

Glikozidaz Enziminin İskenderiye Misketi ve Emir Şaraplarının Aroma Bileşikleri Üzerine Etkisi*

Turgut CABAROĞLU, Ahmet CANBAŞ
Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 05.06.2000

Özet: Bu çalışmada glikozidaz aktiviteleri içeren ticari bir enzimin İskenderiye misketi ve Emir üzümlerinden elde edilen şaraplarda serbest ve bağlı nitelikteki aroma maddeleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Fermantasyon halindeki şıra fermantasyonun sonuna doğru iki kısma ayrılmış ve bunlardan birine 40 mg/l düzeyinde glikozidaz enzimi ilave edilmiş ve diğeri kendi haline bırakılmıştır. Elde edilen şaraplardaki aroma maddeleri Amberlit XAD-2 reçinesi ile ekstrakte edilmiş ve tanıları gaz kromatografisi-kütle spektrometresinde gerçekleştirilmiştir. Aroma maddelerinin miktarları ise gaz kromatografisiyle belirlenmiştir. Enzim uygulanan örneklerde serbest haldeki terpen bileşikleri, uçucu fenoller, norizoprenoidler ve aromatik alkollerin miktarları artmış ve enzimatik parçalanma sonucu glikozid yapıdaki aroma maddelerinin miktarları azalmıştır. Enzim uygulanan örneklerde serbest aroma maddelerindeki artış duyu analizlerle de doğrulanmıştır. Bu analizlerde enzim uygulanan örnekler, tanıklara göre, daha aromatik bulunmuş ve daha çok tercih edilmişlerdir. Aromatik açıdan, enzim uygulamasının İskenderiye Misketi ve Emir şaraplarında kaliteyi olumlu yönde etkilediği söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Aroma maddeleri, glikozidaz enzimi, İskenderiye misketi şarabı, Emir şarabı

Effect of Glucosidases Enzyme Treatment on Aroma Compounds of the White Muscat of Alexandria and Emir Wines

Abstract: The effect of an exogenous commercial enzyme with glycosidase activities on free and glycosidically bound aroma compounds of the white wines obtained from muscat of Alexandria and Emir cultivars was investigated. The fermenting must was divided into two equal parts towards the end of the fermentation and 40 mg/l of enzyme was added to one part. The aroma compounds of the wines were extracted with Amberlite XAD-2 resin and were identified by gas chromatography-mass spectrometry. Their concentrations were determined by gas chromatography. As a result of the enzyme treatment, the concentration of free aroma compounds (terpenes, volatile phenols, C-13 norisoprenoids and aromatic alcohols) increased, and due to the enzymatic hydrolysis, the concentration of glycosidically bound aroma compounds decreased. The increase of free aroma compounds in the enzyme treated wines was also confirmed by sensory analyses. These analyses showed that the enzyme treated wines were more aromatic than and preferable to the controls. In terms of aroma, it can be said that enzyme treatment improved the quality of the muscat of Alexandria and Emir wines.

Key Words: Aroma compounds, glycosydase enzyme, muscat of Alexandria wine, Emir wine

Giriş

Şaraptaki aroma maddelerinin kaynakları; üzüm yani hammadde, alkol ve malolaktik fermantasyonlar ve şarabın olgunlaştırma aşamasıdır. Bunlar arasında üzümde kaynaklanan birincil aroma maddeleri, şaraba çeşide özgü karakterini kazandırdığı için, ayrı bir öneme sahiptir. Bu nedenle, şarap üretiminde ana ilkelerden biri

üzümden ileri gelen aroma maddelerini artırmak ve böylece şarabın taze ve meyvemsi özelliğini geliştirmektir.

Üzümden kaynaklanan başlıca aroma maddeleri: terpen bileşikleri, 13 karbonlu norisoprenoidler, uçucu fenoller ve aromatik alkoller (benzil alkol ve 2-fenil etanol) dir. Siyah ve beyaz üzümlerin çoğu bu bileşikleri içerirler ancak, misket gibi aromatik çeşitler bu

*Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (TÜBİTAK-TOGTAG-TARP-1263).

bileşiklerce çok daha zengindirler. Aroma maddeleri üzümlerde ve şaraplarda iki farklı yapıda bulunurlar: uçucu ve koku verebilen özellikteki serbest aroma maddeleri ve uçucu olmayan, kokusuz ve bazı bileşiklerin (glikozid, karoten, fenolik asitler, amino asitler) yapısında yer alan öncül (precursor) veya bağlı aroma maddeleri (Günata, 1984; Günata ve ark., 1986). Üzümlerde bağlı aroma maddelerinin miktarı çeşide göre değişmekte ve en önemlisi bu bağlı yapı üzümün şaraba işlenmesi sırasında korunmakta ve şarapta pek değişmeden kalmaktadır (Günata ve ark., 1986; Canal-Llauberes, 1993).

