

**TRAKYA YÖRESİNE AİT PAPAZKARASI ÜZÜMLERİ KULLANILARAK,
SPONTAN FERMANTASYON İLE ELDE EDİLEN ŞARAPLARDAN *Saccharomyces
cerevisiae* TÜRÜ MAYALARIN İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE
TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Çağrı ERSEÇ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ

2022

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TRAKYA YÖRESİNE AİT PAPAZKARASI ÜZÜMLERİ KULLANILARAK,
SPONTAN FERMANTASYON İLE ELDE EDİLEN ŞARAPLARDAN *Saccharomyces*
cerevisiae TÜRÜ MAYALARIN İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE
TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

ÇAĞRI ERSEÇ

ORCID: 0000-0002-3822-8700

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Danışman: Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ

MAYIS-2022

Her hakkı saklıdır

ÖZET

TRAKYA YÖRESİNE AİT PAPAZKARASI ÜZÜMLERİ KULLANILARAK, SPONTAN FERMANTASYON İLE ELDE EDİLEN ŞARAPLARDAN *Saccharomyces cerevisiae* TÜRÜ MAYALARIN İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Çağrı ERSEÇ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ

Günümüzde, özellikle büyük çaplı ticari şarap üretiminde, fermantasyon genellikle *Saccharomyces cerevisiae* türü maya kültürleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Standart şarap mayası starter kültürleri yurt dışından getirilerek ülkemizde endüstriyel şarapçılıkta kullanılmaktadır. Böylece zaman içinde bütün üreticilerin şarapları birbirine benzer karakterler göstermeye başlamıştır. Günümüzde yapılan çalışmalar, ülkelerin kendi yerel şarap mayalarını starter olarak kullanarak yerel özellikler taşıyan teruar şaraplarının üretimine yoğunlaşmaktadır. Tez kapsamında Edirne ve Kırklareli sınırlarında bulunan, yapılan bağcılık uygulamaları, mikroklimatik şartları, konumları gibi özellikleri farklılık taşıyan 4 bağdan ve Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsündeki bağdan olmak üzere toplam 5 farklı lokasyondan Papazkarası üzümü önolojik olgunluk aşamasında toplanmıştır. Toplanan üzümler ezilerek spontan fermantasyona tabi tutulmuştur. Fermantasyon sonunda şıralardan maya izolasyonları yapılmış ve toplan 66 adet izolat elde edilmiştir. İzolatlar, 1 adet ticari şarap mayası ile birlikte, temel şarap yapımı için gereken teknolojik özellikleri karşılayıp karşılamadıklarının anlaşılması için fermantasyon hızı, H₂S üretim miktarı, yüksek sıcaklıkta gelişebilme, yüksek şeker konsantrasyonunda gelişebilme, yüksek etanole dayanıklılık, düşük pH değerlerinde gelişebilme, SO₂'ye dayanıklılık, uçur asit miktarı analizlerine tabi tutulmuştur. Gerekli özelliklere sahip olduğu görülenler içerisinde 15 tanesi seçilerek DNA dizileme analizleri yapılmış ve *Saccharomyces cerevisiae* türüne ait oldukları tespit edilmiştir. Bu izolatlara yapılan DNA parmak izi analizlerinde 9 adet farklı suş tespit edilmiştir. İzole edilen mayalar ileride yapılacak uygulamalarda kullanılmak üzere Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünde -80°C'de gliserol stoklarda depolanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Papazkarası, *S. cerevisiae*, Şarap, DNA, Maya, Karakterizasyon.

ABSTRACT

ISOLATION, IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF *Saccharomyces cerevisiae* YEAST SPECIES FROM THE WINES MADE BY SPONTANEOUS FERMENTATION USING PAPAZKARASI GRAPES FROM THRACE REGION

Çağrı ERSEÇ

Tekirdağ Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. ŞÜKRÜ DEMİRCİ

Nowadays, especially in large-scale commercial wine production, fermentation is usually carried out by using the species of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cultures. Standard wine yeast starter cultures are brought from abroad and used in industrial winemaking in our country. Thus, in course of time, the wines of all producers began to show similar characteristics. Today, studies focus on terroir wines production with local characteristics by using the countries' own local wine yeasts as a starter. Within the scope of the thesis, Papazkarası grapes were collected from 4 vineyards with different characteristics such as viticulture practices, microclimatic conditions and locations in the borders of Edirne and Kırklareli. In addition the grapes were also collected from the vineyard in Tekirdağ Viticulture Research Institute. Spontaneous fermentation was done by crushing the collected grapes. At the end of the fermentation, yeast isolations were made from the musts and a total of 66 isolates were obtained. Fermentation rate, H₂S production amount, growth at high temperature, growth at high sugar concentration, resistance to high ethanol, ability to grow at low pH values, resistance to SO₂, volatile acid analysis were done to determine whether they meet the technological requirements for basic winemaking, together with 1 commercial wine yeast. DNA sequencing analyzes were made by selecting 15 of those that were found to have the necessary characteristics and it was determined that they belonged to the species *Saccharomyces cerevisiae*. 9 different strains were detected in the DNA fingerprint analyzes performed on these isolates. Isolated yeasts are stored in glycerol stocks at -80°C in Tekirdağ Viticulture Research Institute for use in future applications.

Keywords: Papazkarasi, *S. cerevisiae*, Wine, DNA, Yeast, Characterization.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
TEŞEKKÜR.....	xiii
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Türü Mayalar.....	4
2.2. Üzüm Tanelerindeki Maya Ekolojisi	5
2.3. Şarap Fermentasyonunda Yer Alan Mayaların Kalite Üzerine Etkileri	7
2.4. Şarap Yapımında Otokton Mayaların Kullanımının Önemi	10
2.5. Maya Hücrelerinin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Tanımlanması	11
2.5.1. İzolasyon ve Saflaştırma	11
2.5.2. Tanımlama.....	12
2.5.2.1. Sitoloji.....	12
2.5.2.2. Taksonomi.....	13
2.6. Şarap Üretimine Uygun Mayaların Seçilmesi.....	15
2.7. Mayaların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	19
2.7.1. Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Üretimi	19
2.7.2. Fermantasyon Hızı	20
2.7.3. Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık.....	22
2.7.4. Yüksek Şeker Konsantrasyonuna Dayanıklılık.....	24
2.7.5. Yüksek Etanole Dayanıklılık	25
2.7.6. Düşük pH Değerlerinde Gelişebilme	28

2.7.7. Kükürt Dioksite Dayanıklılık	29
2.7.8. Uçar Asit Oluşturma.....	30
3. MATERYAL VE METOT	32
3.1. Materyal	32
3.1.1. Hammadde	32
3.1.1.1. <i>Papazkarası Üzüm Çeşiti</i>	33
3.1.2. Besiyerleri	34
3.2. Metot	35
3.2.1. Spontan Fermantasyon Denemelerinin Oluşturulması	35
3.2.2. İzolasyon ve Saflaştırma	36
3.2.3. Mayaların Teknolojik Özelliklerini Belirlemek İçin Yapılacak Analizler	38
3.2.3.1. <i>Hidrojen Sülfür (H₂S) Üretimi</i>	38
3.2.3.2. <i>Fermantasyon Hızı</i>	39
3.2.3.4. <i>Yüksek Şeker Konsantrasyonuna Dayanıklılık</i>	40
3.2.3.5. <i>Yüksek Etanole Dayanıklılık</i>	40
3.2.3.6 <i>Düşük pH Değerlerinde Gelişebilme</i>	40
3.2.3.7. <i>Kükürt Dioksite Dayanıklılık</i>	41
3.2.3.8. <i>Uçar Asit Oluşturma</i>	41
3.2.4. Karakterizasyon.....	42
3.2.4.1. <i>Maya Örneklerinin DNA İzolasyonu</i>	42
3.2.4.2. <i>ITS1-4 Bölgesinin PCR'da Çoğaltılması</i>	44
3.2.4.3. <i>DNA Elektroforezi</i>	44
3.2.4.4. <i>PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve DNA Dizi Analizi</i>	45
3.2.4.5 <i>BLAST Tarama</i>	45
3.2.4.6. <i>DNA Parmakizi Analizleri</i>	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	47
4.1. Spontan Fermantasyon Süreci ve Sonuçları	47
4.2. Maya İzolasyonu ve Örnekleme	48
4.3. Mayaların Teknolojik Özelliklerini Belirlemek İçin Yapılan Analizler	49

4.3.1. Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Üretimi	49
4.3.2. Fermantasyon Hızı	52
4.3.3. Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık.....	58
4.3.4. Yüksek Şeker Konsantrasyonuna Dayanıklılık.....	60
4.3.5. Yüksek Etanole Dayanıklılık	61
4.3.6. Düşük pH Değerlerinde Gelişebilme	64
4.3.7. Kükürtdioksite Dayanıklılık	66
4.3.8. Uçar Asit Oluşturma.....	68
4.4. Karakterizasyon.....	70
4.4.1. DNA Dizileme Analizi.....	70
4.4.2. DNA Parmakizi Analizleri	70
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
6. KAYNAKLAR.....	73
EK 1. Seçilen izolatların ITS 1-4 gen bölgelerinin DNA dizileri ve BLAST analiz sonuçları.....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1: Toplanan üzüm örneklerin SÇKM ve TA değerleri	33
Çizelge 3.2: YPD (Yeast Extract Pepton Dextrose Agar) sıvı besiyeri	34
Çizelge 3.3: YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) katı besiyeri	34
Çizelge 3.4: YPD + amoxicillin agar	35
Çizelge 4.1: İzolatların BIGGY besiyeri üzerinde oluşturdukları renkler	50
Çizelge 4.2: İzolatların fermantasyon hızları	56
Çizelge 4.3: İzolatların 37 °C ve 42 °C sıcaklıklarda gelişebilme yetenekleri.....	58
Çizelge 4.4: İzolatların 30 Bx konsantrasyonda YPD besiyerlerindeki gelişimleri.....	60
Çizelge 4.5: İzolatların farklı etanol konsantrasyonlarındaki gelişimleri	62
Çizelge 4.6: İzolatların farklı pH'lardaki YPD sıvı besiyerlerindeki gelişimleri	65
Çizelge 4.7: İzolatların farklı SO ₂ (ppm) konsantrasyonlarındaki gelişimleri	66
Çizelge 4.8: Maya izolatlarının oluşturduğu uçur asit miktarları	68



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 : <i>S. cerevisiae</i> hücresinin mikroskop altındaki görüntüsü.....	13
Şekil 2.2 : <i>S. cerevisiae</i> mayasının oluşturduğu kolonilerin petri kabındaki görünümü	14
Şekil 3.1: Papazkarası üzümünün hasat edildiği bağlar	32
Şekil 3.2: Papazkarası üzüm çeşiti	33
Şekil 3.3: Bağlardan toplanan üzümler ile oluşturulan spontan fermantasyonlar	36
Şekil 3.4: Spontan fermantasyonlardan alınan örnekler.....	37
Şekil 3.5: Örneklerden, farklı konsantrasyonlarda, yapılan ekimler	37
Şekil 3.6: Kolonilerin seçilmesi	37
Şekil 3.7: Seçilen kolonilerin çizme plak yöntemi ile ekilmesi	38
Şekil 3.8: Saflaştırılan maya suşunun petri kabındaki görüntüsü.....	38
Şekil 3.9: Fermantasyon Hızı Ölçümleri.....	39
Şekil 3.10: Maya gelişimlerinin Durham tüpünde oluşturduğu gaz.....	40
Şekil 3.11: Buharlı damıtma yönteminin uygulanması	41
Şekil 4.1: Farklı bağlardan toplanan üzümler ile oluşturulan spontan fermantasyonların zaman içindeki ağırlık azalmaları	48
Şekil 4.2: İzolatların BIGGY besiyeri üzerinde oluşturdukları koloni renkleri	51
Şekil 4.3: İzolatların YPD sıvı besiyerindeki fermantasyon hızları	54
Şekil 4.4: Delta 12 - delta 21 primerleri ile çoğaltılan DNA'ların jel elektroforezindeki görüntüsü....	71

SİMGELER DİZİNİ

SO ₂	Kükürt dioksit
kob/g	Gramda koloni oluşturan birim
spp.	Tür
y.y.	Yüzyıl
kob/ml	Mililitrede koloni oluşturan birim
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
kob/mg	miligramda koloni oluşturan birim
H ₂ S	Hidrojen sülfür
kb	Kilobaz çifti
µm	Mikrometre
g/l	Litrede gram
mg/l	Litrede miligram
v/v	Hacimce yüzde
g/sa	Saatte gram
gCO ₂ /l.sa	Saatte, litredeki gram cinsinden karbondioksit
CO ₂	Karbondioksit
gCO ₂ /l.gün	Günde, litredeki gram cinsinden karbondioksit
°Bx	Briks
SO ₃ ²⁻	Kükürt iyonu
ppm	Milyonda bir
°	Derece
‘	Dakika
“	Saniye
K	Kuzey
D	Doğu
M	Metre
T.A.	Toplam asit
NaOH	Sodyum hidroksit
HCl	Hidroklorik asit
ml	Mililitre
Na ₂ S ₂ O ₅	Sodyum metabisülfid
ml/ml	Mililitrede mililitre

mm	Milimetre
ml/l	Litrede mililitre
CH ₃ COOH	Asetik asit
M	Mol
rpm	dakikadaki devir sayısı
µl	Mikrolitre
µM	Mikromol
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mA	Miliamper
µg/ml	Mililitrede mikrogram
nm	Nanometre



KISALTMALAR DİZİNİ

M.Ö.	Milattan önce
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
PCR-RFLP	Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism
ITS	Internal Transcribed Spacer
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
BIGGY	Bismuth glucose glycine besiyeri
YPD	Yeast extract peptone dextrose besiyeri
SÇKM	Suda çözünebilir kuru madde
TBAEM	Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
PCR	polymerase chain reaction
BLAST	Basic local alignment search tool
OIV	Uluslararası Bağ ve Şarap Örgütü
NABİLTEM	Namık Kemal Bilim ve Teknoloji Merkezi

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında tecrübesi ile yol gösterici olan yakın ilgi ve desteğini tüm samimiyetiyle gösteren danışman hocam Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ'ye, tanımlamalar aşamasında tecrübeleri ile ışık tutan Prof. Dr. Ayşe Neş'e BİLGİN, Dr. Zeynep Dilan ÇELİK ve Dr. Öğr. Üyesi Muazzez GÜRGAN ESER'e, içten yardımları için NABİLTEM personellerinden Öğr. Gör. Duygu KORUCU ERDEM'e, laboratuvar çalışmaları sırasında yardımını esirgemeyen Ziraat Müh. Ahmet Taha GÜNGÖR'e, çalışmanın ilerlemesinde tecrübelerinden yararlandığım Dr. Gamze UYSAL SEÇKİN'e, bugünleri gelmemi sağlayan annem Canan ERSEÇ, babam Cüneyt ERSEÇ'e ve bu çalışmayı yürüttüğüm dönemde sabır, hoşgörü ve telkinleriyle her zaman yanımda olan eşim Gizem ERSEÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

Çağrı ERSEÇ

Gıda Mühendisi

1. GİRİŞ

Şarap, insanlığın en eski içeceklerinden biridir. Çinde yapılan bir arkeolojik kazıda şarabın insanlar tarafından tüketiminin M.Ö. 7000 yıllarına dayandığını doğrulayan kanıtlar bulunmuştur (McGovern, Fleming ve Katz, 1996). Başlangıçta varillerde hasar gören üzümün fermantasyonu ile bulunan şarabın nasıl oluştuğu birkaç yüzyıl öncesine kadar gizemini korumuştur (Chambers ve Pretorius 2010).

1785 yılında Fransız kimyacı Antoine Laurent Lavoisier şarap fermantasyonunun kimyasal bir süreç olduğunu öne sürmüştür. Aradan geçen elli yıl içerisinde pek ilerleme kaydetmeyen bu konu, 1837 ve 1838 yıllarında farklı ülkelerde çalışan iki bilim insanı tarafından (Charles Cagniard de la Tour, Fransa ve Theodor Schwann, Almanya) daha güçlü mikroskoplarla yapılan incelemelerde tek hücreli canlıların çoğaldıkları ve sayıca arttıklarını gözlemlemiş ve bunun ardından fermantasyonun kimyasal bir süreç olmayıp maya çoğalmasından meydana geldiğini not etmişlerdir. Bu konuda en önemli gelişim ise Louis Pasteur'un bilim alanına girmesiyle yaşanır. Pasteur, ünlü "Fermantasyon Üzerine" isimli çalışmasını bilim dünyasına sunar. Bu çalışmada, fermantasyonu sağlayan mayanın gelişmesi, çoğalması, parçalanması ve ölmesi aşamalarını tek tek anlatmıştır (Anonim, 2021a). 1866'dan beri, Louis Pasteur'un biyo-dönüşümü ilk kez ortaya çıkardığı zaman üzüm suyunun şaraba dönüşmesi, bu karmaşık süreç ve fermentasyondaki mayanın rolü kapsamlı olarak incelenmiştir. Yine de, 150 yıl sonra bile hala açık olmayan fermentasyonla ilgili birçok nokta bulunmaktadır (Pretorius, 2000). Günümüzde şarap fermantasyonu çok büyük oranda *Saccharomyces cerevisiae* türü mayalar kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Jolly, Pretorius, Augustyn, 2006).

Maya fermentasyon teknolojisinde dünya ölçeğinde en gelişmiş birkaç ülke arasında sayılan ülkemizin şarap endüstrisinin ihtiyacı olan mayaları da üretememesi için hiçbir neden yoktur. Ülkemizde geleneksel şarap üretiminden endüstriyel şarap üretime geçiş oldukça yenidir. Geleneksel üretimde şıranın içindeki doğal mayaların çalışması ile şarap yapılırken, endüstriyel şarap üretimine geçince, şarap üretimini tehlikeye atmamak ve şarapta standardizasyonu sağlamak amacıyla, kullanılacak üzüm için önceden seçilmiş ve denenmiş, bütün özellikleri belli başlangıç (starter) maya kültürlerinin kullanılması tercih edilir olmuştur. Ancak, ülkemiz gerçekleri içinde şarabın çok önemli bir yer tutmaması, üretiminin diğer içkilere kıyaslandığında görece daha az olması nedeniyle, konuya ilgi duyulmamış ve endüstriyel

şarapçılık için gereken maya starter kültürleri de böylece yurt dışından ithalat yoluyla temin edilir olmuştur.

Türkiye, ekmek tüketim kültürüne istinaden, ekmek mayasını en çok üreten ve kullanan ülkelerden biridir. Buna paralel olarak ta maya türlerinin endüstriyel üretiminde ve fermantasyon teknolojisinde çok gelişmiş ve günümüzde Dünya’da hatırı sayılır bir pazar payına sahip konuma gelmiştir. Şarap mayasında ise durum ekmek mayasının tam aksidir ve Türkiye endüstriyel şarap üretiminde kullanılan mayaların tamamını yurt dışından almaktadır. Bir diğer deyişle, şarap mayasında tümüyle bir dışa bağımlılık söz konusudur.

Bağcılık bakımından Dünyanın en önemli iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkemiz çok eski ve köklü bir bağcılık kültürüne sahiptir. Uygun ekolojik (iklim, toprak) koşullar yanında, sahip olduğu zengin üzüm gen potansiyeli ile, Türkiye Dünya’da önemli bir bağcılık merkezi konumundadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2020 verilerine göre, ülkemizde 400.998 hektar bağ alanında, 4.208.908 ton üzüm üretimi gerçekleşmiştir. Üretilen üzümün %52,7’si sofralık, %36,5’i kurutmalık ve %10,8’i şaraplık üzüm olarak değerlendirilmektedir (Türkiye İstatistik Kurumu, 2021). Bağcılık bölgemizde ve ülkemizde tarımla uğraşan önemli bir kesimin temel geçim kaynağıdır. Bu nedenlerden dolayıdır ki üzüm ülkemiz açısından ekonomik potansiyeli en yüksek meyvelerin başında gelir.

Turizmin gelişmesine paralel olarak, şarap üretimi de hatırı sayılır şekilde artış göstermektedir. Ülkemizde, 2018 verilerine göre 64,4 milyon litre şarap üretilmektedir. Türk şaraplarının 2,6 milyon litresi ihrac edilirken, 1,8 milyon litre şarap ta ithal edilmektedir (Anonim 2021b). Şaraptaki ihracat verileri Türk şaraplarına yurt dışında ilgi ve talep oluştuğunu gösterirken, ithal verileri kaliteli şaraplara ülke içinde de talep oluştuğunu göstermektedir. Turizmde yüksek gelir grubuna verilen yiyecek/içecek hizmeti içinde iyi kalitede Türk şaraplarının yer almaya başlaması ihracat ile doğru orantılı olmuştur.

Yurt dışından ithal edilen şaraplarda kullanılan pek çok yabancı üzüm ülkemizde yetiştirilmeye başlanmış ve gittikçe artan bir şekilde yerli üretimde bu üzümlerin kullanıldığı görülmeye başlanmıştır. Türk şarapları pek çok uluslararası yarışmada ödüller almakta ve takdir görmektedir. Bununla birlikte kaliteli şarapların da gittikçe birbirine benzemeye başladığı değerlendirilmeleri yapılmaktadır. Bu değerlendirmenin, kolay algılanamayan bir nedeni vardır: Her ne kadar kaliteli bir şarabın en önemli etkeni kullanılan üzüm ve onun nasıl yetiştirildiği olsa da, kullanılan mayanın fermentasyon çıktıları da oldukça önemlidir. Sonuçta şırayı şaraba

dönüştüren mayadır ve mayanın fermentasyon sırasında oluşturduğu kimyasallar (metabolitler) şarabın tat ve kokusunda üzüm kadar öneme sahiptir. Mayanın şarap kalitesine ve özgün tat ve kokusuna olan katkısı genellikle göz ardı edilmekte ve standart maya kültürleri yurt dışından getirtilerek ülkemizde endüstriyel şarapçılıkta kullanılmaktadır. Böylece zaman içinde bütün üreticilerin şarapları birbirine benzer karakterler göstermeye başlamıştır. İthal edilen sınırlı sayıda maya starter kültürü ile çok farklı karakterlere sahip, özgün şarapların üretimini beklemek mümkün değildir.

Bu çalışmada, otokton mayaların izolasyonu için konak birey olarak Papazkarası üzümlerinin seçilmesindeki neden, Trakya bölgesinin yerli ve antik üzüm çeşidi oluşudur. Trakya sınırları içerisinde çok fazla sayıda ve farklı özellikler taşıyan Papazkarası bağı bulunmaktadır. Ayrıca yaşlı Papazkarası bağlarının sayısı da oldukça fazladır. Coğrafi şekiller, yükselti, iklim, aynı bağda yetiştirilen diğer üzüm çeşitlerinin varlığı, toprak yapısı, bağın yaşı gibi unsurlar konak birey üzerindeki maya popülasyonu ve çeşidi üzerindeki en önemli etmenlerden biri olduğundan bu çalışmada Trakya bölgesinde farklı özellikteki Papazkarası bağlarından hasat edilen üzümler kullanılmıştır. Böylece yerel özellikleri tümüyle yansıtabilecek Trakya yöresine özgü teruar şarapların yapılmasına olanak verilebilecek ve ülkemizin yerli şarap mayası çeşitliliğine katkı sağlanabilecektir. Böylelikle özellikle yüksek kalitede şarapların yurtdışındaki temsilinde daha özgün yerel tatlar yakalanabilecek olup bu durumun, ülkemiz şarapçılığının pazar payında yükseliş elde etmesinin önünün açılmasına katkısı olacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Saccharomyces cerevisiae* Türü Mayalar

Saccharomyces cinsi mayalar dünyada üzerine en fazla çalışma yapılmış mikroorganizmalardandır. *S. cerevisiae* ve yakın akrabaları, uzun yıllardır alkollü içecek ve fırıncılık ürünleri v.s. yapımında kullanılmaktadır. Günümüzde pazar payı ve değeri oldukça fazladır (Spencer ve Spencer, 1997).

Fermente gıdalar, Neolitik Çağ'dan bu yana insanlar tarafından tüketilmektedir. Ancak, sürecin arkasındaki olayları anlamak uzun zaman almıştır. Eskiler, fermantasyonu, cibrenin içindeki maddeler arasındaki reaksiyonlardan kaynaklanan bir kaynama olarak tanımlamışlardır. Maya hücreleri 17. yüzyılda gözlemlenmiş, ancak mayalar ve fermantasyon arasındaki ilişki bulunamamıştır. 18. yüzyılın sonları ve 19. yüzyılın başlarında, önce, fermantasyonun canlı organizmalar ile ilişkili olduğu, daha sonra da bu canlı organizmaların maya olduğu tespit edilmiştir. Mayaları canlı organizma olarak tanımladıktan sonra, mayaların şekerler üzerindeki fermantatif aktivitesi ve fermantasyon koşulları belirlendi. Son olarak, bira mayalanmasından sorumlu olan mayalar, İngilizcede şeker mantarı anlamına gelen zuckerpliz ve Latince *Saccharomyces* olarak adlandırıldı (Çavdaroğlu, 2017).

S. cerevisiae, yüksek şeker ve düşük azot içeriği ile karakterize edilen üzüm suyunda gelişebilme yeteneğinden ötürü, alkol fermantasyonundan sorumlu temel maya türü olarak kabul edilmektedir. *S. cerevisiae* türleri yüksek miktarda etil alkol üreterek, *Saccharomyces* dışındaki mayaların gelişimini inhibe etmekte ve şıra fermantasyonu boyunca baskın hale gelmektedirler (Cocolin, Pepe, Comitini, Comi, Ciani, 2004).

Saccharomycetaceae, mantar familyasına bağlı bir maya cinsi olan *Saccharomyces* en basit ökaryot olduğundan, yüksek ökaryotik organizmalar için model organizma olarak yoğun bir şekilde gözlenmiştir ve çalışılmıştır (Michels, 2002; Replansky, Koufopanou, Greig, Bell, 2008). *Saccharomyces* bir glukofilik mikroorganizmadır, bu nedenle üzüm şirasının içinde bulunan fruktoz ve glikozdan glikozu tercih eder ve glikoz tükendiğinde fruktoz kullanır (Tronchoni, Gamero, Arroyo-López, Barrio, Querol, 2009).

Saccharomyces cerevisiae türü mayalar fermantasyon esnasında azotlu bileşiklere de ihtiyaç duyarlar. Bu mikroorganizmaların azot kullanımı yaygın olarak araştırılmış ve bazı azot kaynakları için tercihleri açıklanmıştır, *S. cerevisiae* için tercih edilen azot kaynaklarının glutamik asit, aspartik asit, sparagin, glutamin, serin, treonin, lisin ve arginin olduğu

belirlenmiştir. Bu amino asitler tercih edilen olarak kabul edilirler, çünkü kullanılan ortamda mevcutlarsa diğer amino asitlerden önce alınırlar (Jones ve Pierce, 1964).

2.2. Üzüm Tanelerindeki Maya Ekolojisi

Mayalar doğada her yerde bulunurlar. Ancak rastlantısal olarak ortaya çıkmazlar. Her maya türü kendine özgü habitatlarda ortaya çıkar ve kendi topluluklarını oluştururlar. Bir habitatta bulunan farklı türler ya otokondur (toplumun temel bileşenleri olanlar) ya da allokton (geçici olan ya da tesadüfen olanlar) olabilir. Maya toplulukları içindeki bileşen türleri, nişlerin, yani mayanın yaşaması ve büyümesi için gereken fiziksel, kimyasal ve biyotik özellikleri ile tanımlanmaktadır (Lachance ve Starmer, 1998).

Üzüm, zengin bir besleyici ortamdır, ancak düşük pH, yüksek ozmotik basınç ve SO₂'nin kullanımı, iyi bir besi ortamı özelliğine sahip olma becerisini olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca üzümün depolandığı yerler ve şarap yapımında kullanılan alet ekipmanın yüzeyleri, üzümle sürekli temas nedeniyle çok sayıda mikroorganizmayı barındırabilir. Ortam hijyeni sonuç olarak bu hususta büyük bir rol oynar (Jolly vd., 2006).

Üzümlerin mikroflorası bir dizi faktörden etkilenir. Bunlar arasında bağ irtifası ve yönü, iklim koşulları (sıcaklık, yağış, nem, deniz etkisi), üzüm çeşidi (üzüm çeşidi, üzüm kabuğu kalınlığı), bağcılık uygulamaları (gübreleme, sulama, kanopi yönetimi, fungusit kullanımı, elementel kükürt kullanımı, üzümün gelişim evresi, üzüm sağlığı (çilek hasadı, böcek zararlıları) ve şaraphane atık bertaraf uygulamaları vardır (Epifanio, Gutierrez, Santamaria, López, 1999). Üzümün örneklendiği (tane veya salkım) ve işleniş (yıkama veya kırma) usulü, hangi mayaların izole edileceğini de belirleyebilir (Martini, Ciani, Scorzetti, 1996). Salkım sapına doğru kısımdaki maya hücreleri sayısı, salkımın orta ve alt kısımlarındaki maya hücreleri sayısından daha fazladır (Rosini, Federici, Martini, 1982).

Üzüm ve şarap ekosistemi ile ilişkili oldukları belirtilen mayalar 16 farklı maya cinsi içerisinde sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar; *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea* ve *Zygosaccharomyces* cinsleridir (Raspor, Milek, Polanc, Možina, Čadež, 2006).

Üzümler, şarap üretilen ortamlarda bulunan mayaların en önemli kaynağı olarak kabul edilmektedirler. Buna bağlı olarak üzümlerde gerçekleşen ekolojik etkileşimler şaraphanede

gözlenen maya türü dağılımını doğrudan etkilemektedir. Üzüm tanelerindeki maya florası ve yükü; üzüm çeşidi, üzümün hasat zamanındaki olgunluğu, sıcaklık ve yağış miktarı gibi iklim koşulları, üzüm bağının coğrafi yeri, üzümün yetiştirildiği toprak çeşidi, üzümlerdeki fiziksel hasar durumu ve antifungal uygulamaları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Schuller, Alves, Dequin, Casal, 2005).

Olgunlaşmamış üzüm tanelerinde genellikle çok az sayıda ($10-10^3$ kob/g) mayaya rastlanmaktadır. Fakat bu sayının üzüm olgunlaştıkça ve hasat dönemine yaklaşıldıkça 10^4-10^6 kob/g düzeyine ulaştığı belirtilmektedir. Olgunlaşma sırasında şekerlerin üzümün iç dokularından yüzeye doğru sızarak veya difüze olarak maya gelişmesini teşvik ettiği ifade edilmektedir. Olgunlaşmamış üzümlerde *Rhodotorula*, *Cryptococcus* ve *Candida* türleri ile maya benzeri bir küf olan *Aureobasidium pullulans*'ın daha çok bulunduğu belirtilmektedir. Bağda, mayaların topraktan üzüme çeşitli böcekler (*Drosophila* spp., bal arısı, yaban arısı, vb.) veya rüzgar aracılığı ile taşınabildikleri bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan tüm çalışmalarda, sağlıklı üzümlerdeki mayaların *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apiculata* türleri ile *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula* cinsleri içerisinde yer alan oksidatif türler oldukları bildirilmektedir. Bu maya popülasyonunun %60'dan fazlasını *K. apiculata* veya onun askospor oluşturan telemorfu olan *Hsp. uvarum* türlerinin oluşturdukları belirtilmektedir (Fleet, 2003).

Fransanın güney kesiminde yapılan bir çalışmada, şarap imalathanelerinin bağlarından veya yakınlarındaki bağlardan üzümleri 5 yıl boyunca toplamış ve bu topladıkları üzümlerdeki şarap mayalarını incelemişlerdir. Çalışmanın neticesinde toplamda 106 üzüm örneğinden 608 *Saccharomyces* cinsi maya izole etmişler ve 104 farklı kromozom kalıbı bulmuşlardır. Bu çalışmada bağ alanının yüksekliği, iklimi, boyutu ve yaşının, otokton maya çeşitliliği üzerindeki etkisinin ticari maya kullanımının etkisinden daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır (Valero, Cambon, Schuller, Casal, Dequin, 2007).

Yayınlanan bir diğer çalışmada ise iki ardışık sene boyunca aynı bağdaki üzümler olgunluk dönemlerinde hasat edilmişlerdir. Toplanan üzümler ile spontan fermantasyonlar gerçekleştirilmiştir. Fermantasyonların 3-5-8 ve 12. günlerinde fermantasyon şirasından alınan örnekler değerlendirilmiştir. Ekimi yapılarak saflaştırılan 21 *Saccharomyces* cinsi maya suşundan 3 tanesinin fermentasyon boyunca baskın olduğu ve baskın genotiplerin eşzamanlı olarak ortamda var olabildikleri görülmüştür (Guillamón, Sabaté, Barrio, Cano, Querol, 1998).

Genel olarak üzümler üzerindeki maya yoğunluğu ve çeşitliliğinin tüm Dünyada benzerlik göstermesine rağmen bağ alanının coğrafik konumuna ve mikroklimatik şartlara göre maya popülasyonlarının profillerinin değişebildiği yapılan çalışmalar ışığında bilinen bir gerçektir (Longo, Cansado, Agrelo, Villa, 1991).

Ayrıca bağın yüksekliği ve cephesi gibi coğrafik koşullar, sıcaklık, yağış miktarı ve nem gibi iklim koşulları, sulama, gübreleme, pestisit ve fungusit kullanımı gibi vitikültürel çalışmalarla birlikte üzüm varyetesi gibi bazı dış faktörlerin üzümlerin barındırdığı yüzey mikroflorasını etkilediği gözlemlenmiştir (Pretorius, 2000)

2.3. Şarap Fermentasyonunda Yer Alan Mayaların Kalite Üzerine Etkileri

Mayalar, şarap fermentasyonu sırasında gerçekleştirdikleri alkol fermentasyonu ile şarap aromasının oluşumundaki en önemli aktivitelerini yerine getirmektedirler. Mayalar bu etkiyi, sahip oldukları çeşitli mekanizmalar yolu ile gerçekleştirmektedirler. Bu mekanizmalar arasında;

- Üzüm suyu bileşenlerini kullanma,
- Üzüm yapısından aroma bileşenlerini ekstrakte etmeye yardımcı olan etanol ve diğer çözücülerini üretme,
- Aroması nötral üzüm bileşenlerini aroma aktif bileşenlere dönüştüren enzimleri üretme,
- Birçok aroma aktif ikincil metabolitleri üretme,
- Ölü maya hücrelerinin otolitik olarak parçalanmasını sağlama yer almaktadır.

