

Şarap Kalitesinin Geliştirilmesinde *Brettanomyces* Türlerinin Killer Toksinler ile Engellenmesi

Gökşen GÜLGÖR^{1*}, Mihriban KORUKLUOĞLU¹

¹Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

*E-posta: goksengulgor@uludag.edu.tr

Geliş Tarihi: 06.07.2015; Kabul Tarihi: 03.11.2015

Özet: Şarap yapımında tat ve aromayı bozan, özellikle depolama esnasında gözlemlenen *Brettanomyces bruxellensis*'in yavaş gelişim göstermesi, karakteristik bir özelliğidir. Fermentasyon sırasında metabolik aktivite sonucunda ortaya çıkan yan ürünlerin inhibisyonu ile ortamdaki konsantrasyonunun azaldığı bilinmektedir. Ancak şarabın depolanması ve olgunlaştırılması gibi aşamalarda ortamda yeniden çoğaldığı da belirtilmektedir. *B. bruxellensis*'in şaraba bulaşması sonucunda kültüre alınamayan canlı formda uzun süre kaldığına dair hipotezler bulunmaktadır. Bu nedenle rutin mikrobiyolojik analizlerde bulaşı olduğu anlaşılammakta ve şarabın olgunlaştırılması aşamasında *B. bruxellencis* yeniden çoğalarak, kötü tat, renk ve kokuya neden olabilmektedir. Diğer mayalara benzer şekilde az miktarda karbon kaynağı bulunan ortamda, düşük konsantrasyonlarda sülfür dioksit (SO₂) ve etanol varlığında gelişmeye devam edebilmektedir. Şarap yapımında en önemli sorun olarak bilinen *B. bruxellensis*, özellikle SO₂ kullanımı ile engellenmektedir. Ancak SO₂'nin antimikrobiyel etkisinin yanında alerjik bünyelerde reaksiyona neden olması gibi olumsuz etkileri de söz konusudur. Bazı mayaların, yabancı mayalara karşı “killer toksin” olarak bilinen bileşikler üretmesi göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda *B. bruxellencis*'in inhibe edilebildiği ve şarap yapımında kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* ve malolaktik fermentasyonu gerçekleştiren laktik asit bakterilerinin inhibisyonu uğramadığı bildirilmektedir. Bu derleme kapsamında özellikle şarap kalitesini etkileyen yabancı mayaların “killer toksin” ile bertaraf edilmesi hakkında güncel bilgiler yer almaktadır.

Anahtar Kelimeler: Şarap, *Brettanomyces bruxellencis*, killer toksin.

Properties and Importance of Killer Toxins for Wine Quality Improvement

Abstract: The slow growth is a characteristic feature of *Brettanomyces bruxellensis* which spoils taste and flavour of wine and is observed especially during the storage period. The concentration of this yeast at the medium is known that to decrease because of the inhibition effects of by-products resultant of metabolic activity existed at the fermentation period. However its concentration can show an increase during its storage and aging periods. There is a hypothesis that although *B. bruxellencis* is

in a viable form after spoilage to the wine, can remain non-culturable state for long periods of time. Thus, spoilage cannot be observed by routine culture methods and *B. bruxellensis* can grow again during storage time that causes off-flavour, undesirable colour and smell. The yeast can grow like the other yeasts at the medium lacking in carbon source and including SO₂, ethanol in low concentrations. *B. bruxellensis* known as the most important problem for wine production can be prevented by the use of SO₂. However SO₂ has negative effect as causing allergic reactions besides its antimicrobial effect. In some studies considering compounds known as killer toxins which are produced by some yeast species against wild yeasts, it is indicated that some yeast species can inhibit *B. bruxellensis* whereas other microorganisms-used for production of wine- such as *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria carrying out malolactic fermentation are not inhibited. In this review, some current information takes part about eliminating of wild yeasts effecting the wine quality in especial by killer toxin.

Key Words: Wine, *Brettanomyces bruxellensis*, killer toxin.

Giriş

Şarabın kimyasal kompozisyonu, duyu özellikleri başta olmak üzere, hammaddenin ekolojik ve fizyolojik özelliklerine de bağlıdır. Kullanılan üzümün çeşidi, üzüm kültür ve hasat zamanı gibi faktörler son ürünün kalitesini ve duyu özelliklerini etkilemektedir (Morales ve ark. 2015). Şarabın kimyasal kompozisyonunu belirlemede mikroorganizmalar önemli role sahiptir. Bakteri, maya ve hifli küflerin de toplam etkisi ile son ürün meydana gelmektedir. Ancak şarap prosesinde en önemli mikroorganizma grubu alkol fermentasyonunda rol alması nedeni ile mayalardır (Fleet 2003; Minh 2015; Morales ve ark. 2015).