Üzümlerde aroma maddelerini (terpen bileşikleri, norisoprenoidler, uçucu fenoller ve aromatik alkoller) yapısında bulunduran başlıca dört tip glikozid bulunmaktadır: arabinozilglikozid, apiozilglikozid, ramnozilglikozid (rutinozid) ve β -glikozid (Günata ve ark., 1985; 1990a; Bayonove ve ark., 1992). Glikozid yapıdaki bu bağlı aroma maddeleri, asit veya enzimatik hidrolizasyon sonucu, serbest hale geçerek koku veren aroma bileşiklerine dönüşmekte ve şarabın aroma potansiyelini artırmaktadır (Bayonove ve ark., 1984; 1993; Strauss ve ark., 1986; 1987; Winterhalter ve ark., 1990; Günata ve ark., 1992; Williams ve ark., 1993). Bu durum, bağlı yapıdaki aroma potansiyelinden daha fazla yararlanılmasını sağlamak üzere, ticari enzim kullanımını gündeme getirmiştir. Bu amaca yönelik olarak *Aspergillus niger*'den çeşitli enzim preparatları üretilmiş ve bu enzimler şarabın aroma potansiyelini artırmak amacıyla gerçekleştirilen denemelerde kullanılmıştır. Bu alanda yapılan çalışmalar, şarap üretiminde glikozidaz aktiviteleri içeren enzim kullanımının şarabın aroma potansiyelini artırdığını ve duyuşsal özelliklerini olumlu yönde etkilediğini göstermektedir. (Günata ve ark., 1990b; Dugelay, 1993; Nicolini ve ark., 1993; Cabaroğlu, 1995; Battistuta ve ark., 1996; Bertrand ve Anocibar- Belqui, 1996).

Bu araştırmada İskenderiye misketi ve Emir üzümleri ele alınmıştır. Bunlardan İskenderiye misketi ülkemizde çoğunlukla Ege bölgesinde yetiştirilen, beyaz renkli, iri taneli, oldukça hoş bir aroma ve kokuya sahip sofralık ve şaraplık bir üzüm çeşididir (Anon., 1990). Bu çeşit dünya başlıca ülkelerinde "Alexandria" misketi olarak bilinir ve daha çok tatlı şarap yapımında kullanılır. Emir üzümü, Nevşehir-Ürgüp yöresinde yetiştirilen beyaz renkli, taneleri orta büyüklükte, içi etli ve aromatik açıdan oldukça karakteristik şaraplar veren bir çeşittir (Anon., 1990; Akman ve Yazıcıoğlu, 1960).

Bu araştırmanın amacı, İskenderiye misketi ve Emir üzümlerinin şaraba işlenmeleri sırasında, fermantasyonun sonuna doğru, ortama ilave edilen ticari glikozidaz enziminin aroma maddeleri üzerindeki etkisini incelemektir.

Materyal ve Metot

Materyal

Denemelerde Nevşehir-Ürgüp yöresinden sağlanan 3000 kg Emir üzümü ve Çukurova yöresinden (Adana) sağlanan 150 kg İskenderiye misketi üzümleri kullanılmıştır. Denemeler, 1995 yılında, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü pilot şarap işletmesinde gerçekleştirilmiştir.

Metot

Üzümlerin şaraba işlenmesi

Her iki üzüm çeşidi de geleneksel şarap yapım tekniğine göre şaraba işlenmiştir. Üzümler öncelikle saplarıyla birlikte ezilmiş ve horizontal bir preste sıkılmıştır. Elde edilen şıraya, 50 mg/l hesabıyla kükürt dioksit ilave edildikten sonra, 15 °C'de, 24 saat süre ile tortu alma işlemi uygulanmıştır. Tortusu ayrılan şıra, sıcaklığı kontrol edilebilen bir mahzene alınarak, 18 °C 'de, fermantasyon başlığı altında alkol fermantasyonuna terk edilmiştir. Fermantasyon spontan olarak yürütülmüştür. Fermantasyonun sona erme aşamasında (yoğunluk 1.010 g/cm³'ün altına düştüğünde) ham şarap iki kısma ayrılmış ve bunlardan birine 40 mg/l (üretici firma tarafından önerilen doz) düzeyinde glikozidaz aktiviteleri içeren enzim (AR-2000-Gist Brocades-France) ilave edilmiştir. Fermantasyon tamamlandıktan sonra, her iki kısımda da, şaraplar havalı olarak aktarılmış, 50 mg/l hesabıyla kükürtlenmiş ve sıcaklığı 10-15 °C arasında değişen dinlendirme mahzenine alınmıştır. Şaraplar durultulup berraklaştırıldıktan sonra şişelenmiştir.

Serbest ve bağlı aroma maddelerinin analizi

-**Ekstraksiyon** : Aroma maddeleri analizi alkol fermantasyonu tamamlandıktan 6 ay sonra yapılmıştır. Ekstraksiyon, her örnekte iki kez tekrarlanmak üzere, Amberlit-XAD-2 reçinesi (Merck) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu reçine ile birlikte, şaraptaki yağ asitlerini tutmak amacıyla Dowex (1x8, Sigma) reçinesi de kullanılmıştır. 100 ml şarap örneği alınmış ve iki katı saf su ile seyreltikten sonra içerisine iç standart olarak 30 µg 4-nonanol ilave edilmiştir. Örnekler

Amberlit XAD-2 kolonundan geçirilerek serbest ve bağı aroma maddeleri reçine tarafından tutulmuştur (Cabaroğlu, 1995). Daha sonra kolondan 50 ml pentan/diklorometan azeotrop (2/1 v/v) çözgeni geçirilmiş (Cabaroğlu, 1995) ve Amberlit XAD-2 tarafından tutulan serbest aroma maddeleri bu çözügene alınmıştır. Çözgen "vigreux" damıtma kolonunda, 37°C'de 500 ml ye kadar konsantre hale getirilmiş ve doğrudan gaz kromatografisine enjekte edilerek serbest aroma maddeleri analizi yapılmıştır. Amberlit XAD-2 tarafından tutulan bağı aroma maddeleri ise kolon üzerinden geçirilen 50 ml etilasetat/metanol çözgeni (9/1 v/v) içerisinde toplanmıştır.

