

KİLLER ÖZELLİKLİ MAYALARIN ETKİ MEKANİZMALARI VE ENDÜSTRİDE YOL AÇTIKLARI SORUNLAR

EFFECT MECHANISMS OF KILLER YEASTS AND THE PROBLEMS CAUSED BY THEM IN INDUSTRY

Evrin GÜNEŞ ALTUNTAŞ, Filiz ÖZÇELİK*

Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş Tarihi: 26.01.2007

ÖZET: Killer özelliğın, bazı endüstriyel maya türlerinde bulunan protein yapısındaki bir toksin olduğu bilinmektedir. Toksin genleri çift zincir RNA (dsRNA) molekülleri, linear çift zincir DNA plasmidi veya kromozom üzerinde kodlanmaktadır. Bu partiküllerin yapıları daha iyi anlaşıldığında ökaryot mikroorganizmalardaki önemleri daha fazla belirginleşecekse de, çoğu zaman, bu partiküller büyük bir problem olarak görülmektedir.

Saccharomyces, *Ustilago*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Williopsis*, *Candida*, *Debaryomyces* vb. birçok maya cinsinde killer özellik üzerinde çalışılmıştır. Bunların arasında en iyi anlaşılmış olanı *Saccharomyces cerevisiae*'nin K1 sistemidir. Bu sistem sitoplazmik virüs benzeri partiküllerdeki iki tip dsRNA tarafından kontrol edilmektedir. Bu toksinin öldürme mekanizması iki fazdan oluşmaktadır. İlk aşamada heterodimerik killer protein 1,6-β-D-glukan içeren hücre duvarı reseptörüne atak yapar. Ardından membran proton gradientinin geçirgenliğı bozar, potasyum iyonlarının düzensizleşmesini sağlar ve daha sonra da ATP'nin salınması ile moleküler metabolitlerin azalmasını, en sonunda da hücrenin ölümünü gerçekleştirir.

Endüstride killer toksin üreten maya türleriyle kontaminasyon fırıncılık, biracılık ve şarap üretimi gibi fermentasyon proseslerinde potansiyel bir problemdir.

Anahtar Kelimeler: Killer maya, toksin mekanizması, endüstrideki sorunlar

ABSTRACT: Killer factor is known to be a proteinaceous toxin in many strains of industrial yeasts. The genomes of the toxins have been mapped on double-stranded RNA molecules, a linear double-stranded DNA plasmid and a chromosome. These particles may prove to be of far-reaching importance in eucaryotic microorganisms when their nature is better understood, but for some time they were considered a major nuisance.

Many killer systems were studied so far in various genera of yeast: *Saccharomyces*, *Ustilago*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Williopsis*, *Candida*, *Debaryomyces* and others. The best understood is the killer system K1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Two types of dsRNA in the cytoplasmic virus-like particles control this system. The killing mechanism of this toxin consists of two phases. The first step involves a rapid binding of heterodimeric killer protein to cell wall receptors containing 1,6-β-D-glucan as an essential component. The permeabilization of the membrane proton gradient, efflux of potassium ions, subsequent release of ATP and of low molecular metabolites, and finally death of the cell.

In industrial processes, contamination with killer toxin-producing yeasts species is a potential problem in fermentations; in baking, brewing and wine making processes.

Key Words: Killer yeast, mechanism of toxin, problems in industry

GİRİŞ

Mayalarda killer özellik, ilk kez 1963 yılında, Bevan ve Makower tarafından *Saccharomyces cerevisiae*'da keşfedilmiştir. Killer mayalar olarak adlandırılan bu tip mayalar, duyarlı mikrobiyel hücrelere inhibitör etki gösteren protein ya da glikoprotein üretilen ortama salgırlarlar. Bu salgılanan proteinler, killer protein ya da killer toksin olarak adlandırılmaktadır (1).

* E-mail: ozcelik@eng.ankara.edu.tr

Mayalar killer özellikleri yönünden dört ayrı fenotip göstermektedirler. Bunlar; killer; K, duyarlı; S, nötral; N, killer-duyarlı; K-S suşlardır. Killer suşlar kendi toksinine bağışıklı olup, nötral suşlar hem toksin üretmezler hem de killer toksinine karşı duyarlıdır. Killer-duyarlı suşlar ise killer faktöre sahip olup, aynı zamanda diğer killer mayaların toksinine karşı da duyarlıdır (2).

