlar ile pektolitik ve selüloolitik enzimler sayılmaktadır. Mayalar tarafından üretilen bu enzimlerin şarap aromasının oluşumunda önemli role sahip oldukları ifade edilmektedir (13, 22, 23).

Mayalar ve fermantasyon ortamı arasındaki etkileşimin yanısıra mayaların şarap kalitesi üzerindeki etkisinin iyi anlaşılmasının sonucu olarak da, maya seçimi sırasında yeni kriterlerin oluştuğu ve belirli bir şarap çeşidi ve şarap işleme koşulu için daha iyi uyum sağlayabilen suşların belirlenmeye çalışıldığı bildirilmektedir. Bu hedeflerden bazılarının klasik suş seçimi yöntemleri ile gerçekleştirilebildiği ancak bazı özel yaklaşımların sadece gen transfer teknolojisi ile mümkün olabileceği ifade edilmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda bu teknolojilerin şarap mayalarının özelliklerini geliştirebilme potansiyeline sahip oldukları da görülmektedir (4).

Alternatif şarap mayalarının seçimi ve çoklu starter kültür kullanımı

Şarap üretimi amacı ile seçilen *S. cerevisiae* suşları diğer mayalardan; üzüm suyunu kuvvetli fermente edebilme, ortamda çok az miktarda fermente olmamış şeker bırakma ve yüksek etanol derişimine sahip şarap üretebilme özellikleri ile ayırt edilmektedirler. Ancak bu mayalar ile genellikle belirli aromatik profile sahip şarapların üretilebildiği görülmektedir. Enolojik olmayan ortamlardan izole edilen *S. cerevisiae* suşları ve *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların, şarabın duysal özelliklerini olumlu yönde etkileyebilecek farklı/ilginç ve yeni enolojik karakterlere sahip olabildikleri belirtilmektedir. Ancak bu mayaların genellikle üzüm suyunu etkin bir şekilde fermente edemedikleri

için şarap fermantasyonlarında starter kültür olarak kullanılmadıkları ifade edilmektedir. Fakat bu suşların maya geliştirme programlarında ata (parental) suş olarak başarılı bir şekilde kullanılabilirler bildirilmektedir (7).

Farklı ortamlardan izole edilen maya suşlarının enolojik olarak kullanılabilme potansiyellerinde son zamanlarda bir artış olduğu gözlenmektedir. Örneğin bir araştırmada, Parmesan peynir altı sudan elde edilen *S. cerevisiae* suşlarının enolojik özellikler açısından incelemelerinin gerçekleştirildiği bildirilmektedir. Bu suşların en belirgin özelliklerinin ise; üzüm suyundaki malik asidi parçalayabilme yetenekleri olduğu belirtilmektedir. Suşların, bu bileşiğin başlangıç derişimini %50'ye kadar azaltabildikleri ifade edilmektedir (7). Malik asidi parçalama yeteneği, özellikle asitliği oldukça yüksek olan ve soğuk iklime sahip bölgelerde üretilen şaraplar için tercih edilen bir özellik olarak tanımlanmaktadır. Şarap kültürü olarak kullanılan *S. cerevisiae* suşlarının ise, genellikle üzüm suyunda bu düzeyde etkin bir asitliği giderme özelliği gösteremedikleri belirtilmektedir (7, 24).

S. cerevisiae'nin yanı sıra üzüm suyu ve şaraptan kolaylıkla izole edilebilen *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer alan mayaların, genellikle *Saccharomyces uvarum* türüne ait oldukları bildirilmektedir. Bu suşların düşük sıcaklıklarda (6-10°C) kuvvetli fermantasyon yaptıkları ve soğukta muhafaza edilen üzüm sularında fermantasyonun başlamasından sorumlu oldukları belirtilmektedir. Bu mayaların en önemli enolojik karakteristiklerinin malik asit sentezleme yetenekleri olduğu ifade edilmektedir. Malik asit miktarındaki artışın, üzüm suyu asitliğinin yetersiz olduğu, sıcak iklime sahip bölgelerde üretilen şarapların asitliğinin geliştirilmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra suşların, düşük derişimde asetik asit ve yüksek derişimde gliserin ve süksinik asit üreterek şarapların aromatik profillerinin geliştirilmesinde önemli role sahip oldukları ifade edilmektedir (4, 24). *S. uvarum* suşlarının, *S. cerevisiae* suşlarına kıyasla daha düşük miktarda etanol ürettikleri bildirilmektedir. Aynı zamanda bu türe ait maya suşlarının şarabın aromatik özelliklerini bozabilecek miktarda yüksek alkoller, özellikle β -feniletanolü ürettikleri belirtilmektedir. *S. uvarum* suşlarının şarap fermantasyonlarında starter kültür olarak kullanıldıkları bilinmektedir. Ancak bu kültürlerin şarap üretimi için gerekli optimum karakteristiklere sahip olabilmeleri için moleküler yöntemler

