

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep Dilan ÇELİK

**MALOLAKTİK FERMANTASYON'UN VE İKİ FARKLI MALOLAKTİK
BAKTERİ KÜLTÜRÜNÜN(*Oenococcus oeni* VP41, *Oenococcus oeni* PN4),
KALECİK KARASI ŞARABININ AROMA BİLEŞİKLERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2012

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MALOLAKTİK FERMANTASYON'UN VE İKİ FARKLI MALOLAKTİK
BAKTERİ KÜLTÜRÜNÜN(*Oenococcus oeni* VP41, *Oenococcus oeni* PN4),
KALECİK KARASI ŞARABININ AROMA BİLEŞİKLERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Zeynep Dilan ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 12/06/2012 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği İle Kabul Edilmiştir.

.....
Prof.Dr. Turgut CABAROĞLU
DANIŞMAN

.....
Prof.Dr.Hüseyin ERTEN
ÜYE

.....
Yard.Doç. Haşim KELEBEK
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof.Dr. M. Rifat ULUSOY
Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: ZF2010YL87

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MALOLAKTİK FERMANTASYON'UN VE İKİ FARKLI MALOLAKTİK BAKTERİ KÜLTÜRÜNÜN (*Oenococcus oeni* VP41, *Oenococcus oeni* PN4), KALECİK KARASI ŞARABININ AROMA BİLEŞİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Zeynep Dilan ÇELİK

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

Danışman: Prof. Dr. Turgut CABAROĞLU

Yıl: 2012, Sayfa 63

Jüri : Prof. Dr. Turgut CABAROĞLU

: Prof. Dr. Hüseyin ERTEN

: Yard. Doç. Dr. Haşim KELEBEK

Bu çalışmada malolaktik fermantasyonun (MLF) ve MLF'de kullanılan iki farklı malolaktik bakteri kültürünün (*Oenococcus (O.) oeni* VP41, *O. oeni* PN4), Kalecik Karası şaraplarının aroma bileşikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Şaraplarda aroma bileşikleri sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiş ve GC-MS-FID tekniği ile tanımlanmış ve miktarları belirlenmiştir.

MLF genel olarak şarapların aroma bileşikleri miktarlarını arttırmıştır. Şaraplarda MLF'den önce toplam aroma bileşiği miktarı 84.40 mg/l olarak belirlenmiştir. MLF'den sonra toplam aroma miktarı spontan olarak MLF'ye uğratılmış şarapta 103.63 mg/l'ye, *O. oeni* VP4 suşu kullanılan şarapta 101.80 mg/l'ye ve *O. onei* PN4 suşu kullanılan şarapta 104.39 mg/l'ye yükselmiştir. MLF'de laktik asit bakterilerinin (LAB) etkisi ile, özellikle 2,3-bütandiol, etil laktat, asetik asit, asetoin, asetovanilon ve γ -bütolakton miktarlarında önemli düzeyde artış saptanmıştır. MLF'de kullanılan her iki bakteri kültürünün de şaraplarda diasetil oluşturmadığı ve 2,3-bütandiol, etil laktat, asetik asit, asetoin gibi bileşikleri de spontan MLF'ye göre düşük miktarlarda oluşturduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bakteri kültürü kullanımı, MLF sırasında kötü koku oluşumunu engellemiş ve şarapların aroma bileşimini ve duyuşsal özelliklerini olumlu yönde etkilemiştir.

Anahtar Kelimeler: Kalecik Karası, Kırmızı Şarap, Malolaktik fermantasyon, *Oenococcus oeni*, Aroma Bileşikleri

ABSTRACT

MSc THESIS

EFFECT OF MALOLACTIC FERMENTATION AND TWO DIFFERENT MALOLACTIC STARTER CULTURES (*Oenococcus oeni* VP41, *Oenococcus oeni* PN4) ON THE AROMA COMPOUNDS OF KALECIK KARASI WINES

Zeynep Dilan ÇELİK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Supervisor : Prof. Dr. Turgut CABAROĞLU

Year: 2012, Pages, 63

Jury : Prof. Dr. Turgut CABAROĞLU

: Prof. Dr. Hüseyin ERTEN

: Asst. Prof. Haşim KELEBEK

In this study, the effects of malolactic fermentation (MLF) and two different malolactic starter cultures (*Oenococcus (O.) oeni* VP41, *O. oeni* PN4) on the aroma compounds of Kalecik Karası red wine were investigated. The aroma compounds of wines were extracted by using liquid-liquid extraction method and identified and quantified by GC-MS-FID.

MLF generally increased the amount of wine aroma compounds. The concentration of total aroma compounds in wine was determined as 84.40 mg/l before MLF. After MLF, the level of total aroma compounds increased to 103.63 mg/l in spontaneous wine, 101.80 mg/l in wine inoculated by *O. eoni* VP41 starter culture and 104.39 mg/l in wine inoculated by *O. oeni* PN4 starter culture. The important increase was determined in the amount of 2,3-butandiole, ethyl lactate, acetic acid, acetoin and γ -butyrolactone with inoculation of malolactic starter cultures. It was determined that malolactic starter cultures used did not produce diacetyl and the levels of 2,3-butandiole, ethyl lactate, acetic acid and acetoin produced with the inoculation of malolactic starter cultures were lower compared to spontaneous MLF.

As a result, the use of starter cultures prevented the production of off-flavours and affected positively the aroma composition and sensory characteristic of wines.

Keywords: Kalecik Karası, Red Wine, Malolactic fermentation, *Oenococcus oeni*, Aroma compounds

TEŞEKKÜR

Bu konuda bana çalışma olanağı sağlayan, araŐtırmalarım ve tezimin yazımı sÜresince bana yol gÖsteren danıŐmanım Prof. Dr. Turgut CABAROĞLU'na, jÜri üyesi olarak tezimi değerlendiren sayın hocalarım Prof. Dr. Hüseyin ERTEN ve Yard. Doç. HaŐım KELEBEK'e, tezimin çeşitli aŐamalarında bana yardımcı olan Ar. Gör. Kemal ŐEN, Ar.Gör. Merve DARICI ve Selvihan SERT'e, tüm öğrenim hayatım boyunca maddi, manevi büyük fedakarlıklar yaparak benim bu noktaya gelmemi sağlayan aileme ve dostlarıma teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TANIMLAR VE KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Şaraptaki Aroma Maddeleri.....	5
2.2. MLF ve MLF'nin Şarap Aromasına Etkisi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Hammadde.....	19
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Üzümlerin Şaraba İşlenmesi.....	20
3.2.2. Üzüm Şurasında ve Şarapta Yapılan Analizler.....	22
3.2.2.1. Genel Analizler.....	22
3.2.2.1.(1). Toplam Asit Tayini.....	22
3.2.2.1.(2). pH Tayini.....	22
3.2.2.1.(3). İndirgen Şeker ve Toplam Şeker Tayini.....	22
3.2.2.1.(4). Kuru Madde Tayini.....	22
3.2.2.1.(5). Yoğunluk Tayini.....	23
3.2.2.1.(6). Alkol Tayini.....	23
3.2.2.1.(7). Uçar Asit Tayini.....	23
3.2.2.1.(8). Kükürt Dioksit Tayini.....	23
3.2.2.2. Kağıt Kromotografisi ile Malik asit ve Laktik Tayini.....	23
3.2.2.3. HPLC ile Malik Asit ve Laktik Asit Tayini.....	24
3.2.2.4. Aroma Bileşiklerinin Analizi	24

3.2.2.4.(1). GC-FID, GC-MS Koşulları	25
3.2.2.4.(2). Aroma bileşiklerinin Miktarlarının Hesaplanması....	26
3.2.2.5. Duyusal Analiz.....	26
3.2.2.6. İstatistiksel Analiz.....	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	29
4.1. Kalecik Karası Şarabının Genel Bileşimi.....	29
4.2. Alkol Fermantasyonu ve Malolaktik Fermantasyonun İzlenmesi.....	29
4.2.1. Alkol Fermantasyonunun İzlenmesi.....	29
4.2.2. Malolaktik Fermantasyonun.....	30
4.3. Malolaktik Fermantasyonun Şarapların Genel Bileşimi Üzerine Etkisi.....	34
4.4. Malolaktik Fermantasyonun Şarapların Aroma Bileşikleri Üzerine Etkisi....	36
4.4.1. MLF'nin Yüksek Alkoller Üzerine Etkisi.....	41
4.4.2. MLF'nin Esterler Üzerine Etkisi.....	43
4.4.3. MLF'nin Uçucu Asitler Üzerine Etkisi.....	45
4.4.4. MLF'nin 6C'lu Bileşikler Üzerine Etkisi.....	46
4.4.5. MLF'nin Karbonil Bileşikler Üzerine Etkisi.....	47
4.4.6. MLF'nin Uçucu Fenoller Üzerine Etkisi.....	49
4.4.7. MLF'nin Laktonlar Üzerine Etkisi.....	50
4.5. Şarapların Duyusal Özellikleri.....	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1.KontROLSÜZ MLF SONUCUNDA OLUŞABİLECEK PROBLEMLER.....	13
Çizelge 2.2. Şarapta Bulunan Başlıca Laktik Asit Bakterileri.....	17
Çizelge 4.1. Kalecik Karası Üzüm Şirasının Genel Bileşimi.....	29
Çizelge 4.2. Şarapların Genel Bileşimi.....	34
Çizelge 4.3. MLF'den Önce ve MLF'den Sonra Kalecik Karası Şaraplarının Toplam Aroma Miktarları.....	37
Çizelge 4.4. MLF'nin Kalecik Karası Şaraplarının Aroma Bileşikleri Üzerine Etkisi.....	39
Çizelge 4.5. MLF'de Kullanılan Bakteri Kültürlerinin Kalecik Karası Şaraplarının Aroma Bileşikleri Üzerine Etkisi.....	41
Çizelge 4.6. Şarapların Lezzet Profil Analiz Sonuçları.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil.2.1. Diasetil, Asetoin ve 2,3-Bütandiolün Yapısı.....	9
Şekil 2.2. Sitrik Asit Metabolizması ve Malolaktik Bakteri Tarafından Diasetil Sentezi.....	11
Şekil 2.3. Malik Asitin Laktik Asite Biyodönüşümü.....	15
Şekil 3.1. Kalecik Karası Üzümlü	19
Şekil 3.2. Denemenin Düzenlenmesi.....	21
Şekil.3.3. Kağıt Kromatografisi ile Laktik asit/Malik asit Tayini.....	24
Şekil 3.4. Duyusal Analiz Formu.....	27
Şekil 4.1. Alkol Fermantasyonunun Gidişi.....	30
Şekil4.2. MLF'nin Başlangıç Aşamasına Ait Kağıt Kromatografisi.....	31
Şekil 4.3. MLF'nin Orta Aşamasına Ait Kağıt Kromatografisi.....	32
Şekil 4.4. MLF'nin Son Aşamasına Ait Kağıt Kromatografisi.....	33
Şekil 4.3. Kalecik Karası Şaraplarının Lezzet Profili Diyagramı.....	54

TANIMLAR VE KISALTMALAR

GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GC-FID	: Gaz kromatografisi-alev iyonlaşma dedektörü
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
MLF	: Malolaktik fermantasyon
LAB	: Laktik asit bakterisi
SO ₂	: Kükürt dioksit
<i>O. oeni</i>	: <i>Oenococcus oeni</i>
<i>L. plantarum</i>	: <i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. casei</i>	: <i>Lactobacillus casei</i>
<i>P. damnosus</i>	: <i>Pediococcus damnosus</i>
<i>L. oenos</i>	: <i>Leuconostoc oenos</i>
<i>P. parvulus</i>	: <i>Pediococcus parvulus</i>
<i>P. pentosaceus</i>	: <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Leu. mesenteroides</i>	: <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. mali</i>	: <i>Lactobacillus mali</i>
<i>L. brevis</i>	: <i>Lactobacillus brevis</i>
<i>L. buncheri</i>	: <i>Lactobacillus buncheri</i>
<i>L. fermentum</i>	: <i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>L. fructivorans</i>	: <i>Lactobacillus fructivorans</i>
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>S. bayanus</i>	: <i>Sacharomyces bayanus</i>

1.GİRİŞ

Şarap, bir kısmı veya tamamı ezilmiş taze üzüm şirasının etil alkol fermantasyonuna terk edilmesi sonucu elde edilen alkollü bir içkidir. Şarap üretiminde fermantasyon temel olarak mayaların gerçekleştirdiği etil alkol fermantasyonu ve laktik asit bakterilerinin (LAB) gerçekleştirdiği malolaktik fermantasyon (MLF) olarak iki aşamadan oluşur (Canbaş, 2008).

Şarapta ikinci fermantasyon olarak bilinen MLF genellikle alkol fermantasyonunun ardından meydana gelir. Isı oluşturmeyen bu fermantasyon enzimatik orijindir (Canbaş, 2008). MLF malik asidin laktik asit ve karbondioksit biyodönüşümüdür (Boido ve ark., 2009).

MLF'de iki değerli ve tadı oldukça sert olan malik asit parçalanır ve bir değerli ve daha yumuşak olan laktik asite dönüşür. pH'nın yükselmesi şaraba daha yumuşak bir nitelik kazandırır ve ayrıca rengi değişir. Bu değişiklik sonucu şarabın tadı incelik ve iyileşir. Bunun yanında, malik asitin parçalanması toplam asitlikte önemli bir azalmaya neden olur. Ayrıca tepkime sonunda uçur asit miktarı artabilir ve bazen kokusu hoş olmayan bileşikler oluşabilir (Canbaş, 2008; Constantini ve ark., 2009).

Şaraptaki MLF'de rol oynayan başlıca LAB'ler *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* cinslerine aittir. (Lui, 2002). En sık karşılaşılan türler de *Oenococcus oeni* (*O. oeni*), *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*), *Lactobacillus casei* (*L. casei*), *Pediococcus damnosus* (*P. damnosus*)'dur. Bunlardan *O. oeni* şarapta MLF'de en yaygın olarak bulunan ve kültürü kullanılan bakteri türüdür. Çünkü *O. oeni* düşük pH, yüksek kükürt dioksit (SO₂) ve etil alkol konsantrasyonuna, düşük sıcaklık ve düşük besin konsantrasyonuna diğerlerine göre daha toleranslıdır. LAB için temel substrat malik asit, sitrik asit, pentoz ve heksozdur (Kunkee, 1974 ; Davis ve ark., 1985). LAB Gram (+) pozitifdir ve karbonhidrat metabolizması ile laktik asit üretirler (Krieger, 2005).

Fermantasyonu gerçekleştiren LAB'ın çalışmasını pH, sıcaklık, SO₂ ve alkol gibi faktörler etkilemektedir. pH, şarapta LAB'ın çoğalmalarına etki eden en önemli parametrelerden biridir. Şaraptaki kritik pH 3.5'un altıdır. Çünkü bu değer altında

şarap mikrobiyolojisi kolaylıkla kontrol edilebilir. pH'nın 3.5 ve altı olduğu ortamlarda *O. oeni*, 3.5 üstünde olduğu ortamlarda ise *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinsleri baskındır. Genellikle yüksek pH'larda *Pediococcus* cinsi bakteriler gelişir ve bu bakteriler şarabın bozulmasına neden olabilir (Bauer ve ark., 2004; Fleet ve ark., 1984). SO₂, LAB'nin gelişmesini önler. 30 mg/l ve üstündeki SO₂ konsantrasyonu LAB'ın gelişmesini engeller. Birçok LAB suşu için en yüksek alkol limiti % 14 'dür. Malolaktik bakteriler mezofiliktir ve optimum gelişme sıcaklıkları 15-30 °C arasındadır. MLF'nin başlaması ve devam edebilmesi için pH'nın 3.2-4.0 arasında, serbest SO₂'nin 10 ppm'in altında, sıcaklığın 18-30 °C arasında ve alkolün ise % 13(v/v) 'den düşük olması gerekir (Krieger, 2005).

Kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmeyen MLF şarabın bozulmasına neden olabilir. Saf MLF yalnız malik asidin parçalanmasını sağlar. Saf olmayan spontan fermantasyonda ise malik asit yanında diğer bileşenler ve özellikle şekerler de parçalanır. Bunun sonucunda istenmeyen aroma ve tatlar oluşur (Canbaş, 2008). Şaraplara malolaktik bakteri kültürü aşılması MLF'nin kontrolünü kolaylaştırmaktadır. MLF'de bakteri kültürü kullanılması, spontan MLF sırasında açığa çıkan problemleri önlediği için şarap üreticileri arasında kullanımı yaygınlaşmaktadır (Boido ve ark., 2009).

Aroma maddeleri şarapların duyu kalitesi üzerinde etkili olan önemli bileşenlerden birisidir. Şaraptaki aroma maddelerinin bileşimi ve miktarı kullanılan üzüm çeşidine, fermantasyon öncesinde uygulanan mekanik işlemlere, alkol fermantasyonu koşullarına, MLF ve olgunlaştırma sırasında meydana gelen reaksiyonlara bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterir (Cabaroğlu, 2003). Bunlardan MLF özellikle kırmızı şaraplarda duyu kalite üzerinde belirleyici rol oynayabilmektedir. Kontrolsüz koşullarda gerçekleşen MLF sonunda aşırı tereyağı, ter, ekşi yoğurt ve gliserolde parçalanma sonucunda acı tat oluşabilmekte ve bu özellikler şarabın kalitesini düşürmektedir. Öte yandan bazı şaraplarda MLF çok uzun sürmekte ve aşırı diasetil, asetoin, uçur asit ve laktat oluşumu olabilmektedir. Bu olumsuz gelişmeleri önlemek ve duyu özellikleri geliştirmek için MLF'nin kontrollü bir şekilde yürütülmesi büyük önem taşımaktadır. Bu da öncelikle uygun bir malolaktik bakteri kültürü ile sağlanabilmektedir (Krieger, 2005; Reynolds,

2010). Ülkemizde üretilen kırmızı şaraplarda MLF genellikle kontrolsüz ve spontan olarak gerçekleştirilmekte ve bu durum orta ölçekli işletmelerde ciddi kalite kayıplarına yol açmaktadır. Kalite kaybının yaşandığı çeşitlerden biri de Kalecik Karası şarabıdır. Bilindiği gibi bu çeşit ülkemizde yüksek kalite şarap veren tanınmış siyah çeşitlerden birisidir. Bu çeşitlerden elde edilen şaraplarda MLF uzun sürmekte ve yukarıda bahsedilen sorunlarla zaman zaman karşılaşılmaktadır. Ayrıca ülkemizde malolaktik kültürlerin şarabın aroması üzerine etkisi konusunda yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, malolaktik fermantasyonun ve iki farklı malolaktik bakteri kültürünün (*O. oeni* VP41, *O. oeni* PN4) kullanımının, Kalecik Karası şarabının aroma bileşikleri üzerine etkisini belirlemektir.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Şaraptaki Aroma Maddeleri

Aroma şaraplardaki kaliteyi ve karakteristik özellikleri belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Şarapta bulunan aroma maddelerini kaynaklarına göre 4 grup altında toplamak mümkündür. Bunlar üzümünden gelen aroma maddeleri, üzümün işlenmesi sırasında teknolojik işlemlerden kaynaklanan aroma maddeleri (fermantasyon öncesi aroma), fermentasyon sırasında oluşan aroma maddeleri (alkol ve MLF aroması) ve şarabın olgunlaşması sırasında oluşan aroma maddeleri (olgunluk aroması)'dir (Ribéreau-Gayon ve ark, 2006; Canbaş ve Cabaroğlu, 2000).

