

**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİTOSANIN ŞARAPTA BOZULMA YAPAN MİKROORGANİZMALAR  
ÜZERİNE ANTİMİKROBİYEL ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Gökşen GÜLGÖR**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**BURSA  
2012**

**Her hakkı saklıdır**



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİTOSANIN ŞARAPTA BOZULMA YAPAN MİKROORGANİZMALAR  
ÜZERİNE ANTİMİKROBİYEL ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**Gökşen GÜLGÖR**

Doç. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU

(Danışman)

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

(Eş Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2012

**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Gökşen GÜLGÖR tarafından hazırlanan “**Kitosanın Şarapta Bozulma Yapan Mikroorganizmalar Üzerine Antimikrobiyel Etkisinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU (Uludağ Üniversitesi)

**İkinci Danışman** : Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK (Ankara Üniversitesi)

**Başkan** : Doç. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU

(Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi

Gıda Mühendisliği Bölümü)

**Üye** : Prof Dr. Filiz ÖZÇELİK

(Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi

Gıda Mühendisliği Bölümü)

**Üye** : Prof. Dr. Fikri BAŞOĞLU

(Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi

Gıda Mühendisliği Bölümü)

**Üye** : Doç. Dr. Ramazan DOĞAN

(Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi

Tarla Bitkileri Bölümü)

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Arzu AKPINAR BAYİZİT

(Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi

Gıda Mühendisliği Bölümü)

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Kadri ARSLAN**

**Enstitü Müdürü**

...../...../.....

**U. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi ,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**23/01/2012**

**Gökşen GÜLGÖR**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### KİTOSANIN ŞARAPTA BOZULMA YAPAN MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE ANTİMİKROBİYEL ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Gökşen GÜLGÖR

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU (Uludağ Üniversitesi)

Eş Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK (Ankara Üniversitesi)

Bu çalışmada, şarap üretiminde kullanılan SO<sub>2</sub> düzeyini azaltmak amacıyla, değişik konsantrasyonlardaki kitosanın, üzüm florasında doğal olarak bulunan şarap fermantasyonundan sorumlu şarap mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) ve şarabı bozan laktik asit bakterileri (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*) ile yabancı mayalar (*Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Brettanomyces bruxellensis*) üzerine inhibisyon etkisi belirlenmiştir.

Mikroorganizmalar için uygun besiyerlerine 0,2-5,0 g/L aralığında farklı konsantrasyonlarda, kitosan ilavesi ile gerçekleştirilen denemelerde, her mikroorganizma için minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Kitosanın, bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar için belirlenen MİK değerleri, *S. cerevisiae* için 3 g/L; *L. plantarum* için 1-2 g/L; *H. uvarum*, *L. hilgardii*, *O. oeni*, *B. bruxellensis* için 0,2 g/L ve *Z. bailii* için 0,4 g/L olarak saptanmıştır.

Kitosanın her mikroorganizma suşu için uygun besiyerlerinde, ayrı ayrı belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) dikkate alınarak, kitosan ilaveli şıralarda şarap fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece, kitosanın antimikrobiyel etkisi şarap ortamında da saptanarak, uygulamaya yönelik veriler elde edilmeye çalışılmıştır.

Şarap fermantasyonu denemelerinde, fermantasyon sonunda toplam ağırlık azalışının birbirine çok yakın olması, değişik konsantrasyonlarda kitosan ilavesinin fermantasyon hızını yavaşlatsa da, tamamlanmasını engellemediği şeklinde yorumlanmıştır. Fermantasyon denemelerinde ilave edilen kitosanın, muhtemelen fermantasyon ile birlikte alkol oranındaki artışın da etkisiyle, yabancı mayaların gelişmelerini önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Kitosan, şarap fermantasyonu, mikroorganizma, antimikrobiyel etkinlik, minimum inhibisyon.

**2012, 79 sayfa**

## ABSTRACT

### THE DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHITOSAN ON WINE SPOILAGE MICROORGANISMS

MSc Thesis

Gökşen GÜLGÖR

Uludag University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc.Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU (Uludag University)

Co-Advisor: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK (Ankara University)

In this study, the inhibitory effect of chitosan at various concentrations on *Saccharomyces cerevisiae* that are present in natural flora of grape and mainly responsible for wine fermentation as well as lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni*) and wild yeasts (*Zygosaccharomyces bailii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Brettanomyces bruxellensis*) that cause wine spoilage was determined in order to decrease the SO<sub>2</sub> level used in wine production.

Minimum inhibition concentration (MIC) of each microorganism was determined in appropriate medium which was containing in between 0,2-5,0 g/L chitosan. MIC of chitosan for the strains used in this study was 3 g/L for *S. cerevisiae*, 1-2 g/L for *L. plantarum*, 0,2 g/L for *H.uvarum*, *L. hilgardii*, *O. oeni*, *B. bruxellensis* and 0,4 g/L for *Z. bailii*.

Wine fermentations of musts including chitosan were carried out considering the MIC of chitosan determined in selective media for each microbial strain. In this way, the antimicrobial effect of chitosan was determined both in synthetic medium and wine medium; so it was tried to obtain data reflecting practical applications.

In wine fermentation experiments, similar total weight losses were observed in groups containing different chitosan doses after fermentation and this result was explained as addition of varying concentration of chitosan decreased the fermentation rate but did not inhibit the completion of fermentation. It was determined that the addition of chitosan and probably, the effect of the ethanol increase in the amount of during fermentation, significantly inhibited the growth of wild yeasts.

**Key Words:** Chitosan, wine fermentation, microorganism, antimicrobial activity, minimum inhibition.

**2012, 79 pages**

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Akademik yaşantımda her zaman yanımda hissettiğim danışman hocam Doç. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU'na (Uludağ Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü), yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim, akademik anlamda bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen eş danışman hocam Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü), her zaman yanımda olan sevgili ailem ve sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Mehmet TOKATLI (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü) ile Arş. Gör. Simel BAĞDER'e (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Ankara Üniversitesi BAP 10B4343007 nolu, “Şarap Üretiminde SO<sub>2</sub> Düzeyini Azaltmak Amacıyla Kullanılabilecek Kitosanın Antimikrobiyel Etkinliğinin Araştırılması” konulu proje çalışmasının bir bölümüdür.

Gökşen GÜLGÖR

23/01/2012

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	3
2.1. Şarapta Bulunan Mikroorganizmalar .....	3
2.2. Şarapta Asitlik Giderme.....	12
2.3. Şarabın Muhafazası .....	13
2.4. Kitosan .....	14
2.4.1. Kitosanın özelliklerine etki eden parametreler .....	21
2.4.2. Kitosanın gıda uygulamalarındaki antimikrobiyel etkinliği .....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	28
3.1. Materyal .....	28
3.1.1. Mikroorganizmalar .....	28
3.1.2 Besiyerleri .....	29
3.1.3. Çözeltiler .....	34
3.2. Yöntem .....	35
3.2.1. Kitosanlı besiyerinin hazırlanışı .....	35
3.2.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi .....	36
3.2.3. Kitosanın minimum inhibisyon aralığının daraltılması .....	38
3.3. Şarap Fermantasyonu .....	39
3.4. Kimyasal Analizler .....	43
3.4.1. Şıra analizleri.....	43
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	45
4.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi .....	45
4.2. Mikroorganizma Gelişmelerinin İzlenmesi .....	56
4.3. Kitosanın Alkol Fermantasyonu Üzerine Etkisi .....	57
4.3.1. Fermantasyon hızı .....	57
4.4. Fermantasyon Süresince Yabani ve Toplam Maya Sayısındaki Değişimler ...	60
4.4.1. Fermantasyon süresince yabani maya populasyonundaki değişimler .....	61
4.4.2. Fermantasyon süresince toplam maya populasyonundaki değişimler .....	63
5. SONUÇ .....	68
KAYNAKLAR .....	71
EKLER .....	75
EK 1 Şırada İndirgen Şeker Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı .....	76
EK 2 Glikoz Standart Eğrisi .....	77
EK 3 Fermantasyon süresince izlenen ağırlık azalmalarına (g) ilişkin veriler .....	78
ÖZGEÇMİŞ .....	79



## SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Celcius
%	Yüzde
<	Küçüktür

### Kısaltmalar

C	Karbon
CO <sub>2</sub>	Karbondiyoksit
DD	Deasetilasyon derecesi
DMDC	Dimetildikarbonat
DNA	Deoksiribonükleik
DNS	3,5-Dinitrosalisilik asit
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
g	Gram
G (+)	Gram pozitif
G (-)	Gram negatif
HCl	Hidroklorik asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen preoksit
H <sub>2</sub> S	Hidrojen sülfid
K <sub>4</sub> Fe (CN) <sub>6</sub> .3H <sub>2</sub> O	Potasyum ferrosiyaniür
kob	Koloni oluşturan birim
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterileri
log	Logaritma
Ma	Moleküler ağırlık
mg	Miligram
MIK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
mL	Mililitre
MLF	Malolaktik fermantasyon
mRNA	Messenger ribonükleik asit
MRS	Man Rogosa Sharpe
N	Azot
NaCl	Sodyum klorür
NH <sub>3</sub>	Amonyak
NaOH	Sodyum hidroksit
O <sub>2</sub>	Oksijen
PDA	Potato dextrose agar
pH	Power of hydrogen
SO <sub>2</sub>	Kükürt dioksit
SO <sub>3</sub>	Sülfid
spp.	Subspecies (alt suş)
USD	United States Dollar (Amerikan doları)
WHO	World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)
YGC	Yeast Glucose Chloramphenicol Agar
YPG	Yeast Extract Peptone Glucose
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Çinkosülfat

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kitosanın kimyasal yapısı .....	15
Şekil 2.2. Kitinin deasetilasyonu .....	16
Şekil 2.3. Selüloz (a), kitosan (b), kitin (c) .....	17
Şekil 3.1. Kitosanlı besiyerinin hazırlanışı .....	35
Şekil 3.2. Kitosanlı besiyerlerine mikroorganizma inokulasyonu .....	37
Şekil 3.3. Fermantasyon gruplarının şematik olarak gösterimi .....	40
Şekil 3.4. Fermantasyon grupları ve tekerrürlerin şematik olarak gösterimi .....	41
Şekil 4.1. İlk denemede kitosan konsantrasyonlarına karşı <i>S. cerevisiae</i> 'nin gelişme düzeyleri .....	45
Şekil 4.2. İlk denemede kitosan konsantrasyonlarına karşı <i>L. plantarum</i> 'un gelişme düzeyleri .....	46
Şekil 4.3. İkinci denemede kitosan konsantrasyonuna karşı <i>S. cerevisiae</i> 'nin gelişme düzeyleri .....	48
Şekil 4.4. İkinci denemede kitosan konsantrasyonuna karşı <i>L. plantarum</i> 'un gelişme düzeyleri .....	49
Şekil 4.5. İkinci denemede kitosan konsantrasyonuna karşı <i>L. hilgardii</i> 'nin gelişme düzeyleri .....	51
Şekil 4.6. İkinci denemede kitosan konsantrasyonuna karşı <i>O. oeni</i> 'nin gelişme düzeyleri .....	52
Şekil 4.7. İkinci denemede kitosan konsantrasyonuna karşı <i>H. uvarum</i> 'un gelişme düzeyleri .....	53
Şekil 4.8. İkinci denemede kitosan konsantrasyonuna karşı <i>Z. bailii</i> 'nin gelişme düzeyleri .....	54
Şekil 4.9. İkinci denemede kitosan konsantrasyonuna karşı <i>B. bruxellensis</i> 'in gelişme düzeyleri .....	55
Şekil 4.10. Fermantasyon süresince 8 ayrı fermantasyon grubunda meydana gelen ağırlık azalışı .....	58
Şekil 4.11. Fermantasyon süresince yabancı mayaların ( <i>H. uvarum</i> , <i>Z. bailii</i> ) inhibisyon düzeyleri .....	62
Şekil 4.12. Fermantasyon süresince toplam maya ( <i>S. cerevisiae</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>Z. bailii</i> ) düzeyleri .....	64
Şekil 4.13. Fermantasyon süresince <i>S. cerevisiae</i> suşunun gelişimi .....	67

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. Şarapta bozulma yapan mayalar .....	8
Çizelge 2.2. Şarapta bozulma yapan Laktik asit bakterileri .....	12
Çizelge 2.3. Kitosanın teknik üretim koşulları .....	16
Çizelge 2.4. Kitosanın deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığının antimikrobiyel aktivitesine etkisi .....	19
Çizelge 2.5. Kitosanın bazı organik asitlerdeki çözünürlüğü .....	22
Çizelge 2.6. Kitin, kitosan ve türevlerinin uygulama alanları .....	27
Çizelge 3.1. Denemelerde kullanılan mikroorganizmalar .....	28
Çizelge 3.2. Fermantasyon denemelerinde kullanılan üzüm şirasının özellikleri .....	39
Çizelge 4.1. İlk denemede kullanılan <i>S. cerevisiae</i> suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu .....	45
Çizelge 4.2. İlk denemede kullanılan <i>L. plantarum</i> suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu .....	46
Çizelge 4.3. İkinci denemelerde kitosanın <i>S. cerevisiae</i> suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu .....	47
Çizelge 4.4. İkinci denemelerde kitosanın <i>L. plantarum</i> suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu .....	48
Çizelge 4.5. İkinci denemelerde kitosanın <i>L. hilgardii</i> suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu .....	51
Çizelge 4.6. İkinci denemelerde kitosanın <i>O. oeni</i> suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu .....	52
Çizelge 4.7. İkinci denemelerde kitosanın <i>H. uvarum</i> suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu .....	53
Çizelge 4.8. İkinci denemelerde kitosanın <i>Z. bailii</i> suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu .....	54
Çizelge 4.9. İkinci denemelerde kitosanın <i>B. bruxellensis</i> suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu .....	55
Çizelge 4.10. Kitosanın, şarapta rastlanılan bazı mikroorganizmalara karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları .....	56
Çizelge 4.11. Fermantasyon gruplarındaki yabancı maya sayımı sonuçlarının log (kob/mL) cinsinden gösterimi .....	62
Çizelge 4.12. Fermantasyon gruplarındaki toplam maya sayımı sonuçlarının log (kob/mL) cinsinden gösterimi .....	64
Çizelge 4.13. Fermantasyon gruplarındaki yabancı ve toplam maya sayılarının karşılaştırılması .....	65
Çizelge 4.14. Şarap fermantasyonu süresince <i>S. cerevisiae</i> suşuna ait gelişme düzeyleri .....	65

## 1. GİRİŞ

Tüketicilerin kimyasal koruyucu içermeyen gıdalara olan taleplerinin artması, yeni doğal antimikrobiyel ajanların bulunması ve kullanılması çabalarını arttırmıştır. Bu bağlamda, bakteri, maya ve mantar gibi farklı grup mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etki gösteren kitosan, son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir (Shahidi 1999). İnsan sağlığı açısından ise, kitosanın doğal olması, toksik olmaması, tümör oluşumunu engelleyebilmesi, serum kolesterolü seviyesini düşürebilmesi gibi yararlı etkilerinin olması oldukça önemlidir (Kurt ve Zorba 2005).

Üzüm suyu ve şarapta istenmeyen maya ve bakteri gelişiminin kontrolü için bir dizi antimikrobiyel bileşik incelenmiştir. Ancak; dimetildikarbonat (DMDC) dışındaki antimikrobiyel bileşikler konusundaki çalışmalar, genel olarak sınırlı düzeyde ticari başarı sağlamış ya da laboratuvar boyutundaki araştırmaların ötesine geçememiştir. Şarap üreticileri ve araştırmacılar, doğal koruyucular olan antimikrobiyel peptitler ve bakteriyolitik bileşiklere (bakteriyosinler, killer toksinler, lizozim vb.) ilgi duymaktadırlar. Yapılan çalışmaların sonuçları, bu biyokoruyucuların potansiyel yararlılıklarını göstermiştir; ancak, şarap üretiminde kullanımları büyük ölçüde maliyet verimliliklerine bağlıdır. Oysa kitosanın hammaddesi olan kitinin yeryüzünde selülozdan sonra en fazla bulunan biyopolimer olması, ayrıca yengeç, karides, istakoz gibi canlıların dış iskelet yapılarında bulunması, su ürünlerinin bir atığı olması sebebiyle ekonomik yönden avantajlı olduğu düşünülebilir (Demir ve Seventekin 2009).

Doğada bulunan kaynaklardan bol miktarda elde edilebilen bir biyopolimer olan kitosan, canlılara karşı toksik özelliğinin olmaması, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyoyumluluğu, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından diğer biyopolimerlere göre üstün özellikler göstermesi nedeniyle başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kâğıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanı bulmuştur (Demir ve Seventekin 2009). Kitin ve kitosan şu anda Hindistan, Polonya, Japonya, ABD, Norveç ve Avustralya'da ticari olarak üretilmektedir (Dutta ve ark. 2004).

Şarap üretiminde kükürt dioksit (SO<sub>2</sub>)'e alternatif olarak kullanılacak, tam olarak onun yerini tutabilecek bilinen bir bileşik yoktur. Çünkü SO<sub>2</sub>'nin koruyucu özelliği yanında antioksidan aktivite gibi çeşitli fonksiyonları da vardır (Anonim 2012b).

Ancak; SO<sub>2</sub>'yi tamamlayıcı özellikte, sağlığa zararsız, şarapta bulunan SO<sub>2</sub> miktarının dűřürölmesine olanak sağlayabilen bileşenlerin birlikte kullanımı ile istenmeyen mikroorganizmaları inhibe eden koruyucu maddelerin, alternatif sistemlerin ve tekniklerin geliştirilmesi ve kullanım olanaklarının endűstriyel boyutlarda tartışılması gerekmektedir.

Yapılan bu çalışma ile şarapta SO<sub>2</sub> kullanım dűzeyini azaltmak amacıyla, şarap üretiminin farklı aşamalarında bozulmaya neden olan mikroorganizmaların kontrolűnde, hem antibakteriyel, hem de antifungal özelliğe sahip doğal bir biyopolimer olan kitosanın etkinliği araştırılmıştır.

Literatűrde řarap üretiminde mikrobiyel stabilizasyon amacıyla kitosan kullanımı ile ilgili çok az çalıřmaya rastlanmaktadır. Gómez-Rivas ve ark. (2004) tarafından, řarapta bozulma yapan mayaların kontrolűnde kitosanın antimikrobiyel etkisi ile ilgili yürütűlen çalıřmadan farklı olarak, bu çalıřmanın sadece sentetik besiyerlerinde deđil, řarap ortamı üzerinde de gerçekleřtirilmesinin, daha gerçekçi sonuçlar alınmasına olanak sađlayacađı dűřűnűlmektedir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Günümüzde şarap endüstrisinin en ciddi problemlerinden biri, büyük ekonomik kayıplara yol açan bozulma yapan mikroorganizmaların gelişmesidir. Bozulma yapan mikroorganizmalar, üzüm yüzeylerinin doğal mikroflorasının bir parçası olan bakteri ve mayalardır. Üzümlerin yüzeyinde bulunan bu mikroorganizmalar öncelikle şıranın ve daha sonra da şarap ile şarabın temas ettiği yüzeylerin (şarap ekipmanları, fiçılar) kontaminasyonuna neden olmaktadır. Doğal mikrobiyel floranın gelişmesi, şıraya eklenen fermantasyon starterlerinin gelişmesini sınırlandırmakta ve aynı zamanda şarapta duyuşsal değişikliklere sebep olmaktadır (Puértolas ve ark. 2009).

### 2.1. Şarapta Bulunan Mikroorganizmalar

Şarap prosesinde mikroorganizmaların bulaşması ve şarabın kalitesini etkilemesi üç ayrı aşamada olabilmektedir (du Toit ve Pretorius 2000).

İlk aşamada hammaddede bulunan mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen bozulmalar söz konusudur. Pompalama, filtrasyon, ezme gibi aşamalarda üzümler şarap yapım ekipmanı tarafından doğrudan kontaminasyona maruz kalabilir. Üzümler şaraphanelere dağıtıldıklarında sağlıklı koşullar altında olmadıklarından üzüm suyu içerisindeki mikroorganizma çeşitliliği de aynı şekilde fazla olmaktadır. Sağlıklı üzümler üzerinde hakim olan mikroorganizma genellikle  $10^2$  kob/mL civarında bulunan *Gluconobacter oxydans* iken, *Botrytis cinerea* ile infekte olmuş üzümlerde hakim olan mikroorganizma *Acetobacter aceti* ve *Acetobacter pasteurianus* olmakta ve çok az miktarda ise *Gluconobacter oxidans* bulunmaktadır. Doğal mikroflora hasat zamanı, üzüm çeşidi ve üzümlerin sağlıklı olma durumu, sıcaklık, yağmur, toprak çeşidi, insektisid, fungusid vb. zirai ilaçların kullanımı gibi dış sebeplerden dolayı değişebilmektedir (du Toit ve Pretorius 2000).

İkinci aşamada ise fermantasyon süresinde oluşabilecek bulaşmalar ön plandadır. *Saccharomyces cerevisiae* alkol fermantasyonunda baskın mikroorganizmadır. Üzüm sırasında doğal olarak bulunan yüksek asitlik, şeker konsantrasyonu (% 20 civarında) ve düşük pH, alkol fermantasyonu sırasında birçok maya ve bakteriye karşı doğal baskılayıcı etki oluşmasını sağlamaktadır. Doğal fermantasyonda alkol fermantasyonunun başlamasında öncü olan *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*,

*Kluyveromyces*, *Pichia*, vb. mayalar fermantasyon boyunca artan etil alkol miktarı ile inhibe olarak ortam hakimiyetini *Saccharomyces cerevisiae* suşlarına bırakmaktadırlar (du Toit ve Pretorius 2000).

Üçüncü aşamada ise fermantasyon sonrasında oluşabilecek bulaşmalar şarap bozulmasında etkili olmaktadır. Şişeleme sonrası ya da fiçılarda saklama aşamalarında oluşabilecek bulaşmalar, şarabın duyuşsal özelliklerinde bozulmalara sebep olmaktadır. Bu aşamada dikkat edilmesi gereken en önemli faktörler; oksijenin ortamdaki uzak tutulması, gerekli antimikrobiyel maddelerin yeterli miktarda ve doğru kullanımı, sanitasyon gibi mikroorganizma ve maya bulaşmasını engelleyecek ya da inhibisyonu sağlayacak olan önlem niteliğindeki uygulamalardır (du Toit ve Pretorius 2000).

Şarapta bozulma yapan başlıca mikroorganizmalar; mayalar (*Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*), asetik asit bakterileri (*Acetobacter*, *Glucanobacter*) ve laktik asit bakterileri (LAB) (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*) olsa da, şimdilerde mayaların asıl kontaminantlar olduğu fikri yaygınlaşmıştır. Fermantasyon boyunca hakim maya olan *S. cerevisiae*, sadece şişelenmiş şaraplarda (örneğin şişelenmiş yarı tatlı şaraplarda) yanlış zamanda bulunması durumunda ikinci fermantasyona neden olduğu için, bozulma yapan mikroorganizma olarak kabul edilmektedir (Enrique ve ark. 2007, du Toit ve Pretorius 2000).

*Schizosaccharomyces pombe* şişelenmiş şaraplarda geliştiğinde şarabı bozarak, bulanıklık ve şişe tabanında çökelti oluşturur (Boulton ve ark. 1996). Üzüm şırası ya da şarabın depolanması sırasında ikincil fermantasyona sebep olan en önemli mayalardan biri de *Zygosaccharomyces bailii*' dir (du Toit ve Pretorius 2000). Thomas (1993) tarafından bildirildiğine göre; şişelenmiş şaraplarda bulunduğu şarabı bozan ve şarap üreticileri tarafından 'şarap kâbusu' olarak bilinen bir diğer mikroorganizma da *Saccharomyces ludwigii*' dir. Bu maya türünün etil alkole dayanıklı ve SO<sub>2</sub>, sorbat gibi katkılarına da dirençli olduğu bildirilmektedir (du Toit ve Pretorius 2000).

*Pichia anamola*, *Kloeckera apiculata* ve *Hanseniaspora uvarum* asetik asit üretimi sonucunda ester oluşumu ile alakalı olarak şarapta istenmeyen duyuşsal özelliklere, kötü

koku ve tada sebep olmaktadır. Bu üç tür üzüm sırasında ya da alkol fermantasyonun erken safhalarında meydana gelen bozulmalardan sorumludur. Ester kokusu, şaraplarda off-flavor oluşumunda önemli rol oynayan etil asetat ve metilbütül asetat varlığı ile ilişkilendirilmektedir. 200 mg/L'den yüksek etil asetat ve 0,6 mg/L asetat konsantrasyonuna sahip olan şarap, bozulmuş kabul edilmektedir (du Toit ve Pretorius 2000).

Şarapta asetik asit ve süksinik asit miktarının artması ve L-Malik asit miktarının düşmesi, *Z. bailii* gelişimini destekleyebilmektedir (du Toit ve Pretorius 2000).

Şarapta bir diğer bozulma etkeni de, hidrojen sülfid ve uçucu sülfür bileşiklerinin oluşmasıdır. Hidrojen sülfid ( $H_2S$ ) şarapta bulunan mayalar tarafından sülfat indirgenme metabolik yolu ile 50-80 mg/L sınır değerinin üzerinde üretildiğinde çürümüş yumurta, soğan, lastiksi tat, lahana ya da sarımsak tadı gibi istenmeyen koku ve tatlara sebep olmaktadır. Mayaların  $H_2S$  üretim kabiliyeti çevre şartlarına, maya türüne, ortamdaki serbest amino nitrojen gruplarına, fermantasyon sıcaklığına, şarabın asitliğine ve pH'sına ve elementel sülfür içeren fungusit kullanımına bağlı olarak değişmektedir (du Toit ve Pretorius 2000).