Şarap fermentasyonu, farklı maya türleri ve suşlarının birlikte gelişmeleri ve biyokimyasal aktiviteleri ile oluşan karmaşık bir ekosistemdir. Bu mayaların kaynağının; üzüm florası, şaraphane yüzeyleri ile çevresi (örneğin hava, böcekler) ve eğer kullanılıyorsa eklenen starter kültür olabileceği belirtilmektedir (Fleet, 2003).

Geleneksel; spontan şarap fermentasyonu, başlangıçta üzüm şirasında bulunan şarap mayaları tarafından gerçekleştirilmektedir. Üzüm şirasında gerçekleşen spontan alkol fermentasyonu, temel şarap mayası olarak kabul edilen *S. cerevisiae*'nin dışında, üzümlerde, şırada ve şarapta bulunan ve şarap aromasına katkıda bulunan farklı maya cinsleri ve türlerinin sıra ile katıldıkları karmaşık bir işlem olarak tanımlanmaktadır (Romano, Fiore, Paraggio, Caruso, Capece, 2003).

Şarap mayaları, özellikle *S. cerevisiae* ve onunla ilişkili türlerin üzüm sırasındaki şekerlerin fermantasyonunda önemli role sahip oldukları bilinmektedir. *S. cerevisiae* üzüm sırasında güçlü fermantasyon kapasitesine sahip olduğu ve hoş bir fermantasyon bukesi üretebildiği için şarap fermantasyonlarında tercih edilmekte ve genellikle “şarap mayası” olarak adlandırılmaktadır. Fermantasyon bir kez başladığında, oluşan anaerobik koşullar şıradaki seçici özelliklere katkıda bulunmakta ve küfler ile asetik asit bakterileri gibi fermantatif metabolizmaya sahip olmayan mikroorganizmalar inhibe olmaktadır. Fermantasyon ilerledikçe şıradaki bulunan besin öğeleri tükenmekte ve etanol derişimi artarak etanole duyarlı türlerin inhibisyonu gerçekleşmektedir. 20.yy’da şarap üretilen çeşitli bölgelerde gerçekleştirilen araştırmalarda, şıra mikroflorasında *S. cerevisiae*’nın yanısıra diğer maya türlerinin de bulunduğu rapor edilmektedir. *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Candida*, *Metschnikowia* ve *Debaryomyces* cinsi mayaların, üzümlerin yanısıra şıradan da sıklıkla izole edildikleri bildirilmektedir (Dequin, Salmon, Nguyen, Blondin, 2003).

Alkol fermantasyonunun ilk aşamalarında düşük fermantasyon güçleri ile karakterize edilen *Saccharomyces* cinsi dışındaki maya türleri baskın olmaktadır. Üzüm sırasının spontan yolla fermantasyonu sırasında, *H. uvarum* gibi *Saccharomyces* olmayan mayaların başlangıçta çok miktarda bulunduğu ve fermantasyonu başlattıkları ifade edilmektedir (Aktan ve Kalkan, 2000). Ayrıca *Metschnikowia pulcherrima* (*Candida pulcherrima*), *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), *Candida stellata*, *Pichia spp.*, *Issatchenkia spp.*, *Kluyveromyces spp.* gibi mayaların da fermantasyonun başlangıcına önemli düzeyde katıldıkları ve sayılarının 10^6 - 10^7 kob/ml’ye ulaştığı bildirilmektedir. *Saccharomyces* cinsi olmayan mayalar, fermantasyonun başlangıç evrelerinde toplam maya popülasyonunun %50 - 75’ini oluşturmaktadırlar. Başlangıçta *Saccharomyces* cinsi mayaların konsantrasyonu 50 - $2,5 \times 10^5$ kob/ml arasındadır (Nissen, 2003).

Apiculate mayalarının, genellikle *S. cerevisiae*’nın daha kolay geliştiği %3-5 etanol düzeyine ulaşıncaya kadar fermantasyonda baskın durumda oldukları ifade edilmektedir. Üzüm sırasının spontan fermantasyonunun düşük alkol toleranslı *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayalar ile başlamasının nedeni, bu mayaların üzümlerin yüzeyinde baskın olmalarından kaynaklanmaktadır (Ciani, Beco, Comitini, 2006).

Fermantasyonun sonraki aşamalarında apiculate mayalarının yerini *S. cerevisiae*’nın almasının, apiculate mayalarının düşük etanol toleransları ve şıradaki bulunan bütün şekerleri fermente edememeleri ile ilgili olduğu bildirilmektedir (Rainieri ve Pretorius, 2000). Bu

koşullar altında etanolü daha çok tolere edebilen ve yüksek şeker derişimine sahip ortamlarda daha yarışıl gelişme gösterebilen *S. cerevisiae* suşları ile onunla ilgili türlerin daha baskın mayalar olarak ortaya çıktıkları (10^7 - 10^8 kob/ml) ve fermantasyon işlemini tamamladıkları bilinmektedir. Fermantasyonun sonlarına doğru *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces uvarum*, *Hansenula anomala* ve *Pichia fermentans* gibi maya türlerinin de ortamda buldukları bildirilmektedir (Romano vd., 2003). Ayrıca *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces ludwigii*, *M. pulcherrima* ve bazı *Schizosaccharomyces* ve *Brettanomyces* türleri gibi birçok mayanın da bu koşullarda gelişebildikleri ifade edilmektedir (Rainieri ve Pretorius, 2000).

Düşük sıcaklıkta fermantasyon gibi bazı enolojik uygulamaların, *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların fermantasyona katılımını arttırabileceği belirtilmektedir (Fleet ve Heard, 2002). 15-20 °C'nin altındaki fermantasyonlarda bu mayaların etanole duyarlılıklarının azaldığı ve özellikle *Hanseniaspora* ve *Candida* türlerinin fermantasyona katılımlarının arttığı bildirilmektedir. Bu tür durumlarda bu mayaların fermantasyonun sonuna kadar *S. cerevisiae* ile birlikte baskın florada yer alabildikleri ve şarap aroması üzerinde daha çok etkileri olduğu ifade edilmektedir. (Erten, 2002).

Saccharomyces cinsi dışındaki maya türlerinin fazla miktarda gelişmelerinin ise; şarapların kimyasal bileşimi ve duyuşal kalitesi üzerinde etkileri olabileceği bildirilmektedir. Bu mayaların, 10^6 - 10^7 kob/ml düzeyine erişebildikleri için fermantasyona katılabildikleri ve *Saccharomyces* mayalarının gelişme kinetiklerini ve metabolizmalarını etkileyebildikleri bildirilmektedir. *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların aerobik gelişmenin yanısıra anaerobik gelişme de gösterebildikleri ve fermantasyon sırasında ortamda bulunarak besinsel öğeler için *Saccharomyces* cinsi mayalar ile rekabet ettikleri, etanol ve karbondioksitin yanısıra şarabın son bukesi üzerinde etkili yüksek alkoller, esterler, asitler ve karbonil bileşikleri olarak bilinen ikincil bileşikleri üretebildikleri bilinmektedir. (Zohre ve Erten, 2002). Ancak *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların yüksek miktarda asetik asit, etil asetat veya diğer uygun olmayan bileşikleri üreterek şarap kalitesini olumsuz yönde etkileyebilecekleri de ifade edilmektedir. Buna karşılık bazı şarap üreticileri, yabancı mayaların şarap aromasına katkıda bulunabileceklerini düşünerek spontan fermantasyon uygulamasına devam etmektedirler (Romano vd., 2003).

Mayaların şarap kalitesi açısından önemleri anlaşıldıktan sonra, tek bir hücreden üretilen mayaların izolasyonu için yeni bir teknik geliştirme yoluna gidilmiştir. 1890 yılında,

Muller-Thurgau tarafından yapılan bir çalışmada saf bir maya kültürü üzüm suyuna aşılanarak şarap üretildiği belirtilmektedir. Daha sonraki aşamalarda ise; maya suşlarının seçilmesi ve fermantasyonlarda starter kültür olarak kullanılmak üzere ticarileştirilmesinin gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu şekilde elde edilen bir starter kültür kullanılarak şarap kalitesinin sürdürülebilirliğinin geliştiği ifade edilmektedir. Otuz yıla yakın bir süredir Avusturalya, Güney Afrika ve ABD gibi şarap üreticisi ülkelerde, geleneksel şarap üretim tekniğinin modifiye edilerek, özellikle büyük kapasiteli şarap üretimlerinde üzüm suyuna *S. cerevisiae* kültürü aşılama tekniğinin kullanıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, çoğu şarap üreticisinin hala spontan yol ile şarap üretimini tercih ettikleri görülmektedir. Ayrıca Avrupa'daki şarap fabrikalarında doğal fermantasyonla üretimin devam ettiği ve dünyadaki şarapların %80'inin bu yöntemle üretildiği belirtilmektedir (Rainieri ve Pretorius, 2000).

Starter kültür kullanılarak yönlendirilmiş şarap fermantasyonlarının en önemli olumsuz özellikleri arasında, çok sayıda ticari şarap mayası olmasına rağmen bu kültürler kullanıldığında alışlagelmiş özelliklere sahip şarap üretilmesi yer almaktadır. Ticari maya suşları ile orta kalitede şarap üretilebildiği ve bu mayaların özel coğrafi bölgelerden izole edilen mayalara özgü aromatik özellikleri geliştiremedikleri belirtilmektedir. Bu sorunu çözebilecek şarap mayalarının geliştirilmesi ve seçimi üzerine yapılan çalışmaların ise hala devam ettikleri gözlenmektedir (Raspor vd., 2006).

2.4. Şarap Yapımında Otokton Mayaların Kullanımının Önemi

Üzüm suyundan şarap elde edilmesi, yıllar boyu süregelen ve kendi endüstrisini oluşturmuştur. Şarap üretimi yoğun bir şekilde ticarileştirilmeden önce, şarap üretimi üzümlerin mikroflorası tarafından gerçekleştirilen doğal fermantasyon sonucu elde ediliyordu. Etanol üretiminden sorumlu olan mikroorganizmalar, 19. yüzyılın ikinci yarısında maya olarak tanımlanmıştır (Demain ve Solomon, 1981).

Üzümün çeşidi, yetiştirildiği corafya ve yetiştiriliş koşulları, üzüm mikroflorası gibi bazı faktörler şarabın aroma ve kalitesine doğrudan etki etmektedir. *S. cerevisiae*'nin şarap yapımcılığındaki önemi uzun zamandan beri ortaya çıktığından, fermantasyonda ticari maya kültürlerinin kullanılması, yeniden üretilebilir bir ürünün sağlanması ve şarap bozulma riskinin azaltılması için günümüzde sıradan bir uygulama olmuştur. Bununla birlikte, bu uygulama, yerel mikrofloranın sürekli olarak baskılanmasına ve bunun sonucu olarak, mikrobiyolojik çeşitliliğin azalmasına neden olmakta, şarabın tipikliğini ve kompleks aroma yapısının kaybını beraberinde getirmektedir. Tüm bunlar göz önüne alındığında üzümdeki otokton maya

suşlarının belirlenmesi ve bilinmesi, şarap yapımında en aktif şekilde görev alan suşların korunmasına ve kullanılmasına yardımcı olacaktır (Tristezza vd., 2014).

“Teruar”, tanımlanabilir fiziksel ve biyolojik çevre ile tarımsal ve oenolojik uygulamalar arasındaki etkileşimden kaynaklı olarak yetiştirilen meyvenin kendine has özellikte olmasını sağlayan bir bölgeyi ifade eder (Anonim, 2021c). Bu varsayım, tüketicilerin tercihlerini yönlendirdikleri için şarap piyasası üzerinde güçlü bir etkisi olan tüm dünyadaki menşe ismi sistemlerinin temelidir. Otokokton mikroorganizmaların seçimi ve kullanımı, yerli üzüm çeşitlerinden üretilen şarabın organoleptik ve duyuşsal özelliklerini geliştirmek için güçlü bir araç olabilir (Rodríguez vd., 2010) Ayrıca otokokton mayalar, teruarın ve üzüm çeşidinin belirlediği spesifik şıralara daha iyi adapte olabilme özelliği göstermektedir (Bokulich, Thorngate, Richardson, Mills, 2014). Şarap yapma kaliteleri yüksek mayalar direkt olarak üzümünden veya spontan fermente edilen şıralardan izole edilip tanımlanır ve elde edilen mayaların özellikleri, uzun süre alan şarap üretim proseslerinde kullanılmadan öncesi, test edilir. Günümüze kadar olan süreçte yüksek kalitede şarap yapabilme özelliği olan endojen *S. cerevisiae* suşlarını izole etmek, seçmek ve şarap yapımında kullanmak için çok sayıda araştırmalar yapılmıştır (Furdíková, Makyšová, Ďurčanská, Špánik, Malík, 2014).

2.5. Maya Hücrelerinin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Tanımlanması

2.5.1. İzolasyon ve Saflaştırma

Spontan bir işlemede, üzüm suyu fermantasyonu, hem üzümlere hem de mahzen ortamına bağlı, yabancı otokton mayalarının karışık popülasyonları ile gerçekleştirilir. Bu otokton mikrofloranın bolluğu ve bileşimi art arda yıllar boyunca değiştiğinden, spontan fermantasyonun şarap aroması ve tat üzerinde genellikle tutarlı olmayan bir etkisi vardır ve fermantasyon işlemlerinin başlangıcı ve süresiyle ilgili olarak öngörülebilirlik eksikliğine neden olur (Gutiérrez, Santamaria, Epifanio, Garijo, López, 1999).

Maya ekolojisi ile ilgili yapılan ilk çalışmalar Pasteur tarafından ortaya konulmuştur. Pasteur şıra fermantasyonundan sorumlu mikroorganizmaların kaynağının olgun üzüm salkımları olduğu hipotezini ortaya koymuştur (Pasteur, 1872). Daha sonra, Hansen (1881), kışı toprak üzerinde geçiren şarap mayalarının yazın rüzgar ve çeşitli hava akımları ile üzüm salkımlarına geçtiğini ve oradan da şıraya girdiği fikri ile ortaya çıkmıştır. Böylece Şarap mayalarının ana kaynağının üzüm bağları olduğu sonucuna varılabilir.

Mayaların izolasyonu direkt olarak üzüm salkımlarından yapılabileceği gibi fermentasyonun çeşitli aşamalarında da yapılabilir (Mannazzu, Clementi, Ciani, 2002). Ancak *Saccharomyces* mayaların üzüm salkımı üzerindeki popülasyonu çok az olduğundan, genellikle fermentasyonun belirli aşamalarında izole edilmeleri tercih edilir. Şıradaki etanol oranı %5'i geçtikten sonra *Saccharomyces* mayalar baskın hale gelmeye başlar (Clemente-Jimenez, Mingorance-Cazorla, Martínez-Rodríguez, Heras-Vázquez, Rodríguez-Vico, 2004). Üzüm tanelerindeki maya yoğunluğu, olgunlaşmamış üzüm tanelerinde $10-10^3$ kob/g iken olgunlaşan tanelerde 10^4-10^6 kob/g şeklindedir (Schuller vd., 2005).

Güney İtalya'daki Apulia Bölgesi'nin yerel ve antik üzümü olan "Susumaniello" üzümleri ile yapılan bir araştırmada maya izolasyonu, şıradaki fermentasyonun bittiğine emin olunduktan sonra yapılmıştır. H₂S salınımı az olduğu tespit edilen 200 suş arasından rastgele alınıp saflaştırılan 72 adet suş bazı teknolojik testlere sokulmuş ve çalışma sonucunda 5 *Saccharomyces* suşunun şarap yapmaya elverişli suş olduğu görülmüştür (Tristezza vd., 2014).

Slovakya bölgesinde yetişen Pinot Gris üzümlerinin şirasının 14 gün boyunca spontan fermentasyona bırakıldıktan sonra, fermante şıradan izole edilen *Saccharomyces* cinsi mayaların starter kültür olarak kullanılarak yine aynı bağa ait Pinot Gris üzümlerinin, izole edilen yerel mayalar ve ticari *Saccharomyces* cinsi mayalar ile ayrı ayrı fermentasyona bırakılması şeklinde gerçekleştirilen bir çalışmada, izole edilen otokton mayaların şıraya, ticari *Saccharomyces cinsi* mayalardan, daha iyi adaptasyon sağladığı ve duysal kalitesi daha iyi şarapların ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Schvarczová, Stefaniková, Jankura, Kolek, 2017).

2.5.2. Tanımlama

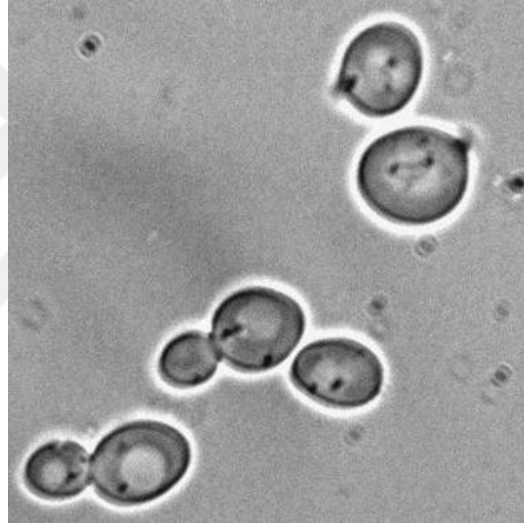
2.5.2.1. Sitoloji

Saccharomyces mayaların, mitotik bir görünümle tanımlanması neredeyse tüm bilimsel çevrelerin üzerinde hemfikir olduğu bir durumdur (Mundkur, 1954). Hücre, periplazmik boşluk ve protoplazma olan iki kılıftan oluşur. Hücre, hücre çeperi, plazmik membran, sitoplazma, organeller ve çekirdeği içerir. Hücre duvarı, ozmotik basınca karşı koruma ve organeller arası organizasyonu sağlayan, hücreye sertlik veren, etkileşimler için bir alan görevi üstlenen, çeşitli fonksiyonlara sahip dinamik ve çok işlevli bir organeldir. Hücre duvarı, hücrenin kuru ağırlığının %15-25'ini temsil eder.

Mayaların plazmik zarı, periplazmik boşluk ve hücrenin çevre ortamı arasında malzeme alışverişi sağlar. Glikoz ve argininin plazmik zara nüfuz etme hızı, membran ATPaz

aktivitesindeki azalmanın bir sonucu olarak etanol varlığında yavaşlar. Sıcaklık ve etanol, membran ATPaz aktivitesi üzerinde sinerjik etki gösterir, sıcaklık arttıkça etanolün enzim aktivitesi üzerindeki etkisi artar. Plazmik membran, çevresel uyarıcılar hakkında bilgi sağlayan reseptör proteinlerini barındırır. Sitoplazma, su ve glikojen, glikoliz ve alkolik fermantasyon enzimleri gibi çözünen maddelerden oluşan pH 5-6 ile tamponlanmış bir çözeltidir.

Hücre çekirdeği geçici gözenekleri sayesinde hücre içinde sürekli yer değiştiren 1-2 mikrometre çapında küresel bir organeldir. *S. cerevisiae*'nin DNA uzunluğu haploid yapıda yaklaşık 14.000 kb'dir. Çekirdekdeki DNA kromozomlar halinde düzenlenir. *S. cerevisiae*, 200 ila 2000 kb arasında değişen boyutlarda 16 kromozom içerir. *S. cerevisiae*'nin mikroskop altındaki görüntüsü şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1: *S. cerevisiae* hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü

Maya suşlarının bazıları, diğer hassas maya suşlarını öldürme kabiliyetine sahip proteinik toksinler üretme kabiliyetine sahiptir. Bu üretici suşlar “öldürücü suşlar” (killer), toksinlere dirençli olmayan suşlar ise “hassas suşlar” (sensitive) olarak adlandırılır. Bu toksinlere karşı dirençli olan ancak bu toksinleri üretmeyen suşlar da mevcuttur.

2.5.2.2. Taksonomi

Mikrobiyal hücrelerin tanımlanmasını iki madde altında sayabiliriz. Bunlardan ilki morfolojik taksonomidir. *Saccharomyces* cinsi mayalar 2-8µm eninde ve 3-15 µm boyundadır. Çoğalma sadece tomurcuklanma ile olur. Hücreler küresel, elipsoit, silindirik veya elegant şekildedir. Psödomisel oluşabilir. Uzun süre subkültür halinde bırakıldığı zaman zar yapabilir.

Askuslar genellikle 1-4, çok ender olarak daha fazla spor içerir. Fermentasyon becerisine sahiptirler. Laktoz ve yüksek parafinleri parçalayamazlar. Başta alkol ve alkollü içkiler, ekmek, yem ve besin mayası üretiminde olmak üzere birçok endüstride adı geçen mayalar bu cinse aittirler (Aktan ve Kalkan, 2000). *S. cerevisiae*'nin petri kabındaki görüntüsü şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2: *S. cerevisiae* mayasının oluşturduğu kolonilerin petri kabındaki görünümü

Geleneksel morfolojik, kültürel, biyokimyasal ve moleküler teknikler, farklı maya türlerini tanımlamak için kullanılıyordu (Chavan vd., 2009). Ancak Fenotipik karakterizasyon, benzer özelliklere sahip maya türlerinin tanımlanması için yeterli değildir. Moleküler teknikler, mikroorganizmaların tanımlanması ve karakterizasyonu için biyokimyasal yöntemlerin alternatifleridir (Bernardi, Pereira, Cardoso, Dias, Schwan, 2008).

Tomurcuklanan *Saccharomyces cerevisiae*, bir ökaryottan ilk tamamen sekans analizi yapılan genom olmuştur. 1996 yılında, dünya çapında yüzlerce araştırmacının çalışması olarak piyasaya sürülmüştür. O zamandan beri, maya genomu tüm dünyadaki genetikçiler, moleküler biyologlar ve bilim insanları tarafından yoğun bir şekilde incelenmiştir. Genom dizisinin bakımı ve açıklamaları uzun zamandan beri orijinal model organizma veritabanlarından biri olan *Saccharomyces* Genome Database tarafından sağlanmaktadır. Ökaryotik genom anlayışımızı derinleştirmek için, *S. cerevisiae*'nin S288C suşu referans genom sekansı, son günlerde, 1996'dan bu yana ilk büyük güncellemesini yaşamıştır. "S288C 2010" olarak adlandırılan yeni versiyon, tek bir maya kolonisinden, modern sekanslama teknolojileri kullanılarak belirlenmiştir (Engel vd., 2014).

2.6. Şarap Üretimine Uygun Mayaların Seçilmesi

Şarap mayalarında aranan en önemli teknolojik özellikler aşağıdaki gibi sıralanmaktadır;

- yüksek alkol konsantrasyonuna dayanıklı olmalı,
- şıradaki şeker miktarına uyumlu oranda etil alkol oluşturmalı,
- şıradaki indirgen şekerlerin tamamını fermente edebilmeli,
- fermantasyon hızı yüksek olmalı,
- kükürt dioksite dayanıklı olmalı,
- yüksek sıcaklıkta gelişebilmeli,
- düşük seviyede uçar asit oluşturmalı,
- düşük seviyede kükürt oluşturmalı,
- düşük seviyede hidrojen sülfür oluşturmalı,
- düşük seviyede köpük oluşturmalı,
- fermantasyondan sonra kolayca dibe çökmeli,
- sınırlı seviyede yüksek alkol oluşturmalıdır (Nikolaou, Soufleros, Bouloumpasi, Tzanetakı, 2006).

Şarap üretiminde kullanılmak üzere seçilen şarap mayalarının, endüstriyel şarap üretimi için uygun olmalarını sağlayacak bazı teknolojik özelliklere sahip olmaları gerekmekte ve bu teknolojik özelliklerin belirlenmesi fermantasyon prosesinin verimliliği açısından oldukça önem taşımaktadır. Teknolojik özelliklerin birçoğu maya suşları içinde büyük oranda farklılık göstermektedir. Bu nedenle, tüm izolatlardaki teknolojik özellikler mutlaka belirlenmelidir (Lopes, Rodríguez, Querol, Bramardi, Caballero, 2006)

Lopes, Rodríguez, Sangorrín, Querol, Caballero, (2007), bölgesel Kuzey Patagonya kırmızı şarabı yapımında starter kültür olarak kullanılacak *S. cerevisiae* türü maya izole etmek için yaptıkları çalışmada fermante edilmiş şıralardan izole ettikleri mayalar için öldürücü etkileşimlere dayalı fizyolojik, teknolojik ve ekolojik kriterlere göre geliştirilmiş iki aşamalı bir seçim protokolü kullanmışlardır. Bu metodolojiyi takiben, seçilen 32 izolat arasından *S. cerevisiae* türüne ait MMf9 izolatu, Kuzey Patagonya yerel kırmızı şarabı için starter kültür mayası olarak seçilmiştir. Bu izolatu starter kültür olarak kullanıldığı şaraplar, yüksek fermentatif güç ve düşük uçucu asit üretimi, düşük köpük ve düşük sülfür üretimi dahil olmak üzere üst düzey teknolojik ve kalitatif özellikler göstermiştir.

Ünsal (2007) Kalecik Karası, Gamay ve Cabernet Sauvignon şaraplarında yaptığı çalışmada şaraplarda;

- pH değerlerini 3,63-3,96 arasında (ortalama 3,8),
- kuru madde miktarlarını %6,38-7,93 arasında (ortalama 6,7),
- toplam asitliği 5,20-6,74 g/l arasında (ortalama 5,8 g/l),
- uçucu asitliği 0,26-0,67 g/l arasında (ortalama 0,48 g/l),
- serbest SO₂ miktarlarını 6-22 mg/l arasında (ortalama 13,5 mg/l),
- toplam SO₂ miktarlarını 92-174 mg/l (ortalama 149 mg/l),
- alkol derecelerini % 11,0-12,5 arasında (ortalama %11,8),
- indirgen şeker miktarlarını 1,5-3,8 g/l (ortalama 2,3 g/l) olarak belirlemiştir.

Alkolik fermantasyonun başlangıcında, *Saccharomyces* cinsi olmayan mayalar sayıca en yüksek popülasyona ulaşır. Her ne kadar *Hanseniaspora* ve/veya *Kloeckera* normal olarak hasatta üzümlerde baskın olsa da, alkolik fermantasyonun başlangıcından sonra inhibe edilirler. *Saccharomyces* mayalar ile karşılaştırıldığında, *Saccharomyces* cinsi olmayan mayalar etanole daha düşük tolerans gösterir. Etanol miktarı ortamda hacmen %5'e ulaştığında, *Saccharomyces* cinsi olmayan mayaların inhibisyona uğradığı görülmüştür (Deak, 2008).

Bozcaada'da farklı 3 bağdan toplanan 7 çeşit üzüm (Bozcaada Çavuşu, Pembe Gemre, Kınalı Yapıncak, Cabernet Sauvignon, Kokulu Kabak, Atasarısı, Cardinal, Karalahna, Alphonse Lavallee, Karasakız) ile yapılan çalışmada üzüm tanesinden *Saccharomyces* cinsi olmayan mayalar izole edilip tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlarda üzümdeki maya çeşitliliğinin bağın yükseltisine, bağın yapısı ve bağ alanında yetiştirilen üzüm çeşitliliğine bağlı olarak değiştiği görülmüştür (Genç ve Çıldır, 2012).

Samaras vd. (2012), daha çok Patras bölgesi veya Kefalonya gibi İyonya adalarında yetiştirilen kırmızı bir üzüm olan Mavrodafni çeşitinden fermantasyon sonunda izole ettikleri mayaların şarap yapımına uygun olup olmadıklarını belirlemek üzere, bu izolatların alkol ve kükürt toleranslarını incelemiştir. İzole edip saflaştırdıkları 350 izolatın herhangi bir moleküler tanımlama yapmadan, alkol ve kükürt toleransını inceledikleri bu çalışmada araştırmacılar izolatların %14,7'sinin %17 v/v etil alkole dayandıklarını, %14 v/v etil alkole ise izolatların yarıya yakınının dayandığını belirlemiştir.

Ilieva vd. (2014), Makedonya Cumhuriyeti'nin Tikveş şarap bölgesinde yetiştirilen Vranec ve Cabernet Sauvignon üzüm çeşitlerinden 80 adet otokton maya suşu izole etmişlerdir. Maya izolasyonundan sonra 10 adet izolat seçmiş ve ardından şarap kalitesi üzerindeki etkilerini test etmek için Vranec ve Cabernet Sauvignon şaraplarının fermantasyonunu bu mayalar ile gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla alkol içeriği, toplam asit, uçar asit, indirgen şeker ve pH gibi bazı temel parametreleri incelemişlerdir. Ayrıca, toplam antosiyanin ve polifenollerin yanı sıra renk yoğunluğu ve tonunun analizini spektrofotometrik yöntemler uygulayarak gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlar, en yüksek polifenol ve antosiyanin içeriğinin Cabernet Sauvignon için F-20 maya ile fermente edilen şarap ve Vranec için F-8 mayası ile fermente edilen şarap için ölçüldüğünü göstermiştir. Genel olarak, en iyi fenolik profili ve en iyi duyuşal özellikleri gösteren bu iki maya ile en iyi şarap kalitesi elde edilmiştir.

Bilgin (2015), yaptığı çalışmada türkiyenin 9 ilinde, üzüm üzerindeki floradan maya örnekleri izole etmiştir. Bu proje kapsamında 334 maya kültüre alınmıştır. Kültüre alınan mayalar arasından şarap yapımında öne çıkan *S. cerevisiae* mayalarının yanı sıra *Ischetchenkia*, *Hanseniaspora* ve *Torulaspota* cinsleri de yer almaktadır. Çalışma sonunda 3 maya türü şarap yapımına uygun olarak belirlenmiştir.

Çelik, Erten, Darıcı, Cabaroğlu (2017), narince üzümünün spontan fermantasyonlarının belli aşamalarında izole ettikleri *Saccharomyces* cinsi ve *Saccharomyces* cinsi olmayan mayaların tanımlanması ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada izole ettikleri mayaları, 5.8 ITS rRNA bölgesinin PCR-RFLP analizi ve 26S geninin D1 / D2 alanları için sekans bilgileri ile tanımlamışlardır. Dokuz cinse ait sekiz farklı tür şu şekilde tanımlanmıştır: *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia kluyveri*, *Metschnikowia spp.*, *Pichia occidentalis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida zemplinina*, *Lachancea thermotolerance* ve *Saccharomyces cerevisiae*. *Hanseniaspora guilliermondii*, *Metschnikowia spp.*, *Pichia occidentalis* ve *Pichia kluyveri* sadece fermantasyonun erken safhasında tespit edilmiştir. Fizyolojik özellikleri, etanol, SO₂, sıcaklık, pH toleransı, H₂S üretimi, killer ve enzimatik aktivite, fermantasyon hızı, flokülasyon özellikleri, köpük, uçucu asit ve uçucu bileşik üretimi açısından test edilen izolatlardan, bir adet *Lachancea termotolerans* ve dört adet *Saccharomyces cerevisiae* suşu dikkat çekici önolojik özellikler göstermiştir.

Schvarczová vd. (2017), amacı Nitra şarap bölgesindeki (Slovakya) bir bağda bulunan yerel *S. cerevisiae* suşlarını izole etmek, karşılaştırmak ve şarap yapım süreci için en uygun

olanları seçmek olan çalışmalarında, 2012–2015 yılları arasında, Pinot Gris üzüm çeşidinin olgunluk dönemindeki meyvelerinin üzerinden, şıradan, fermente şıradan ve genç şaraptan maya izolatları toplamışlardır. Yapılan tanımlama sonucunda *Saccharomyces* olmayan suşlar saf dışı tutularak *S. cerevisiae* türü beş maya izole edilmiş ve teknolojik özelliklere dayalı olarak, mikrovinifikasyon için dört suş seçilmiştir. Bu mayalar ile elde edilmiş genç şaraplarda genel parametreler analiz edilmiş, aynı zamanda aromatik profilleri de gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ve duyuşal değerlendirmeler ile analiz edilmişlerdir. 7613 ve 7913 suşlarının starter kültür olarak kullanıldığı şaraplar 40 mg/L'den fazla etil asetat, 23 mg/l 2-metil-1-propanol ve 17 mg/l'den az 2-fenil etanol içerdiği görülmüştür. Bu şaraplar, tadımcılar tarafından egzotik meyve aromasına sahip olarak değerlendirilmişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak, iki *S. cerevisiae* suşu, teruar Pinot Gris şaraplarının yapımı için başlangıç kültürleri olarak önerilmiştir.

Geröcs vd. (2020), Macaristandaki bir şarap bölgesi olan Badacsony'den topladıkları 480 adet maya suşunu öncelikle karbonhidrat ve azot kaynaklı olarak gruplandırdıktan sonra glikoz, etanol toleransı ve uçar asit oluşturma gibi kriterlerin de olduğu bazı teknolojik özelliklerini analiz ederek seçtikleri 80 adet izolatın karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Seçilen 80 izolatın fermantasyon yeteneği, killer aktivite, hidrojen sülfür üretimi ve asit üretimi de test edilmiştir. rRNA gen dizilemesi analizi ile karakterize ettikleri 80 izolatın içinde 8 farklı cinse ait 15 farklı türün bulunduğunu ve mayaların izole edildikleri bağın yüksek bir çeşitliliğe sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Legras ve Karst (2003), *S. cerevisiae* maya türlerinin suş bazında birbirlerinden ayrımını sağlamada kullanılan DNA parmak izi analizinde en etkili olan interdelta primer çiftini bulmak amacı ile yürüttükleri çalışmalarında. 53 adet ticari *S. cerevisiae* türü maya ile çalışmışlardır. Analizlerde kullandıkları delta1 - delta 2, delta 12 - delta 2 ve delta 12 - delta 21 primer çiftlerinden, suş bazında en etkin ayrımı, delta 12 - delta 21 primer çiftinin sağladığını ortaya koymuşlardır.

