

Şaraptaki Laktik Asit Bakterilerinin Malolaktik Fermantasyondaki Önemleri¹

Semiramis Geredeli², Ertan Anlı³

Giriş

Hasat sırasında üzümlerde, maya, asetik asit bakterileri ve küflerin yanı sıra laktik asit bakterileri de bulunur. Şarabın fermantasyonunda ise yalnızca mayalar ve laktik asit bakterileri rol alır. Şarap fermantasyonu temel olarak iki ana aşamadan oluşur: Mayaların gerçekleştirdiği alkol fermantasyonu ve laktik asit bakterilerinin gerçekleştirdiği malolaktik fermantasyon. Şarap üretimi önemli aşamalardan geçen özel bir gıda prosesidir (Şekil 1) .

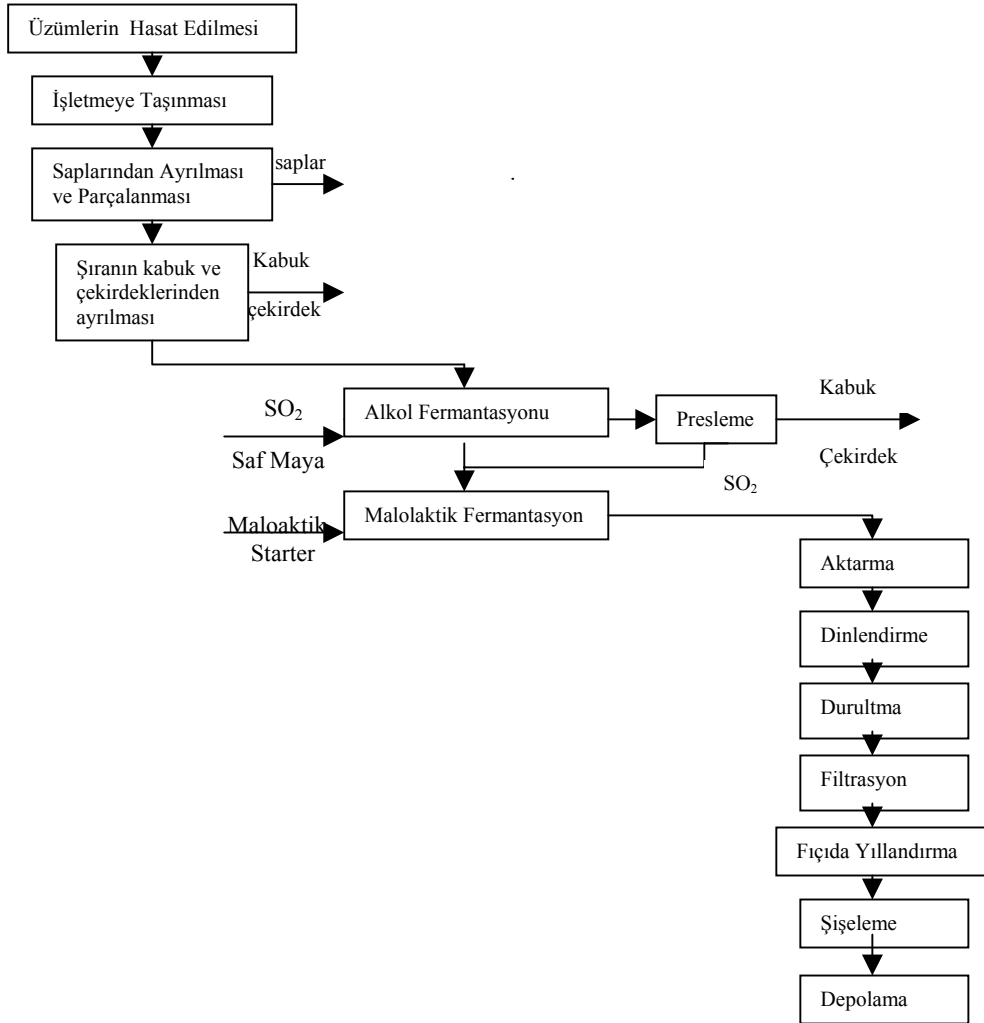
Şarap işlenirken parçalanmış üzümler fermantasyon tankına alınır alınmaz kükürtlendir. Ortamın düşük redoks potansiyeli ve kükürt dioksitin etkisiyle asetik asit bakterileri çok düşük oranlarda varlıklarını sürdürebilirken, küfler ortamdan tamamen elenir ve toplam bakteri popülasyonu azalır. Kükürt dioksite, bakterilerden daha az hassas olan maya, çok yüksek şeker konsantrasyonuna (>210 g/L) ve düşük pH değerine (3.0-3.3) sahip üzüm sırasında hızla gelişmeye başlar. Böylelikle alkol fermantasyonu başlamış olur. Alkol fermantasyonu süresince ortam bakterilerin gelişmesi için uygun değildir ve indirgen şekerlerin tümü etil alkole fermente olduğunda maya artık gelişemez. Ancak bu aşamadan sonra laktik asit bakterileri gelişmeye başlar. İdeal koşullarda malolaktik fermantasyon alkol fermantasyonundan sonra 1-2 gün içerisinde başlar (1). Malik asidin tamamı laktik aside dönüştürüldüğünde, şaraba kükürt eklenerek laktik asit bakterileri etkisiz hale getirilir ve tortu ayırma işlemi gerçekleştirilir. Kükürt dioksit, şarap yapımında şarabın mikrobiyel dengesini sağlamak için günümüzde kullanılan en etkili ve tek yasal maddedir.

Şaraplarda malolaktik fermantasyonun gerçekleşme oranına dair herhangi bir resmi veri olmamakla birlikte kabaca kırmızı şarapların %75'inin, beyaz şarapların ise %40'ının malolaktik fermantasyona uğradığı söylenmektedir (2). Malolaktik fermantasyon aslında terim olarak doğru değildir. Çünkü malolaktik fermantasyon sırasında gerçekleşen malik asidin laktik aside dönüşümü fermentatif bir yol olmayıp, dekarboksilasyondur. Bu isim yalnızca alkol fermantasyonuna benzetmek için verilmiştir. Çünkü her iki aşamada da gaz (CO₂) çıkışı meydana gelir.

¹ Doç. Dr. Ertan Anlı Danışmanlığında Semiramis Geredeli tarafından hazırlanan Yüksek Lisans Tezi Semineridir.

² Gıda Mühendisi, ³ Doç. Dr., Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi: anli@eng.ankara.edu.tr

Laktik asit bakterilerinin metabolizmalarında kullandıkları ana substratlar malik asit, sitrik asit ve mayalardan arta kalan şekerlerdir (heksozlar ve pentozlar) (3). Şekerler (glukoz, fruktoz, ksiloz ve arabinoz) laktik asit, asetik asit, etil alkol ve CO₂'e katabolize olurken, sitrik asit ise asetik asit ve karbonil maddelere, özellikle tereyağı tadına sahip diasetile dönüşür. Ayrıca, bakterilerin şarap fenol bileşenleri (tanen, antosiyan) üzerindeki aktiviteleri sonucu, şarabın tadı ve rengi de değişikliğe uğrar (4).