Hidrojen sülfid diğer şarap bileşenleri ile reaksiyona girerek soğanımsı, lahanamsı, sarımsağımsı kokulara sebep olan merkaptan, tiyol ve disülfidlerin üretiminde rol oynar. *S. cerevisiae* suşlarının alkol fermantasyonu yapımı için ideal maya olarak seçilmelerinin sebebi de belirli sınırları aşmayacak miktarda hidrojen sülfid ve uçucu sülfür bileşiklerinin üretilmesi sonucu şarap hatalarının meydana gelmesini engellemesinden kaynaklanmaktadır. *S. cerevisiae* suşlarının tersine yabani mayalar ise kabul edilemeyen şarap hatalarının oluşmasında büyük rol oynamaktadırlar ve bu sebeple alkol fermantasyonunu yabani mayaların gerçekleştirmesi istenmemektedir (du Toit ve Pretorius 2000).

Uçar asit oluşumu da şarapta arzulanmayan mikroorganizmaların ortama hakim olması ile ortaya çıkmaktadır. Şarapta bulunabilecek uçar asitlerin % 90'ını asetik asit oluşturmaktadır (Radler 1993). Şarapta yüksek seviyede uçar asit oluşumuna laktik asit ve asetik asit bakterilerinin varlığı neden olurken, doğal şarap mayaları ya da yabani mayalar da uçar asit oluşumunda rol oynamaktadır. Asetik asit, alkol fermantasyonunun



erken safhalarında mayalar tarafından üretilmektedir. *Saccharomyces* cinsi mayaların asetat üretimi ve miktarı, ortamın pH'ı, fermantasyon sıcaklığı, ortamda bulunan diğer mikroorganizmaların çeşidi ve miktarı, şıranın bileşimi (şeker ve nitrojen seviyeleri), asetil-CoA sentataz enzimi gibi faktörlere göre çeşitlilik kazanmaktadır. Şarapta yüksek miktarda *Brettanomyces* ve spor form oluşturan *Dekkara* cinsi mayalar ile *P. anamola*, *K. apiculata*, *C. krusei* gibi mayaların bulunması durumunda asetifikasyon oluşumu gözlenmektedir (du Toit ve Pretorius 2000).

*Brettanomyces* ile kontamine olmuş şarapların duyu özelliklerinin bozulması ahır kokusu, tütün kokusu, deri kokusu, at teri kokusu, zift yapısı ve kokusu gibi kelimelerle ifade edilmektedirler (du Toit ve Pretorius 2000). Bu kokular deri, hayvan ve at teri olarak tanımlanmakta ve üzüm hidroksisinnamik asitlerinden etil fenollerin (4-etil fenol, 4-etil gayakol, 4-vinil fenol) oluşumuna dayandırılmaktadır (Renouf ve ark. 2008). Off-flavor oluşumunun rapor edilen en yaygın sebebi olan ve yetersiz yıkamaya bağlı olarak fiçilerde bulunan *Brettanomyces* cinsi mayalar (Renouf ve ark. 2008), *Dekkara*'nın spor oluşturmamayan ve eşeysiz çoğalan formlarıdır. Kurtzman ve Fell (1998) tarafından bildirildiğine göre; üzüm şırası ve şarapla ilgili olan *Brettanomyces* türleri *Brettanomyces intermedius* ve *Dekkara intermedia* türleridir. Her iki tür de, her ne kadar yavaş da olsa, alkol fermantasyonunu gerçekleştirebilmektedir (du Toit ve Pretorius 2000). *B. bruxellensis*, uçucu fenoller oluşturarak şarapta meyvemsi aromaların kaybına yol açmaktadır. Çoğunlukla, diğer mikrobiyel türler azaldığında, yani fermantasyonun sonlarında gelişme göstermektedir. Oldukça dayanıklı bir tür olup, besin yetersizliğinde ve yüksek etilalkol derecelerinde dayanıklılık göstermektedir (Renouf ve ark. 2008). *Brettanomyces* cinsi mayaların endüstriyel alkol fermantasyonu ve alkollü içeceklerdeki bozulmalarla alakalı olduğu bilindiği gibi De Miniac (1989) ile Délia-Dupuy ve ark. (1995) tarafından bildirildiğine göre; *Brettanomyces* cinsi mayaların (ürettikleri asetik asit sebebiyle) ortamda hakim olarak, *Saccharomyces* cinsi mayalar üzerine inhibitör etki yaptığı saptanmıştır (Go'mez-Rivas ve ark. 2004).

*Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia* cinsi mayaların suşları ise, depolanmış şaraplarda film tabakası oluşturmaları sebebiyle, 'film oluşturan mayalar' olarak isimlendirilmektedir (Sponholz 1993, de Winde 2003). Bu mayalar sadece şarabın görünüşü ile ilgili problem yaratmakla kalmayıp, aynı zamanda asetaldehit üretimi sebebiyle, şarapta

okside tat olarak adlandırılan, istenmeyen duyuşsal özelliklerin oluşmasına ve şarap kalitesinin bozulmasına neden olmaktadır. Bu mayalar, şarap ortamında bol miktarda bulunmaları ve fermantasyon esnasında oksijene maruz kalma durumlarında, kısmen doldurulmuş fiçılarda oksijenin çok miktarda bulunması gibi durumlarda kolayca gelişip oğalabilmektedirler. *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia* cinsi mayaların etil alkolden oluşturdukları başlıca ürünler asetik asit, asetaldehit ve asetat esterleridir (du Toit ve Pretorius 2000).

şarap mayaları olarak geçen *Saccharomyces* cinsi mayalar üzüm şırasının fermantasyonunu off-flavor oluşturmadan tamamlayabilen mayalardır ve bu mayalar yüksek konsantrasyonda şeker ve alkole dayanıklıdır. Yabani mayalar olarak adlandırılan *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayalar ise alkol fermantasyonunu gerçekleştirebilmelerine rağmen, ester oluşturarak off-flavor oluşumunda rol oynarlar (du Toit ve Pretorius 2000). Ayrıca, bazı *S. cerevisiae* suşlarının killer toksin üretebildiği dikkate alınarak, bu toksinlerin yabani mayalar üzerine inhibisyon etkisinin olduğu, Rodrguez-Cousiņo ve ark. (2011)' nin yaptığı bir çalışmada rapor edilmiştir; şaraptan izole edilen *S. cerevisiae* suşunun ürettiği tespit edilen 'Klus' adlı killer toksininin şarapta bulunan diğer yabani maya suşlarını inhibe ettiğini saptamıştır.

*Saccharomyces* cinsi dışındaki mayalardan *Zygosaccharomyces* cinsi mayalar yüksek şeker konsantrasyonunda gelişebilen ozmofil mayalardır. *Z. bailii* ise üzüm şırasında kullanılan kimyasal koruyuculara (SO<sub>2</sub>, sorbik asit, benzoik asit), şarabı bozan mayalar için zor koşullar olan % 15'ten fazla etil alkol konsantrasyonu ve düşük pH'a (< 2) karşı dirençli bir mayadır (du Toit ve Pretorius 2000). şarapta bozulma yapan mayalar izelge 2.1'de gösterilmektedir.

**Çizelge 2.1.** Şarapta bozulma yapan mayalar (du Toit ve Pretorius 2000)

<b>Maya türü</b>	<b>Bozulma</b>
<i>Brettanomyces intermedius</i> Anamorf: <i>Dekkara intermedia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uçucu fenollerin üretimi</li> <li>• Ahır kokusu</li> <li>• Yüksek miktarda asetik asit üretiminden dolayı oluşan kötü koku ve tat</li> </ul>
<i>Candida</i> spp. <i>C. vini</i> <i>C. stellata</i> <i>C. pulcherrima</i> <i>C. krusei</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Şarabın oksijene maruz kalması sonucunda film tabakası oluşumu</li> <li>• Etanolün okside olarak uçucu asit, ester ve yüksek konsantrasyonda asetaldehite dönüşümü</li> </ul>
<i>Hanseniaspora uvarum</i> Anamorf: <i>Kloeckera apiculata</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek derecede asetik asit ve esterlerinin oluşumu</li> <li>• Killer toksinlerinin üretimi</li> </ul>
<i>Pichia anamola</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek seviyede asetik asit oluşumu</li> <li>• Ester kokusu</li> <li>• Yüksek miktarda etil asetat</li> <li>• İsoamil asetat</li> <li>• Metilbütül asetat</li> <li>• Film tabakası oluşumu</li> </ul>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Film tabakası şeklinde gelişme</li> <li>• Yüksek seviyede asetaldehit ve etilasetat üretimi</li> </ul>
<i>Pichia</i> spp. <i>P. farinosa</i> <i>P. membranaefaciens</i> <i>P. vini</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tebeşirimsi film tabakası oluşumu</li> <li>• Yüksek seviyede asetaldehit üretimi</li> </ul>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Şeker kalıntılarından meydana getirilen ikincil fermantasyon</li> </ul>
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Külçe şeklinde keçemsi yapı oluşumu</li> <li>• Yüksek konsantrasyonda asetaldehit üretimi</li> </ul>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Şişelenmiş şaraplarda yeniden fermantasyon ve asidifikasyon</li> </ul>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Şarapta ikincil fermantasyon ve yüksek miktarda CO<sub>2</sub> oluşumu</li> <li>• Bulanıklık ve çökelti</li> <li>• Yüksek oranda asetik asit ve ester oluşumu</li> </ul>

Laktik asit bakterileri (LAB), malolaktik fermantasyon (MLF) ile bağlantılı olarak, ikincil fermantasyonun oluşumunda önemli rol oynamakla beraber, şarap yapım prosesinde yanlış zamanda fazla miktarda bulunmaları durumunda şarabın kalitesini olumsuz yönde etkileyerek, bozucu mikroorganizmalar arasında sayılmaktadırlar. Üzüm

şırası ve şarap ile alakalı olan laktik asit bakterileri *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* cinslerine ait suşlardır. Bu dört laktik asit bakterisine ait olan suşların birçoğu şaraptan izole edilebilmiş ve genelde bozulmaya sebebiyet verdikleri saptanmıştır (du Toit ve Pretorius 2000). *Lactobacillus* cinsi bakterilerden özellikle *L. hilgardii*, “piqûre lactique” denilen değişimden sorumlu LAB’dır. Bu mikroorganizmalar, yavaş alkol fermantasyonlarında şarabın kalıntı şekerini kullanarak uçucu asitlikte (D-laktik asit ve asetik asit) artış meydana getirmekte ve şarabın duyuşal özelliklerinde değişime neden olmaktadır (Renouf ve ark. 2008). D-Laktik asit üretimi şarapta bozulmayla ilişkilendirilirken, L-Laktik asit üretimi malolaktik fermantasyon esnasında olmaktadır (du Toit ve Pretorius 2000).

LAB’nin alkol fermantasyonu esnasında ya da alkol fermantasyonu öncesi ve sonrasında bozulmalara sebep olması çevresel faktörlere bağlıdır. LAB’nin doğal gereksinimlerinin karşılanması bakımından sağlıklı üzümde düşük miktarda ( $<10^3$  kob/g) bulunması normal bir durum olarak görülmektedir. LAB düşük pH’a, yüksek etil alkole, düşük sıcaklığa ve az miktarda kullanılabilir besin maddesinin bulunduğu ortamlara adapte olabilmektedir. Ayrıca  $SO_2$ ’ye de dayanıklılık göstermektedir. Alkol fermantasyonu esnasında mayaların ve bazı LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin ortamda bulunması sebebiyle, LAB çoğalma şansı bulamayabilirler; ancak, lag fazından sonra ortamda yeterli miktarda kalabilirlerse, çoğalarak şarap ortamındaki sayıları  $10^6$ - $10^8$  kob/mL’ye kadar ulaşabilmektedir (du Toit ve Pretorius 2000). LAB alkol fermantasyonu esnasında ortamda yeterli sayıda bulunursa deasetifikasyon gerçekleşir ve pH yükselir. pH değeri 3,5’in üzerine çıkarsa, LAB ortamdaki kalıntı şeker ve besin maddelerini kullanarak, malolaktik fermantasyonu yanlış zamanda gerçekleştirirler. Bu sebeple LAB’nin kontrollü fermantasyonu önem kazanmaktadır (du Toit ve Pretorius 2000).

Heterofermentatif Laktobasiller tarafından üretilen mannitol, tek başına bozucu etkiye sahip değilken, asetik asit, D-Laktik asit, propanol, bütanol ve diasetil üretiminde rol oynadığı için şarapta bulunması istenmemektedir. Genelde bu problem, tatlı şaraplarda karşılaşılan bir durum olup, sonucunda şarap viskoz yapı kazanarak, tadında bozulmalar olmaktadır (du Toit ve Pretorius 2000).

*Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsi mikroorganizmalar D-glukandan ekzopolisakkarit üreterek rop oluşturan mikroorganizmalardır. Viskoz ve yapışkan bir görünüş kazanan şaraplar 'rop oluşmuş şaraplar' olarak adlandırılır. Rop oluşmuş şaraplardan *Pediococcus damnosus* ve *Pediococcus pentosaceus* izole edilmiştir. Rop oluşumu sadece ortamda etil alkol olduğu durumlarda alkol fermantasyonu sırasında, ya da şişelemeden sonra meydana gelebilen bir şarap problemidir. pH 3,5'in altında ise rop oluşumu büyük oranda kontrol altına alınabilmektedir (du Toit ve Pretorius 2000).

Şarapta bulunan organik asitler (öncelikli olarak sitrik, tartarik ve sorbik asit) LAB tarafından metabolize edilebilmektedir ve bunun sonucunda da şarapta bozulmalar meydana gelebilmektedir. En önemli metabolitlerden olan diasetil, sitrik asit yıkımı ile meydana gelmekte ve şarapta tereyağı tadına sebep olmaktadır. Mayalar da sitrattan diasetil üretebilmektedir, ancak üretilen diasetil şarapta bozulma yapacak kadar yüksek seviyede olmamaktadır. Alkol fermantasyonu sonrası ve/ya da malolaktik fermantasyon süresince LAB tarafından üretilen diasetil miktarı sınır değer olarak bilinen 4 mg/L'yi geçtiği zaman bozulma oluşmaktadır. Şarapta malolaktik fermantasyonu yapması tercih edilen *O. oeni* 'nin ürettiği diasetil miktarı, Pediokok ve Laktobasillerin malolaktik fermantasyon sonrasında şarapta bozulma yapabilecek miktarda bulunmaları durumunda ürettikleri diasetil miktarından daha düşüktür. Sorbik asit de LAB tarafından metabolize edildiğinde şarap hatalarına sebep olmaktadır. Sorbik asit maya gelişimini engelleyebildiği için gıdalarda kimyasal koruyucu olarak kullanılabilir, ancak LAB'ne etki etmemektedir. Bazı LAB hidrojenasyon ile sorbik asiti sorbinole indirgeyebilmektedir. Mikrobiyel parçalanmaya karşı genelde dirençli olan tartarik asit ise şarap koşulları altında bazı Laktobasiller tarafından parçalanıp, metabolize edilebilmektedir. Tartarik asitin parçalandığından şüphelenilen şaraplarda, diğer bozulmaların da önemli derecede gerçekleşmiş olacağı unutulmamalıdır. Radler ve Yannissis (1972) tarafından bildirildiğine göre; *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus brevis* tartarik asiti parçalayabilmektedir. Son ürünü asetik asit olan tartarik asit degradasyonu, uçar asitlerin üretilmesi sebebiyle şarapta istenmeyen bir durumdur (du Toit ve Pretorius 2000).

Gliserolün bakteriyel degradasyonu sırasında ortaya çıkan akrolein şarapta problem oluşturmayan bir metabolik üründür; fakat, antosiyaninlerin fenolik gruplarıyla

reaksiyona girerse şarapta arzu edilmeyen acı tat ortaya çıkar. Bu durum, fenolik maddelere daha fazla sahip olması sebebiyle kırmızı şaraplarda, beyaz şaraplardakine oranla daha fazla karşılaşılan bir problemdir. Akrolein oluşumu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* ve *Pediococcus* cinsi LAB ile bağlantılıdır (du Toit ve Pretorius 2000).

Bazı LAB tarafından oluşturulan biyojen amin ve etil karbamat şarapta görünüş ya da duyuşsal özelliklerde herhangi bir probleme sebep olmaz, fakat hassas insanlarda baş ağrısı, mide bulantısı, çarpıntı, anafilaktik şok, hipertansiyon gibi toksik etkilere sebep olmasının yanında şarabın ticari faaliyetinde de problemlere yol açmasından dolayı şarapta istenmemektedir (du Toit ve Pretorius 2000, Garcia-Ruiz ve ark. 2008). Biyojen aminlerden histamin baş ağrısı, hipertansiyon ve sindirim bozukluklarına sebep olduğu için üzerinde en çok çalışılan biyojen amindir. Tiramin ve feniletilamin de yüksek miktarlarda tüketildiğinde migren ve hipertansiyona sebep olabilmektedir (Soufleros ve ark. 1998). Bu sebeplerle LAB'inden biyojen amin üretebilenler, şarapta starter kültür seçimi açısından önem teşkil etmektedir (du Toit ve Pretorius 2000).

Özellikle *O.oeni* ve bazı heterofermentatif LAB (ör: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*) tarafından katabolize edilen arjinin varlığında insan ve hayvan için kanserojen olarak bilinen etil karbamat prokürsörleri (üretaz) üretilmekte ve bu sebeple şarapta bulunmaması gerekmektedir. Homofermentatif LAB (ör: *Lactobacillus plantarum*) ve Pediokoklar arjinini kullanamazlar (du Toit ve Pretorius 2000). Çizelge 2.2'de şarapta bozulma yapan LAB gösterilmektedir.

**Çizelge 2.2.** Şarapta bozulma yapan Laktik asit bakterileri (du Toit ve Pretorius 2000)

<b>LAB</b>	<b>Bozulma</b>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Asetik ve laktik asit üretimi sebebiyle şarapta oluşan asidifikasyon</li><li>• Fruktozun indirilmesi sebebiyle mannitol oluşumu</li><li>• İstenmeyen duyuşsal özellikler</li></ul>
<i>Lactobacillus cellobiosus</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Gliserol metabolizmasından dolayı oluşan acı tat</li></ul>
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Çok miktarda asetik asit üretimi</li></ul>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tartarat degradasyonu</li></ul>
<i>Lactobacillus trichodes</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Flokulasyon oluşumu</li></ul>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Rop oluşumu (yapışkanlık, sünme)</li><li>• Acı tat oluşumu</li></ul>
<i>Oenococcus oeni</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Etil karbamat prekürsörlerinin üretimi için arjinin degradasyonu</li><li>• Biyojenik aminlerden histamin üretimi</li><li>• Diasetil seviyesinin artmasından dolayı oluşan tereyağı tadı ve kokusu</li></ul>
<i>Pediococcus damnosus</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Histamin üretimi</li></ul>
<i>Pediococcus parvulus</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Acı tat oluşumuna sebebiyet veren akrolein üretimi</li></ul>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Polisakkarit üretimi sebebiyle viskozitenin artması</li></ul>

## 2.2. Şarapta Asitlik Giderme

Asit miktarı şarabın duyuşsal özelliklerine doğrudan etki etmekte ve aynı zamanda şarabın pH'ına, rengine, stabilitesine ve genel kalitesine dolaylı yollardan etki etmektedir. Titrasyon asitliği üzümün cinsine, iklim koşullarına, bağ koşullarına ve üzümün olgunluk derecesine bağlı olarak etkilenmektedir. Üzüm şırası ve şarapta çeşitli organik ve inorganik asitler bulunmaktadır. Şarapta bulunabilecek başlıca organik asitler; tartarik, malik, sitrik, asetik, laktik ve süksinik asitlerdir (Radler 1993). Malik ve tartarik asit miktarı üzüm şırasındaki titrasyon asitliğinin yaklaşık % 90'ını oluşturmaktadır. Güney Afrika, Avustralya ve Güney Amerika gibi bölgelerin tersine Avrupa, Kanada, Amerika gibi daha serin iklime sahip bölgelerde yetişen üzümde titrasyon asitliği yüksek ve pH değeri düşüktür. Serin iklime sahip bölgelerde, yüksek asitlik ve düşük pH sebebiyle ürünün stabilitesini koruması ve dengede kalabilmesi açısından asit giderme işlemi önem kazanmaktadır. Şarapta asit giderme işlemi malik

asitin laktik asit ve karbondioksite biyolojik çevrimi ile elde edilebilmektedir. Bu proses malolaktik fermantasyon olarak adlandırılmakta ve başta *O. oeni* olmak üzere laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilmektedir. Malik asitin mayalar tarafından degradasyonu maya türüne göre değişkenlik göstermektedir. Şarap mayası olan *S. cerevisiae* malik asiti az kullanılabilen bir maya türü iken *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia* cinsleri ve *S. pombe*, *Schizosaccharomyces malidevorans* ve *Z. bailii* suşları malatı parçalayıp, kullanabilme yeteneğine sahiptirler (du Toit ve Pretorius 2000).

### 2.3. Şarabın Muhafazası

Şarapta bozulma yapan mikroorganizmaların bulunması durumunda şarap prosesini düzgün bir şekilde yürütebilmek için mikroorganizmaların kontrolünün sağlanması gerekmektedir. Bu sebeple de belirli muhafaza yöntemleri bulunmaktadır. Gıdalarda muhafaza yöntemlerinin uzun bir tarihçesi olmakla birlikte genel anlamda muhafaza yöntemleri soğutma, dondurma, asidifikasyon, fermantasyon, kimyasal gıda katkıları ekleme, pastörizasyon ve sterilizasyon olarak sınıflandırılabilir. Şarap yapımında genelde kimyasal muhafaza metodlarından yararlanılmaktadır. Kimyasal muhafaza metodlarının şarapta uygulanma amacı kaliteyi ve mikrobiyolojik güvenliğini sağlamaktır. Öncelikli amaç mikroorganizma gelişimini engellemektir; eğer bu aşamada başarılı olunamamış ise arzulanan mikroorganizmaların gelişmesinin yavaşlatılması, durdurulması veya inaktivasyonun sağlanması ile amaca ulaşılmalıdır (du Toit ve Pretorius 2000).

Kimyasal muhafaza yöntemi olarak, SO<sub>2</sub>, sorbik asit, fumarik asit, benzoik asit, dimetildikarbonat (DMDC), biyoprezervatifler, bakteriyosinler, bakteriyolitik enzimler, zimosin (killer toksinler) ve fenolik bileşiklerin kullanımı gıdalarda ön planda bulunmaktadır (du Toit ve Pretorius 2000, Garcia-Ruiz 2008). Şarap üretim aşamalarında ise, istenmeyen mikrobiyel gelişimin engellenmesi için SO<sub>2</sub> ilave edilmektedir. *Saccharomyces* dışındaki mayaların gelişimini engellemek amacıyla, alkol fermantasyonundan önce presteki üzümlere eklenmekte; böylece, *S. cerevisiae* kolaylıkla çoğalıp fermantasyona hakim olabilmektedir. Alkol fermantasyonu sırasında, LAB'nin inhibisyonunu sağlamaktadır. Eğer şarapta malolaktik fermantasyon isteniyorsa, SO<sub>2</sub> malolaktik fermantasyondan sonra ilave edilmelidir (du Toit ve



Pretorius 2000). Şarabın olgunlaştırılması sırasında da, *Brettanomyces* ve diğer bozulma yapan mikroorganizmaların inhibisyonunu sağlamak amacıyla katılmaktadır (Fugelsang ve Edwards 2007). Ancak; SO<sub>2</sub>'nin etkinliğinin yüksek oranda pH'ya bağlı olması ve SO<sub>2</sub>'nin sadece moleküler formunun antimikrobiyel aktivite göstermesi, yüksek SO<sub>2</sub> konsantrasyonlarının şarapta istenmeyen kokulara ve tüketicilerde alerjik reaksiyonlara neden olabilmesi gibi sebeplerden ötürü, son yıllarda şıra ve şaraplarda SO<sub>2</sub>'nin izin verilen maksimum limitlerinin azaltılması yönündeki eğilim artmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), özel hassasiyete sahip tüketicilerin sağlığını olumsuz etkileyebilmesi nedeniyle, SO<sub>2</sub> kullanımının azaltılmasını önermektedir. Henüz tüm enolojik özellikleri ile SO<sub>2</sub>'nin yerine kullanılabilir başka bir bileşik bilinmemekle birlikte, şaraplardaki SO<sub>2</sub> miktarını düşürmeye olanak sağlayan alternatif bileşiklerin araştırılması konusunda yoğun bir ilgi bulunmaktadır (Stockley ve ark. 2007). SO<sub>2</sub>'nin antiseptik özelliğinin yanı sıra, antioksidant olması ('2 SO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> → 2 SO<sub>3</sub>' reaksiyonu ile serbest oksijenin bağlanması), ethanal ve diğer küçük bileşikleri bağlayarak, şarap aromasını koruması ve yavan karakterin kaybolması gibi olumlu etkileri nedeniyle şarap üretiminde kükürt dioksidin yerine kullanılabilir uygun bir bileşik henüz bulunamamıştır (Anonim 2012a). SO<sub>2</sub>'nin yerine geçecek bileşiğin şu özelliklere sahip olması istenmektedir;

- Maya ve bakterileri etkin bir şekilde öldürebilmeli ya da inhibe edebilmeli,
- Şaraptaki oksidatif reaksiyonları kontrol etmeli,
- Enzimatik esmerleşmeyi önlemeli,
- SO<sub>2</sub>'yi uygunsuz yapan tat etkilerine sahip olmamalı,
- Ekonomik olarak kullanıma uygun olmalı.

