

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FERMANTASYON SIRASINDA *Saccharomyces cerevisiae* MAYASI  
TARAFINDAN TYROSOL'ÜN OLUŞUM METABOLİZMASI VE  
TYROSOL OLUŞUMUNU ETKİLEYEN UYGULAMALAR ÜZERİNDE  
BİR ARAŞTIRMA

Duygu SOLAKOĞLU

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA  
2013

Her hakkı saklıdır

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FERMANTASYON SIRASINDA *Saccharomyces cerevisiae* MAYASI TARAFINDAN TYROSOL'ÜN OLUŞUM METABOLİZMASI VE TYROSOL OLUŞUMUNU ETKİLEYEN UYGULAMALAR ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA

Duygu SOLAKOĞLU

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

Eş Danışman: Dr. Simone VINCENZI

Son yirmi yılda, şarapta var olan fenolik bileşiklerin sahip oldukları biyolojik ve antioksidan aktiviteyle ilişkili olarak insan sağlığı üzerine olan olumlu etkileri ile şaraba ilgi artmıştır. Şaraplarda bulunan ve sağlık açısından yararları artık birçok çalışma ile kanıtlanmış olan resveratrolün yanı sıra şarapta daha yüksek içeriğe sahip olan bir diğer fenolik bileşik olan tyrosol'ün de sağlık üzerine önemli etkileri mevcuttur. Bu çalışmada, tyrosol oluşumu üzerine etkili olan ikinci fermantasyon ve yıllandırma uygulaması ile *Saccharomyces cerevisiae bayanus* maya suçları ve tyrosol üretiminde etkili olan tirozin ilavesi uygulamaları üzerine çalışılmıştır. Öncelikle tyrosol üretimi üzerine etkili olduğu bilinen şişede yıllandırma uygulamasının etkilerine bakılmıştır. İtalya'nın Veneto bölgesi için ekonomik değeri yüksek üzüm çeşitlerinden olan; Chardonnay, Glera ve Incrocio Manzoni'den elde edilen ve ikinci fermantasyona tabi tutularak 18 ay süreyle şişede yıllandırmaya bırakılmış beyaz şaraplardan 1., 3., 6., 12. ve 18. ayların sonunda alınmış örnekler, yıllandırma işleminin tyrosol üretimi üzerine etkilerini incelemek üzere; HPLC cihazında tyrosol içerikleri saptanmıştır. HPLC sonuçları incelendiğinde yıllandırma süresi boyunca tyrosol miktarının değişmediği saptanmıştır. İkinci olarak, tyrosol oluşumu için gerekli temel bileşikler belirli oranlarda yapay ve doğal üzüm şirasının kullanıldığı iki ayrı fermantasyon ortamına katılarak mevcut tyrosol üretimindeki değişiklikler incelenmiştir. Yapay üzüm şirası, gerçek üzüm şirasında bulunan besin içeriğine mümkün olan en yakın oranda glikoz, aminositler, asitler, vitaminler ve mineraller ilave edilerek oluşturulmuştur. Mayaların gelişimleri için mutlak gerekli maddelerden olan azot kaynağı, üzüm şirasından sağlanmıştır. Tyrosolün alkol fermantasyonu sırasında tirozinin dönüşümü ile açığa çıktığı bilindiğinden, tyrosol sentezini arttırmada yapay ve gerçek üzüm şirası fermantasyon ortamlarına, belirlenen düşük, orta ve yüksek (18, 36 ve 72 mg/L) düzeylerinde tirozin eklenerek, fermantasyon sonucunda tyrosol oluşumunda meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. HPLC sonuçları göstermiştir ki, fermantasyonda yapay üzüm şirası kullanıldığında oluşan tyrosol oranı eklenen tirozin oranı takip edildiğinde dahi istenen düzeyde olmamıştır. Ölçülen değerler literatürde geçen gerçek şarapların tyrosol miktarından son derece düşüktür. Bu bulgu, tyrosol miktarı için gerekli (örneğin polifenoller gibi) bazı bileşiklerin yapay üzüm şirasında mevcut olmadığını göstermektedir ve nitekim doğal üzüm şirasının kullanıldığı fermantasyon neticesinde elde edilen tyrosol miktarı, yapay üzüm şirasının kullanıldığı deneydeki miktarın altı katı kadar fazla hesaplanmıştır ve gerçek şaraplarda ölçülen tyrosol miktarına (18mg/L) oldukça yakın çıkmıştır.

**Ocak 2013, 57 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Tyrosol, Şaraptaki Fenolik Bileşikler, *Saccharomyces cerevisiae bayanus*

## ABSTRACT

Master Thesis

RESEARCH ON THE METABOLISM OF TYROSOL FORMATION DURING THE  
FERMENTATION BY *Saccharomyces cerevisiae* YEAST AND PRACTICES  
AFFECTING THE FORMATION OF TYROSOL

Duygu SOLAKOĞLU

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU  
Co-Supervisor: Dr. Simone VINCENZI

In the last twenty years there has been growing interest about the health effect of wines, mainly related to the presence of polyphenols with biological and antioxidant activity. Among the phenolic compounds found in wine, the stilbene group is one of the most important, including resveratrol and its derivatives. Recent studies showed that another phenolic compound present in wines, tyrosol, also has an important health effect. This effect is even more attracting due to the high tyrosol content in white wines, where it is the second most abundant phenolic compound. The aim of the present research was to study the effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae bayanus*) on the final tyrosol content in wine. Firstly, the effect of second fermentation and wine aging in contact with yeast on tyrosol content was analyzed. Three wines obtained from three different varieties, were prepared and stored in “winery” conditions for 18 months, taking samples at different times. The three base wines showed a different content of tyrosol but during the aging of the three wines for 18 months, no remarkable differences in tyrosol content were evidenced. In the second part of the present research, the production of tyrosol by yeast from tyrosine was studied. Due to its competitive factor and ability to ferment equally well over a wide temperature range, the EC1118 yeast strain was used. The fermentation was carried out on both a synthetic medium and a real grape juice (obtained from Manzoni bianco). For both experiments samples were prepared adding three different quantities of tyrosine (18, 36 and 72 mg/L). All of the samples were prepared in duplicate and another two samples were prepared as a control without tyrosine added. The HPLC results showed that using synthetic medium there was a very low tyrosol production (even following tyrosine addition), however using a real grape juice the concentration of tyrosol was six-fold higher than that obtained in model juice. This suggests that some compounds which do not exist in model juice (as for example, polyphenols) can have an effect on tyrosol production.

**January 2013, 57 pages**

**Key Words:** Tyrosol, Phenolic Compounds of Wine, *Saccharomyces cerevisiae bayanus*

## TEŞEKKÜR

Çalışmamı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan Bölüm Başkanımız ve danışman hocam Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı), tezimin bir bölümünü oluşturduğum, İtalya'nın Padova Üniversitesi'ne bağlı Conegliano enoloji laboratuvarındaki çalışmalarım süresince maddi manevi desteğini esirgemeyen, her aşamada engin bilgileri ve pratik çözümleriyle beni bilgilendiren ve destekleyen değerli hocam Dr. Simone VINCENZI'ye, tez yazım aşamasında bilgi ve önerilerini bana sunan desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Turgut CABAROĞLU'na (Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü) ve Prof. Dr. Birhan KUNTER'e (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı), Hacettepe Eczacılık Fakültesi'nde yapılmış olan çalışmalara erişmemi sağlayan başta babam Uzm. Ecz. Ener SOLAKOĞLU'na, Prof. Dr. Tayfun ERSÖZ'e ve Uzm. Ecz. Ekrem KILIÇ'a ve hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Duygu SOLAKOĞLU

Ankara, Ocak 2013

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	3
2.1 Fenolik Bileşikler Üzerine Yapılan Araştırmalar .....	3
2.2 Tyrosol (C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ) Fenolik Bileşiği .....	10
2.3 Tyrosol Üzerine Yapılan Çalışmalar .....	11
2.3.1 Beyaz şaraplarda tyrosol üzerine yapılan çalışmalar .....	20
2.3.2 Kırmızı şaraplarda tyrosol üzerine yapılan çalışmalar .....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1 Materyal .....	24
3.1.1 Doğal köpüren şaraplarda ikinci fermantasyon ve şişede yllandırma uygulaması .....	24
3.1.2 Yapay ve doğal üzüm sırasında fermantasyon ve tirozin ilavesi uygulamaları .	25
3.2 Yöntem .....	27
3.2.1 Denemelerin kurulması .....	27
3.2.1.1 Doğal köpüren şaraplarda ikinci fermantasyon ve şişede yllandırma uygulaması .....	27
3.2.1.2 Yapay ve doğal üzüm sırasında fermantasyon ve tirozin ilavesi uygulamaları.....	28
3.2.1.2.1 Maya hazırlaması .....	28
3.2.1.2.2 Yapay ve doğal üzüm sırasında fermantasyon.....	29
3.2.2 Analiz yöntemleri .....	31

3.2.2.1 HPLC ile tyrosol analizi .....	32
3.2.2.2 HPLC kantitatif analitik yönteminin geliştirilmesi .....	34
3.2.2.3 İstatistikî analiz .....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	36
4.2 Doğal Köpüren Şaraplarda İkinci Fermantasyon ve Şişede Yıllandırma Uygulaması .....	36
4.3 Yapay Üzüm Şirasında Fermantasyon ve Tirozin İlavesi Uygulamaları .....	40
4.4 Doğal Üzüm Şirasında Fermantasyon ve Tirozin İlavesi Uygulamaları .....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
5.1 Doğal Köpüren Şaraplarda İkinci Fermantasyon ve Şişede Yıllandırma uygulaması .....	46
5.2 Yapay Ve Doğal Üzüm Şirasında Fermantasyon ve Tirozin İlavesi Uygulaması .	48
KAYNAKLAR .....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	57

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNP	2,4-dinitrofenol
FAN	Serbest aminonitrojen
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HCl	Hidroklorik asit
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
mg/L	Miligram/litre
ml	Mililitre
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amonyum
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOR	Serbest oksijen radikali
°C	Derece Santigrat
%	Yüzde

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Şarap kalitesinin zamana göre değişim grafiği .....	3
Şekil 2.2 Üzüm ve şaraptaki fenolik bileşikler .....	4
Şekil 2.3 Akdeniz diyetinde yer alan besinlerin şematik dağılımı .....	9
Şekil 2.4 Tyrosol'ün kimyasal yapısı .....	10
Şekil 2.5 Aminoasit eklenmesi ile tyrosol oluşumu .....	15
Şekil 2.6 Tyrosol'ün oluşum reaksiyonu .....	16
Şekil 2.7 Tyrosol ve hidroksityrosolün <i>Saccharomyces cerevisiae</i> hücreleri tarafından dönüşümü .....	17
Şekil 2.8 <i>S.cerevisiae</i> hücre gelişimi, glikoz tüketimi ve tyrosol oluşumu grafiği .....	18
Şekil 2.9 Ortamdaki glikoz miktarının hücre gelişimine ve tyrosol oluşumuna etkisi .....	19
Şekil 3.1 Chardonnay, Glera ve Incrocio Manzoni çeşitlerine ait salkımlar .....	24
Şekil 3.2 Şişede yıllandırma .....	27
Şekil 3.3 Steril kabinde maya hazırlanması .....	28
Şekil 3.4 Yapay üzüm şırası örnekleri .....	29
Şekil 3.5 Doğal üzüm şırası örnekleri .....	30
Şekil 3.6 İnkübatöre konulan yapay üzüm şırasında fermantasyon deneyi örnekleri .....	31
Şekil 3.7 Hesaplanan kalibrasyon eğrisi .....	33
Şekil 4.1 Üç çeşit şarabın ikinci fermantasyon ve yıllandırma süresi boyunca tyrosol miktarının aylara göre değişimi .....	37
Şekil 4.2 Prosecco şarabının 18 aylık dönemde HPLC cihazıyla belirlenen tyrosol miktarları .....	38
Şekil 4.3 Incrocio Manzoni şarabının 18 aylık dönemde HPLC cihazıyla belirlenen tyrosol miktarları .....	38
Şekil 4.4 Chardonnay şarabının 18 aylık dönemde HPLC cihazıyla belirlenen tyrosol miktarları .....	39



Şekil 4.5 Fermantasyon süresince mayalardaki ağırlık azalmasının zamana göre değişimi .....	40
Şekil 4.6 Yapay üzüm şırası deneyi örneklerinin HPLC cihazıyla belirlenen ortalama tyrosol değerleri .....	42
Şekil 4.7 Doğal üzüm şırasında fermantasyon süresince mayalarda görülen ağırlık azalması .....	43
Şekil 4.8 Doğal üzüm şırası deneyi örneklerinin HPLC cihazıyla belirlenen ortalama tyrosol değerleri .....	45
Şekil 5.1 Yapay üzüm şırasında eklenen tirozin oranıyla birlikte artan tyrosol miktarı.....	39
Şekil 5.2 Doğal üzüm şırasında farklı dozlarda (18, 36, 72 mg/L) tirozin eklenmesiyle ortaya çıkan tyrosol üretimindeki % artış .....	39

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Tyrosol'ün kimyasal özellikleri .....	10
Çizelge 2.2 Bordeaux bağlarından 1996-1999 hasadı ile elde edilen üzüm şıralarındaki mevcut azot içeriği .....	12
Çizelge 2.3 1986'da Champagne Bölgesi üzüm çeşitlerinde olgunluk süresince ölçülen aminoasit miktarları .....	13
Çizelge 2.4 Şıraya eklenen azot fraksiyonları ve toplam aminoasit içeriği .....	14
Çizelge 2.5 Başlangıçta şırada bulunan her aminoasidin yüzde miktarları .....	14
Çizelge 2.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> hücrelerinden glikoz, tirozin varlığında ve yokluğunda tyrosol oluşumu .....	19
Çizelge 2.7 Beyaz şaraplarda ve üzüm şırasında bulunan ortalama fenolik bileşiklerin miktarları ve referans aralıkları .....	20
Çizelge 2.8 Şarap örneklerindeki stilben monomeri ve tyrosol içeriği .....	21
Çizelge 2.9 İspanyol şaraplarında belirlenen Hidroksityrosol ve tyrosol miktarları .....	22
Çizelge 2.10 Macaristan ve Kanada şaraplarında diğer fenolik bileşikler ile birlikte bulunan tyrosol miktarları .....	23
Çizelge 3.1 Yapay üzüm şırası ortamının besin maddesi içeriği .....	25
Çizelge 3.2 Yapay üzüm şırası ortamının aminoasit bileşimi .....	26
Çizelge 3.3 HPLC cihazında kullanılan gradyanlar .....	32
Çizelge 3.4 Tyrosol miktarları ve pik alanları .....	33
Çizelge 3.5 Tyrosolün HPLC cihazında geri kazanımının hesaplanması .....	34
Çizelge 4.1 Baz şarap örneklerinde ikinci fermantasyon ve şişede yıllandırma süresince değişen tyrosol miktarları .....	36
Çizelge 4.2 Yapay üzüm şırasında HPLC cihazı ile hesaplanan gerçek ve ortalama tyrosol ve yüzde artış miktarları .....	41
Çizelge 4.3 Doğal üzüm şırasında HPLC cihazıyla belirlenen gerçek ve ortalama tyrosol miktarları ve yüzde artışları .....	44

## 1. GİRİŞ

Burukluk, acılık ve renklenme üzerine büyük katkısı olan fenolik bileşikler şarap için önemli bileşiklerdir. Şarabın duyuşal özelliklerini sağlamada büyük katkıları olan fenolik bileşiklerin insan sağlığı açısından da birçok yararı bulunmaktadır. Fenolik bileşikler serbest radikal temizleyicisi mekanizmalar ile birlikte antioksidan olarak görev almaktadırlar (Chimi vd. 1991, Frankel vd. 1993).

Son yirmi yılda, şarapta var olan fenolik bileşiklerin sahip oldukları biyolojik ve antioksidan aktiviteyle ilişkili olarak insan sağlığı üzerine olan olumlu etkileri ile şaraba ilgi artmıştır. Şaraplarda bulunan fenolik bileşiklerden resveratrolün de (3,5,4'-trihydroxystilbene) içinde bulunduğu stilbenler grubu en önemli grubu oluşturmaktadır (Golberg vd. 1995, Vitrac vd. 2005).

Şaraplarda bulunan ve sağlık açısından yararları artık birçok çalışma ile kanıtlanmış olan resveratrolün yanı sıra şarapta daha yüksek içeriğe sahip olan bir diğer fenolik bileşik olan tyrosolün de sağlık üzerine önemli etkileri mevcuttur (Frankel vd. 1993).

Doğal bir antioksidan olan tyrosol LDL oksidasyonunu önleyici, serbest radikal temizleme gibi antioksidan özelliklere sahip olduğu gibi, LDL düzeyini düşürücü ve kalp damarlarını koruyucu etki yapma yeteneğine sahip olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Pour Nikfardjam ve Pickering 2008).

Tyrosolün biyolojik aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar zeytinyağı ile başlamıştır fakat bu biyofenol aynı zamanda ciddi miktarda hem kırmızı hem de beyaz şaraplarda bulunmaktadır ve şarabın biyolojik aktivitesine olan katkısı ile ilgili veriler bulunmaktadır. Bu durumun beyaz şarapların antioksidan ve serbest radikal temizleyici kapasitesini artırabileceği bilgisi de verilmiştir (Vauzour vd. 2009). Dünya'da beyaz ve kırmızı şaraplarda, diğer fenolik bileşikler ile birlikte tyrosolün de içeriğini belirlemeye yönelik çalışmalar bulunmaktadır ve sağlık üzerine olumlu etkileri kanıtlanmaya başlandığca da bu çalışmalar giderek artmaktadır (Pineiro vd. 2011).

Tyrosol üzerine yapılan araştırmalar göz önüne alındığında, fenolik bileşiklerin son derece reaktif ve çeşitli reaksiyonlara karşı duyarlı olduğundan, tyrosol içeriğinin şarabın yıllandırılması esnasında değişebileceği belirtilmiştir (Gris vd. 2010). Buna ek olarak bir çalışmada da, maya tortusunda bekletme uygulamasının tyrosol fenolik bileşiği üzerine etkileri çalışılmıştır ve tyrosol miktarında bir takım değişiklikler meydana getirdiği bilgisine yer verilmiştir (Pour Nikfardjam ve Pickering 2008).

Tyrosol üzerine yapılan araştırmalardan bir diğerinde ise, şırada gerekli azot miktarı için değişik miktarlarda aminoasit ilavesinin, alkol fermentasyonu sırasında uçucu bileşiklerin oluşumu üzerine etkisi çalışılmıştır ve tyrosol sentezinin, şıraya eklenen aminoasit miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı saptanmıştır (Garde-Cerdan ve Ancin-Azpilicueta 2007)

Bu bilgilerden yola çıkılarak bu araştırmada, ilk olarak şişede yıllandırma (dinlendirme) uygulamasının tyrosol üretimi üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. İtalya'nın Veneto bölgesi için ekonomik değeri yüksek üzüm çeşitlerinden olan; Chardonnay, Glera ve Incrocio Manzoni'den elde edilen baz şaraplar alınarak, ikinci fermentasyona tabi tutulup 18 ay süreyle şişede yıllandırmaya bırakılmış, şarapların her birinden 1., 3., 6.,12. ve 18. ayların sonunda örnekler alınarak, HPLC cihazında tyrosol içeriklerine bakılarak bu süreçte tyrosol miktarında meydana gelen değişikliklerin saptanması amaçlanmıştır.