Şekil 1. Şarap Üretim Şeması

Laktik asit bakterileri, şarapta tat, koku ve renk değişikliklerine neden olmalarının yanı sıra, mikrobiyel kararlılığın sağlanmasında da önemli rol oynarlar. Şarapta laktik asit bakterileri geliştiğinde başka hastalık yapıcı bakterilerin gelişmesi zorlaşır. Bu durum besin rekabeti ve antibakteriyel maddelerin sentezlenmesi ile açıklanabilir (4).

Türlerine, suşlarına ve çoğalmaya başladıkları zamana bağlı olarak laktik asit bakterilerinin şarabın kalitesi üzerine etkileri yararlı ya da zararlı olabilir. Bu yüzden üretim sırasında maya ve laktik asit bakterilerinin gelişimlerinin kontrol altına alınması

gerekir. Şarap, olgunlaşma ve yillanma aşamalarında hiçbir mikroorganizma yani maya ve bakteri içermemelidir. Bu aşamalarda şarabın rengi ve aroması yalnızca kimyasal olarak aktif olan bileşenlerin oksidasyon, esterifikasyon ve polimerizasyonu gibi reaksiyonları sonucu değişir ve gelişir.

Şıra ve Şarapta Laktik Asit Bakteri Popülasyonu

Hasat edildiği anda üzümde bakteri popülasyonu çok düşük olmasına rağmen, ezilip fermantasyon tankına alındıklarında çok daha yüksek miktarlarda bakteri sayılıp izole edilebilir. Bakteri popülasyonu, üzümün olgunlaşma zamanındaki iklim koşullarına bağlı olarak 10^2 kob/ml ile 10^4 kob/ml arasında değişir. pH ile bakteri popülasyonu arasında sıkı bağ vardır: Şöyle ki pH değeri ne kadar büyük olursa toplam laktik asit bakteri popülasyonu da o kadar büyük olur. Şırada esas olarak 4 cins laktik asit bakterisi tanımlanmıştır: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Oenococcus* (Çizelge 1). Laktobasiller fakültatif (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei*) ve zorunlu heterofermentatif (*L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. fructivorans*) gruba girerler. Homofermentatif koklar, başlıca *Pediococcus damnosus* ve *P. pentosaceus* türlerini kapsar. *P. parvulus* türü de ayrıca Washington (5) ve Avustralya şaraplarında (6) saptanmıştır. Şaraplardaki heterofermentatif koklar 1995 yılına kadar *Leuconostoc* cinsine bağlı *Leuconostoc mesenteroides* ve *Leuconostoc oenos* olarak tanımlanırken, *Leuconostoc oenos* türünün diğer leuconostoclarla düşük RNA/DNA hibridizasyonu yapmasından dolayı, Dicks ve arkadaşları tarafından 16S r-DNA ve 23 S r-DNA sıralamasına göre tek türü *Oenococcus oeni* olan *Oenococcus* diye yeni bir cins tanımlaması yapılmıştır (1).

Çizelge 1. Şırada ve şarapta bulunan laktik asit bakteri türleri (1)

Laktobasiller	Fakültatif heterofermentatif	<i>Lactobacillus casei</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
	Zorunlu heterofermentatif	<i>Lactobacillus brevis</i>
		<i>Lactobacillus hilgardii</i>
Kok	Homofermentatif	<i>Pediococcus damnosus</i>
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	Heterofermentatif	<i>Leuconostoc oenos (Oenococcus oeni)</i>
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Alkol fermantasyonunun ilk günlerinde laktik asit bakterileri popülasyonu en fazla 10^4 kob/ml'ye kadar yükselir ve fermantasyonun sonuna doğru 10^2 kob/ml'ye kadar düşer. Laktik asit bakterileri popülasyonunun en fazla olduğu anda etil alkol konsantrasyonu %5-6 dolayındadır. Alkol fermantasyonu sırasında bakterilerin yalnızca toplam popülasyonu değil türlerin çeşitliliği de azalır. Alkol fermantasyonu sonunda genellikle *O. oeni* baskın gelir. Koloni hibridizasyonu yoluyla yapılan deneyler, *Lactobacillus* türlerinin, *Pediococcus* ve *L. mesenteroides* 'in giderek yok olurken ya da çok düşük konsantrasyonlarda saptanırlarken fermantasyon sonunda saptanan tek türün *O. oeni* olduğunu açıkça göstermiştir (7). Bununla birlikte diğer

türlerden bazıları da hayatta kalabilir. Fermantasyon sırasında *O. oeni* 'nin baskın durumu giderek artan etil alkol miktarı ve maya metabolizmasının diğer ürünlerinden kaynaklanır. Yağ asitleri, örneğin dekanoyik ve dodekanoik asit, laktik asit bakterinin gelişimini etkin bir şekilde engellediği belirtilmiştir (8). Etil alkol gibi yağ asitleri de bakteri zararının değişimine neden olmaktadır (9). Bazı maya türleri kükürt metabolizmaları sonucu yüksek miktarlarda kükürt dioksit üretebilmektedir (10). Ortamın artan toksitesi ile birlikte, özellikle maya gelişiminin çok hızlı olduğu aşamada nitrojen eksikliği ortaya çıkabilir. Fakat bu besin kıtlığı geçicidir. Çünkü alkol fermantasyonu sonunda mayaların parçalanması sonucunda ortama yeterince amino asit verilmiş olur. Laktik asit bakteri türleri arasında bu engelleri aşip ortama en iyi uyum sağlayan tür *O. oeni* 'dir. Bununla birlikte bazı *Pediococcus* ve *Lactobacillus* türleri de hayatta kalabilir fakat bu türler şarapta bozukluklara neden olurlar. Laktik asit bakterilerinin doğal seçilimine maya ile etkileşimleri dışında bakteri türlerinin kendi aralarındaki etkileşimlerinin de neden olduğu bilinmektedir (4).

Malolaktik fermantasyon, alkol fermantasyonundan sonra bakteri popülasyonu 10^6 kob/ml'ye ulaştığında başlar. Bakteriyel gelişmeyi etkileyen en önemli faktörler pH, sıcaklık ve etil alkol miktarıdır. Yüksek pH değerlerinde (pH>3.5), %13'den az etil alkol konsantrasyonunda ve 19-20 °C sıcaklıkta gelişimleri kolayken, 3.0'ün altındaki pH değerlerinde. %14'den fazla etil alkol konsantrasyonunda ve 17 °C'den düşük sıcaklıklarda gelişmeleri hemen hemen imkansızdır (11).