kullanılarak genetik olarak geliştirilmeleri gerektiği ifade edilmektedir (7).

Hemen hemen tüm spontan fermantasyonların sonunda *S. cerevisiae* baskın olsa da, yapılan son çalışmalarda düşük sıcaklıklardaki fermantasyonlardan onunla ilgili bir tür olan *Saccharomyces bayanus*'un, özellikle *uvarum* varyetesinin (*Saccharomyces uvarum*) sorumlu olduğu gösterilmektedir (25). *S. uvarum* (= *S. bayanus*)'un katkısının muhtemelen soğuk şarap üretim bölgeleri ve uygulamaları ile sınırlı olduğu ve bu türün kryotolerant özellik taşıması ile bağlantısı olduğu ifade edilmektedir. Bazı spesifik aromatik özelliklere sahip olmaları nedeniyle bu tür mayaların üretime katılmalarının şaraba ayırt edici bir duyuşsal karakter kazandıracığı düşünülmektedir (4). Ancak spontan fermantasyon yolu ile üretilen şaraplarda genellikle fermantasyonun tamamlanamadığı ve kabul edilemeyecek kadar yüksek miktarda (>2-5 g/L) fermente olmamış şekerin şarapta kalabildiği ifade edilmektedir. Bu tür fermantasyonlar genellikle ağırlaşmış veya durmuş fermantasyon olarak adlandırılmakta ve şarap üreticileri için büyük sorunlar yaratmaktadırlar (9).

Saccharomyces cinsi içerisinde yer almayan maya türleri üzüm florasında endojen olarak bulunsalar bile, üzüm suyu fermantasyonu sırasında gelişmeleri çoğunlukla istenmemektedir. Bu mayaların etanolü tolere edemedikleri, SO_2 'ye duyarlı oldukları ve yüksek derişimde asetik asit ve etil asetat ürettikleri rapor edilmektedir (6). Bu nedenlerden dolayı *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların şarap üretimi için uygun olmadıkları ve şarap mayası seçimi ile ilgili çalışmalarda tercih edilmedikleri belirtilmektedir. Buna karşılık yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda, *Saccharomyces* cinsi dışındaki endojen şarap mayalarının şarap üretimindeki rollerinin yeniden değerlendirilmesi gerektiği ifade edilmektedir. Bu mayaların starter kültür kullanılmayan ve kullanılmayan fermantasyonlardaki varlıkları ve kalıcıkları konusunda yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır (5). *Candida*, *Kloeckera* ve *Hanseniaspora* cinsleri içerisinde yer alan bazı maya türlerinin özellikle şarabın aromatik karakteristiklerini geliştirdikleri, şaraba kompleks ve yeni aroma özellikleri kazandırdıkları belirtilmektedir (6, 26, 27). Ancak çoklu starter kültürlerin kullanıldığı durumlarda ortam koşullarının daha iyi tanımlanması gerektiği bildirilmekte ve bu konuda birçok çalışmanın yapıldığı gözlenmektedir (26).