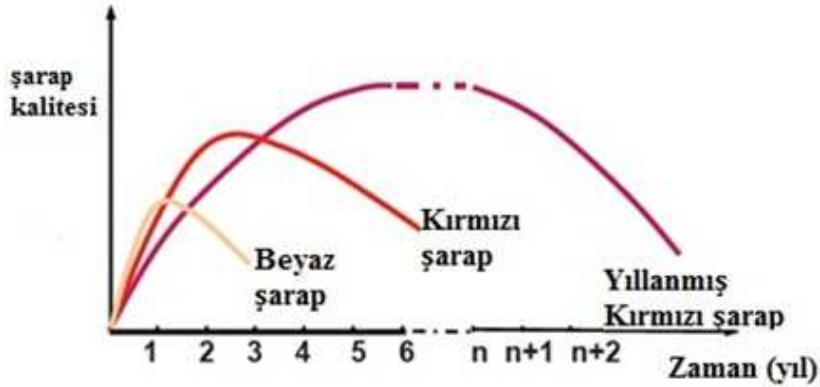
İkinci olarak tyrosol üretimini arttırmayı hedefleyen diğer uygulamada; tyrosol oluşumu için gerekli olduğu bilinen tirozin aminoasidinin belirlenen düşük, orta ve yüksek (18, 36 ve 72 mg/L) miktarları üzüm şırasına eklenerek tyrosol oluşumu üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için, doğal üzüm şırasında bulunan besin içeriğine mümkün olan en yakın oranlarda hazırlanan bir yapay üzüm şırası ortamı ve doğal üzüm şırası kullanılmıştır. Her iki denemeye de belirlenen miktarlarda tirozin eklenip aynı tip maya suşu kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon işlemi sonucunda meydana gelecek tyrosol oluşumlarındaki değişikliklerin HPLC cihazı ile saptanması amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Fenolik Bileşikler Üzerine Yapılan Araştırmalar

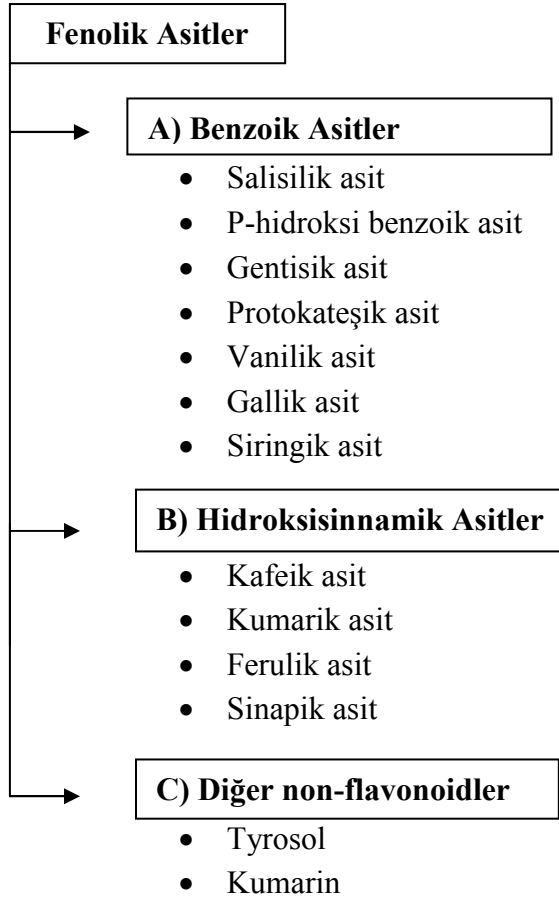
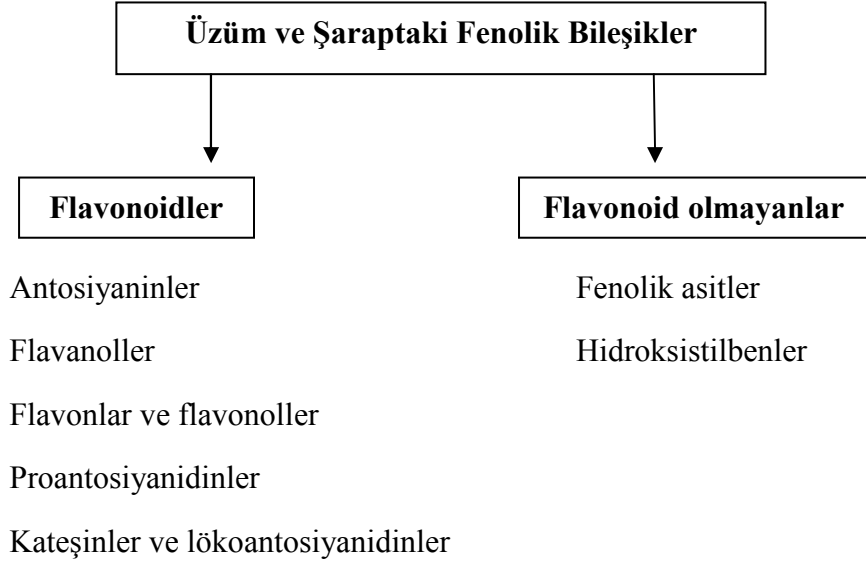
Fenolik bileşikler şarabın renk, tat ve burukluk (Noble vd. 1990) gibi duyuşal özelliklerini sağlamada büyük katkıları olduğu gibi (Lee ve Jaworski 1997) serbest radikal temizleyicisi ve metal bağlayıcısı olan mekanizmalar ile birlikte antioksidan olarak görev alabilirler (Chimi vd. 1991, Frankel 1993).

Şarabın içeriğinde bulunan fenolik bileşikler zaman içerisinde şarabın kalitesi üzerine etki ederler. Bu etki Şekil 2.1’de görüleceği üzere; kırmızı şarapta, beyaz şaraba oranla daha yüksektir. Yıllanmış kırmızı şarapta ise kalite üzerindeki etki en belirgindir ve zaman içerisinde en fazla değişimi göstermektedir.



Şekil 2.1 Şarap kalitesinin zamana göre değişim grafiği (Noble vd. 1990)

Üzüm ve şaraptaki fenolik bileşikler, Şekil 2.2’de gösterildiği üzere, kimyasal açıdan flavonoid olmayanlar (hidroksisinnamik, hidroksibenzoik asit ve türevleri, fenolik alkoller) ve flavonoidler (antosiyantinler, flavon-3-ol monomerleri ve polimerleri, flavonoller ve dihidroflavonoller) olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. P-hidroksi benzoik asit, protokateşik asit, vanilik asit, salisilik asit ve gensitik asit benzoik asit; kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit ise sinnamik asit türevlerindedir (Söylemezoğlu 2003, Nave vd. 2007, Castillo-Sanchez vd. 2008).



Şekil 2.2 Üzüm ve şaraptaki fenolik bileşikler (Söylemezoğlu 2003, Nave vd. 2007, Castillo-Sanchez vd. 2008).

Şarapta var olan fenolik bileşiklerin sahip oldukları biyolojik ve antioksidan aktiviteyle ilişkili olarak insan sağlığı üzerine olan olumlu etkileri ile şaraba ilgi artmıştır.

Şaraptaki fenolik bileşiklerin sağlığa yararları üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. *Vitis vinifera* L. tohumlarından ve kabuklarından elde edilen ekstraktlarının çoğunlukla flavanoidler ve sinamik asitlerden ötürü antioksidan özellikleri birçok çalışmada tespit edilmiştir. Ayrıca şaraplarda da bulunan Kateşinler ve prosiyanidinler üzüm çekirdeklerinde bulunan önemli fenolik bileşiklerdir (De Rijke vd. 1996, Mc Donald vd. 1998).

Şaraplarda bulunan fenolik bileşiklerden resveratrolün de (3,5,4'- trihydroxystilbene) içinde bulunduğu stilbenler grubu en önemli grubu oluşturmaktadır. Bu trans-izomerine ek olarak trihydroxystilbenenin diğer formları örneğin cis-resveratrol, ve bu izomerlerin glikozitleri (Goldberg vd. 1995, Vitrac vd. 2005) ve birkaç dimerleri ve polimeri de şarapta bulunmaktadır. Resveratrol insan sağlığı üzerinde etkili olan rolü nedeniyle en yaygın ve kapsamlı olarak incelenmiş fenolik bileşiktir (Lamuela-Raventos vd. 1995, Ribeiro de Lima vd. 1999).

Asmalarda çekirdek, tane kabuğu, yapraklar ve destek doku organlarında biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı sentezlenen resveratrol;

- Trombositlerin birleşmesini önleyerek pıhtılaşmayı engellediği, LDL oksidasyonunu azalttığı, güçlü antifungal, antiviral (özellikle nezle virüsünde), antiinflamatuvar (iltihap oluşumunu engelleyici), antioksidan, antibakteriyel etkileriyle beraber güçlü bir kalp-damar sistemi koruyucusudur (Frankel vd. 1993).
- Ayrıca meme, prostat ve nöroblastom (sinir hücrelerinde çıkan tümör) türü kanserlerin tedavisinde tedavinin etkinliğini artırdığı, antioksidan ve antiproliferatif (hücre büyümesini engelleyici) etkilerinden ötürü yaşa bağlı gözdeki makular dejenerasyonun (sarı nokta hasarı) önlenmesinde de etkili olduğu bildirilmiştir (Bartlett ve Eperjesi 2008, Kapoor 2009, Covas vd. 2010).

Böylece, resveratrol düzeyi yüksek olan şaraplar resveratrolün sağlık üzerine yararlı etkileri nedeniyle "işlevsel şaraplar" olarak dikkate alınmaktadır (Renaud ve De Lorgeril 1992, Mukherjee vd. 2009, Queiroz vd. 2009).

Bitkiler, en önemli doğal antioksidan kaynağı olup 8000 kadar farklı yapıdaki bitki fenolik bileşikleri bilimsel araştırmalarda bildirilmiştir (Davidson ve Decker 2009).

Gıda antioksidanları, "İnsanlarda fizyolojik şartlarda oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR) veya serbest nitrojen radikallerinden (SNR) birinin ya da her ikisinin de olumsuz etkilerini azaltabilen maddelerdir" şeklinde tanımlanabilir. Yani oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge olması hayat için esastır (Cornelli 2009).

Antioksidan terimi genel bir ifade olup, gıdaların antioksidan içerikleri ve antioksidanların vücut tarafından emilim ve etki oranları (biyoyararlanımları), gıda maddesinin cinsine, hasat zamanı ve hasat yöntemlerine, iklime, depolama ve muhafaza ortamının ısısına, nemine, ışığına, gıdanın hazırlanması, hatta kişi ve toplumların tüketim alışkanlıklarına göre de değişebilmektedir (Moure 2001, Cornelli 2009).

Antioksidanların, arteroskleroz (damar sertliği), eklem romatizması, diyabette faydalı olabileceği gibi, tümör oluşumunu engelleyici, antimutajenik (hücreleri mutasyondan koruyucu etki), antimetastatik (kanserli hücrelerin başka bölgelere sıçramasını önleyici etki), antitrombik (damar içinde pıhtı oluşumunu engelleyici etki), antiülser, antikarsinogenik, yüksek tansiyonu önleyici, antibakteriyel, antifungal antiviral ve antiaging (yaşlanmayı önleyici) etkileri de olduğu yapılan in-vivo çalışmalarla belirlenmiştir (Moure vd. 2001, Kusano ve Ferrari 2008, Hassimotto vd. 2008, Cornelli 2009, Pellegrini vd. 2009).

Polifenoller, ROS (reaktif oksijen türleri) ve lipid bağlarını kıran radikalleri (ROO-) metal iyonlarının yaptığı gibi bağlanarak süpürebilen antioksidanlardır (Stahl vd. 2002, Cemeli vd. 2009, Pellegrini vd. 2009).



Kırmızı şaraplarda burukluğu ve dolgunluğu istenen en iyi düzeyde ayarlamak için tanen gibi polifenolik bileşikler düzenleme yoluna giden şarap üreticilerine ilgi son yıllarda giderek artmıştır. Maserasyon, presleme ve yillandırma uygulamaları sıkça kullanılmasına ve fenolik oluşumunu etkilediği kanıtlanmasına rağmen, ticari maya preparatları kullanılması şarapların fenolik bileşik profilini iyileştirme üzerine en uygun araç olarak gösterilmiştir (Pour Nikfardjam ve Pickering 2008).

Rekabet faktörü ve geniş bir sıcaklık aralığında eşit oranda fermantasyon yeteneği nedeniyle *Saccharomyces cerevisiae* mayaları dünyada en yaygın olarak kullanılan mayalardan biridir. Oldukça düşük miktarda uçucu asit, hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) ve köpük oluşumu gibi fermantasyon karakteristikleri bu mayaları şarap yapımı için seçiminde üst sıralara çıkartmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae bayanus* tipi olan EC1118 mayaları 10°C'den 30°C'ye kadar çok geniş bir sıcaklık aralığında fermente olabilirler ve yüksek osmotik basınç ve alkol toleransı gösterirler. Şarabın karakteristik tadını koruması ve aromaya olan katkısı EC1118 mayalarının diğer olumlu özellikleridir. EC1118 mayaları köpüklü şaraplar dâhil olmak üzere her şarap tipi için önerilen maya suşudur. *Saccharomyces cerevisiae bayanus* tipi bir diğer maya suşu DV 10 ise özellikle yüksek alkol toleransı özelliği sebebiyle köpüren şaraplarda ikinci fermantasyon sırasında kullanılmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* mayalarının fermente kültürleri etanol ve karbondioksit ile birlikte, çok düşük molekül ağırlıklı aroma veren bileşikler üretirler (Fleet ve Heard 1993, Pretorius ve Bauer 2002, Dequin vd. 2003, Hazelwood vd. 2008).

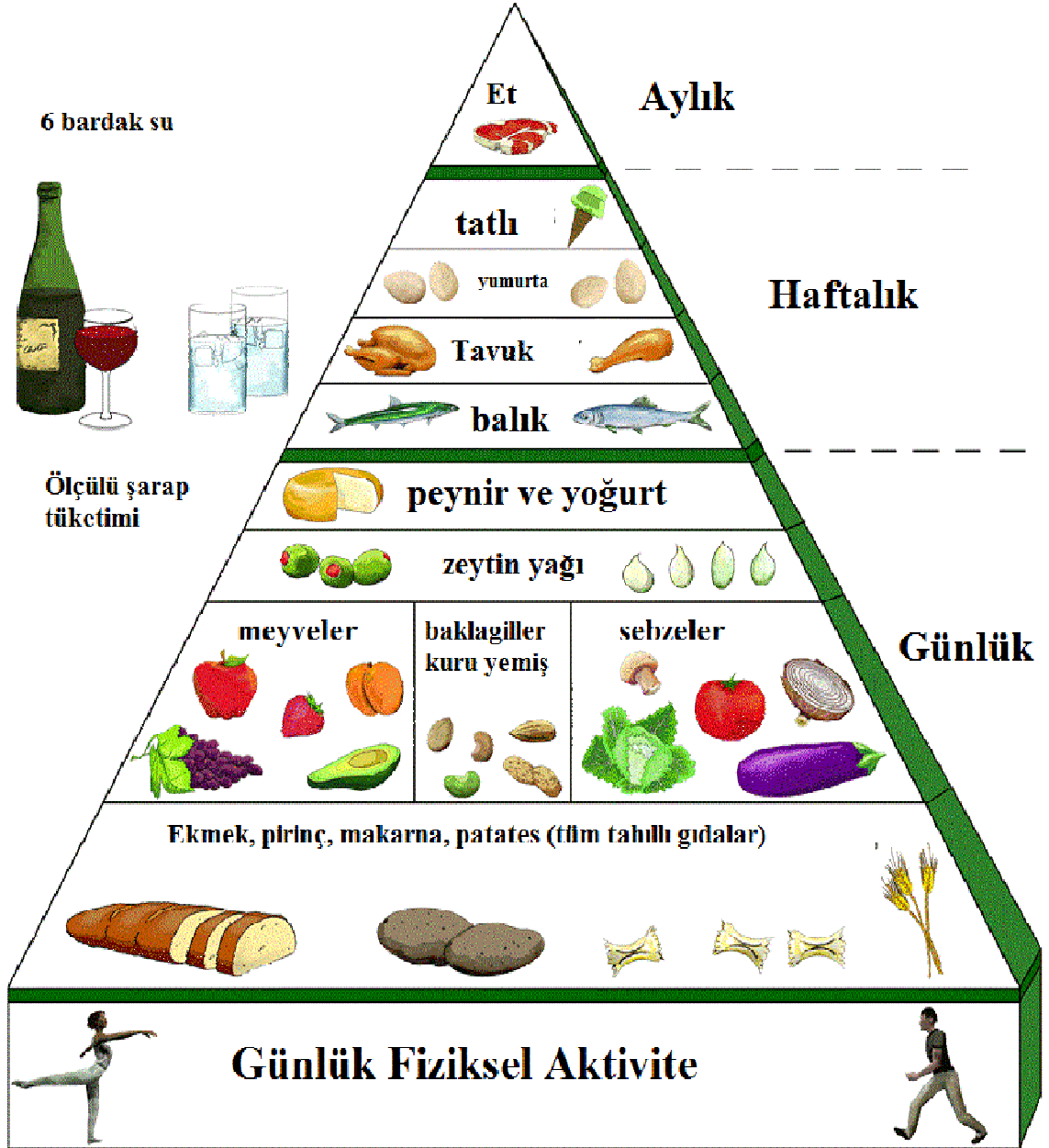
2008 yılında farklı üzüm çeşitlerinin ve ticari mayaların fenolik bileşikler üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada; iki Kanada hibrit üzüm çeşidi olan Maréchal Forc ve Baco Noir ve iki Macaristan'ın *Vitis vinifera* L. varyetelerinden Kadarka ve Lemberger den yapılmış sekiz farklı şarap kullanılmıştır. Kullanılan şarapların yarısı fermantasyondan önce ticari mayalarla (OptiRed) uygulamaya tabi tutulmuş diğer yarısı ise uygulamasız bırakılmıştır. Araştırma sonucunda, çeşitlere bağlı olarak pH, titre edilebilir asitlik, etanol, renk tonu, yoğunluğu ve total fenolik içeriği gibi temel şarap kalite kriterlerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Çeşitlere bağlı değişiklikler ayrıca 11 renksiz fenolik bileşiklerinde de belirlenmiştir bunlar; gallik asit, protokateşik asit, tyrosol, kaftarik asit, kateşin, kafeik asit, GRP, epikateşin, p-kumarik asit, ferulik asit ve trans-resveratrol'dür (Nikfardjam ve Pickering 2008).

Kanada şaraplarının antosiyanin konsantrasyonu (malvidin, delphinidin, petunidin) ve anti-oksidan kapasitesi bakımından en yüksek içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir. OptiRed eklenmesi ise temel kalite kriterleri üzerine düşük miktarda da olsa etki göstermiştir. Örneğin gallik asit, protokateşik asit, kaftarik asit ve kateşin OptiRed uygulamasına tabi tutulanlarda ortalama % 6 oranında artış göstermiştir. Fakat OptiRed uygulanmış bütün varyetelerin monomerik polimerlerden daha çok polimerik monomerlerin mevcut olduğu gibi prosianidin yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir (Nikfardjam ve Pickering 2008).

Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki, şarapta bulunan bir diğer fenolik bileşik olan tyrosolün de sağlık üzerine önemli etkileri mevcuttur. Doğal bir antioksidan olan Tyrosol "Fransız Paradoksu" ile ilişkili olduğu gibi aynı zamanda Akdeniz diyetinin mevcut esas elemanlarından biridir (Dudley vd. 2008, Mukherjee vd. 2009).