Şarap aromasını oluşturan en önemli bileşiklerden biri esterlerdir. Etil alkol fermentasyonu sırasında oluşan esterler mayaların oluşturduğu ikincil ürünlerdir (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2010). Genç şaraplara çiçeksi ve meyvensi hoş kokular kazandıran esterler iki guruba ayrılabilir: Yüksek alkollerin asetatları, özellikle etil asetat, izoamil asetat, hekzil asetat ve 2-feniletıl asetat (Rapp ve Mandery, 1986; Bertrand, 1981) ve Yağ asitlerinin etil esterleri, yüksek alkoller alkol fermentasyonunun yan ürünüdür ve aroma maddeleri içerisinde miktar olarak önemli bir yere sahiptir. Yüksek alkoller, alifatik (düz zincir) ve aromatik yapıda bulunurlar. Fermentasyon sırasında oluşan önemli yüksek alkollerden bazıları: 2-metil propanol, 3-metil bütanol, 2-metil bütanol, 2-fenil etanol (Nykänen, 1986), n-propanol, hekzanol' dür (Etiévant, 1991).

Şaraplarda aroma üzerine etkili olan asitler yağ asitleridir. Bunlar diğer asitlerin aksine düşük algılanma eşik değerine sahiptirler ve şarapta fazla miktarda bulunurlar. Bunların en önemlileri asetik, bütanoik, hekzanoik, 3-metil bütanoik ve oktanoik asitlerdir. Yağ asitleri maya ve bakteriler tarafından fermentasyon sırasında sentezlenirler (Etiévant, 1991).

Fermentasyon sırasında oluşan en uçucu bileşikler karbonil bileşiklerdir. Bunlar çeşitli aldehit ve ketonları içerirler (Nykänen, 1986). Asetaldehit ve 2,3-bütanedion (diasetil) şaraplarda bulunan önemli karbonil bileşiklerdir. Fermentasyon sırasında oluşan asetaldehit şaraptaki toplam aldehitlerin %90'ını oluşturur

(Nykänen, 1986; Henschke ve Jiranek, 1993). Yeni üretilmiş şaraplarda genelde asetaldehit konsantrasyonu 75 mg/l'nin altındadır (Zoecklein ve ark., 1995). Diasetil 1 mg/l ve altındaki konsantrasyonlarda şarap aromasına katkıda bulunur ancak 5 mg/l'nin üzerinde tipik ve hoşla gitmeyen taze tereyağı kokusu verir (Cabaroğlu, 1995).

Uçucu fenol bileşikleri kuvvetli kokulara sahiptirler. Üzüm sırasında bu bileşikler eser miktarda bulunmasına rağmen şarabın litresinde 10 mg'dan birkaç 100 mg'a kadar değişebilirler (Chatonnet ve ark., 1992). Şaraplarda bulunan başlıca uçucu fenoller; 4-vinilfenol (5-1200 µg/l), 4-vinilguaiakol (5-1200 µg/l), 4-etilfenol (0,1-500 µg/l) ve 4-etilguaiakol (0,1-400 µg/l)'dur. 4-vinilfenol ve 4-vinilguaiakol miktarı 800 µg/l'nin üzerine çıktığında şaraplarda hoş olmayan kokular (plastik kokusu) oluşturmaktadır (Pisarnitskii, 2001). Ayrıca 4-etilfenol şaraplara deri, ilaç, sigara ve at teri kokusu ve 4-etilguaiakol ise duman ve baharat kokusu verdiği için, bu bileşiklerin miktarlarının şaraplarda fazla olması istenmez (Pollnitz ve ark., 2000; Monje ve ark., 2002; Martorell ve ark., 2002).

Gamma laktonlar şarap aromasına katkıda bulunurlar ve genellikle tüm şaraplarda bulunurlar. En iyi bilineni gama-bütirolakton'dur. (Vornam ve Sutherland, 1984).

Terpen bileşikleri çeşit aromasının en önemli kısmını oluştururlar. Üzümlerde belirlenen başlıca terpen bileşikleri monoterpenoller, terpendioller (3,6-diol, 3,7-diol), seskiterpenler (farnesol), hidrokarbür terpenler (limonen, α -terpinen) ve terpen oksitlerdir (linalol oksit, nerol oksit). Bugüne kadar üzümde yaklaşık 40 terpen bileşiği belirlenmiştir. Terpen bileşiklerin hepsi kokulu değildir (Marais 1983; Bayonove, 1992). Bunlar içerisinde aromatik açıdan en önemlileri 10 karbonlu bileşikler olan monoterpenollerdir (Bayonove, 1992; Etiévant, 1991). Bunların başlıcaları: linalol, jeraniol, nerol, sitronellol, ho-trienol ve α -terpineol'dür (Strauss ve ark., 1986).

2.2. MLF ve MLF'nin Şarap Aromasına Etkisi Üzerine Yapılan Çalışmalar

MLF'de etkili olan mikroorganizmalar, MLF'yi etkileyen faktörler, MLF'nin şarabın genel bileşimi ve aroma bileşimi üzerine etkisi, bakteri kültürünün şarabın bileşimine etkisi konularında yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Davis ve ark. (1985) MLF'nin şarap kalitesi üzerine etkileri konusunda yaptıkları derlemede, MLF'nin şarapta asitliği düşürerek, şarabın duyuşal özelliğini geliştirdiğini ve mikrobiyal stabiliteyi sağlayarak olumlu etkide bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar MLF'nin şarapta istenmeyen etkilerini ise asitliğin fazla oranda düşmesi pH'nın yükselmesi ve bunun sonucunda şarapta bozulma riski oluşması, istenmeyen aromaların, biyojen aminlerin oluşması ve rengin değişmesi olarak ifade etmişlerdir. Araştırmacılar derlemede, diasetil konsantrasyonunun şarabın duyuşal özellikleri üzerine etkisini incelemişler ve diasetil konsantrasyonunun 1-4 mg/l arasında olduğunda şarap aromasında kompleks bir yapı geliştiğini bildirmişlerdir. Ancak bu konsantrasyon 5-7 mg/l veya daha yüksek olduğunda diasetilin çok etkili bir hale gelip şaraba istenmeyen tereyağımsı bir aroma verdiğini bildirmişlerdir.

Henick-Kling ve ark. (1993), MLF öncesi ve sonrası şaraplar arasındaki farklılıkları duyuşal analizle (aroma, gövde, damakta kalma süresi) belirlemişlerdir. Gaz kromatografisi-Olfaktometri ile yapılan aroma analizlerinde ise şarabın meyvemsi aromasında artış olduğu belirtilmiştir. MLF'nin ayrıca güçlü otsu aromaları da azalttığı belirtilmiştir. Soğuk iklimlerde üretilen şaraplarda özellikle yoğun otsu aromalar oluşur. MLF ile bu otsu kokular azalır ve meyvemsi aromalar artar. Cabernet Sauvignon çok yoğun yeşil biber, ot ve yeşil fasulye aromalarına sahiptir. Ancak MLF'den sonra bu aromaların kaybolduğu ve ahududu, kırmızı biber ve nane aromalarının baskın olduğu belirtilmiştir. Laktik asit bakteri suşlarının da karakteristik aromalar oluşturduğu, bazı suşların karakteristik tereyağımsı, mayamsı ve kabuğumsu aromaları oluşturduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonunda, şarap aromasının ve tadının, bakteri suşlarının karakteristiğine, üzüm türlerinin aroma yoğunluğuna, kullanılan şarapçılık tekniğine ve fıçıda yılanmaya göre değiştiği bildirilmiştir.

Sauvageot ve ark. (1997) yapmış oldukları çalışmada, Pinot noir ve Chardonnay üzümlerinden yapılan Burgundy şaraplarında MLF'nin şarapların bileşimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Yapılan üçlü test sonuçları incelendiğinde, MLF yapılan ve MLF yapılmayan şaraplar arasındaki farkın düşük, ancak istatistiksel açıdan önemli olduğunu bildirmişlerdir. Sonuçlara göre 1991 Pinot hariç MLF yapılmayan şarapların MLF yapılanlara göre hissedilebilir ölçüde asidik olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan duyuşsal analizlere göre MLF'nin şarabın aroma profilini az da olsa değiştirdiğini belirtmişlerdir.

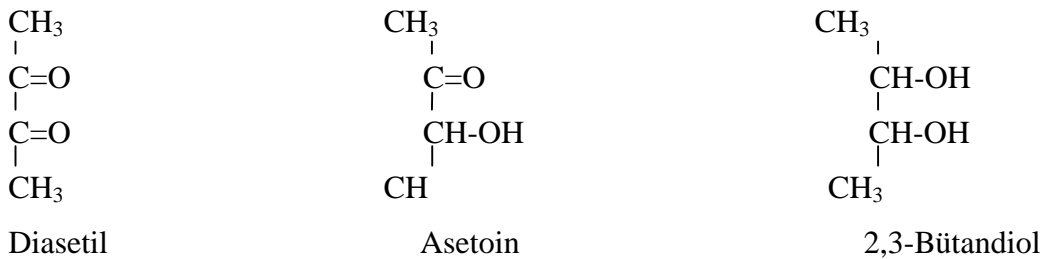
Revel ve ark. (1999), MLF'nin Sauvignon Blanc aromasına etkisi üzerine yaptıkları çalışmada iki farklı kültür bakterisi kullanmışlardır. Hem tank hem de meşe fıçılarda gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen şaraplar, aroma profil analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Araştırmacılar karbonil bileşiklerin oluşumunun az ya da çok bakteri çoğalması ve sitrik asit metabolizması ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir. Meşeden gelen bileşiklerin miktarlarının, MLF'den sonra daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Duyusal analizlerde MLF ile tereyağı, baharat, tütüsü, vanilya gibi aromalar ile şarabın daha kompleks bir yapı kazandığını bildirmişlerdir.

Nielsen ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada, MLF sırasında oluşan diasetil konsantrasyonunun, ortamdaki oksijen konsantrasyonuna, şarabın redoks potansiyeline ve az da olsa başlangıçtaki sitrik asit konsantrasyonuna ve ortamda bulunan SO₂ konsantrasyonuna bağlı olarak değiştirdiğini bildirmişlerdir. Diasetilin, oldukça kuvvetli bir şekilde SO₂ ile egzotermik ve tersinir bir reaksiyona girdiğini ve şarabın depolanması sırasında SO₂ miktarında azalma olursa diasetil miktarının da buna bağlı olarak artacağını bildirmişlerdir.

Maicas ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada, dört farklı şarabı, farklı *O. oeni* suşları ile aşılıyarak MLF'nin, kırmızı şarabın uçucu bileşikler üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar, MLF geçirmiş şaraplarda, duyuşsal özellik ve kalite için önemli parametreler olan yüksek alkol, ester ve asit miktarlarında önemli bir artış belirlemişlerdir. Öte yandan 1-hekzanol, 2-pentanol, izovalerik asit ve hekzanoik asit konsantrasyonlarında herhangi bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

Delequis ve ark. (2000), Chancellor üzümü ile yaptıkları çalışmada, *Sacharomyces bayanus* (*S. bayanus*) RC212 ve Montrachet suşu ile gerçekleştirilen alkol fermantasyonun ardından, iki malolaktik kültür bakterisinin (İnobakter ve X3) şarabın duyuşal ve kimyasal bileşimine etkisini incelemiştirler. Uçucu esterler, aldehitler, ketonlar, asitler ve sülfür içeren bileşikler gaz kromatografisi / mass spektrometresi ile tanımlanmış ve ölçülmüştür. Araştırmacılar, maya suşu, sıcaklık ve malolaktik kültürün şarapların aroma yoğunluğu ve tatlarında farklılığa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bartowsky ve ark., (2004)'nın bildirdiğine göre, diketon olan diasetil, LAB tarafından üretilen en önemli aroma bileşimidir. Diasetil birçok fermente içki ve gıdaya tereyağımsı aroma ve tat verir. Diasetil sitrik asit metabolizmasının ara metabolitidir, daha sonra asetoin ve 2,3-bütandiole indirgenebilir (Şekil 2.1.). Şarabın asitliğinin düşmesi yanında, malolaktik bakteriler, ikincil metabolitlerde ve üzüm-maya türevli metabolitlerde meydana getirdikleri değişiklikler sonucunda şarap aromasına etki ederler. Tereyağımsı ve karamelimsi aroma, malolaktik bakteri metabolizması sonucu gelişen en belirgin değişikliktir. Diasetil şarapta tereyağımsı aromaya sebep olan ana bileşiktir. Mayalar da alkol fermantasyonu sırasında diasetil üretebilirler. MLF'nin başlaması için tercih edilen bakteri türü, düşük pH ve yüksek alkol derecesi gibi birçok bakteri türü için zor olabilecek ortam koşullarına dayanıklılığı nedeni ile *O. oeni*' dir.

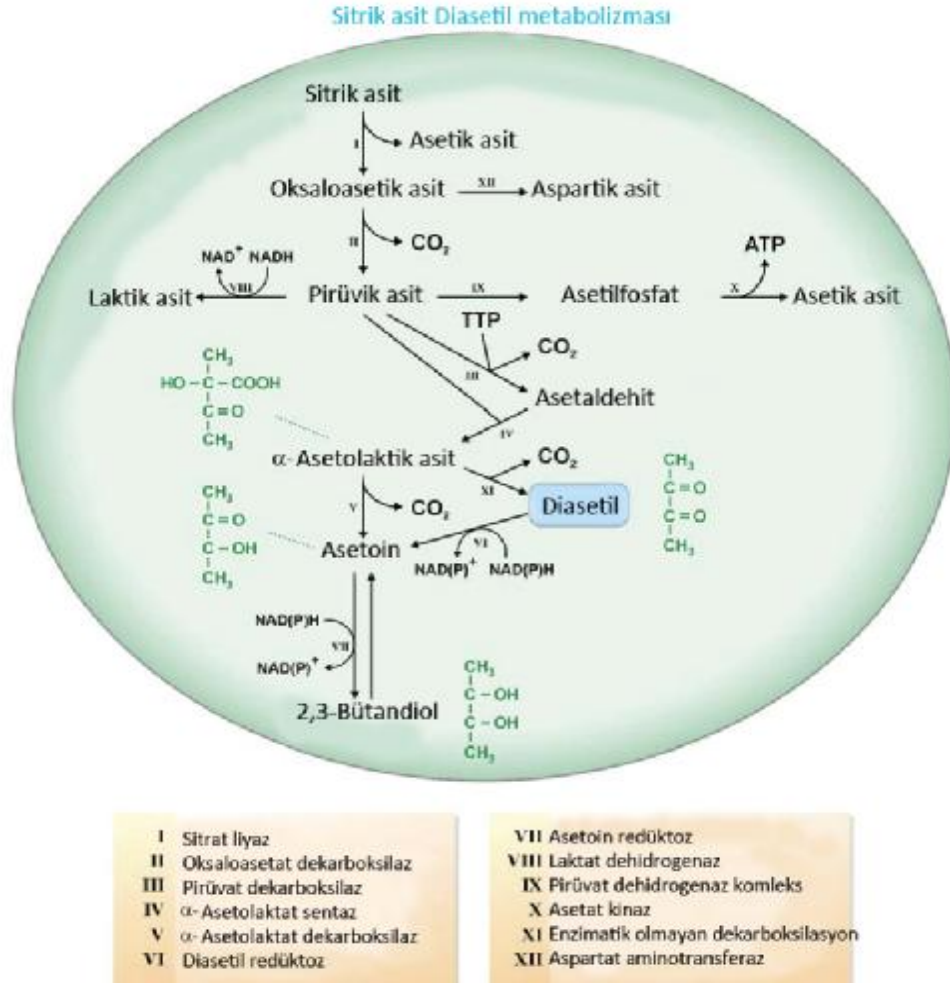


Şekil.2.1. Diasetil, Asetoin ve 2,3-Bütandiol'ün Yapısı (Costantini ve ark., 2009)

Bauer ve ark. (2004)'na göre malolaktik fermantasyona etki eden fiziksel özelliklerden biri olan sıcaklık LAB'nin gelişmelerine etki eder. *O. oeni* için optimum çoğalma sıcaklığı 25°C'dir. Diğer bir özellik olan ortamdaki etanol miktarı

arttıkça bakterilerin çoğalması da doğrusal olarak azalır. % 14 Etanol birçok bakteri suşunun çoğalabileceği en üst limittir. Ortam sıcaklığı arttıkça bakterinin etanol direnci azalır. Fiziksel özelliklerden pH, ortamda hangi bakteri türünün baskın olacağını belirleyen en önemli özelliktir. *O. oeni* 3.5 pH ve altında baskın olan türdür. Daha yüksek pH' larda *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerine ait türler baskın olur. Malolaktik aktivite 3.5-4.0 pH'larda en yüksektir.

Swiegers ve ark. (2005)'na göre sitrik asit birçok laktik asit bakterisi tarafından metabolize edilir ve şarap aroması için önemli bir bileşik olan asetik asit ve diasetil üretilir (Şekil 2.2). Üzüm türevli bir asit olan sitrik asit genellikle şaraplarda 0.1-0.7 g/l miktarları arasında bulunur. MLF sırasında *O. oeni* bakterisi tarafından metabolize edilir. Sitrik asit metabolizması genelde şarapta malik asit tükendikten sonra başlar. Bazı mayalar da sitrik asiti metabolize edebilir ve bunun sonucunda diasetil miktarında ve uçar asit miktarında beklenmeyen artışlar olabilir.