Saccharomyces cinsi dışındaki endojen şarap mayalarının genellikle yüksek derişimde esterler, yüksek alkoller, aldehitler ve gliserin gibi şarabın duysal profilini belirleyen bileşikler ürettikleri bilinmektedir. Bu tür bileşiklerin üretimlerinin farklı maya türlerine göre değiştikleri ifade edilmektedir. Örneğin *C. stellata* ve *K. apiculata* türlerinin yüksek derişimde gliserin, *Candida colliculosa* suşlarının ise yüksek derişimde asetaldehit ve n-propanol ürettikleri belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada, *C. stellata*'nın bir suşu ile aşıl原因an üzüm suyundan elde edilen şarapta gliserin, asetik asit ve etil asetat derişimlerinde artış olduğu belirtilmektedir. Elde edilen şarap *S. cerevisiae* kullanılarak üretilen bir başka şarap ile duysal özellikleri açısından karşılaştırıldığında; *C. stellata* ile üretilenin daha yoğun bal, kayısı, lahana turşusu ve etil asetat aromasına sahip olduğu belirtilmektedir. Bu şarabın ıhlamur, muz ve çiçek aromalarının ise daha az olduğu rapor edilmektedir. Bir başka çalışmada ise, *Debaryomyces vanrijii* türüne ait bir maya suşunun yüksek düzeydeki β -glukozidaz enzimi ile şaraptaki aroma bileşiklerini arttırdığı ifade edilmektedir (7).

Ciani ve Maccarelli (26) tarafından yapılan bir çalışmada, *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer almayan mayalardan *Ip. delbrueckii*, *C. stellata*, *Hsp. uvarum* ve *Kluyveromyces apiculata* türleri enolojik özellikleri açısından incelemeye alınmıştır. Çalışmada, özellikle *Ip. delbrueckii* ve *C. stellata* türü mayaların şarap fermantasyonunu ve aromatik özelliklerini olumlu yönde etkiledikleri rapor edilmektedir. Apiculate mayalarının ise; yüksek miktarda aseton ve etil asetat üretmeleri nedeni ile şarap aromasında olumsuzluklara neden olabilecekleri ifade edilmektedir (26).

Ciani vd (5) tarafından yapılan bir başka çalışmada; *Hsp. uvarum*, *Ip. delbrueckii* ve *Kly. thermotolerans* türleri *S. cerevisiae* ile birlikte çoklu starter kültür olarak kullanılmıştır. Yüksek şeker içeriğine sahip üzüm şıralarında gerçekleştirilen çalışmada, karışık kültürlerin kullanıldığı denemelerde *S. cerevisiae*'nin saf kültürleri ile yapılan denemelere göre daha iyi veya karşılaştırılabilir düzeyde bir fermantasyon davranışı ve şarap bileşimi gözleendiği belirtilmektedir. Buna karşılık aynı çalışmada *Ip. delbrueckii* ve *Kly. thermotolerans* kültürlerinin sıralı olarak kullanıldığı denemelerin ağırlaşmış fermantasyon ile sonuçlandığı, *Hsp. uvarum*'un kullanıldığı denemelerin ise; etil asetat içeriğinde

kabul edilemeyecek düzeyde artışa neden olduğu ifade edilmektedir (5).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer almayan maya türlerinin şarabın duysal özelliklerinde oluşturdıkları farklılıklar vurgulanmaktadır (27, 28). Bazı araştırmacılar bu farklılıkların, *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer almayan mayaların esteraz, glukozidaz, lipaz, proteaz ve selülozlar gibi enzimleri üretmeleri ile ilişkilendirmektedirler. Bu enzimlerin üzümdeki öncül bileşiklerle etkileşime girip şarap aromasında çeşitliliği sağlayan aroma aktif bileşiklerinin üretimine yol açtıkları ifade edilmektedir. Şarap mayası olarak bilinen *S. cerevisiae*'nin ise; hücre dışı enzim üretme özelliğinin zayıf olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle üzüm florasında bulunan ve hücre dışı hidrolitik enzim üretme özelliğine sahip maya türlerinin şarap üretimi açısından önem taşıdıkları bildirilmektedir (11).

Zohre ve Erten (15) tarafından yapılan bir çalışmada, *K. apiculata*, *C. pulcherrima* ve *S. cerevisiae* türlerinin saf ve karışık kültürlerinin şarap fermantasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, fermantasyonun sonunda *S. cerevisiae* baskın olarak bulunsada *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların da karışık kültürlerde önemli düzeyde gelişme ve canlılık gösterdikleri belirtilmektedir. En yüksek etanol üretiminin saf *S. cerevisiae* kültürü ile sağlandığı, ancak karışık kültürlerle de yüksek miktarda etanol üretilebildiği rapor edilmektedir. *K. apiculata* ve *C. pulcherrima* türlerinin tek başlarına kullanıldıkları denemelerde ise; düşük etanol, yüksek kalıntı şeker ve yüksek etil asetat miktarlarının belirlendiği ifade edilmektedir. Karışık kültürler ile gerçekleştirilen denemelerdeki etil asetat miktarının ise; saf *S. cerevisiae* kültürünün kullanıldığı denemelere göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Karışık kültürlerin kullanıldığı denemelerdeki diğer uçucu bileşiklerin miktarlarının da kabul edilebilir düzeyde oldukları belirtilmektedir (15).