Akdeniz diyeti 1990 yılında Halk Sağlığı Harvard Üniversitesine bağlı Sağlık Okulu'nda Dr. Walter Willett tarafından sunulmuştur ve adı Akdeniz Havzası'nda yer alan bazı ülkelerin, geleneksel beslenme biçimlerinden esinlenerek belirlenmiştir. Akdeniz yemeklerinin önemli bir kısmını sebzeler oluşturur, yıl boyu her mevsimde bol olan sebze sıkça yenilir. Günümüzde bitkisel kaynaklı besinlerin daha fazla yenmesi önerileri bunları yüksek miktarda tüketen toplumlarda, çeşitli kronik hastalıkların, özellikle de koroner, kalp hastalığının ve bazı kanserlerin daha seyrek görülmesinden dolayıdır (Kavas 2000).

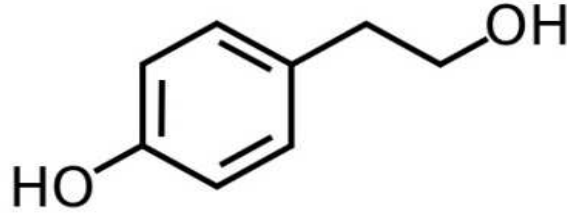
Bu beslenme şekli kırmızı ete az yer verir; balık, tahıl, sebze meyve ve lif ağırlıklıdır, zeytinyağı en önemli besindir, süt yoğurt ve peynir protein kaynağı olarak balık ile birlikte yer alır (Şekil 2.3). Uzmanlar Akdeniz diyetiyle birlikte ölçülü miktarda şarap tüketimini önermektedirler. Bu miktar günde bir iki kadehi geçmemelidir. Bu beslenme tipi kalp damar hastalıkları ve kansere karşı koruyuculuk ile uzun ve kaliteli bir yaşamın temel anahtarıdır (Kavas 2000).



Şekil 2.3 Akdeniz diyetinde yer alan besinlerin şematik dağılımı (Kavas 2000)

## 2.2 Tyrosol (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>) Fenolik Bileşiği

Tyrosol [2 - (4-hidroksifenil) etanol] maya fermantasyonu sırasında üretilen, yağda çözülebilen, bir mono-fenol bileşiğidir (Şekil 2.4) (Di Benedetto vd. 2007). Tyrosol'ün kimyasal özellikleri çizelge 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.4 Tyrosol'ün kimyasal yapısı (Di Benedetto vd. 2007)

Çizelge 2.1 Tyrosol'ün kimyasal özellikleri (Di Benedetto vd. 2007)

<b>Açık kimyasal adı</b>	<b>[2 - (4-hidroksifenil) etanol]</b>
<b>Kapalı formülü</b>	<b>C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub></b>
<b>Molekül ağırlığı</b>	<b>138.164 g/mol</b>
<b>Erime noktası</b>	<b>91-92 °C</b>
<b>Kaynama noktası</b>	<b>158 °C</b>

Birçok çalışma ortaya koymuştur ki bu birleşik, LDL oksidasyonunu önleyici, serbest nitrojen ve oksijen radikallerinden temizleme gibi antioksidan özelliklere sahiptir (Mukherjee vd. 2009). Dahası tyrosolün kalp koruyucu etkisinin olmasının yanı sıra aynı zamanda insanın LDL düzeyini düşürücü etki yapma yeteneğine sahiptir (Dudley vd. 2008, Mukherjee vd. 2009).

Serbest radikal temizleyicisi, anti kansorejen, antimikrobiyal ve kalp koruyucu özellikler gibi çeşitli sağlık arttırıcı faaliyetler, tyrosol ve hidroksityrosole atfedilmiştir (Pineiro vd. 2011).

### 2.3 Tyrosol Üzerine Yapılan Çalışmalar

Tyrosolün biyolojik aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar zeytinyağı ile başlamıştır. Fakat bu biyofenol aynı zamanda ciddi miktarda hem kırmızı hem de beyaz şaraplarda bulunmaktadır ve şarabın biyolojik aktivitesine katkı sağlamaktadır (Gris vd. 2011). Bu durumun beyaz şarapların antioksidan ve serbest radikal temizleyici kapasitesini artırabileceği bilgisi de verilmiştir (Lesko vd. 2011).

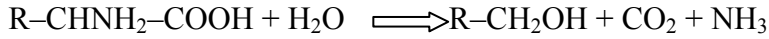
Üzüm sırasında oldukça yüksek miktarda azot bileşikleri bulunmaktadır (0.1-1 g/L çözülebilir azot). Bu bileşikler; amonyum katyonu (% 3-10), amino asitler (% 25-30), polipeptitler (% 25-40) ve proteinlerden (% 5-10) oluşur. Üzümdeki azot miktarı çeşide, anaca, çevre ve yetiştirme koşullarına özellikle de topraktaki azot miktarına ve azotlu gübrelemeye bağlı olarak değişebilmektedir. Olgunlaşmış üzümün azot içeriği içerdiği meyve sırası konsantrasyonu nedeniyle artabilir. Sek beyaz şarap yapımında, şıra elde etme yöntemleri, şıradaki amino grubu bileşikleri ve protein konsantrasyonunu etkiler. Yavaş presleme ve kabuk maserasyonu, kabuktaki fenolik bileşiklerin çıkarılmasına ve bunların konsantrasyonunun artmasına yardımcı olmaktadır (Dubourdieu vd. 1986).

Mayalar gelişimleri için gerekli azot kaynağını üzüm şirasından sağlarlar. Amonyum katyonu mayalar tarafından kolaylıkla asimile edilir ve aminoasit sentezi için mayanın ihtiyacı olan azotu karşılar. Polipeptitler ve proteinler *Saccharomyces cerevisiae* gelişimine katkıda bulunmazlar. Çünkü mayalar bu maddeleri hidroliz edemezler. *Saccharomyces cerevisiae* azot kaynağı olarak aminoasitlere ihtiyaç duymaz çünkü tek tek bunları sentezleme özelliğine sahiptir. Böyle olmakla beraber, bunların eklenmesi mayaları amonyum azottan daha çok uyarır. Aminoasit ve amonyum azot karışımı ise daha etkili bir uyarıcıdır (Henschke ve Jiranek 1992).

Mayalar, aminoasitleri üç mekanizmaya göre kullanırlar.

1. Proteinlere dönüşmeden doğrudan birleştirilmesi
2. Farklı amino bileşenlerinin biyosentezi için amino gruplarına ayrıştırılması (Açığa çıkan karbon molekülü ile ilişkilidir.)

Şaraptaki bir yüksek alkol dönüşümünün reaksiyonu şu şekilde gösterilir:



Mayalar aminoasitlerinden oluşan amonyum azotu muhtemel diğer yollar vasıtasıyla alma yeteneğine sahiptirler (Henschke ve Jiranek 1992).

3. Metabolik reaksiyonlarda karbon kaynağı olarak aminoasit moleküllerinin kullanılması. Maya eşzamanlı olarak buna karşılık gelen amonyum azotu yeniden kazandırarak, telafi eder.

Şıradaki amonyum katyonlarının ve aminoasitlerin başlangıç konsantrasyonu eklenecek maddelerin gerekli miktarını belirlemede en önemli unsurlardır.

$NH_4^+$  (amonyum) konsantrasyonu 25 mg/L'nin altında olduğunda azot ilavesi gerekmektedir. Eğer bu değerler serbest aminonitrojen (FAN) cinsinden ifade edilmiş ise litre başına 160 ila 250 g şeker içeren bir şıradaki tam anlamda bir fermantasyonun gerçekleşmesi için gerekli miktar 70 ila 140 mg/L'dir (Henschke ve Jiranek 1992).

Çizelge 2.2'den de görüleceği üzere bütün şıra örneklerinin mevcut azot içeriği 25mg/L'nin üzerindedir ve ortalama azot içeriği tam anlamda bir fermantasyonun gerçekleşmesi için yeterlidir (Henschke ve Jiranek 1992).

Çizelge 2.2 Bordeaux bağlarından 1996-1999 hasadı ile elde edilen üzüm şıralarındaki mevcut azot içeriği (mg/L de  $NH_4^+$  ve serbest aminoasit cinsinden ifade edilmiştir.) (Henschke ve Jiranek 1992)

	Beyaz	Kırmızı	Roze
Örnek sayısı	32	55	48
Minimum miktar	36	46	42
Maksimum miktar	270	354	294
Ortalama	181.9	157	119
Standart sapma	32	55	48

Çizelge 2.3'te ise 1986 yılında Champagne Bölgesi üzüm çeşitlerinden olan Chardonnay, Pinot Noir ve Pinot Meunier çeşitlerine ait üzümlerden olgunluk süresince Eylül ve Ekim aylarında belirli günlerde örnekler alınarak aminoasit miktarları belirlenmiştir. Bu değerler göz önüne alınarak şıraya eklenecek aminoasit miktarları açısından yararlı veriler belirtilmiştir.

Çizelge 2.3 1986'da Champagne Bölgesi üzüm çeşitlerinde olgunluk süresince ölçülen aminoasit miktarları (mg/L) (Millery 1988)

	Chardonnay					Pinot Noir				Pinot Meunier		
	Eylül			Ekim		Eylül		Ekim		Eylül		Ekim
Örnek tarihleri	8	16	12	7	8	10	22	2	8	16	22	5
Aspartik asit	44	38	16	41	47	33	18	77	33	31	21	31
Threonin	74	136	134	174	91	127	137	219	111	121	146	172
Serin	158	143	119	283	152	165	143	192	192	206	212	176
Glutamik asit	177	173	128	74	108	179	147	116	174	178	68	103
Glutamin	476	361	154	772	286	429	305	638	810	530	730	660
Prolin	111	208	187	1123	64	135	147	396	232	365	582	294
Alanin	251	282	248	487	284	338	333	476	325	306	347	539
Sitrullin	17	45	32	55	39	47	37	70	16	22	17	68
Valin	36	50	50	106	26	44	46	97	78	70	91	67
Sistein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metiyonin	0	11	0	23	0	4	7	14	9	12	18	15
Izolösin	17	39	38	97	6	29	35	84	58	45	72	61
Lösin	20	48	46	98	24	38	43	91	61	55	73	67
Tirozin	7	14	8	28	12	16	12	21	14	12	19	16
Alanin (B)	0	0	0	38	0	0	0	0	0	0	0	2
Fenilalanin	29	39	35	119	-	25	35	85	90	64	108	55
Bütirik asit	18	18	42	218	12	20	41	118	14	43	100	191
Etanolamin	5	11	5	20	5	9	9	1	5	5	8	1
Ornitin	1	18	3	3	1	14	9	14	1	1	1	23
Lisin	1	7	3	5	1	5	5	8	1	1	1	10
Histidin	17	27	22	38	34	24	24	30	34	30	52	31
Arginin	299	813	682	790	392	796	816	1379	393	419	569	1415
Total aminoasit	1760	2482	1953	4590	1889	2478	2350	4124	2652	2518	3235	3997

2007 yılında yapılan bir çalışmada, şırada gerekli azot miktarı için değişik miktarlarda aminoasit ilavesinin, alkol fermantasyonu sırasında uçucu bileşiklerin oluşumu üzerine etkisi çalışılmıştır (Garde-Cerdan ve Ancin-Azpilicueta 2007). Yüzde içerikleri çizelge 2.5'te belirtilen aminoasitlerden 45, 120 ve 250 mg/L alınarak başlangıç materyaline eklenmiştir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4 Şıraya eklenen azot fraksiyonları ve toplam aminoasit içeriği (Garde-Cerdan ve Ancin-Azpilicueta 2007)

	Aminonitrojen (mg N/L)	Kullanılabilir azot (mg N/L)	Total aminoasit içeriği (mg/L)
Başlangıç materyali (şıra)	45	62	332
Şıra45	52	165	378
Şıra120	62	175	447
Şıra250	81	194	578

Bütün veriler ortalama n=4 standart sapma ile verilmiştir. Şıra45: 45 mg/L, Şıra120: 120mg/L, Şıra250: 250 mg/L aminoasit eklemesini ifade etmektedir.

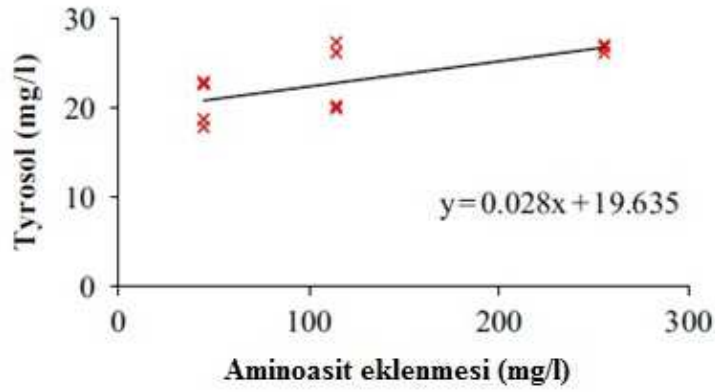
Çizelge 2.5 Başlangıçta şırada bulunan her aminoasidin yüzde miktarları (Garde-Cerdan ve Ancin-Azpilicueta 2007)

Aminoasitler	Yüzde oranları (%)
Lösin	1.5
Triptofan	1.2
Arginin	2.6
Serin	1.9
Asparajin	2.1
Glisin	0.6
Treonin	0.5
Alanin	6.2
Tirozin	0.3
Valin	1.0
Metiyonin	1.2
Sistein	0.4
İzolösin	0.2
Lösin	0.1
Fenilalanin	0.8
Prolin	55.8
Aspartik asit	2.1
Glutamik asit	7.6



Sonuçlar göstermiştir ki, 2-phenylethanol aromatik bileşiği ve onun hidroksillenmiş türevi olan tyrosol sentezi (Şekil 2.5), şıraya eklenen aminoasit miktarı (45, 120 ve 250 mg/L) ile doğru orantılı olarak artmıştır. Yüksek alkoller şekerlerin birleşmesi ile oluşabildikleri gibi katabolik olarak da Ehrlich pathway (aminoasitlerin parçalanma şekli) yolu ile aminoasitlerin parçalanmasıyla da oluşabilmektedirler (Ayrapaa 1971).

Aminoasitlerin şıradaki konsantrasyonu, 2-phenylethanol ve tyrosol oluşumu arasında doğrudan bir bağ olduğu için bunların oluşumu genellikle Ehrlich pathway yolu ile elde edilebilir.



Şekil 2.5 Aminoasit eklenmesi ile tyrosol oluşumu (Ayrapaa 1971)

Araştırmanın sonuçlarına göre alkoller arasında sadece 2-phenylethanol ve tyrosol, aminoasitlerin eklenmesiyle artan bileşikler olarak belirlenmiştir (Ayrapaa 1971).

*Saccharomyces cerevisiae* alkollü içeceklerin üretiminde en az sekiz bin yıldır kullanılmaktadır. Bu mayaların fermente kültürleri etanol ve karbondioksit ile birlikte, çok düşük molekül ağırlıklı aroma veren bileşikler üretirler. Alkollerin, aldehytlerin, organik asitlerin, esterlerin, organik sülfürlerin ve karbonil bileşiklerinin ürün kalitesi üzerinde güçlü bir etkisi vardır. Fermente edilmiş yiyecek ve içeceklerdeki bu bileşiklerin dengesi, belirli ürünler için organoleptik belirleyiciler olarak kullanılmaktadır (Hazelwood vd. 2008).

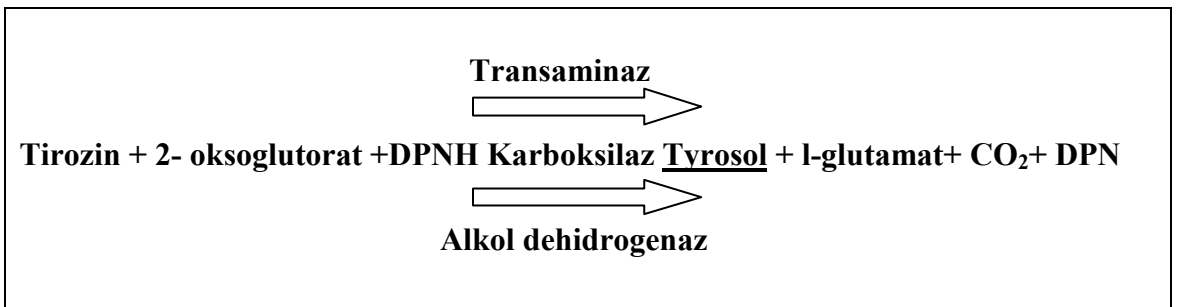
İlk olarak 1950'lerde ve 1960'larda, Sentheshanmuganathan tirozinin tyrosole dönüşümü üzerine çalışmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* hücre ekstraktlarının aspartat, izolösin, metionin, norlösin, fenilalanin, triptofan ve tirozin den amino gruplarını transfer etme yeteğine sahip olduklarını belirlemiştir. Ehrlich pathway'ın ilk adımı bir aminotransferaz aktivitesi tarafından parçalandığıdır (Hazelwood vd. 2008).

Ayrıca p-hidroksi 3-phenlpyruvate'ın p-hidroksi-3 fenilasetaldehid haline dekarboksilasyonunu ve ikincil bileşik olan tyrosolün NADH-bağımlı redüksiyonunu belirlemiştir (Hazelwood vd. 2008).

Bu bulgular ile Ehrlich pathway için Transaminaz, dekarboksilaz ve alkol dehidrogenazından oluşan önemli bir reaksiyon dizisi kurulmuştur (Hazelwood vd. 2008).

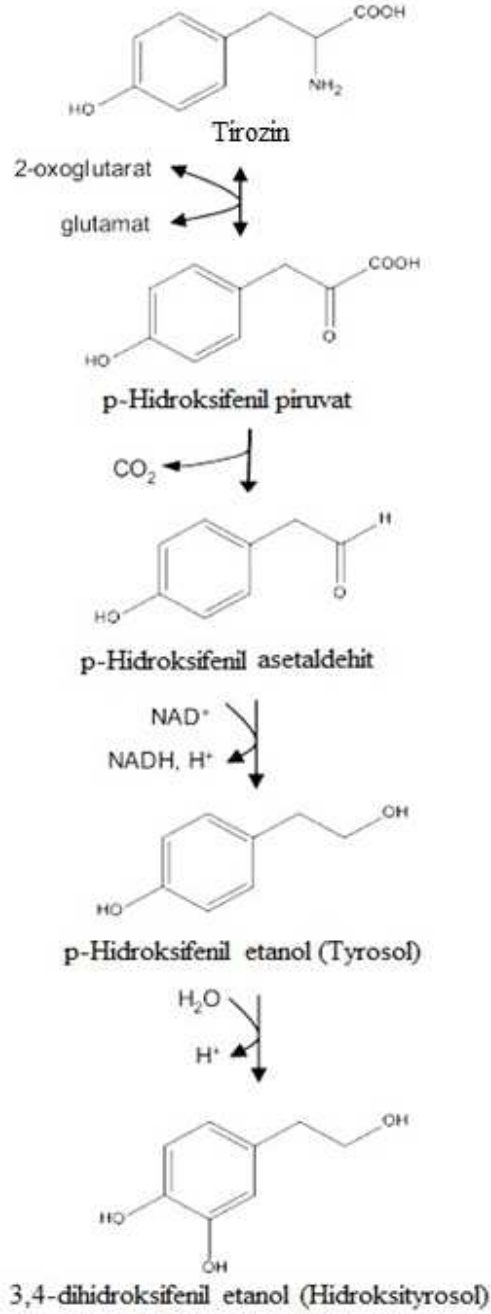
Tyrosol alkol fermantasyonu sırasında, tirozin aminoasidinden oksidatif decorboksilasyon yolu ile *Saccharomyces cerevisiae* mayaları tarafından üretilmektedir (Ribereau-Gayon vd. 2000).