-Bağı aroma maddelerinin enzimatik yolla parçalanması : Bağı aroma maddelerini içeren etilasetat/metanol çözgeni, önce 40 °C' de vakum altında (1 ml'ye kadar) ve daha sonra su banyosunda azot gazı altında tutularak, tamamen uçurulmuş ve böylece glikozid haldeki ekstrakt elde edilmiştir. Glikozid haldeki ekstrakt, 100 µl fosfat sitrat tamponunda (pH 5.0, 0.2 M) çözündürülmüş ve içinde hala serbest aroma maddesi olabileceği ihtimali gözönünde bulundurularak, pentan/diklorometan (2/1 v/v) ile yıkanmış ve daha sonra bu çözgen azot gazı altında uzaklaştırılmıştır. Ekstraktı içeren tampon üzerine 100 µl pektolaz 3PA (Grinsted-Fransa) enzimi çözeltisi [1.2 mg pektolaz 3PA enzimi 100 µl fosfat sitrat tamponunda (pH 5.0, 0.2 M) çözündürülerek elde edilmiştir] ilave edilmiş ve tampon çözelti iyice karıştırıldıktan sonra su banyosunda 40°C'de 12 saat süre ile enzimatik parçalanmaya uğratılmıştır. Enzimatik parçalanmadan sonra serbest hale geçen aroma maddeleri pentan/diklorometan çözgenine alınmış, içerisine iç standart olarak 30 µg 4-nonanol ilave edilmiş ve 37°C'de 500 ml'ye kadar konsantre hale getirilmiştir. Konsantre hale gelen örnekler gaz kromatografisine enjekte edilerek serbest hale geçen bağı aroma maddelerinin analizi yapılmıştır (Cabaroğlu, 1995).

-Gaz kromatografisi koşulları : Aroma maddelerinin analizi, alev iyonlaşma dedektörlü (FID) "Shimadzu GC-14B" marka gaz kromatografisinde, DB-Wax(J&W) kapiler kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolonun uzunluğu 30 m ve iç çapı 0,32 mm'dir. Enjektör tipi, doğrudan kolona (On-Column) enjeksiyondur. Enjektör portu sıcaklığı, enjeksiyon anında 20°C ve daha sonra 180 °C/dk artışla 250 °C'ye çıkacak şekilde ayarlanmıştır. Dedektör sıcaklığı 250 °C'dir. Kolon sıcaklığı, 60 °C 'de 3 dakika beklemeden sonra dakikada 2 °C artarak 220

°C'ye ve daha sonra dakikada 3 °C artarak 245 °C'ye çıkacak ve bu sıcaklıkta 20 dakika sabit kalacak şekilde programlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak azot kullanılmıştır. Cihaza enjekte edilen örnek miktarı 1 mikrolitredir.

-Aroma maddelerinin tanısı : Aroma maddelerinin tanısında "Hewlett Packard-5890" marka gaz kromatografisi ve buna bağı iyon tuzak dedektörlü "Finnigan MAT ITD 700" marka kütle spektrometresi kullanılmıştır. Aroma maddelerinin tanısı standart bileşiklerin tutulma zamanları kıyaslanarak ve her bileşiğe ait kütle spektrumunun, veri bankasından (INRA-Fransa tarafından geliştirilen) bilgisayar kanalıyla değerlendirildiği bir sistemden yararlanılarak yapılmıştır (Voinin ve ark., 1992). Kullanılan kolon ve enjektör tipi gaz kromatografisiyle aynı koşulları taşımaktadır. Cihaz, 60 °C 'de 3 dakika beklemeden sonra 3 °C/dk artışla 245 °C'ye çıkacak ve bu sıcaklıkta 20 dakika sabit kalacak şekilde programlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak kullanılan helyumun akış hızı 1,5 ml/dk olarak sabit tutulmuştur. Cihaza enjekte edilen örnek miktarı 3 mikrolitredir.

-Hesaplama : Pikler tanımlandıktan sonra bileşiklerin konsantrasyonları iç standart yöntemiyle hesaplanmıştır.

Duyusal Analiz

Şarapların duyu analizi "üçlü test" yöntemiyle ve 7 kişilik seçilmiş üyelerden oluşan bir panelist grubu tarafından yapılmıştır (Amerine ve ark., 1965).

İstatistiksel Analiz

Aroma maddeleri ile ilgili analizlerin sonuçları "Statview 4.0" paket programı kullanılarak varyans analizine (Anova) tabi tutulmuş ve değerlendirmelerde "Fisher" in Asgari Önemli Fark (LSD) testi uygulanmıştır (Amerine ve ark., 1965). Duyusal analizlerden elde edilen sonuçlar "üçlü test" istatistik tablosu kullanılarak değerlendirilmiştir (Roessler ve ark., 1978; Barillere ve Benard, 1986).

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Enzim Uygulamasının Serbest Aroma Maddeleri Üzerine Etkisi

İskenderiye misketi ve Emir üzümlerinden elde edilen şaraplarda ticari glikozidaz enzimi kullanımı serbest aroma maddeleri miktarında önemli bir artışa neden olmuştur. Enzim uygulamasının terpen bileşikleri, uçucu fenoller, norizoprenoidler ve aromatik alkoller üzerindeki etkisine ilişkin sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. İskenderiye Misketi ve Emir Şaraplarında Glikozidaz Enziminin Serbest Aroma Maddeleri Üzerine Etkisi.