Üzümlerin doğal fermentasyonu genellikle düşük miktardaki alkole toleranslı olan mayalar (*Kloeckera/Hanseniaspora*) tarafından başlatılır (Morales ve ark. 2015) ve bu sayede alkole toleransı olmayan mikroorganizmalar yavaş yavaş bertaraf edilir. Yaklaşık 3-4 gün sonra ise *Saccharomyces cerevisiae* gibi eliptik mayalar baskın hale gelerek, fermentasyonun devamını ve tamamlanmasını sağlar (Ciani ve ark. 2006; Sun ve ark. 2015). Şarap yapımında aroma tipi ve miktarı; maya çeşidine, çevresel faktörlere (iklim, toprak vb.), kültürlenme çeşidine, meyvenin durumuna, asitlendirme işlemine, şıranın pH'sına, kükürt dioksit (SO₂) miktarına ve malolaktik fermentasyonun gerçekleşme durumuna göre değişkenlik göstermektedir. *Saccharomyces* cinsi dışındaki birçok mayanın (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia anomala*, *Candida stellata*, *Torulasporea delbrueckii*, *Candida valida*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Rhodotorula aurantica*, *Deckera intermedia*, *Candida cantarellii*) şıra fermentasyonunda rolü olduğuna (Morales ve ark. 2015), meyvemsi aromanın arttığına ve şarap bukesinin oluşmasını desteklediğine de değinilmekte (Barrio-Galán ve ark. 2015), ancak bu mayaların etanol toleransları olmadığı için fermentasyonu tamamlamadıkları bildirilmektedir (Clemente-Jimenez ve ark. 2005; Comitini ve ark. 2011; Domizio ve ark. 2011).

Şarap yapımındaki en önemli avantajlardan birisi, seçilmiş bir kültür olan *S.cerevisiae*'nın üzüm şırasına inokule edilmesidir. Fermentasyon aşamasının mikrobiyolojik kontrolünün sağlanması ve standart bir ürün eldesi için özellikleri belirlenmiş, saf kültür ile inokulasyonun yapılması oldukça önemlidir. Bu sayede *S.cerevisiae*'nın ortamda bulunan diğer yabancı mayaları baskılayarak, hâkim mikrobiyotayı oluşturacağına ve dolayısıyla fermentasyonu tamamlayacağına inanılmaktadır (Comitini ve

ark. 2011; Sun ve ark 2015). Şarap yapımında şıraya sadece saf *S.cerevisiae* kültürü dışındaki mayaların eklenmesi bazı kaynaklarda önerilirken, bazılarında ise kaçınılmaktadır. Çünkü farklı cins ve türe ait mayalar eklendiğinde, şarap fermentasyonunun kontrol edilemez hale gelebileceği, çok miktarda asetik asit, asetaldehit, etil asetat ve aseton üretimi olabileceği ve fermentasyon hızının da düşmesi ile birlikte istenilmeyen tat ve aroma oluşabileceği düşünülmektedir. Ayrıca *S.cerevisiae*'nın saf olarak kullanılmadığı durumlarda, SO₂ direncinin de düşebileceği ve fermentasyon akışının yavaşlayabileceği düşünülmektedir. *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayaların şarabın enolojik özelliklerini desteklediği yönünde farklı çalışmalar da bulunmakta, ancak bu araştırmalarda kullanılan mikroorganizmaların özellikle *S. cerevisiae* ile birlikte karışık kültür olduğu durumlardaki toplu davranış şeklinin incelenmesi önerilmektedir. Karışık kültürdeki mikroorganizmaların birbiri ile etkileşimleri sonucunda üründe ortaya çıkan duyuşsal, fiziksel ve kimyasal özelliklerin değerlendirilmesinin daha anlamlı olacağı düşünülmektedir (Englezos ve ark. 2015).

Cominiti ve ark. (2011) yaptıkları çalışma sonucunda *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* dışındaki mayaların birlikte starter olarak kullanılması sonucunda fermentasyon ile ortaya çıkan organik asit değerlerinin arzu edilen miktarlarda olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durumu ise “mayaların tek başlarına fermentasyonu devam ettirmelerinde görülen davranış şekillerinin değişerek, beraber etkileşim halinde olmaları sonucunda şarapta biyoçeşitliliğin getirdiği aroma, renk ve tat kriterlerinin iyileşmesi” olarak açıklamışlardır. Ayrıca son üründe gözlenen profilde, enzimatik aktivitenin de tek başına *S. cerevisiae* fermentasyonunda gözlenen enzimatik aktiviteye oranla çok daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır (Viana ve ark. 2008; Comitini ve ark. 2011).