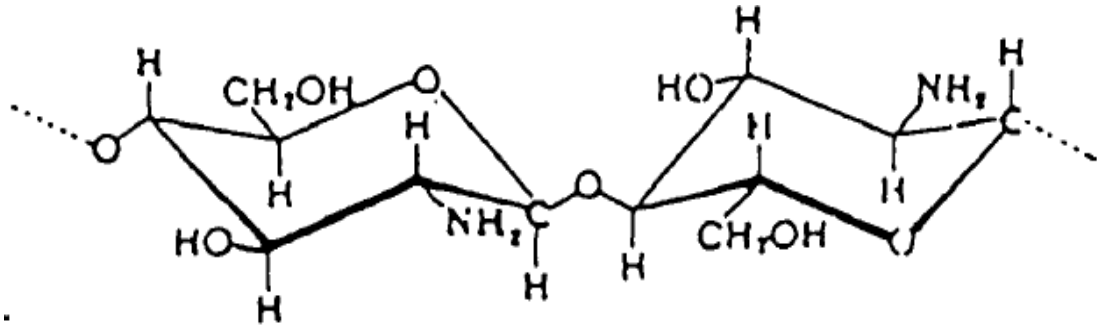
Tüm bunları başarabilecek tek bir bileşiğin bulunması, neredeyse olanaksızdır. Ancak, birbirlerinin özelliklerini tamamlayıcı 2 veya 3 bileşiğin birlikte kullanılması önerilebilmektedir (Stockley ve ark. 2007).

Kimyasal koruyuculara alternatif olarak doğal bir polimer olan kitosanın etkinliği ve kullanımını ise son zamanlarda araştırmacıların dikkatini çekmektedir.

#### **2.4. Kitosan**

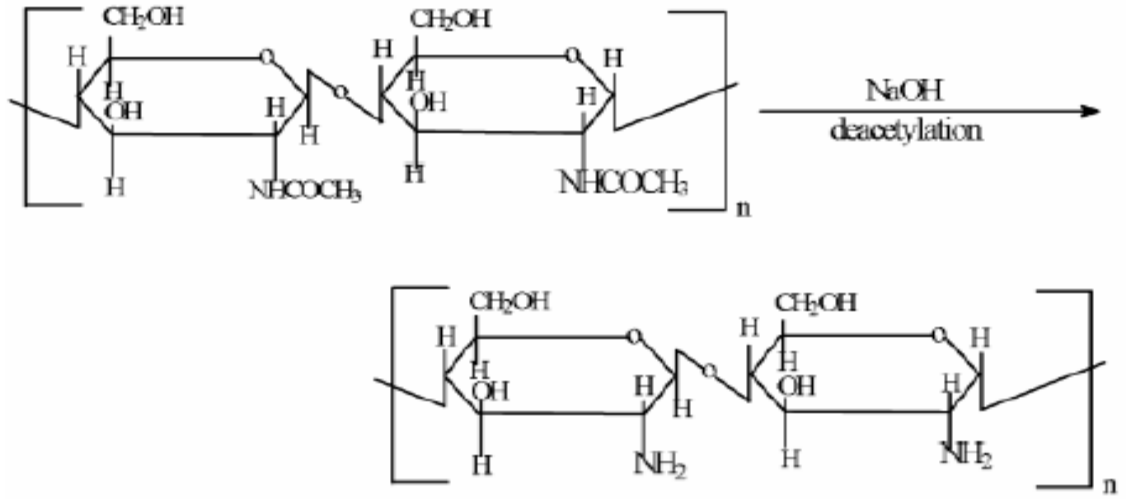
Dünya çapında büyük miktarda yengeç ve karides kabuğu, deniz ürünleri üreticisi şirketler tarafından değerlendirilmeden çevreye atıldığı için, özellikle, son yıllarda bu

atıkların yeniden değerlendirilmeleri gündeme gelmiştir. Kabuklu su ürünleri çürümeye bırakılmak yerine, kimyasal veya biyolojik yöntemlerle yeniden değerlendirilip, yeni ürünler elde edilebilmektedir. Bu şekilde elde edilen ürünlerin başında kitin ve kitinin türevi olan kitosan gelmektedir (Demir ve Seventekin 2009). Kitin ismi Yunancada zarf anlamına gelen 'chiton' kelimesinde türetilmiştir (Kurt ve Zorba 2005). Kitin, hidrojen bağları ile stabilite kazanmış üç boyutlu  $\alpha$ -heliks konfigürasyona sahip, selülozdan sonra en önemli doğal polisakkarittir (Kaş 1997, Lim ve Hudson 2003). Kitinin birçok türevi bulunmakla beraber, bunlar arasında en önemlisi kitosandır. Kitosan ilk kez 1811 yılında Henri Bracannot tarafından mantarların yapısında tespit edilmiştir. Mantarlarda bulunan kitini sülfürik asitte çözmeye çalışan Bracannot başarılı olamamıştır. 1894'te Hoppe-Seyler; kitini potasyum hidroksit içerisinde 180 °C'de işleme sokmuş (deasetilasyon) ve asetil içeriği azaltılmış bir ürün olan "kitosan"ı elde etmiştir (Demir ve Seventekin 2009). Kitosanın kimyasal yapısı, poli-[ $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranoz] olup, Şekil 2.1'de kimyasal yapısı gösterilmektedir.



**Şekil 2.1.** Kitosanın kimyasal yapısı (Kaş 1997)

Şaraplardaki SO<sub>2</sub> düzeyini azaltmak amacıyla da kullanılabilir olan kitosan, doğal bir polimer olması sebebiyle, özellikle son 50 yıldır araştırmacılar için ilginç bir materyal haline gelmiştir. Kitosan gibi doğal bir biyopolimer olan ve esas olarak poli-[ $\beta$ -(1,4)-2-asetamid-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranoz] yapısında olan kitinin deasetilasyonu sonucu kitosan üretilmektedir. Kitinin azot oranı yaklaşık % 7 olup, tam asetile olmuş kitinde N/C oranı ise 0,146'dır. Kitosanın azot içeriği % 7'den daha fazla olup, asetilasyon derecesi 0,40'tan daha azdır (Demir ve Seventekin 2009). Kitinin deasetilasyonu Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.2.** Kitinin deasetilasyonu (Demir ve Seventekin 2009)

Genel olarak bakıldığında yengeç, istakoz ve karides gibi deniz hayvanlarının kabuk kısmı % 30-40 protein, % 30-50 kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat ile % 20-30 kitinden oluşmaktadır. Kabuklu deniz hayvanlarının yapısındaki protein bazı insanlarda alerjiye sebep olabilmektedir. Dolayısıyla, proteinin tamamen uzaklaştırılması, özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanımı açısından son derece önemlidir (Demir ve Seventekin 2009). Çizelge 2.3'te kitosanın teknik üretim koşulları gösterilmektedir.

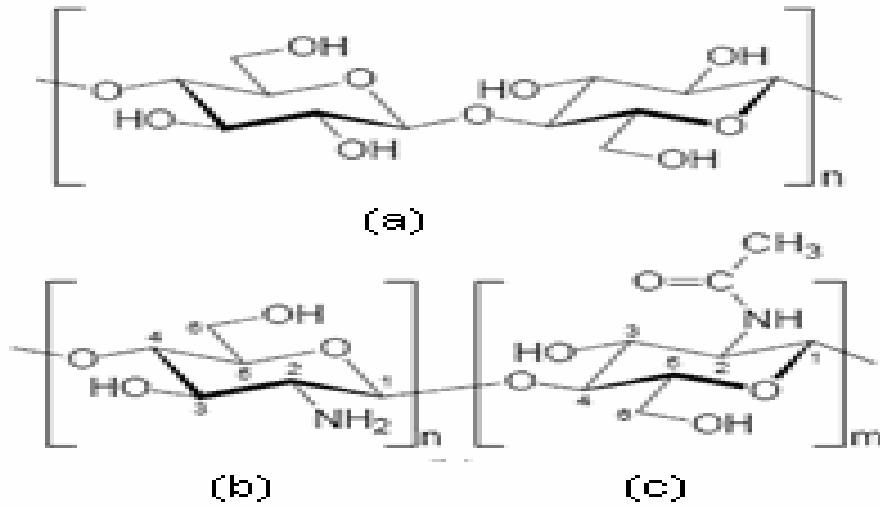
**Çizelge 2.3.** Kitosanın teknik üretim koşulları (Demir ve Seventekin 2009)

İşlem basamağı	Kimyasal madde	Sıcaklık (°C)	Süre
Deproteinizasyon	% 0.5 – 15 NaOH	25 – 100	0.5 – 72 saat
Demineralizasyon	% 2 – 8 HCl	15 – 30	0.5 – 45 saat
Dekolorizasyon	Çeşitli organik çözümler (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	20 – 30	Yıkama, 60 dk.
Deasetilasyon	% 39 – 60 NaOH	60 – 150	0.5 – 144 saat

Kitin ve kitosanın moleküler yapıları benzer görünmesine rağmen, kimyasal özellikleri farklıdır. Kitin, yapısındaki hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler nedeniyle kimyasal olarak daha yüksek stabiliteye sahiptir. Ayrıca, kitinin kristalizasyon yeteneği kitosandan daha fazla olduğu için bazı uygulamalarda daha az reaktif özellik göstermektedir. Gıda katkıları olarak kullanılacak bir maddenin en önemli özelliklerinden

biri olan çözünürlük düzeyi, kitosanda kitine göre daha fazladır. Bunun sebebi, kitosanın zincir boyunca çok sayıda katyonik kısmının olması, polarite ve elektrostatik itme derecesini artırarak çözünürlüğün artmasını sağlamasıdır. Çözünürlük derecesi, kitosanı kitinden ayıran en önemli faktördür. Kitinin çözünürlüğü sınırlı olup, çözücü konusunda seçicidir. Ancak, kitosan birçok sulu asit çözeltisinde çözünebilir. Kitosanın çözünürlüğünün daha fazla olması ve polikasyonik yapısı sayesinde negatif yüklü yüzeylere (mikroorganizma hücre yüzeyi gibi) tutunabilme kabiliyeti, yağ asitleri ve fosfolipitlerle kolayca etkileşime geçebilmesi gibi özellikleri, kitosanı gıda uygulamalarında kitine kıyasla daha kullanılabilir kılmaktadır (Kurt ve Zorba 2005).

Kitin ve kitosan polisakkaritleri, kimyasal olarak selüloza benzemekle birlikte kendi aralarında birtakım farklılıklar göstermektedir. Selülozda, ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitinde asetamid (-NHCOCH<sub>3</sub>), kitosanda ise amin (-NH<sub>2</sub>) grubu bulunmaktadır (Demir ve Seventekin 2009). Şekil 2.3'te kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapıları gösterilmektedir.



**Şekil 2.3.** Selüloz (a), kitosan (b), kitin (c) (Demir ve Seventekin 2009)

Selülozun aksine, kitosan pozitif yüke sahiptir; bu nedenle negatif yüklü yağlar, lipitler, kolesterol, metal iyonları, protein ve makromoleküllere kimyasal olarak bağlanabilmektedir.

Son yıllarda, kitin, kitosan ve türevlerinin bakteri, maya gibi farklı grup mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etkisi oldukça dikkat çekmektedir, özellikle kitosanın, çöktürme, nem tutma, film oluşturma, antimikrobiyel etki, enzim immobilizasyonu gibi çok çeşitli fonksiyonları sayesinde, kozmetik, tıp, tarım gibi endüstrilerde de kitosan kullanımı söz konusu olabilmektedir. (Bostan *ve ark.* 2007). Kitosanın antimikrobiyel etkisi polikasyonik özelliğe sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Negatif yüklü maddelere karşı interaksiyon etki göstermesinden dolayı bakteri, maya ve küflere karşı etkili olabilmektedir. pH 6,3'ün altında kitosanın glikoz monomerlerinin C-2 pozisyonunda bulunan  $\text{NH}_3^+$  grubunun (+) yükü, (-) yüklü mikrobiyel hücre zarlarıyla elektrostatik etkileşimlere girmeleri sonucu, mikrobiyel zarların bütünlüğünü bozup, hücre bileşenlerinin iç ve dış zarlardan sızmasına yol açmaktadır ( Kurt ve Zorba 2005, Tang *ve ark.* 2010). Çelat yapıcı bir ajan olarak rol oynayarak iz elementlere bağlanması ve bu suretle mikrobiyel gelişme ile toksin üretiminin inhibe edilmesi, suyu bağlayarak enzimleri inhibe etmesi, DNA ile bağlanması ve mRNA sentezini engelleyerek üremenin durdurulması şeklinde, muhtemel antimikrobiyel etki mekanizmaları da ileri sürülmektedir (Kurt ve Zorba 2005).

Kitosanın deasetilasyon derecesi (DD) ve moleküler ağırlığı (Ma), antimikrobiyel aktiviteyi etkilemektedir. Deasetilasyon derecesi arttıkça hücre yüzeyine elektrostatik bağlanma gücü de artmakta ve mikroorganizma hücre zarının seçici geçirgen yapısı da daha kolay bozulmaktadır. Ancak moleküler ağırlık arttıkça seçici geçirgen yapının bozulması daha zor olmaktadır. Bu durum Çizelge 2.4'te gösterilmektedir (Aranaz *ve ark.* 2009).

**Çizelge 2.4.** Kitosanın deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığının antimikrobiyel aktivitesine etkisi (Aranaz ve ark. 2009)

Fizikokimyasal özellik	Antimikrobiyel aktivite
↑ DD	↑ Hücre yüzeyine elektrostatik bağlanma gücü
	↑ Seçici geçirgenliğe etki
↑ Ma	↓ Seçici geçirgenliğe etki

Kitosanın patojen mikroorganizmalar üzerine etkisi de araştırmacılar tarafından ele alınmıştır. Wang (1992) tarafından bildirildiğine göre; kitosan % 1-1,5 gibi yüksek konsantrasyonlarda *Staphylococcus aureus*, % 0,5-1 konsantrasyonlarda *Esheria coli* üzerinde inhibisyon oluşturmaktadır (Bostan ve ark. 2007). Zheng ve Zhu (2003), kitosanın moleküler ağırlığı arttıkça mikroorganizma yüzeyinde film tabakası oluşturarak hücre içine besin alımının engellendiğini düşünmüşlerdir. Çünkü molekül ağırlığı arttıkça kitosanın G(+) bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* üzerinde antimikrobiyel etkisinin arttığını saptamışlardır. Aynı araştırmacılar molekül ağırlığı azaldıkça kitosanın G(-) bir bakteri olan *Esheria coli* için antimikrobiyel etkisinin arttığını gözlemlemişlerdir. Bunun sebebinin ise düşük molekül ağırlığına sahip kitosanın hücre duvarından daha kolay içeri nüfuz edebilmesi ve hücre metabolizmasının bu sayede daha kolay bozulması olduğunu ileri sürmüşlerdir

Kitosan konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyel etkinin de kuvvetlendiği ve % 0,1 konsantrasyonda hem *E.coli*, hem de *S. aureus* için tam inhibisyon olduğu rapor edilmiştir. Omura ve ark. (2003) tarafından G(+) bakteriler için minimum inhibe edici kitosan konsantrasyonunun G(-) olanlardan daha düşük olduğu bildirilmiştir (Bostan ve ark. 2007).

Choi ve ark. (2001) tarafından bazı patojenler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda % 0,1'lik kitosan konsantrasyonunun *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sayısında 120 dakikada 4,5 log kob/mL, *Streptococcus mutans* sayısında 0,5 log kob/mL düzeyinde azalma sağladığı bildirilmiştir. Bakteriler kadar küf ve mayalar da kitosandan etkilenmektedir. Çoğu küf türlerinin % 1'in altındaki kitosan konsantrasyonlarına

hassas olduklarını, ancak *Aspergillus flavus* gibi türlerin % 1'in üzerindeki konsantrasyonlarda bile kitosana dirençli oldukları saptanmıştır.

Fang ve ark. (1994) tarafından bildirildiğine göre; pH'ı 5,4 olan ortama kitosan konsantrasyonu % 0,01 – 0,5 olacak şekilde kitosan ilavesi *Aspergillus niger* üremesini durdurmuş, fakat % 0,2'den düşük konsantrasyonlarda *Aspergillus flavus* üremesi ve aflatoksin üretimi engellenememiştir (Bostan ve ark. 2007). Cuero ve ark. (2003) tarafından kitosan kullanımının *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* üremesine etkisinin araştırıldığı çalışmada, bu iki türün üreme hızının yarıya düştüğü ve ayrıca toksin üretimini de % 90 oranında baskılandığı rapor edilmiştir.

Elma suyundaki kitosan (0,1-5 g/L) varlığının 25 °C'de incelenen bozulmaya sebep olan maya türlerinin hepsinin üremesini inhibe ettiği; incelenen mayalar arasında en duyarlısının *Zygosaccharomyces bailii*, en dayanıklısının *Saccharomyces ludwigii* olduğu rapor edilmiştir. Savard ve ark. (2002) tarafından bildirildiğine göre; *Saccharomyces unisporus*'un üremesini inhibe etmek için 1 g/L konsantrasyonunda kitosan yeterli olurken, *Saccharomyces bayanus* için 5 g/L konsantrasyonunda kitosan gerekmektedir. Jung ve ark. (1999) tarafından; 5,75 pH'da yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanın, *Candida albicans* üzerine antimikrobiyel etkisinin yüksek olduğunu belirtmiş; buna sebep olarak da mantar ve graft kopolimerleri arasındaki özel etkileşim gösterilmiştir (Bostan ve ark. 2007).

Devlieghere ve ark. (2004) tarafından bildirildiğine göre; kitosanın antimikrobiyel aktivitesine gıda bileşenlerinin (nişasta, peynir altı suyu, yağ) etkisi *Candida lambica* ile inokule edilmiş ortamda incelenmiş; yağ hariç diğerlerinin aktiviteyi olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır (Bostan ve ark. 2007).

Kitin ve kitosan, günümüzde özellikle Oregon, Washington, Virginia, Japonya ve Antartika'daki kabuklu deniz hayvanlarından üretilmekte ve bu konuda özellikle Norveç, Meksika ve Şili gibi ülkeler çalışmalarını yürütmektedir. Örneğin "Flonac" ticari adıyla yengeç kabuklarından üretilen kitosan polimerinin 2000 yılı üretimi 1250 ton/yıl civarında olmuş, bir kilogramının üretim maliyeti ise ürün kalitesine ve üretim prosesine bağlı olarak 6 ile 32 USD arasında değişmiştir (Demir ve Seventekin 2009).

#### 2.4.1. Kitosanın özelliklerine etki eden parametreler

Kitosanın özelliklerine etki eden parametreler; deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, viskozite, çözünürlük şeklinde sıralanabilir (Demir ve Seventekin 2009).

**Deasetilasyon derecesi:** Kitin ve kitosan arasındaki temel farklılık, yapılarındaki asetil içeriğinden kaynaklanmaktadır. “Deasetilasyon Derecesi (DD)” kitinin yapısında bulunan aminoasetil gruplarından asetil grubunun uzaklaştırılma derecesi olup, geride sadece amin grubu kalır. Kitosanın deasetilasyon derecesinin, çözünme özelliği üzerine büyük etkisi bulunmaktadır. Kitinin belli derecede deasetillenmesi (% 60 ve üzeri) sonucunda “kitosan” elde edilmektedir. Deasetilasyon derecesi, deniz kabuklularının cinsine ve üretim yöntemine göre % 56-99 arasında değişebilmektedir (Demir ve Seventekin 2009).

**Molekül ağırlığı:** Kitosanın doğal ve sentetik polimerlere uygulamasında önemli olan diğer bir parametre de molekül ağırlığıdır. Kitin ve kitosanın molekül ağırlığı, elde edildiği kaynağa ve özellikle deasetilasyon koşullarına (sıcaklık, zaman ve NaOH konsantrasyonu) bağlı olarak değişmektedir. 280 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda kitosan parçalanmaya başlamakta, polimer zinciri kopmakta ve böylece molekül ağırlığı düşmektedir (Demir ve Seventekin 2009).

**Viskozite:** Kitosanın demineralizasyon süresinin artması ile viskozitesi düşmektedir. Yaklaşık 4°C’de depolanan kitosan çözeltisinin viskozite açısından en iyi stabiliteyi gösterdiği anlaşılmıştır (Demir ve Seventekin 2009).

**Çözünürlük:** Kitin, çok miktardaki hidrojen bağları içeren yarı kristal yapıda bir polimerdir. Bu nedenle seyreltik asitlerde ve birçok organik çözücüde çözünmemektedir. Kitosan, katyonik yapısı nedeniyle pH<6 olan ortamda bazı çözeltilerde kolayca çözünebilirken, inorganik asitler içerisindeki çözünürlüğü (% 1 hidroklorik asitte çözünür; sülfirik ve fosforik asitte çözünmez) oldukça düşüktür (Demir ve Seventekin 2009). Kitosan çözeltilerinin pH 7,0 ve üzerinde stabilitesi bozulur. Aynı şekilde oda sıcaklığında uzun süre muhafaza, kitosan çözeltilerinin stabilitesini olumsuz etkilemektedir (Bostan ve ark. 2007). Kitosanın çözünmesi amacıyla en çok asetik asit kullanılırken, formik asit ve laktik asit gibi organik asitler de kullanılmaktadır. Kitosanın çözünürlüğünü sıcaklık, çözgen konsantrasyonu ve partikül



büyükluğu gibi birçok parametre etkilemektedir. Yapılan araştırmalar iyi bir çözünürlük için kitosanın en az % 75-80 deasetilasyon derecesine sahip olması gerektiğini göstermiştir (Demir ve Seventekin 2009).

Kitosan asidik ortamda  $\text{NH}_2$  grubu  $-\text{NH}_3^+$  şeklinde bulunmakta ve ortamdaki anyonik gruplarla elektrostatik olarak etkileşime girmektedir. Protonlaşmış durumda katyonik polielektrolit davranışı göstererek, viskoz çözeltiler oluşturmakta ve zıt yüklü molekül ve yüzeylerle etkileşime girebilmektedir. Çizelge 2.5’de kitosanın çeşitli organik asitler içinde çözünebilirlik durumu gösterilmiştir (Demir ve Seventekin 2009).

**Çizelge 2.5.** Kitosanın bazı organik asitlerdeki çözünürlüğü (Demir ve Seventekin 2009)

Asitler	Kitosan Konsantrasyonu				
	%1	%5	%10	%50	> %50
Asetik	+	+	+		
Sitrik	-	+	+		
Formik	+	+	+	+	+
Laktik	+	+	+		
Malik	+	+	+		
Malonik	+	+	+		
Tartarik	-	-	+		

(+) : çözünebilir , (-) : çözünemez

#### 2.4.2. Kitosanın gıda uygulamalarındaki antimikrobiyel etkinliği

Kitosan antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiğinden, doğal kaynaklı potansiyel gıda koruyucusu olarak ilgi çekmektedir. Kitosanın, bozulma yapan mayalara karşı daha etkili olmasına karşın, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio spp.* ve *Salmonella typhimurium* gibi bazı Gr(-) bakterilerin inhibisyonuna neden olduğu da belirtilmektedir (Bostan ve ark. 2007). Ayrıca No ve ark. (2002) kitosanın G(+) bakteriler üzerine inhibisyon etkisinin, G(-) bakterilere oranla daha fazla olduğunu saptamışlardır.

Şarap üretimi boyunca istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini önlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan  $\text{SO}_2$ 'nin koruyucu olarak kullanımını sınırlandıran bazı faktörler bulunmaktadır.  $\text{SO}_2$ 'nin etkinliği yüksek oranda pH'ya bağlıdır.  $\text{SO}_2$ 'nin

sadece moleküler formu antimikrobiyel aktivite göstermektedir ve pH'sı 3 olan şaraplarda yalnızca % 5-10'u moleküler formda bulunmakta, pH'sı 4 olan şaraplarda ise bulunmamaktadır. Şarapta bozulmaya da neden olabilen bazı mayalar (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*), SO<sub>2</sub>'nin izin verilen maksimum düzeylerini tolere edebilmektedir. Bu nedenle, şarap üretiminde ilave koruyuculara gereksinim duyulmaktadır. Bununla birlikte; SO<sub>2</sub>'nin şaraplarda kullanımı, istenmeyen koku ve flavor oluşumuna ve alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. Sağlık kaygılarının artması ve kimyasal koruyucularla ilgili yasal limitlerin daraltılması ile birlikte, tüketici tercihleri doğal gıdalar yönünde değişmektedir. Bunun sonucunda, gıdalarda SO<sub>2</sub> kullanımının azaltılması ve ilave antimikrobiyel ajanlar ile birlikte kullanılması yönünde bir eğilim giderek yaygınlaşmaktadır (Enrique ve ark. 2007).

Kitosanın antimikrobiyel etkinliği bazı gıda maddelerinde de denenmiştir. Bu kapsamda en çok çalışılan grup; et ve et ürünleridir (Bostan ve ark. 2007). Sagoo ve ark. (2002) tarafından bildirildiğine göre; domuz eti kıymasına katılan % 0,3-0,6 konsantrasyonlarında kitosanın, 4°C'de yapılan muhafazanın ilk günü toplam aerop mezofil mikroorganizma, küf-maya ve laktik asit bakteri sayısında 3 log kob/g azalma sağladığını ve mikroorganizma yükünün 18 günlük muhafaza periyodu boyunca kitosan içermeyen kontrol grubunda diğerlerinden daima daha yüksek olduğu saptanmıştır. Benzer bulgular % 1,0 konsantrasyonundaki kitosan çözeltilerine daldırılmış domuz sosislerinde de görülmüş ve mikroorganizma sayılarında 7 °C'de 18 gün yapılan muhafaza sonunda 1-3 log kob/g azalma kaydedilmiştir. Youn ve ark. (2004) tarafından baharat katılmış etlerle yapılan çalışmalarda % 0,1'den yüksek konsantrasyonlardaki kitosanın raf ömrünü artırdığı ve oksidasyonda belirgin bir azalma olduğu bildirilmiştir. Darmadji ve Izumimuto (1994) tarafından bildirildiğine göre; % 0,5-1,0'lik kitosan konsantrasyonlarının köftelerde *B. subtilis*, *Pseudomonas* gibi bozulma yapan bakterilerin sayısı yaklaşık 1-2 log azalmış ve kokuşma da yavaşlamıştır. Aynı çalışmada % 0,1'in üzerindeki konsantrasyonlar denemelerde kullanıldığında ise *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Micrococcus varians* gibi fermente et ürünlerinde önemli kültür bakterilerinin de üremelerinin engellendiği görülmüştür (Bostan ve ark. 2007).