Aslında Sentheshanmuganathan'ın bu çalışması (1957) göstermiştir ki, tyrosol oluşumu ile maya gelişimi birbiriyle ilişkilidir (Şekil 2.6).



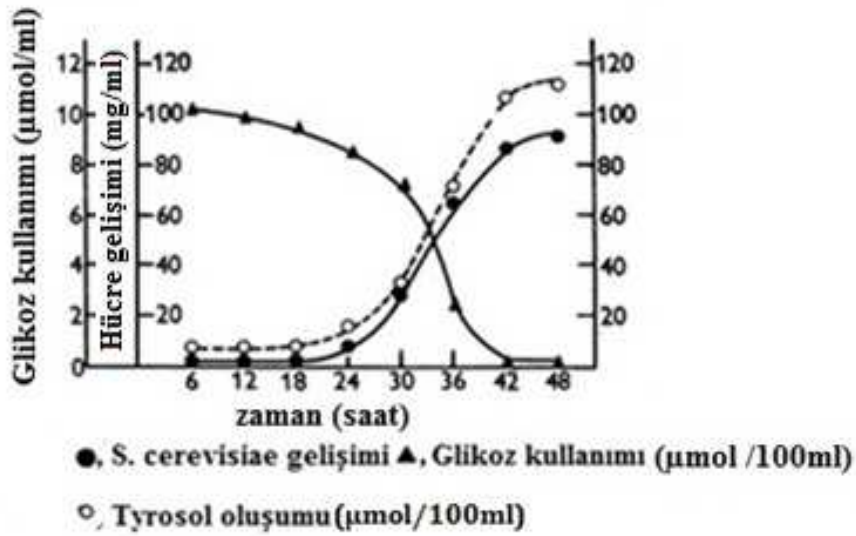
Şekil 2.6 Tyrosol'ün oluşum reaksiyonu (Sentheshanmuganathan ve Elsden 1957)

2011 yılında valide edilmiş HPLC metodu kullanılarak kırmızı şaraplarda tyrosol ve hidroksityrosol içeriklerine bakılmıştır. Bu araştırmada tyrosol ve hidroksityrosolün *Saccharomyces cerevisiae* maya hücreleri tarafından Ehrlich pathway yolu ile dönüşümü şekil 2.7’de gösterilmektedir (Pineiro vd. 2011).



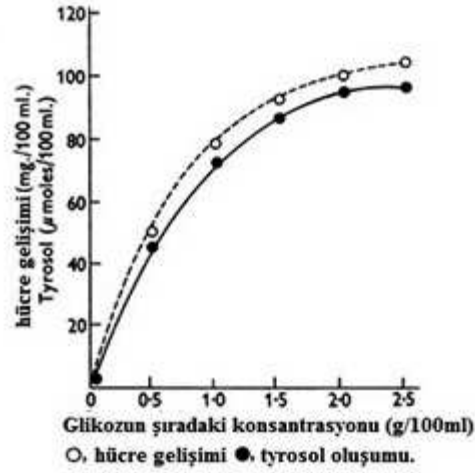
Şekil 2.7 Tyrosol ve hidroksityrosolün *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri tarafından dönüşümü (Pineiro vd. 2011)

Tyrosol sentezi ayrıca glikoz miktarıyla da korelasyon göstermektedir. Şekil 2.8 değişen glikoz miktarı ile birlikte hem *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin gelişimini hem de tyrosol oluşumunu göstermektedir. Glikoz kullanımı neticesinde artan *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin gelişim eğrisi ve buna paralel olarak artan tyrosol oluşumunun eğrisi görülmektedir. Fermantasyon yaklaşık olarak 48 saatte tamamlanmıştır. Tüm ölçümler fermantasyon bitiminden sonra yapılmıştır (Sentheshanmuganathan ve Elsdén 1957).



Şekil 2.8 *S.cerevisiae* hücre gelişimi, glikoz tüketimi ve tyrosol oluşumu grafiği (Sentheshanmuganathan ve Elsdén 1957)

Glikoz, tyrosol oluşumu için gereklidir. Şekil 2.9, glikozun şıradaki konsantrasyonunun hücre gelişimi ve tyrosol oluşumu üzerine etkisini göstermektedir. Glikoz varlığında hem hücre gelişimi hem de tyrosol oluşum eğinde benzer gelişme açısı görülmektedir. Tirozin ve glikoz eklenmesi, tyrosol üretimini ve hücre gelişimini doğru orantılı olarak arttırmıştır (Sentheshanmuganathan ve Elsdén 1957).



Şekil 2.9 Ortamdaki glikoz miktarının hücre gelişimine ve tyrosol oluşumuna etkisi (Sentheshanmuganathan ve Elsden 1957)

Eğer glikoz eklenmemiş olsaydı tirozinden tyrosol oluşumu, glikoz varlığına oranla %13'ü kadar az olacaktı. Çizelge 2.6'ten de görüleceği üzere, glikoz varlığında tyrosol oluşumu 3.8 µmol iken, glikoz yokluğunda bu değer 0.5 µmol olarak hesaplanmıştır (Sentheshanmuganathan ve Elsden 1957).

Çizelge 2.6 *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinden glikoz, tirozin varlığında ve yokluğunda tyrosol oluşumu (Sentheshanmuganathan ve Elsden 1957)

Sistem	Tyrosol oluşumu (µmol)
Glikoz ve tirozin varlığında	3.8
Tirozin yokluğunda	1.1
Glikoz yokluğunda	0.5
Glikoz ve tirozin yokluğunda	0.3

Maya-hücre duvarı arasında amino asitlerin naklinin, enerji gerektiren bir işlem olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Tirozinin tyrosole dönüşümünde glikoz gereklidir. Bu aktif taşıma işlemiyle bağlantılı olarak glikoz fermantasyonda gerekli olan enerjiyi sağlamaktadır. Membran boyunca aktif taşımayı inhibe eden sodyum azid ve 2,4-dinitrofenol (DNP) ün her ikisi de tyrosol oluşumunu tamamen inhibe ederler (Taylor 1947).

### 2.3.1 Beyaz şaraplarda tyrosol üzerine yapılan çalışmalar

Tyrosol, beyaz şaraplarda en çok bulunan ikinci fenolik bileşiktir (Singleton ve Trousdale 1983).

Beyaz İspanyol şaraplarında bulunan fenolik bileşikler üzerine yapılan bir araştırmanın sonuçları çizelge 2.7’de gösterilmiştir (Betés-Saura vd. 1996). Tyrosolün birinci sırada yer alan trans-kafterikasit ile arasında yalnızca 0.3 mg/L gibi bir fark bulunmaktadır.

Çizelge 2.7 Beyaz şaraplarda ve üzüm şirasında bulunan ortalama fenolik bileşiklerin miktarları ve referans aralıkları (Betés-Saura vd. 1996)

Fenolik Bileşikler	Ortalama (mg/L)		Referans aralığı (mg/L)	
	Üzüm şirası (n=18)	Şarap (n=31)	Üzüm şirası (n=18)	Şarap (n=31)
Gallik asit	1.09	0.95	0.66-1.53	0.87-1.04
Cis-kaftarik asit	1.00	0.65	0.90-1.09	0.59-0.71
Protokateşik asit	0.62	1.23	0.41-0.82	1.13-1.33
Trans-kaftarik asit	17.23	11.95	14.87-19.58	10.54-13.36
2-S-glutatyonilkaftarik	6.02	3.17	4.97-7.16	2.86-3.49
Cis-kutarik asit	10.05	7.71	9.22-10.87	7.16-8.26
Tyrosol	-	11.63	-	10.56-12.70
Trans-kutarik asit	11.08	8.57	9.75-12.04	7.95-9.18
Prosiyanidin-B3	2.41	1.16	1.90-2.91	0.92-1.41
(+) Kateşin	3.69	2.49	3.03-4.36	2.24-2.73
Cis-kaftarik asit	1.29	1.00	1.18-1.39	0.93-1.07
Trans-kaftarik asit	0.39	0.61	0.30-0.48	0.55-0.67
Sirinjik asit	0.51	0.43	0.40-0.61	0.37-0.49
Prosiyanidin-B2	1.31	1.39	1.01-1.61	0.82-1.96
Fertarik asit	0.31	0.15	0.21-0.39	0.13-0.17
(-)-Epikateşin	1.19	4.14	0.85-1.52	3.60-4.69
Trans-kumarik asit	0.25	0.15	0.19-0.30	0.09-0.21
Trans-ferulik asit	0.12	0.11	0.08-0.15	0.09-0.13
Kuersetin 3-glukuronit	0.50	0.25	0.35-0.64	0.20-0.31
Total polifenol	58.66	46.50 <sup>a</sup>		
Total hidroksisinamik asitler	46.76	34.07		
Total flavonoidler	7.91	9.43		
Total benzoik asitler	2.60	2.61		

(<sup>a</sup>: tyrosol değeri olmadan elde edilmiş veri)

2000 yılında yapılan bir çalışmada, köpüklü beyaz şaraplarda yıllandırma süresince maya tortusu ile muamele işleminin fenolik bileşiklerin değişimi üzerine etkileri ve renk değişimi üzerine çalışılmıştır. Üç yıllık yıllandırma süreci boyunca alınan örnekler on bir kez ikişer tekrarlı olarak alınmıştır. Polifenolik bileşiklerde meydana gelen

değişikler ise HPLC cihazıyla ölçülmüştür. Araştırma sonuçlarına göre; Macabeo şarabının tyrosol miktarı 12.9 mg/L, Xarel.lo'nunki 15.5 mg/L, Parellada'nın 19.13 mg/L ve Chardonnay'ninki ise 14.29 mg/L olarak belirlenmiştir (Ibern-Gómez vd. 2000).

Şampanyalarda yapılan bir araştırmada ise ortalama tyrosol içeriği 20.12 mg/L olarak belirlenmiştir (Vauzour vd. 2009). Bu sonuç göz önüne alındığında tyrosol beyaz şaraplarda bulunan ana polifenoldür.

### 2.3.2 Kırmızı şaraplarda tyrosol üzerine yapılan çalışmalar

Kırmızı şaraplarda stilben monomerinin ve tyrosolün belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada ise belirlenen tyrosol miktarı yaklaşık 23 ile 47 mg/L arasında değişmiştir. Belirlenen en yüksek tyrosol miktarı 47.85 mg/L ile Merlot (2006), Sangiovese 2007 hasadı ise 23.40 mg/L ile en düşük tyrosol miktarına sahip şaraptır (Çizelge 2.8) (Gris vd. 2011).

Çizelge 2.8 Şarap örneklerindeki stilben monomeri ve tyrosol içeriği (mg/L) (Gris vd. 2011)

	Trans-resveratrol	Cis-resveratrol	Trans-piceid	Cis-piceid	Toplam stilbenler	Tyrosol
Cabernet Franc 2006	3.72	1.70	10.53	5.26	21.20	41.33
Merlot 2006	5.54	0.70	14.39	6.93	27.56	47.85
Sangiovese 2006	3.22	1.25	9.38	4.14	17.99	36.57
Syrah 2006	7.44	6.88	10.30	13.29	37.90	46.74
Cabernet Franc 2007	3.80	2.04	12.23	7.95	26.02	35.41
Merlot 2007	7.36	3.71	23.17	18.58	52.81	44.13
Sangiovese 2007	2.10	1.23	5.73	3.69	12.47	23.40
Syrah 2007	4.60	2.52	9.53	6.50	23.15	26.42

Çizelge 2.9'dan da görüleceği üzere, İspanyol şarapları üzerinde yapılan diğer bir araştırmanın sonuçları da benzer tyrosol içeriği (20.38-44.46 mg/L) göstermiştir (Pineiro vd. 2011). Bu çalışmada, 44.46 mg/L tyrosol içeriği ile 2010 hasadı Merlot en yüksek tyrosol içeriğine sahiptir.

Çizelge 2.9 İspanyol şaraplarında belirlenen Hidroksityrosol ve tyrosol miktarları (mg/L) (n=3) (Pineiro vd. 2011)

Şaraplar	Hasat	Hidroksityrosol (mg/L)	Tyrosol (mg/L)
Tempranillo A	2009	1.84±1.56	22.76±1.00
Tempranillo B		1.46±1.03	20.51±0.74
Tempranillo C		0.82±0.71	21.06±1.69
Blasco		1.55±0.98	27.38±0.66
Cabernet Sauvignon A		3.63±0.77	31.95±0.57
Cabernet Sauvignon B		5.02±1.28	32.57±1.38
Petit Verdot A		4.12±0.63	38.50±0.25
Petit Verdot B		2.33±2.43	40.59±2.82
Syrah A	2010	1.11±2.43	34.11±2.66
Syrah B		0.82±0.71	40.98±0.74
Merlot		1.77±0.49	44.46±2.13
Tintilla de Rota A		2.66±0.17	28.91±0.09
Tintilla de RotaB		1.65±3.58	30.97±2.59
Melonera 1		0.45±1.47	35.31±1.18
Melonera B		0.53±1.64	36.86±0.16
Tempranillo A		-	43.21±3.11
Tempranillo B		-	43.13±0.21
Tempranillo C		-	44.26±0.61
Tempranillo D		1.78±0.25	30.60±0.58
Tempranillo E		3.87±1.34	25.03±0.62
Tempranillo F		4.65±0.56	29.93±0.27
<i>Vitis silvestris</i> A		3.09±0.90	40.20±0.30
<i>Vitis silvestris</i> B		0.28±0.49	23.71±1.78
<i>Vitis silvestris</i> C		0.62±2.92	32.12±3.11
<i>Vitis silvestris</i> D		0.77±1.49	20.38±1.91
Palomino negro		1.10±0.37	29.57±0.33
Rome A		1.67±0.39	35.57±0.46
Rome B		1.86±0.83	35.41±0.26
Garnacha A	1.02±0.80	30.15±0.47	
Garnacha B	1.28±0.83	26.73±0.63	

(-: tespit edilmemiş, ±: RSD (%) standart sapma)



Bugüne kadar yapılan araştırmalarda belirlenen en yüksek tyrosol oranı Macaristan ve Kanada şaraplarında bulunmuştur. Çizelge 2.10'dan da görüleceği üzere, tyrosol miktarları, 39.7 mg/L ile 73.1 mg/L arasında değişmiştir. Baco Noir 73.1 mg/L başlangıç tyrosol oranı ile en yüksek tyrosol içeriğine sahip kırmızı şarap olarak belirlenmiştir. Bu değer, maya tortusunda bekletme işlemi neticesinde Baco Noir eşidinde, 73.1mg/L'den 82.8 mg/L'ye kadar çıkmıştır. Maya tortusunda bekletme işlemi, Baco Noir eşidinde tyrosol miktarında artış sağlarken, Marchal Foch, Kadarka ve Lemberger eşitlerinde azalmaya sebep olmuştur (Pour Nikfardjam ve Pickering 2008).

Çizelge 2.10 Macaristan (M) ve Kanada (K) şaraplarında diğer fenolik bileşikler ile birlikte bulunan tyrosol miktarları (Pour Nikfardjam ve Pickering 2008)

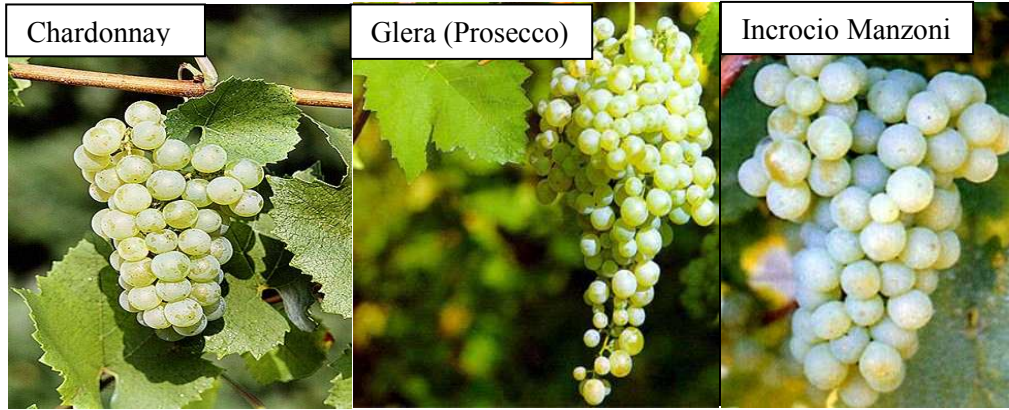
Çeşitler	Başlangıç tyrosol oranı (mg/L)	Maya tortusunda bekletme sonucu tyrosol oranı (mg/L)
Lemberger (M)	39.7	38.8
Kadarka (M)	50.4	41.0
Baco Noir (K)	73.1	82.8
Marchal Foch (K)	63.9	62.1

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Doğal köpüren şaraplarda ikinci fermantasyon ve şişede yıllandırma uygulaması

Araştırmada 2009 yılında İtalya'nın Conegliano bölgesinde hasat edilmiş; Chardonnay, Glera ve Incrocio Manzoni üzüm çeşitlerinden elde edilen baz şaraplar kullanılmıştır. Şampanyanın anavatanı olan Champagne Bölgesi'nin ana üzümlerinden olan Chardonnay, İtalya'nın Conegliano bölgesinde Valdobbiadene kasabasında geleneksel olarak en yaygın yetiştirilen üzüm çeşidi olan Glera, (Bu bölgede yetiştirilen Glera üzümünden elde edilen şaraplara Prosecco adı verilmektedir.) ve İtalya'nın en eski bağcılık ve şarapçılık okulu olan Conegliano Enoloji Okulu'nda Prof. Luigi Manzoni tarafından seleksiyon ile elde edilmiş ve bu yörede yetiştirilen bir üzüm çeşidi olan Incrocio Manzoni (Manzoni bianco) çeşidinden elde edilmiş ve ikinci fermantasyon uygulanmamış baz şaraplar kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Chardonnay, Glera ve Incrocio Manzoni çeşitlerine ait salkımlar

Her bir çeşit için 50 L ikinci fermantasyon uygulanmamış baz şaraplar temin edilmiştir. Üç çeşide ait şarapların her birinden ikişer tane olacak şekilde, 750 ml'lik 6 adet şarap şişelenmiştir. Şişede ikinci fermantasyon işlemini gerçekleştirmek üzere temin edilmiş yüksek alkol toleransı özelliğine sahip, *Saccharomyces cerevisiae bayanus* tipi olan Lallemend firmasına ait Lalvin DV10 maya suşu kullanılmıştır.