Şekil 2.2. Sitrik Asit Metabolizması ve Malolaktik Bakteri Tarafından Diasetilin Sentezlenmesi (Ramos ve Santos, 1996)

Palacios (2005)'un MLF üzerine yaptığı çalışmada bu fermantasyonun şarabın bileşimi ve duysal özellikleri üzerine etkisini detaylı bir şekilde açıklamıştır. Palacios'a göre, MLF sırasında asitlik düşerken, LAB'nin gelişmesi ortamda bazı yeni metabolitlerin oluşmasına da neden olur. Diasetil, etil laktat gibi bazı bileşikler, konsantrasyonları uygun olduğunda şaraba olumlu duysal özellikler verirler. Başarı ile tamamlanmış MLF sonucunda olumlu aroma ve tatlar meydana gelir. Bunlar; Tereyağımsı, kabuğumsu, bal, maya, vanilya, deri, baharat, toprak, dolgun, yumuşak tanen olarak tanımlanır. pH 3.5'in Üstünde gerçekleşen spontan MLF sonucunda ise genellikle olumsuz aromalar meydana gelir (Çizelge 2.1.). Bunlardan bazıları, laktik aromalar, bozulmuş yoğurt, at teri, asetik, acımsı, ıslak deri kokusu, yanmış kibrit, bozulmuş yoğurt olarak tanımlanır. Toplam asitlik düşük olduğunda, tartarik asit,

LAB (özellikle *Pediococcus spp.* ve *Lactobacillus*) tarafından kısmen ya da tamamen parçalanır. Şarapta pH 3.5'den yüksek olduğunda belirli LAB'ler tartarik asite saldırır ve laktik asitin, asetik asit ve CO₂'ye dönüşmesine neden olur. Bu durum meydana geldiğinde toplam asitlik azalır ve uçucu asitlik ve süksinik asit artar. Şarap yavan, zayıf bir duruma gelir, kırmızı pigmentlerin yoğunluğu azalır ve renk mora doğru döner. Ayrıca mikrobiyal, gelişme şarapta bulanıklığa neden olur. Sıra dışı koşullarda fare idrarını andıran asetamid gibi istenmeyen aromalar oluşur. Süksinik asit 0.5 g/l'yi aştığı zaman şarap ekşi, tuzlu bir tat alır. Süksinik asit, şarabın, dengesiz olmasına neden olur. Gliserinin parçalanması şaraba acımsı tat veren akroleinin oluşmasına neden olur. Buna neden olan başlıca bakteriler, *L. casei*, *L. fructivorans* ve *L. hilgardii*' dir. Kırmızı şarapta 4-vinilfenol, 4-vinilguaiakol 4-etilfenol ve 4-etilguaiakol bileşikleri, at terini anımsatan bir koku verir. Duyusal olarak aktif olan 4-etilfenol fare kokusu algılanan şaraplarda bulunmuştur. Bu bileşiklerin ortaya çıkması belirli *Pediococcus* ve *Lactobacillus* suşlarının ortamda gelişmesi ile bağlantılıdır. Ayrıca *Brettanomyces* ve *Dekkera* mayaları da bu olumsuz aromalardan sorumludur. Ornitin ve lizin metabolizması faremsi kötü kokuya neden olan N- heterosikle, 2- asetil-1-pirrolin ve 2-asetil tetrahidropridin oluşumu ile bağlantılıdır. Bu durum heterofermentatif *Lactobacillus spp.*, bazı *O. oeni* suşları, *Brettanomyces* ve *Dekkera* mayaları tarafından şekerin parçalanması sonucunda meydana gelir. Çeşitli şarap aromalarının gelişmesi MLF sırasında etil laktat, etil asetat ve diasetilin uygun şekilde değişimi ile oluşur. Tipik malolaktik aromalar (tereyağı, turşu, ter) eğer temel meyvemsi aromalar ile dengede değil ise şarabın kalitesine olumsuz etki eder. LAB tarafından arjininin parçalanması sitrulin ve karbamil fosfat üretilmesine neden olur. Eğer bu bileşikler belirli mayalar tarafından alkol fermantasyonu sırasında üretilen üre ile tepkimeye girerse kanserojen bir bileşik olan etil karbamat meydana gelebilir. Belirli amino asitlerin parçalanması histamin, putresin ve kadaverin gibi biyojen aminlerin oluşmasına neden olur .

Çizelge 2.1. Kontrolsüz MLF Sonucunda Oluşabilecek Problemler (Palacios, 2005)

Problem	Ortam koşulları	Etkileyen mikroorganizma	Değişen bileşik	Oluşan bileşik	Şaraba etkisi
Tartarik asitin indirgenmesi	Kırmızı,beyaz şarap pH>3.5, düşük toplam asitlik	<i>Pediococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Oenococcus</i>	Tartarik asit	Laktik asit, Asetik asit,CO ₂ Asetamid (nadiren)	Asitlik düşer, uçar asit, renk kaybı, bulanıklık
Gliserin parçalanması	Kırmızı ve beyaz şarapta düşük alkol, yüksek pH(özellikle pres şarapları ve daha uzun yıllanmış şaraplar)	<i>L. casei</i> , <i>L. fructivornas</i> <i>L. hilgardii</i>	Gliserin	Akrolein	Acılık
			Gliserin(glukoz varlığında)	Laktik asit ve asetik asit	Uçar asit
Tamamlanmamış Alkol Fermantasyonunda	Kırmızı ve beyaz şaraplarda, LAB metabolizması için ortamda şeker olması	Birçok LAB	Fermente şekerler	Laktik asit ve asetik asit	Toplam asitlik yükselir, uçar asit, şarabın dengesi ve kompleks yapısı kaybolur, bulanıklık
			Fruktoz	Mannitol	Acı-tatlı tat
Sek şaraplarda fermente olmayan şekerlerin metabolizması	Sek, yüksek pH'lı kırmızı şaraplar	Birçok LAB	Arabinoz, ksiloz,glukoz ,fruktoz	Asetik asit	Uçar asit
Faremsi koku	Yüksek pH oksidasyon,	<i>Lactobacillus</i> , <i>O.oeni</i> (<i>Brettanomyces</i> ve <i>Dekkera mayalanı</i>)	Amino asitler(lizin, ornitin), şekerler	Pridinler	Faremsi koku
Çeşitli aromaların baskılanması	Kırmızı ve beyaz şarap	Belirli malolakitik suşlar	Organik asitler, şekerler, amino asitler	Etil laktat, etil asetat	Meyvemsi aromaların baskılanması,yüksek miktarda karamel, kabuğumsu, maya ve ıslak deri aromaları
				Diasetil	
Etil karbamatın gelişmesi	Yüksek alkol, Yüksek pH'lı şaraplar	LAB	Arjinin	Etil karbamat	İnsan sağlığı tehdidi
Biyojen aminlerin gelişmesi	Yüksek pH'lı şaraplar	LAB	Belirli amino asitler	Histidin	İnsan sağlığı tehdidi
				Putresin	Bozulma, sirke,et benzeri kötü kokuların oluşması

Pozo-Bayon ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada kırmızı şarapta ki amino asit ve uçucu bileşikler, MLF'den önce ve *L. plantarum* ve *O. oeni* türlerinin 4 farklı suşu ile tamamlanan MLF'den sonra karşılaştırılmıştır. Sonuçlar *O. oeni* ve *L. plantarum*'un farklı malolaktik davranışları olduğunu ve iki tür arasında önemli metabolik farklılıklar olduğunu göstermiştir. Her durumda da MLF'nin, şarapta amino asit ve uçucu bileşikler üzerinde etkisi olduğu bildirilmiştir.

Ugliano ve ark (2005), kırmızı şarapta alkol fermantasyonu sırasında üretilen uçucu bileşiklerle, farklı ticari *O. oeni* starter kültürleri ile, MLF sırasında üretilen uçucu bileşikleri karşılaştırmışlardır. Alkol fermantasyonundan sonra ve MLF sonrasında uçucu bileşikler ekstrakte edilmiş ve GC-MS ve GC ile analizleri yapılmıştır. MLF sonrasında yağ asitlerinin asit esterleri ve 3-metilbütül asetat, etil laktat, 3-hidroksibütanoat, metianol, 2-feniletül alkol, bütirolakton konsantrasyonlarının arttığı ve konsantrasyonların kullanılan starter bakteri kültürlerine göre değiştiği belirtilmiştir. MLF'nin kırmızı şaraptaki birçok yüksek alkol, yağ asitleri, kükürtlü bileşikler gibi diğer uçucular üzerinde istatistiksel açıdan önemle düzeyde etkili olmadığı bildirilmiştir.

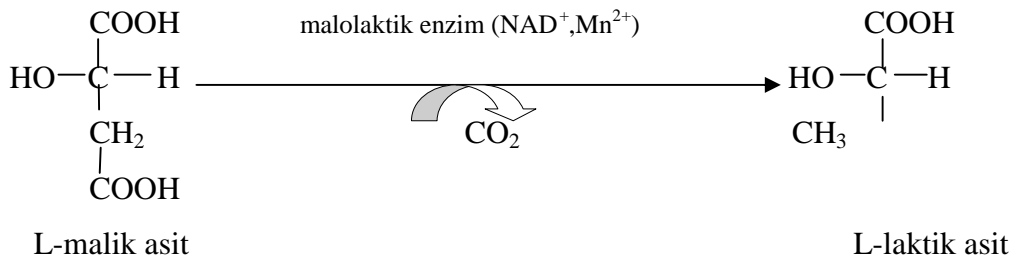
Ribereau-Gayon ve ark. (2006)'nın bildirdiğine göre, alkol fermantasyonundan sonra şarapta 1-2 g/l indirgen şeker kalabilir. Bu kalan glukoz, fruktoz ve birkaç mg/l pentoz (ksiloz, arabinoz), mayalar tarafından fermente edilemez ve MLF sırasında LAB tarafından parçalanırlar. Sonuçta uçar asit miktarında artış gözlenir. Bu tam olarak bir bozulma değildir fakat bunun sonucunda şarap dolgunluğunu ve yumuşaklığını kaybeder.

Izquierdo Canas ve ark. (2008), Tempranillo kırmızı şaraplarında spontan olarak gerçekleştirilen MLF'nin uçucu bileşikler üzerine etkisini incelemişlerdir. Alkol Fermantasyonu ve MLF sonunda toplam 114 uçucu bileşik belirlenmiştir. Spontan MLF sonunda süksinik asit esterleri (etil monosüksinat, dietil süksinat ve etil-metil süksinat), laktonlar (β -etoksi- γ -bütirolakton) ve β -(1-hidroksi-etül)- γ -bütirolakton, terpenler (α -terpinol), norisoprenoidler (damaskenon ve 3-hidroksi- β -damaskenon) ve uçucu fenoller (vanilin ve sirincaldehit) üretilmiştir.

Costantini ve ark. (2009)'nın bildirdiğine göre, MLF'den önce şarap genellikle 200 mg/l-300 mg/l arasında sitrik asit içerir. Sitrik asit, şarapta düşük

konsantrasyonlarda bulunmasına rağmen önemlidir. Sitrik asit metabolizması asetik asit üretimine yol açar, başka bir ifade ile şaraptaki uçur asit konsantrasyonunu artırır. Bununla birlikte şarap aromasına önemli etkisi olan diasetil ve diğer asetonik bileşiklerin üretilmesi ile sitrat fermantasyonu arasında önemli bir ilişki vardır.

Constantini ve ark. (2009)'na göre MLF temel reaksiyonu malik asidin transformasyonu dur. Kimyasal olarak şarapta L-malik asidin L-laktik aside biyodönüşümüdür (Şekil 2.3.). Biyokimyasal olarak ise LAB'ye özgü bir biyodönüşümdür ve malolaktik enzim aktivitesinin sonucudur. Bu transformasyonun sonunda, şarapta asitlik düşer, diğer bir ifade ile pH yükselir. Bu biyodönüşümün sonucunda ayrıca şarapta daha yumuşak bir tat meydana gelir.



Şekil 2.3. Malik Asidin Laktik Asite Biyodönüşümü (Krieger, 2005)

Boido ve ark. (2009), LAB'nin metabolik aktivitelerinin Tannat şarabının uçucu bileşikleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar laktik asit bakterilerinin uçucu metabolitler üreterek, üzüm ve mayadan gelen aroma bileşiklerini değiştirip şarabın aroma ve tadına etki ettiklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmanın sonunda MLF sonrasında Tannat şaraplarının, etil laktat, dietil süksinat, γ -butirolakton konsantrasyonlarında önemli artış olduğu belirtilmiştir.

Lanvaud-Funel (2010)'e göre, sitrik asit metabolizmasının ilk reaksiyonu sitrat liyaz enzimi ile sitrik asidin asetik asit ve oksaloasetik asite parçalanmasıdır. Daha sonra oksaloasetik asit pirüvata dekarboksile edilir ve bu aşamada CO_2 çıkışı olur. Pirüvik asit bir çok yolla indirgenir ve sonuçta asetik asit, diasetil, aseton ve 2,3-bütandiol üretilir.

Lanvaud-Funel (2010)'in yapmış olduğu başka bir çalışmaya göre, şıradaki başlangıç LAB miktarı 10^2 kob/ml ile 10^4 kob/ml arasında değişir. Bu miktar bağbozumu sırasındaki ortam koşullarına göre değişir. Alkol fermantasyonunun

sonunda ortamda az miktarda maya ve LAB bulunur. Bakteri popülasyonu 10 kob/ml ile 10⁴ kob/ml arasında ortam koşullarına göre değişir. Alkol fermantasyonundan sonra ortamdaki bakteri popülasyonu artarak 10⁶ kob/ml'yi geçtiğinde MLF aktif bir şekilde başlar.

Munoz ve ark. (2011)'na göre, MLF'yi gerçekleştirebilen bakteriler arasında *O. oeni*, asidik pH ve % 10 etanol'de kolaylıkla çoğalabilmektedir. Şarapta bulunan başlıca laktik asit bakterileri *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* ve *Lactobacillus* cinlerine aittir (Çizelge 2.2). Bu bakteriler MLF sırasında malik asit ve sitrik asitin yanı sıra şekerler, tartarik asit, gliserol ve belirli amino asitleri metabolize ederler. Üzüm sırası monosakkarit (heksöz: glukoz, fruktoz, galaktoz, mannoz; pentozlar,: arabinoz, ksiloz, riboz ve ramnoz) disakkarit (maltoz, rafinoz, trehaloz) ve daha düşük miktarlarda da oligosakkaritleri içerir. Laktik asit bakterileri şekerleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Homofermentatif laktik asit bakterileri EMP izyolu ile heksozları fermente ederler ve iki molekül laktat ve ATP üretirler. Heterofermentatif laktik asit bakterileri (*O. oeni*, *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. Buchneri*) ve fakültatif homofermentatif bakteriler (*L. plantarum*) ise pentoz fosfat ya da fosfoketolaz iz yolu ile heksoz ve pentozları fermente ederler ve bir mol heksozdan bir mol laktat, etanol, karbon dioksit ve ATP üretirler. Laktik asit bakterileri şıra ve şarapta malik asit, sitrik asit ve tartarik asit gibi organik asitleri metabolize ederler. Bunlardan sitrik asit ortamdaki heksozu kofaktör olarak kullanır ve ortamda heksoz olduğunda indirgenir, fakat malik ve tartarik asit kofaktöre ihtiyaç duymaz. Birçok LAB organik asitleri indirgeyerek şarabın duyuşal özelliğine etki eder. Malik asit şarapta en çok miktarda bulunan asitlerden biridir ve dikarboksilik asitin (L-malik) monokarboksilik asite (L-laktik) dönüşümü sonucunda pH yükselir ve şarabın duyuşal özelliklerinde değişiklikler olur. Malolaktik enzim ilk kez *L. plantarum*'dan izole edilmiştir ve şaraptan izole edilen bütün laktik asit bakterilerinde bulunur. LAB tarafından indirgenen diğere bir organik asit de sitrik asittir. Sitrik asit üzüm ve şıradaki 0.1-1 g/l miktarları arasında bulunur. LAB olan *O. oeni* sitrik asiti glukoz ile birlikte metabolize eder. Sitrik asit, laktat, asetat, diasetil, asetoin ve 2,3-bütandiole indirgenir. Belirli LAB'ler (özellikle *Lactobacillus*) tartarik

asiti metabolize ederler. Tartarik asitin indirgenmesi sonucunda toplam asitlik miktarında ufak bir azalma, uçur asit miktarında ise artış olur.

Çizelge 2.2. Şarapta Bulunan Başlıca Laktik Asit Bakterileri

Cins	Şeker metabolizması	Tür
<i>Pediococcus</i>	Homofermentatif	<i>P.damnus</i>
		<i>P. parvulus</i>
		<i>P. pentosaceus</i>
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentatif	<i>Leu. mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Heterofermentatif	<i>O. oeni</i>
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentatif	<i>L. mali</i>
	Fakültatif heterofermentatif	<i>L. casei</i>
		<i>L. pantarum</i>
		<i>L. brevis</i>
	Heterofermentatif	<i>L. buchneri</i>
		<i>L. fermentum</i>
		<i>L. fructivorans</i>
		<i>L. higaridii</i>

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hammadde

Bu çalışmada, 2010 yılında Nevşehir Ürgüp yöresinden sağlanan 500 kg Kalecik Karası üzümü (*Vitis vinifera* L.) kullanılmıştır (Şekil 3.1).

Maya olarak Lallemmand (Kanada) tarafından üretilen *S. cerevisiae*-Lalvin RC212 şarap mayası kullanılmıştır. Bakteri kültürü olarak Lallemmand (Kanada) tarafından üretilen *O. oeni* Lalvin-PN4 ve *O. oeni* Lalvin-VP41 bakteri suşları kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Kalecik Karası Üzümü

3.2. Yöntem

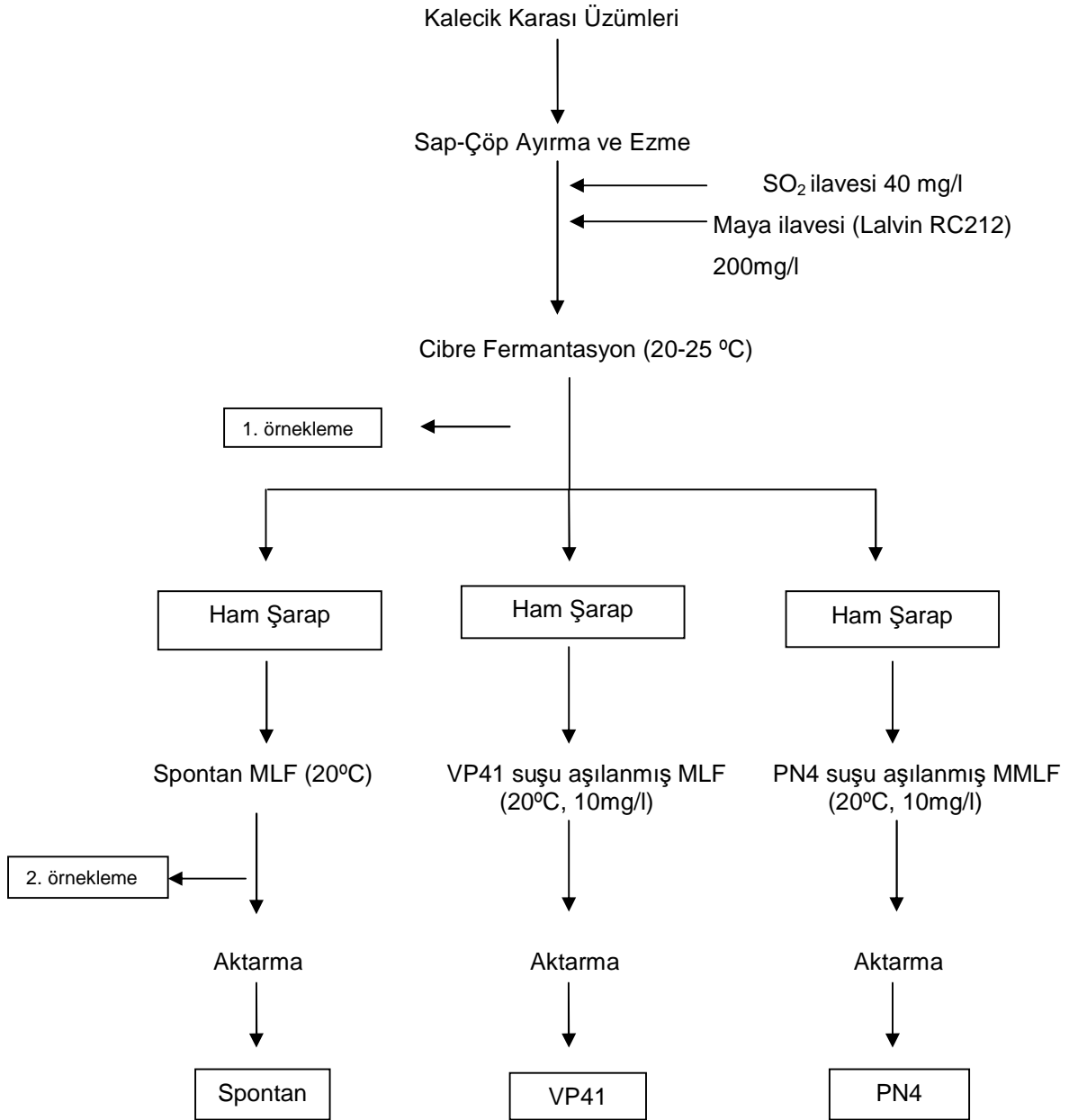
3.2.1. Üzümlerin Şaraba İşlenmesi

Kalecik karası üzümlerinin kırmızı şaraba işlenmesi Şekil 3.1’de verilmiştir. Üretim, Çukurova Üniversitesi Döner Sermaye İşletmesi Şarap Uygulama Ünitesi’nde gerçekleştirilmiştir. İşletmeye 20 kg’lık kasalar içerisinde getirilen Kalecik Karası üzümleri sap-salkım ayırma düzenli üzüm patlatma makinesinden geçirilerek sap ve çöpleri ayrılmış ve üzümlerin taneleri patlatılmıştır. Taneleri patlatılan üzümler makinenin altında bulunan bir pompa vasıtasıyla el değmeden paslanmaz çelik fermantasyon tankına alınmıştır, 40 mg/kg SO₂ katılmış, renk ve tanenlerin şıraya geçişi için cibre fermantasyonuna (maserasyon + alkol fermentasyonu) bırakılmıştır.