Aroma maddeleri (µg/l)	İskenderiye misketi				Emir			
	Tanık	Enzimli şarap	Artış (%)	F ¹	Tanık	Enzimli şarap	Artış (%)	F ¹
Terpen bileşikleri								
Linalol	60	78	30	**	-	-	-	-
α-Terpineol	295	592	100	**	-	-	-	-
Jeraniol	84	185	120	**	7	13	86	*
3,7-diol [#]	65	82	26	*	-	-	-	-
Linalol hidrat	38	40	5	ö.d.	-	-	-	-
3,8-diol ^W	113	175	40	ö.d.	-	-	-	-
Jeranik asit	156	155	-	ö.d.	-	-	-	-
Toplam	811	1307	61	**	7	13	86	*
Uçucu fenoller								
Vanilin	23	33	43	*	36	49	36	*
Asetovanilon	-	-	-	-	70	145	107	*
Vaniloil metil keton	-	-	-	-	24	34	42	*
Sirengaldehit +4-Hidroksi								
-benzaldehit	125	161	29	*	99	166	68	*
Asetosirengon	65	87	34	ö.d.	21	17	-	ö.d.
Tirozol	250	302	21	*	210	301	43	ö.d.
Toplam	463	583	26	*	460	712	55	*
Norizoprenoidler								
3-OH-β-damaskon	-	-	-	-	16	20	25	**
3-Okzo-α-ionol	-	-	-	-	26	35	35	*
Toplam	-	-	-	-	42	55	31	*
Aromatik alkoller								
Benzil alkol	47	93	98	**	90	164	82	*
2-Fenil etanol	16372	17427	6	**	31324	50636	62	**
Toplam	16419	17520	7	**	31414	50800	62	**

F¹: Varyans analizine göre farklılık durumu

ö.d.: önemli değil, *, ** : sırasıyla p<0.05 ve p<0.01 düzeyinde önemli.

[#]3,7-diol :3,7-Dimetil-1,5-oktadien-3,7-diol,^W3,8-diol :3,7-Dimetil-1,5-oktadien-3,8-diol

Tablo 1'de görüldüğü gibi İskenderiye misketi şarabında 7 adet ve Emir şarabında 1 adet terpen bileşiği belirlenmiştir. Bilindiği gibi, misket üzümleri terpen bileşikleri bakımından en zengin çeşitlerdir. Nitekim, İskenderiye misketi şarabında enzim uygulaması en fazla terpen bileşikleri üzerinde etkisini göstermiştir. Bu bileşiklerin toplam miktarı, tanık şarapta 811 µg/l iken enzim uygulanan şarapta 1307 µg/l'a ulaşmıştır. Toplam terpen bileşikleri miktarında ortaya çıkan %61 oranındaki bu artış istatistiksel olarak önemli (p<0.01) bulunmuştur. Bu konuda yapılan benzer araştırmalarda, glikozidaz enzimi (AR-2000) kullanmak suretiyle şaraplardaki

terpen bileşiklerinde "Ottonel" misketinde %24, "Haguenau" çeşidinde %48, "Gewürztraminer" çeşidinde %90 ve "Riesling" çeşidinde %30 düzeylerinde artış sağlandığı bildirilmiştir (Dugelay, 1993; Bertrand ve Anocibar-Belqui, 1996). Denemelerde, enzim ilave edilen İskenderiye misketi şarabında, jeranik asit hariç tüm terpen bileşiklerinin miktarları artmıştır. Terpen bileşikleri içerisinde en yüksek artış jeraniol ve α-terpineol miktarlarında olmuş ve jeraniol miktarı %120 ve α-terpineol miktarı %100 oranında artış göstermiştir. Artış oranları her iki bileşik için de önemli (p<0.01) bulunmuştur. Bunlardan jeraniol, algılanma eşiği olan 130

$\mu\text{g/l}$ 'nin üzerine çıktığında şaraba oldukça hoş, gülümsü ve çiçeksi, kokular kazandırmaktadır (Ribereau-Gayon ve ark., 1975; Bayonove ve ark., 1976). α -Terpineol'ün şaraptaki algılanma eşiği ise 400-500 $\mu\text{g/l}$ 'dir ve bu madde şaraptaki leylak benzeri kokudan sorumludur (Ribereau-Gayon ve ark., 1975; Bittour ve ark., 1996). Linalol'ün de misket aromasında önemli bir yeri vardır ancak, İskenderiye misketinde linalol miktarı algılanma eşiği olan 100 $\mu\text{g/l}$ 'nin altında kalmıştır. Enzim uygulaması linalol miktarını %30 oranında artırmış ve bu artış önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Emir şarabında ise terpen bileşiklerinden sadece jeraniol belirlenmiş ve bu maddenin miktarı enzim ilave edilen örnekte %86 oranında artmıştır. Bu artış istatistiksel düzeyde önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Emir üzümü üzerinde aynı enzimle yapılan benzer bir çalışmada jeraniol miktarının %50 oranında arttığı bildirilmiştir (Cabaroğlu, 1995). Terpen bileşiklerinin üzümlerde glikozid yapıda buldukları (Williams ve ark., 1982; Günata ve ark., 1985; Voirin ve ark., 1990) ve bunların enzim uygulamasıyla parçalanarak serbest hale geçtikleri (Cordonnier ve ark., 1989; Günata ve ark., 1990c; 1992; Dugelay ve ark., 1993) bir çok araştırmacı tarafından da açıklanmıştır.