Ekolojik teoriye göre tüm mikroorganizmalar birbiri ile etkileşime geçebilmekte ve bu sayede sıralı bir dizi reaksiyon gerçekleştirebilmektedir. Şarap ekosistemi içinde bir mayanın gelişimi ve metabolizması, diğer maya, bakteri ya da küf gelişimini etkilemektedir. Üzüm suyunda gelişebilen mikroorganizmaların metabolitleri diğer türlerin gelişimini inhibe edebilmektedir. Örnek olarak karbondioksit oluşturan türler, ortamdaki oksijen oranını düşürerek, aerobik mikroorganizmaların gelişimini yavaşlatabilmekte ve engelleyebilmektedir. Bazı türler ise diğer mikroorganizmaları engelleyici özellikte peptit, protein, glikoprotein (killer toksin vb.) ya da enzimler üretebilmekte ve bu metabolitler ile de refakatçi mikroorganizmaların hücre duvarlarını yıkarak, lizize neden olabilmektedir. Ancak inhibisyon etkisine sahip metabolitlerin oluşumu dışında refakatçi mikrobiyotanın gelişimini destekleyecek çok sayıda mekanizmanın olduğu da bilinmektedir (Mendoza ve Farías 2010; Giaramida ve ark. 2013). Çok sayıda maya hücresi gelişimini tamamlayarak otolize uğradıktan sonra biyokütleden geriye kalan aminosit ve vitaminler, şarap üretiminin sonraki aşamalarında gelişmesi arzu edilen mikroorganizmaları destekleyebilmektedir. Ayrıca metal iyonları, üzüm fenoller gibi toksik bileşenleri adsorbe ederek ayırma gibi fonksiyonel özellikleri de bulunabilen biyokütlerde proteolitik ve pektolitik enzimlere sahip mayalar da barınıyorsa, protein ve pektinlerin parçalanarak, diğer mikroorganizmaların kullanabileceği forma dönüşmesine katkıda bulunabilmektedir (Fleet 2003). Ancak karışık kültür ile elde edilen şarapta toksik özellikte metabolitlerin de meydana gelebileceği ifade edilmektedir (Mendoza ve Farías 2010).

Brettanomyces Türlerinin Karakteristiği

Brettanomyces spp., *Dekkara* cinsinin spor oluşturmayan türleri olarak bilinmektedir. *Brettanomyces* ve *Dekkara* isimleri çoğu zaman birbirinin yerine kullanılabilen, ancak literatürde daha çok *Brettanomyces* olarak adlandırılmaktadır. *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardensis*, *Brettanomyces nanus*, *Brettanomyces anomalus*, ve *Brettanomyces bruxellensis* olmak üzere 5 ayrı türü bulunan *Brettanomyces/Dekkara* cinsi başta üzüm yüzeyinde ve fiçılarda görülmek üzere en çok şarap yapımında ön plana çıkmaktadır. *B. bruxellensis* oval ve elipsoidal şekillerde olup, tomurcuklanma ile çoğalma yeteneğine sahiptir. Hücre morfolojisi birkaç aylık inkübasyondan sonra eliptikten dallanmış forma kadar değişkenlik gösterebilmektedir. *B. bruxellensis*'in fizyolojisi, alışılmadık dışında aroma oluşturması ve anaerobik koşullarda yüksek asetik asit üretimi ve redoks dengesizliğine dayalı olarak alkol fermentasyonunun engellenmesi olarak tanımlanan Custer etkisi göstermesi açısından dikkat çekmekte ve üzerinde çalışılmaktadır (Suarez ve ark. 2007; Wedral ve ark. 2010; Steensels ve ark. 2015).

Dekkara/Brettanomyces cinsine ait maya türlerinin uçucu fenoller (4-etilfenol ve 4-etilguaikol) ürettiği ve bu metabolitlerin de şarabın aromasında arzu edilmeyen değişimlere neden olduğu ve “at teri kokusu” olarak tanımlanan duyuusal bozukluğa yol açtığı bilinmektedir (Chandra ve ark. 2014). Şarapta hidroksisünamik asit, p-kumarik asit ve ferulik asitin uçucu fenolik bileşiklere dönüşmesi *Brettanomyces* cinsine ait türlerin aktivitesi ile olmaktadır. Bu mekanizma iki enzimatik reaksiyona dayanmaktadır. İlk olarak hidroksisünamik asidin dekarboksilasyonu sonucunda vinil derivatları oluşmakta (p-kumarik asitten 4-vinilfenol ya da ferulik asitten 4-vinil guaikol) ve ikinci olarak da redüktaz enzimi ile vinil grupları etil bileşenlerine dönüştürülmektedir (Couto ve ark. 2005; Suarez ve ark. 2007).