Cibre Fermentasyonu: Taneleri patlatılmış üzümler Lalvin RC212 mayası ile aşılanmıştır (200 mg/l) ve fermantasyon başlığı altında 6 gün süresince cibre fermantasyonuna terk edilmiştir. Bu süre boyunca sıcaklık 20-25°C arasında tutulmuştur. Cibre fermantasyonu süresince şıralarda yoğunluk öksele dansimetresi ile, sıcaklık ise termometre ile izlenmiştir. Kaplarda üstte toplanan kitle (şapka) günde iki kez karıştırılarak kırılmıştır. Cibre fermantasyonu sona eren mayşe preste sıkılmış ve katı kısımlarından ayrılarak ham şarap elde edilmiştir. Alkol fermantasyonundan sonra ikinci örnekleme yapılmıştır.

Malolaktik Fermantasyon: Maserasyon ve alkol fermantasyonu tamamlandıktan sonra taze şaraplar MLF için 20°C’lik bir odaya alınmış ve paralelli olarak 3 kısma ayrılmıştır (Şekil 3.1). Birinci kısım spontan olarak MLF’ye terk edilmiştir, ikinci kısım 10 mg/l *O. oeni* PN4 suşu ve üçüncü kısım 10mg/l *O. oeni* VP41 bakteri suşu ile aşılanmıştır. MLF’nin gidişatı iki günde bir kağıt kromatografisi yardımıyla izlenmiştir ve malik asidin tamamen daha dayanıklı ve stabil olan laktik aside dönüşümü sağlanmıştır. MLF’nin başında, ortasında ve sonunda alınan örnekler HPLC’ye enjekte edilerek malik asidin parçalanması kantitatif olarak da belirlenmiştir. MLF’si tamamlanan şaraplardan ikinci örnekleme yapılmıştır. Daha sonra şaraplar aktarılmış ve bakteri faaliyetini durdurmak için içerisine 80 mg/l SO₂

ilave edilmiş ve sıcaklığı 15°C olan dinlendirme mahzeninde olgunlaşmaya terk edilmiştir.



Şekil 3.2. Denemenin Düzenlenmesi

3.2.2. Üzüm Şırası ve Şaraplarda Yapılan Analizler

3.2.2.1. Genel Analizler

Şırada toplam asitlik, SÇKM (Briks), pH, indirgen şeker analizleri, (Anon, 2005) yapılmıştır.

Şaraplarda, şırada yapılan analizlere ek olarak, alkol, yoğunluk, uçar asit, serbest ve toplam SO₂ ve kuru madde analizleri (Anon, 2005) yapılmıştır.

3.2.2.1.(1).Toplam Asit Tayini

10 ml şıra veya şarap örneği üzerine 20 ml saf su konulmuş ve pH'sı 8.2 oluncaya kadar 0.1 N NaOH ile titre edilmek suretiyle belirlenmiştir. Sonuçlar tartarik asit cinsinden litrede gram olarak verilmiştir (Ough ve Amerine, 1988; Anon, 2005).

3.2.2.1.(2). pH Tayini

Şıra ve şarapların pH'sı doğrudan cam elektrotlu pH-metre kullanılarak ölçülmüştür (Anon., 2005).

3.2.1.1.(3). İndirgen Şeker ve Toplam Şeker Tayini

İndirgen ve toplam şeker tayini, Carrez çözeltileri ile rengi giderilen ve durultulan şaraplarda Luff-Schoorl yöntemine göre yapılmıştır (Anon, 2005).

3.2.2.1.(4).Kuru Madde Tayini

Kuru madde tayininde, 10 ml şarap örneği kurutma kaplarına alınarak 100°C'de etüvde kurutulmuş ve yapılan tartımlar sonucunda g/l olarak kuru madde bulunmuştur (Anon, 2005).

3.2.1.1.(5). Yoğunluk Tayini

Yoğunluk, 20 °C'de piknometre ile tayin edilmiştir (Anon, 2005).

3.2.2.1.(6). Alkol Tayini

Alkol miktarı, damıtma sonucu elde edilen alkollü sıvının piknometre ile bulunan yoğunluğundan özel çizelgeler yardımıyla, önce ağırlık (g/l), sonra da hacim (% h) olarak alkol içeriği bulunmuştur (Anon, 2005).

3.2.2.1.(7). Uçar Asit Tayini

Buharlı damıtma yöntemine göre yapılmış ve sonuçları g/l olarak verilmiştir (Anon., 2005).

3.2.2.1.(8). Kükürt Dioksit Tayini

Şaraplarda toplam ve serbest kükürt dioksit, taşıyıcı olarak kullanılan azot gazı yardımı ile hidrojen peroksit çözeltisinde toplanmıştır ve N/100'lük NaOH ile titre edilmek suretiyle belirlenmiştir (Anon, 2005).

3.2.2.2. Kağıt Kromatografisi ile Malik Asit ve Laktik Asit Tayini

MLF süresince malik asitteki değişim kalitatif olarak izlenmiştir. Bu yöntemde öncelikle standart asit çözeltileri (malik, laktik) hazırlanmıştır ve buradan her bir asitin sürüklenme derecesi (R_f) değerleri belirlenmiştir. Daha sonra aynı işlem şarap örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Malik asit kalitatif olarak tamamı parçalanıncaya kadar izleme yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil.3.3.Kağıt Kromatografisi ile Malik asit/Laktik asit Tayini

3.2.2.3. HPLC İle Malik Asit ve Laktik Asit Tayini

MLF'den önce ve MLF sırasında malik ve laktik asit miktarları Shimadzu LC-20AD model SPD-20A ve RID-10A refraktif indeks dedektörlü HPLC ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Kolon olarak ve taşıyıcı faz olarak 5 mm'lik sülfürik asit çözeltisi kullanılmıştır, akış hızı 0.6 ml/dak olarak ayarlanmıştır. Şarap örnekleri önce 0.45 mm'lik filtrelerden geçirilmiş ve HPLC cihazına enjekte edilmiştir.

Örneklerdeki malik ve laktik asit miktarlarının belirlenmesinde dış standart yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla malik ve laktik asit standartlarının 5'er farklı konsantrasyonlarda enjeksiyonları yapılmış ve elde edilen verilerden kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (Tangüler, 2010).

3.2.2.4. Aroma Bileşiklerinin Analizi

Şaraplardan aroma maddelerinin ekstraksiyonunda 100 ml örnek kullanılmıştır. Ekstraksiyonunda çözügen olarak diklorometan çözügeni kullanılmıştır ve ekstraksiyon, her bir örnek için üç kez tekrarlanmıştır. Örneklere iç standart

olarak 41.5 µg 4-nanaol ve 40 ml diklorometan ilave edilmiştir ve 500 ml'lik erlene alınmıştır. Erlenekteki karışım azot gazı altında, 4-5 °C'de, manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılarak, ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Blanch ve ark, 1985; Priser ve ark,1997). Bu işlem sonucu iki faza ayrılan erlen içeriğinden aroma maddelerini içeren çözgen fazı alınarak "Vigreux" damıtma kolonunda 40°C'de 1ml kalıncaya kadar konsantre edilmiştir. Konsantre halde elde edilen sıvı doğrudan GC ve GC-MS'e enjekte edilerek serbest aroma maddeleri belirlenmiştir.

3.2.2.4.(1). GC-FID, GC-MS koşulları

Aroma maddelerinin miktar tayininde, 'Agilent 6890N' marka alev iyonlaşma dedektörlü (FID) gaz kromatografisi kullanılmıştır. Aroma maddelerinin ayrımı DB-WAX kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjektör sıcaklığı 220°C, dedektör sıcaklığı 250°C, kolon sıcaklığı, 60°C'de 3 dakika beklemeden sonra, dakikada 2°C artarak 220°C'ye ve daha sonra dakikada 3°C artarak 245°C'ye çıkacak ve bu sıcaklıkta 20 dakika sabit kalacak şekilde programlanmıştır. Cihaza enjekte edilen miktar 3 µl'dir. Taşıyıcı gaz olarak He kullanılmış ve Helyumun akış hızı 1.5 ml/dakika olarak ayarlanmıştır. Dedektör ve enjektör sıcaklıkları 250°C olarak ayarlanmıştır.

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

3.2.2.4.(2). Aroma bileşiklerinin miktarlarının hesaplanması

Piklerin tanısından sonra aroma maddelerinin miktarları iç standart yöntemiyle aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

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

C_i : Bileşiğin konsantrasyonu

A_i : Bileşiğin pik alanı

A_{st} : İç standardın pik alanı

C_{st} : İç standardın konsantrasyonu (41.5 µg/100 ml)

RF : Cevap faktörü

HF : Hesaplama faktörü (Örnek miktarının litreye çevrilmesi için faktör: 10)

3.2.2.5. Duyusal Analiz

Şarapların duyusal analizlerinde lezzet profil analiz yöntemi uygulanmıştır (Altuğ ve Elmacı, 2005). Duyusal analiz 9 kişiden oluşan bir panelist grubu tarafından gerçekleştirilmiş ve sonuçlar örümcek ağı grafiği halinde verilmiştir. Duyusal analizlerde Şekil 3.4'de verilen form kullanılmıştır.

Adı :

Soyadı :

Herbir örnek için 0-10 arasında puan veriniz.

	296	189	327
Renk			
Koku (burunda)			
Tat			
Aroma (ağızda)			
Ekşilik			
Acılık			
Burukluk			
Dolgunluk			
Genel izlenim			

Şekil 3.4. Duyusal Analiz Formu

3.2.2.6. İstatiksel Analizler

Elde edilen sonuçlar varyans analizi ile değerlendirilmiş ve önemli bulunan farklılıklara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Bu amaçla Windows SPSS 16.0 Software” istatistik paket programı kullanılmıştır (Özdamar, 1999; Rencher, 2002).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Kalecik Karası Şirasının Genel Bileşimi

Kalecik Karası üzüm şirasının genel bileşimi Çizelge 4.1’de verilmiştir. Buna göre yoğunluk 1.095 g/cm^3 , toplam asit miktarı 6.65 g/l , pH’sı 3.47 , indirgen şeker miktarı 208.32 g/l , SÇKM (% Briks) 20.2 olarak saptanmıştır. Selli ve ark. (2004), 1998 ve 1999 Kalecik Karası üzüm şiralarında toplam asitliği 9.3 ve 8.3 g/l , pH’yı 3.5 ve 3.6 , indirgen şekeri ise 191 ve 195 g/l bulmuşlardır. Çalışmada elde ettiğimiz veriler bu değerlerden daha düşüktür. Bu durumun iklim koşulları ve üzümün elde edildiği yörelerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.1. Kalecik Karası Üzüm Şirasının Genel Bileşimi

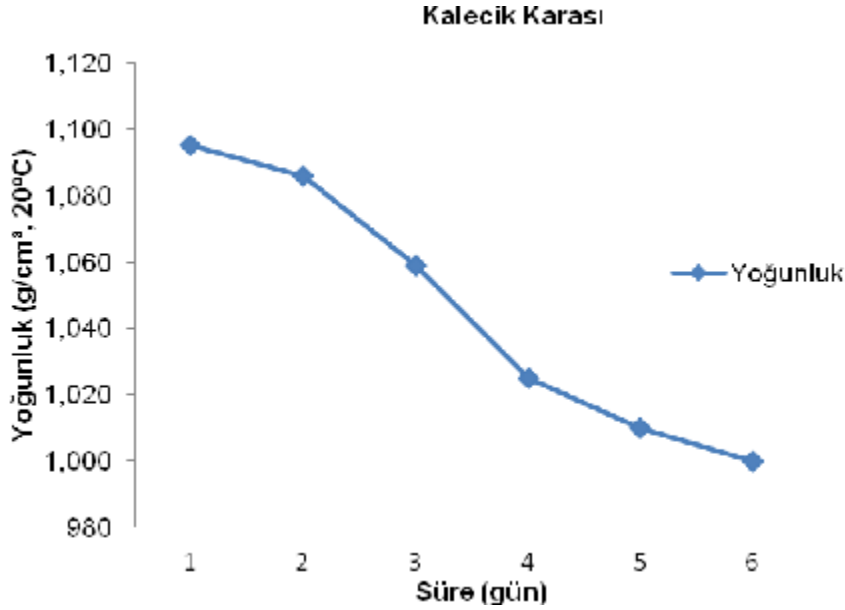
Analizler	
Yoğunluk(g/cm^3 , 20°C)	1.095
SÇMK (%Briks)	20.2
Toplam Asit(g/l)*	6.65
pH	3.47
İndirgen Şeker (g/l)	208.32

*Tartarik asit cinsinden

4.2. Alkol Fermantasyonu ve Malolaktik Fermantasyon’un İzlenmesi

4.2.1. Alkol fermantasyonu

Şırada alkol fermantasyonun gidişi Şekil 4.1’de verilmiştir. Kalecik Karası üzüm şirasında alkol fermantasyonunun takibi günlük sıcaklık ve yoğunluk ölçümleri yapılarak izlenmiştir. Şırada yoğunluk başlangıçta 1.095 g/l olarak belirlenmiş ve litrede 10 gramın altına düşene kadar izlenmiştir. Alkol fermantasyonu sırasında sıcaklık ortalama $22-25^\circ\text{C}$ arasında değişmiştir. Alkol fermantasyonu Şekil 4.1’de görüldüğü gibi $1.$ günde başlamış ve $6.$ günde son bulmuştur.