İskenderiye misketi şarabında 4 adet ve Emir şarabında 6 adet uçucu fenol belirlenmiştir (Tablo 1). Enzim uygulaması, her iki çeşitte de, uçucu fenol bileşiklerinin miktarlarını önemli ölçüde artırmıştır. Toplam uçucu fenol miktarındaki artış İskenderiye misketinde % 26 ve Emirde % 55 oranında gerçekleşmiştir. En fazla artış gösteren maddeler İskenderiye misketinde Vanilin (%48) ve Emirde asetovanilon olarak belirlenmiştir. İskenderiye misketi şarabında vanilin, sirengaldihit+4-hidroksi benaldehit ve tirozol ve Emir şarabında vanilin, asetovanilon, vaniloil metil keton ve sirengaldihit+4-hidroksi benaldehit miktarlarındaki artış önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Bu bileşikler içerisinde, aromatik açıdan en önemlileri olan, vanilin ve asetovanilon şaraplara vanilya ve çikolata kokuları kazandırmaktadır (Etievant, 1991; Acree ve Arn, 1999). Genel olarak uçucu fenoller düşük konsantrasyonlarda şaraplara oldukça hoş giden biber, vanilya, deri ve yanık kokuları vermekte ancak, yüksek konsantrasyonlarda aromatik kaliteyi olumsuz yönde etkilemektedir (Bayonove ve ark., 1998).

İskenderiye misketi şarabında serbest halde norisoprenoid bulunmazken, Emir şarabında 2 adet

norisoprenoid saptanmıştır (Tablo1). Bunların toplam miktarı enzim uygulamasıyla % 31 oranında artmıştır ($p<0.05$). Enzim ilave edilen örnekte 3-hidroksi- β -damaskon miktarı %25 ve 3-okzo- α -ionol miktarı %35 oranında artmış ve artışlar sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.05$ düzeylerinde önemli bulunmuştur. Bu iki bileşik üzümlerde sadece glikozid yapıda bulunmakta ve enzimatik yolla parçalanarak serbest hale geçebilmektedir (Sefton ve ark., 1993). Frontignan misketi, Riesling, Sauvignon ve Syrah şarapları üzerinde yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Günata ve ark., 1992).

Aromatik alkollerin miktarı enzim uygulanan İskenderiye misketi şarabında % 7 ve Emir şarabında % 62 oranında artış göstermiş ve enzim uygulamasıyla meydana gelen artışlar her iki çeşitte de önemli ($p<0.01$) bulunmuştur (Tablo 1). Aromatik alkollerden benzil alkol miktarı, enzim uygulamasıyla, İskenderiye misketinde %98 ve Emirde %82 oranında artmıştır. Artışlar İskenderiye misketinde $p<0.01$ ve Emirde $p<0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Benzil alkol şarabın aromatik kalitesine olumlu katkıda bulunan bileşikler arasında yer almakta ve şaraba meyvemsi bir koku kazandırmaktadır (Etievant, 1991). Benzil alkol, üzüm ve şaraplarda glikozid yapıda bulunmakta ve bu yapının enzimatik yolla parçalanması sonucu serbest hale geçmektedir (Williams ve ark., 1983; Dugelay, 1993; Sefton ve ark., 1993). Enzim uygulamasıyla 2-fenil etanol miktarı her iki çeşitte de artmış ancak, meydana gelen artış sadece Emir şarabında önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. 2-Fenil etanol de üzüm ve şaraplarda glikozid yapıda bulunmaktadır (Williams ve ark., 1983; Sefton ve ark., 1993). Ancak, benzil alkolden farklı olarak, şarapta bulunan 2-fenil etanolün büyük bir kısmı üzümde kaynaklanmayıp, alkol fermantasyonu sırasında oluşmaktadır (Nykanen, 1986). Bu nedenle, özellikle Emir şarabında 2-fenil etanol miktarında meydana gelen artışın sadece enzim uygulamasına bağlanması mümkün değildir. 2-Fenil etanol de şarabın aromatik kalitesine olumlu etkide bulunmakta ve algılanma eşiğinin üzerindeki miktarlarda şaraba gülümsü bir koku kazandırmaktadır (Etievant, 1991).

Enzim Uygulamasının Bağlı Aroma Maddeleri Üzerine Etkisi

Denemelerden elde edilen şaraplardaki bağlı aroma maddelerinin toplam miktarları Tablo 2'de verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi enzim uygulanan örneklerde bağlı