Asit miktarına ve çevre koşullarına bağlı olarak malolaktik fermantasyonun tamamlanması için gereken süre 5 gün ile 2-3 hafta arasında değişir. Malik asidin tümü laktik asit bakterileri tarafından laktik aside dönüştürüldüğünde şarap kükürlenerek (SO₂) kararlı bir hale getirilir. Bakterilerin büyük bir çoğunluğu ve kalan mayalar kükürt dioksite duyarlıdır. Kükürdün etkisi pH'a bağlıdır. Yüksek pH'lı şaraplarda SO₂'nin etkisinin azalması bakterilerin hayatta kalmasına neden olur. Bu tip şaraplarda üretimden aylar sonra bile canlı hücre sayısının 10^5 ve 10^6 kob/ml'lere ulaştığı görülür. Bu koşullarda genellikle *Lactobacillus* ve *Pediococcus* türleri daha baskındır ve bozulmaya neden olurlar. Bu gibi durumlarda yalnızca ısıtma ya da filtreleme gibi fiziksel uygulamalar ile tüm canlı bakteriler ortamdaki uzaklaştırılabilir.

Malolaktik Fermantasyonda Meydana Gelen Olaylar

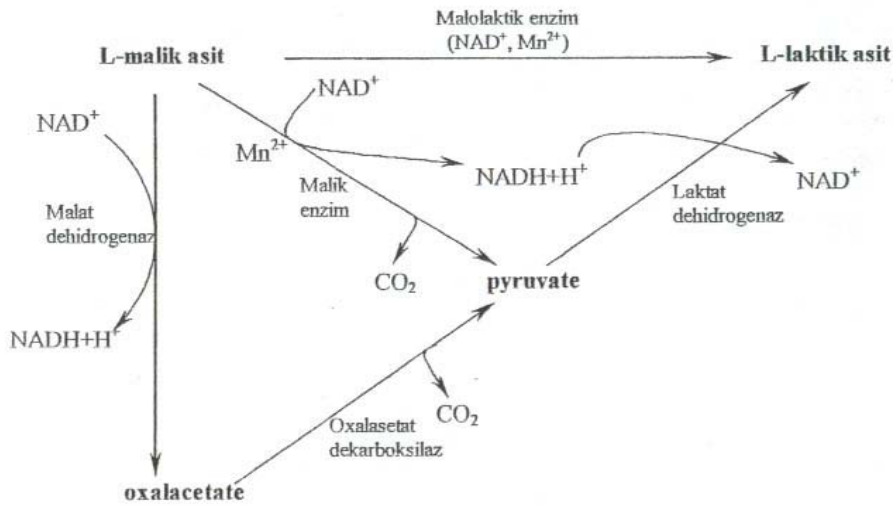
Şarap Asitliğinin Azalması

Malolaktik fermantasyonda en önemli olay laktik asit bakterileri tarafından dikarboksilik asit olan bir molekül L-malik asidin, monokarboksilik asit olan bir molekül L-laktik aside ve 1 molekül CO₂'e dönüştürülmesi sonucunda asitliğin biyolojik olarak azalmasıdır. Malolaktik fermantasyon süresince malik asidin tamamı (2-10 g/L) indirgenir ve bu da şarabın pH 'sının yükselmesi ve tadının değişmesine yol açar.

Bugüne dek yapılan çalışmalarda ortaya çıkan, malik asidin laktik aside dönüştürülmesinde yer alabilecek metabolik tepkimelerin özeti Şekil 2'de gösterilmiştir. Laktik asit bakterileri ortamda NAD⁺ ve Mn²⁺ bulunması durumunda malik asidi bir malolaktik enzim aracılığıyla laktik aside dönüştürür. Malolaktik enzim, malik asidi pirüvata çeviren malik enzimden farklıdır. Malolaktik enzim ilk olarak

1970'li yıllarda *Lactobacillus plantarum* 'dan daha sonra da şarapta tanımlanan tüm laktik asit bakterileri türlerinden izole edilmiştir (11).

Malolaktik reaksiyon tek başına hücreye enerji sağlamamaktadır. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi ile ilgili bugüne dek en çok kabul gören kanı, şarap gibi asidik bir ortamda, L-malik asidin dekarboksilasyonu ile ortam asitliğinin azalması ve böylelikle bakteri gelişiminin kolaylaşması ve artması şeklinde olmuştur. Fakat son yıllarda yapılan deneylerde L-malatın besi ortamına eklenmesi ile laktik asit bakterilerinin gelişim hızlarının arttığı görülmüş ve malolaktik reaksiyonun enerji kaynağı olarak rol oynadığı fikri öne sürülmüştür (13). L-malik asidin hücre içine alınması, dekarboksilasyondan sonra hücre içindeki pH'ın yükselmesi ve oluşan L-laktik asidin hücre dışına akışı sonucu oluşan protonmotif kuvvet ile hücreye ATP'ye çevrilebilir enerji sağlanmış olduğu düşüncesi bakteri gelişiminin artış göstermesini açıklamaktadır.