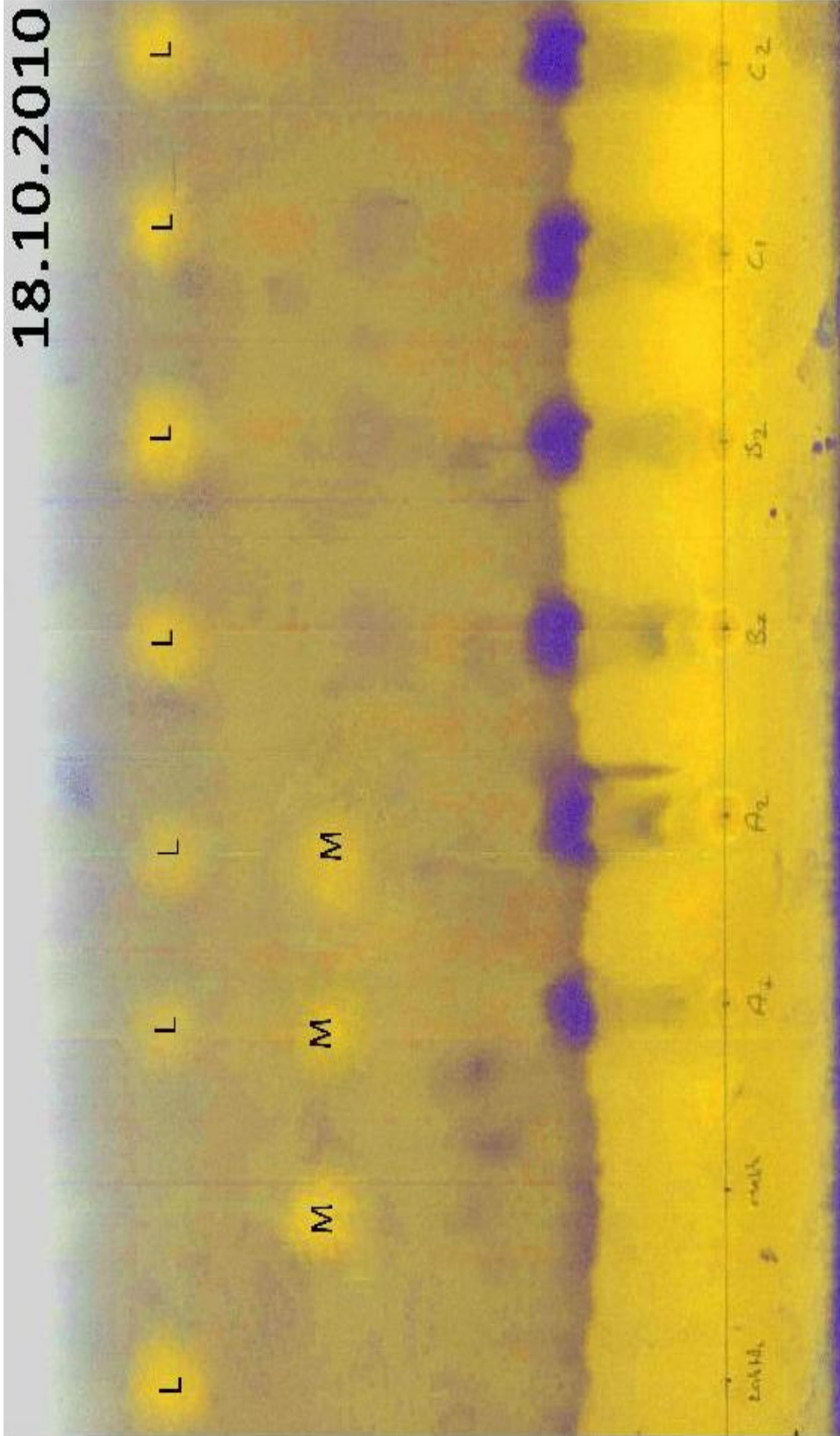


Şekil 4.1. Alkol Fermantasyonunun Gidişi

4.2.2. Malolaktik Fermantasyon

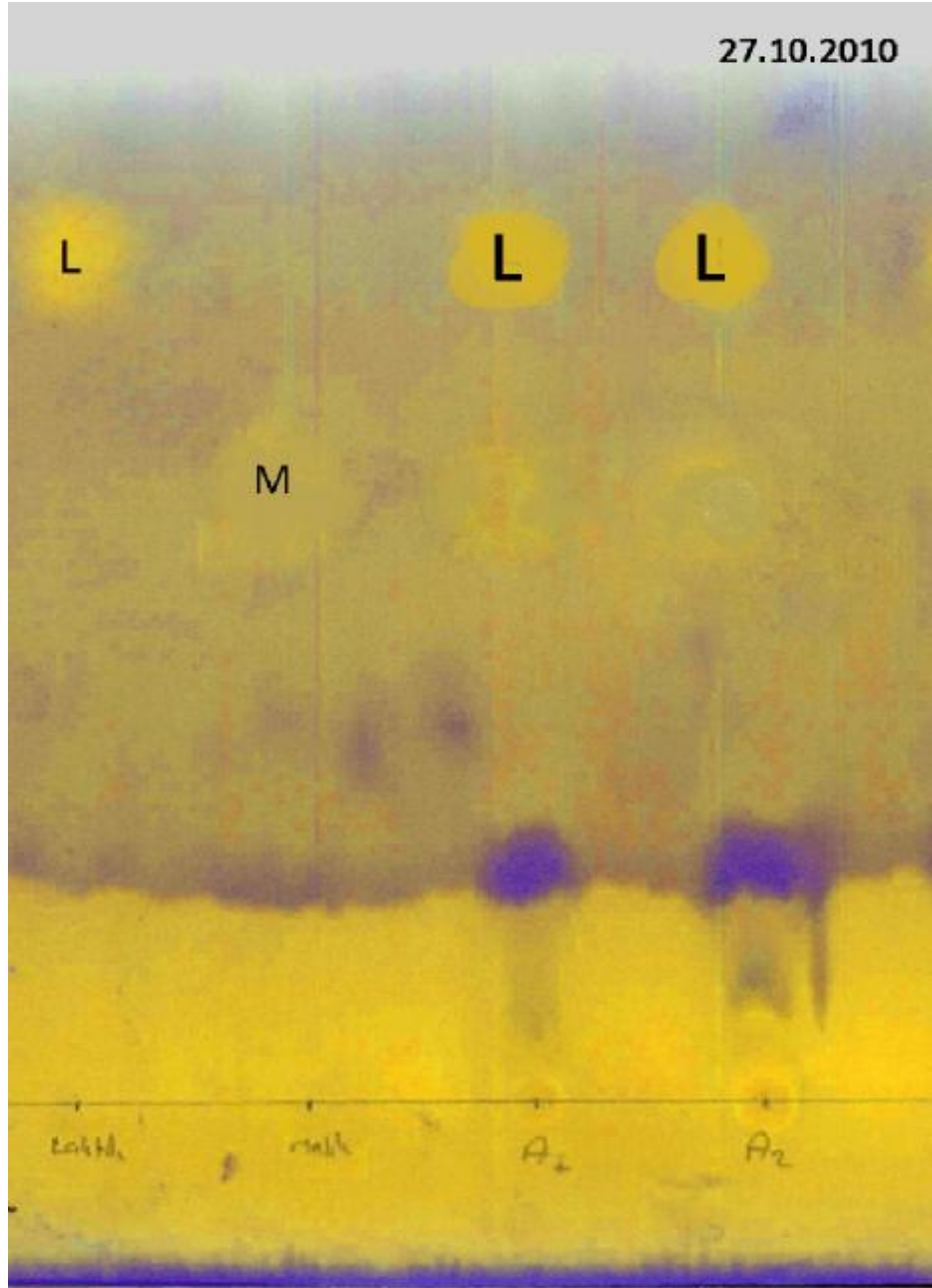
MLF iki günde bir yapılan kağıt kromatografisi ölçümleri ile takip edilmiştir. Malolaktik fermantasyon sırasında sıcaklık ortalama 22-25 °C arasında değişmiştir (Şekil 4.2, 4.3, 4.4).

PN4 ve VP41 bakteri suşları ile aşılamanın örneklerde MLF, alkol fermantasyonu tamamlandıktan sonra 2. günde başlamış ve 11. günde tamamlanmıştır. Spontan olarak yürütülen kontrol örneğinde ise MLF alkol fermantasyonu tamamlandıktan sonra 4. günde başlamış ve 20. günde tamamlanmıştır. MLF'nin başlangıcı ortası ve sonuna ait kağıt kromatrafisi sonuçları sırasıyla Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4'de verilmiştir. Görüldüğü gibi bakteri kültürü ile aşılamanın örneklerde MLF daha kısa sürede başlamış ve daha kısa sürede tamamlanmıştır. Kültür ilavesi ile MLF'nin bu avantajı birçok araştırmada da vurgulanmıştır (Costantini ve ark., 2009). Bakteri kültürleri MLF'nin kontrollü gerçekleştirilmesini sağlayarak ve bozulmaya neden olan bakterilerin gelişimlerini azaltmakta ve bu yolla aroma bakımından istenen şarapların elde edilmesini sağlamaktadır (Nielsen ve ark., 1999; Bauer ve ark., 2004).



Şekil 4.3.MLF'nin Orta Aşamasına Ait Kağıt Kromatografisi

(L:Laktik asit, M: Malik asit, A: Spontan MLF, B: VP41 bakterisi ile gerçekleştirilmiş MLF, C: PN4 bakterisi ile gerçekleştirilmiş MLF)



Şekil 4.4. MLF'nin Son Aşamasına Ait Kromotogram
(L:Laktik asit, M:Malik asit, A: Spontan MLF)

4.3. Malolaktik Fermantasyonun Şarapların Genel Bileşimi Üzerine Etkisi

Kalecik Karası şaraplarının genel bileşimi Çizelge 4.2’de verilmiştir. MLF’den önce ve MLF’den sonra şaraplar arasında genel asitlik, uçar asit, malik asit, laktik asit, kuru madde ve gliserol miktarları arasındaki fark, istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.2. Şarapların Genel Bileşimi

Analizler	MLF'den Önce		MLF'den Sonra		
	Kontrol	Spontan	VP41	PN4	F
Yoğunluk (g/cm ³ , 20°C)	0.9932	0.9926	0.9928	0.9925	ö.d.
Alkol (%h/h, 20°C)	12.5	12.5	12.5	12.5	ö.d.
Toplam Asit**(g/l)	^a 7.05	^d 4.85	^b 5.32	^c 5	*
Uçar Asit*** (g/l)	^c 0.42	^a 0.55	^b 0.48	^c 0.45	*
pH	3.7	3.8	3.9	3.9	ö.d.
Malik Asit(g/l)	^a 3.01	^b iz	^b iz	^b iz	*
Laktik Asit(g/l)	^c 0.2	^b 2.0	^{a,b} 2.3	^a 2.4	*
Kuru Madde (g/l)	^a 26.44	^d 20.48	^b 22.5	^c 20.98	*
Gliserol(g/l)	^b 9.00	^b 9.28	^a 10.09	^c 7.04	*

Tartarik asit cinsinden, *Asetik asit cinsinden, F: Varyans analizine göre farklılık durumu*; $p<0.05$ önem düzeyinde önemlidir, ö.d: önemli değil

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi MLF’den önce toplam asit miktarı 7.05 g/l iken MLF’den sonra şarapların toplam asitliğinde düşme olmuş ve sırasıyla spontan şarapta 4.85 g/l, VP41 şarabında 5.32 g/l ve PN4 şarabında 5 g/l bulunmuştur. Asitlik en fazla spontan yolla elde edilen şarapta düşmüştür. Asitlikteki bu düşme ile birlikte şarapların pH’larında artış gözlenmiş ve pH MLF’den önce 3.7 iken MLF’den sonra spontan’da 3.8, VP41’de 3.9 ve PN4 şarabında da 3.9 bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında MLF farklı bakteri suşları ile tamamlanmış şaraplarda toplam asit değerleri birbirine yakın ve pH değerleri ise aynı bulunmuştur. Revel ve ark.,(1999), genel asitliği MLF’den önce 7.05 g/l, MLF’den sonra bakteri suşuna bağlı olarak 6.45 g/l ve 6.82 g/l olarak bulmuştur. Ugliano ve ark., (2005), başlangıç şarabında toplam asitliği 9.6 g/l, MLF’den sonra 4 farklı kültür bakterisi ile aşılansmış şaraplarda sırasıyla MLB1’de 7.5 g/l, MLB2’de 7.6 g/l, MLB3’te 7.9 g/l ve

MLB4'de 7.6 g/l bulmuşlardır. pH ise başlangıç şarabında 3.13, MLF'den sonra ise MLB1'de 3.23, MLB'de 3.12, MLB3'te 3.1 ve MLB4'de 3.21 bulmuşlardır. Malolaktik bakterilerin aktiviteleri sonunda meydana gelen en önemli değişiklik, malolaktik fermantasyonun temel prensibi olan L-malik asidin, L-laktik aside dekarboksilasyonu sonucunda şarap asitliğinin düşmesidir. Şarapta asitliğin düşmesi ve buna bağlı olarak pH'nın yükselmesi ağızda daha yumuşak bir his verir ve şarabın içimini kolaylaştırır (Bartowsky ve ark., 2004).

Şaraplardaki uçur asit miktarlarına baktığımızda, MLF uçur asit miktarlarını etkilemiştir. MLF'den önce uçur asit miktarı asetik asit cinsinden 0.42 g/l olarak saptanmıştır. Çizelge 4.2'de de görüldüğü MLF uçur asit miktarlarını arttırmıştır. MLF'nin spontan olarak gerçekleştirildiği örnekteki artış bakteri kültürü aşılana göre daha yüksek bulunmuştur. Diğer bir ifade ile bakteri kültürü ile aşılana örneklerde çok az bir artış görülmüştür. Bakteri kültürü aşılması ile uçur asit miktarının daha iyi kontrol edildiği literatürde de bildirilmiştir (Costantini ve ark., 2009). Yüksek miktarlardaki uçur asit, bakterilerin malolaktik aktiviteleri sonucunda oluşur (Ribereau-Gayon ve ark., 2006). Revel ve ark. (1999) MLF'den önce 0.29 g/l olan uçur asit miktarının MLF'den sonra bakteri suşlarına göre farklılık göstererek 0.34 - 0.41 g/l arasında değiştiğini belirtmişlerdir. MLF'den sonra uçur asit miktarında artış iki metabolik izyolu ile gerçekleşebilir. Fosfoketolaz yolu ile indirgen şekerlerden asetik asit oluşabilir (Henick-Kling, 1993 ; Riberau-Gayon ve ark., 2006) ve sitrik asit metabolizmasının ilk adımında asetik asit üretilebilir (Cogan, 1987; Ramos ve ark., 1995, Ramos ve Santos, 1996).

Malik asit miktarı kontrol şarabında 3.01 g/l bulunmuştur. Üzümün yetiştiği iklime ve üzüm çeşidine göre başlangıç malik asit miktarı 1.5 ile 8 g/l arasında değişmektedir (Lonvoud-Funel, 2010). MLF'den sonra şaraplarda beklendiği gibi iz miktarda malik asit bulunmuş ve buna karşın laktik asit miktarında önemli bir artış (0.2 g/l) saptanmıştır. MLF'den sonra laktik asit miktarları sırasıyla Spontan şarapta 2.0, VP41 bakteri kültürü aşılana şarapta 2.3 ve PN4 bakteri kültürü aşılana şarapta 2.4 g/l olarak bulunmuştur. Revel ve ark. (1999) farklı malolaktik bakteri suşları kullanarak yapmış oldukları çalışmada, MLF'den önce 3.16 g/l olan malik asit MLF'den sonra 1.85 g/l ve 2.55 g/l değerlerinde bulunmuştur. Maicas ve ark. (1999),

MLF'den önce 3.87 g/l olan malik asit miktarını MLF'den sonra 0.09-0.81 g/l olarak saptamışlardır. Yine benzer bir çalışmada Boido ve ark. (2009) malolaktik fermantasyondan sonra şaraplarda iz miktarlarda malik asit bulmuşlardır.

Şarapların gliserol miktarlarına baktığımızda, MLF'den önce gliserol miktarı 9.00 g/l bulunmuştur. MLF'den sonra ise spontan ve VP41 şaraplarında az bir artış, PN4 şarabında ise düşme saptanmıştır. Gliserol miktarı en yüksek VP41 örneğinde (10.09 g/l) ve en düşük PN4 (7.04 g/l) ve Spontan (9.28 g/l) örneklerde saptanmıştır. Gliserolün büyük bir kısmı alkol fermantasyonu sırasında üretilir. Gliserol, sek ve dömi-sek şaraplarda 5- 14 g/l miktarlarında bulunur ve kırmızı şaraplarda beyaz şaraplara göre daha yüksek miktarlarda bulunur. Gliserolün algılanma eşik değeri 5.2 g/l'dir ve kokusuz, renksiz bir bileşik olan gliserol şarabın viskozitesini artırır ve kıvamlı bir yapı verir (Swiegers ve ark., 2005).

Şarapların MLF'den sonra uçar asit ve laktik asit miktarlarına bakıldığında spontan olarak elde edilen şarapların uçar asit miktarlarının yüksek (0.55 g/l) ve laktik asit miktarlarının ise düşük (2.0 g/l) olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni spontan MLF'de ortamda *O. oeni* dışındaki bakterilerin de bulunmasından kaynaklanmış olabilir. Bu bakteriler şaraptaki malik asitin dışında diğer şeker ve organik asitlerin parçalanmasına neden olmaktadır. MLF'de bakteri kültürü kullanımı, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* gibi şarapta yüksek miktarda asetik asit oluşturarak bozulmaya neden olan laktik asit bakterilerinin gelişmesini engeller (Munoz ve ark., 2011).

4.4. Malolaktik Fermantasyonun Şarapların Aroma Bileşikleri Üzerine Etkisi

Spontan ve iki farklı bakteri suşu kullanılarak gerçekleştirilen MLF sonunda, Kalecik Karası şaraplarında yüksek alkoller (10 adet), esterler (12 adet), asitler (10 adet), 6C'lu bileşikler (2 adet), karbonil bileşikler (2 adet), fenoller (3 adet) ve laktonları (2 adet) içeren toplam 40 adet aroma maddesi tanımlanmış ve miktarları belirlenmiştir. Aroma maddelerinin toplam miktarları, MLF'den önce 82.01 mg/l iken, MLF'den sonra, spontan şarapta 103. 28 mg/l, VP41 şarabında 101. 59 mg/l, PN4 şarabında ise 104.16 mg/l olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Çizelge 4.3'de de

görüldüğü gibi MLF'den sonra bütün şaraplarda toplam aroma miktarlarında artış olmuştur. Fakat toplam aroma miktarlarındaki artış en fazla PN4 suşu kullanılarak üretilen şarapta saptanmıştır ve bunu sırasıyla spontan ve VP41 suşu kullanılarak üretilen şaraplar izlemiştir.

Çizelge 4.3. MLF'den önce ve MLF'den sonra Kalecik Karası Şaraplarının Toplam Aroma Miktarları*

Bileşikler (µg/l)	MLF'den önce		MLF'den sonra	
	Kontrol	Spontan	VP41	PN4
Yüksek alkoller	70024.9	76861.3	79189.9	80152.2
Esterler	8652.3	15911.4	14068.4	15100
Asitler	8529	6443.5	5726.7	5903.1
6C'lu Bileşikler	682.3	619.7	684.7	658.9
Karbonil Bileşikler	1870.3	1842.1	748.9	701.2
Fenoller	410.2	407.6	381.1	567.9
Laktonlar	376.8	1193.6	792.5	1084.3
Genel Toplam	82016.8	103289.2	101591.1	104167.6

*Sonaçlar üç ekstartksiyon tekerrürünün ortalaması olarak verilmiştir, Kontrol: Alkol fermantasyonu biten şarap, Spontan : Spontan olarak gerçekleştirilmiş MLF , VP41: VP41bakteri suşu ile aşılınmış şarap, PN4: PN4 bakteri suşu ile aşılınmış şarap

MLF'nin şarabın aroma bileşikleri üzerine etkisi ile ilgili çeşitli çalışmalar vardır. Maicas ve ark. (1999) MLF'nin şarabın aromasında etkisi olan uçucu bileşikler üzerinde etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Pazo-Bayon ve ark. (2005), iki farklı bakteri kültürü ile gerçekleştirdikleri MLF'den sonra, bakteriler arasında önemli metabolik farklılıklar olduğunu belirlemiş ve toplam aroma madde miktarlarının arttığını bildirmişlerdir.

Aroma maddeleri kimyasal yapılarına göre gruplandırılmış ve her bir grup aşağıda tartışılmıştır (Çizelge 4.4, 4.5).

Çizelge 4.4. MLF'nin Kalecik Karası Şaraplarının Aroma Bileşikleri Üzerine Etkisi

	AROMA MADDELERİ(µg/l)						F
	LRI	ID	MLF'den Önce		MLF'den Sonra		
Yüksek Alkoller							
			Kontrol	Spontan	VP41	PN4	
1-Propanol	1034	A,B	^d 2092.2±208	^b 2804.6±72	^a 3119.8±58	^{bc} 2638.4±445	*
İzobütil alkol	1085	A,B	^b 6477±222	^a 8276.9±355	^a 7845±798	^a 8041.2±434	*
1-Bütanol	1071	A,B	^c 216.7±21	^{a,b} 250±27	^{a,b} 268.2±39	^a 301±27	*
İzoamil alkol	1229	A,B	50204.4±3267	51818.5±1988	54933.5±3647	56339±1438	ö.d.
1-Pentanol	1244	A,B	^b 58.8±4	^a 67.5±3	^a 71.8±1	^a 72±1	*
2,3-Bütandiol	1576	A,B	^c 173.3±40	^a 1547.6±19	^b 1022.5±285	^b 1014.2±148	*
Metionol	1737	A,B	237.2±30	278.6±3	254.5±15	274.3±21	ö.d.
Benzil alkol	1912	A,B	246.2±18	277.7±3	256.7±21	279.5±10	ö.d.
2-Fenil etanol	1905	A,B	7974.9±461	7921.3±50	7250.2±414	7684.9±377	ö.d.
1H-indole-3-ethanol	2809	A,B	^c 2344.2±181	^{a,b} 3608.6±434	^a 4166.6±781	^{a,b} 3507.7±938	*
Toplam			70024.9	76861.3	79189.8	80152.2	
Esterler							
İzoamil asetat	1130	A,B	^a 3063.5±110	^c 1761.9±52	^{b,c} 1950.4±125	^b 2101.2±276	*
Etil hekzaonat	1238	A,B	^a 726.6±144	^b 363.5±39	^b 398.9±21	^b 403.6±18	*
heksil asetat	1222	A,B	^a 191.2±51	^b 66.4±17	^b 56.5±7	^b 56.9±2	*
Etil laktat	1353	A,B	^c 244.2±26	^a 10165.5±279	^b 8669.4±501	^a 9893±393	*
Etil oktanoat	1430	A,B	^a 1248.1±182	^b 413.5±4	^b 367.8±21	^b 404.6±22	*
Etil-3-hidroksibütanoat	1483	A,B	^{a,b} 139.3±13	^b 125.5±1	^b 127.4±8	^a 157.9±22	*
Etil dekanooat	1634	A,B	^a 603.6±32	^b 106.5±2	^b 90.7±8	^b 123.6±12	*
Dietil suksinat	1690	A,B	^c 53±6	^a 794.2±128	^b 409.2±101	^c 219.2±69	*
Etil 4-hidroksibütanoat	1819	A,B	1363.9±83	1327±4	1283.2±76	1311.9±88	ö.d.
2-Fenil etil asetat	1786	A,B	^a 185.6±1	^b 131.5±1	^b 136±10	^a 172.8±34	*
1-H-İndol-3-etil asetat	2592	A,B	^b 385.2±43	^a 524.4±98	^c 181.6±17	^d s	*
Toplam			8652.3	15911.4	14068.4	15100	
Uçucu Asitler							
Asetik asit	1461	A,B	^d 480.1±	^a 1365.1±	^c 816.2±	^b 1127.8±143	*
Propanoik asit	1584	A,B	58.9±5	82.2±16	85.8±15	89.2±21	ö.d.
İzobutrik asit	1588	A,B	215.7±26	201.9±5	204.6±14	192.1±32	ö.d.
Bütanoik asit	1647	A,B	172.6±56	144.5±2	135.8±10	202.1±66	ö.d.
Hekzanoik asit	1873	A,B	1404.2±65	1397.3±6	1329.3±56	1324.3±94	ö.d.
Oktanoik asit	2089	A,B	^a 2941.6±84	^b 2284.9±75	^b 2263.4±74	^b 2106.9±255	*
Nonanoik asit	2133	A,B	^c 17.7±1	^c 17.2±1	^b 32.3±2	^a 53.5±1	*
Dekanoik asit	2264	A,B	^a 2186.5±99	^b 626.7±6	^b 610.7±39	^c 458.6±88	*
Dodekanoik asit	2517	A,B	^a 694.1±34	^b 102.9±3	^b 97.6±15	^b 71.1±3	*
Hekzadekanoik asit	2886	A,B	^a 341.5±43	^b 220.8±15	^c 151±7	^b 277.5±39	*
Toplam			8529	6443.5	5726.7	5903.1	
6C'lu Bileşikler							
1-Hekzanol	1356	A,B	535.7±54	557.8±9	520.1±29	591.6 ±39	ö.d.
3-Hekzen-1-ol(E)	1384	A,B	^a 146.6±2	^b 61.9±2	^b 64.6±5	^b 67.3±2	*
Toplam			682.3	619.7	684.7	658.9	