Uçucu fenol bileşikler şarap üretim süreci süresince farklı aşamalarda meydana gelebilmektedir. Ancak istenmeyen uçucu bileşiklerin üretiminde rol alan *Dekkara/Brettanomyces* cinsine ait türler özellikle fiçıda olgunlaştırılan şaraplarda yetersiz hijyenden dolayı gözlenebilmektedir. Bu istenmeyen aroma, şarap endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (Chandra ve ark. 2014). Şarap üretiminde görülen mikroorganizmaların kontrolü ve şarabın temas ettiği yüzeylerin hijyeni, üreticilerin en çok önem gösterdiği kriterlerin başında yer almaktadır. Temas yüzeylerinin temizlenmesi ile ilgili olarak birçok yöntem olmakla birlikte, *Dekkara/Brettanomyces* popülasyonunu sınırlayan birçok şarap yapım yöntemleri de bulunmaktadır. Yüksek asitlik değerleri (3.5 pH), SO₂ kullanımı (moleküler formda 0.8 ppm) ve düşük olgunlaştırma sıcaklık dereceleri (10-15°C) gibi uygulamalar şarapta *Dekkara/Brettanomyces* aktivitesini engelleyebilmektedir (Couto ve ark. 2005; Laforgue ve Lonvaud-Funel 2012). SO₂ gibi kimyasal koruyucu kullanımı şarapta mikrobiyel bozulmayı azaltabilmekte ancak, mikroorganizma türlerinin SO₂ duyarlılıkları birbirlerine göre oldukça farklılık göstermektedir. Bu durumda daha etkili yöntemlerin uygulanması gerekebilmektedir. *Dekkara/Brettanomyces*, türlere göre değişimle birlikte 32.5-50°C arası sıcaklıkta gelişmelerine devam edebilmektedirler. Yüksek sıcaklıklara dirençli olmaları da, şarap yapımı esnasında engellenebilme ihtimalini düşürmektedir (Couto ve ark. 2005).

Özellikle şarap yapımında önemi bulunan maya inaktivasyonu için başarı ile uygulanan birçok yöntem bilinmekte olup, bunların çoğunda çeşitli kimyasalların kullanılması zorunluluğu alternatif yöntemlerin geliştirilmesi düşüncesini doğurmaktadır. Bu amaç

kapsamında alkol fermentasyonunu gerçekleştiren *S. cerevisia* tarafından direkt olarak ya da diğer yabancı mayalar tarafından birbirlerini inhibe edebilecek özellikte oldukları bilinen “killer toksin” üretiminin desteklenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Fleet 2007). Killer toksini üretiminde en önemli noktanın maya-maya etkileşimi olduğu bilinmektedir (Gonzalez- Royo ve ark. 2015). Dünya ekosisteminin oluşumunda mikroorganizmalar arasındaki iletişimin önemli olduğu ve bunların arasından maya-maya etkileşimlerinin, şarap, peynir, et ve kakao çekirdeği gibi fermentasyonlarda ön plana çıktığı bilinmektedir. Bu etkileşimler, mikrobiyel gelişme ve ölümün dengeli olduğu fermentasyon ortamında kendiliğinden ortaya çıkmakta ve şarap yapımında da bilindiği gibi alkol fermentasyonunun son ürün oluşumu için kaçınılmaz olduğu durumlarda özellikle farklı maya türleri arasında gerçekleşmektedir (Gonzalez-Royo ve ark. 2015). Bu mekanizma da doğada çok sayıda benzer şekilde gerçekleşen ekolojik değişimin altını çizmektedir. Mikrobiyel besin ögesi gereksinimlerine göre transport sistemlerinin gelişimi ve bu besin maddelerinin farklı cins ve türler arasında aktarılması, mikroorganizmaların bu süreçte mikrobiyel metabolitlere ve son ürüne (etanol vb.) hassasiyet dereceleri ve killer toksinlerine karşı oluşturdukları tepki mekanizmaları ile birbirleri arasında etkileşim ve dolayısıyla da ekolojik değişim gerçekleşmiş olmaktadır. Hücre-hücre etkileşimi ayrıca “quorum sensing” (mikroorganizmalar arasında çoğunluk algılanması) moleküllerinin üretimi ile de meydana gelebilmektedir. Bu etkileşimlerin, son ürünün kalitesi ve alkol fermentasyonunu gerçekleştiren *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* türlerinin interaktivitesini geliştirdiği, bu sayede şarabın kimyasal kompozisyonu ve aromasının istenilen düzeye ulaşabildiği belirtilmektedir (Fleet 2007).

Saccharomyces cerevisiae-Brettanomyces bruxellensis Etkileşimi

Şarap yapımında *S. cerevisiae* ile *B. bruxellensis* arasındaki etkileşimin laboratuvar çalışmalarında gözlenebildiği belirtilmektedir. Alkol fermentasyonunun *S. cerevisiae* tarafından gerçekleştirilmesine rağmen, *B. bruxellensis*'in de glukoz ve fruktozu kullanarak etanol oluşturabildiği bilinmektedir. İki mikroorganizmanın bulunduğu karışık kültürün fermentasyona bırakılması sonucunda tek başına *S. cerevisiae* bulunan saf kültüre oranla ortamdaki şekerlerin tamamının çok daha hızlı kullanılarak, alkol oluştuğu gözlenmiştir. Bu durum göz önüne alındığında *S. cerevisiae* ve *B. bruxellensis* metabolizmasının birbirini desteklediği düşünülmektedir (Romano ve ark. 2003; Tiukova 2014).