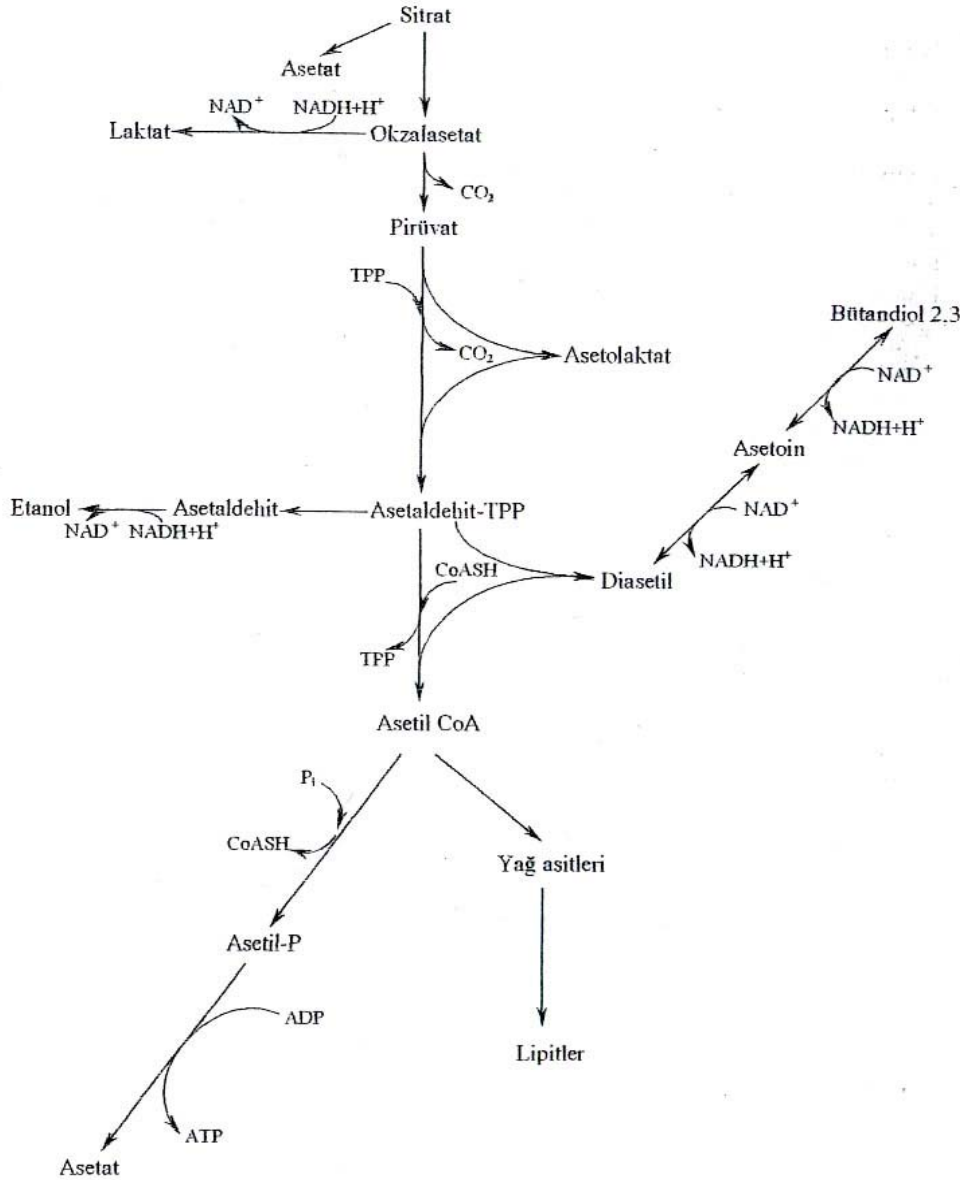


Şekil 2. L-malik asidin metabolik yolları (12)

Şarap Kalitesi Üzerine Etkisi

Malik asidin laktik aside dönüşümü şüphesiz ki malolaktik fermantasyon sırasında meydana gelen en önemli olaydır. L-malik asidin L-laktik asit ile yer değiştirmesi ile asitlik biyolojik olarak azalmış olur. Asitliğin düşmesi yalnızca asitlik değerliğinin azalmasından değil ayrıca malik asidin kuvvetli ekşi tadının daha yumuşak olan laktik asidin tadıyla yer değiştirmesinden kaynaklanır. Bununla birlikte malolaktik fermantasyon sırasında daha başka göze çarpmayan değişiklikler de meydana gelir: yeni bazı kokular ve tatlar ortaya çıkar. Alkol fermantasyonu sırasında oluşan bazı aromalar malolaktik fermantasyondan sonra tamamen kaybolur ya da değişikliğe uğrarlar. Bu da malolaktik fermantasyonu, üzüm cinsinden dolayı meyvemsi aromaların ön planda olmasının gerekmediği çoğu kırmızı ve beyaz şarap için istenen bir olay haline getirir. Malolaktik fermantasyonu tamamlamış şaraplar karmaşık bir lezzete ve dolgun bir yapıya sahip olurlar ve genellikle fıçılarda dinlendirilip şişede yıllanmaya bırakılırlar. Tüm bunların tersine üzümünün aromasına göre sınıflandırılan hafif kırmızı şaraplar ve bazı beyaz şaraplar ise malolaktik fermantasyon ile bu özelliklerini kaybedebilirler.

Malolaktik fermantasyon sırasında bakteriler tarafından üretilen çeşitli maddeler şarabın aromasının değişmesine neden olur. Şimdiye dek bu maddelerden yalnızca birkaçı tanımlanabilmiştir. Dasetil, malolaktik fermantasyon sırasında ortaya çıkan en önemli aroma maddelerinden biridir (14, 15). Aynı zamanda asetoin de meydana gelir fakat algılanma eşiği dasetilden çok daha yüksektir ve hissedilmesi daha zordur. Dasetil, asetoin ve 2,3-bütandiolü kapsayan asetoinik maddeler, sitrik asit metabolizmasının ürünleridir (Şekil 3). Şaraptaki tüm heterofermentatif koklar (*Leuconostoc* ve *Oenococcus*) ve fakültatif heterofermentatif laktobasiller (*L. plantarum*, *L. casei*) sitrik asidi metabolize ederler. Malolaktik fermantasyon sırasında baskın olan *O. oeni*, sitrik asidi malik asitten daha yavaş bir şekilde metabolize eder. Şarabın başlangıç sitrik asit konsantrasyonu 250-300 mg/L iken malolaktik fermantasyonun hızına bağlı olarak son konsantrasyonu 0 ile 100 mg/L arasındadır. Kükürtleme işleminden sonra bile sitrik asit metabolizması devam eder ve sitrik asidin tamamı yok olur. Bu metabolizmanın başlıca ürünleri şarabın tadını bariz bir şekilde etkileyen asetik asit ve asetoinik maddelerdir (C4 bileşikler).



Şekil 3. Şaraptaki laktik asit bakterilerinin sitrik asit metabolizması (12)

Diasetil, asetoin ve asetik asidin şarapta birikmesi malolaktik fermantasyonun hızına göre değişir. Malolaktik fermantasyon çok hızlı olduğunda sitrik asitten asetik asit üretimi fazla, diasetil ve asetoin üretimi ise düşük olur. Bunun tam tersine, bakterilerin çoğalma hızı düşükse daha az asetik asit ve daha fazla diasetil ve asetoin üretimi gerçekleşir (14). Hızlı gelişme koşullarında (yüksek pH ve sıcaklık) yağ asitleri ve lipitleri sentezleme ihtiyacı daha fazladır. Bu durumda, piruvat öncelikle asetil-CoA'ya doğru kayar ve daha az asetoinik maddeler üretilir. Gelişim yavaş olduğunda ise bunun tersi gerçekleşir (düşük pH ve düşük sıcaklık): piruvat C4 bileşiklerini oluşturur. Bundan dolayı, diasetil miktarı, sitrik asidin şaraptaki başlangıç miktarı ile birlikte malolaktik fermantasyonun koşullarına göre de değişir. Bununla birlikte, farklı bakteriler tarafından fermente olmuş şarabın aroma analizleri türler arasında çok önemli farklılıklar olduğunu göstermiş ve bu sonuçlar *L. lactis* 'de kanıtlanmıştır (16). Diasetilin şaraptaki son konsantrasyonu maya ve bakteri kalıntılarının diasetil redüktaz aktivitesi tarafından da etkilenir. Ayrıca diasetil, şaraptaki daha başka birçok ketonik maddeler gibi kükürt dioksitle de geri dönüşümlü olarak birleşir. Diasetilin neden olduğu bu karışıklıklardan dolayı sitrik asit metabolizmasının şarabın aromasına etkide bulunabilmesi için üretim sırasında birkaç noktaya dikkat etmek gerekir. Şarabın tortu ile uzun süre bekletilmesi sitrik asit metabolizmasının etkisini azaltır, erken aktarma ve durulama yapılması ise şarabın aromasını olumlu etkiler (17).