Garofalo vd. 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada, iki farklı coğrafi bölgeden hasat ettikleri üzümlerden maya izolasyonu ve tanımlaması yapmışlardır. Bu bölgelerdeki ilgili üzüm çeşidinin doğal maya florasını ortaya koymak amacıyla yaptıkları bu çalışmada dizileme analizlerini ITS 1 - ITS 4 primerlerini kullanarak, *S. cerevisiae* türü mayaların birbiri ile olan

ayrımalarını ortaya koymak için yaptıkları DNA parmak izi analizini ise delta 12 - delta 21 primer çiftini kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

2.7. Mayaların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.7.1. Hidrojen Sülfür (H₂S) Üretimi

Budroni, Ladu, Zara, Zara ve Farris (2006), yaptıkları çalışmada İtalyanın Sardunya bölgesindeki, cannonau (grenache) çeşitinin yetiştirildiği 6 üzüm bağından topladıkları üzümlerden elde ettikleri fermante şıralardan izole ettikleri 66 adet *S. cerevisiae* türüne ait izolattan çoğunluğunun (\approx %60) krem ve açık kahverengi renk verirken diğer izolatların (\approx %40) kahverengi ve koyu kahverengi renk verdiğini öne sürmüşlerdir.

Lopes vd. (2007), starter kültür olarak kullanılacak *S. cerevisiae* türü maya izole etmek için yaptıkları çalışmada 32 yerli maya izolatından 21 tanesinin orta ve yüksek düzeyde H₂S ürettiklerini ve 11 tanesinin düşük düzeyde ürettiğini tespit etmişlerdir. Çalışmada kullanılan iki ticari mayadan biri yüksek üretimine sahipken diğeri ise düşük H₂S üretimine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Bağder S. (2008), daha önceden Türkiyenin farklı bölgelerinden izole edilip tanımlamaları ve bazı teknolojik testleri yapıldıktan sonra kültür koleksiyonuna dahil edilmiş olan şarap mayaları ile yapmış olduğu çalışmada 10 adet izole edilmiş şarap mayası ve 1 adet ticari maya suşu kullanmıştır. BIGGY (Bismuth Sulphite Glucose Glycine Yeast) besiyeri ile yapmış olduğu H₂S üretimi belirlemede 1 krem rengi, 5 açık kahverengi, 4 kahverengi koloni rengi belirlemiştir. Çalışmada kullandığı ticari maya suşu ise açık kahverengi renk vermiştir.

Çelik vd. (2017), narince üzümlerinin spontan fermantasyonlarından izole ettikleri *Saccharomyces* cinsi ve *Saccharomyces* cinsi olmayan mayaların tanımlanması ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada, 28 izolattan kükürt ve alkol dayanımına göre belirledikleri 4 adet *S. cerevisiae* ve 1 adet *Lachancea thermotolerance* türüne ait mayaların H₂S üretimini incelemişlerdir.

Agarbatı, Canonico, Comitini, Ciani (2020), yaptıkları çalışmada, daha önceki çalışmalar ile İtalyanın Ancona ilindeki Verdicchio üzüm çeşidinden izole edilen *S. cerevisiae* türü bir mayanın sporlarını laboratuvarında eşleştirerek elde ettikleri 18 adet gelişmiş suş ile yürüttükleri çalışmada, BIGGY agar üzerinde krem rengi koloni oluşturan 4 adet gelişmiş suş saptamışlar ve bunlardan 3 tanesinin şarap yapımına da uygun olduğunu tespit etmişlerdir. Bu

çalışmada özellikle organik ve/veya kükürtlemeden şaraplarda starter maya suşundan gelen kükürtün hiç istenmemesi veya çok az düzeyde kabul edilebilir olması gerekçesi ile bu çalışmayı yaptıklarını belirtmişlerdir.

2.7.2. Fermantasyon Hızı

Starter kültür olarak kullanılacak mayalarda aranan en büyük özelliklerden biri fermantasyon hızıdır (Reed ve Nagodawithana, 1988). Şarap mayalarının fermantasyon hızlarının yüksek olmasının istenmesinin nedeni, başlangıçta üzüm kabuğu v.b. ortamlardan gelen mikroorganizmaların çeşitliliği bakımından zengin olan şıradaki istenmeyen özelliklere sebebiyet verecek olan mikroorganizmaların bir an önce inhibe edilmesi ve ortamda starter kültürün çabuk hakim olmasıdır (Esteve-Zarsozo, Gostincar, Bobet, Uruburu, Querol, 2000).

Şaraplardaki fermantasyon hızları, başlangıçta, starter kültür inokulasyonunun miktarına bağlı olmakta, starter kültür miktarı oransal olarak fazla olduğunda yavaş bir başlangıç gerçekleşmektedir. Ancak fermantasyonun başlamasının üzerinden belli bir süre geçtikten sonra fermantasyon hızı inokulasyon miktarına bağlı olmaktan çıkıp maya türüne göre değişiklik göstermektedir (Reed ve Nagodawithana, 1988). Ortamdaki istenmeyen mikroorganizmaları baskılamak adına fermantasyon hızı yüksek olan mayalar seçilse de her zaman yüksek hızda fermantasyon sağlayan mayalar seçilmez. Bunun nedeni; CO₂ gazı çıkışındaki hız arttıkça uçucu aroma bileşenlerinin de gaz çıkışı ile şıradan uzaklaşacağı varsayımından kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı aromatik yönden zengin bazı şarapların üretiminde yüksek hızlı mayaların aksine düşük hızlı mayalar tercih edilmektedir (Özçelik ve Denli 1999).

Fermantasyon hızı, etil alkol üretiminin takibatıyla yapılabildiği gibi, ortamdan salınan CO₂'in izlenmesiyle de belirlenebilir (Reed ve Nagodawithana, 1988). Ortamdaki şekerin ölçülmesi ile de fermantasyon hızları saptanabilmektedir (Nurgel, 2000). Ayrıca fermantasyon hızı spektrofotometrik yöntemlerle de ölçülebilmektedir (Ükelgi, 2011).

Lee, Williamson, Rogers (1989) *Saccharomyces uvarum* türü maya kullandıkları çalışmada, 250 g/l glikoz içeren besiyerinde, çalışılan mayanın fermantasyon hızlarını 25 °C'de 0,19 g/sa, 30 °C'de 0,23 g/sa, 33 °C'de 0,26 g/sa, 37 °C'de 0,23 g/sa, 40 °C'de 0,21 g/sa ve 43 °C'de 0,16 g/sa olarak belirlemişlerdir.

Regodon, Perez, Valdes, De Miguel, Ramirez, (1997) yaptıkları çalışmalar ile ortaya koydukları kriterlere göre starter kültür olarak kullanılacak şarap mayalarının en az %8 v/v etil alkol üretmesi ve fermantasyon işlemi bittiğinde şaraptaki şeker konsantrasyonunun 4 g/l'den az olması gerekmektedir. Günümüzde de şarabın sek şarap kategorisinde değerlendirilmesi için şeker içeriğinin 4 g/l'den düşük olması gerekmektedir.

Iranzo, Perez, Canas (1998), yaptıkları çalışmada izole ettikleri ve denemelerde kullandıkları *Saccharomyces* cinsi 74 maya suşundan %69'unun ilk 3 gündeki fermantasyon hızlarının 0,25 gCO₂/l.sa'dan daha yüksek olduğunu görmüşlerdir.

Pérez-Coello, Briones-Pérez, Ubeda-Iranzo, Martin-Alvarez (1999), İspanyadaki bir şarap bölgesi olan La Mancha'daki bağlardan izole edip saflaştırdıkları 174 adet *S. cerevisiae* suşundan 143 adedi 0,2 gCO₂/l.sa'dan yüksek fermantasyon hızına sahipken 31 adet mayanın, 0,2 gCO₂/l.sa'dan az fermantasyon hızına sahip olduğu anlaşılmış ve bu çalışmada yapılan diğer teknolojik testlere bu 31 adet suş alınmamıştır. Yine bu çalışmada da g/l cinsinden CO₂ azalımı 24. ve 72. saatler aralığında ölçülmüştür.

Orlić, Očić, Jeromel, Huić, Redžepović, (2005), çalışmalarında ilk 3 gün ve ilk 7 gün ortalamalarını almış ve test ettikleri 22 izolattan 15 tanesinin ilk 3 günde 20 gCO₂/l.gün ortalamasının üzerinde bir fermantasyon hızına ulaştıklarını gözlemlemişlerdir.

Budroni vd. (2006), fermante şıralardan izole ettikleri 66 adet *S. cerevisiae* türüne ait izolattan %75'inin %15 ila %17 v/v etanol üretimi gerçekleştirdiği ve %50'lik kısmının ise ilk 3 gün içinde 1,15-1,35 gCO₂/gün arasında bir fermantasyon hızı gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar bu verilerin ışığında test edilen mayaların çok yüksek bir fermantasyon hızlarının olduğunu ve sıra içindeki istenmeyen florayı başarılı bir şekilde ve kısa bir sürede baskılayacağını öne sürmüşlerdir.

Nikolaou vd.(2006) tarafından yapılan çalışmada, Hamburg misketi ve Xynomavro üzümlerinden fermantasyon sonunda izole edilen 84 *S. cerevisiae* suşundan seçilen 6 adetinin kalıntı şeker miktarının 4 g/l'nin altında olduğu ve bu 6 mayanın 72 saatlik toplam CO₂ kaybının 6,58 - 9,90 g/l olduğu belirtilmiştir.

Bağder S. (2008), 10 adet şarap mayası izolatu ve 1 adet ticari maya suşu kullanmıştır. 25 °C'de 20 g/l glikoz içeren YPD besiyerinde denediği maya suşlarında 1 suş haricinde yüksek düzeyde fermantasyon hızlarına ulaştıklarını gözlemlemiştir. Çalışmada 24. ve 72. saatler

arasında 9 izolat 1,06 – 1,56 gCO₂/l.sa arasında değişen fermantasyon hızlarına ulaşmışlardır. İzolatlardan 6 tanesi fermantasyon hızı konusunda kontrol grubu olarak kullanılan ticari mayadan daha iyi sonuç vermiştir.

Çelik vd. (2017), izole ettikleri *Saccharomyces* cinsi ve *Saccharomyces* cinsi olmayan mayalar ile yaptıkları çalışmada seçtikleri 5 adet izolatın fermantasyon hızları ile ilgili olarak 0,45 - 1,7 gCO₂/l.sa hızları arasında değerlere ulaşmışlardır.

Geröcs vd. (2020), Macaristandaki Badacsony yöresinden izole ettikleri 480 adet maya suşundan teknolojik özellikleri iyi olan 9 farklı izolatın 16, 21 ve 26 °C'deki fermantasyon başlangıç zamanlarını ve fermantasyon hızlarını ölçtükleri çalışmada 2 adet te ticari maya kullanmışlardır. İçlerinde *Saccharomyces* cinsine ait olmayan mayaların da bulunduğu çalışmada mayaların 26 °C'de diğer sıcaklıklardan daha hızlı bir fermantasyon başlattıkları ve fermantasyon yoğunluğunun da daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Fermantasyon hızının en düşük ve başlama süresinin ise en geç olduğu sıcaklık 16 °C olmuştur. Genelde uçucu bileşen özelliklerinin korunması için şarap işletmelerinde kullanılan dereceler 16 °C ve 21 °C arasında olmaktadır. Geröcs vd.'nin çalışmalarında 16 °C'de izolatlardan 2 tanesi kontrol grubunu oluşturan 2 adet ticari mayadan daha hızlı fermantasyon başlattığı gözlemlenmiştir.

2.7.3. Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık

Şarap üretim proseslerinde fermantasyon sıcaklığını kontrol etmek önem arz etmektedir. Bunun nedeni 30 °C'nin üzerindeki sıcaklıkların, bazı şarap mayalarının çalışmalarını durdurmasına (stuck fermentation) neden olabilme ihtimalidir. Ayrıca düşük sıcaklıklarda kontrollü fermantasyon, aromayı oluşturan uçucu bileşiklerin sıra içinde kalmasını desteklediğinden dolayı tercih edilmektedir (Beltran, Novo, Guillamon, Mas, Rozes, 2008).

Regodon vd. (1997), İspanya'daki Extremadura bölgesinde bağ bozumu süresince sıcaklığın 35 °C'yi aşabildiğini ve çoğu şarap işletmesinde soğutma sistemlerinin bulunmamasından ötürü duran fermantasyonları önlemek amacıyla, yüksek sıcaklığa dayanıklı maya suşlarının seçilmesinin önemli olduğunu vurgulamışlardır. Bu nedenle; özellikle 42 °C'de gelişme gösterebilen maya suşlarını seçmeye çalışmışlar ve yaptıkları denemeler sonucunda, üzerinde çalıştıkları mayaların 37 °C'de geliştiğini, mayaların %75'inin de 42 °C'de gelişebildiğini belirlemişlerdir.

Şarap yapımı sırasında üzüm şirasının fermente edildiği sıcaklığın nihai şarap kalitesini etkilediği iyi bilinmektedir. *S. cerevisiae* mayasının optimum büyüme sıcaklığı 28 °C civarında iken, fermantasyon sırasında şıra sıcaklığı, meydana gelen reaksiyonlardan dolayı 40 °C'nin üzerine çıkabilir (Rankine, B.C., 2004).

Sıcaklığın, özellikle *S. cerevisiae* üzerinde, alkol duyarlılığı ortaya çıkarmak gibi bir etkisi vardır. 20 °C'den yüksek sıcaklıklarda *S. cerevisiae* alkole karşı duyarlı hale gelmektedir. Maya, düşük sıcaklıklarda etil alkole karşı daha dayanıklı hale gelmekte ancak bu durumda, özellikle 5 °C'nin altındaki sıcaklıklarda maya soğuk stresine girdiğinden dolayı yine gelişmesinde sorunlar yaşanmaktadır. Bu reaksiyonlar, sıcaklık ve etil alkolün hücre membranı lipitlerinin biyolojik fonksiyonu üzerindeki birleşik etkisinden kaynaklanmaktadır (Nurgel, C. 2000).

Bu nedenle; yüksek alkol ve yüksek sıcaklık koşullarında fermantasyonun tamamlanabilmesi için, sıcağa dayanıklı mayaların seçimi oldukça önemlidir. Şarap fermantasyonu ekzotermik bir reaksiyon olup, fermantasyon sırasında önemli miktarda sıcaklık oluşmaktadır. Oluşan bu sıcaklığın bir kısmı giderek kaybolmakta veya zararlı etkisi olmaksızın, ortama dağılmaktadır. Ancak; yüksek hacimli fermantasyon kaplarında bu sıcaklığın çoğu korunarak, şarabın sıcaklığını yükseltmektedir. Bu da mayanın inhibe olmasına ya da gelişmesinin tamamen durmasına neden olabilmektedir. Böyle tamamlanmamış fermantasyonlarda, şarap daha düşük etil alkol ve daha yüksek kalıntı şeker içermektedir (Hutkins, R.W. 2006).

Charoenchai, Fleet, Henschke (1998), 22 adet *Kloeckera apiculata*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia anomola*, çeşitli *Candida* türleri ve *S. cerevisiae* şarap mayası suşları ile yaptıkları çalışmada 10 – 15 - 20 - 25 °C'de gerçekleştirdikleri fermantasyonlar boyunca gelişme hızı ve maksimum hücre kuru ağırlıklarını incelemişlerdir. Tüm türlerin gelişme hızının sıcaklıkla arttığını bulmuşlardır. Mayaların maksimum hücre kuru ağırlıklarının 15 °C'ye kadar arttığını, daha yüksek sıcaklıklarda, suşa bağlı olarak, sabit kaldığını ya da artma veya azalma gösterdiğini belirlemişlerdir. *K. apiculata*'nın pek çok suşunun ve *C. pulcherrima*, *C. stellata* ve *C. colliculasa*'nın bazı suşlarının, *S. cerevisiae*'dan daha hızlı gelişme gösterdiğini ve bunun da şarap fermantasyonlarında erken gelişmelerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Nikolaou vd. (2006), 84 adet *S. cerevisiae* maya izolatu içerisinde seçtikleri 6 izolatu tümünün 37  C’de gelişme gösterirken, 42  C’de 4 tanesinin gelişebildiğini gözlemlemişlerdir.

Costa vd. (2014), Brezilyada etanol üretiminde geniş olarak kullanılan 3 *S. cerevisiae* ve 3 *Kluyveromyces marxianus* türü mayanın çeşitli sıcaklıklarda ve çeşitli glikoz ve etanol yoğunluklarında gelişip gelişmediğini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. 30, 37, 42, 45  C sıcaklık ve %2, 4, 6, 8 oranında glikoz içeriğinde sadece 45  C sıcaklıkta %2 glikoz konsantrasyonunda hiçbir *S. cerevisiae* gelişmemiş %4 glikoz oranında ise 1 tane *S. cerevisiae* zayıf bir gelişim göstermiştir. Yine aynı sıcaklıklarda %2, 4, 6, 8, 10 etanol konsantrasyonlarında denemeler yapıldığında sıcaklık ve etanol konsantrasyonu arttığında maya gelişmelerinde zayıflamalar ve durmalar gözlemlenmiştir.

Çavdaroğlu,  . (2017), Kalecik Karası ve Narince  z mleri ile yaptığı çalışmada, hasat edilen üzümlerin yıkama suyundan,  z m Şirasından ve fermantasyon aşamasındaki Şıradan izole edip saflaştırdığı 37 adet suşun teknolojik özelliklerini incelemiştir. Bu suşlar arasından alkol toleransı yönü ile g cl  olan mayaları tanımlayarak 5 maya suşu elde etmiştir. 5 maya suşunu 28, 37 ve 45  C sıcaklıklarda fermantasyona tabi tutmuştur. 28 ve 37  C sıcaklıklarda tüm izolatlar gelişim gösterirken 45  C sıcaklıkta hiçbir maya suşu gelişim gösterememiştir.

Antia, Akan, Stephen, Eno-ibanga, Akpan (2018), Nijeryada yaptıkları çalışmada palm Şaraplarından izole ettikleri 20 adet *S. cerevisiae* maya suşunun çeşitli teknolojik özelliklerini inceleyip karakterizasyonlarını yapmışlardır. İzole ettikleri 20 izolatu 30, 35 ve 45  C sıcaklıklarda YPD besiyerinde 3 gün boyunca çoğalmaya bırakmışlardır.  nkubasyonun sonunda 30 ve 35  C’de tüm izolatlar gelişirken 45  C’de sadece 3 adet izolatu gelişebildiğini gözlemlemişlerdir.

2.7.4. Yüksek Şeker Konsantrasyonuna Dayanıklılık

Özellikle sıcak bölgelerde yetiştirilen Şaraplık  z mlerde Şeker konsantrasyonları 30 briks’e kadar çıkabilmektedir (Iranzo, Perez, Canas, 1998). Şıradaki Şeker oranının bu Şekilde yüksek olduğu durumlarda maya hücreleri ozmotik basıncın etkisi ile su kaybederek inhibe olabilmektedir (Hutkins 2006). Böylece mayanın üremek için geçirdiği süre uzar ve fermantasyon hızı düŐer, fermantasyonun son evrelerinde mayaların etanol toleranslarının düŐmesi gibi problemler ile karŐılaŐılır (Charoenchai, Fleet, Henschke, 1998). Starter kültür olarak kullanılacak Şarap mayaları 30 üstü brikslerde de çalıŐabilmeli ve sağlıklı Şekilde %10-13 etanol oluŐturabilmelidir ( z elik ve Denli 1999).

Charoenchai, Fleet, Henschke, (1998), farklı türlerdeki 22 adet şarap mayası suşu ile yaptıkları çalışmada, yüksek şeker konsantrasyonunun mayaların gelişme hızları ve hücre kuru ağırlıkları üzerine etkisini araştırmışlardır. Şıranın şeker konsantrasyonu 200 g/l'den 300 g/l'ye yükseldiğinde, bazı maya suşlarının gelişme hızında düşme ve test edilen tüm mayaların son hücre kuru ağırlık değerlerinde ise, ciddi bir azalma gözlemlenmiştir.

Iranzo, Perez, Canas, (1998), yaptıkları çalışmada izole ettikleri ve denemelerde kullandıkları *Saccharomyces* cinsi 74 maya suşundan her birinin de 30 brikste gelişim gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Bağder S. (2008), 30 °Bx düzeyindeki YPD sıvı besiyerlerinde yaptığı denemede, kullandığı izolatların hepsinin bu konsantrasyonda gelişebildiğini gözlemlemiştir.

Lee vd. (2011) çeşitli meyvelerden izole ettikleri 637 izolattan 70 adedini teknolojik özellikleri iyi olarak belirlemişlerdir. 70 adet mayadan sadece 18 tanesi %30, 40 ve 50 glikoz içeren besiyerlerinde gelişebildiği için bu 18 maya ile yapılan analizde %30, 40 ve 50 glikoz konsantrasyonları arasındaki gelişim farkları bir hayli yüksek bulunmuştur.

Santos, Cardoso, Silva, Batistote (2018) yaptıkları bir çalışmada fermantasyon kabiliyeti yüksek bir *S. cerevisiae* maya kullanmışlar ve sakkarin substratının etanol üretiminde kullanımını araştırmışlardır. Çalışmada 18° ve 32° briklerde mayanın ürettiği biyokütle ve mayanın canlılık oranını incelediklerinde, 18° brikteki şıradaki biyokütle miktarının ve maya canlılık oranının 32° brikteki şıradakinden daha fazla olduğunu ve bu oranların fermantasyon süresinden bağımsız olduğunu gözlemlemiştir.

Kuchen, Maturano, Mestre, Combina, Toro, Vazquez, (2019), şaraplarda bozulmaya yol açan maya türlerinde yaptıkları çalışmada 10 *Saccharomyces* cinsi olmayan maya ve kontrol grubu olarak ta bir adet *S. cerevisiae* türü maya kullanmış ve bunların gelişmelerini 21° ve 30° briklerde test etmişlerdir. 21° brikste tüm mayalar gelişirken 30° brikste sadece 3 adet bozulmaya yol açan maya gelişmiş ve kontrol grubu mayanın da geliştiği gözlemlenmiştir.

2.7.5. Yüksek Etanole Dayanıklılık

Etanolün, maya büyümesini ve canlılığını inhibe ettiği, genel amino asit geçirgenliği ve glikoz alım süreçleri gibi çeşitli taşıma sistemlerini etkilediği iyi bilinmektedir. Ayrıca önemli glikolitik enzimlerin aktivitesini inhibe edebilir ve mitokondriyal DNA'ya zarar verebilir (Ibeas ve Jimenez, 1997). Etanolün ana etkisi, hücre membranının fiziksel ve kimyasal özelliklerini

büyük ölçüde bozuntuya uğratarak zarın geçirgenliğini ve akışkanlığını yok etmektir (Alexandre, Rousseaux, Charpentier, 1994). Bazı mikroorganizmalar, alkolün ürettiği farklı hasar türlerine karşı koymak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir (Stanley, Bandara, Fraser, Chambers, Stanley, 2010). Örneğin, *S. cerevisiae*'de etanol direnci ile membran lipidlerinin doymamış yağ asidi derecesi arasında iyi bir korelasyon vardır (Ding, Huang, Zhang, Zhao, Yang, Zhang, 2009). Ayrıca, etil alkole toleranslı suşların, düşük toleranslılara oranla daha az karbonhidrat depoladıkları bildirilmektedir (Benítez, Del Castillo, Aguilera, Conde, Cerdá-Olmedo, 1983). Hücre içi pH homeostazına dahil olan genler de etanol ve diğer alkollere direnç için çok önemlidir (Fujita, Matsuyama, Kobayashi, Iwahashi, 2006).

Saccharomyces cinsine ait mayalar şekerleri etanole fermente etmekte en güvenilir ve en etkili mikroorganizmalardır ve geleneksel olarak endüstride glikoz bazlı tarım ürünlerini etanole fermente etmek için kullanılmaktadırlar (Ho, Chen, Brainard, 1998). Bu alandaki kullanımında, belli bir süre sonunda fermantasyon ortamında meydana gelen etanol miktarına karşı da dayanıklı olması gerekmektedir. Özellikle biyoetanol üretiminde kullanılan *S. cerevisiae* türü mayaların etanol toleranslarının çok yüksek olması istenmektedir.

Costa vd. (2014), 3 *S. cerevisiae* ve 3 *Kluyveromyces marxianus* türü mayanın çeşitli sıcaklıklarda ve çeşitli glikoz ve etanol yoğunluklarında gelişip gelişmediğini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. 30, 32, 42, 45 °C sıcaklıklarda %2, 4, 6, 8, 10 etanol konsantrasyonlarında denemeler yapıldığında sıcaklık ve etanol konsantrasyonu arttığında maya gelişmelerinde zayıflamalar ve durmalar gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile birden farklı stres faktörünün devreye girmesi mayaların olumsuz olarak etkilenmesini arttırmaya yönelik bir eğilim gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Mayalar şarap oluşum sürecinde birçok stres faktörüne maruz kalırlar ve etanol stresi bunlardan sadece bir tanesidir ancak en önemli kriterlerden biridir. Şaraplar genellikle %10-15 arasında etil alkol içerdiklerinden dolayı, potansiyel starter kültürler en azından %15 konsantrasyona kadar etanole dayanım göstermelidir (Geröcs vd. 2020).

Nikolaou vd. (2006) 84 *S. cerevisiae* suşundan seçilen 6 adeti ile yaptıkları analizde %8, 9, 10, 11, 12 v/v etanol konsantrasyonlarında hazırladıkları besiyerlerinde 3 gün boyunca hücre gelişmesini ve fermantasyonun başlamasını incelemişlerdir. Mayaların 5 adeti %8 ve 9 konsantrasyonlarda gelişim göstermiş ve fermantasyon başlatmıştır ancak %10, 11, 12 konsantrasyonlarda gelişebilmiş fakat fermantasyon başlatamamışlardır. 1 maya ise %8, 9, 10

konsantrasyonlarda hem gelişim gösterip hem fermantasyon başlatırken, %11 ve 12 konsantrasyonlarda gelişebilmiş fakat fermantasyon başlatacak kapasiteye ulaşamamıştır. Çalışma sonunda nispeten daha dayanıklı olan suşun, tek başına kullanıldığında, aromatik yönden daha nitelikli şaraplar yaptığı gözlemlenmiştir.

Bağder S. (2008), %0, 8, 10, 12, 14 v/v etanol konsantrasyonlarındaki YPD sıvı besiyerlerine inokule ettiği 10 izolattan biri haricinde hepsi %10 konsantrasyona kadar dayanım göstermişlerdir. 6 izolat ise %14 konsantrasyonda canlılıklarını korumuşlardır. İlginç şekilde çalışmada referans olarak kullanılan ticari maya suşu %12 ve %14 konsantrasyonlarda canlılık sergileyememiştir.

Çelik vd. (2017), çalışmalarında izole ettikleri izolatlardan, teknolojik özelliklerine göre belirledikleri 4 *S. cerevisiae* ve 1 *Lachancea thermotolerance* türü maya suşlarının %12 v/v alkole dayanıklı olup olmadığını anlamak için yaptıkları analizde, %12 konsantrasyonda en fazla gelişimi *S. cerevisiae* türü olanların ikisi göstermiştir. 1 *S. cerevisiae* ve 1 *L. thermotolerance* orta gelişim göstermiş ve 1 adet *S. cerevisiae* ise çok az gelişim göstermiştir. Çalışma sonunda yapılan duyu analizlerde en beğenilen şarabın, aynı zamanda %12 konsantrasyonda en fazla gelişim gösteren suşlardan biri olan 1088 suşu olduğunu ortaya koymuşlardır.

Antia vd. (2018), 20 adet *S. cerevisiae* maya suşunun çeşitli teknolojik özelliklerini inceleyip karakterizasyonlarını yapmışlardır. 30 °C'de 72 saat yürüttükleri analizde inceledikleri 20 mayadan hepsi %10 etanol konsantrasyonunda gelişim gösterirken, 17 tanesi %15 etanolde gelişebilmiştir. %20 etanolde ise 2 adet maya izolatu gelişim gösterebilmiştir. Çalışma sonunda %20 etanole dayanıklı olan suşlardan biri biyoetanol üretiminde starter kültür olarak kullanılmak üzere önerilmiştir.

Kuchen vd. (2019), şaraplarda bozulmaya yol açan maya türlerinde yaptıkları çalışmada 10 *Saccharomyces spp.* olmayan maya ve kontrol grubu olarak ta bir adet *S. cerevisiae* türü maya kullanmış ve bunların gelişmelerini %0, 8, 10, 12, 14 v/v etanol konsantrasyonlu sıvı besiyerlerinde ölçmüştür. Kontrol grubu mikroorganizmalar tüm konsantrasyonlarda gelişim gösterirken, bozulmaya yol açan mikroorganizmalardan hiçbiri %14 konsantrasyonda gelişmemiş sadece 2 tanesi ise %12 etanol konsantrasyonunda gelişim gösterebilmiştir. %0, 8, 10 konsantrasyonlarda ise tüm mikroorganizmalar gelişim göstermişlerdir (%10'da 1'i hariç). Bu çalışma şurada \approx %11 etanol konsantrasyonu oluşana kadar bozulmaya yol açan

mikroorganizmaların gelişebileceğini ve olumsuz bileşiklerini oluşturabileceklerini gözlemlememiz yönünden önem arz etmektedir.

Gerócs vd. (2020), 480 adet maya suşundan 80 adetini %5, 10, 15 etanol konsantrasyonunda olan katı besiyerlerinde geliştirmek üzere yaptığı analizde izolatların %76'sının %15 konsantrasyonda gelişme göstermediğini ve %96'sının %10 konsantrasyonda gelişebildiğini gözlemlemiştir. %15 konsantrasyona dayanıklılık gösteren %24'lük bölümdeki mayaların içerisinde *Saccharomyces* cinsinin yanısıra şaşırtıcı şekilde *Pichia* cinsi mayaların olduğu da gözlemlenmiştir.

2.7.6. Düşük pH Değerlerinde Gelişebilme

Üzüm şarabı fermantasyonunda, 2,75 ila 4,25 arasındaki pH değişkenliği, maya hücrelerinin gelişme aşamaları için önem arz etmektedir (Fleet ve Heard, 2002). Ünsal (2007) Kalecik Karası, Gamay ve Cabernet Sauvignon şaraplarında yaptığı araştırmada; çalışmada kullanılan şaraplar için pH değerlerinin 3,63 - 3,96 arasında olduğunu ortaya koymuştur. pH'daki bu değişkenlik mayanın stres koşullarını etkileyerek ortaya çıkartacağı aroma bileşiklerini de önemli ölçüde etkileyecektir (Lilly, Bauer, Styger, Lambrechts, Pretorius, 2006). Bu nedenle, fermantasyon sırasındaki pH ile *S. cerevisiae*'nin büyüme hızı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek çok önemlidir. Önceki çalışmalar, $pH \leq 3$ 'te fermentasyona başlarken daha uzun bir lag fazı yaşayan maya hücreleri ile pH ve *S. cerevisiae* büyümesi arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Liu ve diğerleri 2015). Gao ve Fleet (1988), düşük pH'ın etanole duyarlılıklarını artırarak maya hücrelerinin gelişimi esnasında stres oluşturacağını bildirmişlerdir. Ek olarak, başlangıç pH'ı, uçucu ve uçucu olmayan bileşiklerin üretimini yanı sıra enzim üretimini de etkileyebilir (Pérez-Torrado ve diğerleri, 2002). Ayrıca, Morata, Gómez-Cordovés, Calderón ve Suárez (2006) üzüm şarabında fermantasyonun erken aşamasında proantosiyandin ve asetil türevlerinin oluşumunun pH'dan etkilendiğini bildirmiştir.

Bağder S. (2008), 3,0 ve 4,0 pH değerlerindeki sıvı YPD besiyerine inokule ettiği bütün mayaların gelişim gösterdiğini ortaya koymuştur.

Lu, Voon, Huang, Lee, Liu, (2016), durian meyvesinin sırasını ve bir adet ticari maya kullanarak gerçekleştirdiği bir çalışmada, 3,1 ve 3,9 pH değerleri ile 20 °C ve 30 °C sıcaklıklardaki sıra kombinasyonlarından doğacak fermantatif farklılıkları ele almıştır. Bu çalışmada pH'ın etanol üretimi konusunda sıcaklıktan daha belirleyici bir stres faktörü

olduğunu ortaya koyan araştırmacılar aynı zamanda pH farklılıklarının şıranın kimyasal bileşimine de etki ettiğini gözlemlemişlerdir.

2.7.7. Kükürt Dioksite Dayanıklılık

Kükürt dioksitin (SO_2) çözünmesiyle elde edilen kükürt (SO_3^{2-}), şarap yapımında mikrobiyal inhibitör ve antioksidan olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, şarap maya suşları için kükürt direnci istenen bir özelliktir (Divol, Du Toit, Duckitt, 2012). Kükürt ilavesi, glikozun glikolitik bozunmasında rol oynayan önemli bir enzim olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazı doğrudan inhibe edebilir, aerobik büyüme sırasında ATP sentezini bloke edebilir ve hücrelerde ATP'nin tükenmesine neden olabilir (Hinze ve Holzer, 1986). Teknolojik açıdan bakıldığında, mayanın kükürt direnci büyük ilgi çekicidir ve hala şarap yapımı için önemli bir kriter teşkil etmektedir. Şarap mayalarının kükürt direnç mekanizması da kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Xu, Wightman, Geller, Avram, Bakalinsky, 1994). *S. cerevisiae* hücreleri, SO_3^{2-} 'e bağlanan asetaldehit üretimindeki artış, kükürt alım yolunun düzenlenmesi ve plazma membran pompası yoluyla kükürt akışı gibi kükürt tarafından üretilen stresle başa çıkmak için farklı mekanizmalara sahiptir (Casalone vd., 1992). Şarapta kullanılan SO_2 miktarı genellikle 20-200 mg/l arasında değişmektedir (Ough, C.S. 1986). Şarabın kükürtten olumsuz etkilenmesini önlemek için farklı maya suşlarını kullanma odaklı stratejiler izlenmektedir. Aslında, kükürt varlığına bağlı asetaldehit üretiminin indüksiyonu, şarapta kötü tatları oluşturabilecek metabolitlerin üretimi ile serbest asetaldehit konsantrasyonunda önemli bir artış ta yaratabilir (Herrero, Garcia, Diaz, 2003). Seçilen suş, H_2S üretimini artırabilen sülfat asimilasyonunu tercihen indüklerse yine aynı sonuç elde edilebilir. Bu molekül çürük yumurta aromasına sahiptir ve aynı zamanda istenmeyen duyuşal özelliklere sahip diğer bileşiklerin öncüsüdür (Swiegers, Bartowsky, Henschke, Pretorius, 2005).