Killer toksinin özelliğine göre, killer mayalar 11 grupta sınıflandırılabilir (K1-K11). İlk üç grup (K1, K2 ve K3) *Saccharomyces cerevisiae*'ye özgüdür. K1 toksini yüksek sıcaklığa ve proteazlara karşı duyarlı olup, pH optimumu 4,6-4,8 arasındadır. Bu nedenle K1 toksini düşük pH'da inaktif hale geleceğinden, şarap fermentasyonunda önemli değildir. Buna karşılık K2 toksini pH 2,8-4,8 arasında stabildir. K4-K11 killer tipleri ise diğer cins ve türlere özgüdür. Bu nedenle K2 ve belki de K3 faktörü taşıyan mayalar şarap endüstrisinde bir sorun yaratabilirler. Çünkü bunların toksinlerinin şarap fermentasyonunda duyarlı şarap mayalarına karşı öldürücü olduğu saptanmıştır (3). *S. cerevisiae* maya suşlarındaki K1, K2 ve K3 killer tiplerinin yanında KT28 ve K3GR1 killer tipleri de rapor edilmiştir (4). Wingfield ve arkadaşları K3 toksin tipinin K2 toksin tipinin bir mutanti olduğunu ve bu iki tipin K1'den farklı olduğunu belirtmişlerdir (4).

Killer proteinlerin aktivite ya da stabiliteleri pH ve sıcaklığa (genellikle pH 3.5-5.0 ve 20-25 °C'de aktif ve stabildir) dayanmaktadır. Duyarlı hücreler üzerindeki toksin aktivitesi ise membran geçirgenliğindeki değişikliklerle, bazı durumlarda DNA replikasyonunun inhibisyonu veya G1 fazında hücre bölünmesinin durdurulması ile açıklanabilmektedir. Toksin üretimi ortamda besin sağlamada killer mayalara, duyarlı mayalara karşı üstünlük kazandırmaktadır. Benzer şekilde bazı endüstriyel fermentasyon proseslerine yabancı killer mayalar kontamine olduklarında, ortamda baskın duruma geçip ürünü bozmaktadırlar. Buna göre, fermentasyonda kontaminasyonu engellemek için önerilen genel bir çözüm; kontaminanta karşı killer toksin inhibitörü üreten bağışık endüstriyel türler oluşturmaktır (1).

Killer sistem özellikle şarap ve bira fermentasyonları ile ekmek üretim prosesi olmak üzere değişik fermentasyonlarda görülebilir (5). Killer maya türleri, değişik gıda ve içki fermentasyonlarından olabildiği gibi, göller, nehirler, meyve ve sebzeler gibi değişik ortamlardan da izole edilmişlerdir. Ekolojik çalışmalar killer aktivitenin toksin üreterek habitatından diğer mayaları uzak tutmak şeklinde bir rekabet mekanizması olduğunu işaret etmektedir (6).

Killer mayalar

Toksin üreten killer mayalar; *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* ve *Zygosaccharomyces* olarak tanımlanmıştır (7).

Saccharomyces cerevisiae türüne ait olan suşlarda, stoplazmada bulunan virüse benzer çift sarmallı RNA partikülleri killer sistem olarak bilinmektedir. Toksin, hücre içi veya hücre dışı kaynaklı olmaktadır. K1 killer suşu tarafından üretilen K1 toksini hücre dışı toksin olup, küçük monomerik bir proteindir ve ısıya stabil, sadece pH 4,2-4,6'da aktiftir. K1 toksini, eksponensiyel büyüme fazında hücreden ayrılmakta ve toksine hassas hücrelerde glukanolara bağlanarak, hücre membranı geçirgenliğini bozmaktadır (9).

Mayalardaki killer toksinin duyarlı hücrelerin duvarlarında bulunan bir reseptöre bağlanarak hücre membranının geçirgenlik özelliğini değiştirdiği kabul edilmektedir (9, 10, 11).

Kluyveromyces lactis türüne ait olan killer mayalar çift sarmallı linear DNA plazmidi taşımaktadırlar. Yüksek moleküler ağırlıkta iki alt üniteli toksin üretmektedirler. Bu toksin, adenil siklaz aktivitesini inhibe etmektedir.

Hansenula mrakii'ye ait olan K11 toksini hücre membranı geçirgenliğini bozmaktadır. Ayrıca, pH 4-11 gibi geniş bir pH aralığında ve yüksek sıcaklıklarda stabildir. *Saccharomyces cerevisiae*'nin ürettiği K1 toksininden daha küçüktür.

Pichia kluyveri'ye ait toksin glukoprotein olarak bilinmektedir ve pH 2,5-4,7 ile 40 °C'nin üzerinde stabildir. *P. kluyveri* toksini, önce hücre duvarını ve daha sonra da hücre membranını bağlayarak etkisini göstermektedir. Membranın bağlanması, büyük bir olasılıkla, oluşan gözenekler elektrokimyasal potansiyeli tahrip ederek sonuçta hücrenin ölümüne neden olmaktadır (12).