Beyaz ve kıvrınızı şaraplarda diasetilin eşik değerleri sırası ile 4,5-9,5 mg/L ve 12-14 mg/L, asetoin için ise 430-600 mg/L ve 2000 mg/L'dir. Şaraptaki diasetil miktarı genellikle 5-10 mg/L arasındadır. Bu eşik değerlerinin üzerindeki değerler insanlar tarafından pek beğenilmemektedir. Diasetilden başka laktik asit bakterileri metilgluksal üretiminde de rol alırlar. Malolaktik fermantasyon sırasında C3 bileşiklerinin (diasetil benzerleri) konsantrasyonları artar. Fakat bu bileşiklerin aromaya etkisi diasetilden daha azdır çünkü C3 bileşikleri C4 bileşiklerinden daha hafif aromaya sahiptirler (12).

Malolaktik fermantasyondan sonra kıvrınızı şarabın rengi ve gövdesi fenolik maddelerin değişikliklerinden etkilenir. Malolaktik fermantasyon tanin ve antosiyanlar arasındaki tepkimeleri artırarak serbest antosiyanı ve burukluğu önemli ölçüde azaltır. Malolaktik fermantasyon sırasında bir kısım fenolik madde çöker ya da yapısal değişikliğe uğrar. Fıçılarda meydana gelen malolaktik fermantasyon ise daha iyi renk dengesi sağlayan çeşitli küçük değişikliklere yol açar (18).

Laktik Asit Bakterilerinin Neden Olduğu Sorunlar

Uçar Asidin Yükselmesi

Şarap üretiminin çok iyi kontrol edildiği durumlarda laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen biyokimyasal tepkimeler şarap kalitesini ve dengesini artırırken şarapta bozulmalara ve hastalıklara neden olarak ürünü tamamen pazarlanamaz hale de getirebilir.

Laktik asit bakterilerinin neden olduğu bozukluklar üretim ya da olgunlaşma ve şişede yillanma sırasında meydana gelebilir. Üretim sırasında malolaktik fermantasyonu gerçekleştiren laktik bakterileri çok erken gelişmeye başlar. Çoğalmaları olması

gerektiği gibi yani alkol fermantasyonundan sonra değil daha önce gerçekleşir. Böylelikle maya tarafından kullanılmamış karbonhidratları özellikle heksozları fermente ederler. Bu aşamada bakteri topluluğu çoğunlukla heterofermentatif bakterilerden ve baskın olarak *O. oeni* 'den meydana gelir. Böyle bir alkol fermantasyonunun ana ürünleri etil alkol ve CO₂'den başka asetik asit ve D-Laktik asittir. Sonuç olarak şarabın uçar asidi yükselir. Uçar asit 1 g/L asetik asit (cinsinden) sınırını aştığında, şarap pazarlanamaz hale gelir. Meydana gelen asetik asit miktarı, fermente olan heksoz miktarına ve toplam bakteri sayısına bağlıdır. "pique lactique" olarak bilinen bu kırılma hatası, alkol fermantasyonu sonlara doğru çok yavaşladığında ya da durduğunda meydana gelir,

Normal olarak maya ve bakteri arasındaki etkileşimler ve şıraya eklenen kükürt dioksit bu tür bir bakteri gelişimine engel olur. Yine de bu soruna üretim sırasında sıklıkla rastlanmaktadır. Bu nedenle alkol fermantasyonunun çok sıkı olarak izlenmesi gerekmektedir. Bağbozumunda üzümler fazla olgunlaşmış ve özellikle hasat öncesi hava çok sıcak ve kuru ise bir sorunla karşılaşılabilen tahmin edilmelidir.

Acılaşıma, Dönme ve Sünme Hastalıkları

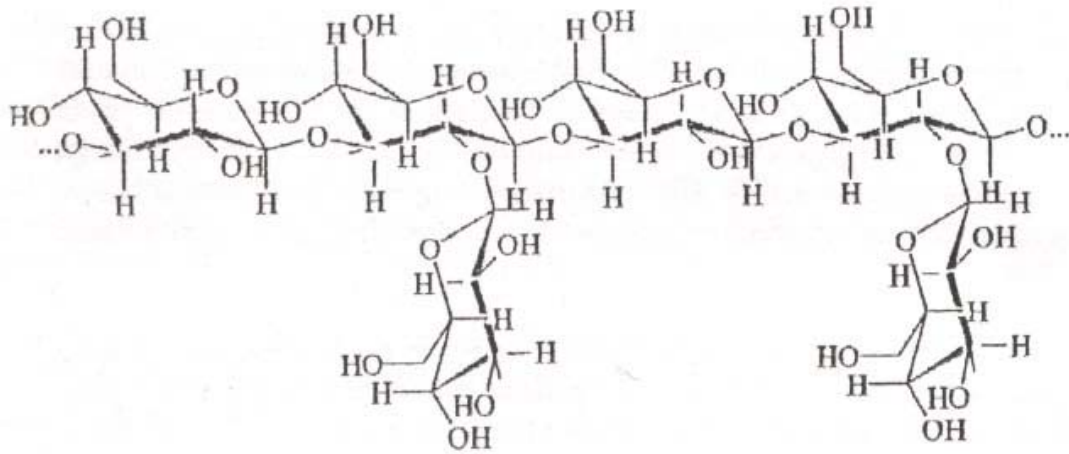
Tat ve aromadaki diğer bozukluklar türlerin değil de bazı özel laktik asit bakteri suşlarının gelişimine bağlanabilir. 1860'da Pasteur tarafından üç şarap hastalığı tanımlanmıştır: "acılaşıma", "dönme" ve "sünme". Her üç hastalıkta laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilir. İlk iki hastalık günümüzde çok yaygın değildir. Üçüncüsü ise daha sık rastlanan ve dikkat edilmesi gereken bir hastalıktır.