Nikolaou vd. (2006) 6 adet suş ile yaptıkları analizde 100, 200 ve 300 mg/l konsantrasyonda SO_2 içeren sıvı besiyerlerine yaptıkları inokülasyonlarda, 72 saatin sonunda sadece 300 mg/l konsantrasyonlu besiyerindeki bir mayanın haricindeki bütün mayaların bütün konsantrasyonlarda gelişim gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Bağder S. (2008), 0, 50, 100, 150, 200 mg/l konsantrasyonlarında SO_2 ilave edilmiş YPD sıvı besiyerlerinde mayaların gelişme özelliklerini incelemiştir. Çalışma kapsamında incelenen tüm maya suşlarının 200 mg/l'ye kadar tüm konsantrasyonlarda gelişme gösterdiği görülmüştür.

Çavdaroğlu, Ç. (2017), Kalecik Karası ve Narince üzümleri ile yaptığı çalışmada, hasat edilen üzümlerin yıkama suyundan, üzüm şırasından ve fermantasyon aşamasındaki şıradan izole edip saflaştırdığı 37 adet suşun teknolojik özelliklerini incelemiştir. Bu suşlar arasından seçtiği 5 maya suşu ile 50, 10, 150, 200 mg/l konsantrasyonlarında SO₂ içeren besiyerlerinde yaptığı analizlerde bütün suşların gelişme kaydettiğini gözlemlemiştir.

Çelik vd. (2017), izole ettikleri mayalardan, teknolojik özelliklerine göre belirledikleri 4 *S. cerevisiae* ve 1 *Lachancea thermotolerance* türü maya suşlarının, 200 mg/l SO₂ içeren besiyerlerindeki gelişimlerini analiz etmişler ve tüm suşların gelişim gösterdiğini belirlemişlerdir.

Kuchen vd. (2019), şaraplarda bozulmaya yol açan maya türlerinde yaptıkları çalışmada 10 *Saccharomyces* cinsi olmayan maya ve kontrol grubu olarak ta bir adet *S. cerevisiae* türü maya kullanmışlardır. 0 - 0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,3 - 0,4 mg/l konsantrasyonlarda SO₂ içeren sıvı besiyerlerinde yaptıkları analizlerde *Saccharomyces* olmayan 9 mayanın 300 mg/l konsantrasyona kadar 7'sinin ise bütün konsantrasyonlarda gelişim gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Böylece, özellikle düşük kükürtleme iddiası olan şaraplarda bozulmaya yol açan mikroorganizmaların inhibisyonu için başlangıçta şıraya katılması gereken en az SO₂ miktarının belirlenmesi üzerine bir fikir oluşmasını sağlamışlardır. Bu çalışmada şaşırtıcı olmayan bir şekilde *S. cerevisiae* olan kontrol grubu tüm konsantrasyonlarda gelişim göstermiştir.

2.7.8. Uçar Asit Oluşturma

Asetik asit, şarapların uçucu asitliğinin ana bileşenidir ve bu nedenle şarap kalitesi için kritik öneme sahiptir. Şaraplardaki konsantrasyonu yaklaşık olarak 0,5 g/l'dir ve Uluslararası Bağ ve Şarap Örgütü (OIV) standartlarına göre şarapların sahip olabileceği en yüksek uçar asit konsantrasyonu, asetik asit cinsinden 1,2 g/l'dir (Uluslararası Bağ ve Şarap Örgütü (OIV), 2021).

Uçucu asitlik hücre büyümesinin başlangıcında oluşur (Alexandre vd. 1994) ve üretimi maya suşuna bağlı olarak değişkenlik gösterdiği gibi (Erasmus, Cliff, van Vuuren, 2004), ortam bileşimi, vitaminler, başlangıçtaki şeker konsantrasyonu ve sıcaklık değişimleri gibi fermantasyon koşullarına da bağlıdır (Monk ve Cowley, 1984). Şarap mayaları, aynı zamanda üzüm şırasında yüksek şeker konsantrasyonlarının (> 35° Brix) neden olduğu hiperozmotik

stres tepkisinin bir yan ürünü olarak ta asetik asit üretir. Ayrıca üzüm tanelerinin zedelenmesi ve botrytis (kurşuni küf) te şarapta uçar asitin artmasına sebep olur (Erasmus vd. 2004).

Nikolaou vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, fermantasyon sonunda izole edilen 84 *S. cerevisiae* suşundan seçilen 6 tanesi ile yapılan analizde besiyerlerindeki fermantasyonlar sonunda uçar asit miktarı 0,31 - 0,48 g/l arasında bulunarak ortalamanın altında uçar asit oluşturdıkları tespit edilmiştir.

Lopes vd. (2007), starter kültür olarak kullanılacak maya izole etmek için yaptıkları çalışmada 32 yerli maya suşundan seçtikleri 2 adet *S. cerevisiae* ve 2 adet ticari şarap mayası ile yürüttükleri analizde, otokton mayalar 0,65 ve 0,78 g/l uçar asit üretirken ticari suşlar 0,65 ve 0,87 g/l uçar asit üretmişlerdir.

Tristezza vd. (2014), Güney italya'daki Apulia Bölgesi'nin yerel ve antik üzümü olan "Susumaniello" üzümleri ile yapılan bir araştırmada H₂S salınımı az olduğu tespit edilen 200 suş arasından rastgele alınıp saflaştırılan 72 adet suş üzerinde yapılan moleküler tanımlama sonucunda elde edilen 15 *S. cerevisiae* suşu için çeşitli teknolojik analizler yürütülmüştür. Bu 15 suş ile yürütülen çalışmada susumaniello üzüm şıraları kullanılmış ve denemeler 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Analizler sonunda otokton mayaların 0,14 - 0,37 g/l arasında, kontrol mayası olan ticari suşun ise 0,46 g/l uçar asit oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Çelik vd. (2017), izole ettikleri mayalardan, teknolojik özelliklerine göre belirledikleri 4 *S. cerevisiae* ve 1 *Lachancea thermotolerance* türü maya suşları ile yaptıkları analizde, mayaların, 15 °C'de, 200 ppm SO₂ ve %12 v/v alkol içeren YPD sıvı besiyerinde fermantasyon sonunda ürettiği uçar asit değerlerini 0,72 - 1,02 g/l arasında bulmuşlardır. Çalışmanın sonucunda en düşük uçar asit üreten 1088 kodlu mayayı starter kültür olarak önermişlerdir.

Furdíková, Makyšová, Špánik, (2017) Slovakya'daki belirli bağlardan topladıkları Gewurztraminer çeşiti üzümlerden izole ettikleri 3 otokton maya ile yürüttükleri çalışmada, çalışılan bütün mayaların yaklaşık 0,3 g/l uçar asit oluşturdıklarını saptamışlardır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hammadde

Çalışmada kullanılacak Üzümler Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ sınırları içinde bulunan bağlardan, olgunluk aşamalarında hasat edilmiştir. Toplamda 5 adet, farklı özellikler taşıyan bağlardan hasat edilen Papazkarası üzümleri sanitasyon kurallarına uyularak laboratuvara getirilmiştir. Üzüm örneklerinin toplandığı bağ lokasyonları şekil 3.1’de harita üzerinde gösterilmiştir.

- Kırklareli Üsküp Bölgesinde bulunan bağcılık uygulamalarının yapılmadığı bir bağ
- Kırklareli ilinde bulunan bir şarap üretim bağı
- Edirne Uzunköprü Kırcasalih Beldesinde bulunan eski bir bağ
- Edirne Uzunköprü Yeniköy Köyünde bulunan bağcılık uygulamalarının yapıldığı bir bağ
- Enstitümüzde bulunan Papaz Karası parseli



Şekil 3.1: Papazkarası üzümlerinin hasat edildiği bağlar

Üzümlerin Hasat Edildiği Yerlerin Koordinatları rakımları aşağıdaki gibidir;

- Kırklareli Üsküp: 41°45’10’’K 27°23’30’’D , Rakım: 351m
- Kırklareli Hamitabat: 41°32’00’’K 27°17’41’’D , Rakım: 140m
- Edirne Kırcasalih: 41°22’52’’K 26°48’6’’D , Rakım: 87m
- Edirne Yeniköy: 41°20’18’’K 26°45’17’’D , Rakım: 78m
- Tekirdağ Bağcılık Arş. Enst.: 40°58’30’’K 27°28’03’’D , Rakım: 50m

Toplanan örneklerin toplam suda çözünebilir kuru madde (şçkm) ve tartarik asit cinsinden toplam titredilebilir asit (ta) değerleri çizelge 3.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1: Toplanan üzüm örneklerin SÇKM ve TA değerleri

Örnek	SÇKM (°Bx)	TA (g/l)
Kırcasalih	18.9	7.05
Yeniköy	18	6.09
Üsküp	14	10.35
Hamitabat	19.3	9.45
Enstitü	22.1	8.55

SÇKM: suda çözünür kuru madde

TA: toplam asit (tartarik asit cinsinden)

3.1.1.1. Papazkarası Üzüm Çeşiti

Gri puslu siyah renkli bir üzüm olan Papazkarası çeşiti, yuvarlak iri tane yapısına (ort. 2.8g) sahip bir çeşittir. Tanedeki çekirdek sayısı ortalama 1-2 adettir. Salkım yapısı “kanatlı konik” olarak adlandırılan yapıda olup salkım büyüklükleri ortalama 550-600g ile “çok iri” sınıfında yer almaktadır. Salkımda taneler sık bir yapıda bulunur. Olgunlaşma dönemi bakımından geçi bir çeşit olan Papazkarası Trakyanın yerel üzümü olarak bilinmekte olup Edirnenin Uzunköprü ilçesinin Kırcasalih beldesi bu çeşit için orijin olarak gösterilmektedir (Çelik, 2006). Papazkarası çeşitinin asma üzerindeki görüntüsü şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: Papazkarası üzüm çeşiti

3.1.2. Besiyerleri

Çizelge 3.2: YPD (Yeast Extract Pepton Dextrose Agar) sıvı besiyeri

İçerik	g/l
Yeast Extract	10
Peptone From Meat	20
D(+)-Glucose	20

YPD sıvı besiyeri hazırlamak için, bileşenler belirtilen miktarlarda tartılarak balon joje içerisine konulur. Üzerine saf su eklenir. Balon joje içerisine balık atılarak manyetik karıştırıcıda ısı verilerek karıştırılır. Yapılacak analizin gerekliliklerine göre NaOH veya HCl ile pH ayarlaması yapılır. Katı partiküllerin tamamının erimesinden sonra balon jojelerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak otoklavda 121 °C’de 20 dakika boyunca sterilize edilir. YPD sıvı besiyerinin içeriği çizelge 3.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.3: YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) katı besiyeri

İçerik	g/l
Yeast Extract	10
Peptone From Meat	20
D(+)-Glucose	20
Agar	15

YPD katı besiyeri hazırlamak için, bileşenler belirtilen miktarlarda tartılarak balon joje içerisine konulur. Üzerine saf su eklenir. Balon joje içerisine balık atılarak manyetik karıştırıcıda ısı verilerek karıştırılır. Katı partiküllerin tamamının erimesinden sonra balon jojelerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak otoklavda 121 °C’de 20 dakika boyunca sterilize edilir. Her petri kabına yaklaşık 10ml olacak şekilde 9mm çapındaki petri kaplarına dökülüp soğumaya bırakılır. YPD katı besiyerinin içeriği çizelge 3.3’te gösterilmektedir.

Çizelge 3.4: YPD + amoxicillin agar

İçerik	g/l
Yeast Extract	10
Peptone From Meat	20
D(+)-Glucose	20
Agar	15
Amoxicillin	0,015

YPD+amoxicillin agar besiyeri hazırlamak için, bileşenler belirtilen miktarlarda tartılarak balon joje içerisine konulur. Üzerine saf su eklenir. Balon joje içerisine balık atılarak manyetik karıştırıcıda ısı verilerek karıştırılır. Katı partiküllerin tamamının erimesinden sonra balon jojelerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak otoklavda 121 °C’de 20 dakika boyunca sterilize edilir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri soğumaya bırakılır. En fazla 55 °C sıcaklıkta besiyeri içerisine amoxicillin eklenir ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Her petri kabına yaklaşık 10ml olacak şekilde 9mm çapındaki petri kaplarına dökülüp soğumaya bırakılır. YPD + amoxicillin agar’ın içeriği çizelge 3.4’te gösterilmektedir.

Mayaların ürettiği hidrojen sülfür (H₂S) miktarını tayin etmede BIGGY agar kullanılır. 45 gr toz besiyeri üzerine 1 litre saf su konulup manyetik karıştırıcıda ısıtılarak karıştırılır. Kaynama noktasına geldiğinde ocaktan alınıp petri kaplarına, her petriye 10’ar ml gelecek şekilde dökülür. Bu besiyeri, hazırlanması sırasında, otoklavlanmaz, kaynama noktasından yüksek sıcaklıklarda selektif agar olma özelliğini yitirir.

3.2. Metot

3.2.1. Spontan Fermantasyon Denemelerinin Oluşturulması

Edirne ve Kırklareli sınırlarında bulunan, farklı özellikler taşıyan 4 bağdan ve Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsünün (TBAEM) içinde bulunan Papazkarası bağından, olmak üzere toplam 5 bağdan Papaz Karası üzümleri önolojik olgunluk aşamalarında toplanmıştır. Temiz malzemelerle hasat edilen salkımlar steril poşetlerin içinde, mobil dolaplar ile laboratuvara getirilip kırılmış ve spontan fermantasyona bırakılmıştır.

Laboratuvara getirilen üzümlerin, hasat ile kırılıp cibrelili spontan fermantasyona bırakılmaları arasındaki sürenin 24 saati geçmemesine dikkat edilmiş ve bu sürede +4 °C’de muhafaza edilmiştir (Fugelsang ve Edwards, 2007). Aseptik koşullarda üzüm taneleri

salkımlardan ayrılmış ve taneler patlatılmıştır. Salkımından ayrılıp patlatılan taneler cibre haline getirilmiş ve 1 litrelik şişelere, her şişede 850 ml cibre olacak şekilde konulmuştur. Denemeler 3 tekerrür halinde hazırlanmıştır. Üzümlerin kırılmasından sonra her bir fermentasyon sırasına, her türlü biyolojik riskten kaçınmak ancak şıranın içinde mümkün olan en fazla maya popülasyonunu sağlamak amacıyla 25 mg/l kükürt dioksit (SO₂)'e denk gelecek şekilde 32,2 ml sodyum metabisüfit (Na₂S₂O₅) eklenmiştir (Parish ve Carroll, 1987).

Toplam 5 bağdan alınan üzümlerden elde edilen cibre örnekleri 17 °C sabit sıcaklıkta fermentasyona bırakılmıştır (şekil 3.3). Fermentasyonların bitimine kadar şişelerdeki ağırlık azalmaları her gün ölçülmüş ve ağırlık azalmaları durunca fermentasyonların bittiği öngörülmüştür. Kurulan bütün denemelerde fermentasyonlar, 15 - 25 günler arasında tamamlanmıştır.

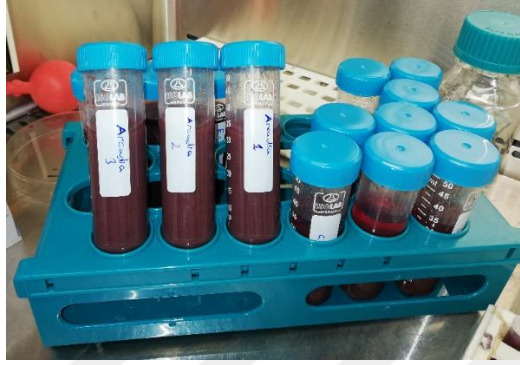


Şekil 3.3: Bağlardan toplanan üzümler ile oluşturulan spontan fermentasyonlar

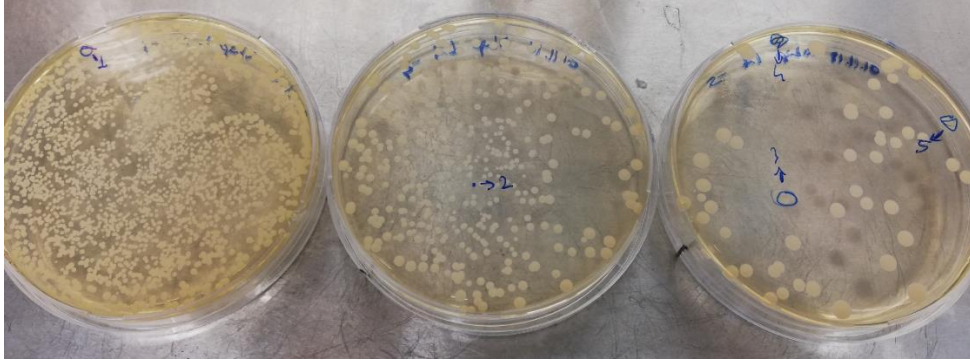
3.2.2. İzolasyon ve Saflaştırma

Üzüm cibreleri spontan fermentasyona bırakıldıktan sonra günlük ağırlık azalmaları izlenmiştir. Ağırlık azalmaları sabitlendiğinde fermente olmuş şıraların her birinden örnekler alınarak YPD katı besiyerlerine ekimler yapılmıştır (Guimares ve ark. 2006). Ekimler yapılırken dilüsyon konsantrasyonları 10⁻² ile 10⁻⁶ olarak ayarlanıp her konsantrasyondan petri kaplarına ekim yapılmıştır. Maya izolasyonu yapılacağından dolayı, bakteri çoğalmasının önüne geçmek için %0,015 mg/l amoksisilin konulan YPD katı besiyerlerine yapılan ekimlerden sonra, petri kapları 4 gün 28 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. (Çavdaroğlu, 2017).

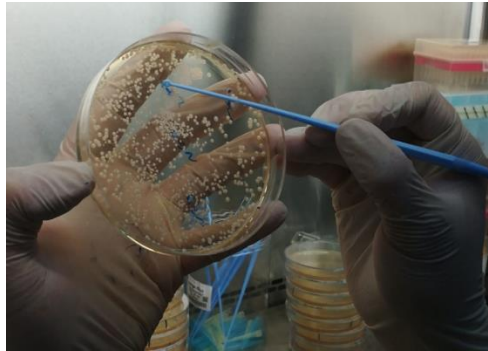
İnkübasyon sonunda besiyerlerinde görülen koloniler, morfolojik özelliklerine göre incelenip rastgele seçilerek bir diğer YPD katı besiyerine çizme plak yöntemi ile ekilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi 6 kere tekrarlanmıştır (Valero ve ark. 2007). Spontan fermantasyon örneklerinden alınan numuneler ve bu numuneler kullanılarak yapılan izolasyon ve saflaştırma süreci şekil 3.4, şekil 3.5, şekil 3.6, şekil 3.7 ve şekil 3.8’de gösterilmiştir.



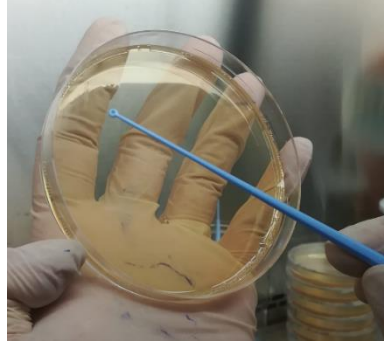
Şekil 3.4: Spontan fermantasyonlardan alınan örnekler



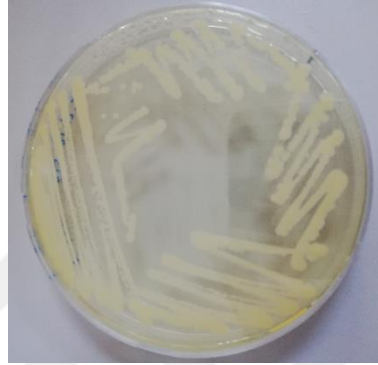
Şekil 3.5: Örneklerden, farklı konsantrasyonlarda yapılan ekimler



Şekil 3.6: Kolonilerin seçilmesi



Şekil 3.7: Seçilen kolonilerin çizme plak yöntemi ile ekilmesi



Şekil 3.8: Saflaştırılan maya suşunun petri kabındaki görüntüsü

3.2.3. Mayaların Teknolojik Özelliklerini Belirlemek İçin Yapılacak Analizler

3.2.3.1. Hidrojen Sülfür (H_2S) Üretimi

İzolatların fermantasyon sürecindeki hidrojen sülfür (H_2S) üretim miktarlarını belirlemek amacı ile yapılan analizde BIGGY agar besiyeri kullanılmıştır. Mayaların besiyeri üzerinde oluşturdukları renklere göre ne düzeyde H_2S üreticisi oldukları tespit edilmeye çalışılmıştır (Vicente vd., 2006).

Öncelikle 45 g BIGGY agar toz olarak tartılıp 1 litre saf su ile karıştırılmıştır. Agarın ayırt edici özelliğini kaybetmemesi için diğer sıvı ve katı besiyerlerinden farklı olarak $121^{\circ}C$ 'de otoklavlanmamış bunun yerine $98^{\circ}C$ 'de 30 dakika otoklavlandıktan sonra $60^{\circ}C$ 'de, kabin içinde 9 mm'lik plastik petri kaplarına, her kaba ortalama 10 ml besiyeri gelecek şekilde dökülmüştür. Ardından olası bir istenmeyen canlılığın önüne geçmek amacıyla petri kapları 1 saat boyunca ultraviyole ışık altında bekletilmiştir.

Besiyerleri katılaştıktan sonra $28^{\circ}C$ 'de 24 saat boyunca aktiveleştirilen maya suşları BIGGY agar besiyerine çizme plak yöntemiyle ekilerek, $30^{\circ}C$ 'de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda kahverengi, koyu kahverengi ve siyah koloniler yüksek

H₂S üreticisi olarak kabul edilmişlerdir. Maya çizgilerinin kahverengileşme derecesi; 1: beyaz, 2: krem, 3: açık kahverengi, 4: kahverengi, 5: koyu kahverengi ve 6: siyah şeklindeki skala esas alınarak değerlendirilmiştir (Cordente, Heinrich, Pretorius, Swiegers, 2009).

Analizde pozitif kontrol olarak, H₂S üreticisi olduğu bilinen *Candida krusei* suşu kullanılmıştır. Bir diğer kontrol grubu olarak ise ticari bir maya suşu olan “Lalvin RC212” kullanılmıştır.

3.2.3.2. Fermantasyon Hızı

Fermantasyonlarda 50 ml’lik steril plastik falcon tüpleri kullanılmıştır. Her tüpe 20 ml YPD besiyeri konulmuş ve 25 °C’de inkübatörde fermantasyonlar gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon denemelerinde maya gelişme ortamı olarak 20 g/l glikoz ihtiva eden YPD besiyeri (pH 3,5) kullanılmıştır. Sıvı besiyerinin pH’sını ayarlama da hidroklorik asit (HCl) ve sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmıştır.

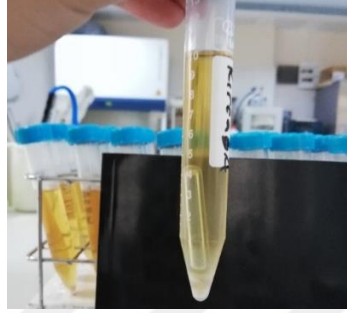
İzolatlar, denemelerin yapıldığı besi ortamına konmadan önce YPD (pH 4,5) besiyerinde 28 °C’de 24 saat bırakılarak aktif hale getirilmiş ve thoma lamı ile sayılarak her bir besi ortamına 10⁶ hücre/ml yoğunlukta olacak şekilde aktarılmıştır. Fermantasyon süresince karbondioksit (CO₂) gazı çıkışı olduğundan CO₂ molekülünün havaya karışmasının neden olduğu ağırlık kayıpları düzenli aralıklarla ölçülmüştür (şekil 3.9). Gaz çıkışına bağlı ağırlık kayıpları sıfır olduğunda fermantasyonun sona erdiği kabul edilmiştir (Iranzo, Perez, Canas, 1998; Pérez-Coello, Briones-Pérez, Ubeda-Iranzo, Martin-Alvarez, 1999).



Şekil 3.9: Fermantasyon Hızı Ölçümleri

3.2.3.3. Yüksek sıcaklığa dayanıklılık

Mayaların yüksek sıcaklıkta gelişme yetenekleri belirlenirken, 28 °C'de 24 saat boyunca YPD sıvı besiyerinde aktifleştirilen maya kültürleri, YPD sıvı besiyerine (10 ml) 1 öze dolusu inoküle edilmiş, 37 ve 42 °C'de 5 gün inkübasyona bırakılarak gelişmeleri, durham tüplerindeki gaz oluşumlarına bakılarak (şekil 3.10), incelenmiştir (Nikolaou vd., 2006).



Şekil 3.10: Maya gelişimlerinin Durham tüpünde oluşturduğu gaz

3.2.3.4. Yüksek Şeker Konsantrasyonuna Dayanıklılık

Üzüm ve sıradaki şeker konsantrasyonu çok yüksek (30° brix ve üzeri) olduğunda, ozmotik basıncın artmasıyla birlikte mayalar inhibe olabilmektedirler (Hutkins, 2006).

Denemeler, brix derecesi 30°'ye ayarlanmış YPD Broth besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Maya kültürleri, durham tüpü içeren besiyerine (10 ml) 1 öze dolusu inoküle edilerek, 30 °C'de 3 gün inkübasyon sonucunda, durham tüpünün üçte ikisinde gaz oluşturan maya suşlarının gelişmeleri pozitif olarak kabul edilmiştir (Iranzo vd., 1998).

3.2.3.5. Yüksek Etanole Dayanıklılık

Maya izolatları, YPD Broth besiyerinde 28 °C'de 24 saat aktifleştirildikten sonra, 100-130-150-170 ml/l konsantrasyonda etanol içeren 10 ml YPD besiyerlerine, Thoma lamı ile sayıldıktan sonra inoküle edilerek ($\sim 3 \mu\text{l } 10^6 \text{ kob/ml}$) 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılarak bu süre sonundaki gelişimleri takip edilmiştir. Tüplerdeki gelişimin gözlemlenmesi durham tüpleri ve besiyerinin bulanıklığına bakılarak gözlemlenmiştir (Guimarães, Moriel, Machado, Picheth, Bonfim, 2006).

3.2.3.6 Düşük pH Değerlerinde Gelişebilme

pH değerleri HCl ve NaOH ile 3,0 ve 4,0'e ayarlanan YPD besiyerleri 15 ml'lik tüplere 10 ml konulmuştur. Her maya suşu tüplere 10 μl inoküle edilmiş ve 28 °C'de 7 gün boyunca

inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda tüplerin içindeki gaz birikimine bakılmıştır. Durham tüplerinin 2/3'sinin gaz olduğu tüplere inoküle edilen mayaların üreme kaydettiği kabul edilmiştir. Denemede kontrol olarak, ayarlaması yapılmayan, 6,67 pH'a sahip YPD besiyeri kullanılmıştır (Charoenchai vd., 1998).

3.2.3.7. Kükürt Dioksite Dayanıklılık

Şarap mayalarında bulunması gereken en önemli özelliklerden birisi, başlangıçta şıraya katılabilecek 25 - 200 mg/l aralığındaki SO₂ miktarlarını tolare edebilme özelliğine sahip olmasıdır (Parish ve Carroll, 1987) Maya suşlarının 0, 50, 100, 150, 200 mg/l konsantrasyonlarında SO₂ ilave edilmiş YPD besiyerlerinde gelişme özellikleri incelenmiştir. Aktif hale getirilen maya kültürleri yaklaşık 10⁶ hücre/ml düzeyinde olacak şekilde besi yerine inoküle edilmiş ve 72 saat 28 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. (Guimarães vd., 2006).

3.2.3.8. Uçar Asit Oluşturma

Mayaların fermentasyon aşamasında ikincil metabolit olarak meydana getirdikleri asetik asit (CH₃COOH) miktarını belirlemek için %20 glikoz içeren malt ekstraktlı sıvı besiyeri (YPD) kullanılmıştır. Mayaların besiyerinde oluşturduğu uçar asitin miktarının belirlenmesinde buharlı damıtma yönteminden faydalanılmıştır (şekil 3.11). Buharlı damıtma sistemi ile damıtılan 60 ml sıvı kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Ardından fenolfitaleyn indikatörlüğünde 0,1 N NaOH çözeltisi ile renk değişimi gözlenene kadar titre edilmiştir. Titrasyonda renk değişimi gözlenene kadar harcanan NaOH miktarı (ml) 0,12 ile çarpılarak fermentasyon sonunda besiyerinde mayalar tarafından oluşturulan uçar asit miktarı asetik asit cinsinden "g/l" olmak üzere hesaplanmıştır (Ough ve Amerine, 1988).



Şekil 3.11: Buharlı damıtma yönteminin uygulanması

3.2.4. Karakterizasyon

Saflaştırılarak teknolojik testlere tabi tutulan ve testlerin sonucunda şarap yapımı için uygun olduğu düşünülen izolatlar DNA sekans analizleri yapılmak üzere harici bir laboratuvara gönderilmiştir. Böylelikle temel testlerden geçmiş olan mayaların hangi türe ait olduğu veya *S. cerevisiae* türüne ait olup olmadıkları tespit edilmiştir. Sekans analizine gönderilmek üzere, maya örneklerinin izole edildiği üzüm örneklerinin toplandığı 5 bölgenin her birini temsil etmesi açısından testlerde farklı özellikler gösterdiği görülen 3'er izolat seçildi. DNA sekans analizi Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bünyesindeki Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (NABİLTEM) kuruluşunda yapılmıştır.

3.2.4.1. Maya Örneklerinin DNA İzolasyonu

Maya hücrelerinden DNA ekstre etmek için kullanılan metotlar insan veya hayvan hücreleri ya da virüslerden DNA ekstraksiyon metodlarıyla karşılaştırıldığında daha fazla süre gerektiren ve verim anlamında da nispeten düşük sonuçlar veren bir prosestir. Bir maya hücresinin DNA'sının elde edilmesi için öncelikle bir hayli dayanıklı olan hücre duvarının uzaklaştırılmasına ihtiyaç duyulur.

Hayvansal hücredeki hücre duvarı çok sayıda kompleks karbohidrata bağlı bir proteinler bütünüdür. Bitkilerde ise hücre duvarını oluşturan ana unsur selülozdur. Farklı olarak, mantarlarda ve mayalarda bu kompleks karbohidrat, böceklerin kabuk ve isketinde ana yapı maddesi olan kitindir. Bundan dolayı maya hücrelerinin duvarlarını parçalamak için lyticase veya zymolase enzimleri kullanılır. Hücre duvarı parçalanmış olan bu hücrelere sferoplast denmektedir.

Sferoplastları elde ettikten sonra hücreleri parçalayarak DNA'yı hücreden çekip serbest hale getirmek çok daha kolaydır.

DNA ekstraksiyonunda kullanılan yöntemler sırasıyla şöyledir;

Sorbitol tampon hazırlanması:

- 0,7 M Sorbitol
- 0,1M EDTA
- 0,1M Tris. HCl, pH 8,0

1. Petriden bir maya kolonisi alınmış ve 1 ml Sorbitol tampon içeren 1,5 ml mikrosantrifuj tüpe aktarılmış ve sonrasında pipet ile karıştırılmıştır.
2. Hücreler 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak toplanmış ve supernatant atılmıştır.
3. 1 ml Sorbitol tampon, 1 µl DTT ve 250 ünite lyticase eklenmiştir.
4. Vorteks yapılarak maya hücreleri çözülmüş ve 30 °C'de 30 dakika her 5 dakikada bir karıştırılarak inkübe edilmiştir.
5. Hücreler 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak toplanmış ve supernatant atılmıştır.
6. 200 µl solüsyon DL ve 20 µl proteinaz K eklenmiştir.
7. Vorteks yaparak karıştırılmış ve 56 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında örneklerin karıştığından emin olmak için örnekler her 10 dakikada bir vorteks ile karıştırılmıştır.
8. 250 µl solüsyon B eklenip 20 saniye vorteks yapılarak karıştırılmıştır.
9. Kısa bir santrifüjden sonra her 3 dakikada bir karıştırılarak 65 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
10. 200 µl etanol (%96-100) eklenip, 20 saniye vorteks yapılarak karıştırılmıştır.
11. Kısa bir santrifüjden sonra karışım, toplama tüpünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarılmıştır.
12. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıp sıvı içeren alttaki tüp atılmış ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
13. 700 µl solüsyon W1 eklenmiş 10.000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpündeki sıvı atılmış ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirilmiştir.
14. 700 µl solüsyon W2 eklenmiş 10.000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpündeki sıvı atılmış ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirilmiştir.
15. 14.000 rpm'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır.

16. Spin kolon, steril 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpe transfer edilmiştir.

17. 200 µl 70 °C'ye ısıtılmış solüsyon E eklenmiş ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir.