Aroma maddeleri (µg/l)	İskenderiye misketi				Emir			
	Tanık	Enzimli şarap	Azalma (%)	F ¹	Tanık	Enzimli şarap	Azalma (%)	F ¹
Terpen bileşikleri								
Linalol	7	4	43	**	-	-	-	-
α-Terpineol	21	68	62	**	-	-	-	-
Trans linalol pıranik oksid	4	iz	100	**	-	-	-	-
Sitronellol	7	2	71	**	-	-	-	-
Nerol	140	56	60	*	-	-	-	-
Jeraniol	194	76	61	*	9	5	44	ö.d.
3,7-diol [#]	60	23	62	**	-	-	-	-
Linalol hidrat	46	25	46	ö.d.	-	-	-	-
3,6-diol [¶]	7	5	29	**	-	-	-	-
Terpenol	43	16	63	*	-	-	-	-
Toplam	529	215	59	**	9	5	44	ö.d.
Uçucu fenoller								
4-Vinil-fenol	6	3	50	**	iz	iz	-	-
4-Vinil gaiakol	6	4	33	ö.d.	4	3	25	ö.d.
Vanilin	7	6	14	ö.d.	6	4	33	ö.d.
Asetovanilon	-	-	-	-	6	4	33	ö.d.
Zenjeron	-	-	-	-	5	3	40	**
Vaniloil metil keton	-	-	-	-	13	6	54	*
2-Gaiasil etanol	62	53	15	ö.d.	4	iz	100	ö.d.
Sirengaldehit +4-Hidroksi								
-benzaldehit	143	90	37	ö.d.	18	7	61	*
Öjenol	-	-	-	-	iz	iz	-	-
Tirozol	256	110	57	ö.d.	132	60	55	**
Toplam	480	266	45	ö.d.	188	87	54	**
Norizoprenoidler								
3-OH-β-damaskon	31	6	81	**	25	8	68	**
3-okzo-α-ionol	30	15	50	*	14	8	43	**
3-OH-7,8-dehidro-β-ionol	-	-	-	-	10	7	30	ö.d.
Toplam	61	21	66	**	49	23	53	**
Aromatik alkoller								
Benzil alkol	34	15	56	*	98	86	12	*
2-Fenil etanol	141	32	77	**	174	82	53	**
Toplam	175	47	73	**	272	168	38	**

F¹: Varyans analizine göre farklılık durumu

ö.d.: önemli değil, *, ** : sırasıyla p<0.05 ve p<0.01 düzeyinde önemli.

[#]3,7-diol :3,7-Dimetil-1,5-oktadien-3,7-diol,

[¶]3,6-diol :3,7-Dimetil-1,7-oktadien-3,6-diol

Tablo 2. İskenderiye Misketi ve Emir Şaraplarında Glikozidaz Enziminin Bağlı Aroma Maddeleri Üzerine Etkisi.

aroma miktarları değişik oranlarda azalmıştır. Bu durum, bağlı aroma maddelerinin ortama ilave edilen enzim tarafından parçalanmış olmaları ile ilgilidir.

Enzim ilave edilen örneklerde glikozid yapıdaki terpen bileşiklerinin miktarı, İskenderiye misketi şarabında %59

ve Emirde %44 oranında azalmıştır (Tablo 2). Bu azalma İskenderiye misketinde p<0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. İskenderiye misketinde enzim ilave edilen örnekte, linalol hidrat hariç, diğer tüm terpen bileşiklerindeki azalma, istatistiksel açıdan önemlidir.

Enzim uygulamasıyla meydana gelen azalma oranı bileşiklere göre %29 ile %100 arasında değişmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi, terpen bileşikleri genellikle glikozid yapıda bulunmakta ve glikozidaz enzimlerinin etkisiyle serbest hale geçmektedir.

Uçucu fenol bileşiklerinin miktarları enzim uygulamasıyla her iki çeşitte de azalmıştır (Tablo 2). Azalma, İskenderiye misketinde %45 ve Emirde %54 oranlarındadır. Bu azalma, İskenderiye misketinde önemli bulunmazken, Emirde önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. İskenderiye misketi örneklerinde sadece 4-vinil fenol miktarındaki azalma önemlidir ($p<0.01$). Emir örneklerinde ise zenjeron ($p<0.01$), vaniloil metil keton ($p<0.05$), sirengaldehit+4-hidroksi benzaldehit ($p<0.05$) ve tirozol ($p<0.01$) miktarlarındaki azalma önemli düzeydedir. Bu bileşiklerden çoğu glikozid yapıda bulunmaktadır (Günata, 1994).

Bağlı yapıdaki norizoprenoidlerin miktarı enzim uygulamasıyla, iki çeşitte de, önemli düzeyde azalmıştır ($p<0.01$) (Tablo 2). Azalma, İskenderiye misketinde %66 ve Emirde %53 oranlarındadır. Her iki çeşitte de 3-hidroksi- β -damaskon miktarındaki azalma $p<0.01$ düzeyinde önemlidir. 3-okzo- α -ionol miktarındaki azalma hem İskenderiye misketinde ($p<0.05$) hem de Emirde ($p<0.01$) önemlidir. Bilindiği gibi bu bileşikler de üzümlerde glikozid yapıda bulunmaktadır.

Enzim uygulamasıyla aromatik alkollerin miktarında meydana gelen azalma her iki çeşitte de önemlidir ($p<0.01$) (Tablo 2). Azalma, İskenderiye misketinde %73 ve Emir'de %38 oranlarındadır. Her iki çeşitte de benzil alkol ve 2-fenil etanol miktarındaki azalma önemlidir. Bu iki aromatik alkol de, daha önce de belirtildiği gibi, üzümlerde glikozid yapıda bulunmaktadır.

Şarapların Duyusal Özellikleri

Şarapların duysal analiz sonuçları Tablo 3'te verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi İskenderiye misketinde enzim ilave edilen örneğin tanıktan farklı olduğunu 5 panelist belirlemiş ve aynı panelistler enzim uygulanan örneği tercih etmişlerdir. Ayrıca, enzimli örneği tercih eden panelistler enzim uygulanan örneğin tanığa göre daha zengin bir msket aromasına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Cevap veren panelist sayısına göre tanık ve enzim ilave edilen örnekler arasındaki fark $p<0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Emir örneklerinde enzim ilave edilen örneğin tanıktan farklı olduğunu 5 panelist belirlemiş ve bu panelistlerden 4'ü enzim uygulanan örneği tercih etmişlerdir. Cevap veren panelist sayısına göre tanık ve enzim ilave edilen örnekler arasındaki fark da $p<0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Duyusal analizlerden elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde, genel olarak enzim uygulanan şarapların tanıklardan farklı buldukları ve bunların daha çok tercih edildikleri anlaşılmaktadır.