Çizelge 4.4'ün devamı

Karbonil Bileşikler							
Diasetil	943	A,B	^a 1606.9±6	^b 211.4±44	^c s	^c s	*
Asetoin	1291	A,B	^c 263.4±42	^a 1630.7±59	^b 748.9±46	^b 701.2±36	*
Toplam			1870.3	1841.1	748.9	701.2	
Fenoller							
4-vinilguaiakol	2212	A,B	^a 209.2±45	^b 142.7±6	^b 122±6	^b 96.8±33	*
4-vinilfenol	2379	A,B	^b 112.7±18	^a 165.2±24	^c 50.9±9	^b 84.2±2	*
acetovanillon	2995	A,B	^c 88.3±9	^c 99.7±6	^b 208.2±40	^a 386.9±96	*
Toplam			410.2	407.6	381.1	567.9	
Laktonlar							
γ-Bütrolakton	1635	A,B	^d 376.8±10	^a 1055.7±19	^c 700.8±33	^b 896±115	*
4- Etoksikarbonil .gama.butanolakton	2168	A,B	^d s	^b 137.9±3	^c 91.7±9	^a 188.3±18	*
Toplam			376.8	1193.6	792.5	1084.3	
Genel Toplam			89847.8	103695.3	102293.7	104946.3	

Kontrol: Alkol fermentasyonu tamamlanmış şarap, Spontan: Spontan MLF, VP41: VP41 bakterisi suşu ile aşılanmış şarap, PN4: PN4 bakterisi suşu ile aşılanmış şarap. DB,Wax kolonda belirlenen Kovats indeks değeri, ±Standart sapma; ID, Tanımlama: A, Alıkonma indeksinin literatürle karşılaştırılarak tanımlama; B, kütle spektrometresi kullanarak tanımlama, s: saptanamadı, F: Varyans analizine göre farklılık durumu, *: p<0.05 önem düzeyinde önemlidir, öd: önemli değil

Çizelge 4.5.MLF’de Kullanılan Bakteri Kültürlerinin Kalecik Karası Şaraplarının Aroma Bileşikleri Üzerine Etkisi

AROMA MADDELERİ (µg/l)				
MLF’den Sonra				
<i>Yüksek alkoller</i>	Spontan	VP41	PN4	F
1-Propanol	2804.6±72	3119.8±58	2638.4±445	ö.d.
İzobütil alkol	8276.9±355	7845±798	8041.2±434	ö.d.
1-Bütanol	250±27	268.2±39	301±27	ö.d.
İzoamil alkol	51818.5±1988	54933.5±3647	56339±1438	ö.d.
1-Pentanol	67.5±3	71.8±1	72±1	ö.d.
2,3-Bütandiöl	1547.6±19	1022.5±285	1014.2±148	ö.d.
Metionol	278.6±3	254.5±15	274.3±21	ö.d.
Benzil alkol	277.7±3	256.7±21	279.5±10	ö.d.
2-Fenil etanol	7921.3±50	7250.2±414	7684.9±377	ö.d.
1H-indole-3-ethanol	3608.6±434	4166.6±781	3507.7±938	ö.d.
<i>Esterler</i>				
İzoamil asetat	1761.9±52	1950.4±125	2101.2±276	ö.d.
Etil hekzaonat	363.5±39	398.9±21	403.6±18	ö.d.
heksil asetat	66.4±17	56.5±7	56.9±2	ö.d.
Etil laktat	^a 10165.5±279	^b 8669.4±501	^a 9893±393	*
Etil oktanoat	^a 413.5±4	^b 367.8±21	^a 404.6±22	*
Etil-3-hidroksibütanoat	^b 125.5±1	^b 127.4±8	^a 157.9±22	*
Etil dekanooat	^{a,b} 106.5±2	^b 90.7±8	^a 123.6±12	*
Dietil suksinat	^a 794.2±128	^b 397.3±24	^b 219.2±69	*
Etil 4-hidroksibütanoat	1327±4	1283.2±76	1311.9±88	ö.d.
2-Fenil etil asetat	131.5±1	136±10	172.8±34	ö.d.
1-H-İndol-3-etil asetat	^a 524.4±98	^b 181.6±17	^c _s	*
<i>Uçucu Asitler</i>				
Asetik asit	^a 1365.1±1	^c 816.2±2	^b 1127.8±143	
Propanoik asit	82.2±16	85.8±15	89.2±21	ö.d.
İzobutrik asit	201.9±5	204.6±14	192.1±32	ö.d.
Bütanoik asit	144.5±2	135.8±10	202.1±66	ö.d.
Hekzanoik asit	1397.3±6	1329.3±56	1324.3±94	ö.d.
Oktanoik asit	2284.9±75	2263.4±74	2106.9±255	ö.d.
Nonanoik asit	^c 17.2±1	^b 32.3±2	^a 53.5±1	*
Dekanoik asit	^a 626.7±6	^b 610.7±39	^b 458.6±88	*
Dodekanoik asit	^a 102.9±3	^a 97.6±15	^b 71.1±13	*
Hekzadekanoik asit	^b 220.8±15	^a 151±7	^c 277.5±39	*

Çizelge 4.5'in devamı

6 C'lu Bileşikler				
1-Hekzanol	557.8±9	520.1±29	591.6±39	ö.d.
3-Hekzen-1-ol(E)	61.9±2	64.6±5	67.3±2	ö.d.
Karbonil Bileşikler				
Diasetil	^a 211.4±44	^b _s	^b _s	*
Asetoin	^a 1630.7±59	^b 748.9±46	^b 701.2±36	*
Fenoller				
4-vinilguaiakol	142.7±6	122±6	96.8±33	ö.d.
4-vinilfenol	^a 165.2±24	^c 50.9±9	^b 84.2±2	*
acetovanillon	^b 99.7±6	^b 208.2±40	^a 386.9±96	*
Laktonlar				
γ-Bütirilakton	^a 1055.7±19	^c 700.8±33	^b 896±115	*
4-Etoksi karbonil.gama.butanolakton	^a 137.9±3	^b 91.7±9	^a 188.3±18	*
Genel Toplam				
	103695.3	102293.7	104946.3	

Spontan: Spontan MLF , VP41: VP41bakteri suşu ile aşılınmış şarap, PN4: PN4 bakteri suşu ile aşılınmış şarap, ±Standart sapma, s: saptanamadı, F: Varyans analizine göre farklılık durumu, *: p<0.05 önem düzeyinde önemlidir, öd: önemli de ğil

4.4.1. MLF'nin Yüksek Alkoller Üzerine Etkisi

Yüksek alkoller maya metabolizmasının ikincil ürünleridir ve yüksek konsantrasyonda şaraba keskin, acı bir tat verirken, optimum konsantrasyon da şarabın meyvemsi aromasına katkıda bulunurlar (Nykanen ve ark. 1977, Lambrechts ve Pretorius, 2000, Swiegers ve ark., 2005). Yüksek alkoller alifatik (düz zincir) ve aromatik yapıda bulunurlar (Nykanen ve ark., 1977). Şarapta ki yüksek alkollerin konsantrasyonu 300 mg/l'nin altında ise bu şarabın duyuşal özelliğine olumlu etki eder. Ancak yüksek alkollerin konsantrasyonu 400 mg/l'nin üstüne çıkarsa şarap aromasını olumsuz etkiler (Rapp ve Versini.1991).

MLF'den önce ve MLF'den sonra spontan, VP41 ve PN4 Kalecik Karası şaraplarında toplam 10 adet yüksek alkol belirlenmiştir. Yüksek alkollerin toplam miktarları, MLF den önce 70.02 mg/l, MLF den sonra, spontan şarapta 76.86 mg/l, VP41 bakteri kültürü kullanılan şarapta 79.18 mg/l ve PN4 bakteri kültürü kullanılan şarapta ise 80.15 mg/l olarak bulunmuştur. Genel olarak MLF yüksek alkollerin miktarlarını arttırmış, artış bakteri kültürü kullanılan örneklerde spontana göre biraz daha yüksek olmuştur (Çizelge 4.4). Pazo-Bayon ve arkadaşlarının (2005) yapmış

olduğu bir çalışmada. MLF sonrasında yüksek alkol miktarının başlangıç şarabına göre arttığını bildirmişlerdir.

MLF birçok yüksek alkol bileşiğinde artışa neden olmakla birlikte bu artışlar 1-propanol, izobütil alkol, 1-bütanol, 1-pentanol, 2,3-bütandiol ve 1H-indol-3-etanol bileşiklerinde istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). MLF'den sonra en belirgin artış 2,3-bütandiol miktarında olmuştur. MLF dan önce 2,3-bütandiol miktarı 173.3 µg/l iken MLF'den sonra sırası ile Spontan şarapta 1547.6 µg/l, VP41'de 1022.5 µg/l ve PN4'de 1014.2 µg/l olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Spontan şaraptaki artış bakteri kültürü aşılana göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni spontan fermantasyonda *O. oeni* yanında başka bakterilerin de bulunmasından kaynaklanabilir. 2,3-Bütandiol hem maya hem de laktik asit bakteri metabolizması sonucu üretilen aroma bileşiğidir. Bu bileşiğin hafif tatlı acı bir aroması vardır ve şarapta duyuşsal önemi düşüktür (Jackson, 2000). Diasetil ve asetoin enzimatik yolla 2,3-bütandiol'e indirgenir. Bu iki indirgenme reaksiyonu şaraplardaki 2,3-bütandiolün yüksek miktarlarda bulunmasının nedenleridir (Maicas ve ark., 1999).

Yüksek alkoller içersinde izoamil alkol miktarındaki artış dikkati çekmiştir. Ancak, MLF'den önce ve sonra örnekler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.4). İzoamil alkol gibi dallanmış zincir yapılı yüksek alkoller mayalar tarafından Ehrlich yoluyla amino asitlerden açığa çıkarlar (Swiegers ve ark., 2005). MLF sonrasında bazı araştırmacılar izoamil alkol miktarının arttığını (Pazo-Bayon ve ark., 2005), bazı araştırmacılar ise değişmediğini bildirmişlerdir (Revel ve ark., 1999). Ugliano ve ark. (2005). MLF'nin yüksek alkoller üzerine önemli bir etkisinin olmadığını belirtmiş ve sadece 1-heptanol, 3-metil-1-pentanol ve 1-oktan-3-ol bileşiklerinde az miktarda artış gözlemlemişlerdir. Boido ve arkadaşlarının (2009) yapmış olduğu bir başka çalışmada da MLF sonrası şaraplarda yüksek alkol konsantrasyonlarında önemli bir artış gözlenmediği bildirilmiştir. Buna karşın Maicas ve ark. (1999)'nın yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise izobütanol, 1-propanol, 1-bütanol ve izoamil alkol konsantrasyonlarında farklılıklar belirlemişlerdir.

4.4.2. MLF'nin Esterler Üzerine Etkisi

Esterler alkol fermantasyonu sırasında oluşan ve şarabın meyvemsi aromasına önemli etkisi olan aroma bileşikleridir. Esterler kaynaklarına göre iki grup altında toplanabilir. Bunlardan birincisi yüksek alkollerin asetatları olup en önemlileri izoamil asetat, izobütil asetat, metil asetat ve 2-fenil asetatır, ikinci grup, yağ asitlerinin etil esterleri olup en önemlileri etil hekzanoat, etil oktanoat ve etil dekanooattır (Etievant, 1991).

MLF'den önce ve MLF'den sonra Spontan, VP41, PN4 Kalecik Karası şaraplarında toplam 12 adet ester bileşiği belirlenmiştir. Ester bileşiklerinin toplam miktarları, MLF'den önce 8.65 mg/l, MLF'den sonra ise spontan şarapta 15.91 mg/l, VP41 bakteri kültürü ile aşılınmış şarapta 14.06 mg/l, PN4 bakteri kültürü ile aşılınmış şarapta ise 15.10 mg/l bulunmuştur (Çizelge 4.4)

Genel olarak MLF ile birlikte ester dağılımında önemli değişiklikler olmuş ve toplam miktar artsa da birçok ester bileşiğinde azalma belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu önemli artıştan sorumlu iki temel bileşiğin etil laktat ve dietil süksinat olduğu saptanmıştır. Etil laktat konsantrasyonu başlangıç şarabında 244.2 µg/l iken, MLF'den sonra spontan şarapta 10165.5 µg/l, VP41de 8669.4 µg/l ve PN4'de ise 9893 µg/l olarak bulunmuştur. Spontan şarapta *O. oeni* suşları ile gerçekleştirilen fermantasyona göre daha yüksek miktarda artış olmuştur (Çizelge 4.4). Etil laktat MLF sırasında üretilen önemli bir aroma bileşiğidir. Etil laktat algılanma eşik değeri 60-110 mg/l olan ve şaraba tereyağımsı ekşi sütü anımsatan aromaları veren bir bileşiktir (Yılmaztekin ve ark., 2005; Ribereau-Gayon ve ark, 2006). Her üç şarapta etil laktat algılanma eşik değerinin altında bulunmuştur. Maicas ve ark. (1999) yaptığı çalışmada, *O. oeni* suşu ile MLF'si tamamlanmış şarapta 50 mg/l etil laktat belirlemişlerdir. Etil laktat üretimi laktik asit fermantasyonu ile ilişkilidir ve bu nedenle miktarı şaraptaki MLF aktivitesine göre değişiklik gösterir. Pazo-Bayon ve ark. (2005)'nin, *O. oeni* ve *L. plantarum* bakteri suşlarını kullanarak yaptıkları bir diğer çalışmada ise etil laktat miktarının, MLF sonrasında, başlangıç şarabının 4 katına çıktığı bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre başlangıç etil laktat konsantrasyonu 36.96 µg/l olarak belirlenmiştir ve MLF sonrasında *O. oeni* IS-18 suşu ile aşılınmış

şarapta 168.5 µg/l, IS-159 suşu ile aşılınmış şarapta 137µg/l olarak belirlenmiştir. *L. plantarum* J-39 suşu ile aşılınmış şarapta 235.04 µg/l, J-51 suşu ile aşılınmış şarapta ise etil laktat konsantrasyonu 189 µg/l olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada MLF sonrasında etil laktat konsantrasyonunun arttığı ve bakteri suşları arasında farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Boido ve ark. (2009), farklı kültür bakterileri ile tamamlanmış MLF'den sonra bütün şaraplarda etil laktat miktarında artış olduğunu bildirmişlerdir.

MLF'den önce dietil süksinat miktarı 53 µg/l iken, MLF'den sonra, spontan şarapta 794.2 µg/l, VP41 şarabında 409.2 µg/l ve PN4 şarabında 219.2 µg/l olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Dietil süksinat miktarı MLF'den sonra artmış olup şaraplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.4, 4.5). Pazo-Bayon ve ark. (2005) yapmış olduğu benzer bir çalışmada MLF'den sonra dietil süksinat konsantrasyonunun farklı bakteri suşları ile aşılınmış şaraplarda başlangıç şarabınının konsantrasyonun göre yaklaşık iki katı arttığını bildirmişlerdir. Dietil süksinat süksinik asitin esterleşmesi ile oluşur ve α -ketoglutarat metabolizmasının yan ürünüdür ve MLF sırasında konsantrasyonu artar (Ugliano ve ark., 2005).

MLF'den sonra her üç örekte de İzomil asetat (meyvemsi, muz), etil hekzaonat (meyvemsi,çiçeksi), 2-fenil etil asetat (bal, meyvemsi, çiçeksi), heksil asetat, etil oktaonat (meyvemsi, çiçeksi), etil dekanat (meyvemsi), konsantrasyonlarında düşme olmuştur. Etil-3-hidroksibütanoat miktarı ise sadece PN4 şarabında artmış, spontan ve VP41 şaraplarında ise miktarı başlangıç şarabına göre daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.4). izomil asetat, etil hekzaonat, heksil asetat, etil oktonat, etil dekanat, etil-4-hidroksibütanoat, 2-fenil etil asetat ve 1-H-indol-3-asetat miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.4). Mayalar, yağ asidi etil esterlerini esteraz ve alkol asetiltransferaz enzimleri yardımı ile alkol fermantasyonu sırasında üretirler. Ancak MLF sırasında etil laktat, etil asetat, etil hekzaonat ve etil oktaonat oluştuğu bilinmektedir (Lui, 2002). MLF sırasında ester sentezi ve hidrolizi laktik asit bakterilerinin esteraz aktivitesine bağlıdır. MLF'nin şaraptaki nihai ester konsantrasyonu ile ilgili karşıt görüşler vardır. Bazı çalışmalara göre alkol fermantasyonu orijinli farklı esterlerin konsantrasyonları, laktik asit metabolizması

sonucu önemli artış gösterirken (Delequies ve ark. 2000), diğer çalışmalarda esterlerin konsantrasyonlarında önemli bir düşme belirlenmiş ve şarabın meyvemsi özelliğinin önemli ölçüde düştüğü belirtilmiştir (Plassis ve ark. 2002). Henick-Kling ve ark. (1993) MLF'nin şarap aromasına etkisinin olması üzerine 3 grupta incelemiştir (meyvemsi, otsu, malolaktik aroma). Meyvemsi aromaların azalabileceğini, artabileceğini veya hiç değişmeyeceğini; Otsu aromaların azalabileceğini ve son olarak da malolaktik aromaların artacağını bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi MLF'den sonra şarapların toplam ester miktarları artsada bu artışın çok büyük oranda sadece etil laktattan kaynaklandığı saptanmıştır. Öte yandan her üç Kalecik Karası şarabında da meyvemsi aroma veren esterler azalmıştır.