18. 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

19. Santrifüj sonrasında spin kolon atılıp, mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda izole edilmiş genomik DNA elde edilmiştir. (Anonim, 2021d)

3.2.4.2. ITS1-4 Bölgesinin PCR'da Çoğaltılması

Çalışmalarda ileri primer olarak ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3') ve geri primer olarak ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') kullanılmıştır. Çalışmada 500 µl'lik PCR tüplerine toplam hacim 50 µl olacak şekilde sırasıyla 17,5 µl moleküler çalışmalar için üretilmiş steril su, 2,5 µl buffer (MgCl₂ içermez), 0,5 µl (deoksinükleotidtrifosfat) dNTP miks (dATP, dCTP, dGTP, dTTP'lerden her birinin konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde hazırlanan karışım), 0,5 µl ITS1 ileri ve 0,5 µl ITS4 geri primerleri, 2 µl MgCl₂ ve 0,5 µl Taq DNA polimeraz enzimi ve son olarak 1 µl DNA ilave edilmiş ve (negatif kontrol için 1 µl çalışmada kullanılan steril su kullanılır) tüpler PCR haznesine yerleştirildikten sonra PCR reaksiyon parametreleri 95 °C'de 15 dk Initial Denaturation (denaturasyonun başlaması) , 94 °C'de 60 sn. Denaturation (çift zincirin açılması), 55 °C'de 2 dk. Annealing (primerlerin bağlanması), ve 72 °C'de 2 dk. Extension (zincir uzaması) olarak programlanmış ve bu işlem 35 defa tekrarlanmıştır. İşlem tamamlandıktan sonra bu reaksiyonun sonuna, son zincir uzama aşaması için 72 °C'de 10 dk. Final Extension (son uzama) eklenmiş ve 4 °C'ye soğutulmuş, PCR'dan çıkarılan tüpler -40 °C'de muhafaza edilmiştir (Blaiotta vd., 2002).

3.2.4.3. DNA Elektroforezi

DNA örneklerinin elektroforezi, %1 agaroz içeren jellerde yapılmıştır (Meyers, Sanchez, Elwell, Falkow., 1976). Yatay jel sistemleri için agaroz, 100 ml tris-asetat elektroforez tamponu içerisinde ve kaynar su banyosunda çözülmüştür. 45 °C'ye kadar soğutulan ortam elektroforez plakalarına 30 - 50 ml olacak şekilde aktarılmış ve jel tarakları yerleştirilerek 60 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tampon çözelti, jeli kapatacak şekilde elektroforez tanklarına dökülmüş ve jellerin zedelenmemesine dikkat edilerek, taraklar çıkartılmıştır.

-40 °C'den çıkartılan PCR'lanmış DNA örneklerinden 1 µl alınarak temiz bir parafilm üzerinde 2µl boya çözeltisi (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder) ile karıştırılmış ve mikropipet aracılığı ile jel kuyucuklarına yüklenmiştir. DNA'nın büyüklüğünü belirlemek amacıyla jelin bir kuyucuğuna da 5µl marker (6x LoadingDye Solution) yüklenmiştir. Yükleme işlemi bittikten sonra tank kapatılarak güç kaynağına bağlanmıştır. Elektroforez, 100 voltta, 325 mA'de 30 - 60 dakika süre ile yapılmıştır.

Yükleme boyası jelin 3/4 ve 4/5'lik kısmını geçtikten sonra elektroforez işlemi sona erdirilmiştir. Ortamdan alınan jel, kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış 0,2 µg/ml etidyum bromür içeren çözeltisinde 30 dakika boya işlemine tabi tutulmuştur. Boyama işlemi biten jel 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışıktaki incelenerek Kodak Gel Logic 200 ImagingSystem kullanılarak fotoğrafları alınmıştır (Macrina, Tobian, Jones, Evans, Clewell, 1982).

3.2.4.4. PCR Ürünlerinin Saflastırılması ve DNA Dizi Analizi

Maya örneklerinden DNA ekstraksiyonu, PCR'da çoğaltılan ve agaroz jelde görüntülenen DNA örneklerinin DNA dizi analizi Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (NABİLTEM)'de yapılmıştır.

3.2.4.5 BLAST Tarama

BLAST (Basic Alingment Search Tool), aranan dizi sırasını (nükleotid veya amino asit) veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizileri ile karşılaştırarak aynı veya en yakın olan dizi sırasının ait olduğu mikroorganizmayı, % yaklaşımla veren bir bilgisayar programıdır. BLAST, moleküler biyoloji ile ilgili bilgileri bir kaynaktan toplamayı ve genom verilerinin bilgisayar ortamında analiz edilmesi için bilgisayar programları geliştirmeyi amaçlayarak, 1988 yılında kurulan National Center for Biotechnological Information adlı kuruluş tarafından geliştirilmiş bir veri tabanıdır (Ely ve Chen, 2001). Baz sırası belirlendikten sonra, bu sıra (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) adlı internet sayfasında bulunan program kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılır. Tarama sonucu, aranan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ait olabileceği, benzerlik yüzdesi ile birlikte belirlenir (Altschul v.d., 1997).

3.2.4.6. DNA Parmakizi Analizleri

Seçilen suşların, genomik tanımlaması, ITS bölgelerinin çoğaltılması ile yapıldıktan sonra, BLAST taramasında *S. cerevisiae* türüne ait olduğu belirlenen izolatların suş bazında birbirlerinden farklı olup olmadıklarını görmek adına DNA parmakizi analizleri yapılmıştır.

İzolatlardan elde edilen DNA örnekleri Delta 12 - Delta 21 primer çifti kullanılarak Go-Taq DNA polimeraz enzimi ile PCR'da çoğaltıldı. Bunun gibi bazı DNA parmakizi analizlerinde çeşitli delta primerleri kullanıldığı için bazı kaynaklarda bu analizlere “interdelta analizleri” de denmektedir.

PCR tepkimesi 25 µl hacminde 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 1 µM ileri primer (delta 12), 1 µM, geri primer (delta 21), 1,25 Unite Go-taq flexi DNA polimeraz (Promega), 50 ng DNA içermektedir. PCR şartları, 4 dak 95 °C ön denatürasyon, daha sonra 30 döngü 30 sn 95 °C, 30 sn 46 °C annealing (yapıştırma), 90 sn 72 °C (polimerizasyon), ve son olarak 7 dak 72 °C'de son uzatma şeklindedir. PCR sonrası örnekler %1,4'lük agaroz jeli üzerinde 1xTBE tamponu içinde 100 V'da 2 saat yürütüldü. Etidyum bromür varlığında UV ışık altında görüntülendi ve fotoğrafları kaydedildi (Bilgin, 2015).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Spontan Fermantasyon Süreci ve Sonuçları

Laboratuvar koşullarında sapslarından ayrılıp patlatılan taneler ile oluşturulan spontan fermantasyonların 17 °C sabit sıcaklıkta fermantasyona bırakılmasının ardından denemeler her gün 1g hassasiyete sahip terazi ile tartılarak ağırlık azalimleri tespit edildi.

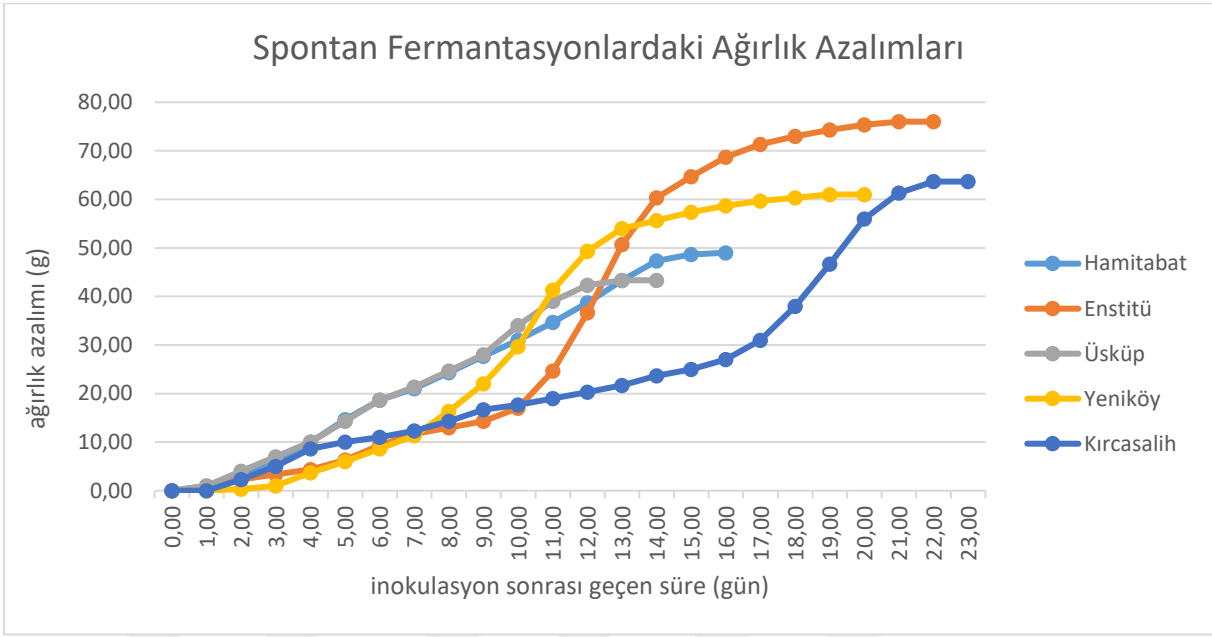
Yapılan tartımlar ile spontan fermantasyonların başlama süreleri, belli periyotlardaki hızları, bitiş aşamaları gibi bilgilere ulaşılabilir veriler elde edildi. Şekil 4.1'deki grafiğe göre;

Yeniköy dışındaki tüm örneklerdeki fermantasyonların 2-3 günde başladığı, Yeniköy örneklerinde fermantasyonların ortalama 4. Günde başladığı görülmüştür. Bu süre, örneklerdeki mikroorganizma florasının yoğunluğuna ve/veya fermantasyon başlatıcı mikroorganizmaların yeteneklerine bağlı olarak değişebilmektedir.

Kırcasalih, Yeniköy ve Enstitü örneklerinde belli bir aşamaya kadar yavaş seyreden fermantasyon sürecinin daha sonra hızlanması, alkole dayanıklı olmayan, fermantasyon hızı düşük ancak başlangıçta baskın olan *non-Saccharomyces* mayalardan oluşan floranın, fermantasyon sürecini başlatıp, şıradaki alkol miktarının artması ile inhibe olması ve yerine alkole dayanıklı ve fermantasyon hızları yüksek *Saccharomyces* cinsi mayaların ortamda baskın hale gelmesi ile açıklanabilir. Diğer örneklerde, floradaki maya cinslerinin dağılımındaki çeşitlilikten dolayı fermantasyon süreci daha doğrusal seyretmiştir.

Fermantasyonun doğrusal seyrettiği Üsküp ve Hamitabat örneklerinde fermantasyonların sırasıyla 13. ve 15. günlerde bittiği ve 21 günde biten diğer denemelere nazaran daha kısa sürdüğü görülmüştür. Bu fark ta fermantasyon sürecindeki dalgalanma ve doğrusallık ile açıklanabilir. Stabil ve hızlı devam eden Üsküp ve Hamitabat örneklerinde fermantasyon süresi daha kısa olmuştur. Bu örneklerin kendi aralarındaki 2 günlük farkın ise Üsküp örneklerinin SÇKM değerlerinin diğer örneğe göre daha düşük olmasından dolayı fermante edilecek şeker miktarının nispeten az olması ile açıklanabilir.

Fermantasyonların bitişine kadar olan ağırlık azalimlerindeki farklar, örneklerin ilk aşamadaki SÇKM değerleri ile alakalıdır. Şıradaki fermante edilebilir şeker miktarının fazla oluşu, daha fazla fermantasyon aynı zamanda daha fazla CO₂ çıkışı anlamına gelmektedir. Örneklerdeki ağırlık azalimleri da, ortamdan CO₂'nin ayrılmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.1: Farklı bağlardan toplanan üzümler ile oluşturulan spontan fermantasyonların zaman içindeki ağırlık azalimleri

Capello, Bleve, Grieco, Dellaglio, Zacheo (2004) tarafından yapılan bir çalışmada İtalyada bulunan 12 bağdan toplanan çeşitli üzümler 25 °C sıcaklıkta spontan fermantasyona bırakılmış ve alkolik fermantasyonun sonlanması 14 gün sürmüştür. Çalışmamızdaki, spontan fermantasyonlar ise 17 °C sabit sıcaklıkta bekletilmiş ve fermantasyon süreleri 15-25 gün arasında tamamlanmıştır. Spontan fermantasyonların tamamlanma süresinin uzun olması sıcaklığın daha düşük olmasından kaynaklanmış olabilir. Şener, Canbaş ve Ünal 2007’de ve Torija, Rozès, Poblet, Guillamón, Mas 2003’te yaptıkları çalışmalarda da maya gelişiminin sıcaklığa bağlı değişiminin bu yönde olduğunu gözlemlemişlerdir.

4.2. Maya İzolasyonu ve Örneklem

Spontan fermantasyonların bitiminde alınan örneklerden ekimler yapılmış ve petri kabı üzerinde oluşturdukları kolonilerin morfolojilerine bakarak rastgele izolasyonlar yapıp saflaştırma işlemleri tekrarlandıktan sonra toplam 66 adet izolat elde edilmiştir. İzolatların isimlendirilmesi, alındıkları bölgenin adının baş harfi ve izolat numarası olacak şekilde yapılmıştır (H9: Hamitabat bölgesindeki bağdan izole edilen 9. İzolat).

İzolatların isimlendirmeleri yapıldıktan sonra şarap yapabilecek yetenekte olanlarının belirlenmesi amacı ile temel teknolojik testlerinin yapılması işlemlerine başlanmıştır.

4.3. Mayaların Teknolojik Özelliklerini Belirlemek İçin Yapılan Analizler

4.3.1. Hidrojen Sülfür (H₂S) Üretimi

Bu analiz izolatların hidrojen sülfür oluşturma derecelerini anlamak amacıyla yapılmıştır. Çizelge 4.1.'de izolatların BIGGY besiyeri üzerinde oluşturdukları renkler belirtilmektedir.



Çizelge 4.1: İzolatların BIGGY besiyeri üzerinde oluşturdukları renkler

İzolat No	H ₂ S Üretim Derecesi	İzolat No	H ₂ S Üretim Derecesi
K1	Kahverengi	Ü13	açık kahverengi
K2	Kahverengi	Ü14	kahverengi
K3	Kahverengi	Ü15	açık kahverengi
K4	açık kahverengi	Ü16	koyu kahverengi
K5	Kahverengi	Ü17	açık kahverengi
K6	Kahverengi	Ü18	açık kahverengi
K7	açık kahverengi	Ü19	siyah
K8	açık kahverengi	H1	açık kahverengi
K9	krem rengi	H2	açık kahverengi
K10	açık kahverengi	H3	açık kahverengi
K11	açık kahverengi	H4	kahverengi
K12	açık kahverengi	H5	kahverengi
K13	Kahverengi	H6	krem rengi
Y1	açık kahverengi	H7	açık kahverengi
Y2	açık kahverengi	H8	açık kahverengi
Y3	açık kahverengi	H9	kahverengi
Y4	açık kahverengi	H10	kahverengi
Y5	açık kahverengi	H11	açık kahverengi
Y6	açık kahverengi	H12	açık kahverengi
Y7	krem rengi	H13	açık kahverengi
Y8	krem rengi	H14	açık kahverengi
Y9	krem rengi	H15	açık kahverengi
Ü1	Siyah	E1	krem rengi
Ü2	açık kahverengi	E2	açık kahverengi
Ü3	açık kahverengi	E3	açık kahverengi
Ü4	Kahverengi	E4	kahverengi
Ü5	açık kahverengi	E5	kahverengi
Ü6	Siyah	E6	açık kahverengi
Ü7	Kahverengi	E7	açık kahverengi
Ü8	koyu kahverengi	E8	kahverengi
Ü9	Siyah	E9	kahverengi
Ü10	açık kahverengi	E10	açık kahverengi
Ü11	açık kahverengi	RC212	kahverengi
Ü12	açık kahverengi	<i>C. krusei</i> *	siyah

*Candida krusei

Yapılan analiz sonucunda K9, Y7, Y8, Y9, H6, E1 suşlarının krem rengi oluşturduğu gözlenerek, analiz edilen suşlar arasında en düşük H₂S üretimine sahip olduğu tespit edilmiştir. K4, K7, K8, K10, K11, K12, Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, Ü2, Ü3, Ü5, Ü10, Ü11, Ü12, Ü13, Ü15, Ü17, Ü18, H1, H2, H3, H7, H8, H11, H12, H13, H14, H15, E2, E3, E6, E7, E10 suşlarının açık kahverengi renk vererek kontrol mayası olarak kullanılan *Saccharomyce cerevisiae* suşundan

daha düşük H₂S ürettiği tespit edilmiştir. K1, K2, K3, K5, K6, K13, Ü4, Ü7, Ü14, H4, H5, H9, H10, E4,E5, E8, E9 suşlarının kahverengi renk oluşturduğu ve bunun, ticari şarap mayası olarak kullanılan ve kontrol grubunu oluşturan suş ile aynı H₂S oluşum düzeyi olduğu gözlemlenmiştir. Ü8 ve Ü16 suşlarının koyu kahverengi renk vererek yüksek bir H₂S üretimine sahip olduğu, Ü1, Ü6, Ü9 ve Ü19 suşlarının ise siyah renk vererek en yüksek H₂S üretimine sahip oldukları görülmüştür.

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan *Candida krusei* suşu koyu kahverengi renk vererek yüksek derecede H₂S üreticisi olduğunu kanıtlamış, aynı zamanda analizin güvenilirliğini göstermiştir. Bir diğer kontrol grubu olan ticari maya suşu (Lalvin RC212) ise kahverengi bir koloni rengi oluşturmuştur.

66 adet maya izolatında yapılan H₂S üretimi analizinde, izolatlardan 43 tanesinin krem rengi (2) ve açık kahverengi (3) renk oluşturarak düşük H₂S üretimine sahip olduğu görülmüştür. Analiz edilen ticari maya suşu ise BIGGY agar besiyeri üzerinde kahverengi koloniler oluşturarak çalışmadaki 43 izolattan daha fazla H₂S ürettiğini göstermiştir. Hidrojen sülfür üretme kapasitesi olarak 17 izolat, agar besiyeri üzerinde kahverengi koloniler oluşturarak ticari maya ile hemen hemen aynı oranda hidrojen sülfür oluşturma kapasitesine sahip olduğunu göstermişlerdir. Kahverengi koloniler orta düzeyde hidrojen sülfür üretiminin göstergeleridir ve şarap üretimi için kabul edilebilir durumdadır. 6 adet izolat ise koyu kahverengi ve siyah koloniler oluşturarak şarap üretimi için kabul edilemez düzeyde yüksek bir hidrojen sülfür üretimi sergilemişlerdir. Bazı izolatların BIGGY agar üzerinde oluşturdukları koloni renkleri şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2: İzolatların BIGGY besiyeri üzerinde oluşturdukları koloni renkleri

Agarbatı vd. (2020) düşük sülfür üretmek üzere *S. cerevisiae* türü mayaların sporlarını laboratuvarında eşleştirerek elde ettikleri 18 adet gelişmiş suş ile yürüttükleri çalışmada, BIGGY agar üzerinde krem rengi koloni oluşturan 4 adet gelişmiş suş saptamışlar ve bunlardan 3

tanenin şarap yapımına da uygun olduğunu tespit etmişlerdir. Agarbatı vd.'nin çalışmasına paralel olarak bu tez çalışmasında da K9, Y7, Y8, Y9, H6, E1 kodlu suşlar BIGGY agar üzerinde krem rengi koloni oluşturarak çok az düzeyde H₂S ürettiklerini veya hiç üretmediklerini göstermişlerdir. Bu mayalardan Y7, Y8, Y9, H6, E1 suşları diğer analizlerde de başarı sağladıkları için, mayadan gelen H₂S düzeyinin çok düşük olması istenen şarapların üretiminde kullanılabileceği yönünde bir öngörü oluşturmaktadırlar.

Budroni vd. (2006) izole ettikleri 66 adet *S. cerevisiae* türüne ait izolattan çoğunluğunun (≈%60) krem ve açık kahverengi renk verirken diğer izolatların (≈%40) kahverengi ve koyu kahverengi renk vermesi bu çalışmanın çıktıkları ile de uyumaktadır. Bu çalışmada 66 izolattan 43 tanesi krem rengi ve açık kahverengi koloniler oluşturarak toplam izolatların ≈%65'lik kısmını oluşturmuştur. Kahverengi, koyu kahverengi ve siyah koloniler oluşturan izolatlar ise toplam örneklemin ≈%35'ini oluşturmuştur.

Bu çalışmaya benzer şekilde, Lopes vd. (2007), 32 maya suşunun 21'sinin orta ve yüksek H₂S ürettiğini saptamışlardır ve yapılan diğer testlerin ardından mmf9 izolatının şarap yapımına uygun olduğunu öne sürmüşlerdir. Seçtikleri izolat aynı zamanda düşük H₂S üretimine sahip olan 11 izolattan biridir. Bu çalışmada kontrol grubunu oluşturan ticari mayaların birinin düşük birinin ise yüksek H₂S oluşturma eğiliminde olduğu görülmektedir ve bu da ticari şarap mayalarının yüksek H₂S üretimine sahip olabildiklerini göstermektedir.

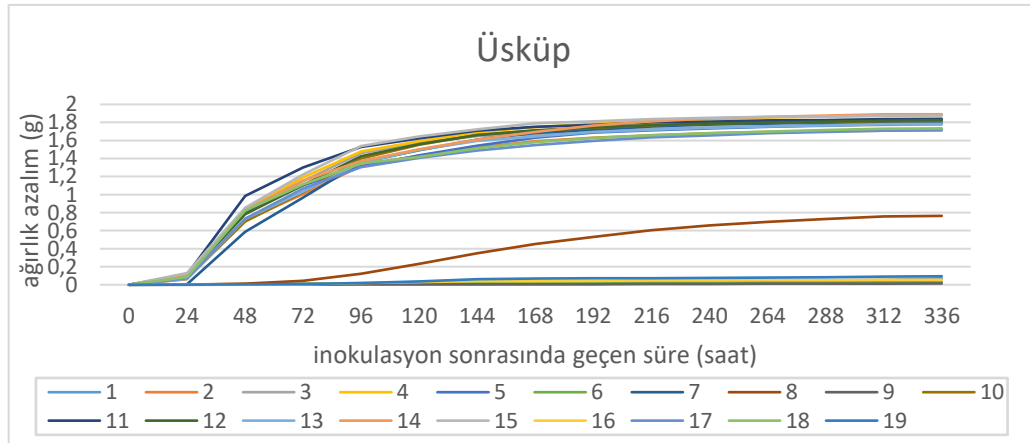
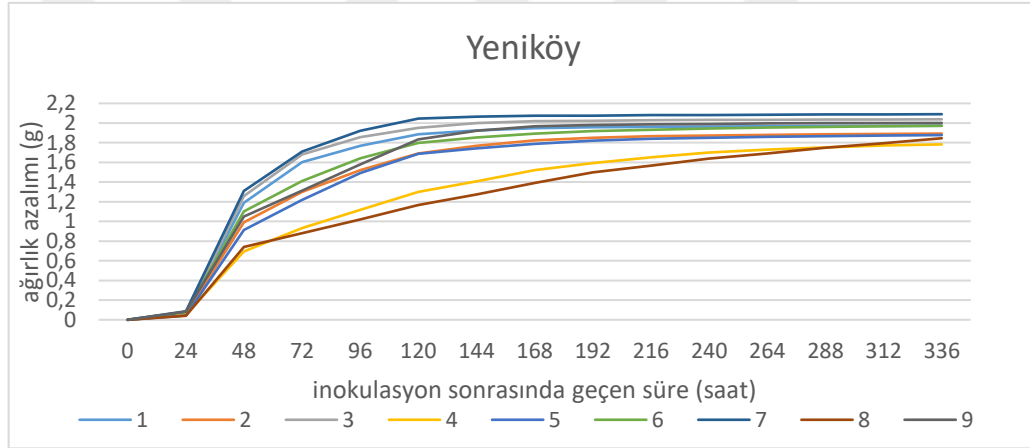
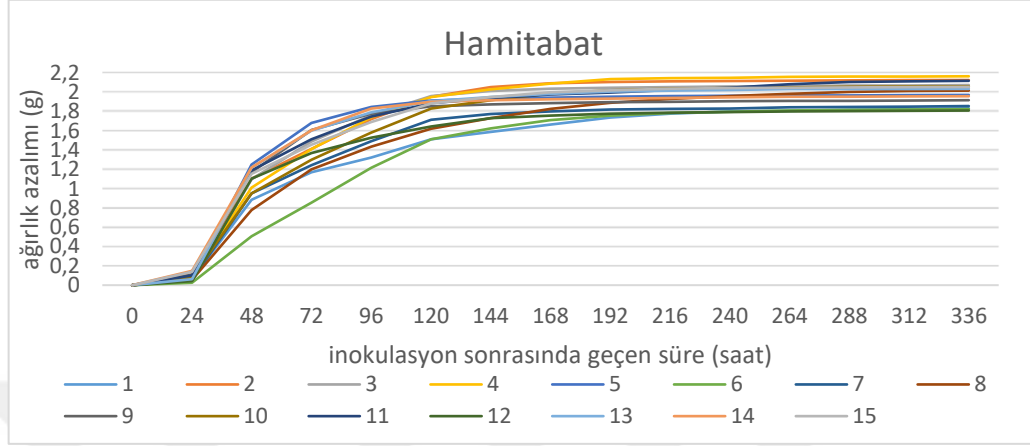
Bağder, S. (2008), çalışmasında kullandığı 10 adet maya izolatının benzer şekilde krem rengi, açık kahverengi ve kahverengi koloniler oluşturdukları görülmektedir.

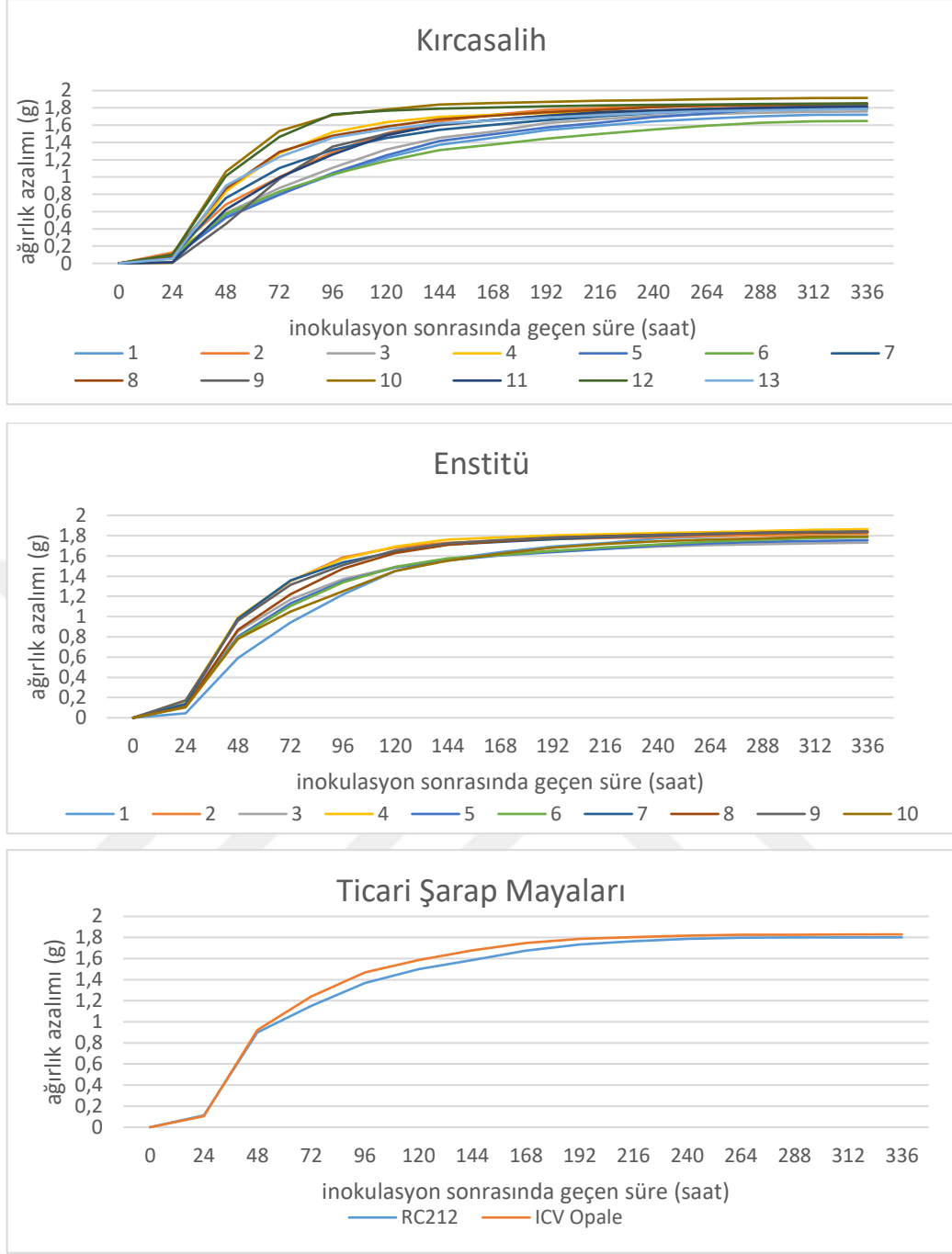
Ayrıca Çelik vd. (2017) çalışmalarında izole ettikleri 4 *S. cerevisiae* ve 1 *Lachancea thermotolerance* türü maya suşlarının açık kahverengi ve kahverengi koloni oluşturduğunu gözlemlemişlerdir.

4.3.2. Fermantasyon Hızı

İzolatların, sırayı fermante etmekteki hızlarını belirlemek için yapılan analizde 50 ml'lik tüplere 20 ml olacak şekilde 20 g/l glikoz içeren 3,5 pH'daki YPD sıvı besiyerleri hassas şekilde pipetlerle ölçülerek koyulmuştur. Her bir tüpteki maya yoğunluğu ≈10⁶ hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

İki tekerrürlü olacak şekilde yapılan analizde, CO₂ kaybından kaynaklanan ağırlık azalmalarına göre, hassas terazide tartılarak, belirlenen fermantasyon hızı grafikleri şekil 4.3'te gösterilmektedir.





Şekil 4.3: İzolatların YPD sıvı besiyerindeki fermantasyon hızları

336 saat süre ile, 66 adet izolat ve biri kırmızı biri beyaz şarap mayası olmak üzere 2 adet ticari şarap mayası ile yürütülen fermantasyon denemelerinin sonunda ağırlık azalımlarının 0,0144 - 2,166 g arasında değiştiği gözlemlenmiştir.

Üsküp yöresi üzümlerinden izole edilen izolatlar olan Ü1, Ü6, Ü8, Ü9, Ü16, Ü19 nolu mayalar 336 saat sonunda çok az üreme gösterdikleri için sırada meydana getirdikleri ağırlık

azalimleri da çok az olmuştur. Bu izolatlar diğer teknolojik testlerde de varlık gösteremeyen izolatlar olduklarından bu sonuç normal görülmüştür.

Sıvı besiyerlerindeki fermantasyonlarında varlık gösteremeyen mayaların denemeleri ve ticari maya denemeleri hariç tutulduğunda izolatlar ile yapılan denemeler 1,648 - 2,166 g arasında ağırlık azalimleri göstermişlerdir. Ortalama ağırlık azalımı ise 1,872 g olarak gözlemlenmiştir. Ticari mayalar ile yapılan denemelerde ise RC212 1,801 g ve ICV Opale 1,829 g ağırlık azalımı göstererek, izolatlar ile yapılan denemelerin ortalamasına yakın sonuç vermişlerdir. Hamitabat ve Yeniköy yöresinden toplanan izolatlar ile yapılan denemeler diğer denemelere göre genelde daha fazla ağırlık azalımı göstermişlerdir.

Bağder S. (2008), 10 adet izolat ile yürüttüğü çalışmada, izolatları 200 ml YPD besiyerlerine inokule ederek 192 saatin sonunda incelediği örneklerde biri haricinde hepsinin 17,7 - 18,40 g ağırlık azalımı gösterdiğini gözlemlemiştir. Kontrol olarak kullandığı ticari maya ise 18,01 g ağırlık azalımı göstermiştir. Ticari maya ile yapılan kontrol denemesi bu çalışmada yapılan kontrol denemesi ile örtüşmektedir. İzolatlar ile yapılan denemelerin sonuçları ise uyuşmakla beraber, bu çalışmadaki maya çeşitliliği nedeniyle ağırlık azalım aralığı biraz daha geniştir.

Fermantasyon hızı denemelerinde çoğu çalışmada fermantasyonun ilk 24 ve 72 saatleri arasındaki ağırlık farkı ölçülmektedir. Mayaların, lag fazından sonraki bu ilk fermantasyon dönemlerinde yapılan ölçüm bize mayanın fermantasyon kuvveti hakkında bir fikir vermesi açısından oldukça önemlidir. Iranzo vd. (1998), bu ağırlık farkının 0,25 g CO₂/l.sa'dan fazla olduğu maya türlerinin bu açıdan şarap yapımına uygun ve şarabı yeterli kuvvette fermante edebilen mayalar olduğunu belirtmektedirler.