### 3.1.2 Yapay ve doğal üzüm sırasında fermantasyon ve tirozin ilavesi uygulamaları

Doğal üzüm sırasında bulunan besin maddesi içeriğine en yakın şekilde hazırlanan, yapay üzüm şırası ortamı kullanılmıştır. Yapay üzüm şırası ortamının besin maddesi içeriği ve aminoasit bileşimi çizelge 3.1 ve çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Yapay üzüm şırası ortamının besin maddesi içeriği

<b>Bileşikler</b>	<b>Miktarları</b>
Glikoz	200 g/L
Malik asit	6 g/L
Sitrik asit	6 g/L
Potasyum fosfat	0.75 g/L
Potasyum sülfat	0.50 g/L
Magnezyum sülfat	0.25 g/L
Kalsiyum klorür	0.155 g/L
Sodyum klorür	0.20 g/L
Amonyum klorür	0.46 g/L
Aminoasit solüsyonu	13.09 ml
Oligo element solüsyonu	1 ml
Vitamin solüsyonu	10 ml

Çizelge 3.2 Yapay üzüm şırası ortamının aminoasit bileşimi

Elementler	Miktarlar (g/L)
Tirozin	1.4
Triptofan	13.7
Izolösin	2.5
Aspartik Asit	3.4
Glutamik Asit	9.2
Arginin	28.6
Lösin	3.7
Treonin	5.8
Glisin	1.4
Glutamin	38.6
Alanin	11.1
Valin	3.4
Metiyonin	2.4
Fenilalanin	2.9
Serin	6.0
Histinidin	2.5
Lisin	1.3
Sistein	1.0
Prolin	46.8

Doğal üzüm şırası olarak ise Cerletti Lisesi (Conegliano) 2009 hasadından elde edilen ve -20°C’de muhafaza edilmiş Incrocio Manzoni (Manzoni bianco) çeşidine ait üzüm şırası kullanılmıştır. Yapay ve doğal üzüm şırası örneklerinin her ikisinde de fermantasyon işlemini gerçekleştirmek üzere; WL (Wallerstein Laboratuvarı Besi Ortamı-Agar şirketi OXOID) besi ortamı kullanılarak geliştirilen *Saccharomyces cerevisiae bayanus* tipi Lallemand Firmasına ait Lalvin EC1118 kuru maya suşu kullanılmıştır. Her iki denemeye de belirlenen düşük, orta ve yüksek (18, 36 ve 72 mg/L) miktarlarda tirozin aminoasidi eklenmiştir.

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Denemelerin kurulması

#### 3.2.1.1 Doğal köpüren şaraplarda ikinci fermantasyon ve şişede yllandırma uygulaması

Şampanya tipi doğal köpüren şarap üretim yöntemi ile üretilen; Chardonnay, Glera ve Incrocio Manzoni üzüm çeşitlerinden elde edilmiş ve ikinci fermantasyon uygulanmamış baz şarapların her birinden ikişer tane olacak şekilde, 750 ml lik 6 adet şarap şişelenmiştir. Örneklere ikinci fermantasyonu gerçekleştirmek üzere; 10g/L sakkaroz, 0.4 mg/L tiamin, 0.1 g/L amonyum fosfat, 0.5 mg/L bakır sülfat ve 10g/hL (köpüklü şaraplarda ikinci fermantasyonda kullanıma uygun) DV10 (*Saccharomyces cerevisiae bayanus*) mayası eklenerek 18°C’de fermantasyon başlatılmış ve şişede yllandırmaya (dinlendirmeye) bırakılmıştır. İlk ay şişeler yatay konumda muhafaza edilmiştir ve fermantasyon tamamlandıktan sonra dikey konuma getirilmiş ve 18. ayın sonuna kadar bu konumda muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2). Analizler için her bir şarap örneğinden 18 aylık yllandırma periyodu süresince 1., 3., 6.,12. ve 18. ayların sonunda örnekler alınmıştır. 6 şişenin her biri örneklerin alınması sırasında, daha homojen örnekler elde etmek için çalkalanmıştır. Örnekler 2.5 ml olarak alınarak, 0.2 µm de filtre edilmiş, tyrosol içerikleri belirlenmek üzere, liyofilize edilerek (freeze-drying, dondurarak kurutma) saklanmıştır.



Şekil 3.2 Şişede yllandırma

### 3.2.1.2 Yapay ve doğal üzüm sırasında fermantasyon ve tirozin ilavesi deneyleri

#### 3.2.1.2.1 Maya hazırlanması

Öncelikle besin maddesi içeren WL (Wallerstein Laboratuvarı Besi Ortamı OXOID) besi ortamı hazırlanmıştır. Toz 75 g/L suda süspansiyon haline getirilerek, 121°C'de 15 dakika boyunca otoklava konulmuştur. Sterilizasyondan sonra 20 ml hacimli petrilere konularak soğumaya bırakılmıştır. EC 1118 kuru mayasının su alıp şişmesini (rehidratasyonunu) sağlamak üzere 37°C suda 20 dakika süresince süspansiyon edilmiştir ve petride tek tek ayrılmış düzgün koloniler elde etmek için seyreltilerek kültür ortamına aşılanmıştır (Şekil 3.3). Mayalar Petride 25°C'de 48-72 saat süresince geliştirilmiştir. Petriden tek tek oluşan ayrılmış koloniler alınarak, mayaların çoğalmalarını sağlamak üzere 30 ml'lik 10 g/hL maya ekstresi, 20 g/L pepton, 20 g/L glikoz içeren kültür ortamına aşılanmıştır.



Şekil 3.3 Steril kabinde maya hazırlanması

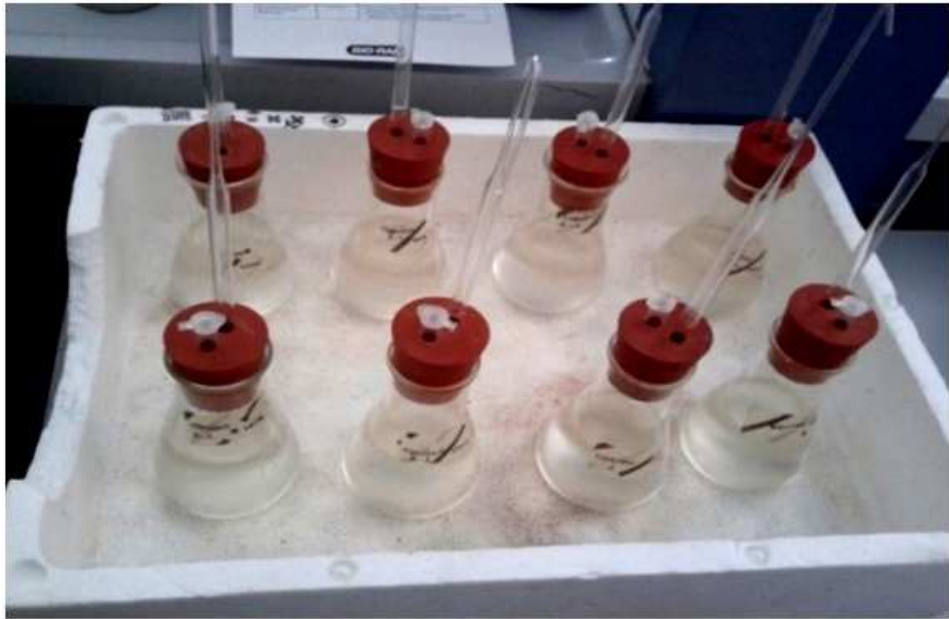
### 3.2.1.2.2 Yapay ve doğal üzüm şirasında fermantasyon

Yapay üzüm şirası deneyi için, üzüm şirasında bulunan besin maddesi ve aminoasit içeriğine en yakın şekilde hazırlanan ve bileşimi sırayla çizelge 3.1 ve çizelge 3.2’de gösterilen yapay üzüm şirası ortamı hazırlanmıştır.

Doğal üzüm şirası deneyi için ise,  $-20^{\circ}\text{C}$ ’de muhafaza edilmiş Incrocio Manzoni çeşidine ait doğal üzüm şirası  $0.2\ \mu\text{m}$  de filtre edilmiştir.

Hazırlanan yapay üzüm şirası ortamından ve Incrocio Manzoni çeşidine ait doğal üzüm şirasından 100’er ml alınarak erlene konulmuştur. Üzerlerine  $25^{\circ}\text{C}$ ’de geliştirilen EC1118 maya solüsyonu ilave edilmiştir.

Yapay ve doğal üzüm şirası örneklerinden bir kısmı üç farklı dozda tirozin eklenerek hazırlanmıştır. Stok solüsyonu  $0.1\ \text{N HCl}$  içerisinde  $20\ \text{mg/ml}$  tirozin çözülmesiyle elde edilmiştir. Eklenecek tirozin konsantrasyonu  $18, 36$  ve  $72\ \text{mg/L}$  olarak belirlenmiş yapay ve doğal üzüm şirası örneklerine ilave edilmiştir. Tirozin ilavesi olan bütün örnekler ikişer tekrarlı olarak altı adet hazırlanmış, diğerleri ise kontrol olarak belirlenerek tirozin eklenmemiştir (Şekil 3.4ve Şekil 3.5).



Şekil 3.4 Yapay üzüm şirası örnekleri



Şekil 3.5 Doğal üzüm şırası örnekleri

Örnekler en uygun kontrollü koşullarda maya gelişimini sağlamak üzere 25°C’de inkübatöre konulmuştur (Şekil 3.6). Fermantasyon sırasındaki şekerin dönüşümüyle meydana gelen karbondioksitin buharlaşmayla kaybı sonucu oluşan ağırlık azalması her gün iki kere ölçülerek kaydedilmiş ve kontrolleri düzenli olarak gerçekleştirilmiştir.

Ağırlık azalması sona erdiğinde, örnekler inkübatörden alınarak vakum filtre kullanılarak filtre edilmiştir. İlk olarak GF/A cam mikrofiber filtre (Filter-Lab) ikinci olarak ise 0.2 µm’lik selüloz asetat filtre kullanılmıştır. Filtre edilen örneklerden 2.5 ml alınarak HPLC analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.





Şekil 3.6 İnkübatöre konulan yapay üzüm şirasında fermantasyon deneyi örnekleri

### 3.2.2 Analiz yöntemleri

Doğal köpüren şaraplarda ikinci fermantasyon ve şişede yıllandırma uygulaması ile yapay ve doğal üzüm şirasında fermantasyon ve tirozin ilavesi deneylerinin her ikisinde de örneklerin tyrosol içeriğini belirlemek için valide edilmiş HPLC metodu kullanılmıştır. Her iki uygulamada da elde edilen verilerin birbirleri arasında fark yaratıp yaratmadığının istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Excel'in XLSTAT programı kullanılarak, ANOVA (varyans analiz) testi ile analiz edilmiştir.

### 3.2.2.1 HPLC ile tyrosol analizi

Analiz, ikili bir pompa (Waters 1525), bir otomatik örnekleyici (Waters 2707), bir UV detektörü (Waters 2487 Dual Band) ekipmanları ile donatılmış bir yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Sonuçların kontrolü için Breeze 2 yazılım programı kullanılmıştır. Analiz, çizelge 3.3'te belirtilen gradyanlar kullanılarak, bir C18 kolonu (Lichrospher 4x250mm, 5µm, Agilent Technologies) üzerinde gerçekleştirilmiştir.

HPLC'de tyrosol pikini en net şekilde belirlemek için pek çok yöntem uygulanmıştır. Çizelge 3.3'te gradyanları verilen metot, tyrosolün kısa sürede diğer bileşiklerden en iyi şekilde ayrıldığı yöntem olarak belirlenmiştir. Doğal köpüren şaraplarda ikinci fermantasyon ve şişede yıllandırma uygulaması ile yapay ve doğal üzüm sırasında fermantasyon ve tirozin ilavesi deneylerine ait örneklerin hepsinin tyrosol miktarı bu metot kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.3 HPLC cihazında kullanılan gradyanlar

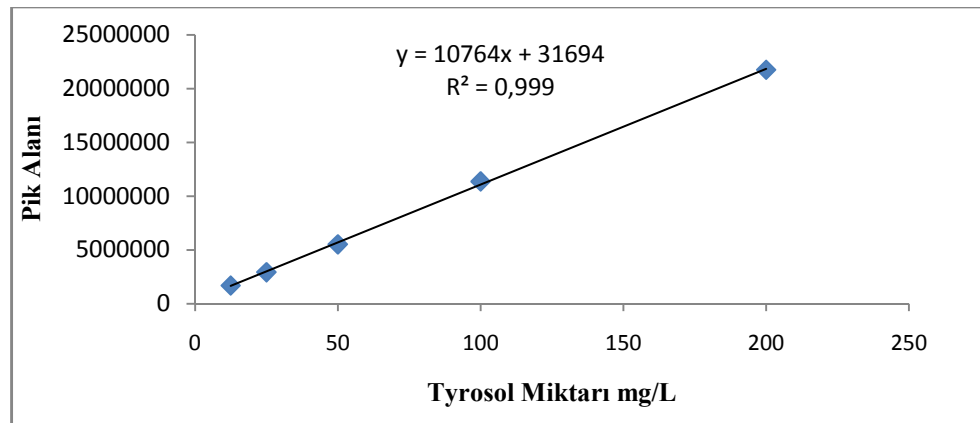
Zaman (dk)	% 0.5 Formik asit (Buffer A)	% 2 Formik asit + Metanol (Buffer B)
0	80	20
5	78	22
6	78	22
8	76	24
10	76	24
11	0	100
14	0	100
15	80	20
21	80	20
0	80	20

HPLC’de enjeksiyon hacmi 100 µL, akış oranı 0.6 ml/dk’dır. Tyrosol 40° C’ de 280 nm UV’de belirlenmiştir. Pik alanları Breeze 2 yazılım programı kullanılarak belirlenmiştir ve değerler 12.5-200 mg/L tyrosol miktarının HPLC’ye enjekte edilmesi ile belirlenen kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır. Çizelge 3.4 HPLC’ye enjekte edilen tyrosol miktarlarını ve Breeze 2 yazılım programında hesaplanan pik alanlarını vermektedir.

Çizelge 3.4 Tyrosol miktarları ve pik alanları

Tyrosol miktarı mg/L	Pik alanı
12.5	1704539
25	2940320
50	5530140
100	11374660
200	21747300

Şekil 3.7’de HPLC’ye enjekte edilen tyrosol miktarının meydana getirdiği, Breeze Software programında hesaplanan pik alanları neticesinde oluşturulan kalibrasyon eğrisini göstermektedir. Artan tyrosol konsantrasyonu ile birlikte tyrosol pik alanı da doğru olarak arttığından metodun validasyonu bu şekilde hesaplanmıştır.



Şekil 3.7 Hesaplanan kalibrasyon eğrisi

### 3.2.2.2 HPLC kantitatif analitik yönteminin geliştirilmesi

Beyaz şaraplardaki ortalama tyrosol içeriği göz önüne alınarak 2.5 kez konsantre edilerek liyofilize edilen örnekler, bu oran temel alınarak seyreltilmiştir. Liyofilizasyon (dondurarak kurutma) işlemi sırasında bazı bileşikler özellikle küçük moleküller süblimleşme yolu ile yok olabileceği için tyrosolün geri kazanımı bu metot uygulanarak hesaplanmıştır. HPLC cihazında geri kazanımın hesaplanması için, standart tyrosol, %12 etanol, 5 g/L tartarik asitten oluşan ve pH'ı 3.2 olan bir yapay şarap solüsyonuna ilave edilerek, HPLC ye enjekte edilmiştir. Üç farklı tyrosol konsantrasyonu (10, 20, 30 mg/L) test edilmiştir ve her deney iki kez tekrarlanmıştır.

Hesaplanan geri kazanımın değerini % 100'e yakın olması kullanılan dozun yeterliliğini ve doğruluğunu göstermektedir. Cihaza enjekte edilen, 20 mg/L ile 30 mg/L arasındaki değerler, geri kazanım için yeterli ve gerekli miktar olarak seçilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Tyrosolün HPLC cihazında geri kazanımının hesaplanması

	Belirlenen konsantrasyon	Hesaplanan konsantrasyon	% Geri kazanım	Ortalama
10 mg/L A	25	23.10	92.42	88.00
10 mg/L B	25	20.90	83.58	
20 mg/L A	50	48.56	97.12	95.24
20 mg/L B	50	46.68	93.37	
30 mg/L A	75	78.11	104.15	102.69
30 mg/L B	75	75.93	101.24	

### 3.2.2.3 İstatistiki analiz

Doğal köpüren şaraplarda ikinci fermantasyon ve şişede yıllandırma uygulaması ile yapay ve doğal üzüm sırasında fermantasyon ve tirozin ilavesi deneylerinin her ikisinde de, örneklerin birbirleri arasında bir farklılık yaratıp yaratmadığını test etmek için Excel'in XLSTAT programı kullanılarak, ANOVA (varyans analiz) testi ile analiz edilmiştir. Denemelerde hesaplanan her bir p değerinin 0.005'ten küçük veya eşit olması analiz sonucu belirlenen değer anlamlı olduğunu göstermektedir

Doğal köpüren şaraplarda ikinci fermantasyon ve şişede yıllandırma uygulamasında üç üzüm çeşidine ait Chardonnay, Prosecco ve Incrocio Manzoni şaraplarından elde edilen her bir örneğin 18 aylık dönem boyunca 1., 3., 6., 12. ve 18. aylarda HPLC cihazı ile hesaplanan tyrosol miktarları arasında bir değişiklik olup olmadığını saptamak için ANOVA (varyans analiz) testi uygulanmıştır.