Zivanovic ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada kitosan filmleri hem tek başına, hem de kekik yağı ile birlikte *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş et ürünlerinde denenmiştir. Filmle kaplanan ürünler 10 °C' de 5 gün muhafaza edilmiş ve yapılan mikrobiyolojik analizlerde kitosan filminin *L. monocytogenes* sayısını 2 log kadar; % 1 ve % 2 kekik esansiyel yağı içeren kitosan filmlerinin ise 3,6 ve 4 log kadar azalttığı saptanmıştır. Tsai ve ark. (2002) tarafından kitosanın balık etleri üzerine etkisi araştırılarak, balık fletolarının yüksek deasetilasyon derecesine sahip % 1'lik kitosan ile muamelesinin mezofil, psikrotrof, koliform, *Aeromonas* ve *Vibrio* üremesini yavaşlattığı, raf ömrünü 5 günden 9 güne uzattığı sonucuna varılmıştır (Bostan ve ark. 2007).

Taha ve Swailam (2002) tarafından bildirildiğine göre; % 0,04 konsantrasyondaki kitosanın, *Aeromonas hydrophila* üremesi baskıladığı, sıcaklık artışı ve pH azalışı ile baskılayıcı etkinin daha da arttığı saptanmıştır. Kitosanın depolama sırasında da koruyucu etkisi olabileceği düşünülerek meyve ve sebzelerde de çalışılmıştır. El Ghaouth ve ark. (1997) tarafından bildirildiğine göre; çilek yüzeylerinin kitosan ile kaplanması (15 g/L), küf üremesini ve bu sebeple oluşan çürümeyi önemli ölçüde geciktirdiği gözlenmiştir. Chien ve ark. (2007) ise dilimlenmiş mangonun kalitesi ve raf ömrü üzerine yenilebilir kitosan ile kaplamanın etkisini araştırmışlar ve farklı konsantrasyonlarda (% 0; 0,5; 1,0 ve 2,0) kitosan solüsyonları ile muamele edilen dilimlenmiş meyveleri 25 °C'de muhafaza etmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda kitosanın, su kaybını geciktirerek duyusal kaliteyi koruduğu; ayrıca, mikroorganizma gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır. Cheah ve Page (1997) tarafından yapılan çalışmalarda % 2-4 kitosan ile kaplanan havuçlarda çürüme oranının önemli derecede azaldığı (% 88'den % 28'e) , Du ve ark. (1997) tarafından yapılan çalışmalarda şeftali, armut, kivi gibi meyvelerin saklanması sırasında kitosan ile kaplamanın benzer etkileri olduğu rapor edilmiştir (Bostan ve ark. 2007).

Oh ve ark. (2001) tarafından bildirildiğine göre; kitosanın antimikrobiyel etkisi deneysel olarak kontamine edilmiş mayonezlerde araştırılmış ve 25 °C'de muhafaza sonucunda *Lactobacillus fructivorans* ve *Zygosaccharomyces bailii* sayısının önemli derecede azaldığı anlaşılmıştır. Bu nedenle mayonezde bozulma yapan mikroorganizmaların

üremesini inhibe etmek için doğal bir koruyucu olarak kitosan kullanılmasını önermişlerdir (Bostan ve ark. 2007).

Roller ve Covill (2000), asetik asit (% 0,16) veya limon suyu (% 1,2 ve % 2,6) ile kombinasyon halinde kitosan (3 g/L) ilave edilerek hazırlanan mayonezlere deneysel olarak *S. enteritidis*, *Z. bailii* ve *L. fructivorans* inokule etmişlerdir. 5 ve 25°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta 8 gün süreyle yapılan depolama sırasında asetik asit ve kitosan içeren mayonezlerde *L. fructivorans* ve *Z. bailii* üremesinin baskılandığı saptanmış; *S. enteritidis* sayısında ise önemli bir değişme gözlenmemiştir. Limon suyu ve kitosan içeren örneklerde ise önemli farklılıklar olmadığı belirtilmiştir.

Farklı bir çalışmada 5°C' de depolanan ve kitosan ile kaplanmış (9 mg/g) karideslerde bozulma yapan mikroorganizma sayısının önemli derecede azaldığı, ancak 25 °C'de muhafaza edilen örneklerde kitosanın bir koruyucu madde olarak etkili olmadığı da bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre, kitosan ile asetik asit kombinasyonunun koruyucu olarak kullanılabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Kitosanın denendiği bir başka ürün ise pizza olmuştur (Bostan ve ark. 2007). Rodriguez ve ark. (2003) pizzalarda kitosanın hem yenilebilir film olarak hem de bir hamur bileşeni olarak kullanılması halinde gösterebileceği antifungal etkiyi araştırmışlardır. Yenilebilir film şeklinde kitosan kullanımının (0,079 g/100 g pizza) *Alternaria*, *Penicillium* ve *Cladosporium* üremesini yavaşlattığını, *Aspergillus* üzerine aynı derecede etki göstermediğini ve kitosanın hamur içine ilave edildiğinde ise hiç bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Moon ve ark. (2007) yaptıkları çalışmalarda kitosanın mastitisli inek sütünden izole edilen *S. aureus* suşlarına karşı inhibisyon etkisini incelemişlerdir. Antimikrobiyel etkiyi artırmak için, denemelerinde suda biraz daha iyi oranda çözünen, düşük molekül ağırlıklı ve yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanla çalışmışlar ve 10 dk kitosan (% 0,0001'den % 0,5'e kadar değişen konsantrasyonlarda) uygulamasının sonucunda *S. aureus* gelişmesinde inhibisyon gözlemişlerdir.

Kitosan, su artırılması ve sulu yan ürünlerde bulunan materyalin geri kazanılmasında da etkili bir polimerdir. Kitosanın deniz ürünleri atıklarından elde edilen diğer polimerlere kıyasla çelat oluşturma kabiliyeti oldukça yüksek olup, gıdaların işlenmesinde kullanılmış sularda bulunan proteinlerin koagülasyonunu da sağlayarak, proteinlerin

geri kazanımını sağlayabilmektedir. Bu sayede, kitosan kullanımı ile peyniraltı suyundan protein elde etme işleminin, ultrafiltrasyon işlemine alternatif bir yöntem olabileceği düşünülmektedir (Kurt ve Zorba 2005, Aranaz et al. 2009).

Meyve suyu üretiminde de bulanıklığın giderilmesi için jelatin gibi ajanlar kullanılmaktadır. Kitosan tuzları güçlü pozitif yükler taşıdığı için meyve suyundaki negatif kolloidal yüklerle etkileşime girerek bulanıklık oluşturan bileşenlerin çökmesini sağlar. Dolayısıyla kitosan durultma ajanı olarak da kullanılabilir (Kurt ve Zorba 2005).

Bira üretiminde, laktik asit bakterilerinin gelişmesi, bozulmalara neden olduğu için, arzu edilmemektedir. Gil ve ark. (2004) tarafından bildirildiğine göre; bira üretimi sırasında izole ettikleri bozucu etki yapan dört laktik asit bakterisinin gelişimini durdurmak ve mikroorganizmayı inhibe etmek için 0,1 g/L kitosanın yeterli olduğu; ancak, bu konsantrasyonun bira üretiminde kullanılan yedi farklı maya türü için yeterli olmadığı ve inhibisyon için 1,0 g/L kitosan gerektiği saptanmıştır. Bu sebeple de 0,1 g/L'lik kitosan konsantrasyonunun, fermantasyonu engellemeden, bakteri inhibisyonunu sağlayabildiği anlaşılmıştır (Bostan ve ark. 2007).

Gıda maddelerinin raf ömrünün uzatılarak uzun süre muhafazasını sağlamak günümüzde halen katkı maddesi kullanımıyla bağdaştırılmaktadır. Ancak, kullanılan katkı maddelerinden birçoğunun tüketici sağlığına olumsuz etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir. Bu sebeple, kimyasal gıda koruyucularına alternatif olarak, zararlı etkisinin olmadığı bilinen bitkisel veya hayvansal kaynaklardan elde edilen doğal koruyucu maddeler önerilmiş ve bir kısmı da piyasaya sunulmuştur. Doğal katkı maddelerin kullanımı sonucu zamanla tahmin edilen performansın elde edilemediği anlaşılmıştır. Doğal katkıların, kimyasal olanlara göre etkisinin zayıf olması onların dezavantajı olduğundan, kitosan için de kapsamlı bir araştırma yapılmalıdır. Çok çeşitli mikroorganizmaya karşı inhibisyon etkisinin olduğu saptanmış olsa da, konunun daha çok araştırılmasında fayda vardır. Özellikle et ve et ürünlerinde mikrobiyel yükü azaltmak ve ürünün kalitesini artırmak için kitosanın istenilen etkiyi gösterdiği tam olarak kanıtlanabilirse, et teknolojisinde koruyucu katkı maddesi kullanımı ile ilgili sorunun çözülmesine önemli katkı sağlayacaktır (Bostan ve ark. 2007). Kitosanın diğer alanlarda kullanımları Çizelge 2.6'da görülmektedir.

**Çizelge 2.6.** Kitin, kitosan ve türevlerinin uygulama alanları (Demir ve Seventekin 2009)

<b>Uygulama Alanı</b>	<b>Spesifik Kullanımları</b>
Su arıtımı	Kirlenmiş atık sular için koagülasyon ve flokülasyon
	Atık sudaki metal iyonlarının uzaklaştırılması ve geri kazanımı
Ziraat	Bitki katkı maddesi Antimikrobiyel madde Bitki tohumu kaplanması Gübre yapımı İnsektisidlerde
Biyoteknoloji	Kromatografik yöntemlerde Enzim immobilizasyonunda
Gıda	Doğal kıvamlaştırıcı Hayvan yemlerini de içeren yiyecek katkı maddesi Yiyecek işlemede (örneğin şeker işleme) Filtreleme ve temizleme Hipokolestrolemik madde (zayıflama maddesi) Atık yiyeceklerin tekrar işlenmesi

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Mikroorganizmalar

Ticari şarap üretiminde üzüm sırasında bulunması beklenen laktik asit bakterilerinden (LAB) *Lactobacillus plantarum* ve mayalardan *Saccharomyces cerevisiae* Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Bir diğer LAB olan *Oenococcus oeni* (DSM-20252) ve *Lactobacillus hilgardii* (DSM-20051) ile şarabın depolanma sürecinde en önemli bozulma etmeni olan maya *Brettanomyces bruxellensis* (DSM-70001), Almanya DSMZ' den temin edilmiştir. Yabani mayalardan *Hanseniaspora uvarum* (JFO 1755), ve *Zygosaccharomyces bailii* (JFO 0488), Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden Prof. Dr. Yeşim ÖZBAŞ'tan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Denemelerde kullanılan mikroorganizmalar

Kültür No.	Mikroorganizma türü	Kaynağı
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Narince 3	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü
3	<i>Hanseniaspora uvarum</i> JFO 1755	Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü
4	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> JFO 0488	Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü
5	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> DSM-70001	DSMZ (Almanya)
6	<i>Oenococcus oeni</i> DSM-20252	DSMZ (Almanya)
7	<i>Lactobacillus hilgardii</i> DSM-20051	DSMZ (Almanya)

Mikroorganizmalar uygun sıvı besiyerlerinde aktifleştirilip, % 40 (v/v) gliserol içeren kriyo tüpler içerisinde -20° C’de depolanmıştır. Sürekli olarak kültürlerin aktif tutulması gereksinimi nedeniyle de aylık pasajlar yapılmış, *S. cerevisiae*, *H. uvarum* ve *Z. bailii* YPG sıvı besiyerine 28° C’de 48 saat; *L. hilgardii* ve *O. oeni* MRS sıvı besiyerine 28° C’de sırasıyla 48 ve 96 saat; *L. plantarum* MRS sıvı besiyerine 28° C’de 48 saat ve *B. bruxellensis* YPG ve Tyriptic Soy Broth sıvı besiyerlerine inokule edilerek 28° C’de 96 saat Binder (USA) marka inkübatörde inkübe edilmiştir.

Besiyeri ve gerekli ekipmanın sterilizasyonunda CL-40 M Alp (Japan) marka otoklav, pH ölçümünde pH 4,0 ve pH 7,0 tamponlarıyla (Hamilton Duracal Buffer, Switzerland) kalibre edilmiş pH metre (Metler Toledo Seven Easy pH, China), tüpleri karıştırmak amacıyla Heidolph MR Hei-Standard (Germany) marka vorteks kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerde ise Shimadzu UV-1208 (Japan) marka spektrofotometre kullanılmış ve santrifüj işlemi ise Mikro 22R Hettich Zentrifugen (Germany) ile Biofuge 15 Heraus Sepatech (Germany) markalı santrifüjlerde gerçekleştirilmiştir.

### 3.1.2. Besiyerleri

Mikroorganizmalar aşağıda içerikleri belirtilen besiyerlerinde uygun koşullarda geliştirilmişlerdir.

#### MRS broth

Bileşim	g/L
Kazein peptonu	10,0
Et özütü	8,0
Maya özütü	4,0
D(+) glukoz	20,0
Dipotasyum hidrojen fosfat	2,00
Tween* 80	1,00
Di-amonyum hidrojen sitrat	2,00
Sodyum asetat	5,00
Magnezyum sülfat	0,2
Manganez sülfat	0,04

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 52,24 g tartılarak, damıtık su ile 1 L’ye tamamlanmış ve tüplere dağıtılarak 121°C’de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:5,7).



## MRS-agar

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Kazein peptonu	10,0
Et özütü	8,0
Maya özütü	4,0
D(+) glukoz	20,0
Dipotasyum hidrojen fosfat	2,00
Tween* 80	1,00
Di-amonyum hidrojen sitrat	2,00
Sodyum asetat	5,00
Magnezyum sülfat	0,2
Manganez sülfat	0,04
Agar-agar	14

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 52,24 g tartılarak, kaynar haldeki damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:5,7).

## YPG (Yeast Extract Peptone Glucose) broth

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Maya özütü	10,0
Et peptonu	20,0
Glukoz	20,0

Besiyeri bileşenleri damıtık su içinde çözüldürüldükten sonra, pH değeri 1 N HCl ile 4.5'e ayarlanmış ve tüplere dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

## Fermantasyon besiyeri (% 20 glikoz içeren YPG broth)

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Maya özütü	10,0
Et prptonu	10,0
Glukoz	200,0

Besiyeri bileşenleri damıtık su içinde çözüldürüldükten sonra, pH değeri 1 N HCl ile 3.5'e ayarlanmış ve tüplere dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

### M17 broth

Bileşim	g/L
Soya peptonu	5,0
Et peptonu	2,5
Kazein peptonu	2,5
Maya özütü	2,5
Et özütü	5,0
D(+) Lactoz	5,0
Askorbik asit	0,5
Na-β glikonufosfat	19,0
Magnezyum sülfat	0,25

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 42,25 g tartılarak, damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmış ve tüplere dağıtılarak 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:7,2).

### M17 agar

Bileşim	g/L
Soya peptonu	5,0
Et peptonu	2,5
Kazein peptonu	2,5
Maya özütü	2,5
Et özütü	5,0
D(+) Lactoz	5,0
Askorbik asit	0,5
Na-β glikonufosfat	19,0
Magnezyum sülfat	0,25
Agar-agar	12,75

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 55 g tartılarak, kaynar haldeki damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:7,2).

### TSB (Tryptic soy broth / CASO broth)

Bileşim	g/L
Kazein peptonu	17,0
Soya peptonu	3,0
D(+) Glukoz	2,5
Sodyum klorit	5,0
di-Potasyum hidrojenfosfat	2,5

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 30 g tartılarak, damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmış ve tüplere dağıtılarak 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:7,3).

### **PDA (Potato dextrose agar)**

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Patates özütü	4,0
Glukoz	20,0
Agar	15,0

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 39 g tartılarak, kaynar haldeki damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:5,6).

### **Trytic soy agar (CASO agar)**

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Kazein peptonu	17,0
Soya peptonu	3,0
D(+) Glukoz	2,5
Sodyum klorit	5,0
di-Potasyum hidrojenfosfat	2,5
Agar-agar	15,0

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 45 g tartılarak, kaynar haldeki damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:7,3).

### **YGC agar (Yeast Glucose Chloramphenicol Agar)**

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Maya özütü	5,0
D(+) Glukoz	20,0
Kloramfenikol	0,1
Agar-agar	14,9

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 40 g tartılarak, kaynar haldeki damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:6,6).

### **Nutrient broth**

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Et özütü	10,0
Pepton A	10,0
Sodyum klorit	5,0

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 25 g tartılarak, damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmış ve tüplere dağıtılarak 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:7,3).

### **Nutrient agar**

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Et özütü	10,0
Pepton A	10,0
Sodyum klorit	5,0
Agar-agar	15,0

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 40 g tartılarak, kaynar haldeki damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:7,3).

### **Sikloheksimidli YGC agar**

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Maya özütü	5,0
D(+) Glukoz	20,0
Kloramfenikol	0,1
Sikloheksimid	0,1
Agar-agar	14,9

Besiyeri bileşenleri kaynar haldeki damıtık su içinde çözündürüldükten sonra, pH değeri 1 N HCl ile 6,6'ya ayarlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

### **Skim Milk (Yağsız süt tozu) agar**

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Su	50
Kül	100
Lipid içeriği	53
Laktoz cinsinden indirgen şeker	500
Agar-agar	15

Yukarıda bileşimi verilen hazır süttozu, % 10 (w/v) oranında olacak şekilde tartılarak, 15 g/L Agar-agar eklenmiş ve kaynar haldeki damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:6,5).

### **Skim Milk (yağsız süt tozu) broth**

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Su	50
Kül	100
Lipid içeriği	53
Laktoz cinsinden indirgen şeker	~ 500

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden % 10 (w/v) oranında olacak şekilde tartılarak, kaynar haldeki damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:6,5).

### **Brain-Heart infussion broth**

<b>Bileşim</b>	<b>g/L</b>
Nutrient substrat (Beyin/kalp özütü ve peptonlar)	27,5
D(+)-glukoz	2,0
Sodyum klorit	5,0
di-sodyum hidrojen fosfat	2,5

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 37 g tartılarak, damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (pH:4,5).

### **3.1.3. Çözeltiler**

**% 1 lik asetik asit çözeltisi:** Saf asetik asit çözeltisinden 10 mL alınıp saf su ile litreye tamamlanmıştır.

**Kitosan çözeltisi (ana stok):** 10 g toz haldeki düşük molekül ağırlığına sahip kitosan (SIGMA) %1 lik asetik asit çözeltisi ile litreye tamamlanmıştır.



değerlerine göre farklı konsantrasyonlarda eklenen kitosanının şarap üretim prosesindeki etkisi araştırılmıştır.

### 3.2.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi

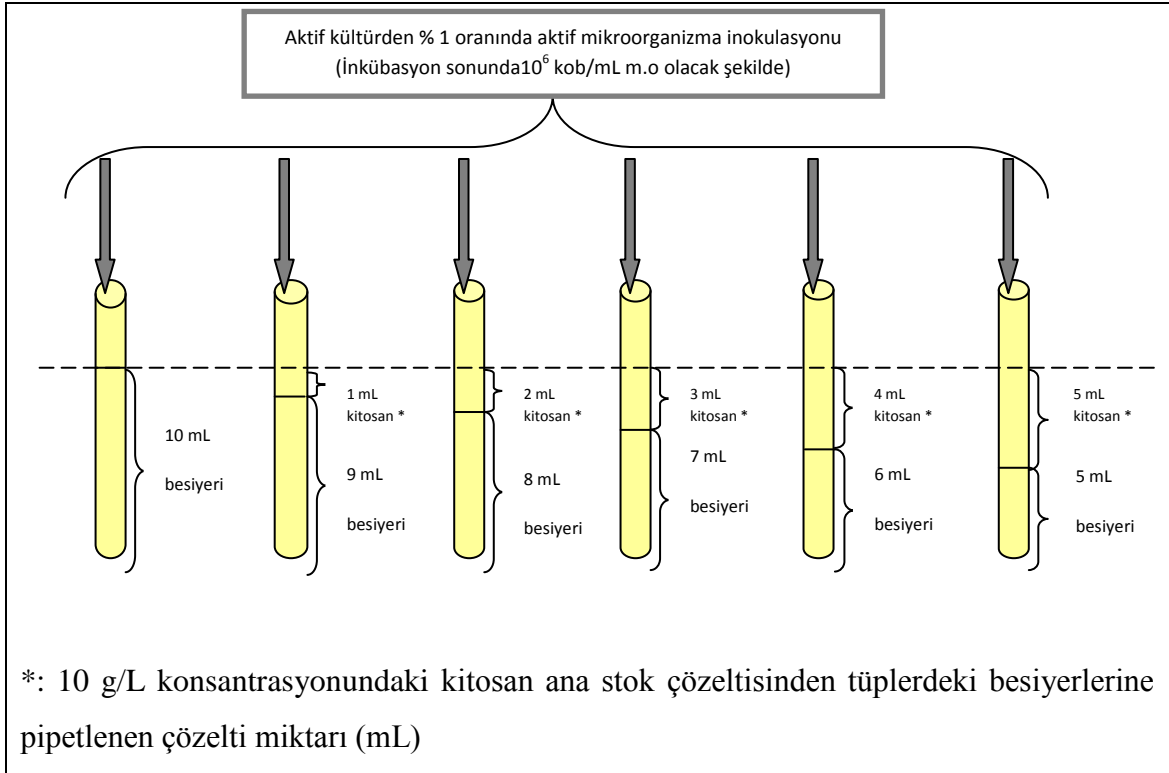
Almanya DSMZ'den temin edilen üç mikroorganizmadan iki tanesinin (*B. bruxellensis* ve *O. oeni*) gelişmesi ve hızla çoğalması sağlanamamış, sıvı ve katı besiyerlerinde çok uzun sürelerde ve az miktarda gelişme gösterebildikleri için, kitosan ön denemelerinin sadece ikincisinde kullanılabilmiştir.

Şarapta malolaktik fermentasyonda önemli rol oynayan *O. oeni*'nin ve benzer şekilde şarabın depolama aşamasında istenmeyen yabancı mayalardan en önemlisi olan *B. bruxellensis*'in de arzulanan düzeyde gelişebilmesi için farklı besiyerleri ve farklı pH denemeleri yapılmıştır. Sıvı besiyerleri (MERCK) hem normal pH'larında hazırlanmış hem de *O. oeni*'nin daha iyi geliştiği asidik ortamı sağlamak için pH 4,8'e ayarlanarak hazırlanmıştır. *B. bruxellensis* suşunun temin edildiği DSMZ'ye ait katalog bilgilerinde mayanın uygun gelişme pH'ı belirtilmediğinden, *O. oeni* için hazırlanan besiyerlerinin aynısı (M17 Broth hariç) *B. bruxellensis* için de hazırlanmıştır. Bu sebeple, her iki mikroorganizma için farklı pH'a sahip Nutrient Broth (pH: 4.8 ve pH: 6.6), Tryptic Soy Broth (pH: 4.8 ve pH: 7.3), Brain-Heart Infusion Broth (pH: 4.8 ve pH: 7.3) ve sadece *O. oeni* için ayrıca M 17 Broth (pH: 4.8 ve pH: 7.2) hazırlanarak, mikroorganizmaların gelişmeleri incelenmiştir. İnkübasyon *O. oeni* için hep 28°C'de yapılmış, ancak yabancı mayaların sıcaklığa duyarlı olabildiği göz önüne alınarak *B. bruxellensis* için 25, 28 ve 30°C' de inkübasyon denemeleri yapılmıştır.

Şarap denemelerinde de kullanılan düşük molekül ağırlığına sahip kitosanın, şarapta alkol fermantasyonu için üzüm sırasında mutlaka bulunması ya da sonradan aşılması gereken *S. cerevisiae* suşu ile diğer mayalar ve üzüm sırasında bulunabilecek istenmeyen mikroorganizmalardan *L. plantarum* bakterisine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, sentetik besiyerinde ön denemeler yapılmıştır. Ön denemelerde aktiveleştirme işlemi LAB'nin MRS sıvı besiyerine (MERCK), mayaların ise YPG sıvı besiyerine (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 20 g/L glikoz; pH 4,5) aşılması ve 28°C'de 2 gün süre ile inkübe edilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Kültürleri aktifleştirmek için farklı pH'larda farklı besiyerleri denenmiş ve *O. oeni* dışındaki laktik asit bakterilerinin en iyi MRS Broth'da (pH:5,7) ve *B. bruxellensis* dışındaki mayaların ise en iyi YPG Broth'da (pH:4,5) geliştikleri gözlenmiştir. Bu aşamadan sonra ise aktif mikroorganizmaların şarap ortamına adım adım adapte edilebilmesi için şarap benzeri sıvı besiyeri (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 200 g/L glikoz; pH 3,5)'nde kitosanlı denemeler gerçekleştirilmiştir.