Bu çalışmadaki izolatların ve kontrol grubunun, fermantasyonun ilk 24. ve 72. saatleri arasındaki ağırlık azalimleri, çizelge 4.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2: İzolatların fermantasyon hızları

İzolat no	Fermantasyon hızı (g CO ₂ /l.sa)	İzolat no	Fermantasyon Hızı (g CO ₂ /l.sa)
K1	0,739 ± 0,0085	Ü13	1,008 ± 0,1476
K2	0,910 ± 0,0177	Ü14	1,092 ± 0,0023
K3	0,834 ± 0,0186	Ü15	1,141 ± 0,0152
K4	1,318 ± 0,0245	Ü16	0,004 ± 0,0021
K5	0,764 ± 0,0334	Ü17	1,036 ± 0,0088
K6	0,783 ± 0,0153	Ü18	1,068 ± 0,0033
K7	1,071 ± 0,0141	Ü19	0,008 ± 0,0010
K8	1,249 ± 0,0218	H1	1,152 ± 0,0285
K9	1,011 ± 0,0218	H2	1,354 ± 0,0088
K10	1,492 ± 0,0261	H3	1,511 ± 0,0016
K11	1,023 ± 0,0119	H4	1,384 ± 0,0019
K12	1,419 ± 0,0020	H5	1,694 ± 0,0133
K13	1,228 ± 0,0250	H6	0,866 ± 0,0163
Y1	1,618 ± 0,0526	H7	1,236 ± 0,0000
Y2	1,292 ± 0,0098	H8	1,192 ± 0,0004
Y3	1,698 ± 0,0016	H9	1,563 ± 0,0094
Y4	0,916 ± 0,0137	H10	1,266 ± 0,0038
Y5	1,226 ± 0,0041	H11	1,468 ± 0,0089
Y6	1,387 ± 0,0011	H12	1,386 ± 0,0004
Y7	1,691 ± 0,0086	H13	1,606 ± 0,0060
Y8	0,876 ± 0,0024	H14	1,517 ± 0,0030
Y9	1,283 ± 0,0010	H15	1,372 ± 0,0172
Ü1	0,002 ± 0,0009	E1	0,933 ± 0,0116
Ü2	0,984 ± 0,0133	E2	1,281 ± 0,0084
Ü3	1,112 ± 0,0020	E3	1,082 ± 0,0082
Ü4	1,166 ± 0,0059	E4	1,236 ± 0,0027
Ü5	1,050 ± 0,0044	E5	1,060 ± 0,0061
Ü6	0,009 ± 0,0010	E6	1,033 ± 0,0306
Ü7	1,002 ± 0,0035	E7	1,272 ± 0,0344
Ü8	0,044 ± 0,0058	E8	1,159 ± 0,0050
Ü9	0,003 ± 0,0004	E9	1,191 ± 0,0490
Ü10	0,997 ± 0,0101	E10	0,987 ± 0,0192
Ü11	1,239 ± 0,0019	RC212	1,082 ± 0,0211
Ü12	1,057 ± 0,0081	Opale	1,182 ± 0,0867

Yapılan denemelerde, şırayı fermante etme kabiliyetleri bulunmadığı tespit edilen Ü1, Ü6, Ü8, Ü9, Ü16, Ü19 izolatları haricindeki tüm mayaların 24 - 72 saatler arasındaki ağırlık azalımının 0,25 g CO₂/l.sa'dan büyük olduğu görülmüştür. Çalışmadaki zayıf izolatların haricindeki diğer mayaların ağırlık azalımları 0,739 - 1,698 g CO₂/l.sa aralığında olduğu saptanmıştır. Buradan yola çıkarak, fermantasyon gücü anlamında, diğer tüm izolatların, şarapta starter kültür olarak kullanımının uygun olabileceği görülmektedir. İzolatlardan 36 adetinin kontrol grubu olan ticari kırmızı şarap mayası (RC212)'nden, 30 adetinin ise kontrol

grubu olan ticari beyaz şarap mayası (ICV Opale)'ndan daha yüksek fermantasyon kuvvetine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Fermantasyon sonundaki ağırlık azalımlarında önde olan izolatların 24 - 72. saatler arasındaki ağırlık azalımlarında da önde oldukları saptanmıştır.

Iranzo vd. (1998), yaptıkları çalışmada izole ettikleri ve denemelerde kullandıkları *Saccharomyces* cinsi 74 maya suşundan % 69'unun ilk 3 gündeki fermantasyon hızlarının 0,25 g CO₂/l.sa'dan daha yüksek olduğunu görmüşlerdir.

Pérez-Coello vd. (1999), izole edip saflaştırdıkları 174 adet *S. cerevisiae* suşundan 143 adedi 0,2 g CO₂/l.sa'dan yüksek fermantasyon hızına sahipken 31 adet mayanın, 0,2 g CO₂/l.sa'dan az fermantasyon hızına sahip olduğu anlaşılmıştır.

Orlić vd. (2005), çalışmalarında ilk 3 gün ortalamalarını almış ve test ettikleri 22 izolattan 15 tanesinin ilk 3 günde 20 g CO₂/l.gün ortalamasının üzerinde bir fermantasyon hızına ulaştıklarını gözlemlemişlerdir. Bu da 0,83 g CO₂/l.sa'ya eşdeğer olmaktadır ve bu çalışmadaki izolatlardan daha zayıf bir fermantatif kuvvete sahip olduğu görülmüştür.

Budroni vd. (2006), fermante şıralardan izole ettikleri 66 adet *S. cerevisiae* türüne ait izolattan %50'lik kısmının ilk 3 gün içinde 1,15 - 1,35 g CO₂/gün arasında bir fermantasyon hızı gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmadaki denemelerin besiyeri miktarı 50 ml olduğundan bu sayılar, 0,96 - 1,13 g CO₂/l.sa olarak çevrilebilir. Ayrıca çalışmada kullanılan şıralar 190 g/l glikoz içermektedir. Araştırmacılar bu verilerin ışığında test edilen mayaların çok yüksek bir fermantasyon hızlarının olduğunu ve sıra içindeki istenmeyen florayı başarılı bir şekilde ve kısa bir sürede baskılayacağını öne sürmüşlerdir. Bourdoni vd.'nin elde ettiği veriler ile bu çalışmadaki fermantasyon hızı verileri benzer özellik göstermektedir.

Bağder S. (2008), çalışmasında, 24. ve 72. saatler arasında 9 izolatın 1,06 - 1,56 g CO₂/l.sa arasında değişen fermantasyon hızlarına ulaştığını gözlemlemiştir. İzolatlardan 6 tanesi fermantasyon hızı konusunda kontrol grubu olarak kullanılan ticari mayadan daha iyi sonuç vermiştir. Ayrıca, Çelik vd. (2017), çalışmalarında seçtikleri 5 adet izolatın fermantasyon hızları ile ilgili olarak 0,45 - 1,7 g CO₂/l.sa hızları arasında değerlere ulaşmışlardır. Bağder S. ve Çelik vd.'nin ulaştığı bu sonuçlar bu çalışma ile de uyum sağlamaktadır.

4.3.3. Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık

Starter kültür olarak önerilecek izolatların, şarap üretim proseslerinde görülebilecek en yüksek sıcaklıklara mukavemet göstermesi ve bu sıcaklıklarda gelişebilmesi gerekir. Yapılan analizde izolatlar 28 °C’de 24 saat aktifleştirildikten sonra YPD sıvı besiyerlerine inokule edilip 5 gün boyunca 37 °C ve 42 °C’lerde inkübasyona bırakılmıştır. 5. günde besiyerlerinin içine konulan durham tüplerindeki gaz oluşumlarına göre gözlenen gelişimler çizelge 4.3.’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3: İzolatların 37 °C ve 42 °C sıcaklıklarda gelişebilme yetenekleri

İzolat No	Sıcaklık (°C)		İzolat No	Sıcaklık (°C)	
	37	42		37	42
K1	+	+	Ü13	+	+
K2	+	+	Ü14	+	+
K3	+	+	Ü15	+	+
K4	+	+	Ü16	+	+
K5	+	+	Ü17	+	-
K6	+	-	Ü18	+	+
K7	+	+	Ü19	+	+
K8	+	-	H1	+	+
K9	+	+	H2	+	+
K10	+	+	H3	+	+
K11	+	+	H4	+	+
K12	+	+	H5	+	+
K13	+	+	H6	+	+
Y1	+	+	H7	+	+
Y2	+	+	H8	+	-
Y3	+	+	H9	+	+
Y4	+	+	H10	+	-
Y5	+	+	H11	+	+
Y6	+	+	H12	+	+
Y7	+	+	H13	+	+
Y8	+	+	H14	+	+
Y9	+	+	H15	+	-
Ü1	+	-	E1	+	+
Ü2	+	-	E2	+	+
Ü3	+	+	E3	+	+
Ü4	+	+	E4	+	+
Ü5	+	+	E5	+	+
Ü6	+	-	E6	+	+
Ü7	+	+	E7	+	+
Ü8	+	+	E8	+	+
Ü9	+	-	E9	+	+
Ü10	+	+	E10	+	+
Ü11	+	+	RC212	+	+
Ü12	+	+	Opale	+	+

Yapılan denemede, izole edilen bütün suşların 37 °C’de gelişebildiği gözlemlenmiştir. 66 izolattan sadece 10 tanesi 42 °C’de gelişim gösterememiştir. Bu analiz ile izole edilen mayalarının büyük çoğunluğunun şarap yapımı için istenen sıcaklık dayanımının olduğu görülmüştür.

42 °C’de gelişim gösteremeyen 10 izolattan 5 tanesi Üsküp yöresi bağındaki üzümlerden izole edilen mayalardır. Bu bağdaki üzümlerin, hasat aşamasındaki, briks derecesi nispeten düşük olduğundan (14 °Bx) doğal olarak fermantasyon sonundaki alkol oranı da nispeten düşük (6,75 v/v) olmuştur. Bundan dolayı Üsküp yöresinden toplanan üzümlerden izole edilen mayalardan bir kısmının *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayalardan olabileceği göz önünde bulundurulmuştur ve 42 °C’de gelişim göstermeyen izolatların *Saccharomyces* cinsinin dışındaki (*non-Saccharomyces*) mayalar olduğu tahmin edilmektedir. Çalışmamızda sadece teknolojik özellikleri iyi olan mayaların bazıları dizileme analizine gönderildiği için, bu analizde 42 °C’de gelişim göstermeyen maya izolatlarının hangi cinse bağlı olduğu daha ileride yapılacak olan çalışmalarla saptanabilir.

Her iki sıcaklıkta da gelişim gösteren izolatlardan bazıları, diğer testlerin sonuçları da göz önünde bulundurularak, seçilmiş ve dizileme analizi yapılmıştır. Analizde kontrol grubu olarak kullanılan ticari mayalar (Lalvin RC212 ve ICV Opale) her iki sıcaklıkta da gelişim göstermiştir.

Nikolaou vd. (2006), tarafından yapılan çalışmada, seçilen 6 maya izolattının tümünün 37 °C’de gelişme gösterirken, 42 °C’de 4 tanesinin gelişebildiğini gözlemlemiştir.

Bağder S. (2008), İzolatları YPD besiyerlerine inokule ederek 37 °C ve 42 °C’lerde gelişimlerini incelediği analizde izolatların hepsinin 37 °C’de gelişim gösterdiği ancak referans maya da dahil olmak üzere 11 suştan hiçbirinin 42 °C’de gelişemediğini gözlemlemiştir.

Çavdaroğlu, Ç. (2017), fermantasyon aşamasındaki şıradan izole edip saflaştırdığı 37 adet maya suşu arasından alkol toleransı güçlü olan mayaları tanımlayarak elde ettiği 5 maya suşunu 28, 37 ve 45 °C sıcaklıklarda fermantasyona tabi tutmuştur. 28 ve 37 °C sıcaklıklarda tüm izolatlar gelişim gösterirken 45 °C sıcaklıkta hiçbir maya suşu gelişim gösterememiştir.

Antia vd. (2018), 20 adet *S. cerevisiae* maya suşunu 30, 35 ve 45 °C sıcaklıklarda YPD besiyerinde 3 gün boyunca çoğalmaya bırakmışlardır. İnkübasyonun sonunda 30 ve 35 °C’de tüm izolatlar gelişirken 45 °C’de sadece 3 adet izolatın gelişebildiğini gözlemlemişlerdir.

4.3.4. Yüksek Şeker Konsantrasyonuna Dayanıklılık

30 °Bx’e ayarlanmış YPD besiyerlerine 10’ar ml izolat inokule edilmiştir. 30 °C’de 3 günün sonunda falconlar içindeki durham tüplerinde oluşan gaz birikimi incelendiğinde tüm izolatların ve kontrol grubunun 30 °Bx’te gelişebildiği görülmüştür (çizelge 4.4).

Çizelge 4.4: İzolatların 30 °Bx konsantrasyonda YPD besiyerlerindeki gelişimleri

İzolat No	30 °Bx	İzolat No	30 °Bx	İzolat No	30 °Bx	İzolat No	30 °Bx
K1	+	Y5	+	Ü13	+	H11	+
K2	+	Y6	+	Ü14	+	H12	+
K3	+	Y7	+	Ü15	+	H13	+
K4	+	Y8	+	Ü16	+	H14	+
K5	+	Y9	+	Ü17	+	H15	+
K6	+	Ü1	+	Ü18	+	E1	+
K7	+	Ü2	+	Ü19	+	E2	+
K8	+	Ü3	+	H1	+	E3	+
K9	+	Ü4	+	H2	+	E4	+
K10	+	Ü5	+	H3	+	E5	+
K11	+	Ü6	+	H4	+	E6	+
K12	+	Ü7	+	H5	+	E7	+
K13	+	Ü8	+	H6	+	E8	+
Y1	+	Ü9	+	H7	+	E9	+
Y2	+	Ü10	+	H8	+	E10	+
Y3	+	Ü11	+	H9	+	RCR212	+
Y4	+	Ü12	+	H10	+	Opale	+

Bu analizde, tüm izolatların yüksek şeker içeriğinde gelişebilme yeteneğinde olduğu görülmüştür. Özellikle geç hasat, sıcak iklim üzümlerinden veya botrytisli asmalardan elde edilen şaraplarda yüksek şeker konsantrasyonlarından dolayı mayaların fermantasyon başlatma becerilerinde aksamalar görülebilir. Bu gibi nedenlerden ötürü ilk fermante edilecek şıradaki yüksek şeker konsantrasyonunun oluşturduğu ozmotik basınçtan etkilenmeyerek fermantasyonu sorunsuz ve hızlı bir biçimde başlatacak starter kültür kullanımı önem arz etmektedir. Çalışmamızda izole edilen tüm izolatların yüksek şeker konsantrasyonundan kaynaklanacak stres faktörlerine karşı dirençli olduğu ve bu ortamda çoğalıp fermantasyonu sorunsuz başlatabileceği gözlemlenmiştir.

Iranzo vd. (1998), yaptıkları çalışmada izole ettikleri ve denemelerde kullandıkları *Saccharomyces* cinsi 74 maya suşundan her birinin 30 °Bx'te gelişim gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Bağder S. (2008), 30 °Bx düzeyindeki YPD sıvı besiyerlerinde yaptığı denemede, kullandığı izolatların hepsinin bu konsantrasyonda gelişebildiğini gözlemlemiştir.

Lee vd. (2011) çeşitli meyvelerden izole edip teknolojik özelliklerinin iyi olduğunu tespit ettikleri 70 adet mayadan sadece 18 tanesi %30, 40 ve 50 glikoz içeren besiyerlerinde gelişebildiği için bu 18 maya ile yapılan analizde %30, 40 ve 50 glikoz konsantrasyonları arasındaki gelişim farkları bir hayli yüksek bulunmuştur.

Kuchen vd. (2019), şaraplarda bozulmaya yol açan maya türlerinde yaptıkları çalışmada 10 *Saccharomyces spp.* olmayan maya ve kontrol grubu olarak ta 1 adet *S. cerevisiae* türü maya kullanmış ve bunların gelişmelerini 21° ve 30° brikslerde test etmişlerdir. 21 °Bx'te tüm mayalar gelişirken 30 °Bx'te sadece 3 adet bozulmaya yol açan maya gelişmiş ve kontrol grubu mayanın da geliştiği gözlemlenmiştir.

4.3.5. Yüksek Etanole Dayanıklılık

Maya izolatları, 100-130-150-170 ml/l konsantrasyonda etanol içeren 10 ml YPD sıvı besiyerlerine, Thoma lamı ile sayıldıktan sonra inokule edilerek ($3 \mu\text{l} \approx 10^6$ kob/ml) 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda durham tüplerinde oluşan gaz ve besiyeri bulanıklığına bakılarak gelişimler gözlemlendiğinde Çizelge 4.5'de gösterilen sonuçlara ulaşılmıştır.

Çizelge 4.5: İzolatların farklı etanol konsantrasyonlarındaki gelişimleri

İzolat No	etanol konsantrasyonu (%)				İzolat No	etanol konsantrasyonu (%)			
	10	13	15	17		10	13	15	17
K1	+	+	+	-	Ü13	+	+	+	-
K2	+	+	+	-	Ü14	+	+	+	-
K3	+	+	+	+	Ü15	+	+	+	-
K4	+	+	+	-	Ü16	-	-	-	-
K5	+	+	+	+	Ü17	+	+	-	-
K6	+	-	-	-	Ü18	+	+	+	+
K7	+	+	+	+	Ü19	-	-	-	-
K8	+	+	+	+	H1	+	+	+	-
K9	+	+	-	-	H2	+	+	+	-
K10	+	+	+	+	H3	+	+	+	-
K11	+	+	+	+	H4	+	+	+	-
K12	+	+	+	+	H5	+	+	+	-
K13	+	+	+	+	H6	+	+	+	-
Y1	+	+	+	-	H7	+	+	+	-
Y2	+	+	+	-	H8	+	-	-	-
Y3	+	+	+	-	H9	+	-	-	-
Y4	+	+	+	-	H10	+	+	+	-
Y5	+	+	+	-	H11	+	-	-	-
Y6	+	+	+	-	H12	+	-	-	-
Y7	+	+	+	-	H13	+	-	-	-
Y8	+	+	+	-	H14	+	+	+	-
Y9	+	+	+	-	H15	+	+	+	-
Ü1	+	+	+	-	E1	+	+	+	-
Ü2	+	+	-	-	E2	+	+	+	-
Ü3	+	+	+	+	E3	+	+	+	-
Ü4	+	+	+	-	E4	+	+	+	-
Ü5	+	+	+	-	E5	+	+	+	-
Ü6	+	+	-	-	E6	+	+	+	-
Ü7	+	+	+	-	E7	+	+	+	-
Ü8	+	+	+	-	E8	+	+	+	-
Ü9	+	-	-	-	E9	+	+	+	-
Ü10	+	+	+	-	E10	+	+	+	-
Ü11	+	+	+	-	RC212	+	+	+	-
Ü12	+	+	+	-	Opale	+	+	-	-

İzole edilen maya izolatlarından çoğu şarap yapacak yeterliliğe sahip olan mayalarda istenilen %15 konsantrasyonda etanol varlığında canlılıklarını sürdürmüş (Geröcs vd. 2020) ve fermantasyon yaratacak güce ulaşmışlardır. Neredeyse bütün şarapların alkol oranının %8 - 15 arası olduğu düşünüldüğünde, çalışmada izole edilen 66 adet mayanın 53 adeti etanol stresine karşı starter olarak görev yapabilecek niteliktedir. 13 adet maya ise %15 etanol konsantrasyonunda inhibe olmuştur. Bu mayaların starter kültür olarak öne sürülebilir kapasitede olmadıkları düşünülmektedir.

Ü16 ve Ü19 izolatları en düşük konsantrasyon olan %10 konsantrasyonda dahi gelişim gösterememişlerdir. K6, Ü9, H8, H9, H11, H12, H13 izolatları ise %10'da gelişip %13'te gelişememişlerdir. K9, Ü2, Ü6 ve Ü17 izolatları ise %10 ve %13 konsantrasyonlarda gelişim gösterebilmiş ancak %15 konsantrasyonda gelişim gösterememiştir. Bu maya suşlarının beyaz şarap veya daha düşük alkollü şarapların yapımında kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir (Bağder S. 2008). Bu gibi alanlarda kullanılabilme ihtimalleri daha ileriki çalışmalarda araştırılabilir niteliğe sahiptir.

Etanol dayanıklılığı testlerinde izolatların %17 alkole dayanıklılığı da test edilmiştir. Kırcasalih köyündeki bir bağdan izole edilen izolatların 9'u %17 etanole dayanım gösterip gelişebilmişlerdir. Ayrıca Üsküp bölgesindeki bağdan izole edilen 2 adet izolat ta %17 etanol konsantrasyonunda gelişebilmiştir

Kontrol suşlarının ikisi de %17 etanol konsantrasyonunda gelişememiştir. Kontrol suşlarından kırmızı şarap mayası olarak satılan RC212, %10, 13, 15 etanol konsantrasyonlarında gelişim gösterirken, beyaz şarap mayası suşu olarak satılan ICV Opale %15 etanol konsantrasyonunda gelişim gösterememiştir.

Nikolaou vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, %8, 9, 10, 11, 12 v/v etanol konsantrasyonlarında hazırladıkları besiyerlerinde bütün mayalar %8 ve %9 konsantrasyonlarda fermantasyon başlatabilmiştir. Ancak bu izolatların sadece 1 adeti %10 etanol konsantrasyonunda fermantasyon başlatabilmiştir. İzolatların hiçbirisi %11 ve %12 konsantrasyonlarda fermantasyon başlatamamışlardır. Çalışma sonunda nispeten daha dayanıklı olan suşun, tek başına kullanıldığında, aromatik yönden daha nitelikli ve meyvemsi şaraplar ürettiği gözlemlenmiştir. Bu da çalışmamızda %17 etanol konsantrasyonlarında gelişim gösteren izolatların daha nitelikli şarap yapabileceğini öngörmemizi sağlamaktadır.

Bağder S. (2008), yapmış olduğu çalışmada, 10 adet izole edilmiş şarap mayasından biri haricinde hepsi %10 konsantrasyona kadar dayanım göstermişlerdir. 6 izolat ise %14 konsantrasyonda canlılıklarını korumuşlardır. İlginç şekilde çalışmada referans olarak kullanılan ticari maya suşu (Fermicru AR2) %12 ve %14 konsantrasyonlarda canlılık sergileyememiştir. Bunun nedeni ise, Fermicru AR2 mayasının, üretici firma tarafından beyaz şarap mayası olarak tanımlanmış öneriliyor olması olarak düşünülebilir. Bundan dolayı çalışmamızda %8, 10 ve 13 etanol konsantrasyonlarında gelişip %15 konsantrasyonda gelişim

sergileyemeyen izolatların ileriki çalışmalarda beyaz veya rose şaraplarda starter kültür olarak kullanılabilirliğinin araştırılabileceği düşünülmektedir. Yine aynı şekilde Çelik vd. (2017), çalışmalarında izole ettikleri izolatların %12 v/v alkole dayanıklı olup olmadığını test etmişlerdir. Kullandıkları 4 *S. cerevisiae* suşundan 2 tanesi %12 konsantrasyonda çok iyi bir gelişim sergilemişlerdir. Çalışmalarının sonunda yapılan duyu analizlerde en beğenilen şarabın, aynı zamanda %12 konsantrasyonda en fazla gelişim gösteren suşlardan biri olan 1088 suşu olduğunu ortaya koymuşlardır.

Costa vd. (2014) biyoetanol üretiminde kullanılan starter kültürler ile yaptıkları çalışmada, çeşitli etanol konsantrasyonları ve sıcaklık kombinasyonlarında sıcaklık ve etanol konsantrasyonu arttığında maya gelişmelerinde zayıflamalar ve durmalar gözlemlenmiştir.

Antia vd. (2018), palm şaraplarından izole ettikleri 20 adet *S. cerevisiae* maya suşunun hepsinin %10 etanol konsantrasyonunda gelişim gösterirken, 17 tanesinin %15 etanolde gelişebildiğini ve %20 etanolde ise 2 adet maya izolatının gelişim gösterdiğini belirlemişlerdir. Çalışma sonunda %20 etanole dayanıklı olan suşlardan biri biyoetanol üretiminde starter kültür olarak kullanılmak üzere önerilmiştir. Böylelikle çalışmamızdaki izolatlardan %17 alkol dayanımına sahip olan suşların, ileride yapılacak çalışmalar ile biyoetanol üretimi için de önerilebileceği ihtimali doğmaktadır.

Çalışmamıza paralel olarak, Gerócs vd. (2020), izole ettikleri maya suşlarını %5, 10 ve 15 etanol konsantrasyonunda olan katı besiyerlerine inokule etmişlerdir. İzolatların %76'sının %15 konsantrasyonda gelişme göstermediğini ve %96'sının %10 konsantrasyonda gelişebildiğini gözlemlenmiştir.

4.3.6. Düşük pH Değerlerinde Gelişebilme

Üzüm şirasının pH skalası 2,75 – 4,25 arasındadır (Fleet ve Heard, 2002). Sınır değerler seyrek görülen durumlar veya özel amaçlı şaraplarda geçerli olmakla beraber şıra pH'sı genel olarak 3,0 – 4,0 arasında değişir. Bu seviyedeki pH'lar mikroorganizmalar için bir stres faktörü oluşturacağından dolayı şarap starteri olarak seçilecek izolatların ilk aşamada bu pH aralıklarında gelişim göstermesi aranmaktadır. pH'sı 3,0 ve 4,0'e ayarlanan YPD sıvı besiyerlerine izolatlar inokule edilerek 28 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Durham tüplerindeki gaz oranına bakarak gerçekleştirilen analiz sonuçları çizelge 4.6'da verilmiştir. Denemede kontrol olarak pH ayarlaması yapılmayan 6,67'lik YPD sıvı besiyeri kullanılmıştır.

Çizelge 4.6: İzolatların farklı pH'lardaki YPD sıvı besiyerlerindeki gelişimleri

İzolat No	pH		İzolat No	pH		İzolat No	pH		İzolat No	pH	
	3,0	4,0		3,0	4,0		3,0	4,0		3,0	4,0
K1	+	+	Y5	+	+	Ü13	+	+	H11	+	+
K2	+	+	Y6	+	+	Ü14	+	+	H12	+	+
K3	+	+	Y7	+	+	Ü15	+	+	H13	+	+
K4	+	+	Y8	+	+	Ü16	+	+	H14	+	+
K5	+	+	Y9	+	+	Ü17	+	+	H15	+	+
K6	+	+	Ü1	+	+	Ü18	+	+	E1	+	+
K7	+	+	Ü2	+	+	Ü19	+	+	E2	+	+
K8	+	+	Ü3	+	+	H1	+	+	E3	+	+
K9	+	+	Ü4	+	+	H2	+	+	E4	+	+
K10	+	+	Ü5	+	+	H3	+	+	E5	+	+
K11	+	+	Ü6	+	+	H4	+	+	E6	+	+
K12	+	+	Ü7	+	+	H5	+	+	E7	+	+
K13	+	+	Ü8	+	+	H6	+	+	E8	+	+
Y1	+	+	Ü9	+	+	H7	+	+	E9	+	+
Y2	+	+	Ü10	+	+	H8	+	+	E10	+	+
Y3	+	+	Ü11	+	+	H9	+	+	RC212	+	+
Y4	+	+	Ü12	+	+	H10	+	+	Opale	+	+

Yapılan analizde bütün izolatların ve kontrol suşlarının pH 3,0 ve 4,0 stres faktörüne dayanıklı oldukları ve bu pH'larda gelişim gösterebildikleri ortaya çıkmıştır. İzolatlar arasında fark gözlemlenmemiş ve tüm durham tüplerinin tamamının gaz ile dolduğu görülmüştür. Bu sonuç ile izolatların, üzüm çeşiti, üzüm olgunluğu, kabuk tane oranı v.b. faktörlerden kaynaklı olarak düşük olabilen şıra pH'sına dayanıp, pH stres faktörü özelinde fermantasyon başlatma yeteneğine sahip oldukları görülmüştür. Buna benzer çalışmalarda;

Bağder S. (2008), yapmış olduğu çalışmada 10 adet izole edilmiş şarap mayası ve 1 adet ticari maya suşu kullanmıştır. 3,0 ve 4,0 pH değerlerindeki sıvı YPD besiyerine inokule ettiği bütün mayaların gelişim gösterdiğini ortaya koymuştur.

Lu vd. (2016), durian meyvesinin şirasını ve bir adet ticari maya kullanarak gerçekleştirdiği bir çalışmada, 3,1 ve 3,9 pH değerleri ile 20 °C ve 30 °C sıcaklıklardaki şıra kombinasyonlarından doğacak fermantatif farklılıkları ele almıştır. Bu çalışmada pH'ın etanol üretimi konusunda sıcaklıktan daha belirleyici bir stres faktörü olduğunu ortaya koyan araştırmacılar aynı zamanda pH farklılıklarının şiranın kimyasal bileşimine de etki ettiğini gözlemlemişlerdir. Lu vd.'nin çalışmasına göre, nispeten güçlü stres faktörlerinden olduğu görülen şıra pH'sına dayanım konusunda, çalışmamızda izole edilen maya türlerinin gelişiminin iyi olduğu görülmektedir.

4.3.7. Kükürtdioksite Dayanıklılık

İzolatların, fermantasyon başlangıcında şıraya katılabilecek 25 - 200 mg/l aralığındaki SO₂'yi tolare edebilecek güçte olup olmadığını anlamak için, maya suşları 0, 50, 100, 150, 200 mg/l konsantrasyonlarında SO₂ ilave edilmiş YPD besiyerlerinde, 72 saat 28 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucundaki gelişimler gözlemlenmiş ve sonuçlar çizelge 4.7'e gösterilmiştir.

Çizelge 4.7: İzolatların farklı SO₂ (ppm) konsantrasyonlarındaki gelişimleri

İzolat No	SO ₂ (ppm)					İzolat No	SO ₂ (ppm)				
	0	50	100	150	200		0	50	100	150	200
K1	+	+	+	+	+	Ü13	+	+	+	+	+
K2	+	+	+	+	+	Ü14	+	+	+	+	+
K3	+	+	+	+	+	Ü15	+	+	+	+	+
K4	+	+	+	+	+	Ü16	+	+	+	+	+
K5	+	+	+	+	+	Ü17	+	+	+	+	+
K6	+	+	+	+	+	Ü18	+	+	+	+	+
K7	+	+	+	+	+	Ü19	+	+	+	+	+
K8	+	+	+	+	+	H1	+	+	+	+	+
K9	+	+	+	+	+	H2	+	+	+	+	+
K10	+	+	+	+	+	H3	+	+	+	+	+
K11	+	+	+	+	+	H4	+	+	+	+	+
K12	+	+	+	+	+	H5	+	+	+	+	+
K13	+	+	+	+	+	H6	+	+	+	+	+
Y1	+	+	+	+	+	H7	+	+	+	+	+
Y2	+	+	+	+	+	H8	+	+	+	+	+
Y3	+	+	+	+	+	H9	+	+	+	+	+
Y4	+	+	+	+	+	H10	+	+	+	+	+
Y5	+	+	+	+	+	H11	+	+	+	+	+
Y6	+	+	+	+	+	H12	+	+	+	+	+
Y7	+	+	+	+	+	H13	+	+	+	+	+
Y8	+	+	+	+	+	H14	+	+	+	+	+
Y9	+	+	+	+	+	H15	+	+	+	+	+
Ü1	+	+	+	+	+	E1	+	+	+	+	+
Ü2	+	+	+	+	+	E2	+	+	+	+	+
Ü3	+	+	+	+	+	E3	+	+	+	+	+
Ü4	+	+	+	+	+	E4	+	+	+	+	+
Ü5	+	+	+	+	+	E5	+	+	+	+	+
Ü6	+	+	+	+	+	E6	+	+	+	+	+
Ü7	+	+	+	+	+	E7	+	+	+	+	+
Ü8	+	+	+	+	+	E8	+	+	+	+	+
Ü9	+	+	+	+	+	E9	+	+	-	-	-
Ü10	+	+	+	+	+	E10	+	+	-	-	-
Ü11	+	+	+	+	+	RC212	+	+	+	+	+
Ü12	+	+	+	+	+	Opale	+	+	+	+	+

Yürütülen analizde, E9 ve E10 izolatları haricindeki, bütün maya suşlarının, yasal üst sınır olan 200 ppm SO₂ konsantrasyonunda gelişim gösterdikleri belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan maya suşları da tüm SO₂ konsantrasyonlarında gelişebilmiştir. Bu tabloya göre 2'si haricindeki tüm izolatlar, SO₂ dayanımı bakımından, genel olarak şarap yapımında kullanılabilir gözükmektedir. 200 mg/l konsantrasyonda gelişim göstermeyen izolatlar 15mg/l konsantrasyonu da tolare edemediği ve birinin 100 mg/l konsantrasyonda dahi gelişemediği gözlemlenmiştir. Bu mayalar şarap yapımı için zayıf olarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde diğer çalışmalarda;

Parish ve Carroll (1987), izole ettikleri 4 adet *S. cerevisiae* maya suşundan 2'sinin 300 mg/l SO₂'yi, 1'inin 200 mg/l SO₂ konsantrasyonunda gelişebildiğini, diğer maya suşunun ise 25 mg/l SO₂'ye dahi duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Nurgel C. (2000), incelediği *S. cerevisiae* mayalarının tamamının 100 ve 150 mg/l SO₂ konsantrasyonlarında ilk günde fermantasyona başladıkları, 200 mg/l SO₂ konsantrasyonda ise, bazı mayaların fermantasyona 3. gün başladıkları belirtilmiştir.

Cocolin vd. (2004), yeni tip şarap üretim yerlerinden izole ettikleri *S. cerevisiae* türüne ait izolatların %65'inin 150 mg/l, %45'inin 300 mg/l SO₂; eski tip şarap üretim yerlerinden izole ettikleri suşların ise, tümünün 150 mg/l, %95'inin 300 mg/l SO₂'ye dayanıklı olduklarını belirtmişlerdir.

Nikolaou vd. (2006) izole edip seçtikleri mayaların 6 adeti ile yaptıkları analizde 100, 200 ve 300 mg/l konsantrasyonda SO₂ içeren sıvı besiyerlerinde yaptıkları analizlerde 300mg/l konsantrasyonlu besiyerindeki bir mayanın haricindeki bütün mayaların, bütün konsantrasyonlarda gelişim gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Bağder S. (2008), 0, 50, 100, 150, 200 mg/l konsantrasyonlarında SO₂ ilave edilmiş YPD sıvı besiyerlerinde mayaların gelişme özelliklerini incelemiştir. Çalışma kapsamında incelenen tüm maya suşlarının, tüm konsantrasyonlarda gelişme gösterdiği görülmüştür.