Yapay ve doğal üzüm sırasında fermantasyon ve tirozin ilavesi deneylerinde ise eklenen edilen 18, 36 ve 72 mg/L tirozinin fermantasyon sonunda tyrosol oluşumunu arttırıp arttırmadığını istatistiksel olarak değerlendirmek için yine Excel'in XLSTAT programı kullanılarak, ANOVA (varyans analiz) testi ile analiz edilmiştir. Bu yöntem için yapay üzüm şırası örnekleri kendi içerisinde ve doğal üzüm şırası örnekleri kendi içerisinde olmak üzere; istatistiksel olarak incelenmiş ve artan tirozin ilavesinin, tyrosol oluşumu üzerinde istatistiksel anlamda değişiklik meydana getirip getirmediğine bakılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

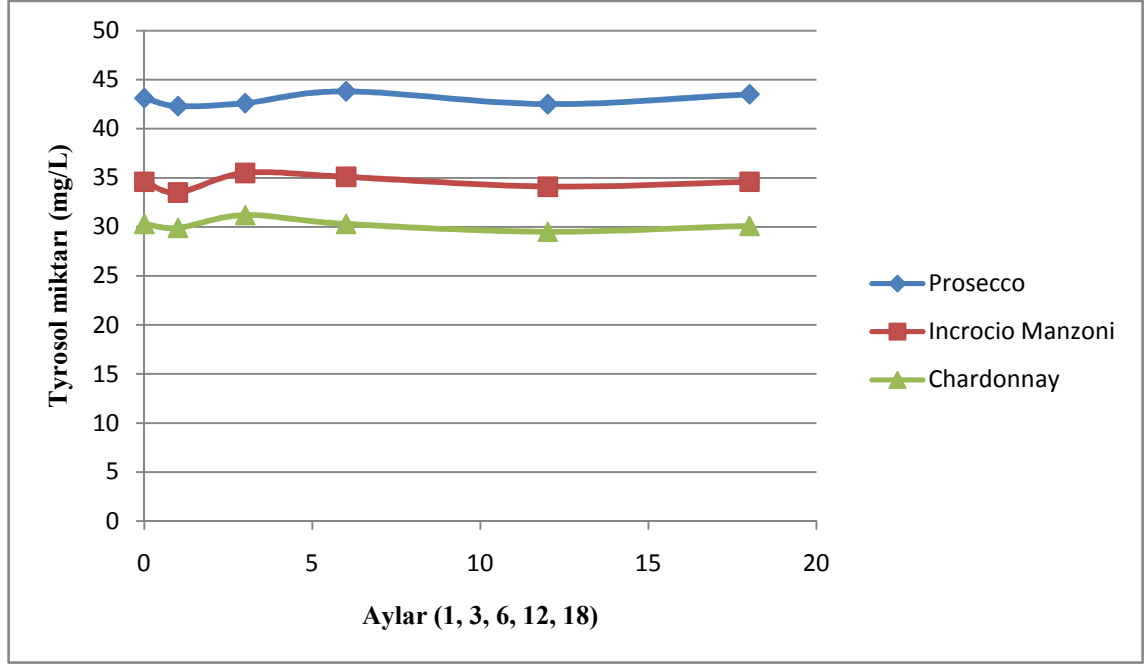
### 4.2 Doğal Köpüren Şaraplarda İkinci Fermantasyon ve Şişede Yıllandırma Uygulaması

Üç farklı çeşitten elde edilmiş baz şaraplar (Chardonnay, Prosecco ve Incrocio Manzoni) üzerinde yapılan bu çalışmada, örnekler hazırlanıp ikinci fermantasyona tabi tutularak 18 ay boyunca şaraphane koşulları altında yıllandırılmış (dinlendirilen) ve 1, 3, 6, 12, 18. aylarda örnekler alınarak dondurulmuştur. İkinci fermantasyon uygulanmamış başlangıç aşamasındaki baz şaraplardan alınan örnekler incelendiğinde, üç farklı çeşidin de farklı miktarlarda tyrosol içerisine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Baz şarap örneklerinde ikinci fermantasyon ve şişede yıllandırma süresince değişen tyrosol miktarları (mg/L)

Baz şarap çeşitleri	Başlangıç tyrosol miktarı (mg/L)	1. ay sonunda tyrosol miktarı (mg/L)	3. ay sonunda tyrosol miktarı (mg/L)	6. ay sonunda tyrosol miktarı (mg/L)	12. ay sonunda tyrosol miktarı (mg/L)	18. ay sonunda tyrosol miktarı (mg/L)
Prosecco	43.1	42.3	42.6	43.8	43.2	44.1
Incrocio Manzoni	34.6	33.5	35.5	35.1	34.1	34.6
Chardonnay	30.3	29.9	31.2	30.3	29.5	30.1

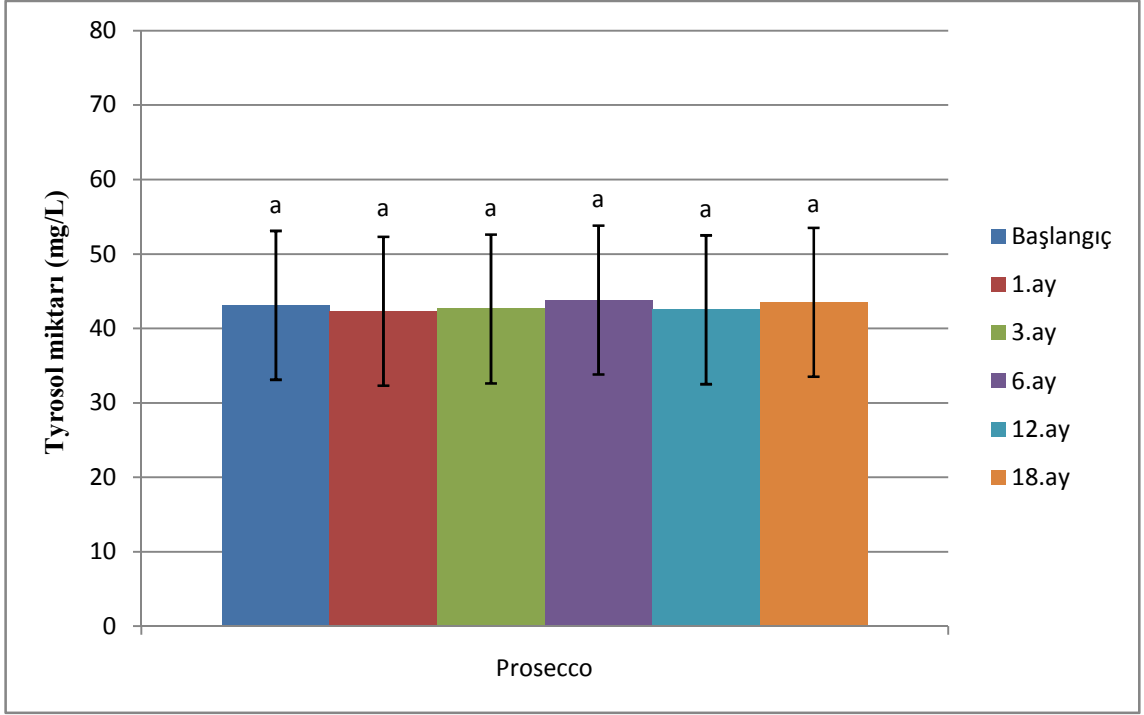
Üç şarap örneği arasında en yüksek tyrosol miktarı 43.1 mg/L ile Prosecco şarabında saptanmıştır. Bunu 34.6 mg/L ile Incrocio Manzoni ve 30.3 mg/L ile Chardonnay takip etmektedir. Sonuçlar incelendiğinde 18 aylık dönem boyunca şarapların tyrosol miktarında az da olsa bazı dalgalanmalar görülmüştür. Yalnızca Prosecco şarabında küçük bir artış ile tyrosol miktarı; 43.1 mg/L'den 44.1 mg/L'ye çıkmıştır. Fakat ikinci fermantasyonun başladığı birinci ay da dahil olmak üzere yıllandırma süreci tyrosol miktarı üzerinde dikkate değer düzeyde bir artışa sebep olmamıştır. Tyrosol miktarında bir değişme olmadığı halde, her üç şarap çeşidinde de birinci ayda küçük bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.1).



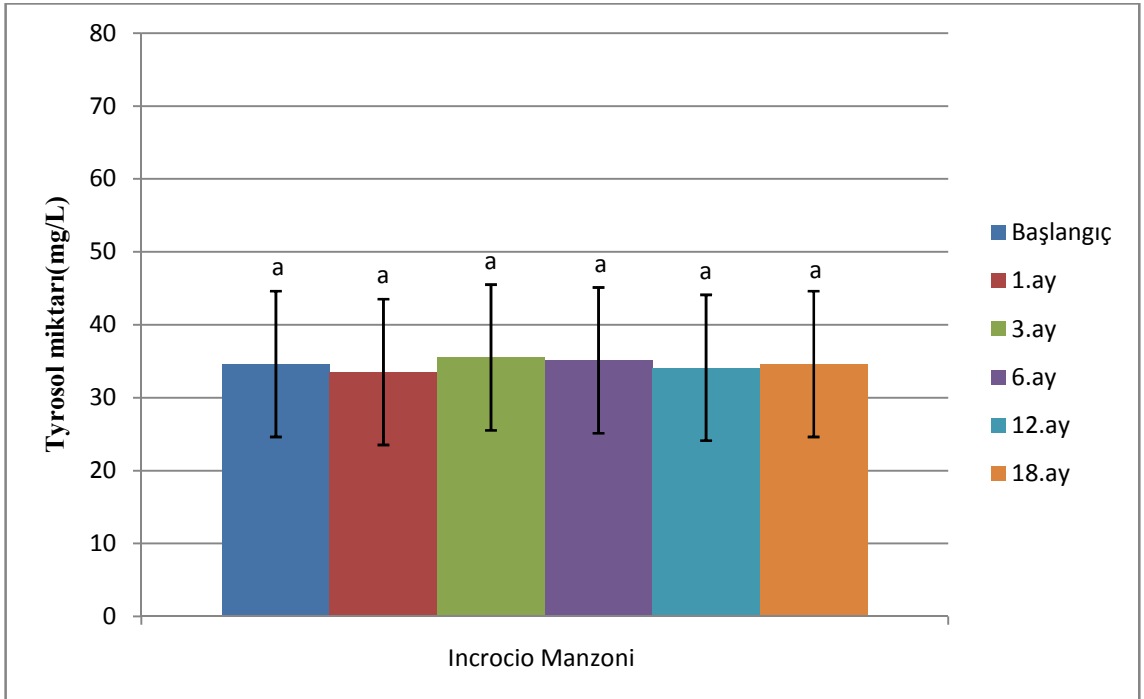
Şekil 4.1 Üç çeşit şarabın ikinci fermantasyon ve yıllandırma süresi boyunca tyrosol miktarının aylara göre değişimi

Üç şarabın başlangıç ve 18. ayın sonunda hesaplanan tyrosol miktarları karşılaştırılacak olursa, ikinci fermantasyon ve yıllandırma işleminin tyrosol miktarı üzerinde büyük bir değişiklik meydana getirmediği gözlenmiştir. Bu durum maya tortusuyla temas halinde yapılan yıllandırma işleminin, mayaların faaliyeti sırasında ortaya çıkan tirozin salınımının takibinde dahi herhangi bir ilave tyrosol üretimi sağlamadığını göstermiştir.

Üç şarap örneğinin de 18 aylık süreç boyunca HPLC ile ölçülen tyrosol miktarlarında değişiklik olup olmadığını belirlemek üzere XLSTAT Excel programı kullanılarak istatistiksel olarak ANOVA (varyans analizi) testi ile analiz edildiğinde, değerler arasında herhangi bir farklılık belirlenmemiştir. Her üç çeşit şarap örneğine ait istatistiksel bulgular incelendiğinde, (Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) 'a' harfi ile işaretlenmiş değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı verileri göstermektedir ve örnekler arasında belirgin farklılıklar bulunmamaktadır.

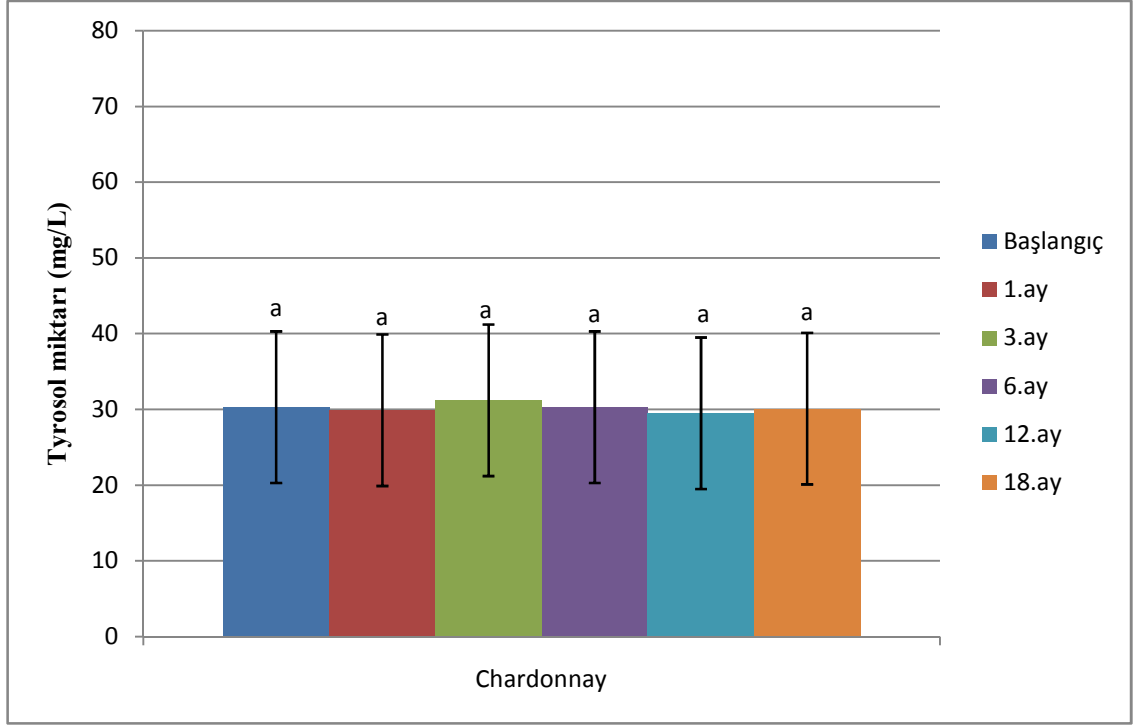


Şekil 4.2 Prosecco şarabının 18 aylık dönemde HPLC cihazıyla belirlenen tyrosol miktarları ( $p < 0.05$ )



Şekil 4.3 Incrocio Manzoni şarabının 18 aylık dönemde HPLC cihazıyla belirlenen tyrosol miktarları ( $p < 0.05$ )





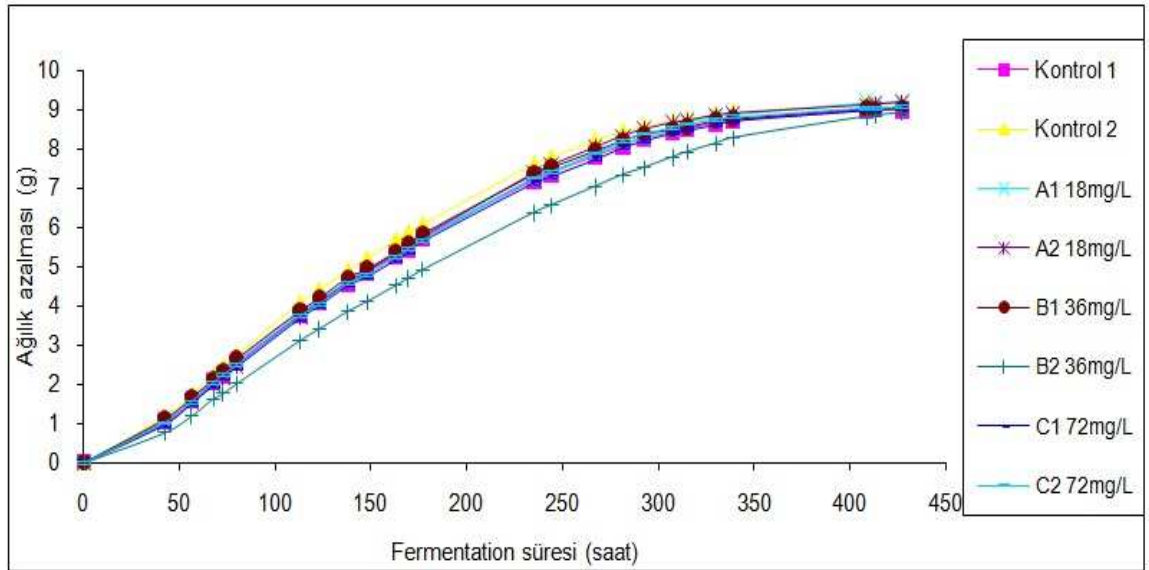
Şekil 4.4 Chardonnay şarabının 18 aylık dönemde HPLC cihazıyla belirlenen tyrosol miktarları ( $p<0.05$ )

Bu değerler göz önüne alındığında; 18 ay süren, doğal köpüren şaraplarda ikinci fermantasyon ve şişede yıllandırma (dinlendirme) uygulamasının, Chardonnay, Prosecco ve Incrocio Manzoni şaraplarında tyrosol miktarı açısından, dikkate değer bir değişiklik meydana getirmediği saptanmıştır.

### 4.3 Yapay Üzüm Şirasında Fermantasyon ve Tirozin İlavesi Uygulamaları

Araştırmanın bu kısmında, mayalar tarafından tyrosol üretimi üzerine çalışılmıştır. Bu çalışmada mayalar, optimum koşullar altında 25°C'de alkol fermantasyonuna tabi tutulmuştur, fermantasyon yaklaşık olarak iki haftada tamamlanmıştır.

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, örnekler arasında dikkate değer bir değişiklik gözlenmemiştir. Her bir maya örneğinin gelişimi birbirine paralel eğriler göstermiştir. Yalnız içlerinden sadece B2 örneğinde diğerlerine oranla, yavaş bir gelişim eğrisi görülmektedir. Fakat B2 (36 mg/L tirozin ilavesi) örneğinin hazırlanan diğer eşi olan B1 örneğine bakıldığında, diğer örneklerle aynı oranda gelişim gösterdiği saptanarak sağlanması bu şekilde yapılmıştır.



Şekil 4.5 Fermantasyon süresince mayalardaki ağırlık azalmasının zamana göre değişimi

18, 36 ve 72 mg/L tirozin eklenen örnekler kendi içlerinde ve ayrıca tirozin eklenmemiş kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında fermantasyon boyunca her örneğin birbirine çok yakın fermantasyon eğrileri göstermesi neticesinde, tirozin eklenmesinin fermantasyon oranında herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı görülmektedir.

Şekil 4.5'te görüldüğü üzere, fermantasyonun ilk 200-250 saati boyunca maya aktivitesi gittikçe yükselen bir eğri göstermiştir. 250'nci saatin sonrasında ise eğri, belli bir seviyeye ulaştıktan sonra 350 ila 400'ncü saatin sonlarına doğru sabitlenmektedir. Bu durum fermantasyonun bittiğine işaret etmektedir.

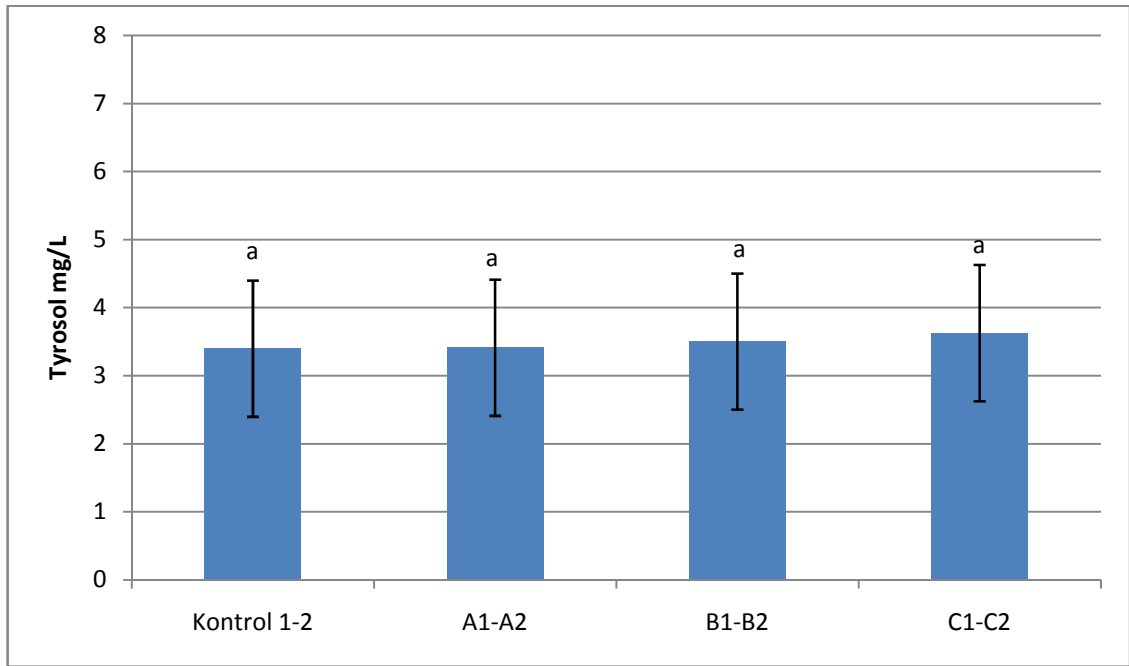
Fermantasyon süreci tamamlanan yapay üzüm sırasında fermantasyon örneklerinin filtre edildikten sonra HPLC cihazı ile ölçülen tyrosol miktarları, ortalamaları ve yüzde artışları çizelge 4.2'de gösterilmektedir. İkışer tekrarlı olarak hazırlanan örneklerin ortalama tyrosol miktarları sırasıyla; hiç tirozin eklenmemiş olan Kontrol örneklerinde 3.39 mg/L, 18 mg/L tirozin eklenen örneklerde 3.41 mg/L, 36 mg/L tirozin eklenen örneklerde 3.50 mg/L ve 72 mg/L tirozin eklenen örneklerde 3.63 mg/L olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2 Yapay üzüm sırasında HPLC cihazı ile hesaplanan gerçek ve ortalama tyrosol ve yüzde artış miktarları

	Tyrosol konsantrasyonu (mg/L)	Ortalama	Tyrosol Artışı (%)
Kontrol 1	3.433	3.396	
Kontrol 2	3.359		
A1-18 mg/L	3.456	3.410	0.41
A2-18 mg/L	3.364		
B1-36 mg/L	3.470	3.502	3.13
B2-36 mg/L	3.535		
C1-72 mg/L	3.573	3.626	6.75
C2-72 mg/L	3.678		

Yapay üzüm sırası deneyinde, eklenen 18, 36 ve 72 mg/L tirozin miktarları, tyrosol oluşumunda az da olsa bir artış göstermiştir fakat bu artış dikkate değer düzeyde değildir.