% 1'lik asetik asit içerisinde çözündürülen 10 g/L konsantrasyondaki kitosan stok çözeltisi sterilize edildikten sonra, uygun hacimlerde şarap benzeri sıvı besiyeri (10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 200 g/L glikoz; pH 3.5) ile aseptik koşullarda karıştırılarak, 10'ar mL'lik tüplerde hazırlanmıştır. Mikroorganizmalar farklı konsantrasyonlarda ( 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 g/L ) kitosan içeren tüplerdeki şarap benzeri sıvı besiyerine % 1 oranında (inkübasyondan sonra yaklaşık  $10^6$  kob/mL mikroorganizma içerecek şekilde) inokule edilip 6 gün süre ile 28 °C'de inkübasyona bırakılmış ve 0. gün ve 6. günlerde uygun katı besiyerlerinde (mayalar için YGC Agar, bakteriler için MRS Agar) yayma plak yöntemi ile sayım yapılmıştır. Şekil 3.2' de inokulasyon şematize edilmiştir.



**Şekil 3.2.** Kitosanlı besiyerlerine mikroorganizma inokulasyonu



**Yayma plak yöntemi:** Yayma yönteminde petri kutusuna önce agarlı besiyeri dökülüp, katılaştıktan sonra sıvı örnekten (şarap, üzüm şırası) doğrudan ya da uygun seyreltisinden 0,1 mL aktarılıp, Drigalski spatülü ile yayılmıştır. Yeterli sıcaklık ve sürede inkübasyon sonucunda gelişen koloniler sayılarak örnekteki mikroorganizma miktarı kob/ mL olarak şu formüle göre hesaplanmıştır (Halkman 2005).

$$N = C / [ V \times ( n1 + 0.1 \times n2 ) \times d ]$$

Burada;

N: Örneğin 1 gram ya da 1 mL'sindeki mikroorganizma sayısı

C: Sayımı yapılan tüm petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V: Sayımı yapılan petri kutularına aktarılan hacim (mL)

n1: İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi

n2: İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi

d: Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranıdır.

### **3.2.3. Kitosanın minimum inhibisyon aralığının daraltılması**

Kitosanın etkinliğinin esas olarak 1 g/L ile 2 g/L konsantrasyonları arasında gerçekleştiği ve daha büyük konsantrasyonlarda mikroorganizmanın tamamen inhibe olduğu anlaşıncaya, konsantrasyon aralığı daraltılarak, denemeler yeniden tüm mikroorganizmalar için yapılmıştır. Bu aşamada bir önceki denemeden farklı olarak konsantrasyon aralığı daraltılmış (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0 g/L) ve mikroorganizmaların aktifleştirildiği sıvı besiyeri değiştirilerek, tüm mikroorganizmalar için YPG broth kullanılmıştır. Besiyeri değişikliğinin sebebi mikroorganizmayı her aşamada şarap ortamına biraz daha benzeyen bir sıvı besiyeri içinde aktifleştirerek adaptasyonunu sağlamaktır. Laktik asit bakterileri (*O. oeni* hariç) MRS Agar' da, *S. cerevisiae* dışındaki mayalar (*H. uvarum* ve *Z. bailii*) ise YGC Agar'da 0. gün, 3. gün ve 6. günlerde sayılmıştır. Gelişim ve inhibisyon düzeyinin daha iyi gözlemlenebilmesi için alkol fermentasyonunda mutlaka gerekli olan *S. cerevisiae* suşu ise diğer

mayalardan farklı olarak 20 gün boyunca 28°C’de inkübe edilmiş ve 0. gün, 3. gün, 6. gün, 20. günlerde YGC Agar’da sayılmıştır.

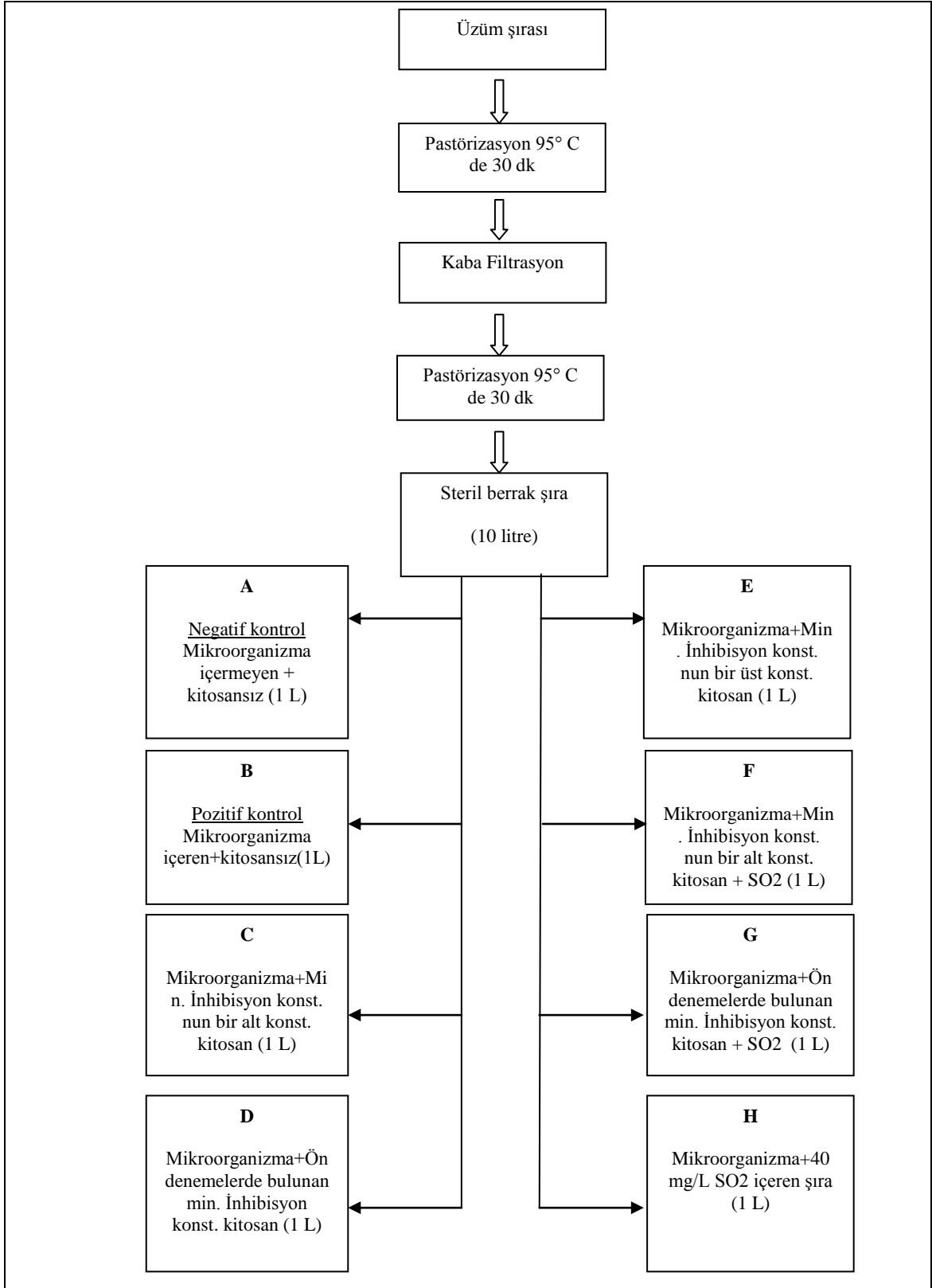
### 3.3. Şarap Fermantasyonu

Şarap fermantasyonu denemelerinde kullanılan üzüm şırası Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Deneme Bağları’ndan temin edilen Narince üzümü sıkılarak elde edilmiştir. 10 litre şıra ilk olarak 95°C’de 30 dk otoklavlanarak fermantasyon başlatılana kadar steril kaplarda muhafaza edilmiştir. Yeterli sayıda fermantasyon şişesi ve fermantasyon başlığı elde edilip, sentetik ortamda kitosanın minimum inhibisyon değeri her mikroorganizma için ayrı ayrı belirlendikten sonra şıra, kaba filtre yardımıyla süzülerek, kaba tortu ortamdan ayrılmıştır. Fermantasyon şişelerine doldurulan şıra 95 °C’de 30 dk pastörize edilmiştir. Fermantasyon denemelerinde kullanılan üzüm şırasının özellikleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Fermantasyon denemelerinde kullanılan üzüm şırasının özellikleri

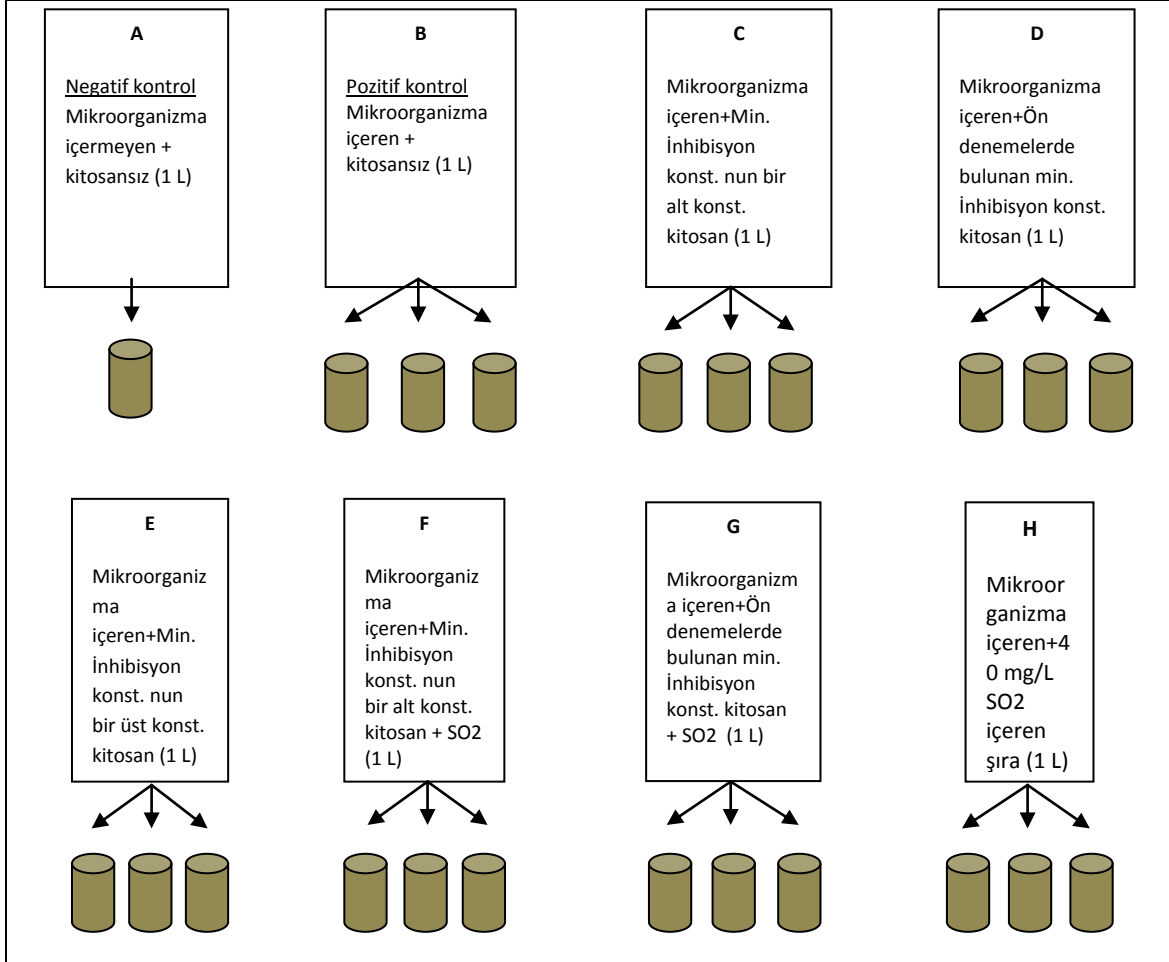
Narince üzüm şırası	Şıra analizleri				
	pH	Titrasyon asitliği (g/L)	İndirgen şeker (g/L)	Briks (%)	Öksele
	3,27	6,34	211,85	21,75	90

Fermantasyon denemeleri 8 ayrı grup ve her grup için 3 tekerrür olacak şekilde planlanmıştır. Mikroorganizma inokule edilmeyen ve kitosan içermeyen, sırf pastörize şıradan oluşan negatif kontrol grubu (A); mikroorganizma aşılana, kitosan içermeyen pozitif kontrol grubu (B); denemelerde hazırlanan kitosan konsantrasyonları arasında minimum inhibisyon konsantrasyonu değerinin bir alt (C) ve bir üst (E) konsantrasyonlarında kitosan içeren ve mikroorganizma inokule edilen iki ayrı grup; ön denemelerde elde edilen sonuçlara göre minimum inhibisyon konsantrasyonunda kitosan ve mikroorganizma içeren grup (D); 40 mg/L SO<sub>2</sub> eklenmiş, minimum inhibisyon konsantrasyonu (G) ve bir alt konsantrasyonunda kitosan içeren (F), mikroorganizmalı iki ayrı grup ve sadece 40 mg/L SO<sub>2</sub> içeren mikroorganizmalı grup (H) olmak üzere 8 grup dizayn edilmiştir. Bu gruplar Şekil 3.3’te gösterilmektedir.



**Şekil 3.3.** Fermantasyon gruplarının şematik olarak gösterimi

Başlangıç pH değeri yaklaşık 3,2 olan steril berrak şıranın pH'sı, 2N NaOH ile 3,5'e ayarlanmıştır. Fermantasyon denemeleri 250'şer mL'lik fermantasyon şişelerinde ve 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon grupları ve tekerrürlü fermantasyon şişeleri Şekil 3.4'te şematize edilmiştir.



**Şekil 3.4.** Fermantasyon grupları ve tekerrürlerinin şematik olarak gösterimi

20 g/L'lik kitosan ana stok çözeltisi (kitosan suda çözünmemekle birlikte, organik asitlerde de belirli oranda ve uzun sürede çözünmektedir. Yapılan denemelerde % 1'lik asetik asit çözeltisi içerisinde çözümlenebilen en yüksek kitosan miktarı litrede 20 gram olarak belirlenmiştir. % 1'lik asetik asit çözeltisi ile hazırlanmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Düşük molekül ağırlığına sahip kitosanın yabancı mayalar (*H. uvarum* ve *Z. bailii*) ve alkol fermantasyonundan sorumlu olan *S. cerevisiae* suşu üzerine minimum inhibisyon değeri göz önüne alınarak, 20 g/L lik kitosan ana stok çözeltisinden pipetlenen 2,5 mL sıvının şıra ile 250 mL ye tamamlanması durumunda,

şırada 0,2 g/L kitosan; 5 mL sıvının şıra ile 250 mL ye tamamlanması durumunda şırada 0,4 g/L kitosan ve 7,5 mL sıvının şıra ile 250 mL ye tamamlanması durumunda ise 0,6 g/L kitosan konsantrasyonları elde edileceği için, otoklav sonrası kitosan ana stok çözeltisinden steril şartlarda fermantasyon şişelerine ilave edilecek miktarlardaki şıra, 250'şer mL şıra ile dolu olan fermantasyon şişelerinden çıkarılmıştır. Şişelerin fermantasyon başlıkları takılarak, fermantasyon başlıkları alüminyum folyo ile kapatılıp, 95°C'de 30 dk pastörize edilmiştir. Pastörizasyon sonrasında steril şartlarda uygun gruplara, uygun konsantrasyonlarda kitosan çözeltisi ve SO<sub>2</sub> (40 g/L) eklenmiştir.

*S. cerevisiae* ve karışık yabani maya kültüründen (*H. uvarum*, *Z. bailii*) alınan örnekler Thoma lamında sayılmış ve her iki gruptan da yaklaşık 10<sup>6</sup> kob/mL, fermantasyon şişelerine inokule edilmiştir. Steril koşullarda yapılan her işlemde sonra fermantasyon şişeleri hafifçe çalkalanarak homojen bir karışım sağlanmıştır. İnokulasyondan sonra fermantasyon başlıklarına yaklaşık 2-3 mL saf su konulmuştur. Bu sayede şişelere dışarıdan hava girişi engellenmiş, sadece fermantasyon sonucu oluşacak CO<sub>2</sub> gazının ortamdaki dışarı çıkışına olanak sağlanmıştır.

Şarap mayalarının optimum gelişme sıcaklığı 25-28 °C'dir. 30 °C'nin altındaki sıcaklıklarda fermantasyon hızı yavaşlamaktadır. Ancak çok düşük sıcaklıklarda (7-8 °C) dahi fermantasyon çok yavaş olarak devam etmektedir. 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise mayalar fermantasyon yeteneklerini kaybetmekte ya da inhibe olmaktadır (Özçelik ve Denli 1999). Alkol fermantasyonu, eksotermik reaksiyonlar zincirinden oluştuğu için, soğutma uygulanmaz ise ortamın sıcaklığı zamanla 5-10°C civarında artmaktadır. Bu sebeple optimum sıcaklığın korunmasına özen gösterilmelidir (Hutkins 2006). Fermantasyon sıcaklığı mayaların biyokimyasal reaksiyonlarını doğrudan etkilemekte ve düşük sıcaklıklarda *Saccharomyces* dışındaki mayalar etil alkole daha fazla direnç gösterebildiğinden, düşük sıcaklıklarda *Saccharomyces*'ten daha iyi gelişerek, ortama hakim olabildikleri belirtilmektedir (Torija ve ark. 2003)

Şarap fermantasyonunu gerçekleştirmek için, içlerinde üzüm şırası ve çeşitli konsantrasyonlarda kitosan ve SO<sub>2</sub> bulunan fermantasyon başlıklı 500 mL'lik 22 adet kahverengi fermantasyon şişesi, mayaların inokulasyonundan sonra 25 °C'de fermantasyona bırakılmıştır.

Aşılamanın yapıldığı gün 0. gün olarak belirlenerek, her grubun tüm tekerrürlerinden 10'ar mL örnek alınıp, kapaklı, steril plastik tüplerde -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Örnekler dondurulmadan önce YGC Agar (MERCK) ve % 0,01 oranında sikloheksimid (SIGMA) içeren YGC Agar (MERCK)'a ekim yapılmıştır. Sikloheksimid, % 0,01 konsantrasyonunda kullanıldığında, *Saccharomyces* cinsi mayaların gelişimini engellerken, yabancı mayaların gelişip, koloni oluşturabilmelerine olanak sağlamaktadır (Halkman ve Sağdaş 2011). Bu sayede sıfıncı gün ve sonraki her iki günde bir alınan örneklerde toplam maya ve yabancı maya sayımları yapılmış ve kalan örnekler kimyasal analizler için -20° C'de muhafaza edilmiştir.

Fermantasyon şişelerinin başlangıç ağırlıkları belirlenerek, sonraki her iki günde bir CO<sub>2</sub> üretimine bağlı olarak meydana gelen ağırlık azalması izlenmiş, fermantasyon bitişi ise ağırlık azalmasının durduğu gün olarak belirlenmiştir (Iranzo ve ark. 1998).

### **3.4. Kimyasal Analizler**

#### **3.4.1. Şıra analizleri**

Laboratuvar koşullarında elde edilen şıra 5000 rpm'de 10-15 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonunda elde edilen berrak şırada pH, titrasyon asitliği, indirgen şeker, briks ve öksele derecesi gibi şıra analizleri yapılmıştır.

**pH:** Şıranın pH değeri, potansiyometrik olarak, pH-metre (Mettler Toledo, S-20K, İsviçre) ile 20°C'de ölçülmüştür.

**Titrasyon asitliği:** Cliff ve ark. (2007) tarafından önerilen yönteme göre belirlenmiştir. Bu amaçla, 10 mL şıra alınarak 90 mL destile su ile seyreltildikten sonra, ayarlı 0.1 N NaOH çözeltisi ile ve pH metre yardımıyla, pH 8.1'e ulaşınca kadar titre edilmiştir. Şıranın titrasyon asitliği, tartarik asit cinsinden, "g/L" olarak hesaplanmıştır.

**Briks:** Şıranın briks derecesi ABBE refraktometresi kullanılarak saptanmıştır.

**Öksele derecesi:** Şıranın öksele derecesi öksele aerometresi kullanılarak belirlenmiştir.

**İndirgen şeker:** Şırada indirgen şeker tayini DNS (3,5-Dinitrosalisilik asit) kullanılarak, değiştirilmiş Miller yöntemine göre yapılmıştır (Forouchi ve Gunn 1983). Analizden önce örnekler, Carrez çözeltileri yardımıyla berraklaştırılmıştır.

Berraklaştırma işlemi amacıyla, santrifüj edilmiş şıranın berrak kısmından 1 mL alınarak 1.5 mL'lik eppendorf tüpüne aktarılmış ve üzerine sırasıyla 0.1 mL Carrez I ve 0.1 mL Carrez II ilave edilerek, her aşamada vorteks yardımıyla dikkatlice karıştırılmıştır. Ardından 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj (Heraeus Sepatech Biofuge 15) edilmiştir.

Gerekli oranda seyreltilmiş örnekten 1 mL alınıp, üzerine 2 mL DNS çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Kaynar su banyosunda 15 dk bekletildikten sonra, oluşan sarı-kahverengi rengin stabilizasyonu için üzerine 1 mL Rachelle tuzu ilave edilip tekrar karıştırılmıştır. Laboratuvar sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra üzerine 5 mL damıtık su ilave edilip tekrar karıştırılmış ve Shimadzu UV-1208 spektrofotometrede, 575 nm dalga boyunda tanığa karşı absorbans değerleri ölçülmüştür. Tanık, uygulanan tüm işlemlerde örnek yerine damıtık su kullanılarak hazırlanmıştır.

Hesaplama, 0.12-0,6 g/L glikoz içeren çözeltiler yardımıyla önceden çizilen standart eğri kullanılarak yapılmıştır. Analiz boyunca kullanılan Carrez I, Carrez II, DNS ve Rachelle tuzu çözeltilerinin hazırlanışı ve hesaplamada kullanılan glikoz standart eğrisinin grafiği EK 1 ve EK 2'de verilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) Belirlenmesi

Kitosanın, şarapta rastlanılan mikroorganizmalara karşı inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan ilk denemelerde, minimum inhibisyon konsantrasyonlarının yüksek olması beklenen iki mikroorganizma (*S. cerevisiae* ve *L. plantarum*) ile farklı konsantrasyonlarda (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 g/L) kitosan içeren besiyerlerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.1 ve 4.2 ile Şekil 4.1 ve 4.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** İlk denemede kitosanın *S. cerevisiae* suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)					
		Kitosan Konsantrasyonu (g/L)					
		0	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
<i>S. cerevisiae</i>	0	6,05	6,05	6,05	6,05	6,05	6,05
	6	7,91	7,28	4,78	-	-	-

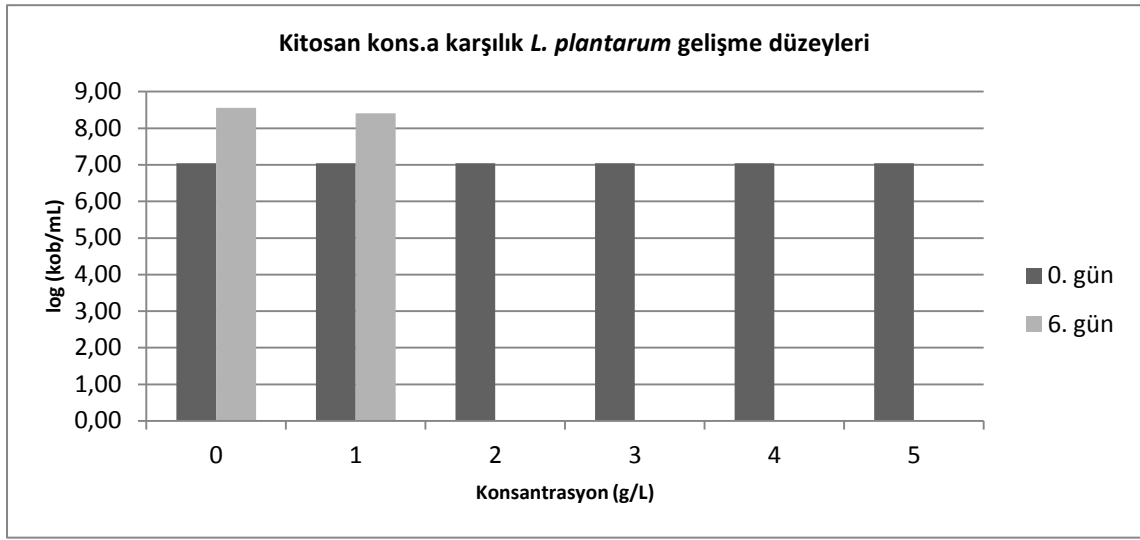


**Şekil 4.1.** İlk denemede kitosan konsantrasyonlarına karşı *S. cerevisiae*' nin gelişme düzeyleri



**Çizelge 4.2.** İlk denemede kitosanın *L. plantarum* suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)					
		Kitosan Konsantrasyonu (g/L)					
		0	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
<i>L. plantarum</i>	0	7,05	7,05	7,05	7,05	7,05	7,05
	6	8,56	8,41	-	-	-	-



**Şekil 4.2.** İlk denemede kitosan konsantrasyonlarına karşı *L. plantarum* 'un gelişme düzeyleri

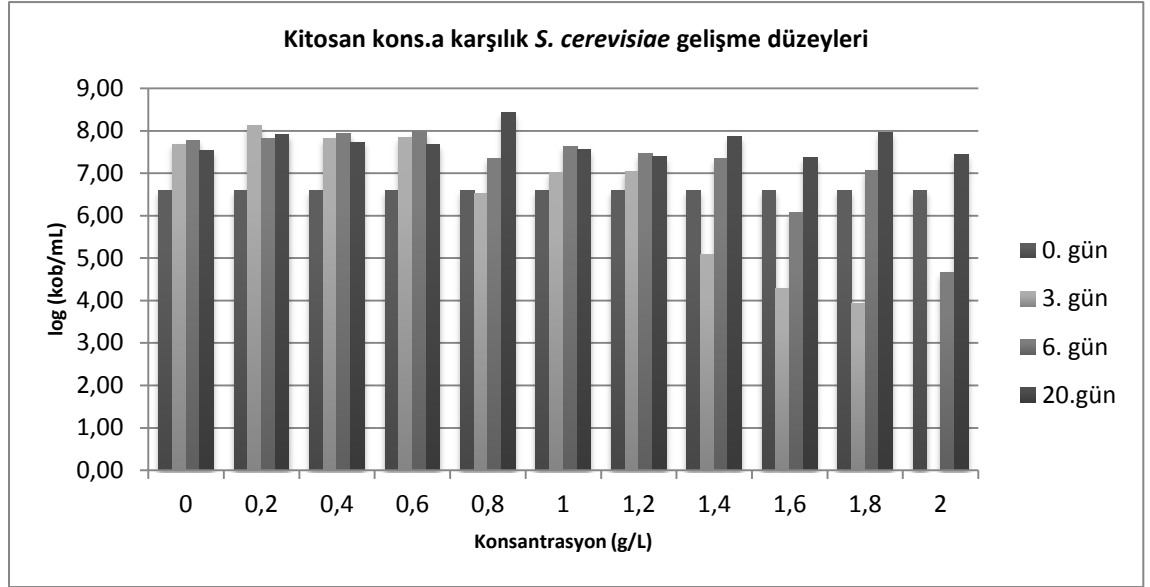
Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi, kitosanın *L. plantarum*’a karşı minimum inhibisyon konsantrasyonunun 2 g/L; *S. cerevisiae*’a karşı ise 3 g/L olduğu belirlenmiştir. Ancak; kitosanın *S. cerevisiae*’a karşı inhibisyonun 2 g/L de başladığı ve hücre konsantrasyonun belirgin biçimde (yaklaşık 1 log kadar) azaldığı gözlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda, Bölüm 3.2.3’te de belirtildiği gibi, kitosanın konsantrasyon aralığının daraltılarak, 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0 g/L konsantrasyonunda kitosan içeren besiyerlerinde denemelerin yapılmasına karar verilmiştir.