Toro ve Vazquez (29) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise; Syrah şarabı karakteristikleri üzerine *Candida cantarelli* ve *S. cerevisiae* kültürlerinin saf, karışık ve sıralı olarak aşıl原因malarının etkileri araştırılmıştır. Çalışmada karışık ve sıralı kültürlerin kullanıldığı denemelerdeki gliserin ve etanol miktarlarının saf *S. cerevisiae* kültürleri kullanılan denemelerdekine göre, daha yüksek oldukları belir-

tilmektedir. Karışık ve sıralı kültürlerin kullanıldığı örneklerin bileşimlerinde farklı olarak gözlenen asetoin, propanol ve süksinik asitin enolojik olarak uygun oldukları ifade edilmektedir. Araştırmada, Syrah şarabına özgü önemli karakteristik özelliklerin oluşturulabilmesi için, *C. cantarelli* ve *S. cerevisiae* karışık kültürlerinin kullanımının daha verimli olabileceği vurgulanmaktadır (29).

Saccharomyces cinsi dışındaki maya türlerinin fermantasyonun ilk aşamalarında şarapta doğal olarak buldukları ve etanol derişimi %4-5'e ulaştınca gelişmelerinin inhibe oldukları bilinmektedir. Etanole duyarlılıkları nedeni ile *Saccharomyces* cinsi dışındaki şarap maya suşlarının, şarap üretiminde fermantasyonun tamamlanmasını sağlamak için sadece *S. cerevisiae* gibi etanole toleranslı suşlarla birlikte starter kültür olarak kullanılabilirler belirtilmektedir. Bu amaçla, üzüm suyuna maya aşılmasının *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayalar ile kuvvetli *S. cerevisiae* şarap suşunun karışık kültürleriyle yapılabileceği ifade edilmektedir. Bir başka yöntemde ise; mayaların ortama sıralı olarak aşılmasını önerilmektedir. Bu amaçla; ortama önce *Saccharomyces* cinsi dışındaki maya suşunun aşılabilmesi, bunu takiben *S. cerevisiae* suşu ile aşılamanın gerçekleştirilebileceği ifade edilmektedir (14-16).

Saccharomyces cinsi içerisinde yer almayan maya türlerinin giderek artan oranda, ABD ve Avustralya'daki ticari şarap üretimlerinde kullanıldıkları bildirilmektedir. Bu uygulamanın, sonucu tahmin edilemeyen ve genellikle bu nedenle problem oluşturan spontan fermantasyon yöntemine karşı iyi bir seçenek olduğu belirtilmektedir. *Saccharomyces* cinsi dışındaki bu mayaların, şarapta endojen olarak bulunmaları nedeniyle belirli bir bölgeye özgü şarapların kendilerine özgü karakteristiklerinin geliştirilmesine katkıda oldukları da ifade edilmektedir (2, 7).

SONUÇ

Şarap fermantasyonu sırasında starter olarak seçilmiş maya kültürlerinin kullanılmasının aroma ve kalite açısından daha standart bir şarap üretimini sağladığı bilinmektedir. Şarap endüstrisinde fermantasyon işlemi sırasında şarabın aroma ve tadına belirli karakteristikleri katabilecek yeni şarap suşlarının seçimi üzerine yoğun çalışmalar yapıldığı görülmektedir. Buna ek olarak, şarap endüst-