Çavdaroğlu, Ç. (2017), izole edilmiş 37 adet suşun teknolojik özelliklerini incelediği çalışmasında, bu suşlar arasından seçtiği 5 maya suşu ile 50, 10, 150, 200 mg/l konsantrasyonlarında SO₂ içeren besiyerlerinde yaptığı analizlerde bütün suşların gelişme kaydettiğini gözlemlemiştir.

Çelik vd. (2017), izole ettikleri mayalardan, teknolojik özelliklerine göre belirledikleri 4 *S. cerevisiae* ve 1 *Lachancea thermotolerance* türü maya suşlarının, 200 mg/l SO₂ içeren besiyerlerindeki gelişimlerini analiz etmişler ve tüm suşların gelişim gösterdiğini belirlemişlerdir.

4.3.8. Uçar Asit Oluşturma

Mayaların fermentasyon aşamasında ikincil metabolit olarak meydana getirdikleri asetik asit (CH₃COOH) miktarını belirlemek için % 20 glikoz içeren malt ekstraktlı sıvı besiyeri (YPD) kullanılmıştır.

Uçar Asit üretim miktarlarını belirlemek üzere, önceki analizlerde şarap yapımı için gerekli özellikleri karşılamış olan, 15 adet maya seçilmiştir. Maya seçiminde teknolojik özellikleri karşılayan izolatlardan, aynı bağdan izole edilenler arasında, fermentasyon hızları birbirinden farklı olan maya suşları seçilmiştir. Böylece maya suşlarının aynı olma şansının en aza indirilmesi hedeflenmiştir.

Çizelge 4.8: Maya izolatlarının oluşturduğu uçar asit miktarları

İzolat no	Uçar asit (g/l)	İzolat no	Uçar asit (g/l)
K1	0,336 ± 0,021	Ü18	0,348 ± 0,094
K10	0,420 ± 0,098	H4	0,408 ± 0,138
K11	0,332 ± 0,132	H5	0,268 ± 0,045
Y4	0,328 ± 0,028	H6	0,276 ± 0,012
Y7	0,304 ± 0,037	E2	0,328 ± 0,037
Y9	0,352 ± 0,091	E4	0,292 ± 0,048
Ü3	0,348 ± 0,072	E7	0,256 ± 0,007
Ü14	0,328 ± 0,014	RC212	0,280 ± 0,018
		Opale	0,322 ± 0,045

Mayaların fermentasyon aşamasında ikincil metabolit olarak meydana getirdikleri asetik asit miktarının belirlenmesinde kullanılan buharlı damıtma sistemi ile fermentasyon sonunda besiyerinde mayalar tarafından oluşturulan uçar asit miktarı asetik asit cinsinden “g/l” olmak üzere hesaplanmıştır. İzolatların inokule edildiği besiyerlerindeki asetik asit miktarları çizelge 4.8.’te gösterilmektedir.

İzolatların uçar asit oluşturma derecelerinin saptanması çalışması üç tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır. Mayaların fermentasyon sürecinde oluşturduğu uçar asit miktarlarının istatistiksel olarak birbirlerinden farklı olup olmadığını anlamak için öncelikle normalite testi

yapılmış ve uç değerler saf dışı bırakıldıktan sonra tek yönlü anova analizi yapılmıştır. Yapılan anova analizinde model önemli olarak bulunmuştur ($p < 0.05$). Ardından yapılan Tukey çoklu karşılaştırma testi ve gruplandırmada ise izolatların uçur asit oluşturma derecelerinin birbirlerinden istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür.

Asetik asit, şarapların uçucu asitliğinin ana bileşenidir ve bu nedenle şarap kalitesi için kritik öneme sahiptir. Şaraplardaki konsantrasyonu yaklaşık olarak 0,5 g/l'dir ve Uluslararası Bağ ve Şarap Örgütü (OIV) standartlarına göre şarapların sahip olabileceği en yüksek uçur asit konsantrasyonu, asetik asit cinsinden 1,2 g/l'dir (Uluslararası Bağ ve Şarap Örgütü (OIV), 2021).

Uçucu asitlik hücre büyümesinin başlangıcında oluşur (Alexandre vd. 1994) ve üretimi maya suşuna bağlı olarak değişkenlik gösterdiği gibi (Erasmus, Cliff, van Vuuren, 2004), ortam bileşimi, vitaminler, başlangıçtaki şeker konsantrasyonu ve sıcaklık değişimleri gibi fermantasyon koşullarına da bağlıdır (Monk ve Cowley, 1984). Şarap mayaları, aynı zamanda üzüm sırasında yüksek şeker konsantrasyonlarının (> 35 °Bx) neden olduğu hiperozmotik stres tepkisinin bir yan ürünü olarak ta asetik asit üretir. Ayrıca üzüm tanelerinin zedelenmesi ve botrytis (kurşuni küf) te şarapta uçur asitin artmasına sebep olur (Erasmus vd. 2004).

Nikolaou vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, fermantasyon sonunda izole edilen 84 *S. cerevisiae* suşundan seçilen 6 tanesi ile yapılan analizde besiyerlerindeki fermantasyonlar sonunda uçur asit miktarı 0,31 - 0,48 g/l arasında bulunarak ortalamanın altında uçur asit oluşturdıkları tespit edilmiştir.

Lopes vd. (2007), starter kültür olarak kullanılacak *S. cerevisiae* türü maya izole etmek için yaptıkları çalışmada 32 yerli maya suşundan seçtikleri 2 adet *S. cerevisiae* ve 2 adet ticari şarap mayası ile yürüttükleri analizde, otokton mayalar 0,65 ve 0,78 g/l uçur asit üretirken ticari suşlar 0,65 ve 0,87 g/l uçur asit üretmişlerdir.

Tristezza vd. (2014), Güney italya'daki Apulia Bölgesi'nin yerel ve antik üzümü olan "Susumaniello" üzümleri ile yapılan bir çalışmada H₂S salınımı az olduğu tespit edilen 200 suş arasından rastgele alınıp saflaştırılan 72 adet suş üzerinde yapılan moleküler tanımlama sonucunda elde edilen 15 *S. cerevisiae* suşu için çeşitli teknolojik analizler yürütülmüştür. Bu 15 suş ile yürütülen çalışmada susumaniello üzüm şaraları kullanılmış ve denemeler 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Analizler sonunda otokton mayaların 0,14 - 0,37 g/l arasında, kontrol mayası olan ticari suşun ise 0,46 g/l uçur asit oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Çelik vd. (2017), izole ettikleri mayalardan, teknolojik özelliklerine göre belirledikleri 4 *S. cerevisiae* ve 1 *L. thermotolerance* türü maya suşları ile yaptıkları analizde, mayaların 15 °C'de, 200 ppm SO₂ ve %12 v/v alkol içeren YPD sıvı besiyerinde fermantasyon sonunda ürettiği uçur asit değerlerini 0,72-1,02 g/l arasında bulmuşlardır. Çalışmanın sonucunda en düşük uçur asit üreten 1088 kodlu mayayı starter kültür olarak önermişlerdir.

Furdíková vd. (2017), Slovakya'daki belirli bağlardan topladıkları Gewurztraminer çeşiti üzümünden izole ettikleri 3 otokton maya ile yürüttükleri çalışmada, çalışılan bütün mayaların yaklaşık 0,3 g/l uçur asit oluşturduklarını saptamışlardır.

4.4. Karakterizasyon

4.4.1. DNA Dizileme Analizi

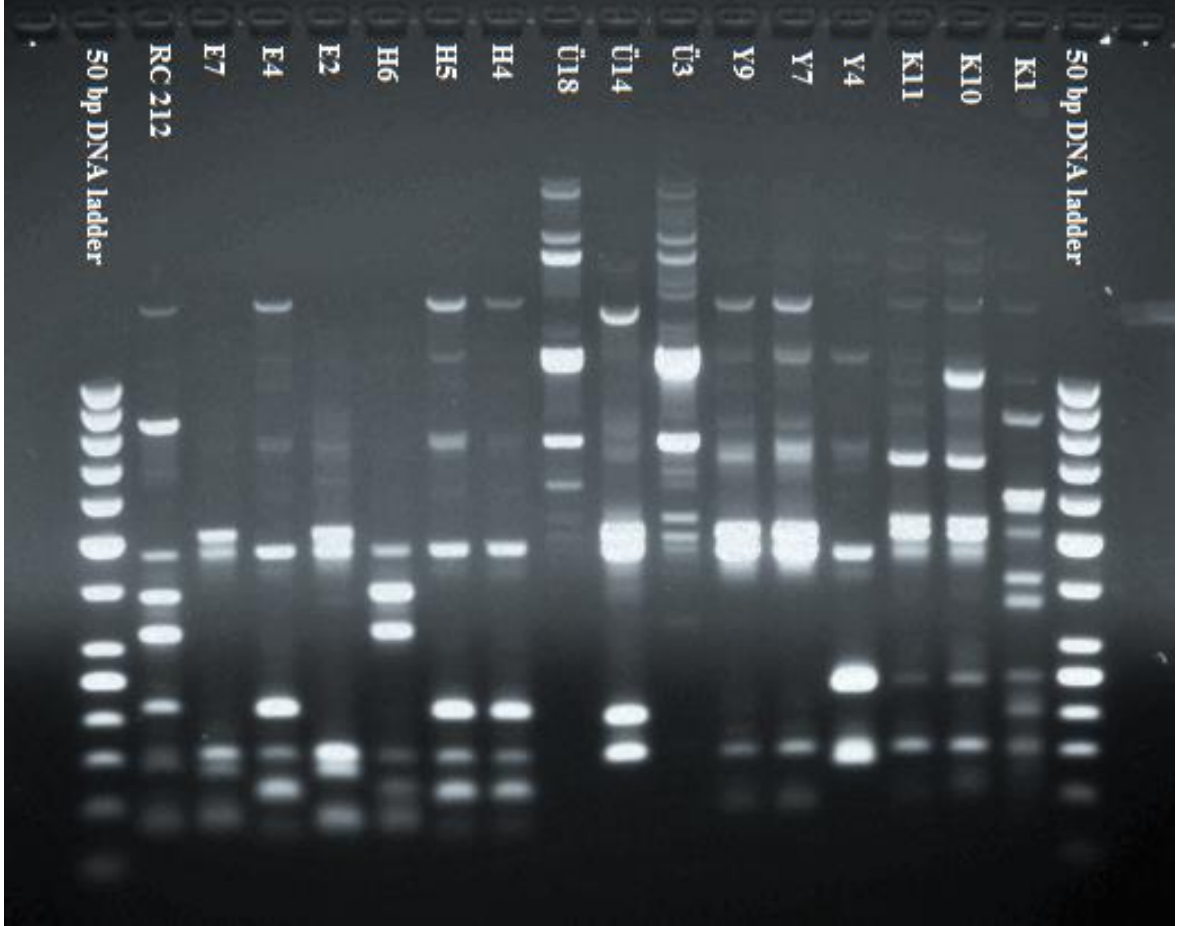
Teknolojik testlerde, şarap yapabilecek yeterliliği göstermiş olan mayalar arasında aynı bağdan izole edilmiş olanların kendi içinde farklılık gösterme şansını arttırmak adına fermantasyon hızlarının birbirlerinden uzak olduğu düşünülen izolatlar belirlenmiş ve her bağdan 3'er adet olacak şekilde seçilmiştir. Seçilen K1, K10, K11, Y4, Y7, Y9, Ü3, Ü14, Ü18, H4, H5, H6, E2, E4, E7 izolatlarının *S. cerevisiae* türüne ait olup olmadıklarının anlamak için DNA dizileme analizi yapmak üzere Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi'ne bağlı olan NABİLTEM'e gönderilmiştir.

ITS gen bölgeleri iki yönlü olarak okunmuş ve her iki yönde de okunan nükleotit dizileri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Fark gösteren yerler DNA dizileme kromatogramları üzerinden manuel olarak değerlendirilmiş ve BLAST analizi için hazır hale getirilmiştir. Dizi analizi sonuçları BLAST programı ile GenBank'ta var olan diziler ile karşılaştırılmış ve maya örneklerinin moleküler tanıları yapılmıştır. Yapılan dizileme analizleri sonucunda seçilen 15 izolatın hepsinin *Saccharomyces cerevisiae* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin DNA dizi analizi ve bu örneklere yapılan BLAST arama sonuçları EK-1'de toplu olarak verilmiştir.

4.4.2. DNA Parmakizi Analizleri

Dizileme analizleri ile elde edilen sonuçlarda, 15 izolatın da *S. cerevisiae* türüne ait olduğu belirlendikten sonra, suş bazındaki farklılıkları değerlendirmek üzere, DNA parmakizi analizlerinin seçilen tüm izolatlara uygulanmasına karar verilmiştir.

Delta 12-21 primerleri ile PCR'da çoğaltılan DNA örnekleri 1,4'lük agaroz içeren 1xTBE jel'de 100V'ta 2 saat yürütüldükten sonra görüntüleri kaydedilmiştir (şekil 4.4).



Şekil 4.4: Delta 12 - delta 21 primerleri ile çoğaltılan DNA'ların jel elektroforezindeki görüntüsü

Elektroforez sonrası kaydedilen görüntü incelendiğinde K10 – K11, Y7 – Y9, Ü3 – Ü18, H4 – H5 ve E2 – E7 izolatlarının birbiri ile aynı suşlar olduğu görülmüştür. İlginç şekilde farklı bir bağdan alınan E4 izolatının da H4 ve H5 izolatları ile aynı suş olduğu görülmüştür. *S. cerevisiae* türüne ait olan ticari şarap mayası ile izole edilip seçilen hiçbir izolatın, suş bazında, aynı olmadığı görülmüştür. Delta 12-21 primerlerinin kullanıldığı DNA parmakizi sonucunda, seçilen suşlar arasından 9 tanesinin farklı *S. cerevisiae* suşu olduğu görülmüştür.

Legras ve Karst (2003), DNA parmakizi analizi ile *S. cerevisiae* suşlarının ayrımında en etkili olan primer çiftinin delte 12 - delta 21 primer çifti olduğunu ortaya koyduğu çalışmalarına istinaden bu çalışmada da aynı primerler kullanılmış ve yapılan DNA parmak izi analizinde Legras ve Karst'ın çalışmasındaki elektroforez görüntüsünün benzerine ulaşılmıştır.

Bilgin A.N. (2015), topladığı üzümlerden izole ettiği, farklı cinslerdeki 334 adet otokton mayanın dizileme analizlerini ITS1 ve ITS4 primer çiftlerini kullanarak gerçekleştirdikten sonra *S. cerevisiae* türüne ait mayaların birbirlerinden farklı olup olmadıklarını, yine delta 12 ve delta 21 primer çiftlerini kullanarak analiz etmiştir. Çalışmasının sonunda bu yöntemle 3 adet farklı *S. cerevisiae* suşunun şarap yapım özellikleri bakımından öne çıktığını gözlemlemiştir. Tez çalışmamızda da aynı yöntemler izlenerek, temel teknolojik özellikleri taşıyan suşlarda, genomik karakterizasyon çalışması yapılmış ve 9 farklı *S. cerevisiae* suşu elde edilmiştir. Ancak bu suşların şaraplarda etkin sonuçlar verip vermeyecekleri ileride yapılacak çalışmalarla belli olacaktır.

Garofalo vd. 2016 yılında, üzüm çeşitlerinde doğal maya florasını ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışmada dizileme analizlerini ITS 1 - ITS 4 primerlerini kullanarak ve DNA parmak izi analizlerini ise delta 12 - delta 21 primer çiftini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Tez çalışmamızda da Garofalo vd.'nin ulaştığı jel görüntüsünün benzerine ulaşılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, günümüzde, Dünyadaki şarap üreticisi ülkelerde öne çıkan ve tamamıyla yerel özellikler taşıyan teruar şaraplarının üretiminin bir parçası olarak yapılan yerel mayaların izolasyonu ve tanımlanması çalışmalarına paralel olarak Ülkemizin kendi gen kaynaklarından yerel mayaların toplanması, amaca uygun ve dirençli türlerin belirlenerek, şarap yapımına uygun, *S. cerevisiae* türüne ait olan mayaların seçilmesi amaçlanmıştır. Bu sayede lokal ve amaca uygun şarap mayaları elde ederek bölgesel şarapların karakteristik farklarını tam anlamıyla yansıtan teruar şarapların üretimine katkı sağlanabilir ve buna ek olarak ülkemizde ihracatı yapılan şarapların karakteristik tatlar taşımasının, böylece ülkemiz şaraplarının yurtdışı pazarında daha geniş bir alana yayılmasının önünü açılabilir. İleriki dönemde şarap mayaları konusunda ülkemizin dışa bağımlılığını azaltmak ve ayrıca kendi starter kültürlerimizi tanımlama ve üretme yolunda adımlar atılmasına katkı sağlamak ta çalışmanın hedefleri arasındadır.

Proje kapsamında Kırklareli, Edirne ve Tekirdağ illerinde farklı özellikler taşıyan 5 lokasyondan Papazkarası üzümleri, maya izolasyonu ve tanımlanması için toplanmıştır. Spontan fermantasyonlar sonunda, morfolojik özelliklerine göre bakılarak rastgele seçilen 66 adet saflaştırılmış izolat elde edilmiştir. İzolatlara uygulanan teknolojik analizler sonucunda 46 adet mayanın şarap yapabilecek kapasiteye sahip olduğu görülmüştür.

Hidrojen sülfürün şaraplarda yarattığı çürük yumurta kokusu istenmeyen bir durum olduğundan şarap starteri olarak kullanılacak mayaların düşük seviyelerde H₂S üretmesi istenmektedir. Yapılan hidrojen sülfür üretimi analizinde referans olarak alınan ticari maya suşu (Lalvin Bourgovin RC212) BIGGY agar üzerinde kahverengi koloniler oluşturarak orta düzey bir hidrojen sülfür üreticisi olduğunu göstermiştir. Kullanılan ticari maya sınır olarak kabul edilerek analizdeki diğer izolatlardan kahverengi ve daha açık tonlarda koloniler oluşturan 60 adet izolat şarap mayası potansiyeli taşıyan mayalar olarak kabul edilmiştir. Koyu kahverengi ve daha koyu tonda koloni oluşturan 6 adet izolat (Ü1, Ü6, Ü8, Ü9, Ü16 ve Ü19) yüksek hidrojen sülfür üretimlerinden dolayı şarap yapma özelliği taşımayan maya kategorisinde değerlendirilmiştir.

Y7, Y8, Y9, H6, E1 suşlarının, diğer teknolojik analizlerde de başarı sağladıklarından dolayı, mayadan gelen H₂S düzeyinin çok düşük olması istenen veya hasarlı üzümlerden

yapılacak şarapların üretiminde kullanılabilme potansiyellerinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Şarap mayalarının fermantasyonun ilk aşamalarında ortamda baskın hale geçmeleri gerektiğinden 24. ve 72. saatler arası üreme hızının yüksek olması istenmektedir. Çalışmada, bu aralıktaki ağırlık azalmalarına bakıldığında, Ü1, Ü6, Ü8, Ü9, Ü16, Ü19 izolatları haricindeki bütün izolatlar 0,25 g.CO₂/l.sa fermantasyon hızının üzerinde bir performans göstermiştir. 66 izolattan 30 tanesi, kontrol grubu olarak kullanılan kırmızı ve beyaz şarap mayalarından daha iyi performans gösterirken, 7 tanesi de kontrol grubu olarak kullanılan iki ticari mayanın arasında bir performans sergilemişlerdir. Fermantasyon hızı yüksek mayalar oransal olarak, en fazla Yeniköy ve Hamitabat'tan toplanan üzümlerden izole edilen izolatlardır. Bu konuda yapılan diğer çalışmalara bakarak izolatların yarısından fazlasının, şırayı çok kuvvetli bir şekilde fermante edebilen, yüksek fermantasyon hızına sahip, baskın mayalar olduğu gözlemlenmiştir.

37 °C ve 42 °C'de yapılan yüksek sıcaklıkta çoğalma kabiliyeti ölçüm testlerinde, tüm izolatlar 37 °C'de gelişim gösterirken, 10 izolat 42 °C'de gelişim gösterememişlerdir. Geriye kalan 56 adet izolat her iki sıcaklıkta da gelişim göstermiştir. Bu oran, benzer çalışmalardaki izolatların 42 °C'deki gelişimlerine kıyasla yüksek bir oran olarak görülmektedir. Yüksek sıcaklıklarda iyi gelişim gösteren mayaların, soğutma sistemi bulunmayan ve fermantasyon süresince aşırı sıcaklık yükselmelerinin görülebildiği durumlarda fermantasyon duraksamalarının önüne geçmek için kullanılabilme potansiyeli vardır.

Çalışmadaki tüm maya izolatlarınının 30 °Bx konsantrasyonda gelişebildikleri gözlemlenmiştir. Bu yönden bakılarak izolatların geç hasat edilen, sıcak iklimde yetişmiş veya botrytisli üzümlerden elde edilen yüksek şeker konsantrasyonuna sahip şıralardan elde edilecek şarapların üretiminde ozmotik basınca dayanıklı starterler olarak kullanılacakları görülmüştür.

Ü16 ve Ü19 izolatları %10 ve K6, Ü9, H8, H9, H11, H12, H13 izolatları ise %13 alkolde gelişim gösteremediklerinden dolayı şarap starteri olarak değerlendirmeye alınmamışlardır. K9, Ü2, Ü6 ve Ü17 izolatları ise %10 ve %13 konsantrasyonlarda gelişim gösterebilmiş ancak %15 konsantrasyonda gelişim gösterememiştir. Bu maya suşlarının, yüksek alkollü şarapların yapımında kullanılması potansiyel sorunlara yol açabilir. Ancak beyaz şarap veya daha düşük alkollü şarapların yapımında kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Bu

gibi alanlarda kullanılabilirlik ihtimalleri daha ileriki çalışmalarda araştırılabilir niteliğe sahiptir. 53 adet izolat %15 etanol konsantrasyonunda gelişebilmiştir. Bu konsantrasyonda gelişebilmeleri, şarap yapımı için yeterli bir özellik olup, starter olarak kullanılacaklarını göstermektedir. Ayrıca K3, K5, K7, K8, K10, K11, K12, K13, Ü3 ve Ü18 izolatları %17 etanol konsantrasyonlarında dahi gelişim göstermişlerdir. %15 ve üstündeki etanol konsantrasyonlarına dayanıklılık testleri daha çok biyoetanol veya biyokütle üretimlerinde kullanılacak starter kültürlerin seçilmesinde yapılan analizlerdir. Ancak etanolün maya üzerinde bir stres faktörü olduğunu düşündüğümüzde starter kültür olarak kullanılacak maya suşunun bu stres faktörüne ne kadar dayanıklı olursa stres altındayken ürettiği ve kaliteye olumsuz etki edebilen ikincil metabolitlerini üretme ihtimalinin de o denli düşük olacağını öngörebiliriz. Bu nedenle çalışmada starter kültür olabileceği öne sürülen izolatların, %17 etanol konsantrasyonunda gelişim gösterebilen suşların izole edildiği bağlarda, bu izolatların içinden de seçilmesine karar verilmiştir.

Fermantasyonun başında ve sonunda genellikle görülen pH aralığı 3,0 ve 4,0 olmaktadır ve çalışmadaki tüm izolatlar bu pH aralığında gelişim göstermiştir. Ayrıca E9 ve E10 izolatları dışındaki tüm izolatlar 0-200 ppm SO₂ konsantrasyonlarında gelişim göstermişlerdir. 200 ppm SO₂ konsantrasyonu ülkemizde Türk Gıda Kodeksine göre yasal sınır olarak belirlenmiştir. Yüksek kükürtlemenin gerekebileceği, düşük asitli şıra, beyaz üzüm şırası, darbe ve çürüklerin fazla olduğu üzümlerin şaraba işlenmesi vs. gibi durumlarda çalışmadaki izolatların kullanılabilirliği öngörülmektedir.

Teknolojik özellikleri belirlenen izotatlardan şarap yapımı için uygun olanlar arasından seçilen mayaların uçurucu asit oluşuma potansiyelleri incelendiğinde, OIV standartlarına göre şarapların sahip olabileceği en yüksek uçurucu asit konsantrasyonu olan 1,2 g/l'den daha az asetik asit oluşturdukları görülmüştür. Elde edilen değerler diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında ortalama olduğu saptanmıştır. Yapılan Tukey çoklu karşılaştırma testinde izolatların uçurucu asit oluşturma derecelerinin birbirlerinden istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür.

Trakya yöresine ait bir çeşit olan Papazkarası üzümü üzerinden izole edilerek saflaştırılan 66 adet izolata uygulanan teknolojik testlerde, 46 adet izolatın şarap yapabilmek için gerekli temel kriterlere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların içinden, yapılan analizlerden yola çıkılarak, birbirinden farklı olduğu düşünülen 15 adet maya seçilerek DNA dizileme analizine tabi tutulmuş ve hepsinin *S. cerevisiae* türüne ait olduğu görülmüştür. İzolatların suş bazında birbirlerinden farklı olup olmadığını anlamak için DNA parmakizi

analizleri yapılmış ve çalışma sunucunda şarap yapabilme yeteneğine sahip, 9 farklı *S. cerevisia* suşu elde edilmiştir.

Elde edilen izolatlar Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü bünyesinde -80 °C’de gliserol stoklarda saklanmaktadır. Moleküler tanımlaması yapılan izolatların şarap uygulamalarında gösterecekleri performansları görebilmek için bir T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne ilgili proje sunulmuş ve kabul edilmiştir.



6. KAYNAKLAR

- Agarbati, A., Canonico, L., Comitini, F., Ciani, M. (2020). Reduction of Sulfur Compounds through Genetic Improvement of Native *Saccharomyces cerevisiae* Useful for Organic and Sulfite-Free Wine. *Foods*, 9(5), 658.
- Aktan, N., Kalkan, H. (2000). *Şarap Teknolojisi*. Şarapta yapılan analizler (1. Baskı) içinde (614-642). Ankara: Kavaklıdere Eğitim Yayınları.
- Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C., (1994). Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol Letters*, 124, 17–22.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. Z. Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped Blast and Psi-Blast. *A new generation of protein database search programs* (5. Baskı) içinde (3389 -3402). Oxford: Oxford University Press.
- Anonim (2021a). Fermentasyon üzerine. 17.03.2021. Erişim adresi: <http://apelasyon.com/Yazi/396-dogal-maya-ile-kultur-mayasifermentasyonu-karsilastirmasi>
- Anonim (2021b). Şarap üretim, ithalat ve ihracat verileri. 29.03.2021. Erişim adresi: <https://www.tarimorman.gov.tr/TADB/Menu/23/Alkol-Ve-Alkollu-Ickiler-Daire-Baskanligi>
- Anonim (2021c). Definition of Vitivinicultural “Terroir”. 23.03.2021. Erişim adresi: <http://www.oiv.int/public/medias/379/viti-2010-1-en.pdf>
- Anonim (2021d). Maya izolatlarının DNA izolasyonu. 01.04.2021. Erişim adresi: <https://docplayer.biz.tr/24292744-Rta-mayadan-genomik-dna-izolasyon-kiti.html>
- Antia, E.U., Akan, D.O., Stephen, U.N., Eno-Ibanga, K.C., Akpan, G.N. (2018). Isolation and screening of yeast isolates indigenous palm wine for ethanol production. *Philippine Journal of Science*, 147(3), 411-417.
- Bağder, S. (2008). Türkiyede Değişik Şarap Bölgelerinden İzole Edilmiş Şarap Mayalarının Teknolojik Özellikleri. (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Beltran, G., Novo, M., Guillamon, J.M., Mas, A., Rozes, N. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 121, 169–177.
- Benítez, T., Del Castillo, L., Aguilera, A., Conde, C., Cerdá-Olmedo, E. (1983). Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(5), 1429-1436.
- Bernardi, T.L., Pereira, G.V.M., Cardoso, P., Dias, E.S., Schwan, R.F. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: Identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2705-2712.

- Bilgin, A.N. (2015). *Türkiye bağlarından şarap/alkol fermentasyonuna uygun mayaların seçilmesi ve moleküler karakterizasyonu* (TAGEM AR-GE Projesi), Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul.
- Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., Andolfi, R., Moschetti, G. (2002). 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garrisi*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis. *System Appl. Microbiol.*, 25(4), 520-527.
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D.A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 139-148.
- Budroni, M., Ladu, G., Zara, G., Zara, S., Farris, A.G. (2006). Molecular and Enological Characterization of Autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Grape-musts and Wines Cannonau. 2006 First International Symposium on Environment Identities and Mediterranean Area. DOI: 10.1109/ISEIMA.2006.345011.
- Capello, M.S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F., Zacheo, G. (2004). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1274-1280.
- Casalone, E., Colella, C.M., Daly, S., Gallori, E., Moriani, L., Polsinelli, M. (1992) Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 22(6), 435-440.
- Chambers, P.J. and Pretorius, I.S. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Reports*, 12(11), 914-920.
- Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D.P., Deshpande, M.V. (2009). Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiology*, 26(8), 801-808.
- Charoenchai, C., Fleet, G.H. and Henschke, P. (1998). Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(3), 283-288.
- Ciani, M., Beco, L., Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, 108(2), 239-245.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Heras-Vázquez, F.J.L., Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microb.*, 21(2), 149-155.
- Cocolin, L., Pepe, V., Comitini, F., Comi, G., Ciani, M. (2004). Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *Fems Yeast Research*, 5(3), 237-245.
- Cordente, A.G., Heinrich, A., Pretorius, I.S., Swiegers, J.H. (2009). Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *Fems Yeast Research*. 9(3), 446-459.

- Costa, D.A., de Souza, C.J.A., Costa, P.S., Rodrigues, M.Q.R.B., dos Santos, A.F., Lopes, M.R., Genier, H.L.A., Silveira, W.B., Fietto, L.G. (2014). Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI 10.1007/s00253-014-5580-3.
- Çavdaroğlu, Ç. (2017). *Physiological Traits of Saccharomyces cerevisiae Strains Isolated From Traditional Wines in Turkey* (Yüksek Lisans Tezi). Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çelik, H. (2006). Üzüm Çeşit Kataloğu. Ankara, Sunfidan A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi.
- Çelik, Z.D., Erten, H., Darıcı, M., Cabaroğlu T. (2017). Molecular characterization and technological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of *Vitis vinifera* L.cv. Narince grape must grown in ancient wine making area Tokat, Anatolia. 40th World Congress of Vine and Wine. Doi: 10.1051/bioconf/20170902017.
- Deak, T. (2008). *Handbook of Food Spoilage Yeasts* (2nd ed.). Baton Boca: CRC Press.
- Demain, A.L., Solomon, N.A. (1981). Industrial microbiology: introducing an issue of how products useful to man are manufactured by microorganisms. *Sci. Am.*, 245:43-51.
- Dequin, S., Salmon, J.M., Nguyen, H.V., Blondin, B. (2003). *Wine yeasts*. *Yeasts in Food* (1. Baskı) içinde (389-425). Hamburg: Woodhead Publishing Limited.
- Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D., Zhang, K. (2009). Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 253–263.
- Divol, B., Du Toit, M., Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 95(3), 601–613.
- Ely, R.L. ve Chen, J. (2001). Comparison of artificial neural network, genetic programming, and mechanistic modeling of complex biological processes. *Environ. Eng. Sci.*, 18(5), 267-278.
- Engel S.R., Dietrich F.S., Fisk D.G., Binkley G., Balakrishnan R., Costanzo M.C., Dwight S.S., Hitz B.C., Karra K., Nash R.S., Weng S., Wong E.D., Lloyd P., Skrzypek M.S., Stuart R.M., Simison M., Cherry M.J. (2014). The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(3), 389-398.
- Epifanio, S.I., Gutierrez, A.R., Santamaria, M.P., López, R. (1999). The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 219-224.
- Erasmus, D.J., Cliff, M., van Vuuren, H.J.J. (2004) Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55(4), 371–378.
- Erten, H. (2002). Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 373-378.

- 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.
- Fleet, G.H., Heard, G.M. (2002). *Yeasts-Growth during fermentation*. Wine Microbiology and Biotechnology (1st ed.) içinde (27-54), London: Taylor&Francis Inc.
- Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 11-22.
- Fugelsang, K.C. ve Edwards, C.G. (2007). *Wine Microbiology Practical Applications and Procedures* (1st ed.) içinde (82-101), New York: Springer Inc.
- Fujita, K., Matsuyama, A., Kobayashi, Y., Iwahashi, H. (2006). The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. *FEMS Yeast Res.* 6, 744–750.
- Furdíková, K., Makyšová, K., Ďurčanská, K., Špánik, I., Malík, F. (2014). Influence of yeast strain on aromatic profile of Gewürztraminer wine. *Food Science and Technology*, 59, 256–262.
- Furdíková, K., Makyšová, K., Špánik, I. (2017). Effect of Indigenous *S. cerevisiae* Strains on Higher Alcohols, Volatile Acids, and Esters in Wine. *Czech Journal of Food Sciences* 35(2), 131 - 142.
- Gao, C., Fleet, G. (1988). The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.*, 65,405–409.
- Garofalo, C., Tristezza, M., Grieco, F., Spano, G., Capozzi, V. (2016). From grape berries to wine: population dynamics of cultivable yeasts associated to “Nero di Troia” autochthonous grape cultivar. DOI 10.1007/s11274-016-2017-4.
- Genç, T.T., Çıldır, İ.N. (2012). Bozcaada üzüm çeşitleri üzerinde *Non-Saccharomyces* mayaların dağılımı. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 5 (1), 115-120.
- Geröcs, G., Barná, K.N., Pál, S., Szőke, B., Májer, J., Farkas, T., Olasz, F. (2020). Isolation and characterization of yeast strains from Badacsony, Hungary. *Indian Journal of Experimental Biology*, 58, 461-473.
- Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169(5), 387-392.
- Guimarães, T. M., Moriel, D. G., Machado, I. P., Picheth, C. M. T. F., Bonfim, T. M. B. (2006). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(1), 119-126.
- Gutiérrez, A.R., Santamaria, P., Epifanio, S., Garijo, P., López, R. (1999). Ecology of Spontaneous Fermentation in One Winery During 5 Consecutive Years. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29, 411-415.
- Hansen, E.C. (1881). *Medd. Carlsberg. Lab. Bd.*, 1, 293-309.