İkinci denemelerde, kitosanın *S. cerevisiae* ve *L. plantarum*'a karşı minimum inhibisyon konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0 g/L konsantrasyonlarda kitosan içeren ortamlarda 0, 3, 6 ve 20 günlük inkübasyon sürelerinde mikroorganizma sayımları yapılmış ve sayım sonuçları Çizelge 4.3 ve 4.4 ile Şekil 4.3 ve 4.4'te verilmiştir. *S. cerevisiae*'nın 2 g/L kitosana dahi dayanıklı olduğu ve 20 günlük inkübasyon süresi sonunda belirgin bir inhibisyon gözlenmediği belirlenmiştir. Kitosanın *S. cerevisiae* üzerinde etkin bir antimikrobiyel etkisinin bulunmaması, alkol fermantasyonundan sorumlu esas mikroorganizma olması sebebiyle, istenen bir özelliktir.

Rhoades ve Roller (2000), indirgenmiş ve doğal olmak üzere iki haldeki kitosanın gıdalarda bozulma yapan mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyel etkisini incelemişlerdir. Bozulmuş meyve suyundan izole edilen *S. cerevisiae* 3085'in 0,2 ve 0,3 g/L az indirgenmiş haldeki kitosan konsantrasyonuna, gazlı içeceklerden izole edilen *Z. bailii* 906'ya oranla daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Denemelerde elde edilen tüm kitosan hidrolizatlarının (büyük miktarda degradasyona maruz bırakılmış kitosan hariç) 0,3 g/L konsantrasyonları, *Z. bailii* 906 ve *S. cerevisiae* 3085'i inhibe ettiği saptanmıştır.

**Çizelge 4.3.** İkinci denemelerde kitosanın *S. cerevisiae* suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)										
		Kitosan Konsantrasyonu (g/L)										
		0	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00
<i>S. cerevisiae</i>	0	6,59	6,59	6,59	6,59	6,59	6,59	6,59	6,59	6,59	6,59	6,59
	3	7,68	8,12	7,81	7,83	6,53	7,03	7,04	5,09	4,28	3,92	-
	6	7,78	7,82	7,93	7,97	7,35	7,64	7,46	7,34	6,07	7,06	4,65
	20	7,53	7,91	7,73	7,67	8,43	7,55	7,39	7,86	7,36	7,96	7,45

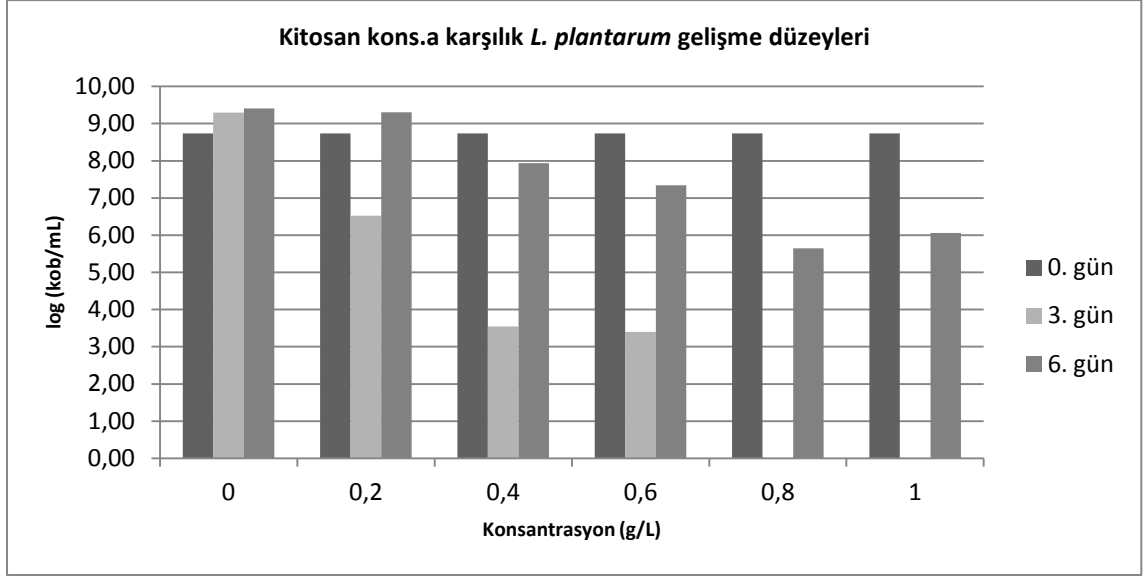


**Şekil 4.3.** İkinci denemede kitosan konsantrasyonlarına karşı *S. cerevisiae* 'nın gelişme düzeyleri

0-5 g/L aralığında kitosan içeren ortamlarda gerçekleştirilen ilk denemelerde, 2 g/L konsantrasyondaki kitosanın *L. plantarum*'un inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir. İkinci denemelerde ise, *L. plantarum*'un 1 g/L kitosan düzeyine kadar dayanıklı olduğu görülmektedir. Bu durumda, kitosanın *L.plantarum*'a karşı minimum inhibisyon oranının 1-2 g/L aralığında bir değer olduğu söylenebilir.

**Çizelge 4.4.** İkinci denemelerde kitosanın *L. plantarum* suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)					
		Kitosan Konsantrasyonu (g/L)					
		0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
<i>L. plantarum</i>	0	8,74	8,74	8,74	8,74	8,74	8,74
	3	9,30	6,52	3,54	3,40	-	-
	6	9,41	9,31	7,94	7,34	5,64	6,06



**Şekil 4.4.** İkinci denemede kitosan konsantrasyonlarına karşı *L. plantarum*'un gelişme düzeyleri

İkinci denemelerde Çizelge 4.3 ve 4.4 ile Şekil 4.3 ve 4.4'te görüldüğü gibi kitosan konsantrasyonu yükseldikçe *S. cerevisia* ve *L. plantarum* gelişme düzeylerinde ani azalış ve sonra yeniden ani artışlar gözlenmektedir. *S. cerevisiae* için 1,40 g/L kitosan konsantrasyonundan itibaren 3. gün 1,5 log kadar azalış olurken, 6. gün mikroorganizma sayısında yaklaşık 2 log kadar artış olduğu gözlenmektedir. *L. plantarum* için de 0,80 ve 1,00 g/L kitosan konsantrasyonlarında 3. gün 8-9 log kadar ani azalış görülürken, 6. günde 5-6 log kadar ani artış gözlenmektedir. Bu durumun, Rhoades ve Roller (2000) tarafından da bildirildiği gibi; mikrobiyel aktivite göstermesi beklenen kitosanın, uygulandığı ilk anda mikroorganizma hücrelerini hızlıca (yaklaşık 2 dk civarı) öldürdüğü ya da canlı kültürde gelişmeyi durduğu düşünülmektedir. Canlı kalan hücrelerin ise daha dirençli alt gruplara ait olduğu (karışık kültürler için) ve/veya kitosanın diğer bileşen ve hücrelere bağlanarak çözültiden ayrıldığı, doğal bir bileşik olması sebebiyle de mikroorganizmaların, sentetik koruyuculara oranla, kitosana daha kolay adapte olduğu ve dolayısıyla başlangıçta belirli bir seviyede inhibisyon sağlanırken, ilerleyen günlerde adaptasyon sebebiyle mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyonun kaybolduğu düşünülmektedir.

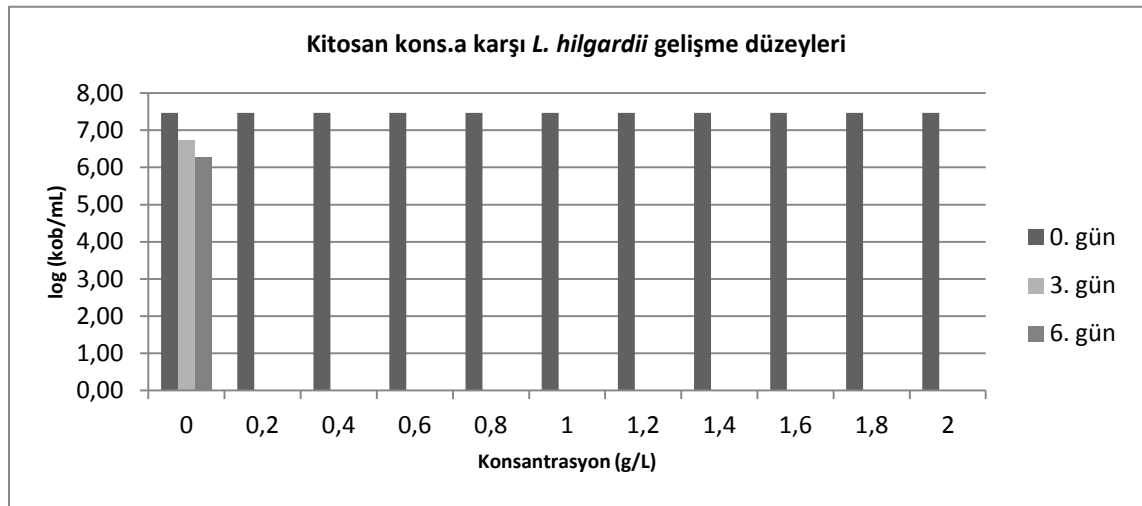
Rhoades ve Roller (2000), tarafından yapılan çalışmada; bazı katı ve sıvı gıdaların muamele edildiği 0,3 g/L konsantrasyonundaki doğal (düşük molekül ağırlığında,

yüksek asetilasyon derecesine sahip) ve indirgenmiş kitosanın bozulmaya sebep olan mikroorganizmaların başlangıç sayılarını 3-4 log kob/mL kadar azaltarak, mikrobiyel yükü önemsiz sayılabilecek limitlere düşürdüğü saptanmıştır. 7 °C’de 4 gün inkübasyon sonunda toplam mikroorganizma ve laktik asit bakterileri sayısında, kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2 log kob/mL düşüş gözlenirken, 8 günlük inkübasyon sonunda ise laktik asit bakterileri ve toplam mikroorganizma sayısında, kontrol grubu ile kitosan katkılı gruplar arasında bir fark olmadığı (her iki grupta da popülasyonun 7 kob/mL’ ye ulaştığı) saptanmıştır. Bu durumun tersine, hem doğal hem de indirgenmiş kitosan katkılı meyve suyu gruplarının 2 haftalık inkübasyonu sonucunda mayaların gelişmesinin tamamen baskılandığı gözlenmiştir (Rhoades ve Roller 2000).

Çizelge 4.1 ve 4.2 ile Şekil 4.1 ve 4.2’de görüldüğü gibi, ilk denemelerde *S. cerevisiae* ve *L. plantarum* için kitosanın minimum inhibisyon konsantrasyonu, sırasıyla, 3 ve 2 g/L olarak belirlenmiştir. İkinci denemelerde ise bu durum dikkate alınarak, diğer mikroorganizmalar için de yaklaşık 0-2 g/L kitosan konsantrasyon aralığında inhibisyonun gerçekleşeceği tahmin edilmiştir. Bu sebeple ikinci denemelerde daha dar aralıklı kitosan konsantrasyonlarında ve uzun süreli inkübasyon sonucunda daha gerçekçi sonuçlara ulaşılabileceği düşünülmüş ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki çizelge ve şekillerde özetlenmiştir. Kitosanın LAB üzerine antimikrobiyel etkisi Rhoades ve Roller (2000) tarafından da gözlemlenmiştir. Humus (pH: 4,2; 7°C’ de inkübasyon) ile yaptıkları çalışmalarda; 0,3 ile 1 g/kg arasında değişen konsantrasyonlardaki kitosanın, doğal mikroflora üzerine herhangi bir antimikrobiyel etkisinin olmadığı, ancak 5 g/kg kitosan konsantrasyonunun, özellikle laktik asit bakterileri olmak üzere, toplam mikroorganizma sayısını azalttığı gözlenmiştir. 6 gün inkübasyon sonunda, kitosan içeren gruplarda, laktik asit bakterileri ve toplam bakteri miktarında yaklaşık 4 log kob/mL azalma saptanmıştır (Rhoades ve Roller 2000). Kitosanın, bir diğer laktik asit bakterisi *L. hilgardii* suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5’ de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.5.** İkinci denemelerde kitosanın *L. hilgardii* suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)										
		Kitosan Konsantrasyonu (g/L)										
		0	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00
<i>L. hilgardii</i>	0	7,47	7,47	7,47	7,47	7,47	7,47	7,47	7,47	7,47	7,47	7,47
	3	6,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	6,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

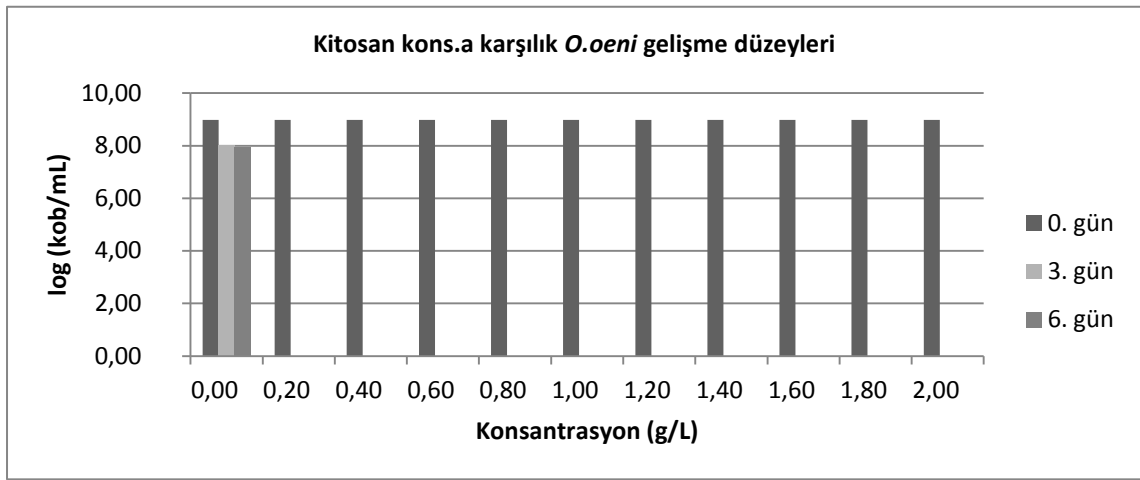


**Şekil 4.5.** İkinci denemede kitosan konsantrasyonlarına karşı *L. hilgardii* 'nin gelişme düzeyleri

Kitosanın, bir diğer laktik asit bakterisi *O.oeni* suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6'da gösterilmektedir.

**Çizelge 4.6.** İkinci denemelerde kitosanın *O. oeni* suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)											
		Kitosan Konsantrasyonu (g/L)											
		0	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	
<i>O. oeni</i>	0	8,98	8,98	8,98	8,98	8,98	8,98	8,98	8,98	8,98	8,98	8,98	8,98
	3	8,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	7,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



**Şekil 4.6.** İkinci denemelerde kitosan konsantrasyonlarına karşı *O.oeni* 'nin gelişme düzeyleri

Kitosanın mayalar üzerine antimikrobiyel etkisinin olduğu araştırmacılar tarafından yapılan daha önceki çalışmalarda da belirlenmiştir. Örneğin; şaraplarda depolama sırasında bozulmalara sebep olan yabancı mayalar *B. bruxellencis*, *B. intermedius* ve alkol fermantasyonunu tamamlayan *S. cerevisiae* üzerine kitosanın antimikrobiyel etkisini inceleyen Gómez-Rivas ve ark. (2004), 5-6 g/L ve daha yüksek konsantrasyonlarda kitosan uygulandığında, *S. cerevisia* suşunun lag fazının 15 saat kadar uzadığını, ancak inhibisyonun daha yüksek konsantrasyonlarda gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Kitosanın *B. bruxellencis* suşu üzerine inhibisyon etkisi 1 g/L konsantrasyonunda başlarken, *B. intermedius* suşunun lag fazının 30 saate kadar gecikmesi için 0,5 g/L kitosan konsantrasyonunun yeterli olduğu belirlenmiştir. 6 g/L

kitosan konsantrasyonu *S. cerevisiae* suşunun ne gelişme hızını, ne de ulaşabildiği maksimum sayıyı etkilediği bildirilmiştir; ancak, kontrol grubu ile kıyaslandığında, maksimum sayıya ulaşma süresinin daha uzun olduğu saptanmıştır.

Kitosanın şarapta bozulmalara sebep olan bazı yabancı mayalar üzerine inhibisyon etkileri incelenmiş ve *H. uvarum* için minimum inhibisyon konsantrasyonuna ait değerler Çizelge 4.7 ile Şekil 4.7’de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.7.** İkinci denemelerde kitosanın *H. uvarum* suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)											
		Kitosan Konsantrasyonu (g/L)											
		0	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	
<i>H. uvarum</i>	0	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40
	3	8,07	7,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	7,86	7,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



**Şekil 4.7.** İkinci denemede kitosan konsantrasyonlarına karşı *H. uvarum* 'un gelişme düzeyleri



*Z. bailii* için minimum inhibisyon konsantrasyonuna ait değerler Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8'de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.8.** İkinci denemelerde kitosanın *Z. bailii* suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)										
		Kitosan Konsantrasyonu (g/L)										
		0,00	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00
<i>Z. bailii</i>	0	7,23	7,23	7,23	7,23	7,23	7,23	7,23	7,23	7,23	7,23	7,23
	3	7,94	7,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	7,60	6,68	-	-	-	-	-	-	-	-	-

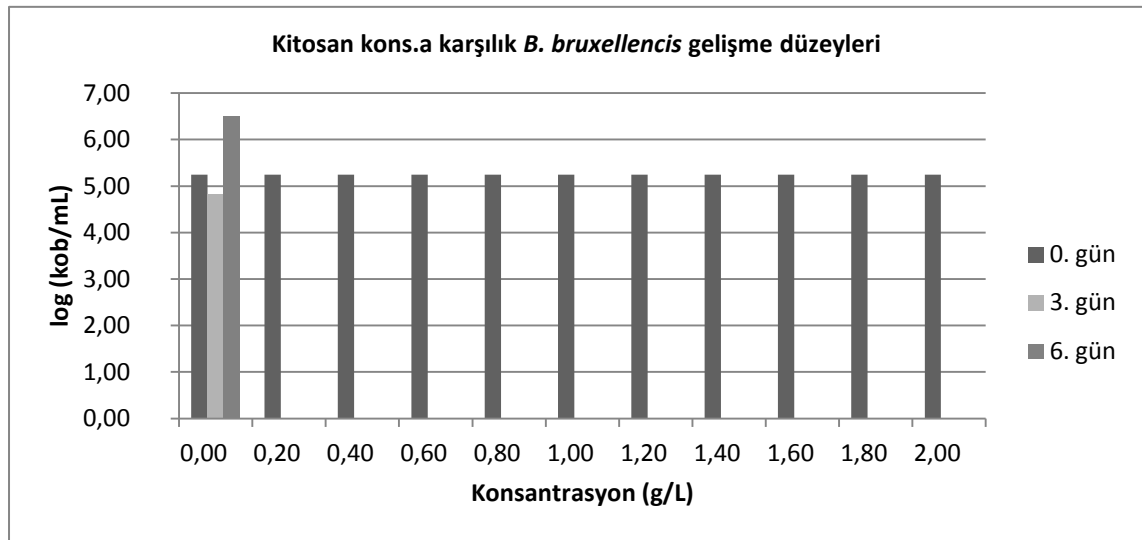


**Şekil 4.8.** İkinci denemede kitosan konsantrasyonlarına karşı *Z. bailii* 'nin gelişme düzeyleri

*B. bruxellensis* için minimum inhibisyon konsantrasyonuna ait Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9 aşağıda gösterilmektedir.

**Çizelge 4.9.** İkinci denemelerde kitosanın *B. bruxellensis* suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)										
		Kitosan Konsantrasyonu (g/L)										
		0,00	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00
<i>B. bruxellensis</i>	0	5,24	5,24	5,24	5,24	5,24	5,24	5,24	5,24	5,24	5,24	5,24
	3	4,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	6,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



**Şekil 4.9.** İkinci denemelerde kitosan konsantrasyonlarına karşı *B. bruxellencis*'in gelişme düzeyleri

Tüm denemelerin sonuçları göz önüne alınarak, denemelerde kullanılan mikroorganizmaların minimum inhibisyon değerleri Çizelge 4.10'da gösterilmektedir.

**Çizelge 4.10.** Kitosanın, şarapta rastlanılan bazı mikroorganizmalara karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları

<b>Mikroorganizma türü</b>	<b>Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (g/L)</b>
<i>S. cerevisiae</i>	3
<i>L. plantarum</i>	> 1, < 2
<i>H. uvarum</i>	0.4
<i>L. hilgardii</i>	0.2
<i>Z. bailii</i>	0.4
<i>O. oeni</i>	0.2
<i>B. bruxellensis</i>	0.2

#### **4.2. Mikroorganizma Gelişmelerinin İzlenmesi**

*O. oeni* ve *B. bruxellensis* suşlarının geliştirilebilmesi için yapılan denemelerde sonuç olarak; hem alkol içeren, hem de içermeyen besiyerlerinden Nutrient Broth'da gelişme gözlenmezken, düşük pH'ya sahip M 17 Broth besiyerinde *O. oeni* gelişimi ve Tryptic Soy Broth besiyerinde ise her iki mikroorganizmanın da gelişebildiği gözlenmiştir. Ancak, gelişme hızı düşüktür. Bununla birlikte, inkübasyon sıcaklığının mayanın gelişme hızına etkisi gözlemlenmemiştir.

Denenen bu besiyerlerinin dışında Skim Milk sıvı (Fluka) ve Skim Milk katı besiyerleri (Fluka) de hazırlanarak (sıvı besiyerinde pH: 4,8) maya ve bakteri inokule edilmiştir. Renginin beyaz olup, petriye dökülen agarın berrak olmaması sebebiyle 28°C'de 2 gün inkübasyon sonrasında Skim Milk besiyerinde gelişme olup olmadığı çıplak gözle fark edilememiştir. Bu sebeple de, bakteri ve maya inokule edilmiş Skim Milk sıvı besiyerlerinden % 1 oranında sıvı pipetlenerek, *B. bruxellensis* suşu YGC Agar'a, *O. oeni* suşu ise MRS Agar'a yayma plak yöntemi ile ekilmiş ve 28°C'de 2 gün inkübasyon sonrasında, yeteri kadar olmamakla birlikte, gelişme gözlenmiştir.

*B. bruxellensis* suşunun gelişiminin gözlenebilmesi için YGC Agar dışında Trytic Soy Agar (MERCK), Nutrient Agar (MERCK), Skim Milk Agar (OXOID) ve PDA (OXOID) katı besiyerlerine yayma plak yöntemi ile ekilmesi sonucunda en iyi gelişimin PDA besiyerinde olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak, *B. bruxellensis* suşunun Tyriptic Soy Broth besiyerinde çoğaltılıp, PDA'da sayılması; *O. oeni* suşusun ise MRS Broth, M 17 Broth ve Tyriptic Soy Broth besiyerlerinde aynı seviyede geliştiği anlaşılıp, çoğaltma işleminin MRS Broth'da, sayımın ise yine MRS Agar'da yapılması uygun bulunmuştur. Sentetik besiyerlerinde yapılan denemeler sonucunda kitosanın tüm mikroorganizmalar için minimum inhibisyon konsantrasyonları ortaya konulmuştur.