Yapay üzüm şırası deneyi örneklerinin HPLC cihazıyla belirlenen ortalama tyrosol değerleri olan; 3.40, 3.41, 3.50 ve 3.63 mg/L XLSTAT programı kullanılarak istatistiksel olarak ANOVA (varyans analizi) testi ile analiz edildiğinde, değerler arasında herhangi bir farklılık belirlenmemiştir. Şekil 4.3'te bu ortalama tyrosol değerleri sırasıyla; Kontrol 1-2, A1-A2, B1-B2 ve C1-C2 ile gösterilmiştir. Şekil 4.6'dan da görüleceği üzere 'a' harfi ile işaretlenmiş değerler arasında belirgin farklılıklar bulunmamaktadır.

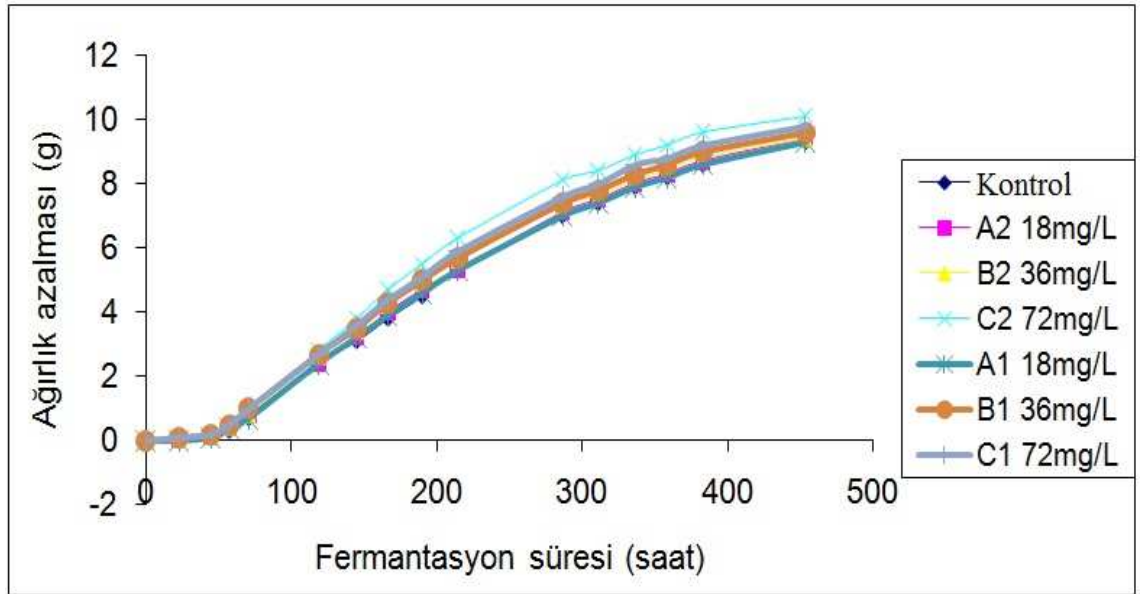


Şekil 4.6 Yapay üzüm şırası deneyi örneklerinin HPLC cihazıyla belirlenen ortalama tyrosol değerleri ( $p < 0.05$ ). A: 18mg/L A1 ve A2, B: 36mg/L B1 ve B2, C: 72mg/L C1 ve C2 örneklerinin hesaplanan tyrosol değeri ortalamalarını göstermektedir. a: istatistiki olarak yakın değerleri ifade etmektedir.

#### 4.4 Doğal Üzüm Şirasında Fermantasyon ve Tirozin İlavesi Uygulamaları

Yapay üzüm şirası deneyi ile aynı koşullarda çalışılan bu denemede fermantasyon doğal üzüm şirasında başlatılmıştır. Şekil 4.6 doğal üzüm şirası örneklerinin fermantasyon süresi boyunca değişimini göstermektedir. Bütün örnekler birbirine yakın gelişim göstermiştir yalnız 72 mg/L tirozin eklenen C1 ve C2 örneklerini diğerlerine kıyasla biraz daha yüksek bir gelişim eğrisi göstermiştir. Tirozin eklenmesi maya gelişim oranında bir artış sağlamıştır.

Doğal üzüm şirasında mayalar fermantasyon sürecini yapay üzüm şirasına oranla daha uzun sürede tamamlamışlardır. Yapay üzüm şirası deneyinde mayalar fermantasyonu 400 saatte tamamlarken, doğal üzüm şirası deneyinde bu süreç yaklaşık olarak 500 saate kadar devam etmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Doğal üzüm şirasında fermantasyon süresince mayalarda görülen ağırlık azalması

Fermentasyon süreci tamamlanan doğal üzüm sırasında fermentasyon örneklerinin filtre edildikten sonra HPLC cihazı ile ölçülen tyrosol miktarları, ortalamaları ve yüzde artışları çizelge 4.3'te gösterilmektedir.

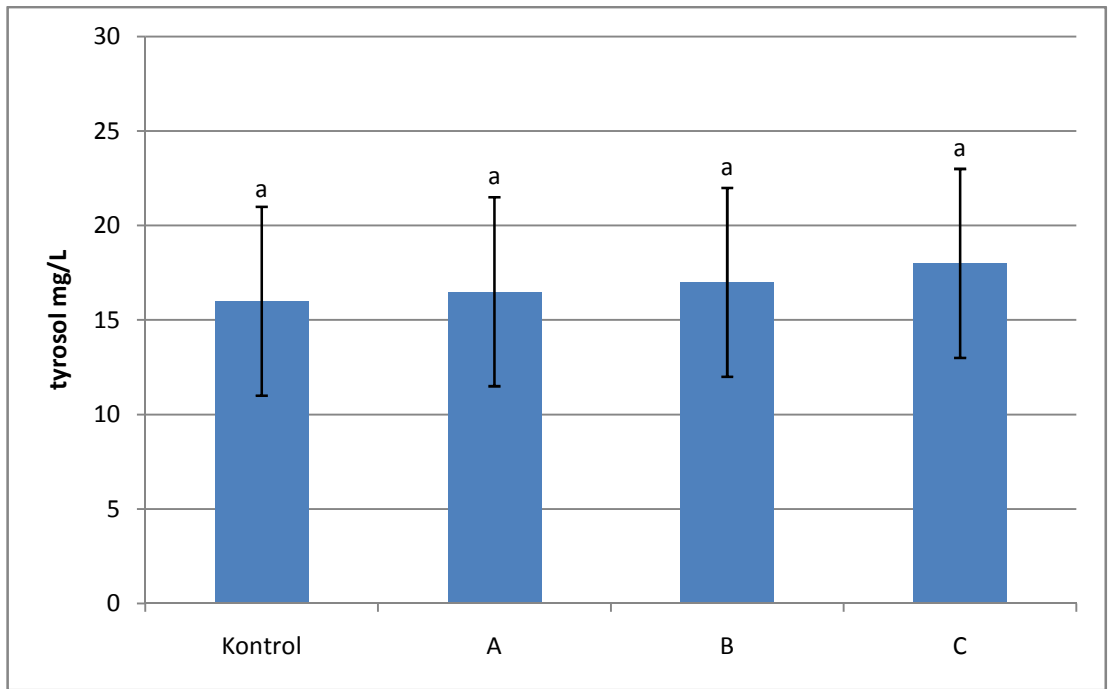
İkişer tekrarlı olarak hazırlanan örneklerin ortalama tyrosol miktarları sırasıyla; hiç tirozin eklenmemiş olan Kontrol örneğinde 16.01 mg/L, 18 mg/L tirozin eklenen örneklerde 16.52 mg/L, 36 mg/L tirozin eklenen örneklerde 17.38 mg/L ve 72 mg/L tirozin eklenen örneklerde 18 mg/L olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3 Doğal üzüm sırasında HPLC cihazıyla belirlenen gerçek ve ortalama tyrosol miktarları ve yüzde artışları

	Gerçek konsantrasyon (mg/L)	Ortalama tyrosol miktarı (mg/L)	Tyrosol artışı (%)
EC1118 Kontrol	16.007	16.007	
EC1118 18mg/L A1	16.530	16.515	3.17
EC1118 18mg/L A2	16.501		
EC1118 36mg/L B1	16.999	17.383	8.60
EC1118 36mg/L B2	17.767		
EC1118 72mg/L C1	17.425	17.98	12.32
EC1118 72mg/L C2	18.535		

Yüzde tyrosol artışlarına bakılacak olursa, 18 mg/L tirozin ilavesi % 3.17'lik, 36 mg/L tirozin ilavesi % 8.6'lık ve 72 mg/L tirozin ilavesi ise % 12.32'lik bir artış sağlamıştır. Yapay üzüm sırası deneyinde 72 mg/L tirozin ilavesi neticesinde elde edilen % 6.75 artışla kıyaslandığında, doğal üzüm sırasında tirozin ilavesinin daha yüksek miktarda tyrosol oluşumuna sebep olduğu görülmektedir.

Doğal üzüm şırası deneyi örneklerinin HPLC cihazıyla belirlenen ortalama tyrosol değerleri olan; 16.01, 16.52, 17.38, 18 mg/L XLSTAT programı kullanılarak istatistiksel olarak ANOVA (varyans analizi) testi ile analiz edildiğinde, değerler arasında herhangi bir farklılık belirlenmemiştir. Şekil 4.6’da hesaplanan bu ortalama tyrosol miktarları sırasıyla; Kontrol, A, B ve C ile gösterilmiştir. Şekil 4.8’den de görüldüğü üzere ‘a’ harfi ile işaretlenmiş değerler arasında belirgin farklılıklar bulunmamaktadır.



Şekil 4.8 Doğal üzüm şırası deneyi örneklerinin HPLC cihazıyla belirlenen ortalama tyrosol değerleri ( $p < 0.05$ ). A: 18mg/L A1 ve A2, B: 36mg/L B1 ve B2, C: 72mg/L C1 ve C2 örneklerinin hesaplanan tyrosol değeri ortalamalarını göstermektedir. a: istatistiki olarak yakın değerleri ifade etmektedir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1 Doğal Köpüren Şaraplarda İkinci Fermantasyon ve Şişede Yıllandırma uygulaması

Fenolik bileşikler son derece reaktif ve çeşitli reaksiyonlara karşı duyarlı olduğundan, bazı araştırmacılar yapmış oldukları çalışmalarda, tyrosol içeriğinin şarabın yıllandırılması esnasında değişebileceğini belirtmişlerdir (Gris vd. 2010). Buna ek olarak son yıllarda yapılan araştırmalar göstermiştir ki; şarabı maya tortusunda bekletmek tyrosol içeriğinde artışlar meydana getirmiştir. Araştırmacıların öne sürdüğüne göre; mayaların faaliyetleri esnasında tirozin de dâhil olmak üzere, azot ihtiva eden bileşiklerin artışı, tyrosolde de bir artış meydana getirmektedir. Bahsi geçen araştırmada, tortu ile muamele işlemi yalnızca üç ay süreli ve haftada iki kez örnekleri çevirmek suretiyle uygulanmıştır (Lesko vd. 2011).

Üç farklı çeşitten elde edilen şaraplar üzerinde yapılan bu çalışmada, örnekler hazırlanıp 18 ay boyunca şaraphane koşulları altında depolanmıştır ve 1, 3, 6, 12, 18. aylarda örnekler alınarak dondurulmuştur. İlk ay şişeler yatay konumda muhafaza edilmiştir ve fermantasyon tamamlandıktan sonra dikey konuma getirilmiş ve 18. ayın sonuna kadar bu konumda muhafaza edilmiştir.

İkinci fermantasyon uygulanmamış başlangıç aşamasındaki bazı şaraplardan alınan örnekler incelendiğinde, üç farklı çeşidin de farklı miktarlarda tyrosol içerisine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). En yüksek tyrosol miktarı 43.1 mg/L ile Prosecco şarabında saptanmıştır. Bu veriler tyrosol miktarının büyük miktarda çeşide bağlı olduğu görüşünü doğrulamaktadır. Aslında şaraptaki fenolik bileşiklerin bileşimi ve miktarı; şarap üretimi için kullanılan üzüm çeşidine, iklim koşullarına, şarapçılıkta kullanılan prosedürlere ve şarapların yıllandırılması sırasında ortaya çıkan kimyasal reaksiyonlara bağlı olduğu belirtilmiştir (Macheix vd. 1990, Pena vd. 1998).

Tyrosol aktif fermantasyon sırasında mayalar tarafından sentezlendiği bildirilmiştir. (Sentheshanmuganathan ve Elsdén 1957). Sonuçlar incelendiğinde, ikinci



fermantasyonun yer aldığı birinci ay da dahil olmak üzere yıllandırma süreci tyrosol miktarı üzerinde dikkate değer düzeyde bir artışa sebep olmamıştır. Yalnızca Prosecco şarabında 18 ayın sonunda yaklaşık 1mg/L'lik bir artış olmuştur ama istatistiki analiz neticesinde bunun da dikkate değer seviyede olmadığı saptanmıştır. Tyrosol miktarında bir değişme olmadığı halde, her üç şarap çeşidinde de birinci ayda küçük bir azalma meydana gelmiştir. Bu durum bu çalışmada ekstra bir tirozin eklemesinin olmadığından ve ikinci fermentasyon için gerekli azotun sadece amonyum nitrat olarak temin edilmesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Buna ek olarak, tyrosol miktarının 18 aylık yıllandırma periyodu boyunca artmadığı gibi herhangi bir azalma da göstermeyip sabit kaldığı göz önüne alındığında, tyrosolün bir hayli dayanıklı bir bileşik olduğu görülmektedir.

2000 yılında yapılan, köpüklü şaraplarda maya tortusuyla temas halinde yıllandırılmasının, fenolik bileşikler ve renklenme üzerinde meydana getirdiği değişikliklerin incelendiği bir çalışmada da, örnekler 11 kez tekrarlı şekilde hazırlanmış ve yıllandırma işlemi üç yıl sürdürülmüştür. Yıllandırma süresince fenolik bileşiklerde meydana gelen değişiklikler HPLC cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Üç yıl süren yıllandırma süreci boyunca bütün köpüklü şaraplarda ve *Cuvée* lerde flavanoid grubunun % 32.27 oranında azaldığını, azalmanın % 38.32 ile en yüksek oranda Parellada köpüklü şarabında ve Macabeo, Xarel.lo ve Parellada'dan yapılmış *Cuvéelerde* (% 48.98) olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ortalama tyrosol miktarı da hesaplanmış ve sırasıyla Macabeo, Xarel.lo, Parellada ve Chardonnay çeşitlerinde 12.9 mg/L, 15.5 mg/L, 19.13 mg/L, ve 14.29 mg/L olarak bulunmuştur. Bununla birlikte bizim çalışmamıza paralel olarak, yıllandırma süresi boyunca tyrosol miktarının değişmediği tespit edilmiştir (Ibern-Gómez vd. 2000).

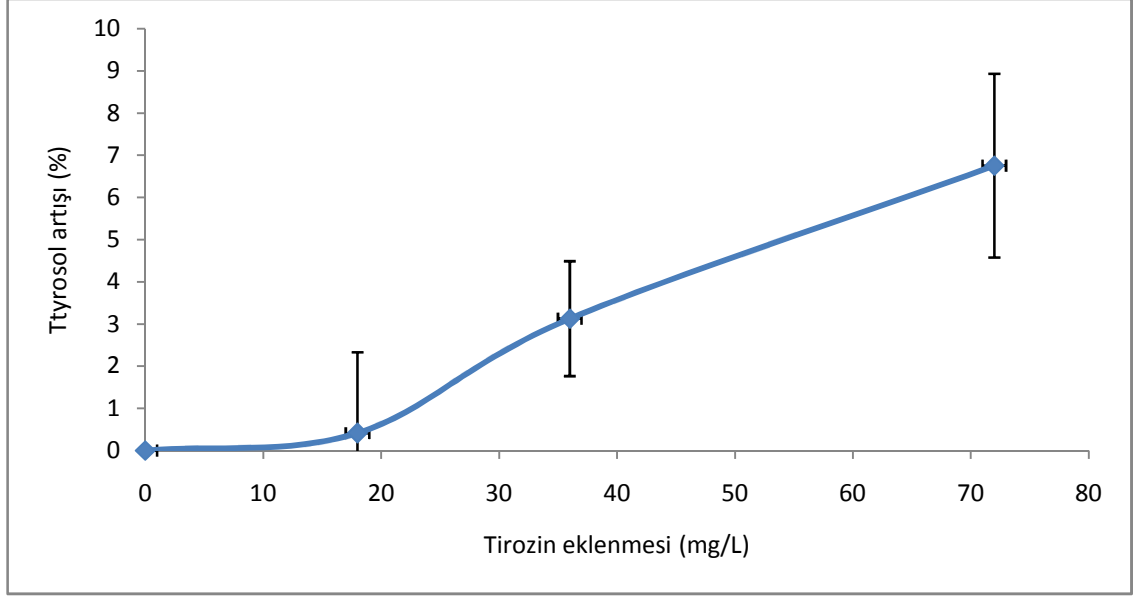
Doğal köpüren şaraplarda ikinci fermentasyon ve şişede yıllandırma uygulaması ile bu araştırmanın sonuçları kıyaslandığında, her ikisinde de tyrosol miktarının değişmediği sonucuna varılmıştır.

## 5.2 Yapay ve Doğal Üzüm Şırasında Fermantasyon ve Tirozin İlavesi Uygulaması

Bugüne dek yapılan çalışmalar göstermiştir ki; tyrosol alkol fermantasyonu sırasında oksidatif dekarboksilasyonla tirozinden oluşmaktadır (Ribereau-Gayon vd. 2000). Bu da tyrosol üretimi için en önemli noktanın fermantasyon periyodu olduğunu göstermektedir (Sentheshanmuganathan ve Elsdén 1957). Fermantasyon süreci tamamlanan yapay üzüm şırası örneklerinin filtre edildikten sonra HPLC cihazı ile ölçülen tyrosol miktarları incelendiğinde, tirozin eklenmemiş örneklerdeki hesaplanan tyrosol miktarı, gerçek şaraplarda bulunan tyrosol miktarı ile karşılaştırıldığında oldukça düşük çıktığı görülmektedir (Çizelge 4.2).