Şarapta acılaşıma gliserol metabolizmasından gelen akreloin ile tanenin birleşmesinden kaynaklanır. Bu birleşme özellikle kırmızı şaraplarda acı maddelerin oluşmasına neden olur. Gliserol, etil alkol gibi maya metabolizmasının bir ürünü olup şarabın ana bileşenlerinden biridir. Şaraplarda ortalama 5-8 g/L miktarında bulunur. Şarabın lezzetine önemli katkı sağlar. Gliserolün yalnızca azalması değil metabolizması sonucu ortaya çıkan ürünlerde şarap kalitesini etkiler. Schütz ve arkadaşları tarafından, yalnızca *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus buchneri* türlerinin bu olayda rol aldıkları saptanmıştır (1). Bu türler, gliserolü, akreloinin ön maddesi olan 3-hidroksipropionaldehite dönüştüren gliserol dehidrataz enzimine sahiptirler. Akreloin tek olarak acı bir tada sahip değildir fakat fenolik maddelerle olan etkileşimi acı maddelerin ortaya çıkmasına neden olur.

Dönme hastalığı, tartarik asidin mikrobiyal indirgememesinden kaynaklanır. Şarap için malik asit gibi önemli bir asit olan tartarik asidin azalması, toplam asitliği azaltır ve uçar asidi yükseltir. Tartarik asidin bir kısmının ya da tamamının indirgenmesinin şarap kalitesinde azalmaya neden olduğu bilinmekle beraber laktik asit bakterilerinin tartarik asit metabolizması hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (1).

Sünme hastalığı şarabın yoğunluğunun aşırı bir şekilde artması ve hatta yağdan bile daha yavaş akar hale gelmesi şeklinde tanımlanabilir. Bazı laktik asit bakteri türleri kalıntı şekerlerden şarabın yoğunluğunun artmasına yol açan hücre dışı polisakkarit sentezleyebilirler. Bundan başlıca *Pediococcus damnosus* sorumludur (12). Bununla birlikte Van Vuuren ve Dicks değişik ülkelerin şaraplarında yaptıkları deneylerde *O. oeni* 'nin de polisakkarit üretimi ile bağlantılı olduğunu göstermişlerdir (19). *P.*

damnosus, normal olarak üzümde bulunur ve fermantasyon sırasında ortadan tamamen kaybolur. Malolaktik fermantasyonda bazen önemli rol oynar. *P. damnosus* suşlarının çoğu hastalık yapıcı değildir. Yalnızca sünmüş şaraplardan izole edilen suşları düşük glukoz konsantrasyonlarında (1 g/L'den az) kültüre alındıklarında bile hücre dışı polisakkarit üretebilmektedirler. *P. damnosus* tarafından üretilen glukanın, glukozun trisakkarit olarak tekrar ettiği bir yapısı vardır (20 Llauberes . 1990) (Şekil 4). 100 mg/L glukoz konsantrasyonu, şaraba kabul edilemez bir yoğunluk kazandırması için yeterli bir miktardır. Glukoz üretebilen *P. damnosus* suşları etil alkole diğer suşlardan daha toleranslıdır. Bununla birlikte, salgıladıkları bu hücre dışı proteinlerden dolayı ortama ve hatta SO₂'ye karşı daha dayanıklı olmaları tüm şarap ekipmanlarının bu bakteri ile bulaşık olma riskini arttırmaktadır. Sünme hastalığı şişelemeden önce şarap halen tankların içindeyken oluşabilir. Bu durumda, mekanik yollarla şarabın normal yoğunluğuna döndürülmesi mümkün olabilmektedir. Genel olarak sünmüş şaraplar, eğer içinde başka mikroorganizma, maya ya da bakteri gelişmemişse yoğunluğunun fazla olmasından başka bir soruna sahip değildir. Fakat çoğu zaman sünme, şişelemeden haftalar ya da aylar sonra çok yavaş olarak ortaya çıkmaktadır. Şişelenmeden önce şarabın içinde bu tür bakterilerin varlığının bilinmesi filtrasyon ve ısıtma işlemlerinin önemini arttırmaktadır.



Şekil 4. *Pediococcus damnosus* tarafından üretilen hücre dışı proteinin (glukan) yapısı

Kötü Kokuların Oluşması

Şarap yapımı sırasında ya da sonrasında bazen kötü kokular oluşabilir. Bu tür kusurların nedenleri ve içerikleri tam olarak tanımlanabilmiş değildir. Son yıllarda kırmızı şaraplarda uçucu fenol bileşenleri; 4-etilfenol ve 4-etilgaiacol miktarının fazlalığı nedeniyle algılanılan hayvansal fenolik kokular ilgi uyandırmaktadır. Her iki uçucu fenol bileşeni de üzüm ve şarabın önemli fenol bileşenleri olan p-kumarik asit ve ferulik asidin karboksilasyonu ve bunu izleyen indirgenmesi sonucu oluşur. Algılama eşiğinden daha fazla miktarlarda bulunan uçucu fenol bileşenleri şaraba fenolik bir karakter kazandırır. Bu indirgenme tepkimeleri genelde fıçılarda

yıllandırma sırasında görülür ve bundan *Brettanomyces* türünün suşlarının aktivitesi sorumlu tutulur. Uçucu fenollerin düzeyi ile bu türün nüfusu arasında sıkı bir bağ vardır. Aslında bu maya türü kükürt dioksite çok duyarlı olmasından dolayı şarapta yaşayamaz (21). Bununla birlikte Cavin ve arkadaşları laktik asit bakterilerinin de (*L. plantarum*, *L. brevis* ve *Pediococcus*) ferulik ve p-kaumerik asitleri metabolize edebildiğini göstermişlerdir (22).

Fare idrarı kokusu gibi kötü kokular da laktik asit bakterileri tarafından üretilir ve bu kokulardan 3 heterosiklik uçucu baz sorumludur: 2-asetiltetrahidropiridin, 2-etiltetrahidropiridin ve 2-asetil-pyrrolin. Costello ve arkadaşları laktik asit bakterilerinin üzüm suyunda ve şarap ortamında bu maddeleri üretme yetileri üzerine çalışmışlardır (12). Heterofermentatif türler, laktobasiller ve *O. oeni* pozitif sonuçlar vermişlerdir. Ön sonuçlar bu maddelerin üretiminin, ortamda etil alkolün bulunması durumunda karbonhidrat ve aminoasit metabolizmalarının etkileşimleri sonucunda olduğunu göstermiştir.

Biyojen Amin ve Etil Karbamat Oluşumu

Biyojen aminler ve etil karbamat şarapta laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan ve şarabın kalitesi açısından istenmeyen maddelerdir. Her ikisi de hem şarap yapımı sırasında hem de sonrasında meydana gelmektedir. Bazıları ayrıca az miktarlarda üzümde de bulunabilmektedir.

Biyojenaminler insan metabolizmasında fizyolojik olarak aktif olan maddelerdir. Vücutta bazı fonksiyonlar için az miktarlarda alınmaları gerekli ve zararsız olmalarına rağmen fazla alındıkları durumlarda ya da vücudun detoksifikasyon mekanizması ilaçlardan ya da genetik olarak zayıf olduğu durumlarda bazı toksik etkilere sahiptirler. Biyojenaminler fermente ürünlerinde, sebzelerde, balık ve ette şaraptan daha yüksek miktarlarda bulunurlar (23). Fakat bu ürünlerin bir arada tüketilmesi ve şaraptan gelen etil alkolün de etkisiyle biyojenaminler, özellikle hassas kişilerde sağlık sorunlarına yol açabilir.