Sonuç

İskenderiye misketi ve Emir üzümleri ile gerçekleştirilen denemelerde ortama ilave edilen glikozidaz enziminin şaraplardaki serbest aroma maddeleri miktarlarını önemli ölçüde artırdığı saptanmış ve bu artışın şarapların duysal özelliklerine de yansıdığı belirlenmiştir. Diğer çeşitler üzerinde gerçekleştirilecek benzer araştırmalar glikozidaz enziminin bu olumlu etkisine açıklık kazandıracak ve kullanımının yaygınlaşmasında belirleyici olacaktır.

Çeşit	örnekler	Toplam panelist sayısı	Farkı belirleyen panelist sayısı	Enzimli örneği tercih eden panelist sayısı
İsk. misketi	Tanık	7	5*	5
	Enzimli şarap			
Emir	Tanık	7	5*	4
	Enzimli şarap			

Tablo 3. İskenderiye Misketi ve Emir Üzümlerinden Elde Edilen Şarapların Üçlü Test Yöntemine Göre Duyusal Analizleri.

* $p<0.05$ düzeyinde önemli

Kaynaklar

- Acree, T., H. Arn, 1999. Flavornet. <http://www.nysaes.cornell.edu/flavornet1999>
- Akman, A., T. Yazıcıoğlu, 1960. Fermentasyon Teknolojisi Cilt 2, Şarap Kimyası ve Teknolojisi, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, no: 160, Ankara.
- Amerine, M. A., R.M. Pangborn, E.B. Roessler, 1965. Principle of sensory evaluation of food, Academic Press Inc., New York.
- Anonymous, 1990. Standart Üzüm Çeşitleri Kataloğu, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayınları, no: 15, Ankara.
- Barillere, J.M., P. Benard, 1986. Exemples d'interpretation de résultats de dégustation, *Connaiss. Vigne Vin*, 20:137-154.
- Battistutta, F., M. Miorini, R. Zironi, 1996. Effect of commercial β -glucosidase on analytical hydrolysis of flavor precursors. In: *Oenology 95* (Ed. A. Lonvaud-Funel), Technique et Documentation, Paris, pp: 553-556.
- Bayonove, C., R. Cordonnier, P.B., Ratier, 1976. L'extraction des composés de l'arôme du muscat dans la phase préfermentaire de la vinification, *CR. Acad. Agric. France*, 26 Mai, 734-750.
- Bayonove, C., Y.Z. Günata, R. Cordonnier, 1984. Mise en évidence de l'intervention des enzymes dans le developpement de l'arôme du jus de muscat avant fermentation: la production des terpenols. *Bull. l'OIV*, (643-644): 741-758.
- Bayonove, C., Y.Z. Günata, J.C. Sapis, R.L. Baumes, 1992. Augmentation des aromes dans le vin et utilisation d'enzymes, *Rev. Fr. Oenolog*, 64: 15-18.
- Bayonove, C., Y.Z. Günata, J.C. Sapis, I. Dugelay, R.L. Baumes, A. Razungles, 1993. Le potentiel aromatique du raisin et son evolution dans le vin: quelques exemples caractéristiques. In: *Symp. Intern. Connaissance Aromatique de cépages et Qualité des Vins*. Montpellier (Eds. C. Bayanove, J. Crouzet, C. Flanz, J.C. Martin, J.C. Sapis), Imp. Prim'vert, Béziers, France, pp: 2-11.
- Bayonove, C., R. Baumes, J. Crouzet, Z. Gunata, 1998. Aromes. In: *Oenologie* (Ed. C. Flanz), Tec et Doc, Paris, pp: 165-235.
- Bertrand, A., A. Anocibar-Belqui, 1996. Essais d'utilisation d'enzymes pectolitiques à activés complémentaires de type glucosidase dans les vins, Influence sur l'arôme, *Rev. Fr. Oenol.*, 157: 19-24.
- Bitteur, S., C. Tesniere, A. Fauconnet, C. Bayonove, C. Flanz, 1996. Carbomic anaerobiosis of muscat grapes, *Sciences des Aliments*, 16: 37-48.
- Cabaroğlu, T., 1995. Nevşehir-Ürgüp yöresinde yetiştirilen beyaz Emir üzümünün ve bu üzümünden elde edilen şarapların aroma maddeleri üzerinde araştırmalar, Doktora Tezi, Aralık 1995, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ç.Ü. Basımevi, Adana, 152 s.
- Canal-Llauberes, R.M., 1993. Volarisation du potentiel aromatique des vins par voie enzymatique. In: *Symp. Intern. Connaissance Aromatique de cépages et Qualité des Vins*. Montpellier (Eds. C. Bayonove, J. Crouzet, C. Flanz, J.C. Martin, J.C. Sapis), Imp. Prim'vert, Béziers, France, pp: 251-256.
- Cordonnier, R., Y.Z. Günata, R.L. Baumes, C.L. Bayonove, 1989. Recherche d'un matériel enzymatique adapté à l'hydrolyse des précurseurs d'arôme de nature glycosidique du raisin, *Conn. Vigne Vin*, 23: 7-23.
- Dugelay, I., 1993. L'arome du raisin: étude des précurseurs hétérosidiques et des activités enzymatiques exogenes impliquées dans leur hydrolyse, Thèse de Doctorat, 18 Mars 1993, ENSA, Montpellier, p. 174.
- Dugelay, I., Y.Z. Günata, S.C. Sapis, R. Baumes, C. Bayonove, 1993. Role of cinnamoly esterase activities from enzyme preparations on formation of volatile phenols during winemaking, *J. Agric. Food Chem.*, 41: 2092-2096.
- Etievant, P.X., 1991. Wine. In: *Volatile Compounds in Food and Beverages* (Ed. H. Maarse), Marcel Dekker, New York, pp: 483-546.
- Günata, Y.Z., 1984. Recherches sur la fraction liée de nature glycosidique de l'arôme du raisin: Importance des terpenylglycosides, action des glycosidases, Thèse de Doctorat, 14 Avril 1984, USTL, Montpellier, p. 195.
- Günata, Y.Z., C.L. Bayonove, R.L. Baumes, R.E. Cordonnier, 1985. The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fraction of some grape aroma components, *J. Chromatogr.*, 331: 83-90.
- Günata, Y.Z., C.L. Bayonove, R.L. Baumes, R.E. Cordonnier, 1986. Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv. muscat during the wine processing: preliminary results. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37 : 112-114.
- Günata, Y.Z., C. Bayonove, R. Cordonnier, A. Arnoud, P. Galzy, 1990a. Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molischana* and *Candida wickerhamii* β -glucosidases, *J. Sci. Agric. Food Chem.*, 50: 499-506.
- Günata, Z., I. Dugelay, J.C. Sapis, R. Baumes, C. Bayonove, 1990b. Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: Libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques, *J. Intern. Sci. Vigne Vin.*, 24: 133-144.
- Günata, Z., I. Dugelay, J.C. Sapis, R. Baumes, C. Bayonove, 1990c. Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: Libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques, *J. Intern. Sci. Vigne Vin.*, 24 : 133-144.
- Günata, Z., I. Dugelay, J.C. Sapis, R. Baumes, C. Bayonove, 1992. Role of enzymes in the use of the flavour potential from grape glycosides in winemaking. In: *Progress in Flavour Precursor Studies* (Eds. P. Schreier, P. Winterhalter), Würzburg, Germany, pp: 219-234.
- Günata, Z., 1994. Etude et exploitation par voie enzymatique des précurseur d'arômes du raisin de nature glycosidique, *Rev. Oenol.*, 74: 22-27.