Mayalar tarafından asimile edilebilir azot miktarı, yapay üzüm şırası ortamı için 300 mg/L kullanılmıştır. Bu miktar, maya hücrelerinin uygun gelişimi için gerekli minimum miktarın bile bir hayli üzerindedir. Azot kaynağı olarak aminoasitler gibi mayalar tarafından kolayca asimile edilebilir formlar kullanılmıştır. Çizelge 2.3'te belirtilen farklı üzüm çeşitlerinin aminoasit içerikleri göz önüne alınarak, tirozin miktarı (18 mg/L) doğal üzüm şırasında bulunması mümkün olan içeriğe göre hesaplanmıştır (Millery 1988).

Yapay üzüm şırası deneyinde, eklenen 18, 36 ve 72 mg/L tirozin miktarları, tyrosol oluşumunda az da olsa bir artış göstermiştir fakat bu artış dikkate değer düzeyde değildir. Ayrıca yapay üzüm şırası deneyi örneklerinin HPLC cihazıyla belirlenen ortalama tyrosol değerleri olan; 3.40, 3.41, 3.50 ve 3.63 mg/L XLSTAT programı kullanılarak istatistiksel olarak ANOVA (varyans analizi) testi ile analiz edildiğinde, değerler arasında herhangi bir farklılık belirlenmemiştir. Tirozin eklenmesi tyrosol üretimini bir miktar arttırmıştır. Fakat bu artışlar 18, 36 ve 72mg/L dozlarında tirozin eklenmesine karşılık gelen; % 0.4, % 3.1 ve % 6.8 oranında artışlar dikkate değer olarak alınmamaktadır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1 Yapay üzüm sırasında eklenen tirozin oranıyla birlikte artan tyrosol miktarı

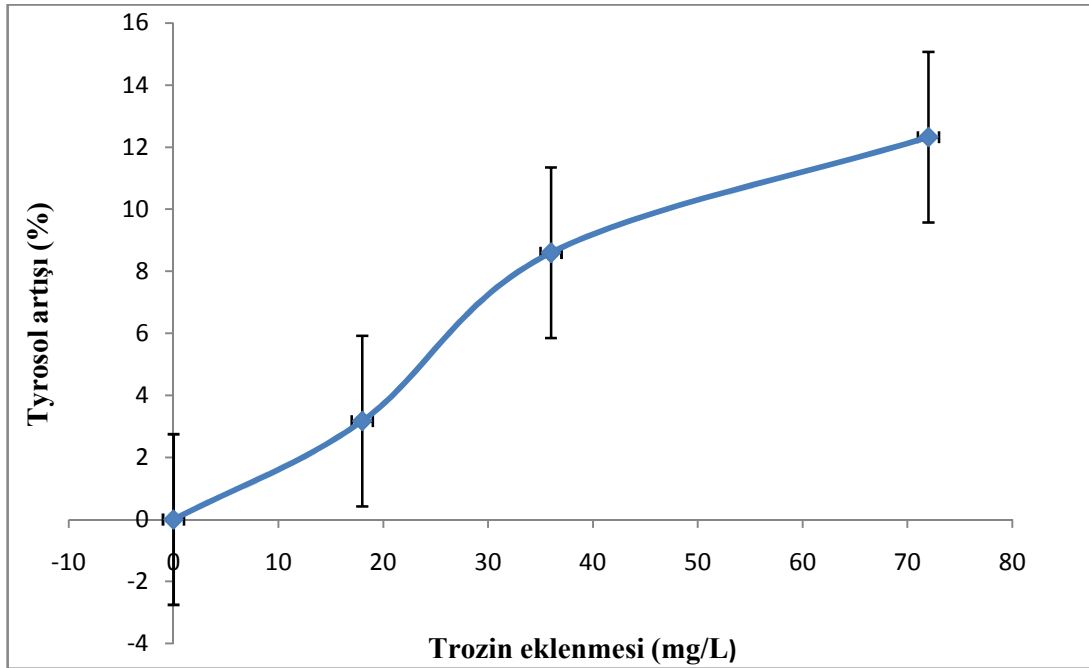
Dolayısıyla bu düşük tyrosol üretim miktarı düşük substrat nedenine bağlı olmadığı sonucuna varılmıştır. Çünkü yapay üzüm şirası ortamında, maya hücrelerinin uygun gelişimi için yeterli azot ve besin maddesi içeriği gerekli ve yeterli düzeyde hazırlanmıştır (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2). Dolayısıyla mayaların tyrosol dönüşümü mekanizmasında etkili olan diğer faktörlerin de bulunduğu sonucuna varılmıştır. Yapay üzüm şirasında mevcut olmayan polifenoller, asitler gibi bileşikler, şeker azot dengesi ve fermantasyon sıcaklığı bu diğer faktörlere örnek olarak gösterilebilir.

Tirozin eklenmesinin tyrosol üretimi üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılması için gerçek şarap üretim sürecine daha yakın koşullarda çalışılarak, fermantasyonun doğal üzüm şirasında başlatıldığı örnekler incelendiğinde, tirozin ilavesinin maya gelişim oranında bir artış sağladığı sonucuna varılmıştır. Özellikle aminoasit içeriğinin artırılması ağırlık azalmasını artırmıştır. Doğal üzüm şirası ile yapay üzüm şirasının sonuçları karşılaştırıldığında, doğal üzüm şirasında mayalar fermantasyon sürecini yapay üzüm şirasına oranla daha uzun sürede tamamlamışlardır. Yapay üzüm şirası deneyinde mayalar fermantasyonu 400 saatte tamamlarken, doğal üzüm şirası deneyinde bu süreç yaklaşık olarak 500 saate kadar devam etmiştir.

Bu durumda doğal üzüm sırasında bulunan azot içeriğinin, yapay üzüm sırasında mevcut olmadığı ve eklenen azot miktarının maya gelişimini dikkate değer bir şekilde arttırdığı söylenebilir.

HPLC sonuçlarına göre doğal üzüm sırası deneyinde hesaplanan tyrosol miktarları, 16 mg/L ile 18 mg/L arasında değişmiştir. Bu değerler şaraplarda bulunan gerçek tyrosol miktarlarıyla uyum içerisindedir (Ibern-Gómez vd. 2000).

Doğal üzüm sırasında tyrosol üretimini etkileyen faktörler aynı zamanda, tirozin eklenmesinin etkilerinin ortaya çıkışını da arttırmıştır. Çünkü eklenen tirozin miktarı aynı olmasına rağmen yapay üzüm sırasında tyrosol üretimini dikkate alınacak düzeyde arttırmamıştır. Doğal üzüm sırasında ise tirozin eklenmesi Şekil 5.2’de de görüldüğü üzere tyrosol üretiminde artış göstermiştir.



Şekil 5.2 Doğal üzüm sırasında farklı dozlarda (18, 36, 72 mg/L) tirozin eklenmesiyle ortaya çıkan tyrosol üretimindeki % artış

Doğal üzüm şırası deneyi sonucunda 72 mg/L olan en yüksek dozda tirozin eklenmesi tyrosol üretiminde %12.32'lik bir artış sağlamıştır (Çizelge 4.3). Bu değer, yapay üzüm şırası deneyindeki 72 mg/L tirozin eklenmesi neticesinde elde edilen % 6.75'lik artış ile kıyaslandığında bir hayli yüksek bir değerdir (Çizelge 4.2).

Bu sonuçlar göstermektedir ki, mayalar tarafından tyrosol üretimini teşvik eden ve yapay üzüm şırasında bulunmayan polifenoller, bazı aminoasitler gibi bileşikler, doğal üzüm şırasında mevcuttur ve yeterli oranda tyrosol üretimini sağlamakta etkili olmuşlardır.

HPLC sonuçları değerlendirildiğinde, doğal üzüm şırası kullanıldığında oluşan maksimum tyrosol üretimi, yapay üzüm şırasına oranla altı kat daha fazladır. Her iki çalışmada da tyrosol üretimi artışını karşılaştıracak olursak, 72 mg/L tirozin eklenmesi, yapay üzüm şırası deneyinde 0.2 mg/L, doğal üzüm şırasında ise 2.5 mg/L artış sağlamıştır.

Bu güne kadar yapılan araştırmalar dikkate alındığında, tyrosol sentezi; şıranın bileşiminde bulunan maddeler, şeker azot dengesi ve fermantasyon sıcaklığı gibi birçok faktöre bağlıdır. Bu çalışmada, tyrosolün mayalar tarafından sentezinin tam olarak anlaşılması için farklı alanlarda da araştırmalara (örn. Polifenoller) gerek olduğu sonucuna varılmıştır.

Artık günümüzde değeri iyice anlaşılan fenolik bileşiklerin, sağlığa olan yararları dikkate alındığında bununla ilgili olarak, şarap tüketiminde fenolik bileşik içeriği de önem kazanmaktadır. Bu deneyin sonuçlarında elde edilen bilgiler, şarapta doğal yolla tyrosol üretimini arttırmaya yönelik çalışmalara ışık tutması açısından önem arz etmektedir.

## KAYNAKLAR

- Akin, E. B., Karabulut ve I., Topcu, A. 2008. Some compositional properties of main Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Food Chem*,107 s. 939–48.
- Ayrapaa, T. 1971. Biosynthetic formation of higher alcohols by yeasts. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium. *Journal of the Institute of Brewing*. Vol. 77 pp. 266–275
- Bartlett, H. E. and Eperjesi, F. 2008. Nutritional supplementation for type 2 diabetes: a systematic review. *Ophthal Physiol Opt*. Vol. 28 pp.503–23
- Betés-Saura, C., Andrés-Lacueva, C. and Lamuela-Raventos, R. M. 1996. Phenolics in Wine Free Run Juice and Wines from Penedés by High-Performance Liquid Chromatography: Changes during Vinification, American Chemical Society
- Castillo-Sanchez, J. X., Garcia-Falcon, M. S., Garrido J, Martinez-Carballo, E., Martins-Dias, L. R. And Mejuto, X. C. 2008. Phenolic compounds and colour stability of vinho wines: influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry*. Vol. 106(1) pp. 18-26.
- Cemeli, E., Baumgartner, A. and Anderson, D. 2009. Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res*. Vol. 681 pp. 51–67.
- Chimi, H., Cillard, P. and Rahmani M. 1991. *J Am Oil Chem*. Vol. 68 pp. 307-312
- Cornelli, U. 2009. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol*. Vol. 27 pp.175–94
- Covas, M. I., Gambert, P. and Fitó, M. 2010 Wine and oxidative stress: Up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in human. *Atherosclerosis*. Vol. 208 pp. 297–304.
- Davidson, G. P. and Decker, T. R. 2009. Chemopreventive Role of Fruits and Vegetables in Oropharyngeal Cancer. *Nutr Clin Pract*. Vol.24 pp. 250–60.
- Dequin, S., Salmon, J. M., Nguyen, H. V. and Blondin, B. 2003. Wine yeasts. In: *Yeasts in food, beneficial and detrimental aspects* (Boekhout, T., Robert, V., Eds.) pp.389–412 B. Berhr's Verlag GmbH and Co, Hamburg, Germany
- De Rijke, Y. B., Demacker, P. N. M., Assen, N. A, Sloots, L. M, Katan, M. B. and Stalenhoef A. F. H. 1996. *J Sci Food Agric*, Vol. 70 pp.55-61
- Di Benedetto, R., Varia, R., Scazzocchio, B., Filesi, C., Santangelo, C., Giovannini, C., Matarrese, P., D'archivio, M. and Masella, R. 2007 Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*. Vol. 17 pp. 535–545.

- Dubourdieu, D., Llauberes, R. M. and Ollivier, C. 1986 Conn. Vigne Vin, Vol. 20 (2) pp. 119
- Dudley, J. I., Lekli, I., Mukherjee, S., Das, M., Bertelli, A. A. And Das, D. K. 2008. Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: Resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. J. Agric. Food Chem. Vol. 56 pp. 9362–9373.
- Fleet, G. H. and Heard, G. M. 1993. Yeast-growth during fermentation. In: Wine microbiology and biotechnology (Fleet, G.H., Ed.). pp. 27–54 Harwood Academic Publishers, Singapore.
- Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E. and Kisella, J. E. 1993. Lancet. Vol. 341 pp. 454-457. Doi, 10.1016/0140-6736(93)90206-V
- Garde-Cerdan, T. and Ancin-Azpilicueta, C. 2007. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. Swiss Society of Food Science and Technology., LWT Vol. 41 pp. 501–510
- Goldberg, D. M., Karumanchiri, A. Ng. E., Yan, J. and Diamandis, E. P. 1995. Soleas, G. J. Direct gas chromatographic-mass spectrometric method to assay cis-resveratrol in wines: Preliminary survey of its concentration in commercial wines. J. Agric. Food Chem. Vol. 43 pp. 1245–1250.
- Gris, E. F., Mattivi, F., Ferreira, E. A., Vrhovsek, U., Filho, D. W., Pedrosa, C. R. and Bordignon-Luiz, M. T. 2011. Stilbenes and Tyrosol Compounds in the Assessment of Antioxidant and Hypolipidemic Activity of *Vitis vinifera* L. Red Wines from Southern Brazil, J. Agric. Food Chem. Vol. 59 pp.7954-796
- Hassimotto, N. M. A., Pinto, M. D. S. and Lajolo, F. M. 2008. Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. J Agric Food Chem. Vol. 56 pp.11727–33.
- Hazelwood, L. A., Daran, J-M. V., Maris, A. J. A, Pronk, J. T. and Dickinson, J. R. 2008. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism, Applied And Environment Microbiology. pp. 2259-2266
- Henschke, P. A. and Jiranek, V. 1992. In Wine Microbiology and Biotechnology (Ed. G.H. Fleet). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. pp. 77–169.
- Ibern-Gómez, M., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., Singleton, V. L. and Torre-Boronat, M. C. 2000. Browning of Cava (Sparkling Wine) During Aging in Contact with Lees Due to the Phenolic Composition, Am J Enol Vitic. Vol. 51, No. 1

- Kapoor, V. K., Dureja and Chadha, R. 2009. Herbals in the control of ageing. *Drug Discov Today*. Vol. 14(19–20) pp. 992–8.
- Kavas, A., 2000. Sağlıklı Yaşam İçin Doğru Beslenme. Literatür Yayınları No: 37. Literatür Yayıncılık Dağıtım, Pazarlama, Sanayi ve Tic. A.Ş. İstiklal Cad. No: 133.Kat 1-2.TR- 800071, Beyoğlu, İstanbul.
- Kusano, C. and Ferrari, B. 2008. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Haliç University J Cell Mol Biol*, 7, (1) 1-15.
- Lamuela-Raventos, R. M., Romero-Perez, A. I., Waterhouse A. L. and De La Torre-Boronat, M. C. 1995. Direct HPLC analysis of cis and transresveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera L.* wines. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43 pp. 281–283
- Lee, C. Y and Jaworski A. W. 1997. *Am J Enol Vitic.* Vol. 48 pp. 277-280
- Lesko, A., Kallay, M., Nyul-Pühra, B. and Nyitrai-Sardy, D. 2011. The Change of Polyphenolic Composition and Tyrosol content of The Wine as an effect of Sur Lie Method, *Acta Alimentaria*. Vol. 40 pp. 79-90
- Macheix, J. J., Fleuriet, A. and Billot, J. 1990. Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton. pp. 323–332
- Mc Donald, M. S., Hughes, M., Burns, J., Lean, M. E. J., Matthews, D. and Crozier, A. 1998. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46 pp. 368-375
- Millery, A. 1988. Caractérisation des cépages champenois a partir de leurs acides aminés libres. Thèse Doctorat Université Reims.
- Moure, A., Cruz, J. M. and Franco, J. D. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* Vol. 172 pp. 145–71.
- Mukherjee, S., Lekli, I. Gurusamy, N. and Bertelli, A. A. 2009. D. K. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Free Radical Biol. Med.* Vol. 46 pp. 573–578.
- Nave, F., Cabrita, M. J. and Teixeira da Costa, C. 2007. Use of solid-supported liquid-liquid extraction in the analysis of polyphenols in wine. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1169 pp. 23-30.
- Noble, A. C. and Robichaud, J. L. 1990. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53 pp. 343-353. Doi10.1002/jsfa.2740530307



- Pellegrini, N., Miglio, C. and Del Rio, D. 2009. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Int J Food Sci Nutr*. Vol. 60 Suppl 2: pp. 12–22.
- Pena, A., Hernández, T., Estrella, I. and Suarez, J. 1998. Polyphenols in food. COST 916. European Community, Luxemburg. pp. 221–225
- Pena-Neira, A., Hernandez, T., Garcia-Vallejo, C., Estrella, I. and Suarez, J.A. 2000. A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *Eur Food Res Technol*. Vol. 210 pp. 445-448
- Pineiro, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M. and Puertas, B. 2011. Direct Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Quantification of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Red Wines, *J. Agric. Food Chem*.
- Pour Nikfardjam, M. S. and Pickering, G. J. 2008. Influence of variety and commercial yeast preparation on red wine made from autochthonous Hungarian and Canadian grapes. Part I: Phenolic composition, *Eur Food Res Technol*. Vol. 227 pp.1077-1083
- Pretorius, I. S., and Bauer, F. F. 2002. Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol*. Vol. 20 pp. 426-432.
- Queiroz, A. N., Gomes, B. A. Q, Moraes, W. M. and Jr. Borges, R. S. A. 2009. Theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. *Eur. J. Med. Chem*. Vol. 44 pp. 1644–1649.
- Renaud, S. and De Lorgeril, M. 1992. Wine, alcohol, platelets and French paradox for coronary heart disease. *Lancet* Vol. 229 pp. 1523–1526.
- Ribeiro, de Lima, M. T, Waffo-Tguo, P., Teissedre, P. L, Pujolas, A., Vercauteren J, Cabanis, J. C. and Mrillon J. M. 1999. Determination of stilbenes (trans-astringin, cis-and trans-piceid, and cis- and transresveratrol) in Portuguese wines. *J. Agric. Food Chem*. Vol. 47 pp. 2666–2670.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. 2000. Handbook of oenology. John Wiley and Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, p. 404 Ricardo da Silva, J. M., Darmon, N., Fernandez, Y., Mitjavila, S. 1991. *J. Agric. Food Chem*. Vol. 39 pp.1549-1552
- Sentheshanmuganathan, S. and Elsdon, S. R. 1957. The Mechanism of the Formation of Tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*. A.R.C. Unit of Microbiology, Department of Microbiology, The University, Sheffield
- Singleton, V. L. and Trousdale, E. 1983. White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC, *Am. J. Enol. Vitic*. Vol. 34 pp. 27-83
- Söylemezoğlu, G. 2003. Üzümdeki fenolik bileşikler. *Gıda*. Vol. 28(3) pp. 277-285.

- Stahl, W., Berg, H. and Arthur, J. 2002. Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med.* Vol. 23 pp. 39–100.
- Taylor, E. S. 1947. *J. gen. Microbiol.* pp. 86.
- Vauzour, D., Houseman, E. J., George, T. W., Corona, G, Garnotel, R., Jackson, K. G., Sellier, C., Gillery, P., Kennedy, O. B., Lovegrove, J. A. and Spencer, J. P. E. 2009. Moderate Champagne consumption promotes an acute improvement in acute endothelial-independent vascular function in healthy human volunteers, *British Journal of Nutrition.* Vol. 103 pp. 1168-1178
- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlind, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J. C., Mrillon, J. M. and Teissedre, P. L. 2005. Determination of stilbenes ( $\delta$ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin) in Brazilian wines. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53 pp. 5664–5669.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Duygu Solakoğlu

Doğum Yeri: Altındağ/Ankara

Doğum Tarihi: 07.09.1987

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: İngilizce, İtalyanca

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Anittepe Lisesi (2004)

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı  
(2010)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Entitüsü (Eylül 2010-Şubat 2013)