Alkol fermentasyonu süresince *S. cerevisiae* popülasyonu, *Saccharomyces* olmayan mikroorganizmaların da ortamda bulunmasından etkilenmemekte ve gelişme hızı değişmemektedir. Saf kültür olarak geliştirildiği ve karışık kültür içinde geliştiği durumlar karşılaştırıldığında her ikisinde de ulaştığı sayının aynı (10^7 kob/mL) olduğu, ayrıca etil alkol üretim seviyesinin de aynı kaldığı bildirilmektedir. Ancak alkol fermentasyonunun sonunda *S. cerevisiae* hücrelerinin *B. bruxellensis* hücrelerine oranla daha az aktif formda bulunduğu ve bu durumun da düşük şeker konsantrasyonunda *B. bruxellensis*'in etil alkole daha dirençli olduğu anlamına geldiği belirtilmektedir. *B. bruxellensis*'in ise sentetik besiyeri ile hazırlanmış, %12 alkol içeren ortamda bile halen canlı kalabildiği çalışmalar sonucunda bildirilmektedir (Romano ve ark. 2003; Renouf ve ark. 2006; Mendoza ve Farías 2010).

Killer Toksin Üretimi

Gıda teknolojisinde en zararlı maya türlerinin, asidik koruyuculara ve ozmotik strese tolerans gösterenler olduğu bilinmektedir. Mayaların zor koşullara direnç gösterebilme ve ortamda canlı formda kalabilme nedenlerinden birinin de “killer toksin” üretmeleri olduğu bilinmektedir. Bu sayede diğer maya türleri ile yarışabilmekte ve hâkim mikroflorayı oluşturarak canlılığını devam ettirebilmektedir (Loureiro 2000).

Şarabı bozan mayalar, Kunkee ve Bisson (1993) tarafından (i) fermentasyonu gerçekleştiren ve tatlı şarapları yeniden fermente edebilenler (*Saccharomyces cerevisiae*), (ii) yüksek şeker ve asitlik düzeyine dayanıklılık gösterenler (*Zygosaccharomyces bailii*), (iii) film oluşturan mayalar (*Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metchnikowia*, *Debaryomyces*), ve (iv) *Brettanomyces* spp. olacak şekilde dört grup altında toplanmıştır. Şarapta arzu edilmeyen fenolik tadın oluşumundan sorumlu olan *Dekkara/Brettanomyces*'in engellenmesi, tüketici beğenisi açısından oldukça önemlidir. Fenolik bileşenlerden 4-etilfenol şarapta 400 µg/L'den az miktarda bulunduğu, şarabın aromasını desteklerken, 620 µg/L'den fazla olduğu durumlarda istenmeyen tat, koku ve aromaya neden olmaktadır (Loureiro ve Malfeito-Ferreira 2003).

Şarap yapımı esnasında *B. bruxellensis* kontrolü için SO₂ kullanımı oldukça yaygındır. Ancak SO₂, bazı tüketicilerde alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır; ayrıca SO₂ özellikle ortam pH'sından etkilenmekte ve bisülfid (HSO₃⁻) ile sülfid (SO₃²⁻) formlarına dönüşebilmektedir. Antimikrobiyel özellikteki formu ise moleküler formu olan SO₂·H₂O'dur (Mehlemakulu ve ark. 2014).

B. bruxellensis şarabın yıllandırılması aşamasında gelişebilmekte, ancak kültüre alınamamaktadır (Laforgue ve Lonvaud-Funel 2012). Mikroorganizmaların doğada canlı olarak kalabilmeleri için en önemli kriterlerden biri planktonik ya da biyofilm formunda olmalarıdır. Özellikle bakteriler, diğer mikroorganizmalar gibi besin yetersizliği, elverişsiz çevre koşulları vb. durumlarda kendilerini koruma altına alabilmek için bazı yollar izlemektedirler. Spor formu ve biyofilm oluşumunda görüldüğü gibi canlı fakat kültüre alınamayan formunda (CFKF) da daha dirençli oldukları bildirilmektedir. Ancak literatürdeki bilgilere göre, spor oluşturabilen hücreler, CFKF formdaki hücreleri kapsamamaktadır. CFKF hücreler doğada belirli bir süre sonra canlılıklarını yitirebilmektedirler. Yapılan bazı çalışmalarda bunun nedeni araştırılmış ve bakterilerde bulunan fakat fonksiyonları kesin olarak bilinmeyen bazı genlerin CFKF formundaki hücrelerde mutasyona uğradığı ve orijinal fonksiyonunu da zamanla yitirdiği sonucuna ulaşılmıştır (Trevors 2011). Benzer genetik özellikler şarapta bozulmalara yol açabilen *B. bruxellensis* için de geçerli olabileceğinden, maya hücrelerinin canlı formunu koruduğu ancak SO₂ kullanımı sonucunda strese girerek kültüre alınabilir formunu kaybettiği düşünülmektedir. Üzüm şirasına ya da şaraba sülfid eklenmesinin ardından kültüre alınabilir formunun kaybolması tetiklenmekte ama canlılık devam edebilmektedir (Laforgue ve Lonvaud-Funel 2012). Ortam pH'sının artması ve SO₂ konsantrasyonunun düşmesi ile hücreler yeniden kültüre alınabilir forma gelebilmektedir. CFKF formundaki hücrelerin hücre boyutlarının % 22 oranında küçüldüğü bildirilmektedir. *Brettanomyces* tarafından üretilen fenolik bileşiklerin tespit edildiği durumlarda bile mayanın kültürel yollarla belirlenememesi, şarapta CFKF formunda bulunduğu bir göstergesi olarak işaret edilmektedir (Serpaggi ve ark. 2012).