Biyojenaminlerin çoğu şarapta saptanmıştır: Etilamin, isoamilamin, diaminobütan (putresin), diaminopentan (kadaverin), tiramin, feniletilamin ve histamin aminoasitlerin dekarboksilasyonu sonucu meydana gelirler. Fakat isomilamin, metilamin ve putresin çok düşük miktarlarda üzümde de bulunur. Şaraptaki biyojenaminler hakkında ilk çalışmalar histamin üzerine başlamıştır. Birbiri ile çelişen sonuçlara varan birkaç çalışma varsa da yaygın kanı, histamin oluşumuna *Pediococcus* türlerinin neden olduğudur ve bu da şarap üretiminin iyi kontrol edilmemesinden kaynaklanmaktadır. Fakat yapılan birçok şarap analizinden sonra şarapların çoğunun biyojenamin içerdiği görülmüş ve *Pediococcus* üzerine tartışmalar yeniden başlamıştır. Yüksek miktarlarda biyojenamin konsantrasyonuna sahip şaraplardan bakteri kütlesi izole edilmiş ve bu kütlede yalnızca *O. oeni* suşlarının bulunduğu, diğer bakteri türlerinin ise çok düşük miktarlarda bulunduğu görülmüştür. Bakterinin hızlı geliştiği yüksek pH'da amin oluşumunun da yüksek olduğu gözlenmiştir (24). Ayrıca, Arjantin şaraplarından izole edilen laktik asit bakterileri suşlarını da histamin ürettiği saptanmış ve bakteri *L. hilgardii* olarak tanımlanmıştır (25). Biyojen amin oluşumu yalnızca malolaktik fermantasyon

sırasında gerçekleşmez. Histamin düzeyinin şarabın depolanması sırasında da yükseldiği gözlenmiştir (26).

Şarapta oluşumuna dikkat edilmesi gereken diğer bir madde ise, kanserojen olduğu bilinen etil karbamattır. Bu bileşiğin şaraptaki habercileri ise mayalar tarafından üretilen üre ve laktik asit bakterileri tarafından üretilen sitrullin ve karbamil fosfattır. Bu metabolizmayı gerçekleştirdiği en iyi bilinen laktik asit bakterisi şaraplardan izole edilen heterofermentatif *L. hilgardii* 'dir. Hogg ve arkadaşları *L. hilgardii* bulaşmış fortifiye şaraplarda bu metabolizmayı açıkça ortaya koymuştur (12). *O. oeni*, arjinini parçalayamaz olarak bilinse de Liu ve arkadaşları bu türün suşlarının, örneğin *L. buchneri*, arjininden etil karbamat habercilerini ürettiğini göstermiş ve başka araştırmacılar tarafından da bu bilgi doğrulanmıştır (27).

Biyojenaminler ve etil karbamat oluşumu şarapta istenmez. Tüketiciler ürünlerin kaliteli olmasının yanında sağlıklı ve hijyenik olmalarına da dikkat ettiklerinden beri şarap üreticilerinin bu tip konulara daha fazla önem vermeleri gerekmiştir. Üzümde ve şarabın yapıldığı ortamdaki mikroflora, şarapta istenmeyen değişikliklere neden olan laktik asit bakteri türleri ve suşlarını da içerdiğinden, malolaktik fermantasyonu saf laktik asit bakterileri ile gerçekleştirmek, malolaktik fermantasyondan en üst düzeyde yararlanılmasını sağlayacak ve yukarıda bahsedilen bir çok istenmeyen olayın gerçekleşme riskini azaltacaktır.

Malolaktik Fermantasyonun Geliştirilmesi ve Kontrol Altına Alınmasına Yönelik Yapılan Çalışmalar

Malolaktik Starter Kültürlerinin Kullanılması

Alkol fermantasyonundan hemen sonra daha malolaktik fermantasyon başlamadan, laktik asit bakterilerinin gelişimini engelleyeceğinden şarap kükürlenmez. Alkol ve malolaktik fermantasyon arasında bakterilerin ortama alışması ve sayılarının malolaktik fermantasyonu başlatmak için yeterli olana kadar çoğalmaları için geçen sürede şarap kimyasal oksidasyona uğrayabilir ya da asetik asit bakterileri ya da küfler gibi mikroorganizmalar gelişebilmektedir. Bu nedenlerle iki fermantasyon arasındaki sürenin mümkün olduğunca az olması gerekmektedir. Zamandan kazanmak ve şarabın bozulma riskini azaltmak için şarap üreticileri malolaktik starter kültürleri kullanmaktadırlar. Birkaç çeşit dondurulmuş kültür ticari olarak bulunabilmektedir. En yaygın olarak kullanılanı şaraptan izole edilmiş *Oenococcus oeni* suşlarının karışımından oluşan kültürlerdir. Önceleri bu kültürlerin şaraba aşılama öncesi aktive etmek gerekiyordu günümüzde hemen kullanıma hazır dondurulmuş kültürler bulunmaktadır (28). Kültür şarap içine direk olarak eklenir ve hemen gelişerek 5-7 gün içinde malik asidi laktik aside dönüştürür. Starter kültürler alkol fermantasyonu tamamlandıktan sonra şaraba eklenmelidirler. Aksi halde ortamda mayalar tarafından daha kullanılmamış şekerleri metabolize ederek uçur asidin yükselmesine neden olurlar. Bu starter kültürlerle malik asit dönüşümünün kontrol altına alınmasına rağmen mantıklı suş seçimleri ile malolaktik fermantasyonun diğer etkileri de istenilen yönde geliştirilebilir.

Malolaktik Reaktörler

Tutuklanmış laktik asit bakterileri ya da malolaktik enzim, malolaktik fermantasyonun kontrolü için çözüm olarak düşünülmüş ve üzerine çalışmalar yapılmıştır. İlk kez Divies ve Siess 1976'da sentetik bir ortama tutuklanmış *Lactobacillus casei* tarafından L-malik asidin dönüşümünü tanımlamıştır. Bu konuda daha başka denemeler de yapılmış ve çoğunun sonuçları sentetik ortamda malolaktik fermantasyonun sorunsuz bir şekilde gerçekleştirilebileceğini göstermiştir. Reaktörün hastalık yapıcı bakteri ve fajlarca enfeksiyonu, malolaktik aktivitenin kaybı, şarabın kalitesinde istenmeyen değişiklikler meydana gelmesi bu teknolojinin karşısında duran en önemli sorunlar arasında sayılmaktadır.