### **4.3. Kitosanın Alkol Fermantasyonu Üzerine Etkisi**

Şarap fermantasyonu üzüm yüzeyinde bulunan doğal mikroflorayla ya da seçilmiş mayalarla gerçekleşmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces bayanus* türleri şarap fermantasyonunu gerçekleştirebilen en yaygın iki maya türüdür (Bisson 2004). *S. cerevisiae* üzüm şirasının yüksek şeker ve düşük azot içeriğine rağmen, sırada gelişebilmektedir. Bu sebeple alkol fermantasyonundan sorumlu temel maya türü olarak kabul edilmektedir (Cocolin ve ark. 2004)

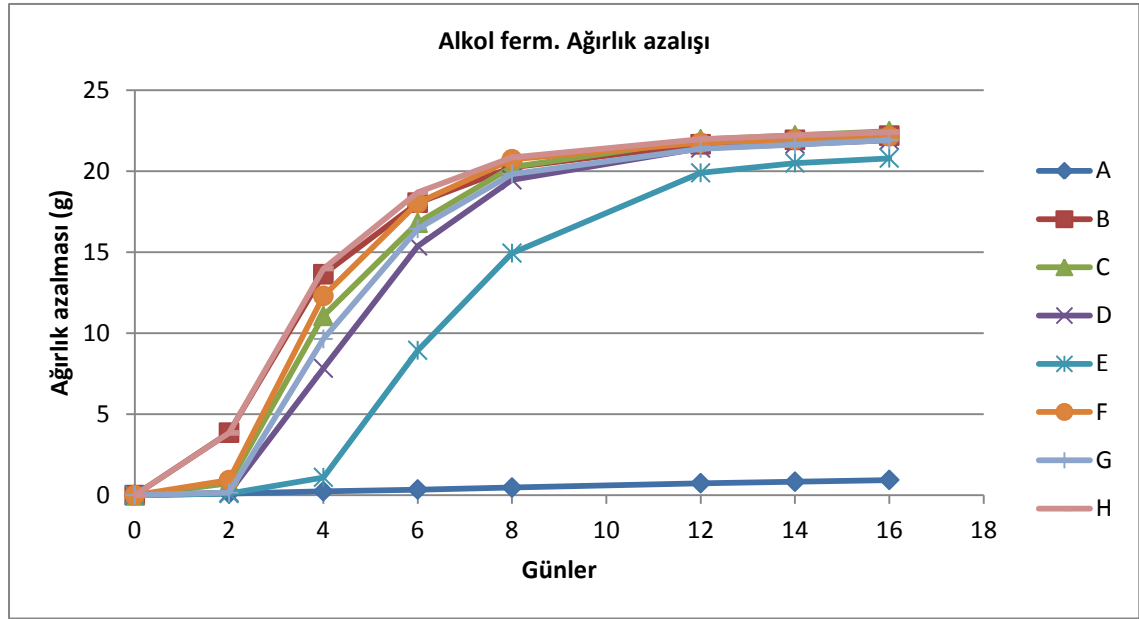
#### **4.3.1. Fermantasyon hızı**

Şarap mayası seçiminde kullanılan en önemli kriterlerden biri fermantasyon hızıdır (Reed ve Nagodawithana 1988). Şarap mayalarının üzüm şirasında yabancı mayalara oranla oldukça az miktarda olmalarına rağmen arzulanmayan yabancı mayaların gelişmesine izin vermeden hızla fermantasyona başlayarak, ortama hakim olmaları ve fermantasyonu belirli bir zaman içinde tamamlamaları beklenmektedir. Ayrıca iyi bir şarap mayası fermente olabilen şekerlerin tümünü fermente edebilme yeteneğine de sahip olmalıdır (Özçelik ve Denli 1999, Esteve-Zarzoso ve ark. 2000).

Fermantasyon hızı, şekerin zamana bağlı olarak azalması ile belirlenebilmektedir (Özçelik ve Denli 1999, Esteve-Zarzoso ve ark. 2000). Ayrıca, daha kısa zamanda fermantasyon hızının belirlenebilmesi için, fermantasyon süresince oluşan etil alkol ve

karbondioksitin yarattığı ağırlık azalışı hesaplanarak da bulunabilmektedir (Reed ve Nagodawithana 1988).

Denemelerde kullanılan 8 ayrı fermantasyon grubunda, 3 tekerrürlü olarak *S. cerevisiae* suşu tarafından tamamlanan alkol fermantasyonunun CO<sub>2</sub> üretimine bağlı ağırlık azalışı 16 gün boyunca iki günde bir yapılan tartımlarda izlenmiş ve her fermantasyon grubu için saptanan ağırlık azalışının zamanla değişimi Şekil 4.10'da gösterilmiş olup, bu grafiğe ait veriler EK 3'te verilmiştir.



**A:** Negatif kontrol, **B:** Pozitif kontrol, **C:** 0,2 g/L kitosan + (*S. cerevisiae* Narince 3, *H. uvarum* JFO 1755, *Z. bailii* JFO 0488), **D:** 0,4 g/L kitosan + (*S. cerevisiae* Narince 3, *H. uvarum* JFO 1755, *Z. bailii* JFO 0488), **E:** 0,6 g/L kitosan + (*S. cerevisiae* Narince 3, *H. uvarum* JFO 1755, *Z. bailii* JFO 0488), **F:** 0,2 g/L kitosan + 40 mg/L SO<sub>2</sub> + (*S. cerevisiae* Narince 3, *H. uvarum* JFO 1755, *Z. bailii* JFO 0488), **G:** 0,4 g/L kitosan + 40 mg/L SO<sub>2</sub> + (*S. cerevisiae* Narince 3, *H. uvarum* JFO 1755, *Z. bailii* JFO 0488), **H:** 40 mg/L SO<sub>2</sub> + (*S. cerevisiae* Narince 3, *H. uvarum* JFO 1755, *Z. bailii* JFO 0488)

**Şekil 4.10.** Fermantasyon süresince 8 ayrı fermantasyon grubunda meydana gelen ağırlık azalışı

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi, fermantasyon süresince ağırlık azalması A grubu hariç diğer tüm gruplarda toplamda yaklaşık 21-22 g olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak belirlen A grubu, sadece fermantasyon süresince sterilitenin korunup korunmadığının kontrolü amacıyla planlanmıştır. Ağırlık azalışının bu grupta gözlenmeme sebebi ise herhangi bir maya suşunun şıraya bulaşmaması ve sterilitenin korunması ile fermantasyonun gerçekleşmemesinden ileri gelmektedir.

B grubu ile H grubunun grafiklerinin aynı seyretmesi sebebiyle aynı oranda ağırlık azalması olduğu anlaşılmaktadır. B grubu, pozitif kontrol grubu olarak, kitosan ve SO<sub>2</sub> içermeyen, sadece steril üzüm şırası ve mayaları (*S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *Z. bailii*) içeren gruptur. Bu grubun fermantasyon denemelerine dahil edilme amacı, mayaların steril üzüm şırası ortamında normal gelişme seyrinin gözlemlenerek, diğer gruplarla karşılaştırmaların yapılabilmesidir. H grubunda ise steril üzüm şırasına inokule edilen *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *Z. bailii* suşları ile 40 mg/L SO<sub>2</sub> bulunmakta olup, kitosan içermemektedir. Bu iki grup fermantasyonda benzer ağırlık azalışı göstermiş olup, aynı hızda fermantasyon yapmışlardır. Bu durumda, 40 mg/L SO<sub>2</sub>'nin fermantasyondan sorumlu mayalar üzerine herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığı ve fermantasyonun beklenen şekilde, B grubundaki ile yaklaşık aynı oranlarda ve normal seyrinde devam ettiği anlaşılmaktadır. SO<sub>2</sub>'nin fermantasyondan sorumlu mayalar üzerine inhibisyon etkisinin bulunmaması, SO<sub>2</sub>'nin mayadan ziyade bakteriler üzerine antimikrobiyel etkisinin olması ile bağdaştırılabilir (Anonim 2012b ).

C grubunda ise başlangıçta ağırlık azalışı pozitif kontrol grubuna (B) oranla oldukça yavaş seyretmiş; ancak, fermantasyonu tamamlayabilmiştir. Bunun sebebinin ise yabancı mayalar (*H. uvarum* ve *Z. bailii*) için kitosanın minimum inhibisyon konsantrasyonunun bir alt değeri olan 0,2 g/L kitosan konsantrasyonuna sahip C grubunda, fermantasyonun başlamasından sorumlu bu mayaların, inhibe olmasalar bile, daha yavaş fermantasyon yaptığı düşünülmektedir.

D grubu göz önüne alındığında, *H. uvarum* ve *Z. bailii* için minimum inhibisyon değeri olan 0,4 g/L kitosan konsantrasyonuna sahip şırada C grubuna benzer şekilde, ancak C grubundan da yavaş seyreden bir fermantasyon grafiği görülmektedir. Aynı şekilde E grubuna bakılacak olursa da, *H. uvarum* ve *Z. bailii* için minimum inhibisyon değerinin bir üst değeri olan 0,6 g/L kitosan konsantrasyonuna sahip şırada C ve D grubuna benzer şekilde, ancak her iki gruptan da daha yavaş seyreden bir fermantasyon gidişi görülmektedir. Bu sonuçlara göre; artan kitosan konsantrasyonu, şarap fermantasyonunu başlatan mayalar üzerindeki inhibisyon etkisi nedeniyle, başlangıçta alkol fermantasyonu hızını azaltmakta; ancak fermantasyonun tamamlanmasını engellememektedir.

F grubu fermantasyon şişeleri 0,2 g/L kitosan konsantrasyonuna sahip steril üzüm şirasına aseptik koşullarda eklenen 40 mg/L SO<sub>2</sub> ile maya suşlarını (*S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *Z. bailii*) içermektedir. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi F grubundaki ağırlık azalışı dikkate alındığında, C grubuna yakın bir fermantasyon hızı göstermektedir. Bu durumda, daha önce de bahsedildiği gibi, 40 mg/L SO<sub>2</sub>'nin fermantasyondan sorumlu mayalar üzerine herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığı ve F grubunun fermantasyondaki ağırlık azalışının, ortamda belirli bir konsantrasyonda bulunan kitosanın mayaların fermantasyon hızını yavaşlatması sebebiyle, C grubundaki ile karşılaştırıldığında, yaklaşık aynı oranlarda ve normal seyirinde devam ettiği anlaşılmaktadır. Aynı şekilde, G grubunun fermantasyon hız eğrisi C grubu ile D grubunun eğrileri arasında kalmıştır. G grubu fermantasyon şişelerindeki şıranın, D grubundaki ile aynı kitosan konsantrasyonuna sahip olması ve ayrıca 40 mg/L SO<sub>2</sub> içermesine rağmen, Şekil 4.10'da görüldüğü gibi, D grubundakinden çok az daha yüksek bir fermantasyon hızına ulaştığı saptanmıştır. Bu düzeyde 40mg/L kullanılan SO<sub>2</sub>'nin *S. cerevisiae* suşuna karşı herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığı diğer gruplarda da gözlenmiştir.

Negatif kontrol grubu (A) hariç diğer gruplarda fermantasyon sonunda toplam ağırlık azalışının birbirine çok yakın olması, değişik konsantrasyonlarda kitosan ilavesinin fermantasyonun başlama hızını yavaşlattığı, ancak tamamlanmasını engellemediği şeklinde yorumlanmıştır.

#### **4.4. Fermantasyon Süresince Yabani ve Toplam Maya Sayısındaki Değişimler**

Fermantasyon başlangıcında fermantasyon şişelerine aşılana toplam maya (*S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *Z. bailii*) popülasyonu 5 x 10<sup>6</sup> kob/mL iken, toplam yabancı maya (*H. uvarum*, *Z. bailii*) popülasyonu ise 2 x 10<sup>6</sup> kob/mL düzeyindedir.

Mayaların, farklı suşları ya da farklı cinse ait türlerinin, katı besiyerindeki görünüşleri genelde aynıdır. Bu sebeple, karışık maya kültürlerinden katı besiyerine ekim yapıldığında ayrı kültürlerin petride belirlenmesi oldukça zordur. Fermantasyon şişelerine aşılana üç ayrı maya suşunun fermantasyon sürecinde miktarlarında meydana gelen değişimin saptanabilmesi için yabancı mayalar (*H. uvarum*, *Z. bailii* suşları) sikloheksimidli YGC agarda; *S. cerevisiae* suşunu da içeren toplam maya

sayımı ise YGC agarda yapılmıştır. Bu sayede hem *S. cerevisiae*'nin gelişim düzeyi, hem de kitosanın yabancı mayalar üzerine etkisi kolaylıkla gözlenebilmiştir.

Maya sayımlarında kullanılan YGC agar, kloramfenikol içerdiği için, bakteri gelişimine izin vermemektedir. Bu sayede, bakteri ve mayanın bir arada bulunduğu karışık kültürdeki toplam maya sayımlarında da YGC agar kullanılabilir. Kloramfenikol geniş spektrumlu bir antibiyotik olup, aerobik ve anaerobik mikroorganizmalara karşı aktivite göstermektedir (Kara ve Kolaylı 2010). Ancak, mayaların birbirinden ayrılması gerektiği koşullarda YGC agar yeterli olmamaktadır.

Bir besiyeri, normal bileşimine göre ve antimikotik, antiseptik bir bileşik eklenerek iki ayrı şekilde hazırlandığında, katkı konularak hazırlanan besiyeri, selektif özellik kazanmaktadır. Sikloheksimid, ökaryotik hücrelerde protein sentezini inhibe eden bir kimyasal bileşiktir. Ancak *Hanseniaspora uvarum* ve *Zygosaccharomyces bailii*'de dahil olmak üzere 45 maya suşunun sikloheksimide karşı direnç gösterdiği bilinmektedir. *Saccharomyces cerevisiae*'nin da 14 ayrı suşu sikloheksimide direnç gösterse bile, genelde birçok suşu dayanıksızdır (Di Maio ve ark. 2010). Bu sebeple sikloheksimidli YGC agarda ekim ve sayım yapılması, fermantasyon şişelerine inokule edilen *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *Z. bailii* suşları arasından sadece yabancı mayaların (*H. uvarum*, *Z. bailii*) gelişiminin izlenmesine olanak sağlamıştır.

#### **4.4.1. Fermantasyon süresince yabancı maya (*H. uvarum*, *Z. bailii*) popülasyonundaki değişimler**

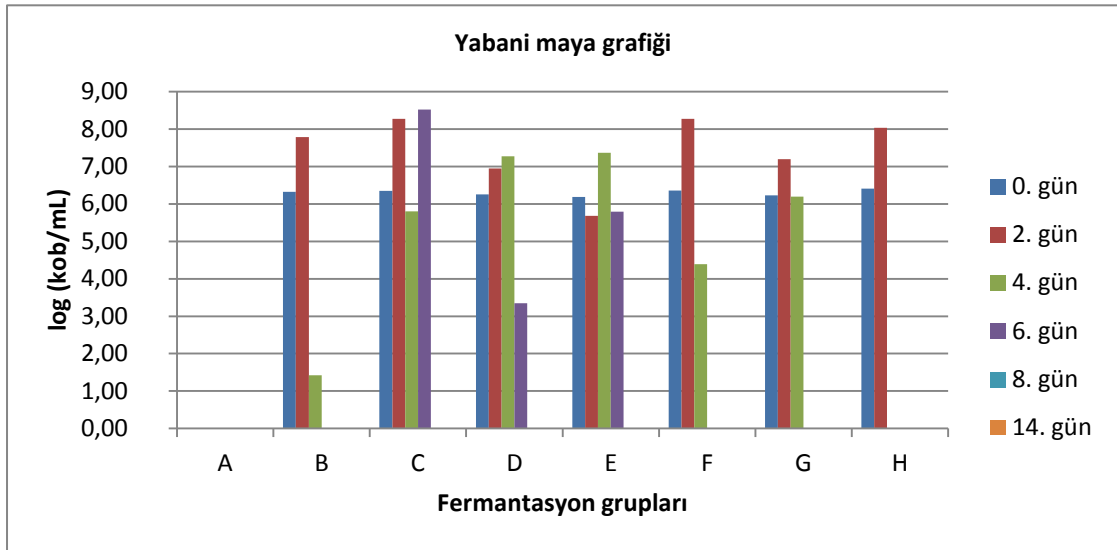
Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11'de görüldüğü gibi, 14 günlük fermantasyon süresinde SO<sub>2</sub>, yabancı mayaların inhibisyonunda, kitosana kıyasla daha etkili olmuştur. Sırasıyla, C, D ve E gruplarında bulunan 0,2; 0,4 ve 0,6 g/L kitosan konsantrasyonları ancak 8. gün tam olarak etkinliğini gösterirken, sırasıyla F ve G gruplarında iki antimikrobiyel ajan olarak birlikte bulunan kitosan (0,2 ve 0,4 g/L) ve SO<sub>2</sub>'nin (40'ar mg/L) inhibisyon etkisi 6. günden itibaren gözlenmektedir. Sadece 40 mg/L SO<sub>2</sub> içeren H grubunda ise 4. günden itibaren gözlenen inhibisyon neticesinde fermantasyon grupları arasında en hızlı inhibisyon etkisine sahip grubun H grubu fermantasyon şişeleri olduğu saptanmıştır. Pozitif kontrol grubu olan B grubunda ise 25°C'de üzüm şirasında inkübasyona



bırakılan yabancı mayaların (*H. uvarum*, *Z. bailii*) normal gelişimleri ve sonrasında alkolün etkisi ile inhibisyonları grafikte görülmektedir.

**Çizelge 4.11.** Fermantasyon gruplarındaki yabancı maya sayımı sonuçlarının log(kob/mL) cinsinden gösterimi

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)							
		Fermantasyon Grupları							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Toplam Yabancı Maya ( <i>H. uvarum</i> , <i>Z. bailii</i> )	0	-	6,32	6,35	6,26	6,19	6,36	6,23	6,41
	2	-	7,78	8,28	6,95	5,68	8,27	7,20	8,03
	4	-	1,42	5,80	7,28	7,37	4,39	6,19	-
	6	-	-	8,52	3,35	5,79	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-



**Şekil 4.11.** Fermantasyon süresince yabancı mayaların (*H. uvarum*, *Z. bailii*) inhibisyon düzeyleri

C grubu fermantasyon şişelerinde bulunan düşük konsantrasyondaki kitosanın (0,2 g/L) maya gelişimini başlangıçta inhibe edemediği, ancak gelişimi yavaşlattığı söylenebilir. 2. günde maya gelişimini az da olsa desteklediği, ancak 4. günden itibaren hem inhibisyonun, hem de olağan gelişim ve ölüm fazları gereği ortamdaki sayılarının düşmeye başladığı söylenebilir. 6. gündeki yabancı maya sayısındaki artış ise kitosanın gelişimi yavaşlattığı ama tamamen durdurmadığı fikrini desteklemektedir. 0,2 g/L kitosan konsantrasyonu inhibisyon için yeterli olmayıp, B grubundan farklı olarak

yabani mayaların logaritmik faz, durağan faz ve ölüm fazına ait sürelerin normal gelişme eğrisine kıyasla daha uzun olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bu sebeple de gelişim normal seyrinden daha yavaş seyretmekte ve mikroorganizma gelişim fazlarının süreleri uzadığı için, tam inhibisyonun ortaya çıkma zamanı gecikmektedir. D ve E gruplarında da benzer durumlar söz konusu olup, kitosan konsantrasyonu arttıkça gelişim hızı azalmaktadır. F ve G gruplarında ise ortamda bulunan kitosanın konsantrasyonu arttıkça (F grubunda 0,2 g/L, G grubunda 0,4 g/L) yabani maya gelişim hızlarının düştüğü; ancak, SO<sub>2</sub> (her iki grupta da 40'ar mg/L) varlığı sebebiyle de sadece kitosan bulunan gruplardan farklı olarak, daha hızlı bir inhibisyon olduğu söylenebilir. Sadece SO<sub>2</sub> içeren H grubunda ise hızlı bir inhibisyon gözlenmektedir. Bu durumun, kitosan gibi gelişme hızını yavaşlatıcı bir etken maddenin ortamda bulunmaması sebebiyle, mikroorganizma gelişim fazlarının normal sürelerinde gerçekleştiği ve ortamdaki SO<sub>2</sub>'nin de 2. günden sonra direkt olarak yabani maya inhibisyonunu sağladığı söylenebilir.

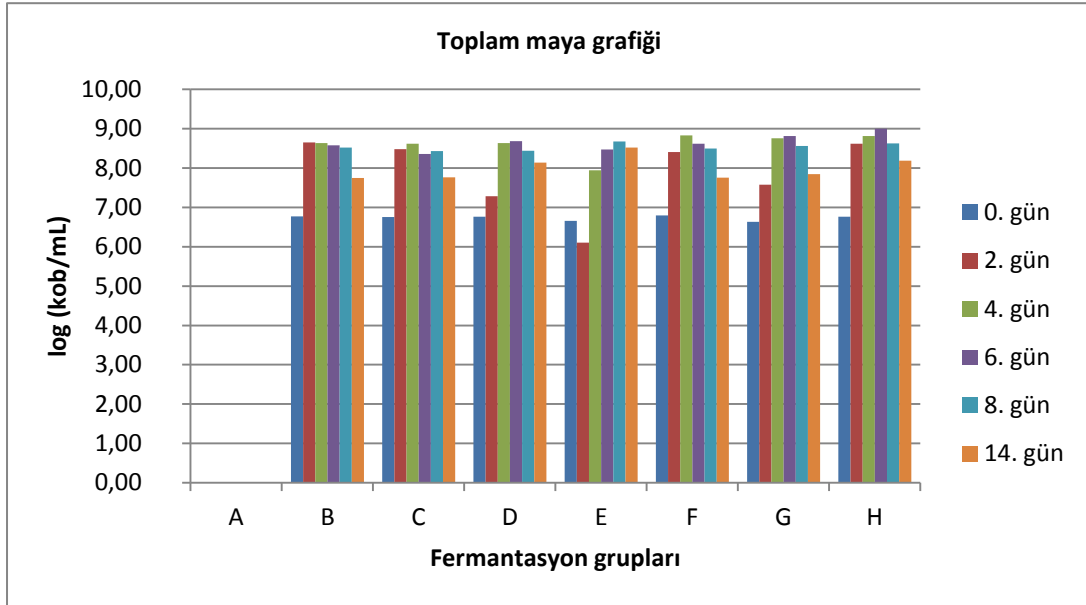
#### **4.4.2. Fermantasyon süresince toplam maya (*S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *Z. bailii*) popülasyonundaki değişimler**

Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12'de görüldüğü gibi kitosanın toplam maya popülasyonunda az da olsa inhibisyon etkisinin olduğu; ancak, içerisinde kitosan bulunmayan ve 40 mg/L SO<sub>2</sub> bulunan H grubu fermantasyon şişelerinde toplam maya popülasyonunun kitosanlı gruplara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Diğer kitosanlı gruplarda ise kitosan konsantrasyonu arttıkça toplam maya gelişim hızında kitosan konsantrasyonundaki artışla ters orantılı olarak düşüş gözlenmektedir. Kitosanlı ve SO<sub>2</sub>'li fermantasyon gruplarındaki (F ve G) toplam maya popülasyonunun, aynı konsantrasyonlarda kitosan içeren ve SO<sub>2</sub> içermeyen fermantasyon gruplarındaki (C ve D) toplam maya popülasyonu ile, inkübasyon günlerine göre bazı farklılık göstermekle birlikte, genel anlamda yakın ya da aynı olduğu saptanmıştır. Bu durumda, kitosanın olduğu koşullarda SO<sub>2</sub>'nin herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığı söylenebilir.

Çizelge 4.12'de fermantasyon gruplarındaki toplam maya sayımı sonuçları log (kob/mL) cinsinden ifade edilmekte ve Şekil 4.12'de fermantasyon süresince toplam maya (*S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *Z. bailii*) düzeyleri gösterilmektedir.

**Çizelge 4.12.** Fermantasyon gruplarındaki toplam maya sayımı sonuçlarının log(kob/mL) cinsinden gösterimi

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)							
		Fermantasyon Grupları							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Toplam Maya ( <i>S. cerevisiae</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>Z. bailii</i> )	0	-	6,77	6,76	6,76	6,66	6,79	6,63	6,76
	2	-	8,65	8,48	7,28	6,11	8,41	7,58	8,62
	4	-	8,63	8,62	8,64	7,95	4,83	8,75	8,82
	6	-	8,58	8,36	8,68	8,47	8,62	8,81	9,00
	8	-	8,52	8,43	8,44	8,67	8,50	8,56	8,63
	14	-	7,75	7,76	8,14	8,52	7,76	7,85	8,19



**Şekil 4.12.** Fermantasyon süresince toplam maya (*S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *Z. bailii*) düzeyleri

Sikloheksimidli YGC agarda yapılan sayımlarda yabancı maya sayıları belirlenirken, YGC agarda yapılan sayımlarda yabancı mayalar ve *S. cerevisiae* suşunun toplam miktarı belirlenmektedir. Bu durumda Çizelge 4.13'te görüldüğü gibi, her iki sayım sonuçlarının log(kob/mL) cinsinden değerlerinin karşılaştırılması yapılabilmektedir. Çizelge 4.13'te fermantasyon gruplarındaki yabancı ve toplam maya sayılarının log (kob/mL) cinsinden değerlerinin karşılaştırılması gösterilmektedir.