Bazı *B. bruxellensis* suşları sülfür dioksit dirençli olabilmektedir. Mehlemakulu ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada karakterizasyonu bilinen “killer toksin”in, antimikrobiyel özelliği sayesinde şarap yapımı ve depolanması esnasında *B. bruxellensis* gelişimini engelleyebildiğini ortaya koymuşlardır. CpKT1 ve CpKT1 olarak adlandırılan killer toksinleri *Candida pyralidae*'in geliştiği ortamlardan izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiştir. İzole edilen bu iki toksinin molekül ağırlıklarının 50kDa civarında olduğu ve üzüm suyuna aşılınmış çok sayıda *B. bruxellensis* suşuna karşı öldürücü etkiye sahip olduğu, pH 3.5-4.5 aralığında ve 15-25°C'de stabil formda kalarak, şarap ortamında istenmeyen mikroorganizmalarla yarışabilir nitelikte olduğu, ayrıca *S. cerevisiae* ve laktik asit bakterilerinin gelişimine negatif bir etkisinin olmadığı bildirilmektedir. Bu sonuçlar ise izole edilen bu iki toksinin alkol fermentasyonunu gerçekleştiren ve malolaktik fermentasyonun gelişiminde rol oynayan, şarap oluşumunda ortamda aktif olarak bulunması zorunlu mikroorganizmalara karşı etkisinin olmadığını göstermektedir (Mehlemakulu ve ark. 2014).

Santos ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada *Pichia membranifaciens* CYC 1086'nın, killer toksin (PMKT2) salgılayabildiğini gözlemlemişler ve bu toksinin birçok maya ve küfü inhibe edebildiğini bildirmişlerdir. Kültür supernatantı içindeki toksin, ultra filtrasyon ile konsantre edilmiş ve homojen olması için doğal elektroforez ve ardından HPLC jel filtrasyonu ile iki kademeli olarak saflaştırılmıştır. Toksinin biyokimyasal karakterizasyonuna göre moleküler ağırlığının 30kDa ve izoelektrik noktasının 3.7 olduğu belirlenmiştir. Optimal inhibisyon aktivitesinin 4.5 pH'da ve 20°C civarında olduğu gözlenmiştir. Bu pH değeri üzerinde ise toksin aktivitesinde keskin bir düşüş gözlenmiş, pH 6.0 civarında da aktivite tamamen durmuştur. *Pichia membranifaciens* CYC 1086'nın geliştirildiği ortamdan iki farklı killer toksini izole edilmiş ve bunlardan PMTK2'nin PMTK'dan farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip olduğu belirlenmiş, dolayısıyla şarabı bozan mayaların biyo-kontrollerinde farklı kullanım şekilleri olabileceği düşünülmüştür. PMKT2, *B. bruxellensis*'i inhibe ederken, *S. cerevisiae*'nın bu toksine tamamen dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda optimum koşulların sağlanması ile *Pichia membranifaciens* CYC 1086'ya PMKT2 üretirebileceği; toksinin ortamdan izole edilerek, saflaştırılabileceği ve şarap yapımında biyo-kontrolün sağlanması amacıyla kullanılabileceği anlaşılmaktadır (Santos ve ark. 2009).

Santos ve ark. (2011) tarafından yapılan bir diğer çalışmada *S. cerevisiae* ve *B. bruxellensis*'e ait 39 suşun killer toksin üreten mayalara karşı dirençleri belirlenmeye çalışılmış ve *Ustilago maydis* tarafından üretilen killer toksini (CYC 1410) *B. bruxellensis*'e karşı oldukça etkili iken *S. cerevisiae*'nın ise tamamen dirençli olduğu kanıtlanmıştır. Bu sonuç göz önüne alınarak mayanın kendisi ya da toksininin şarapta doğal koruyucu olarak kullanılabileceği görüşü savunulmuştur. KP6 olarak adlandırılan bir diğer killer toksinin *B. bruxellensis*'i inhibe edebilmesi için ise pH değerinin 3.0-4.5 ve sıcaklığın ise 15-25°C arasında olması gerektiği belirtilmektedir. Ayrıca çok düşük konsantrasyondaki (100 AU/mL) toksinin bile *B. bruxellensis* tarafından üretilen 4-etilfenol miktarını azalttığı ve yüksek konsantrasyonlarda (400-2000 AU/mL) ise maya gelişimini tamamen engelleyebildiği bildirilmektedir. Çalışma sonuçları göz önüne alındığında düşük konsantrasyonlardaki toksinin şarap üretiminde kullanılması, *B. bruxellensis* aktivitesi sonucu ortaya çıkan uçucu fenolik bileşenlerin üretiminin engellenmesinde yeterli olacaktır (Santos ve ark. 2011).