- Nicolini, G., Y.Z. Günata, G. Versini, I. Dugelay, F. Mattivi, 1993. Use of glycosidase enzymes in musts: effects on the chemical and sensory character of the wines In: Symp. Intern. Connaissance Aromatique de cépages et Qualité des Vins. Montpellier (Eds. C. Bayonove, J. Cruzet, C. Flanzly, J.C. Martin, J.C. Sapis), Imp. Prim'vert, Béziers, France, pp: 257-266.
- Nykanen, L., 1986. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages, *Am. J. Enol. Vitic.*, 37 : 84-96.
- Ribereau-Gayon, P., J.N. Boidron, A. Terrier, 1975. Aroma of muscat grape varieties, *J. Agric. Food Chem.*, 23: 1042-1047.
- Roessler, E.B., R.M. Pangborn, J.L. Sidel, H. Stone, 1978. Expanded statistical tables for estimating significance in paired preference, paired-difference, duo-trio and triangle tests, *J. Food Science*, 43: 940-943.
- Sefton, M.A., I.L. Francis, P.J. Williams, 1993. The volatile composition of Chardonnay juices: A study by flavor precursor analysis, *Am. J. Enol. Vitic.*, 44: 359-369.
- Strauss, C.R., B. Wilson, P.J. Williams, 1986. Flavour of non-muscat varieties, In: Proceeding of Sixth Australian Wine Ind. Techn. Conf. (Ed. T. Lee), Aust. Inds. Pub., Adelaide, pp: 117-120.
- Strauss, C.R., P.R. Gooley, B. Wilson, P.J. Williams, 1987. Application of droplet counter current chromatography to the analysis of conjugated forms of terpenols, phenols and other constituents of grape juice, *J. Agric. Food Chem.*, 35:519-524.
- Voirin, G.S., R.L. Baumes, S.M. Bittour, Y.Z. Günata, C.L. Bayonove 1990. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes, *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1373-1378.
- Voirin, G.S., R.L. Baumes, J. Sapis, C.L. Bayonove, 1992. Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. II. Qualitative and quantitative determination of monoterpene glycosides in grape, *J. Chromatogr.*, 595: 269-281.
- Williams, P.J., C.R. Strauss, B. Wilson, R.A. Massy-Westropp, 1982. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines, *Phytochemistry*, 21: 2013-2020.
- Williams, P. J., C.R. Strauss, B. Wilson, R.A. Massy-Westropp, 1983. Glycosides of 2-phenylethanol and benzyl alcohol in *Vitis vinifera* grapes, *Phytochemistry*, 22: 2039-2041.
- Williams, P.J., I.L. Francis, M.A. Sefton, 1992. Sensory and Chemical analysis of hydrolysed flavour precursors from Sauvignon blanc grapes, In: Progress in Flavour Precursor Studies (Eds. P. Schreier, P. Winterhalter), Würzburg, Germany, pp: 235-242.
- Winterhalter, P., M.A. Sefton, P.J. Williams, 1990. Volatile C13-norisoprenoid compounds in Riesling wine are generated from multiple precursors, *Am. J. Enol. Vitic.*, 41: 277-283.