risinde şu sıralarda görülen eğilim; şarap kalitesini geliştirmek amacı ile yeni teknolojiler geliştirme ve *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların karışık ya da sıralı olarak *S. cerevisiae* ile birlikte kullanılması yönündedir. Bu nedenle çoklu starter kültürlerin kullanılması olasılıklarının araştırıldığı bir çok çalışma yapıldığı gözlenmektedir. Bu tür çalışmaların, çoklu starter kültür kullanılan fermantasyonlarda her bir suşun özelliğine bağlı olarak şarap üretimi sırasında oluşan kompleks aroma özelliklerini geliştirmek için yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda öne çıkan endojen çoklu starter kültürler kullanılarak üretilen şarapların, *S. cerevisiae* kültürlerinin tek başlarına kullanıldığı yönlendirilmiş fermantasyon ile üretilen şaraplara iyi birer alternatif olabilecekleri tahmin edilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Fleet GH. 2002. The microorganisms of winemaking-isolation, enumeration and identification. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, GH Fleet (eds), pp. 1-26, Taylor&Francis Inc, London.
2. Esteve-Zarzoso B, Gostincar A, Bobet R, Uruburu F, Querol A. 2000. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from "El Penedes" area (Spain). *Food Microb.*, 17: 553-562.
3. Raspor P, Milek DM, Polanc J, Možina SS, Čadež N. 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int. J. Food Microb.*, 109, 97-102.
4. Dequin S, Salmon JM, Nguyen HV, Blondin B. 2003. Wine yeasts. In *Yeasts in Food*, T Boekhout and V Robert (eds), pp. 389-425, Woodhead Publishing Limited, Hamburg.
5. Ciani M, Beco L, Comitini F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, 108, 239-245.
6. Fleet GH, Heard GM. 2002. Yeasts-Growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, GH Fleet (eds), pp. 27-54, Taylor&Francis Inc, London.
7. Rainieri S, Pretorius IS. 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.*, 50, 15-31.
8. Schuller D, Alves H, Dequin S, Casal M. 2005. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde region of Portugal. *FEMS Microb. Ecol.*, 51 (2), 167-177.
9. Fleet G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 11-22.

10. Mortimer R, Polsinelli M. 1999. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.*, 150, 199-204.
11. Strauss MLA, Jolly NP, Lambrechts MG, van Rensburg P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 182-190.
12. Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M, Capece A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 169-180.
13. Aktan N, Kalkan H. 2000. Şarap Teknolojisi. Kavaklıdere Eğitim Yayınları, No:4, 614 s, Ankara.
14. Clemente-Jimenez JM, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Heras-Vázquez, FJL, Rodríguez-Vico F. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microb.*, 21, 149-155.
15. Zohre DE, Erten H. 2002. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochem.*, 38, 319-324.
16. Erten H. 2002. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 373-378.
17. Regodon JA, Perez F, Valdes ME, De Miguel C, Ramirez M. 1997. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microb.*, 14, 247-254.
18. Özçelik F, Denli Y. 1999. Şarap mayalarının teknolojik özellikleri. *Gıda*, 24 (6), 385-389.
19. Deák T, Beuchat LR, 1996. Handbook of Food Spoilage Yeasts, CRC Press, 210 pp, USA.
20. Iranzo JFU, Pérez AIB, Cañas PMI. 1998. Study of oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. *Food Microb.*, 15, 399-406.
21. Nikolaou E, Soufleros EH, Boulompasi E, Tzanetakis N. 2006. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiol.*, 23, 205-211.
22. Fiore C. 2003. Enzymatic activities in various yeast species and strains of wine origin. Book of Abstracts 23rd International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest.
23. Canal-Llauberes RM. 2002. Enzymes in Winemaking. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, GH Fleet (eds), pp. 477-506, Taylor&Francis Inc, London.
24. Delfini C, Formica JV. 2001. *Wine Microbiology Science and Technology*, Marcel Dekker, Inc., 490 pp, Italy.
25. Naumov GI, Masneuf I, Naumova E, Aigle M, Dubourdieu D. 2000. Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Res. Microbiol.*, 151, 683-691.
26. Ciani M, Maccarelli F. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with winemaking. *World J. Microbiol. Biotech.*, 14, 199-203.
27. Henick-Kling T, Edinger W, Daniel P, Monk P. 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 865-876.
28. Egli CM, Edinger WD, Mitrakul CM, Henick-Kling T. 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.*, 85, 779-789.
29. Toro ME, Vazquez F. 2002. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarelli* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World J. Microbiol. Biotech.*, 18, 347-354.