**Çizelge 4.13.** Fermantasyon gruplarındaki yabancı ve toplam maya sayılarının karşılaştırılması

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)							
		Fermantasyon Grupları							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Toplam Yabancı Maya ( <i>H. uvarum</i> , <i>Z. bailii</i> )	0	-	6,32	6,35	6,26	6,19	6,36	6,23	6,41
	2	-	7,78	8,28	6,95	5,68	8,27	7,20	8,03
	4	-	1,42	5,80	7,28	7,37	4,39	6,19	-
	6	-	-	8,52	3,35	5,79	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-
Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)							
		Fermantasyon Grupları							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Toplam Maya ( <i>S. cerevisiae</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>Z. bailii</i> )	0	-	6,77	6,76	6,76	6,66	6,79	6,63	6,76
	2	-	8,65	8,48	7,28	6,11	8,41	7,58	8,62
	4	-	8,63	8,62	8,64	7,95	4,83	8,75	8,82
	6	-	8,58	8,36	8,68	8,47	8,62	8,81	9,00
	8	-	8,52	8,43	8,44	8,67	8,50	8,56	8,63
	14	-	7,75	7,76	8,14	8,52	7,76	7,85	8,19

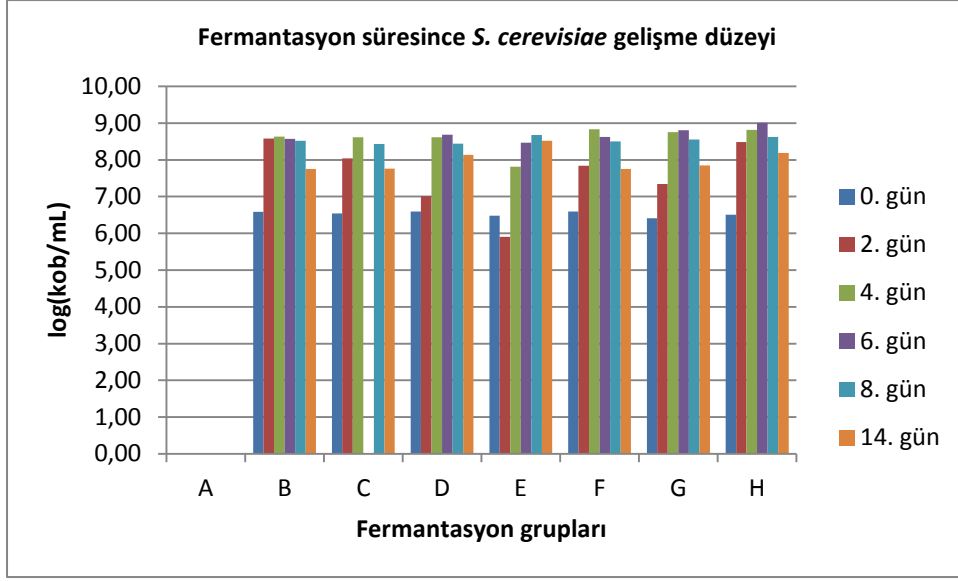
Her fermantasyon grubu için toplam maya sayımlarında bulunan değerlerden, yabancı maya sayımlarında bulunan değerler matematiksel olarak çıkarıldığında, kalan değerler log cinsinden hesaplanırsa, *S. cerevisia* suşunun her fermantasyon grubundaki sayısının log (kob/mL) cinsinden değerini vereceği için, bu hesaplama ile fermantasyon süresince *S. cerevisiae* suşunun gelişim düzeyi de belirlenmiştir. Çizelge 4.14'te fermantasyon süresince *S.cerevisiae* suşuna ait sayım sonuçları log(kob/mL) cinsinden gösterilmektedir.

**Çizelge 4.14.** Şarap fermantasyonu süresince *S. cerevisiae* suşuna ait gelişme düzeyleri

Mikroorganizma Türü	İnkübasyon Süresi (gün)	log (kob/mL)							
		Fermantasyon Grupları							
		A	B	C	D	E	F	G	H
<i>S. cerevisiae</i>	0	-	6,58	6,54	6,60	6,48	6,59	6,41	6,51
	2	-	8,58	8,04	7,01	5,90	7,84	7,34	8,49
	4	-	8,63	8,62	8,62	7,81	8,83	8,75	8,82
	6	-	8,58	-	8,68	8,47	8,62	8,81	9,00
	8	-	8,52	8,43	8,44	8,67	8,50	8,56	8,63
	14	-	7,75	7,76	8,14	8,52	7,76	7,85	8,19

Çizelge 4.14'te görüldüğü gibi *S. cerevisiae* gelişiminde tek başına kitosanın yavaşlatıcı etkisi görülse de (C, D ve E gruplarında), tam inhibisyon gözlenmemektedir. Aynı şekilde tek başına SO<sub>2</sub>'nin (H grubunda) da *S. cerevisiae* suşunu inhibe edemediği anlaşılmaktadır. SO<sub>2</sub>'nin ve kitosanın birlikte bulunduğu F ve G gruplarında ise maya gelişiminin, aynı konsantrasyonlarda kitosan içeren ve SO<sub>2</sub> içermeyen C ve D gruplarında görülen gelişme düzeyi ile aynı ya da benzer olduğu söylenebilir. Bu durumda tek başına kitosan ve tek başına SO<sub>2</sub>'nin şarap mayası üzerine herhangi bir inhibisyon etkisinin saptanmadığı gibi her ikisinin (SO<sub>2</sub> + kitosan) bir arada bulunması durumunda da inhibisyon gözlenmemiştir. Ön denemelerde yabancı mayaların inhibisyonu için yeterli olduğu saptanan kitosan konsantrasyonlarının ve şarap denemelerinde kullanılan 40 mg/L düzeyindeki SO<sub>2</sub>'nin şarap mayası olan *S. cerevisiae* için inhibisyona sebep olmadığı belirlenmiş olup, SO<sub>2</sub> ve kitosanın şıradaki konsantrasyonları artılırsa, inhibisyon gözlenebileceği düşünülmektedir. Çünkü *S. cerevisiae* suşunun, yabancı mayalara kıyasla, kitosana karşı çok daha dirençli olduğu gözlenmiş olmasına rağmen, az da olsa gelişimi yavaşlatıcı etkisinin olduğu da Çizelge 4.14 ve Şekil 4.13'ten anlaşılmaktadır. Bu durumda kitosan konsantrasyonu belirli düzeyde artırılırsa *S. cerevisiae* suşunu da inhibe edebileceği söylenebilir. Aynı durum SO<sub>2</sub> için de geçerlidir. Şarap prosesinde *S. cerevisiae* suşu dışındaki maya ve bakterileri inhibe edebilmek için üzüm çeşidinin mikrobiyel florası, üzümün yetiştiği bölge, yetiştirilme özellikleri, pH'ı, üzümün kırmızı ya da beyaz şaraba işlenmesi gibi özelliklerine göre kükürt ilavesinin 20-120 mg/L (Miller 2012) arasında kullanılması uygun bulunmuştur. Daha yüksek SO<sub>2</sub> konsantrasyonlarında *S. cerevisiae* suşunun da inhibe olabileceği söylenebilir.

Denemelerde kullanılan düşük molekül ağırlıklı kitosanın, şarapta istenmeyen mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi görülürken, fermantasyonu gerçekleştiren *S. cerevisia* suşuna karşı herhangi bir inhibisyon etki göstermemesi, istenilen bir sonuçtur. Şekil 4.13'te fermantasyon süresince *S.cerevisiae* suşuna ait gelişim düzeyleri şematize edilmiştir.



**Şekil 4.13.** Şarap fermantasyonu süresince *S. cerevisiae* suşunun gelişimi

## 5. SONUÇ

Çalışmada elde edilen sonuçlar, aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalardan *O. oeni* ve *B. bruxellensis* suşları hariç, diğer mikroorganizma suşları genel besiyerlerinde arzulan düzeyde gelişmişlerdir. *O. oeni* suşu sadece MRS Broth ve CASO Broth'da (pH: 4,5) zayıf gelişebilmiş ve sayım amaçlı, farklı katı besiyerlerine yapılan ekimler sonucunda da sadece MRS Agar'da gelişebilmiştir. *B. bruxellensis* suşu'nun gelişmesinde de sorun yaşanmış, en iyi CASO Broth ve YPG Broth'da (pH: 4,5), katı besiyerlerinden ise en iyi PDA'da gelişebilmiştir.
2. Kitosanın şarapta bulunan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etkisinin belirlenmesine yönelik olarak, sentetik besiyerinde, 0,2-2,0 g/L aralığında 10 değişik konsantrasyonda kitosan ilavesi ile gerçekleştirilen denemeler sonucunda, *S. cerevisiae* suşunun kitosana karşı, yabani mayalar ve laktik asit bakterilerine kıyasla, çok daha dirençli olduğu görülmüştür. İlave denemelerde, *S. cerevisiae* suşunun, ancak 3 g/L konsantrasyonunda inhibe olduğu gözlenmiş; bu bulgu, şarap üretiminde antimikrobiyel bileşik olarak kitosan kullanılması durumunda alkol fermantasyonunun tamamlanabilmesi yönünden, olumlu değerlendirilmiştir.
3. Denemelerde kullanılan diğer mikroorganizmaların, *L. plantarum* hariç olmak üzere, 0,2-0,4 g/L kitosan konsantrasyonunda inhibe oldukları, ancak; *L. plantarum* suşunu inhibe edebilecek minimum kitosan konsantrasyonunun 1-2 g/L aralığında olduğu saptanmıştır.
4. Yabani mayalar olarak adlandırılan maya suşlarından *B. bruxellensis* suşu 0,2 g/L kitosan konsantrasyonunda inhibe olurken, *H. uvarum* ve *Z. bailii* suşlarının minimum inhibisyon konsantrasyonu 0,4 g/L olarak bulunmuştur. Laktik asit bakterileri olan *O. oeni* ve *L. hilgardii* suşlarını ise inhibe edebilen en düşük kitosan konsantrasyonu 0,2 g/L olarak saptanmıştır. Bu durumda şarapta arzulanmayan mikroorganizmaların (*L. plantarum* hariç) inhibisyonu 0,2 ve 0,4 g/L kitosan konsantrasyonu gibi çok düşük konsantrasyonlarda bile sağlanabilmektedir.

5. Şarap üretiminde kitosanın alkol fermantasyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla, üzüm şirasına, kitosanın mikroorganizmalar üzerine daha önce belirlenen minimum inhibisyon değerleri dikkate alınarak ilave edildikleri, 8 grup fermantasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. A, B, C, D, E, F, G ve H olarak tanımlanan fermantasyon gruplarında fermantasyonun seyri, 16 gün boyunca ağırlık azalışı ile izlenmiş; ağırlık azalmaları, Negatif Kontrol Grubu (A) hariç, 21-22 g olarak saptanmıştır. Negatif Kontrol Grubu (A) hariç diğer gruplarda fermantasyon sonunda toplam ağırlık azalışının birbirine çok yakın olması, değişik konsantrasyonlarda kitosan ilavesinin fermantasyon hızını yavaşlatsa da, tamamlanmasını engellemediği şeklinde yorumlanmıştır. Mikroorganizma aşılınmayan Negatif Kontrol Grubu'nda fermantasyonun gerçekleşmemesi beklenen bir sonuçtur.
6. Fermantasyondan sorumlu mayaların gelişiminde, tek başına kitosanın yavaşlatıcı etkisi görülse de (C, D ve E gruplarında), tam inhibisyon gözlenmemiştir. Aynı şekilde, tek başına 40 mg/L SO<sub>2</sub>'nin (H grubunda) de fermantasyondan sorumlu mayaları inhibe edemediği anlaşılmaktadır.
7. SO<sub>2</sub>'nin ve kitosanın birlikte bulunduğu durumda (F ve G gruplarında) maya gelişiminin, aynı konsantrasyonlarda kitosan içeren ve SO<sub>2</sub> içermeyen şarap ortamında (C ve D gruplarında) görülen gelişme düzeyi ile benzer olduğu söylenebilir. Bu durumda, denemede kullanılan dozlarda, tek başına kitosan ve tek başına SO<sub>2</sub>'nin şarap mayası üzerine herhangi bir inhibisyon etkisinin görülmediği ve her ikisinin (SO<sub>2</sub> + kitosan) bir arada bulunması durumunda da inhibisyon oluşmadığı belirlenmiştir.
8. Yabani mayaların kitosan içermeyen ve 40 mg/L SO<sub>2</sub> içeren şarap ortamında hızla inhibe oldukları saptanmıştır.
9. Fermantasyondan sorumlu mayalar üzerine kitosanın inhibisyon etkisi olmasa bile fermantasyonu yavaşlatıcı etkisinin olduğu anlaşılmıştır.



**10.** Şarap fermantasyonu denemelerinde kitosanın, sentetik besiyerlerinde gösterdiği oranda inhibisyon etkisi belirlenemese de, muhtemelen fermantasyon ile birlikte alkol oranındaki artışın da etkisiyle, yabani mayaların gelişmelerini önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Anonim, 2012a.** The use of sulfur dioxide in winemaking. <https://people.ok.ubc.ca/neggers/Chem422A/Sulfur%20Dioxide.pdf> – (Erişim Tarihi: 13.01.2012).
- Anonim, 2012b.** The use of sulphur dioxide in must and wine. <http://www.ecoconsult.net/The%20use%20of%20Sulphur%20Dioxide.pdf> – (Erişim Tarihi: 13.01.2012).
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A. 2009.** Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3: 203-230.
- Bisson, L.F. 2004.** The biotechnology of wine yeast. *Food Biotechnology*, 18(1): 63-96.
- Bostan, K., Aldemir, T., Aydın, A. 2007.** Kitosan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 37 (2) : 118-127.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. 1996.** Principles and practises of winemaking. Chapman & Hall, New York.
- Chien P-J., Sheu F., Yang F-H., 2007.** Effect of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *J. Food Engin.*, 78; 225-229.
- Choi, B. K., Kim, K. Y., Yoo, Y. J., Oh, S. J., Choi, J. H., Kim, C. Y. 2001.** *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimicrob Agents*, 18: 553-557.
- Cliff, M.A., King, M.C., Schlosser, J. 2007.** Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International*, 40: 92-100.
- Cocolin, L., Ercolini, D. 2004.** Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods, 162 p.
- Cuero, R., Ouellet, T., Yu, J., Mogongwa, N. 2003.** Metal ion enhancement of fungal growth, gene expression and aflatoxin sytnthesis in *Aspergillus flavus*: RT-PCR characterization. *J. Appl. Microbiol.* 94: 953-961.
- Demir, A., Seventekin, N. 2009.** Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. *Tekstil teknolojileri elektronik dergisi*, 3 (2): 92-103.
- De Winde, J. H. 2003.** Functional genetics of industrial yeasts. <http://books.google.com.tr/books?id=6gbxAskvRYYC&pg=PA101&dq=Fugelsang+1997&hl=tr&sa=X&ei=nY8RT7PHoicsAaU0xP&ved=0CDkQ6AEwAg#v=onepage&q=Fugelsang%201997&f=false> - (Erişim Tarihi: 14.01.2012).

**Di Maio, S., Polizzotto, G., Planeta, D., Oliva, D. 2010.** A method to discriminate between the *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed fermentation on WLD and lysine agar media, *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 32 (1): 35-41.

**Du Toit, M., Pretorius, I.S. 2000.** Microbial spoilage and preservation of wine: Using weapons from nature's own arsenal. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21: 74-96.

**Dutta, P. K., Dutta, J., Tripathi, V. S. 2004.** Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63: 20-31.

**Enrique, M., Marcos, J.F., Yuste, M, Martínez, M., Vallés, S., Manzanares, P. 2007.** Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 118: 318–325.

**Esteve-Zarsozo, B., Gostincar, A., Bobet, R., Uruburu, F., Querol, A. 2000.** Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from "El Penedes" area (Spain). *Food Microbiology*, 17: 553-562.

**Forouchi, E. and Gunn, D. J. 1983.** Some effects of metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 1905-1911.

**Fugelsang K. C., Edwards, C. G. 2007.** Wine microbiology-Practical Applications and Procedures. [http://books.google.com.tr/books?id=sLAszaQ4yV0C&pg=PA342&lpg=PA342&dq=Sponholz++Dittrich+1974&source=bl&ots=BuDNpIpR0O&sig=94R\\_jw\\_hye\\_UhtzjzI9B0UR\\_58RP40&hl=tr&sa=X&ei=5ooRT\\_8q0OGzBtmfxSY&ved=0CB8Q6AE\\_wAA#v=onepage&q=Sponholz%20%20Dittrich%201974&f=false](http://books.google.com.tr/books?id=sLAszaQ4yV0C&pg=PA342&lpg=PA342&dq=Sponholz++Dittrich+1974&source=bl&ots=BuDNpIpR0O&sig=94R_jw_hye_UhtzjzI9B0UR_58RP40&hl=tr&sa=X&ei=5ooRT_8q0OGzBtmfxSY&ved=0CB8Q6AE_wAA#v=onepage&q=Sponholz%20%20Dittrich%201974&f=false) – (Erişim Tarihi: 14.01.2012).

**García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martí'nez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martí'n-A'lvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. 2008.** Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19: 835–841.

**Go'mez-Rivas, L., Escudero-Abarca, B. I., Aguilar-Uscanga, M. G., Hayward-Jones, P. M., Mendoza, P., Ramí'ez, M. 2004.** Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *Society for Industrial Microbiology*, 31: 16–22.

**Halkman, A.K. 2005.** Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, 358 pp.

**Halkman, A.K, Sağdaş, Ö. E., 2011.** Mikrobiyoloji El Kitabı. [http://www.mikrobiyoloji.org/TR/pdf/merckmikrobiyoloji\\_elkitabi.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/TR/pdf/merckmikrobiyoloji_elkitabi.pdf) – (Erişim Tarihi: 13.01.2012).

**Hutkins, R. W. 2006.** Microbiology and Technology of Fermented Foods, Blackwell Publishing, USA, 349-395 pp.

**Iranzo, J. F. U., Perez, A. I. B., Canas, P. M. I. 1998.** Study of oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. *Food Microbiology*, 15: 399-406.

**Kara, M., Kolaylı, S. 2010.** Kloramfenikolün gıda güvenliği amaçlı teşhisinde yüzey plazmon rezonans ve moleküler baskılama tekniklerinin kullanımı, *GıdaTehnolojileri Elektronik Dergisi*, 5(2): 35-47.

**Kaş, H. S. 1997.** Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J. Microencapsulation*, 14(6): 689-711.

**Kurt, Ş., Zorba, Ö. 2005.** Kitin, kitosan ve türevlerinin gıdalarda kullanım olanakları. *Gıda*, 30 (6): 371-378.

**Lim, S., Hudson, S. M. 2003.** Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *J. Macromol.Sci.*, 43: 223-269.

**Miller, M. 2012.** How SO<sub>2</sub> and pH are Linked. <http://accuvin.com/pHSO2Links.pdf> – (Erişim Tarihi: 13.01.2012).

**Moon, J. S., Kim, H. K., Koo, H. C., Joo, Y. S., Nam, H., Park, Y. H., Kang, M. I. 2007.** The antibacterial and immunostimulative effect of chitosan-oligosaccharides against infection by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75: 989–998.

**No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., Meyers, S. P. 2002.** Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 65-72.

**Özçelik, F., Denli, Y. 1999.** Şarap mayalarının teknolojik özellikleri. *Gıda*, 24 (6): 385-389.

**Peynaud, E., Domerq. S. 1959.** A review of microbiological problems in winemaking in France. *Am. J. Enol. Vitic.*, 10: 69-77.

**Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I. 2009.** Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 130: 49–55.

**Radler, F. 1993.** Yeasts metabolism of organic acids. Fleet, G.H. ed. Wine microbiology and biotechnology, Singapore: Harwood Academic Publishers, 165-182 pp.

**Reed, G., Nagodawithana, T.W. 1988.** Technology of yeast usage in winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(1): 83-90.

**Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A. 2008.** Effectiveness of dimethydicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control*, 19: 208–216.

**Rhoades, J., Roller, S. 2000.** Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1): 80-86.

[Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., Ramírez, M.](#) 2011. A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded rna virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Appl Environ Microbiol.*, 77(5):1822-32.

**Rodriguez, M. S., Ramos, V., Agullo, E. 2003.** Antimicrobial action of chitosan against spoilage organisms in precooked pizza, *Journal of Food Science*, 68 (1): 271-274.

**Roller, S., Covill, N. 2000.** The antimicrobial properties of chitosan in laboratory in mayonnaise and mayonnaise based shrimp salads. *Journal of Food Protection*, 63: 202-209.

**Shahidi, F., Arachchi, J. K.V., Jeon, Y. 1999.** Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 37-51.

**Soufleros, E., Barrios, M.L., Bertrand, A. 1998.** Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:266-278.

**Sponholz, W., 1993.** Wine spoilage by microorganisms. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, 395– 420.

**Stockley, C. S., Nigel Sneyd, T., Lee, T. H. 2007.** Reduced Additive Brewing and Winemaking, in *Technology of Reduced Additive Foods*, Second Edition, Wiley-Blackwell, 240 pp.

**Tang, H., Zhang, P., Kieft, T. L., Ryan S. J., Baker, S. M., Wiesmann, W. P., Rogelj, S. 2010.** Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. *Acta Biometer*, 6 (7): 2562-71.

**Torija, M. J., Rozés, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Mas, A. 2003.** Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80: 47-53.

**Zheng, L.Y., Zhu, J.F., 2003.** Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54: 527-530.

## **EKLER**

**EK 1 Şırada İndirgen Şeker Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı**

**EK 2 Glikoz Standart Eğrisi**

**EK 3 Fermantasyon süresince izlenen ağırlık azalmalarına (g) ilişkin veriler**

## **EK 1 Şırada İndirgen Şeker Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı**

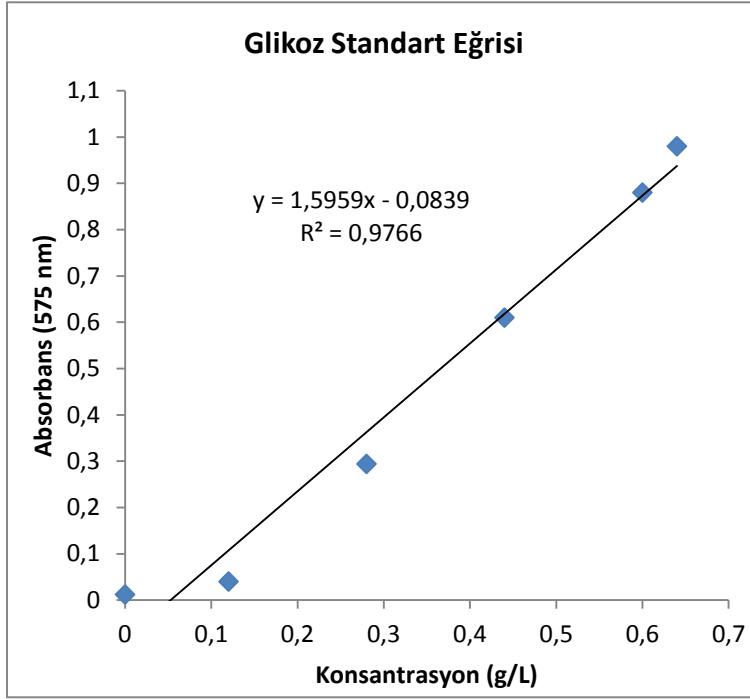
**Carrez I Çözeltisi:** 15 g potasyum ferrosiyaniir ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ) damıtık suda çözüdüürölüp 100 mL'ye tamamlanır.

**Carrez II Çözeltisi:** 30 g çinkosülfat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) damıtık suda çözüdüürölüp 100 mL'ye tamamlanır.

**DNS Çözeltisi:** 10 g DNS, 10 g NaOH ve 1.6 g fenol bir miktar damıtık suda eritilerek litreye tamamlanır. Kullanımdan önce, çözeltinin her 100 mL'si için %10'luk sodyum sülfıt çözeltisinden 1 mL eklenir.

**Rachelle tuzu çözeltisi:** 40 g sodyum-potasyum tartarat damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanır.

## EK 2 Glikoz Standart Eğrisi



Şekil 1 Şıradaki şeker analizinde kullanılan glikoz standart eğrisi



**EK 3 Fermantasyon süresince izlenen ağırlık azalmalarına (g) ilişkin veriler**

Fermantasyon grupları	Süre (gün)								
	0	2	4	6	8	12	14	16	TOPLAM
<b>A</b>	0	0,10	0,14	0,11	0,12	0,27	0,09	0,11	<b>0,94</b>
<b>B</b>	0	3,86	9,78	4,42	2,19	1,42	0,27	0,26	<b>22,19</b>
<b>C</b>	0	0,74	10,32	5,75	3,45	1,71	0,24	0,26	<b>22,47</b>
<b>D</b>	0	0,13	6,10	7,51	4,45	2,47	0,27	0,22	<b>21,13</b>
<b>E</b>	0	0,10	1,00	7,84	6,00	4,96	0,61	0,30	<b>20,80</b>
<b>F</b>	0	1,01	10,70	5,38	2,89	1,21	0,24	0,23	<b>21,65</b>
<b>G</b>	0	0,16	9,48	6,80	3,39	1,56	0,25	0,29	<b>21,93</b>
<b>H</b>	0	3,84	10,15	4,71	2,16	1,13	0,23	0,20	<b>22,41</b>

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gökşen GÜLGÖR

Doğum Yeri ve Tarihi : Kayseri 1987

Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Sami Yangın Anadolu Lisesi (2001-2005)

Önlisans : Anadolu Üniversitesi Dış Ticaret Bölümü  
(2006-2008 / Açık Öğretim)

Lisans : Erciyes Üniversitesi Mühendislik  
Fakültesi Gıda Mühendisliği  
Bölümü (2005-2009)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri  
Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim  
Dalı (2009-2011)  
Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri  
Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim  
Dalı (Yatay Geçiş / 2011- Devam ediyor)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri  
Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim  
Dalı/Araştırma Görevlisi (2011-Devam  
ediyor)

İletişim (e-posta) : goksen\_gulgor@hotmail.com

Yayınları :

- Gülgör, G., Özçelik F. 2011. Bakteriyosin Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Amaçlı Kullanımı. 7.Gıda Mühendisliği Kongresi. 24-26 Kasım 2011, Ankara. Sözlü bildiri. Kitaplar serisi: 26, 50