Malolaktik enzimin carraghenan ya da alginate üzerine tutuklanması tekniği de denenmiştir. İlk kez Festaz-Furet tarafından enzim aktivitesi için gerekli şartlar göz önünde bulundurularak bir enzim reaktörü tanımı verilmiştir (11). Daha sonra başka araştırmacılar tarafından da L-malik asidin L-laktik aside dönüşümünü geliştirecek hücresiz enzim reaktörü tanımı yapılmıştır (1). Fakat, enzim aktivitesi için gerekli olan özel koşullar (optimum pH 5.8), Mn^{2+} ve NAD^+ kofaktörlerine olan gereksinim ve birçok şarap bileşeninin (karboksilik asitler, polifenoller) enzim üzerindeki inhibisyon etkisi nedenleriyle enzimin hücre zarı tarafından ortamdan korunması gerektiğinden, bu tür malolaktik enzim sistemlerinin gelişmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Rekombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Malolaktik fermantasyonun teknolojik olarak kontrolüne yönelik çalışmalar yapılırken starter kültürlerin kullanılması dışında, şıraya *O. oeni* 'den daha fazla uyum gösterebilecek bir malolaktik mayanın oluşturulması fikri akla gelmiştir. Amaçlanan, mayanın alkol fermantasyonunu gerçekleştirirken aynı anda malolaktik enzimle malatı da laktik aside dönüştürebilmesini gerçekleştirmektir. Bu nedenle *Saccharomyces cerevisiae* 'ya malolaktik enzimi kodlayan gen, *mleS*, aktarıldı (29, 30). Ön sonuçlar malatın hücre içine alınmasındaki sınırlamalar nedeniyle malat dönüşümünün maya tarafından tamamen gerçekleştirilemediğini gösterdi. Volschenk, *Schizosaccharomyces pombe* 'nin malat permeaz enzimini kodlayan *mae1* genini *mleS* geni ile birlikte aktararak yeni bir rekombinant malolaktik *S. cerevisiae* oluşturdu ve malik asit başarı ile fermente edilebildi (31). Fakat malolaktik fermantasyon yalnızca malik asidin indirgenmesini değil daha birçok biyokimyasal tepkimeleri ve bakteriyel metabolizmaları içerdiğinden, bu tür mayaların kullanılması bütün şarap türleri için geçerli olamamıştır.

Kaynaklar

1. Moreno-Arribas, M. V. ve Lonvaud-Funel, A. 2000. The involvement of lactic acid bacteria in wine making. Recent Res. Devel. Microbiology, 4; 481-504,
2. Ough, C. S. 1992. Wine making basics. Haworth Press, Binghamton, NY.
3. Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., Fleet G. M. 1985. Practical implications of malolactic fermentation: a review. Am. J. Enol. Vitic., 36,290-300.

4. Lonvaud-Funel, A. ve Joyeux, A. 1993. Antagonisms between lactic acid bacteria of wines: Inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentasaceus*. Food Microbiol., 10; 41 1-419.
5. Edwards, C. G. ve Jenseii K.'A. 1992. Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington State wines: *Pediococcus* spp. Am. J. Enol. Vitic., 43; 233-238.
6. Davis, C., Silveira, N. F. A., Fleet, G. H. 1985. Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. Appl. Environ. Microbiol., 50; 872-876.
7. Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., Ledotix, O. I 991. Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isolopic DNA probes. J. Appl. Bacteriol., 71, 501-508.
8. Edwards, C. G., Beelman, R. B., Bartley, C. E., McConnell, A. 1990. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the -growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. Am. J. Enol. Vitic., 41; 48-56.
9. Lonvaud-Funel, A., Joyeux. A., Desens, C. 1988, The inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. J. Food. Sci. Agri., 44; 183-191.
10. King, S. W., Beelman, R. B. 1986. Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system, Am. J. Enol. Vitic., 37; 53-60.
11. Lonvaud-Funel, A. 1995. Microbiology of malolactic fermentation: Molecular aspects. FEMS Microbiology Letters, 126; 209-214.
12. Lonvaud-Funel, A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antonie van Leeuwenhook, 76; 317-331.
13. Poolman, B. 1993. Energy transduction in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12; 125-148.
14. Bertrand A., Smirou-Bonnamour, C., Lonvaud-Funel, A. 1984. Aroma compounds formed in malolactic fermentation. Proceedings of the Alko Symposium on flavour research of alcoholic beverages. Biotech. Indus. Ferm. Res., 3; 39-49.
15. Davis, C. R., Wibowo, D., Fleet, G. H., Lee, T. H, 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. Am. J. Enol. Vitic., 39; 137-142.
16. Hugenholtz, J. 1993. Citrate metabolism In lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12; 165-178.
17. Nielsen, J. C. Prah, C., Lonvaud-Funel, A. I 996. Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze dried *Leuconostoc oenos* cultures. Am. J. Enol. Vitic., 47; 42-48.
18. de Revel, G., Martin, R, Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A, 1999. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. J. Agric. Food. Chem., 47; 4003-4008.
19. Van Vuuren, H. J. J. ve Dicks, L. M. T. 1993. Wine Microbiology Review. Am. J. Enol. Vitic., 44, 99-112.
20. Llauberes 1990. Wine micrororganisms. Article in Win Symposium. Bordeaux, 1990.
21. Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethyl phenol contents of red wines. Am. J. Enol. Vitic., 46; 463-468.
22. Cavin, J. F., Andioc, V., Etievant, P. X., Divies, C. 1993. Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. Am, J. Enol. Vitic.,44; 76-80

23. Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L., Huis. I. N. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food. Microbiol.*, 11; 73-84.
24. Lonvaud-Funel, A. ve Joyeux, A. 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine producing strain of *Leuconostoc oenos*, *J. Appl. Bacteriol.*, 77; 401-407.
25. Farais, (Vi. E., Manca De Nadra, M. C., Rollan, G. C., Strasser De Saad, A, M. 1993. Histidine decarboxylase activity in lactic acid bacteria from wine. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 27; 191-199.
26. Coton, E., Rollan, G. C., Bertrand, E., Lonvaud-Funel, A. 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines, early detection frequency and distribution. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49; 199-204.
27. Mira de Orduna, R., Liu, S. Q., Patchett, M. L., Pilone, G. J. 2000. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine clegradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 183; 31-35.
28. Nielsen, J. C., Richelieu, M. 1999. Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 740-745.
29. Anasanay, V., Dequin, S., Blondin, B. ve Barre, P. 1993. Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis*. *FEBS Lett.*, 332, 74-80.
30. Denayrolles, M., Aigle, M., Lonvaud-Funel, A. 1995. Functional expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the *Lactococcus lactis mleS* gene encoding the malolactic enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* 125; 37-44.
31. Dequin, S. 2001. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56; 577-588.