Killer toksinleri potansiyel biyokontrol ajanları olarak bilinmekte olup, bununla ilgili bir diğer çalışma ise Ullivarri ve ark. (2014) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada iki farklı *S. cerevisiae* suşunun (Cf8 ve M12) killer toksin üretebildiği ve şarap üretiminde bu suşların hem alkol fermentasyonunu, hem de doğal tat ve aroma koruyucu özelliğın oluşumunu sağlayabileceği belirtilmektedir. Killer toksinlerinin biyokimyasal testler ve ayrıca PCR ile karakterize edilerek dirençsiz mayalar üzerine inhibisyon etkisinin olduğu, toksinlerin optimal etkinlik gösterdiği koşulların şarap üretiminde kullanılan asitlik ve sıcaklık değerlerine (3.5 pH ve 15-25°C) eşdeğer olduğu bildirilmektedir. Ayrıca ortama azot kaynağı eklendiğinde her iki toksin üretiminin de arttığı anlaşılmıştır (Ullivarri ve ark. 2014).

Şarap üretiminde *S. cerevisiae*'nin killer toksin üretiminin desteklenmesi ve istenmeyen maya gelişiminin kontrol edilmesi için en uygun kombinasyon üzerine çalışılmıştır. Cf8–M12 inokulasyonu sonucunda inhibisyon etkisinin dirençsiz *S. cerevisiae* suşları ve şarabı bozan mayalar için % 45 oranında arttığı, ayrıca % 5-12 civarında etil alkol ve 50 mg/L SO₂ varlığında Cf8 başta olmak üzere her iki toksinin de inhibisyon etkisinin daha yoğun olduğu belirtilmektedir. Killer toksin üretebilen her iki suşun da şarap üretiminde starter olarak kullanılabilmesi ve biyokontrol sağlayarak şarabın kalitesini de geliştirebileceği bildirilmektedir (Ullivarri ve ark. 2014). *B. bruxellensis* gelişimini kontrol altında tutmak ve hem üzüm suyunda, hem de şarabın depolanması aşamalarında bozulmasını engellemek için alternatif bir yöntem olarak “killer toksin” kullanımı önerilmektedir (Mehlemakulu ve ark. 2014).

Sonuç

Şarap üretiminde alkol fermentasyonu sırasında bozucu etkisi anlaşılamayan, canlı formunu koruduğu halde kültüre alınmadığı için klasik mikrobiyolojik yöntemler ile belirlenemeyen ve yalancı negatif sonuçlar veren *B. bruxellensis*'in bazı durumlarda şarap bukesini geliştirdiği söz konusu olsa bile, kontrol edilemediği zaman istenmeyen tat ve aromaya neden olması, şarap prosesi boyunca ve özellikle depolama aşamasında engellenmesi gerekliliğini doğrulamaktadır. Yüksek alkol ve düşük şeker konsantrasyonlarına dayanıklılık göstermesi nedeni ile en çok depolama aşamasında sorun yaratan mayanın kimyasal yollar ile engellenmesi en çok tercih edilen yöntem olmakla birlikte, hassas bünyeli kişilerde alerjik reaksiyona yol açabilmesi ve son yıllarda tüketici tarafından doğal ürünlere talebinin artması, *B. bruxellensis*'in farklı yöntemler ile kontrol altına alınabilmesi çalışmalarını hızlandırmıştır. Şarapta alkol fermentasyonunun gerçekleşmesi için vazgeçilmez olan *S. cerevisiae* başta olmak üzere farklı maya türlerinin de şarap ortamında üretebildikleri farklı killer toksinlerin alkol oluşumunu etkilemezken, *B. bruxellensis*'in engellenmesinde oldukça etkili olduğu, çalışmalarla ortaya çıkarılmış ve şarapta doğal koruyucu olarak kullanılabilmesi düşüncesini desteklemiştir. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalar ile belirlenmiş olan toksinlerin bu etkileri, şarap fabrikalarında küçük ölçekli denemeler ile de desteklenebilir, SO₂ yerine, killer toksinlerinin ya da üretici mayanın direkt kendisinin de şarap ünitesinde kullanılmasını ve biyokontrolün doğal yollar ile sağlanmasını mümkün kılabilmesi düşünülmektedir. Ayrıca killer toksinlerin bazı küfler tarafından oluşturulan mikotoksinlerden farklı olarak, insan sağlığına zararlı bir etkisinin olmaması ve etki gösterdiği tek hedefin diğer maya türleri olması da endüstriyel kullanım açısından uygun olabileceğinin bir diğer göstergesidir.