4.4.3. MLF 'nin Uçucu Asitler Üzerine Etkisi

Uçucu asitler kısa karbon zincirli organik asitlerdir. Şarapta uçucu asit konsantrasyonu genellikle 500-1000 mg/l arasında değişir. Asetik asit uçucu asitlerin %90'nı oluşturur. Propionik asit, hekzanoik asit gibi geri kalan uçucu asitler bakteri ve mayalar tarafından lipid metabolizması sonucunda sentezlenirler.

MLF'den önce ve MLF'den sonra spontan, VP41 ve PN4 Kalecik Karası şaraplarında toplam 10 adet uçucu asit bileşiği belirlenmiştir. MLF'den önce toplam uçucu asit miktarı 8.52 mg/l iken, MLF'den sonra spontan şarapta 6.43 mg/l, VP41 şarabında 5.72 mg/l ve PN4 şarabında ise 5.90 mg/l olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.4'de de görüldüğü gibi MLF'den sonra toplam uçucu asit miktarlarında azalma olmuştur. MLF uygulanmış şaraplar içerisinde en yüksek uçucu asit miktarı spontan şarapta belirlenmiştir. Uçucu asitler şaraplarda yüksek miktarlarda bulduklarında bozulmuş peynire benzeyen kokular vererek şarap kalitesini düşürürler (Ugliano ve ark., 2003). Boido ve ark., (2009) MLF'den sonra DSM7008 kültür bakterisi ile aşılınmış şarapta toplam uçucu asit miktarında çok az bir artış olduğunu buna karşın D-11 kültür bakterisi ile aşılınmış şarapta toplam uçucu asit miktarının belirgin bir şekilde arttığını bildirmişlerdir. Maicas ve ark., (1999) başlangıç şarabına göre uçucu asit miktarının bakteri suşuna göre farklılık göstererek BM3, VV5, TE3, CH4 bakterisi

suşları ile aşılınmış şaraplarda arttığını buna karşın MA4 bakteri kültürü ile aşılınmış şarapta ise azaldığını bildirmişlerdir.

MLF'den önce ve MLF'den sonra spontan. VP41 ve PN4 Kalecik Karası kırmızı şaraplarında bulunan asetik asit, oktanoik asit ve nonanoik asit, dekanolik asit, dodekanoik asit ve hekzadekanoik asit miktarları arasında fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Oktanoik asit şaraplarda miktar olarak en fazla bulunan uçucu asit olmuştur ve bunu sırasıyla hekzanoik asit ve asetik asit izlemiştir (Çizelge 4.4).

Şarabın aroması üzerine etkili olan en önemli uçucu asit bileşiği asetik asittir. Kalecik Karası şaraplarında asetik asit miktarı MLF'den önce 480.1 µg/ iken MLF'den sonra sırasıyla Spontan şarapta 1365.1µg/l, VP41 şarabında 816.2 µg/l ve son olarak da PN4 şarabında 1127.8 µg/l olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Asetik asit sitrik asit metabolizması ile oluşur. Sitrik asit metabolizması sonucunda üretilen asetik asit miktarı başlangıçtaki substrat miktarına göre değişir ve genellikle 0.1-0.2 g/l artar. Şarap aromasına etki eden asitler asetik asit (sirke kokusu), propanoik asit (keçi kokusu) ve bütanoik asit (bozulmuş tereyağı)'tir. Asetik asit dışındaki asitler genellikle şarapta algılanma eşik değerinin altında bulunurlar (Rapp ve ark., 1986, Costello, 2005).

Görüldüğü gibi MLF'den sonra Kalecik Karası şaraplarının toplam uçucu asit miktarları düşmüştür. Bakteri kültürü aşılınarak tamamlanmış MLF'den sonra şaraplarda spontan şaraba göre daha az toplam uçucu asit miktarı saptanmıştır.

4.4.4. MLF'nin 6C'lu Bileşikler Üzerine Etkisi

6C'lu bileşikler, temel olarak üzümde bulunan linoleik ve linolenik asitten ard arda meydana gelen enzimatik reaksiyonlar sonucunda oluşurlar (Oliveira ve ark., 2006). MLF'den önce ve MLF'den sonra spontan, VP41 ve PN4 Kalecik Karası şaraplarında toplam 2 adet 6C'lu bileşik belirlenmiştir. MLF'den önce 6C'lu bileşiklerin konsantrasyonu 0.58 mg/l, MLF'den sonra ise spontan şarapta 0.63 mg/l, VP41 şarabında 0,46 mg/l ve PN4 şarabında 0.64 mg/l olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). MLF'den sonra 1-hekzanol miktarında bir değişim olmazken, 3-

hekzen-1-ol miktarında düşüş belirlenmiştir. MLF'den önce ve sonra şaraplarda bulunan 3-hekzen-1-ol (trans) miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$) Henick-Kling ve ark. (1993) MLF'nin otsu aromaları azaltabileceğini bildirmişlerdir. Maicas ve ark. (1999) ise, MLF'den sonra 1-hekzanol miktarında bir değişme olmadığını bildirmişlerdir. Boido ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada MLF'nin sonunda 6C'lu bileşiklerin miktarında önemli bir fark olmadığını bildirmişlerdir.

4.4.5. MLF'nin Karbonil Bileşikler Üzerine Etkisi

Karbonil bileşikler, fermantasyon sırasında mikroorganizmalar tarafından ortamdaki karbon kaynağına bağlı olarak karbonhidrat veya sitrik asit metabolizması, lipit oksidasyonu veya amino asit indirgenmesiyle sentezlenirler (Swiegers ve ark., 2005). MLF'den önce ve MLF'den sonra spontan, VP41 ve PN4 şaraplarında diasetil ve asetoin olmak üzere toplam 2 adet karbonil bileşiği tanımlanmıştır. Karbonil bileşiklerin toplam miktarları MLF'den önce 1,87 mg/1 iken MLF'den sonra, spontan şarapta 1.89 mg/1, VP41'de 0.74 mg/1 ve PN4 'de 0.7 mg/1 bulunmuştur. Çizelge 4.4'de de görüldüğü gibi bütün şaraplarda asetoin tespit edilmiştir, fakat diasetil sadece spontan şarapta tespit edilmiş olup kültür bakterisi aşıl原因 şaraplarda tespit edilememiştir. Alkol fermantasyonu sırasında maya metabolizması sonucunda 0.2-0.3 mg/1 gibi düşük konsantrasyonlarda diasetil üretilir fakat bu, daha sonra büyük oranda asetoin ve 2,3 bütandiole metabolize edilir (Bartowsky ve ark, 2004; Costello, 2005).

MLF'den önce ve MLF'den sonra Spontan, VP41 ve PN4 şaraplarda belirlenen diasetil ve asetoin miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p< 0.05$). MLF'den sonra bakterisi kullanılarak elde edilen şaraptaki asetoin miktarı spontan şaraptaki miktara göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi MLF'den önce asetoin konsantrasyonu 263.4 $\mu\text{g}/1$ iken MLF'den sonra artarak Spontan şarapta 1620.7 $\mu\text{g}/1$, VP41 şarabında 748.2 $\mu\text{g}/1$ ve PN4 şarabında 701.2 $\mu\text{g}/1$ olarak bulunmuştur. Asetoin miktarındaki en fazla artış Spontan şarapta görülmüştür. Kültür bakterileri kullanılan şaraplardaki asetoin

miktarları birbirine oldukça yakın bulunmuştur. MLF'den sonra şarapta diasetil ve asetoin miktarının düşmesi istenen bir özelliktir.

Diasetil konsantrasyonu MLF'den önce 1606.8 µg/l iken MLF'den sonra spontan şarapta azalarak 265 µg/l olarak bulunmuştur. VP41 ve PN4 şaraplarında ise diasetil bulunamamıştır (Çizelge 4.4). Diasetilin algılanma eşik değeri 0,2-2,3 mg/l arasında olup, bu değer şarap çeşidine göre değişmektedir (Costello, 2005). Diasetil miktarı, MLF'den önce kontrol örneğinde ve spontan şarapta algılanma eşik değerinin üstünde bulunmuştur. Diasetil sitrik asit metabolizması sırasında üretilir ve daha sonra asetoin ve 2,3-bütandiole indirgenebilir. Kontrolsüz MLF sonunda diasetil konsantrasyonu çok artabilir bu da şarabın duyuşsal özelliğini olumsuz yönde etkiler. Izquierdo Canas ve ark. (2008) spontan MLF'nin Tempranillo şarabının aroma bileşenlerine etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, diasetil ve asetoin bileşiklerinde MLF sonrasında artış olduğunu bildirmişlerdir ve sırasıyla diasetil konsantrasyonunu 4.08 ve 4.84 mg/l bulunmuştur. Revel ve ark., (1999), MLF'den önce 0.25-0.29 mg/l olan diasetil miktarını MLF'den sonra 0.53-0.73 mg/l bulmuşlardır. MLF'den önce 5.09-5.15 mg/l olan asetoin miktarını ise MLF'den sonra 4.03-5.06 mg/l olarak bulmuşlardır.

Görüldüğü gibi MLF'den sonra bütün şaraplarda diasetil miktarında azalma, asetoin miktarında ise artma tespit edilmiştir. Asetoin miktarı özellikle spontan olarak gerçekleştirilen şarapta çok artmıştır. Asetoin diasetilin indirgenmesi sonucunda oluşur. Çizelge 4.4 incelendiğinde spontan olarak gerçekleşen MLF'de oluşan diasetilin bir kısmının asetoinine indirgenmediğini görmekteyiz. Diasetil miktarı ise MLF'den sonra belirgin bir şekilde azaldığını bakteri kültürü aşılınmış şaraplarda ise diasetile hiç rastlanmadığını görmekteyiz. Diasetil 5 mg/l'nin altında şaraba dolgunluk verir ve şarabın karamel ve kabuğumsu aromalarını artırır. 5mg/l'nin üstünde ise şaraba istenmeyen tereyağımsı bir aroma verir (Costantini ve ark., 2009).

4.4.6. MLF'nin Uçucu Fenoller Üzerine Etkisi

Fenoller, kırmızı şarap kalitesi ve karakteristiği için önemli olan bileşiklerdir. Fenoller şarabın renk, tat, aroma, ağız hissi ve mikrobiyal özelliklerine etki ederler. Uçucu fenoller, üzüm şirasında bulunan hidrosinamik asit öncüllerinden meydana gelirler. Çok düşük algılanma eşik değerleri vardır ve bundan dolayı kolayca algılanabilirler (Swiegers ve ark., 2005).

MLF'den önce ve MLF'den sonra spontan, VP41 ve PN4 şaraplarında 4-vinilguaiakol, asetovanilon ve 4-vinilfenol olmak üzere toplam 3 adet fenol bileşiği tanımlanmıştır. Fenol bileşiklerinin toplam miktarları MLF'den önce 0.41 mg/1, MLF'den sonra, spontan şarapta 0.40 mg/1, VP41 şarabında 0.38 mg/1 ve PN4 şarabında ise 0.56 mg/1 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Şarapta istenmeyen kokulara neden olan 4-vinilguaiakol miktarı bütün şaraplarda düşmüştür, fakat en belirgin düşüş PN4 şarabında görülmüştür. 4-vinilguaiakol şaraba ilaç benzeri bir koku verir (Swiegers ve ark., 2005).

MLF'den önce 4-vinilfenol miktarı 112.7µg/ iken MLF'den sonra Spontan şarapta 165.2 µg/1 bulunmuş, buna karşın VP41 ve PN4 şaraplarında 50.9 µg/1 ve 84.2 µg/1 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). MLF'nin spontan ve bakteri kültürü ile gerçekleştirilmesine bağlı olarak, 4-vinilfenol miktarı değişmiştir. 4-Vinilfenol miktarı spontan şarapta MLF öncesine göre önemli düzeyde artmış ($p < 0.05$), buna karşın *O. oeni* suşları kullanılan şaraplarda ise azalmıştır. 4-Vinilfenol şarapta istenmeyen kokulara neden olan bir fenoldür. Bu bileşik şaraba, ilaç ve at terine benzeyen kokular verir (Ribereau- Gayon ve ark. 2006; Pollnitz ve ark., 2000). Bu nedenle MLF sonrasında bu bileşiğin miktarının düşük olması istenen bir özelliktir. Genellikle MLF'nin bakteri kültürü ile gerçekleştirildiği şaraplarda bu bileşiğin miktarının düşük olduğu bildirilmiştir (Costantini ve ark., 2009). Ugliano ve ark. (2006), dört farklı bakteri kültürü ile gerçekleştirdikleri MLF'nin sonunda bütün şaraplarda 4-vinilfenol ve 4-vinilguaiakol miktarlarında belirgin bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bodio ve ark. (2009)'nın yaptıkları çalışmada ise, DSM7008 suşu ile gerçekleştirilmiş MLF'den sonra şarapta 4-vinilfenol miktarı artmış, D-11 suşu ile gerçekleştirilmiş şarapta ise başlangıç şarabına göre miktar değişmemiştir.

MLF'den önce şaraptaki asetovanilon miktarı 88.3 µg/l iken MLF'den sonra spontan şarapta 99.7µg/l, VP41 şarabında 208.2µg/l ve son olarak da PN4 şarabında 386.9 µg/l olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi MLF sonrasında şaraplardaki asetovanilon miktarları artmış ve özellikle bakteri kültürü kullanılan örneklerde belirgin bir artış saptanmıştır. MLF'den sonra her üç örnekte asetovanilon miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.5). Asetovanilon miktarı üzerinde kullanılan bakteri suşunun önemli düzeyde etkili olduğu belirlenmiştir.

4.4.7. MLF'nin Laktonlar Üzerine Etkisi

Şaraplarda fermantasyon sırasında oluşan en önemli lakton bileşiği γ -bütirolaktondur. Bu lakton Ehrlich yoluyla glutamik asitin dekarboksilasyonu ve deaminasyonu ile oluşan γ -hidroksibütirik asitin laktonizasyonu ile oluşur. Ancak bu bileşik aynı zamanda üzümde de gelebilir (Ribereau-Gayon ve ark., 2006).

Malolaktik fermantasyondan önce şarapta sadece γ -bütirolakton bileşiği belirlenmiştir. MLF'den sonra ise Spontan, VP41 ve PN4 şaraplarında γ -bütirolakton ve 4-etoksi karbonil-gama-bütanolakton olmak üzere toplam 2 adet lakton bileşiği tanımlanmıştır. Laktonların toplam miktarları MLF'den önce 0.37 mg/l iken MLF'den sonra Spontan şarapta 1.19 mg/l, VP41 şarabında 0.79 mg/l ve PN4 şarabında ise 1.08 mg/l bulunmuştur (Çizelge 4.4). Görüldüğü gibi MLF sonunda toplam lakton miktarı artmıştır.

MLF'den önce γ -bütirolakton miktarı 376.8 µg/l iken, miktar MLF'den sonra her üç şarapta da artmış ve sırasıyla spontan şarapta 1055.7 µg/l VP41 şarabında 700.8 µg/l ve PN4 şarabında 896 µg/l bulunmuştur. MLF γ -bütirolakton miktarını her üç örnekte de önemli düzeyde etkilemiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.4). MLF'den sonra Spontan, VP41 ve PN4 şarapları arasındaki fark da önemli düzeyde bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.5). Ugliano ve ark.(2005), yaptıkları çalışmada MLF'den sonra γ -bütirolakton miktarının arttığını bildirmişlerdir. Boido ve ark. (2009), γ -bütirolakton miktarını MLF'den önce 506 µg/l, MLF'den sonra ise, 593 µg/l ve 1374 µg/l olarak bulmuşlardır. Maicas ve ark. (1999), MLF'den sonra γ -

bütirolakton miktarında 0.4 mg/1 artış olduğunu bildirmişlerdir. Pazo-Bayon ver ark. (2005) MLF'den sonra γ -bütirolakton miktarının arttığını bildirmiş ve *O. oeni* ile tamamlanmış şarapta *L. plantarum*'a göre bu artışın daha fazla olduğunu bulmuşlardır. γ -Bütirolakton *O. oeni* 'nin α -ketoglutarat metabolizmasının yan ürünüdür ve şaraba şeftali aroması verir (Yılmaztekin ve ark. 2005, Ugliano ve ark., 2005).

MLF'den sonra her üç örnekte de 4-etoksi karbonil.gamma.bütirolakton bulunmuştur (Çizelge 4.4). Bu bileşiğin sadece MLF'den sonra saptanması, bakteri suşları tarafından oluşturulduğunu göstermektedir. Spontan ve suşlar arasındaki fark her üç örnekte de önemli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Çizelge 4.5).

Görüldüğü gibi MLF Kalecik Karası şaraplarında ki lakton bileşiklerinin miktarlarını etkilemiştir. Farklı bakteri kültürleri karşılaştırıldığında ise VP41 ve PN4 arasında lakton bileşiklerinin metabolizmasında farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

4.5. Şaraplarının Duyusal Özellikleri

MLF'yi spontan olarak, VP41 ve PN4 bakteri suşları ile gerçekleştirilen Kalecik Karası şarapları, 9 kişilik panelist grubu tarafından değerlendirilmiştir. Panelistler şarapları renk, koku, tat, aroma, ekşilik, acılık, burukluk, dolgunluk ve genel izlenim olmak üzere 9 belirleyici özelliğe göre 10 puan üzerinden değerlendirmişlerdir. Şarapların Lezzet Profil Analizi sonuçları Çizelge 4.6'de verilmiş ve örümcek ağı diyagramı üzerinde Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

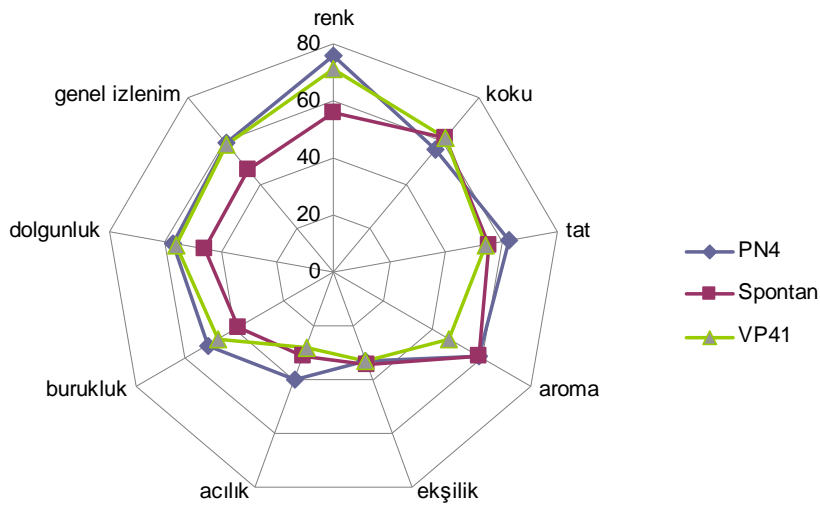
Lezzet profil analizinde şaraplar renk açısından değerlendirildiğinde 8.4 ile PN4 şarabı ilk sırada yer almış ve bunu 7.8 ile VP41 ve 6.2 ile Spontan şarap izlemiştir. Koku açısından spontan şarap ve VP41 birbirine oldukça yakın puanlar alırken, PN4 suşu kullanılan şarap 6.2 puan almıştır. Aroma açısından Spontan ve PN4 aynı puanı almış, VP41 ise bunlara göre daha düşük puan (5.2) almıştır. Tat açısından 7 puan ile VP41 suşu kullanılan şarap ilk sırada yer almıştır. Ekşilik bakımından her üç şarap da birbirine yakın puanlar almıştır. Acılık bakımından PN4 suşu kullanılan şarap diğer ikisine göre daha yüksek puan almıştır. Burukluk

dolgunluk ve genel izlenim açısından bakteri kültürü kullanılan şaraplar spontan şaraba göre daha yüksek puanlar almışlardır. Yapılan benzer çalışmalarda bakteri kültürü kullanımının lezzet bileşenlerini ve dolgunluğu geliştirdiği bildirilmiştir (Costello, 2005). Malolaktik fermantasyonun şarap aromasına duyuşal etkisi üzüm türüne göre de değişmektedir. Chardonnay şarabında MLF kuvvetli bir şekilde aroma ve ağız hissine etki ederken Riesling de sadece daha yumuşak ve damakta daha dengeli bir tat vermektedir. Yapılan çalışmalarda MLF'den sonra şarap aromasının duyuşal olarak değiştii, malolaktik aromaların arttığı meyvemsi aromaların değişmediği ve otsu aromaların azaldığı bildirilmiştir (Henick-Kling ve ark., 1993).