- Herrero, M., Garcia, L.A., Diaz, M. (2003). The effect of SO₂ on the production of ethanol, acetaldehyde, organic acids and flavor volatiles during industrial cider fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3455–3459.
- Hinze, H., Holzer, H. (1986). Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Arch. Microbiol.*, 145, 27–31.
- Ho, N.W.Y., Chen, Z., Brainard, A.P. (1998). Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(5), 1852–1859.
- Hutkins, R.W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*(1st ed.) içinde (349-395). USA: Blackwell Publishing.
- Ibeas, J.L. ve Jimenez, J. (1997). Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces* flor yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 7,12.
- Ilieva, F., Petropulos, V.I., Dimovska, V., Mitrev, S., Karov, I., Spasov, H. (2014). Influence of autochthonous yeasts on the quality of wines from Vranec and Cabernet Sauvignon varieties. Conference: 24 th International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry. 220-225.
- 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.
- Jolly, N.P., Pretorius, I.S., Augustyn, O.P.H. (2006). The role and use of *Non-Saccharomyces* yeasts in wine production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 27(1), 15-39.
- Jones, M., Pierce, J.S. (1964). Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J. Inst. Brew.* 70, 307-315.
- Kuchen, B., Maturano, Y.P., Mestre, M.V., Combina, M., Toro, M.E., Vazquez, F. (2019). Selection of native *non-Saccharomyces* yeasts with biocontrol activity against spoilage yeasts in order to produce healthy regional wines. *Fermentation*, 5(60), Doi:10.3390/fermentation5030060.
- Lachance, M.A. ve Starmer, W.T. (1998). *Ecology of yeasts*. The yeasts, a taxonomic study (4th ed.) Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Lee, J.H., Williamson, D., Rogers, P.L. (1989). The effects of temperature on the kinetics of ethanol production by *Saccharomyces uvarum*. *Biotechnology Letters*, 2(4):83-88.
- Lee, Y.J., Choi, Y.R., Lee, S.Y., Park, J.T., Shim, J.H., Park, K.H., Kim, J.W. (2011). Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. *Mycobiology*, 39(1), 33-39.
- Legras, J-L., Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 249-255.
- Lilly, M., Bauer, F.F., Styger, G., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2006) The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of

- higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Res.*, 6, 726–743.
- Liu, X., Jia, B., Sun, X., Ai, J., Wang, L., Wang, C., Zhao, F., Zhan, J., Huang, W. (2015). Effect of initial pH on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Food Sci.*, 80, 800–808.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., Villa, TG. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 141-144.
- Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Querol, A., Bramardi, S., Caballero, A.C. (2006). Relationship between molecular and enological features of Patagonian wine yeasts: relevance in selection protocols. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 827-833.
- Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M., Querol, A., Caballero, A.C. (2007). Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 539-546.
- Lu, Y., Voon, M.K.W., Huang, D., Lee, P.R., Liu, S.K. (2016). Combined effects of fermentation temperature and pH on kinetic changes of chemical constituents of durian wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-016-8043-1.
- Macrina, F.L., Tobian, J.A., Jones, K.R., Evans, R.P., Clewell, D.B. (1982). A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene*, 19, 345-353.
- Mannazzu, I., Clementi, F., Ciani, M. (2002). *Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters*. Biodiversity and biotechnology of wine yeasts (4th ed.) içinde (19-33). Trivandrum: Research Signpost.
- Martini, A., Ciani, M., Scorzetti, G. (1996). Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 435-440.
- McGovern, P.E., Fleming, S.J., Katz, S.H. (1996). *The Origins And Ancient History of Wine* (1. Baskı). Amsterdam: Gordon and Breach Publishers.
- Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P., Falkow, S. (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 127(3), 1529-37.
- Michels, C.A. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* as a Genetic Model Organism. *Genetic Techniques for Biological Research*, 6, 19-21.
- Monk, P.R., Cowley, P.J. (1984). Effect of nicotinic acid and sugar concentration of grape juice and temperature on accumulation of acetic acid yeast fermentation. *J. Ferment. Technol.*, 62, 515– 521.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Calderón, F., Suárez, J.A. (2006). Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 123-129.

- Mundkur, B.D. (1954). The Nucleus of *Saccharomyces*: A Cytological Study of a Frozen-Dried Polyploid Series. *J. Bacteriol.*, 68(5), 514-529.
- Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Tzanetakis, N. (2006). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristic and vinification results. *Food Microbiology*, 23, 205-211.
- Nissen, P. (2003). Characterization of early growth arrest and death of *non-Saccharomyces* yeasts in model wine fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.
- Nurgel, C. (2000). Emir ve Kalecik karası üzümünün şaraba işlenmesinde maya florasındaki gelişmeler ve fermantasyonda kullanılan mayaların kalite üzerine etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Orlić, S., Očić, N., Jeromel, A., Huić, K., Redžepović, S. (2005). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from Kutjevo wine growing area at the laboratory scale. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 70(3), 93-97.
- Ough, C.S. (1986). Determination of sulfur dioxide in grapes and wines. *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 69(1), 5-7.
- Ough, C.S. ve Amerine, A.M. (1988). *Methods for Analysis of Musts and Wines* (2nd Edt.) içinde (365). New York: Wiley.
- Özçelik, F. ve Denli, Y. (1999). Şarap mayalarının teknolojik özellikleri. *Gıda*, 24(6), 385-389.
- Parish, M.E. ve Carroll, D.E. (1987). Fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* isolates from *Vitis rotundifolia* grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 45-48.
- Pasteur, L. (1872). Nouvelles experiences pour de´montrer que le germe de la levure qui fait le vin provient de l’exterieur des grains de raisin. *Comptes Rendus de L’Académie des Sciences de Paris* 75: 781-793.
- Pérez-Coello, M.S., Briones-Pérez, A.I., Ubeda-Iranzo, J.F., Martin-Alvarez, P.J. (1999). Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. *Food Microbiology*, 16, 563-573.
- Pérez-Torrado, R., Carrasco, P., Aranda, A., Gimeno-Alcañiz, J., Pérez-Ortín, J.E., Matallana, E., del Olmo, M. (2002). Study of the first hours of microvinification by the use of osmotic stress-response genes as probes. *Syst. Appl. Microbiol.*, 25, 153–161.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.
- Rainieri, S., Pretorius, I.S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.*, 50, 15-31.
- Rankine, B.C. (2004). *Making good wine: a manual of winemaking practice for Australia and New Zealand*. Macmillan: Basingstoke, England.

- Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Možina, S.S., Čadež, N. (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int. J. Food Microb.*, 109, 97-102.
- Reed, G., Nagodawithana, T.W. (1988). Technology of yeast usage in winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(1), 83-90.
- Regodon, J.A., Perez, F., Valdes, M.E., De Miguel, C., Ramirez, M. (1997). A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology*, 14, 247-254.
- Replansky, T., Koufopanou, V., Greig, D., Bell, G. (2008). *Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(9), 494–501.
- Rodríguez, M.E., Infante, J.J., Molina, M., Domínguez M., Rebordinos L., Cantoral J.M. (2010). Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1292–1302.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 169-180.
- Rosini, G., Federici, F., Martini, A. (1982). Yeast flora of grape berries during ripening. *Microb. Ecol.* 8, 83-89.
- Samaras, Y., Amitsi, A., Groumpos, B., Riga, I., Roussa, C., Makariadou, E., Eriotou, E. (2012). Isolation, identification and tolerance to alcohol and sulfite of yeasts from Kefalonian grape must solids. 57th Meeting of New Zealand Microbiology Society.
- Santos, M.D.S.M., Cardoso, C., Silva, E.M., Batistote, M. (2018). Potential of Saccharine Substrates for Ethanol Production. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 10(1), DOI: 10.17807/orbital.v10i1.1013.
- Schvarczová, E., Stefaniková, J., Jankura, E., Kolek, E. (2017). Selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains for production of typical Pinot gris wines. *Journal of Food and Nutrition Research*, 56(4), 389-397.
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., Casal, M. (2005). Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde region of Portugal. *FEMS Microb. Ecol.*, 51(2), 167-177.
- Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. (1997). *Yeasts in Natural and Artificial Habitats* (1st ed.). Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P.J., Stanley, G.A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.*, 109, 13–24.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian J. Grape Wine Res.*, 11, 139–173.
- Şener, A., Canbas, A., Ünal, M.U. (2007). The effect of fermentation temperature on the growth kinetics of wine yeast species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31(5), 349-354.

- Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, 80(1), 47-53.
- Tristezza, M., Fantastico, L., Vetrano, C., Bleve, G., Corallo, D., Grieco, F., Mita, G., Grieco, F. (2014). Molecular and technological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from natural fermentation of Susumaniello grape must in Apulia, Southern Italy. *International Journal of Microbiology*. doi: 10.1155/2014/897428.
- Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., Querol, A. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 237–243.
- Türkiye İstatistik Kurumu, (2021). Tarımsal üretim istatistikleri. 24 Şubat 2021. Erişim adresi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>
- Uluslararası Bağ ve Şarap Örgütü [OIV], (2021). International code of oenological practices. 17 Nisan 2021. Erişim adresi: <https://www.oiv.int/public/medias/7713/en-oiv-code-2021.pdf>
- Ükelgi, N. (2011). Türkiye'nin üç üzüm bağından toplanan üzümlerden şarap mayası izolasyonu, tanımlanması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Sabancı Üniversitesi, İstanbul.
- Ünsal, T. (2007). Kalecik Karası, Gamay ve Cabernet Sauvignon Şaraplarında Bazı Fenolik Bileşenlerin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., Dequin, S. (2007). Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.*, 7(2), 317-29.
- Vicente, M.A., Fietto, L.G., Castro, I.M., Santos, A.N.G., Coutrim, M.X., Brandão, R.L. (2006). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 51-59.
- Xu, X., Wightman, J.D., Geller, B.L., Avram, D., Bakalinsky, A.T. (1994). Isolation and characterization of sulfite mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 25, 488–496.
- Zohre, D.E., Erten, H. (2002). The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochem.*, 38, 319-324.

EK 1. Seçilen izolatların ITS 1-4 gen bölgelerinin DNA dizileri ve BLAST analiz sonuçları

K1

CCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAA
 AACAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATTA AAAA ACTTTCAACAACGGA
 TCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAA
 TTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATT
 CCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGT
 GAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGA AATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTT
 TTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTT
 TTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTAT
 CGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCA
 GGTAGGA

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
935 bits(506)	0.0	506/506(100%)	0/506(0%)	Plus/Plus
Query 2	CCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAG	61		
Sbjct 260	CCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAG	319		
Query 62	AATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATTA AAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC	121		
Sbjct 320	AATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATTA AAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC	379		
Query 122	TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGA	181		
Sbjct 380	TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGA	439		
Query 182	ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTT	241		
Sbjct 440	ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTT	499		
Query 242	AGCGTCATTTCCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACT	301		
Sbjct 500	AGCGTCATTTCCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACT	559		
Query 302	TGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTG	361		
Sbjct 560	TGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTG	619		

```

Query 362 CTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTT 421
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 620 CTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTT 679

Query 422 ATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTT 481
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 680 ATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTT 739

Query 482 AAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 507
          |||||||||||||||||||
Sbjct 740 AAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 765

```

K10

GTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAAT
TTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT
CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGG
CATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATA
CTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTTCCAA
AGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTT
ACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGA
AGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
920 bits(498)	0.0	498/498(100%)	0/498(0%)	Plus/Minus
Query 1		GTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCG	60	
Sbjct 450070		GTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCG	450011	
Query 61		TAAGTGGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCG	120	
Sbjct 450010		TAAGTGGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCG	449951	
Query 121		ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGA	180	
Sbjct 449950		ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGA	449891	
Query 181		ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCAT	240	
Sbjct 449890		ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCAT	449831	

```

Query 241 TTCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAAATTG 300
          |||
Sbjct 449830 TTCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAAATTG 449771

Query 301 CTGGCCTTTTCATTGGATGtttttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGT 360
          |||
Sbjct 449770 CTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGT 449711

Query 361 ATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAG 420
          |||
Sbjct 449710 ATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAG 449651

Query 421 CGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTG 480
          |||
Sbjct 449650 CGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTG 449591

Query 481 ACCTCAAATCAGGTAGGA 498
          |||
Sbjct 449590 ACCTCAAATCAGGTAGGA 449573

```

K11

TGTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAAA
TGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAG
AGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTA
AGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGAC
AATTAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTT
TCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTAT
CTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTA ACTGGAAATTTTAAAT
ATTAACCACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCT
TCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAAATTGC
TGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGG
TATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTAT
ACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGT
TCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1485 bits(804)	0.0	804/804(100%)	0/804(0%)	Plus/Minus
Query 3		TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGA	ttt	62

Sbjct	434606	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTT	434547
Query	63	ttttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTC	122
Sbjct	434546	TTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTC	434487
Query	123	CAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTAT	182
Sbjct	434486	CAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTAT	434427
Query	183	TCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACA	242
Sbjct	434426	TCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACA	434367
Query	243	ACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGG	302
Sbjct	434366	ACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGG	434307
Query	303	CCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGA	362
Sbjct	434306	CCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGA	434247
Query	363	ATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT	422
Sbjct	434246	ATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT	434187
Query	423	CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAA	482
Sbjct	434186	CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAA	434127
Query	483	TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCTGTTTGA	542
Sbjct	434126	TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCTGTTTGA	434067
Query	543	GCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTT	602
Sbjct	434066	GCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTT	434007
Query	603	GAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGttttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTT	662
Sbjct	434006	GAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTT	433947

```

Query 663      GAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCtttttttAT 722
                |||
Sbjct 433946   GAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTAT 433887

Query 723      ACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAA 782
                |||
Sbjct 433886   ACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAA 433827

Query 783      AGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 806
                |||
Sbjct 433826   AGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 433803

```

Y4

TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAA
TGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAG
AGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTA
AGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGAC
AATTAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTT
TCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTAT
CTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACTGGAAATTTTAAAT
ATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCT
TCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGC
TGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGG
TATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTAT
ACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGT
TCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1489 bits(806)	0.0	806/806(100%)	0/806(0%)	Plus/Minus
Query 1	TTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGAT	60		
Sbjct 434608	TTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGAT	434549		
Query 61	ttttttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAG	120		
Sbjct 434548	TTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAG	434489		
Query 121	TCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCT	180		
Sbjct 434488	TCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCT	434429		

Query 181 ATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAAACCGTTTCAATA 240
 |||
 Sbjct 434428 ATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAAACCGTTTCAATA 434369

 Query 241 CAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGG 300
 |||
 Sbjct 434368 CAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGG 434309

 Query 301 GGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAAATTTTGTCAAAAACAA 360
 |||
 Sbjct 434308 GGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAAATTTTGTCAAAAACAA 434249

 Query 361 GAATTTTCGTAACGGAAATTTTAAAATATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGTT 420
 |||
 Sbjct 434248 GAATTTTCGTAACGGAAATTTTAAAATATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGTT 434189

 Query 421 CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTG 480
 |||
 Sbjct 434188 CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTG 434129

 Query 481 AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTT 540
 |||
 Sbjct 434128 AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTT 434069

 Query 541 GAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAAC 600
 |||
 Sbjct 434068 GAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAAC 434009

 Query 601 TTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGtttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGC 660
 |||
 Sbjct 434008 TTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGC 433949

 Query 661 TTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCttttttt 720
 |||
 Sbjct 433948 TTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTT 433889

 Query 721 ATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTT 780
 |||
 Sbjct 433888 ATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTT 433829

 Query 781 AAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 806
 |||

Sbjct 433828 AAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 433803

Y7

CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGA
TTTTTTTGTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGAT
GGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTT
TCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATT
AAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTT
TGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTAT
TCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATTA
AAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
TGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTC
AAACATTCTGTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAATTGCTGGC
CTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATA
ATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTATACTG
AGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTA
AAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1482 bits(802)	0.0	802/802(100%)	0/802(0%)	Plus/Minus
Query 1	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGA	ttttt	60	
Sbjct 434604	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGA	TTTTT	434545	
Query 61	ttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCA		120	
Sbjct 434544	TTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCA		434485	
Query 121	GCCGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTC		180	
Sbjct 434484	GCCGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTC		434425	
Query 181	CAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAAC		240	
Sbjct 434424	CAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAAC		434365	
Query 241	AACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCC		300	
Sbjct 434364	AACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCC		434305	

Query 301 CAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAAT 360
 |||
 Sbjct 434304 CAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAAT 434245

Query 361 TTTCGTAACGGAAATTTTAAAATATTTAAAACCTTTCACAACCGGATCTCTTGGTTCTCG 420
 |||
 Sbjct 434244 TTTCGTAACGGAAATTTTAAAATATTTAAAACCTTTCACAACCGGATCTCTTGGTTCTCG 434185

Query 421 CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATC 480
 |||
 Sbjct 434184 CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATC 434125

Query 481 ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTGAGC 540
 |||
 Sbjct 434124 ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTGAGC 434065

Query 541 GTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGA 600
 |||
 Sbjct 434064 GTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGA 434005

Query 601 AATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGA 660
 |||
 Sbjct 434004 AATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGA 433945

Query 661 GGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCtttttttATAC 720
 |||
 Sbjct 433944 GGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCtttttttATAC 433885

Query 721 TGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAG 780
 |||
 Sbjct 433884 TGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAG 433825

Query 781 TTGACCTCAAATCAGGTAGGA 802
 |||
 Sbjct 433824 TTGACCTCAAATCAGGTAGGA 433803

Y9

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAAT
 GGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGA
 GATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTA
 GTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACA
 ATTAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTT
 CTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATC
 TATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATA

TTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTT
CTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCT
GGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGT
ATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTATA
CTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTC
TTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAC

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1487 bits(805)	0.0	805/805(100%)	0/805(0%)	Plus/Minus
Query 1	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGAtt	60		
Sbjct 434607	TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATT	434548		
Query 61	tttttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGT	120		
Sbjct 434547	TTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGT	434488		
Query 121	CCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTA	180		
Sbjct 434487	CCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTA	434428		
Query 181	TTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAATTA AACCGTTTCAATAC	240		
Sbjct 434427	TTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAATTA AACCGTTTCAATAC	434368		
Query 241	AACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGG	300		
Sbjct 434367	AACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGG	434308		
Query 301	GCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAG	360		
Sbjct 434307	GCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAG	434248		
Query 361	AATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC	420		
Sbjct 434247	AATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC	434188		
Query 421	TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGA	480		

Sbjct 434187 TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGA 434128

Query 481 ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTG 540
 |||

Sbjct 434127 ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTG 434068

Query 541 AGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACT 600
 |||

Sbjct 434067 AGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACT 434008

Query 601 TGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGtttttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCT 660
 |||

Sbjct 434007 TGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCT 433948

Query 661 TGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCtttttttA 720
 |||

Sbjct 433947 TGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTA 433888

Query 721 TACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTA 780
 |||

Sbjct 433887 TACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTA 433828

Query 781 AAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 805
 |||

Sbjct 433827 AAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 433803

Ü3

TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAA
 TGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAG
 AGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTA
 AGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGAC
 AATTAACACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTT
 TCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTAT
 CTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAT
 ATTAACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
 GAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAA
 CGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTTCT
 TCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAAATTGC
 TGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGG
 TATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTAT
 ACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGT
 TCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAG

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1491 bits(807)	0.0	807/807(100%)	0/807(0%)	Plus/Minus
Query 1		TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGAT		60
Sbjct 434608		TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGAT		434549
Query 61		ttttttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAG		120
Sbjct 434548		TTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAG		434489
Query 121		TCCAGCCGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCT		180
Sbjct 434488		TCCAGCCGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCT		434429
Query 181		ATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAATTA AACCGTTTCAATA		240
Sbjct 434428		ATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAATTA AACCGTTTCAATA		434369
Query 241		CAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGG		300
Sbjct 434368		CAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGG		434309
Query 301		GGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAAATTTTGTCAAAAACAA		360
Sbjct 434308		GGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAAATTTTGTCAAAAACAA		434249
Query 361		GAATTTTCGTAAC TGGAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTT		420
Sbjct 434248		GAATTTTCGTAAC TGGAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTT		434189
Query 421		CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTG		480
Sbjct 434188		CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTG		434129
Query 481		AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTT		540
Sbjct 434128		AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTT		434069
Query 541		GAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAAC		600
Sbjct 434068		GAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAAC		434009

```

Query 601 TTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGtttttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGC 660
          |
Sbjct 434008 TTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGC 433949

Query 661 TTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCttttttt 720
          |
Sbjct 433948 TTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTT 433889

Query 721 ATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTT 780
          |
Sbjct 433888 ATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTT 433829

Query 781 AAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAG 807
          |
Sbjct 433828 AAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAG 433802

```

Ü14

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATG
GATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAG
ATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAG
TTCTTTCTTGCTATTCCAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAA
TAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTC
TTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCT
ATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTA ACTGAAAATTTTAAAATAT
TAAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGTTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCCTTC
TCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTG
GCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTA
TAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTATAC
TGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCT
TAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1485 bits(804)	0.0	804/804(100%)	0/804(0%)	Plus/Minus
Query 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGA	ttt	60	
Sbjct 434606	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATT		434547	
Query 61	ttttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTC		120	

Sbjct	434546	TTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTC	434487
Query	121	CAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC	180
Sbjct	434486	CAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC	434427
Query	181	TCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATAAAACCGTTTCAATACA	240
Sbjct	434426	TCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATAAAACCGTTTCAATACA	434367
Query	241	ACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGG	300
Sbjct	434366	ACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGG	434307
Query	301	CCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGA	360
Sbjct	434306	CCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGA	434247
Query	361	ATTTTCGTAACGGAAATTTTAAAATATTAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCT	420
Sbjct	434246	ATTTTCGTAACGGAAATTTTAAAATATTAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCT	434187
Query	421	CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCCGTGAA	480
Sbjct	434186	CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCCGTGAA	434127
Query	481	TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGA	540
Sbjct	434126	TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGA	434067
Query	541	GCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTT	600
Sbjct	434066	GCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTT	434007
Query	601	GAAATGCTGGCCTTTTCATTGGATGtttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTT	660
Sbjct	434006	GAAATGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTT	433947
Query	661	GAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCtttttttAT	720
Sbjct	433946	GAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTAT	433887

```

Query 721 ACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAA 780
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 433886 ACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAA 433827

Query 781 AGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 804
          ||||||||||||||||||||
Sbjct 433826 AGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 433803

```

Ü18

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATG
GATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAG
ATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAG
TTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAA
TAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTC
TTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCT
ATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATAT
TAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGCGTAATCATCGAATCTTTGAACG
CACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCCTC
TCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTG
GCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTA
TAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTATAC
TGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCT
TAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCAAAGA

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1500 bits(812)	0.0	812/812(100%)	0/812(0%)	Plus/Minus
Query 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGAttt	60		
Sbjct 434606	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATT	434547		
Query 61	ttttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTC	120		
Sbjct 434546	TTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTC	434487		
Query 121	CAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTAT	180		
Sbjct 434486	CAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTAT	434427		
Query 181	TCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATAAAACCGTTTCAATACA	240		

Sbjct 434426 TCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAAACCGTTTCAATACA 434367

Query 241 ACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGG 300
 |||

Sbjct 434366 ACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGG 434307

Query 301 CCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGA 360
 |||

Sbjct 434306 CCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGA 434247

Query 361 ATTTTCGTAACGGAAATTTTAAAATATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT 420
 |||

Sbjct 434246 ATTTTCGTAACGGAAATTTTAAAATATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT 434187

Query 421 CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAA 480
 |||

Sbjct 434186 CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAA 434127

Query 481 TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGA 540
 |||

Sbjct 434126 TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGA 434067

Query 541 GCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTT 600
 |||

Sbjct 434066 GCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTT 434007

Query 601 GAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGttttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTT 660
 |||

Sbjct 434006 GAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTT 433947

Query 661 GAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCttttttttAT 720
 |||

Sbjct 433946 GAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTAT 433887

Query 721 ACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAA 780
 |||

Sbjct 433886 ACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAA 433827

Query 781 AGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGC 812
 |||

Sbjct 433826 AGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGC 433795

H4

Query 363 ATTTTCGTAACGGAAATTTTAAAATATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT 422
 |||
 Sbjct 434246 ATTTTCGTAACGGAAATTTTAAAATATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT 434187

 Query 423 CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAA 482
 |||
 Sbjct 434186 CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAA 434127

 Query 483 TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGA 542
 |||
 Sbjct 434126 TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGA 434067

 Query 543 GCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTT 602
 |||
 Sbjct 434066 GCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTT 434007

 Query 603 GAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGttttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTT 662
 |||
 Sbjct 434006 GAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTT 433947

 Query 663 GAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCtttttttAT 722
 |||
 Sbjct 433946 GAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTAT 433887

 Query 723 ACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAA 782
 |||
 Sbjct 433886 ACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAA 433827

 Query 783 AGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 806
 |||
 Sbjct 433826 AGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 433803

H5

GCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGG
 ATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGA
 TGGAGAGTCCAGCCGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGT
 TTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAAT
 TAAAACCGTTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCT
 TTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTA
 TTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATT
 AAAAATTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
 ATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC

ACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTCCTTCT
CAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGG
CCTCTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTAT
AATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTATACT
GAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTT
AAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAG

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1472 bits(797)	0.0	799/800(99%)	0/800(0%)	Plus/Minus
Query 2		CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGAttttt		61
Sbjct 434604		CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTT		434545
Query 62		ttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCA		121
Sbjct 434544		TTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCA		434485
Query 122		GCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTC		181
Sbjct 434484		GCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTC		434425
Query 182		CAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAAC		241
Sbjct 434424		CAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAAC		434365
Query 242		ACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCC		301
Sbjct 434364		ACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCC		434305
Query 302		CAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCAATAATTTTGTCAAAAACAAGAAT		361
Sbjct 434304		CAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCAATAATTTTGTCAAAAACAAGAAT		434245
Query 362		TTTCGTAAC TGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCG		421
Sbjct 434244		TTTCGTAAC TGAAATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCG		434185
Query 422		CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATC		481
Sbjct 434184		CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATC		434125

```

Query 482 ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGC 541
          |||
Sbjct 434124 ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGC 434065

Query 542 GTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGA 601
          |||
Sbjct 434064 GTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGA 434005

Query 602 AATTGCTGGCCTTTCATTGGATGtttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGA 661
          |||
Sbjct 434004 AATTGCTGGCCTTTCATTGGATGTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGA 433945

Query 662 GGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCtttttttATAC 721
          |||
Sbjct 433944 GGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTTATAC 433885

Query 722 TGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAG 781
          |||
Sbjct 433884 TGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAG 433825

Query 782 TTTGACCTCAAATCAGGTAG 801
          |||
Sbjct 433824 TTTGACCTCAAATCAGGTAG 433805

```

H6

GGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTCTGT
TATAGGACAATTAAAACCGTTTCCATACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTG
CAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACATACACAAAC
AATTTTATCTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAT
TTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGC
GTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAAC
TTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGC
GTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAA
TCTTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGG
CGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA

Saccharomyces cerevisia

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1182 bits(640)	0.0	646/649(99%)	0/649(0%)	Plus/Minus

Query 1 GGCTTGTAAGTTTCTTTCTTCTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTCTGTTATA 60
 |||
 Sbjct 434451 GGCTTGTAAGTTTCTTTCTTCTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATA 434392

Query 61 GGACAATTAAAACCGTTTCCATACACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTT 120
 |||
 Sbjct 434391 GGACAATTAAAACCGTTTCAATACACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTT 434332

Query 121 TCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACATACACAAACAATTTTATCTATT 180
 |||
 Sbjct 434331 TCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACAAACAATTTTATCTATT 434272

Query 181 CATTAAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAATTTTAAATATTTAAAC 240
 |||
 Sbjct 434271 CATTAAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAATTTTAAATATTTAAAC 434212

Query 241 TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT 300
 |||
 Sbjct 434211 TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT 434152

Query 301 AATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTGG 360
 |||
 Sbjct 434151 AATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTGG 434092

Query 361 TATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTCTGTTGGTAGT 420
 |||
 Sbjct 434091 TATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTCTGTTGGTAGT 434032

Query 421 GAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGttttttttC 480
 |||
 Sbjct 434031 GAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTC 433972

Query 481 CAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTT 540
 |||
 Sbjct 433971 CAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTT 433912

Query 541 CCAACTGCGGCTAATCtttttttATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGA 600
 |||
 Sbjct 433911 CCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGA 433852

Query 601 GCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 649
 |||
 Sbjct 433851 GCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 433803

E2

TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAAT
TTTGGAAAATGGATTTTTTTTGTGTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAG
AAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCT
AGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTG
TTATAGGACAATTA AAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTT
GCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAA
CAATTTTATCTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTA ACTGGAAA
TTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGGCATGCCTGTTTGAGC
GTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAAC
TTGAAATTGCTGGCCCTTTTCATTGGATGTTTATTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTG
CGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTA
ATCTTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAG
GCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAATCAGGTAGGA

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1489 bits(806)	0.0	811/813(99%)	1/813(0%)	Plus/Plus

Query	1	TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGA	60
Sbjct	1	TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGA	60
Query	61	AAATGGAttttttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAG	120
Sbjct	61	AAATGGATTTTTTGTGTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAG	120
Query	121	ATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCT	180
Sbjct	121	ATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCT	180
Query	181	TTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA AAAACCG	240
Sbjct	181	TTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA AAAACCG	240
Query	241	TTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATT CGA	300
Sbjct	241	TTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATT CGA	300
Query	301	GCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAAATTTTGTG	360
Sbjct	301	GCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAAATTTTGTG	360

Query 361 AAAACAAGAATTTTCGTAACGAAATTTTAAAATATTAAAACTTTCAACAACGGATC 420
 |||
 Sbjct 361 AAAACAAGAATTTTCGTAACGAAATTTTAAAATATTAAAACTTTCAACAACGGATC 420

Query 421 TCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGA 480
 |||
 Sbjct 421 TCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGA 480

Query 481 ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCAT 540
 |||
 Sbjct 481 ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCAT 540

Query 541 GCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTG 600
 |||
 Sbjct 541 GCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTG 600

Query 601 GAGTAACTTGAAATTGCTGGCCCTTTTCATTGGATGTTTATTTTCCAAAGAGAGGTTTC 660
 |||
 Sbjct 601 GAGTAACTTGAAATTGCTGG-CCTTTTCATTGGATGTTTATTTTCCAAAGAGAGGTTTC 659

Query 661 TCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAA 720
 |||
 Sbjct 660 TCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAA 719

Query 721 TCtttttttATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAAC 780
 |||
 Sbjct 720 TCTTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAAC 779

Query 781 AATGTTCTTAAAGTTGACCTCAATCAGGTAGGA 813
 |||
 Sbjct 780 AATGTTCTTAAAGTTGACCTCAATCAGGTAGGA 812

E4

CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGA
 TTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGAT
 GGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTT
 TCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAATT
 AAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTT
 TGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTAT
 TCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGAAATTTTAAAATATTA
 AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
 TGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
 CATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTTCTTCTC

AAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTCAAATTGCTGGC
 CTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATA
 ATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTG
 AGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAAATGTTCTTA
 AAGTTTGACCTCAAATCAGGTAG

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1478 bits(800)	0.0	800/800(100%)	0/800(0%)	Plus/Minus
Query 1	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGAttttt	60		
Sbjct 434604	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTT	434545		
Query 61	ttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCA	120		
Sbjct 434544	TTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCA	434485		
Query 121	GCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTC	180		
Sbjct 434484	GCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTC	434425		
Query 181	CAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAAC	240		
Sbjct 434424	CAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAAC	434365		
Query 241	ACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCC	300		
Sbjct 434364	ACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCC	434305		
Query 301	CAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAAT	360		
Sbjct 434304	CAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAAT	434245		
Query 361	TTTCGTAACCTGGAATTTTAAAATATTAACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCG	420		
Sbjct 434244	TTTCGTAACCTGGAATTTTAAAATATTAACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCG	434185		
Query 421	CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATC	480		
Sbjct 434184	CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATC	434125		

```

Query 481      ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGC 540
                |||
Sbjct 434124   ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGC 434065

Query 541      GTCATTTCCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTGA 600
                |||
Sbjct 434064   GTCATTTCCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTGA 434005

Query 601      AATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGtttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGA 660
                |||
Sbjct 434004   AATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGA 433945

Query 661      GGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCtttttttATAC 720
                |||
Sbjct 433944   GGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTTATAC 433885

Query 721      TGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAG 780
                |||
Sbjct 433884   TGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAG 433825

Query 781      TTTGACCTCAAATCAGGTAG 800
                |||
Sbjct 433824   TTTGACCTCAAATCAGGTAG 433805

```

E7

CAGTTTCCGTAGGTGAACTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAA
AATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACA
AGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTG
TAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGG
ACAATTAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCAT

Saccharomyces cerevisiae

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
484 bits(262)	1e-132	262/262(100%)	0/262(0%)	Plus/Plus
Query 3	GTTTCCGTAGGTGAACTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGAt	62		
Sbjct 7	GTTTCCGTAGGTGAACTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGAT	66		
Query 63	ttttttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAG	122		
Sbjct 67	TTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAG	126		

```
Query 123 TCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCT 182
          |||
Sbjct 127 TCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCT 186

Query 183 ATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGT TATAGGACAATTA AACCGTTTCAATA 242
          |||
Sbjct 187 ATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGT TATAGGACAATTA AACCGTTTCAATA 246

Query 243 CAACACACTGTGGAGTTTTCAT 264
          |||
Sbjct 247 CAACACACTGTGGAGTTTTCAT 268
```