Kaynaklar

- Barrio-Galán, R., Medel-Marabolí, M. ve Á. Peña-Neira. 2015. Effect of different aging techniques on the polysaccharide and phenolic composition and sensory characteristics of Syrah red wines fermented using different yeast strains. *Food Chemistry*. 179: 116–126.
- Chandra, M., Barata, A., Ferreira-Dias, S., Malfeito-Ferreira, M. ve V. Loureiro. 2014. A Response Surface Methodology study on the role of factors affecting growth and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis* ISA 2211 in wine. *Food Microbiology*. 42: 40–46.
- Ciani, M., Beco, L. ve F. Comitini. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108: 239–245.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martí'nez-Rodríguez, S., Las Heras-Va'zquez, F.J. ve F. Rodríguez-Vico. 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 98: 301–308.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. ve M. Ciani. 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*. 28: 873–882.
- Couto, J.A., Neves, F., Campos, F. ve T. Hogg. 2005. Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. *International Journal of Food Microbiology*. 104: 337–344.
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I. ve M. Ciani. 2011. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 147: 170–180.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V. ve L. Cocolin. 2015. Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. *International Journal of Food Microbiology*. 199: 33–40.
- Fleet, G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*. 86: 11 – 22.
- Fleet, G.H. 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*. 18:170–175.
- Giaramida, P., Ponticello, G., Di Maio, S., Squadrito, M., Genna, G., Barone, E., Scacco, A., Corona, O., Amore, G., di Stefano, R., ve D. Oliva. 2013. *Candida zemplinina* for production of wines with less alcohol and more glycerol. *South African Journal of Enology And Viticulture*. 34: 204–211.
- Gonzalez- Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve- Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J.M. ve F. Zamora. 2015. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulasporea delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology*. 240: 999–1012.
- Laforgue, R. ve A. Lonvaud-Funel. 2012. Hydroxycinnamic acid decarboxylase activity of *Brettanomyces bruxellensis* involved in volatile phenol production: Relationship with cell viability. *Food Microbiology*. 32: 230–234.
- Loureiro, V. 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International* 33: 247–256.
- Loureiro, V. ve M. Malfeito-Ferreira. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*. 86: 23– 50.
- Kunkee, R. ve L. Bisson. 1993. Winemaking yeasts. s: 69–127. Editör: A.H. Rose, J.S. Harrison. Academic Press, London.

- Mehlomakulu, N.N., Setati, M.E. ve B. Divol. 2014. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *International Journal of Food Microbiology*. 188: 83–91.
- Mendoza, L. ve M.E. Farías. 2010. Improvement of wine organoleptic characteristics by non-*Saccharomyces* yeasts. s: 908-919. Editör: A. Mendez-Vilas. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex. Badajoz, Spain.
- Minh, N.P. 2015. Yeast Species Affecting To Grape Wine Production. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*. 3 (2): 188-191.
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M. ve R. Gonzalez. 2015. The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99: 3993–4003.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M. C., De Revel, G. ve A. Lonvaud-Funel. 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 1208–1219.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. ve A. Capece. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*. 86: 169–180.
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E. ve D. Marquina. 2009. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*. 155: 624–634.
- Santos, A., Navascués, E., Bravo ve D. Marquina. 2011. *Ustilago maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology*. 145: 147–154.
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Grand, A.S. ve H. Alexandre. 2012. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology* 30: 438-447.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H. ve K.J. Versteren. 2015. *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 206: 24–38.
- Sua´rez, R., Sua´rez-Lepe, J.A., Morata, A. ve F. Caldero´n. 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*. 102:10–21.
- Sun, Y., Li, E., Qi, X. ve Y. Liu. 2015. Changes of diversity and population of yeasts during the fermentations by pure and mixed inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Annals of Microbiology*. 65: 911–919.
- Tiukova, I. (2014). *Dekkera bruxellensis*, a Non-conventional Ethanol Production Yeast Studies on Physiology, Transcriptomics and Interactions with Industrial Microbial Isolates. Unpublished Ph.D. dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Microbiology Uppsala.
- Trevors, J.T. 2011. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. *Journal of Microbiological Methods*. 86: 266–273.
- Ullivarri, M.F., Mendoza, L.M. ve R.R. Raya. 2014. Killer activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains: partial characterization and strategies to improve the biocontrol efficacy in winemaking. *Antonie van Leeuwenhoek*. 106: 865–878.
- Viana, F., Gil, J.V., Genove, S., Valle, S. ve P. Manzanares. 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*. 25: 778–785.
- Wedral, D., Shewfelt, R. ve J. Frank. 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT- Food Science and Technology*. 43: 1474-1479.