Çizelge 4.6. Şarapların Lezzet Profil Analizi Sonuçları*

Özellikler	Spontan	VP41	PN4
Renk	6.2	7.8	8.4
Koku	6.8	6.7	6.2
Tat	6.5	5.2	6.5
Aroma	6.1	6	7
Ekşilik	3.7	3.6	3.6
Acılık	3.4	3.1	4.4
Burukluk	4.3	5.2	5.6
Dolgunluk	5.1	6.2	6.3
Genel izlenim	5.2	6.5	6.5

*: Ortalama değerleri



Şekil 4.5 Kalecik Karası Şaraplarının Lezzet Profil Diyagramı

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada MLF'nin ve MLF'de iki farklı bakteri kültürü (*O. oeni* VP41, *O. oeni* PN4) kullanımının, Kalecik Karası şarabının aroma bileşikleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

MLF sırasında malik asitin laktik aside dönüşümü kağıt kromatografisi ve HPLC analizleri ile izlenmiştir. Şaraplarda aroma maddelerinin analizi, sıvı sıvı ekstraksiyonun ardından GC-MS-FID ile gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda şaraplarda genel ve duyu analizleri de yapılmıştır.

Elde edilen bulgulara göre;

MLF'de bakteri kültürü kullanımı fermantasyonun kısa sürede başlamış ve spontan olarak yürütülen MLF'ye göre daha kısa sürede tamamlanmasını sağlamış yani, şarabı daha kısa sürede stabil hale getirmiştir.

Genel bileşim olarak MLF sonucunda şaraplarda toplam asit miktarı düşmüş, malik asit tamamen parçalanmış buna karşın laktik asit miktarları, pH değerleri ve uçur asit miktarları artmıştır. Kültür kullanımı spontan MLF'ye göre daha az miktarda uçur asit oluşumunu ve daha fazla miktarda laktik asit oluşumu sağlamıştır.

MLF şarapların aroma bileşikleri miktarı ve dağılımı üzerinde etkili olmuştur. MLF şaraplardaki aroma maddelerinin miktarlarını arttırmıştır. MLF'den önce toplam aroma miktarı 82.01 mg/l iken MLF'den sonra spontan şarapta 103.28 mg/l, VP41'de 101.59 mg/l ve PN4 şarabında 104.16 mg/l bulunmuştur. Tanımlanan aroma bileşiği miktarı MLF'den önce 40 adet iken MLF'den sonra Spontan şarapta 39, VP41 şarabında 39 ve PN4'de 38 adet bulunmuştur.

MLF ile aroma gruplarından yüksek alkoller, esterler ve laktonların toplam miktarları artmıştır. MLF aroma bileşiklerinden özellikle 2,3-bütandiol, etil laktat, dietil süksinat, asetik asit, asetoin, 4-vinilfenol ve γ -bütirolakton miktarlarını belirgin bir şekilde etkilemiştir. Diasetil ve 4-vinilfenol dışında bu bileşiklerin miktarları üç şarapta da büyük oranda artmıştır. En yüksek artış 2,3-bütandiol ve etil laktat miktarlarında saptanmıştır. Diasetil miktarı MLF'den sonra her üç şarapta da düşmüş ve bakteri kültürü aşılardan şaraplarda saptanmamıştır. 4-Vinilfenol miktarı ise spontan şarapta artarken bakteri kültürü kullanılan şaraplarda düşmüştür. Bakteri kültürü kullanımı spontan olarak yürütülen MLF'ye göre aroma bileşiklerinin miktarı üzerinde etkili

olmuştur. Spontan fermantasyonda 2,3-bütandiol, etil laktat, dietil süksinat, asetik asit, asetoin, 4-vinilfenol ve γ -bütirolakton miktarları kültür kullanılan örneklere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu bileşiklerden 2,3-bütandiol, asetik asit, diasetil, 4-vinifenol yüksek miktarda şaraplara kötü koku veren bileşiklerdir.

Duyusal olarak, bakteri kültürü kullanılarak gerçekleştirilen MLF spontana göre şaraplarda burukluk, dolgunluk ve beğenilirliği arttırmıştır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, Kalecik Karası şaraplarında MLF’de bakteri kültürü kullanımı aroma maddeleri üzerinde etkili olmuş ve şaraplarda kötü koku oluşumunu azaltmış, duysal açıdan dolgunluğu da arttırmıştır. Bu nedenlerden dolayı uygulamada Kalecik Karası şarabı üretiminde MLF’de *O. oeni* VP41 ve *O. oeni* PN4 suşlarının kullanımı önerilir.

KAYNAKLAR

- ALTUĞ, T. Ve ELMACI, Y., 2005. Gıdalarda Duyusal Değerlendirme. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Müh. Bölümü, Meta Basım Bornova, İzmir, 92s.
- ANONYMOUS, 2005. Reference Methods for Analysis of Wines. Official Journal of European Communities, Council Regulation (EEC) No:1990R2676-EN-2005,194s.
- 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.
- BAYONOVE, C., 1992. Les composés terpeniques (Doneche, B., Editör), Les acquisitions récentes en chromatographie du vin, Technique et Documentation, Lavoisier-Paris, 99-119.
- BAUER, R., DICKS, L.M.T, 2004. Control of Malolactic Fermentation in Wine. A Review. South African Journal of Enology and Viticulture, 25 (2), 75-88.
- BERTRAND, A., 1981. Formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique, incidence sur la qualité du vin. Colloque Soc. Fr. Microbiol., Reims, Talence, 251-267.
- BERTRAND, A., 1999. Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 47, 4003-4008.
- BLANCH, G.P., REGLERO, G., BAUMES, R.L., CORDONIER, R.E., 1985. A Comparison of Different Extraction Methods for Volatile Components of Grape Juice. Journal of Chromatographic Science, 29, 11-15.
- BOIDO, E., MEDINA, K., FARIÑA, L., CARRAU, F., VERSINI, G., DELLACASSA, E., 2009. The Effect of Bacterial Strain and Aging on the Secondary Volatile Metabolites Produced during Malolactic Fermentation of Tannat Red Wine. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 57, 6271-6278.

- CABAROĞLU, T., 1995. Nevşehir-Ürgüp Yöresinde Yetiştirilen Beyaz Emir Üzümünün ve Bu Üzümünden Elde Edilen Şarapların Aroma Maddeleri Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 152 s.
- CABAROĞLU, T., 2003. Üzümlerde Aroma Maddeleri ve Şarapçılık Açısından Önemi. Gıda 28(6), 599-605.
- CABAROĞLU, T., YILMAZTEKİN, M., 2010. Aroma Biyoteknolojisi. Gıda Biyoteknolojisi. Nobel Yayın Dağıtım, 1. Baskı, Bölüm 10, 375-390.
- CANBAŞ, A., CABAROĞLU, T., 2000. Kabuk maserasyonunun İskenderiye Misket Üzümünden Elde Edilen Şıradaki Aroma Maddeleri Üzerine Etkisi. Gıda Dergisi, 25(1), 61-68.
- CANBAŞ, A., 2008. Şarap Teknolojisi Ders Notları. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ADANA, 163(s).
- CHATONNET, P., DUBOURDIEU, D., BOIDRON, J.-N., PONS, M., 1992. The Origin of Ethylphenols in Wines. Journal of Science Food and Agriculture, 60, 165-178.
- COGAN, T.M., 1987. Co-metabolism of Citrate and Glucose by *Leuconostoc spp*: Effects on Growth, Substrates and Products. Journal of Applied Bacteriology, 63, 551-558.
- COSTANTINI, A., GARCIA-MORUNO, E., MORENO-ARRIBAS, M.V., 2009. Biochemical Transformations Produces by Malolactic Fermentation (MORENO-ARRIBAS, M. V., POLO, M. C., Editörler). Wine Chemistry and Biochemistry, Springer, New York, USA, 2, s.28-49.
- COSTELLO, P., 2005. The Chemistry of Malolactic Fermentation, (MORENZINO, R., SPECHT, K. S., Editörler). Malolactic Fermentation in Wine. Lallemand Inc, Canada, 4:1-4:11.
- DAVIS, C.R., WIBOWO, D., ESCHENBRUCH, R., LEE, T.H., FLEET, G.H., 1985. Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review. American Journal of Enology and Viticulture, 36(4), 290-301.

- DELEQUIS, P., CLIFF, M., KING, M., GIRARD, B., HALL, J., REYNOLDS, A., 2000. Effect of Two Commercial Malolactic Cultures on the Chemical and Sensory Properties of Chancellor Wines Vinified with Different Yeasts and Fermentation Temperatures. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(1), 42-48.
- DELLACASSA, E., 2009. The Effects of Bacterial Strain and Aging on the Secondary Volatile Metabolites Produced during Malolactic Fermentation of Tannat Red Wine. *Journal of Food Chemistry*. 57, 6271-6278.
- ETIEVANT, P.X., 1991. Wine In: Volatile Compounds of Food and Beverages. Ed. H. Maarse (Marcel Dekker Inc: New York, USA), 483-546.
- FLEET, G.H., LAFON-LAFOURCADE, S., RIBEREAU-GAYON, 1984. Evolution of Yeast and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 1034-1038.
- HENSCHKE, P. A., JINAREK, V., 1993. Yeast-metabolism in Nitrogen Compounds. *Wine Microbiology and Biotechnology*. 'Ed. G. M. Fleet' Harwood Academic Press. Chur, Switzerland, 507 s.
- HENICK-KLING, T., ACREE, T., GAVITT, B.K., KRIEGER, S.A., LAURENT, M.H, 1993. Sensory Aspects of Malolactic Fermentation, pp: 148-152.
- IZQUIERDO CAÑAS, P.M., GARCÍA ROMERO, E., GÓMEZ ALONSO, S., PALOP HERREROS, M.L.L., 2008. Changes in the Aromatic Composition of Tempranillo Wines during Spontaneous Malolactic Fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (8), 724-730.
- JACKSON, R. S., 2000. Wine science. Principles and Application. Academic Press, San Diego. New York, Pp. 184-186 & 264-265.
- KRIEGER, S., 2005. The History of Malolactic Bacteria in Wine, Chapter 3. Malolactic Fermentation in Wine. Lallemand Inc, Canada, 3:1-3:9, 8:1-8:6.
- KUNKEE, R.E., 1974. Malolactic Fermentation and Winemaking. *Chemistry of Winemaking*, chapter 7, 151-170.
- LAMBRECHTS, M.G. and PRETORIUS, I.S. 2000. Yeasts and Importance to Wine Aroma. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21, 97-129.

- LONVOUD-FUNEL, A., 2010. Managing Wine Quality. Volume 2: Oenology and Wine Quality (REYNOLDS, A.G., Editor) Woodhead Publishing Limited, USA, 60-89.
- LIU, S.-Q., 2002. Malolactic Fermentation in Wine-Beyond Deacidification. Journal of Applied Microbiology, 92, 589-601.
- MAICAS, S., GIL, J.V., PARDO, I., FERRE., S., 1999. Improvement of Volatile composition of Wines by Controlled Addition of Malolactic Bacteria, 1999. Food Research International, 32, 491-496.
- MARAIS, I., 1983. Terpens in The Aroma of Grapes and Wines: A review. South African Journal of Enology and Viticulture, 4, 49-60.
- MARTORELL, N., MARTI, M., MESTRES, M., BUSTO, O., GUASCH, J., 2002. Determination of 4-Ethylguaicol and 4-Ethylphenol in Red Wines Using Headspace Solid-Phase Micro Extraction-Gas Chromotography. Journal of Chromotography A, 975: 349-354.
- MONJE, M.,C., PRIVAT, C., GASTINE, V., NEPVEU, F., 2002. Determination of Ethylphenol Compounds in Wine by Headspace Solid-Phase Micro Extraction in Conjunction With Gas Chromatography and Flame Ionization Detection. Analytica Chimica Acta, 458 (1): 111-117.
- MUNOZ, R., MORENO-ARRIBAS, M.V., de las RIVAS, B., 2011., Lactic Acid Bacteria. Molecular Wine Microbiology (8), Elsevier, USA, s.191-218.
- NIELSEN, J.C., RICHELIEU, M., 1999. Control of Flavor Development in Wine during and after Malolactic Fermentation by *O. oeni*. Applied and Enviromental Microbiology, 740-745.
- NYKÄNEN, L.L., NYKANEN, I., SUOMALAINEN, H., 1977. Distribution of Esters Produced During Sugar Fermentation Between the Yeast Cell and the Medium. Journal of Institute of Brewing, 83, 32-34.
- NYKÄNEN, L., 1986. Formaiton and Accurrence of Flavor Compounds in Wine and Distilled Alcoholic beverages. American Journal of Enology and Viticulture,37, 84-96.

- OLIVEIRA, J. M., FARIA, M., SA, F., BARROS, F., ARUJO, I. M., 2006. C6-Alcohols as Varietal Markers for Assessment of Wine Origin. *Analytica Chimica Acta*, 563, 300-3009.
- OUGH, C.S., AMERINE, M.A., 1988. *Methods for Analysis on Musts and Wines*. John Willey and Sons, New York, 377 s.
- ÖZDAMAR, K., 1999. *Paket Programları ile İstatistiksel Veri Analizi*, Kaan Kitabevi Eskişehir, 535s.
- PALACIOS, A., 2005. Organoleptic Defects Caused by Uncontrolled Malolactic Fermentation, Chapter 7. *Malolactic Fermentation in Wine*. Lallemant Inc, Canada, 7:1-7:7.
- PISARNITSKII, A., P., 2001. Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(6), 552-560.
- POLLNITZ, A., P., PARDON, K.H., SEFTON, M.A., 2000. Quantitative Analysis of 4-Ethylphenol and 4-Ethylguaiacol in Red Wine. *Journal of Chromotography A*, 874; 101-109.
- POZO-BAYON, M.A., ALEGRIA E.G., POLO, M.C., TENORIO, C., MARTIN-ALVAREZ, P.J., CALVO DE LA BANDA, M.T., RUIZ-LARREA, F., MORENO-ARRIBAS, M.V., 2005. Wine Volatile and Amino Acid Composition after Malolacti Fermentation: Effect of *O. oeni* and *L. plantarum* Starter Cultures. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53,8729-8735.
- PRISER, C., ETIEVANT, P.X., NICLAUS, S., BRUN, O., 1997. Representative Champagne Wine Extract for Gas Chmotography Olfactometry Analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 3511-3514.
- RAMOS, A., SANTOS, H. 1996. Citrate and Sugar Cofermentation in *L. oenos* ,a C13 Nuclear Magnetic Resonance Study. *Applied and Enviromental Microbiology*, 62, 2577-2585.
- RAMOS, A., LOLKEMA, J.S., KONINGS, W.N. and SANTOS, H., 1995. Enzyme Basis for pH Regulation of Citrate and Pyruvate Metabolism by *L. oenos*. *Applied and Enviromental Microbiology* 61, 1203-1320.

- RAPP, A., MANDERY, H., 1986. Wine aroma. *Experientia*. 42, 873-84.
- RAPP, A., VERSINI, G., 1991. Influence of Nitrogen Compounds in Grapes on Aroma Compounds in Wine. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine, Seattle, USA (American Society of Enology and Viticulture: Davis, CA), 156-164.
- RENCHER, A.C., 2002. *Methods of Multivariate Analysis*, Second Edition. Wiley Online Library.
- REVEL, G., MARTIN, N., PRIPIS-NICOLAU, L., LONVOUD-FUNEL, A., CARRASCOSA, A.V., MUNOZ, R., GONZALES, R., 1999. Contribution on the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 4003-4008.
- RIBEREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., DUBOURDIEU, 2006. *Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. John Wiley & Sons Inc. England, pp: 233-284.
- SAUVAGEOT, F., VIVIER, P., 1997. Effects of Malolactic Fermentation on Sensory Properties of Four Burgundy Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48 (2), 187-192.
- SELLI, S., CABAROĞLU, T., ERTEN, H., NURGEL, C., LEPOUTRE, J.P., GUNATA, Z., 2004. Volatile Composition of Red Wine From cv. Kalecik Karasi Grown in Central Anatolia. *Food Chemistry*, 85, 207-213.
- SCHNEIRDER, R., BAUMES, R., BAYANOVE, C., RAZUNGLES, A., 1998. Volatile Compounds Involved in the Aroma of Sweet Fortified Wines (Vins Doux Naturels) from Grenache Noir. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 3230-3237.
- SCHNEIRDER, R., RAZUNGLES, A., AUGIER, C., BAUMES, R., 2001. Monoterpenic and Norisoprenoidic Glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. As Precursors of Odorants in Muscadet Wines, *Journal of Chromatography A*, 936, 145-157.
- STRAUSS, C.R., WILSON, B., WILLIAMS, P.J., 1986. Flavour of Non-Muscat Varieties. In: *Proceedings of sixth Australian wine ind. Techn. Conf.*, ed. T. Lee, Aust. Inds. Pub., Adelaide, 117-120.

- SWIEGERS, J.H., BARTOWSKY, E.J., HENSCHKE, P.A., PRETORIUS, I.S., 2005. Yeast and Bacterial Modulation of Wine Aroma and Flavor. *Avustralian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173.
- TANGÜLER, H., 2010. Şalgam Suyu Üretiminde Etkili Olan Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi ve Şalgam Suyu Üretim Tekniğinin Geliştirilmesi. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 367s.
- UGLIANO, M, GENOVESE, A., MOIO, L., 2003. Hydrolysis of Wine Precursors during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *O. oeni*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 5073-5078.
- UGLIANO, M. and LUIGI MOIO, 2005. Changes in the Concentration of Yeast-Derived Volatile Compounds in Red Wine during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 10134-10139.
- VORNAM, A. H., SUTHERLAND, J. P., 1984. *Beverages, Technology, Chemistry and Microbiology*, Chapman and Hall, 386-392.
- YILMAZTEKİN, M., CABAROĞLU, T., ERTEN, H., CANBAŞ, A., 2005. Şaraplarda Malolaktik Fermantasyon Sırasında Oluşan Aroma Maddeleri ve Kalite Üzerine Etkisi. Gıda Kongresi, İzmir.
- ZOECKLEIN BW, FUGELSANG KC, GUMP BH, NURY FS. 1995. *Wine analysis and production*. New York: The Chapman & Hall Enology Library.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Gaziantep’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2007 yılında bu bölümden mezun oldu. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.