Çizelge 1. Bazı killer mayaların genetik temelleri ve toksin genleri (8)

Maya	Genetik Temel	Toksin Geni
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	dsRNA virüs	M1-, M2-, M28
<i>Hansenula uvarum</i>	dsRNA virüs	M-dsRNA
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	dsRNA virüs	M-dsRNA
<i>Ustilago maydis</i>	dsRNA virüs	M-dsRNA
<i>Kluyveromyces lactis</i>	linear dsDNA plazmid	pGK11
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	kromozomal	Tanımlanamadı
<i>Pichia acaice</i>	linear dsDNA plazmid	pPac1
<i>Pichia inositovora</i>	linear dsDNA plazmid	pPin1
<i>Pichia kluyveri</i>	kromozomal	Tanımlanamadı
<i>Pichia farinosa</i>	kromozomal	SMK1
<i>Pichia anamola</i>	kromozomal	Tanımlanamadı
<i>Williopsis mrakii</i>	kromozomal	HMK
<i>Williopsis saturnus</i>	kromozomal	Tanımlanamadı
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	kromozomal	Tanımlanamadı
<i>Debaryomyces hansenii</i>	kromozomal	Tanımlanamadı
<i>Candida glabrata</i>	kromozomal	Tanımlanamadı

S. cerevisiae'da killer durum

Genetik çalışmalar *S. cerevisiae*'nin killer fenotipinin sitoplazmik kalıtım olduğunu ve killer hücrenin sitoplazmasında virüs benzeri partiküllerle bağlantılı olarak bir çift zincir RNA (dsRNA) var olduğunu göstermektedir. Buna karşın, killer fenotip her zaman dsRNA ile determine edilmez. *Kluyveromyces lactis* gibi diğer maya cinslerinde, killer fenotip için gerekli bilgi düz zincir dsDNA tarafından taşınmaktadır. *Candida* sp. ve *Hansenula anamola*'nın killer karakteri ise ekstrakromozomal genlerle değil, kromozomal genlerle kodlanmıştır (13).

S. cerevisiae'da bulunan M dsRNA, killer toksini ve bağışıklığı kodlar. M dsRNA'nın M1 dsRNA (1,9 kB), M2 dsRNA (1,7 kB), M3 dsRNA (1,5 kB) gibi değişik tipleri vardır. Bu tipler K1, K2 ve K3 toksinleriyle uyumlu olabilmektedirler. M dsRNA'lar hücrede 10-100 arasında değişen yüksek kopya sayılarında bulunmaktadır. Diğer bir dsRNA (4,7 kB) L dsRNA şeklinde dizayn olmuştur ve M formundan 3 kat daha büyüktür. Hücredeki kopya sayısı 100 ile 1000 arasında değişir. Bu tip M dsRNA içermeyen ve killer proteinlere duyarlı, hemen hemen bütün *S. cerevisiae* izolatlarında bulunmaktadır. Aslında, M tip dsRNA'nın enkapsülasyonu ve replikasyonu L tip dsRNA'ya dayanmaktadır. L tip dsRNA 2 farklı tip RNA molekülü içerir; L-A ve L-BC. L-A tipi hem M hem de L tip dsRNA molekülleri için enkapsülasyonu sağlayan major kapsid proteinleri kodlar. L-BC tipinin L-A tipiyle benzerliği yoktur. Bu tip, K1 tip killer türlerde küçük kapsid proteini kodlar. Fakat çoğu killer tür L-BC tip dsRNA molekülü içermez. Günümüzde, hala L-A ve de L-BC tipleri tam olarak anlaşılamamıştır.

Çizelge 2. S. cerevisiae fenotipleri ve özellikleri (14)

Fenotip	Özellikler
$K_1^+ R_1^+$	Killer protein üreten, kendi proteinine bağışık, K_2 ve K_3 proteinlerine duyarlı türler
$K_2^+ R_2^+$	Killer protein üreten, kendi proteinine bağışık, K_1 ve K_3 proteinlerine duyarlı türler
$K_3^+ R_3^+$	Killer protein üreten, kendi proteinine bağışık, K_1 ve K_2 proteinlerine duyarlı türler
$K^- R^-$	Nötral fenotip (killer protein üretmezler ve bağışık türler)
$K_1^{++} R_1^+$	Süper killer fenotip (daha aktif ve daha stabil K_1 killer protein üreten türler)
$K_1^+ R_1^w$	Suicidal fenotip (toksin üreten ve K_1 toksinine karşı azalan bir bağışıklık gösteren türler)
$K^- R^-$	Killer protein üretmeyen duyarlı türler

S. cerevisiae türlerinin T, W ve XL gibi başka dsRNA tipleri de vardır. Bu tiplerin de killer olayı tam anlayamamış olmakla beraber, bazı çalışmalar bunların M dsRNA'larda oluşan bazı silinmeler sayesinde oluştuklarını göstermektedir (14).

Killer mayaların etki mekanizmaları

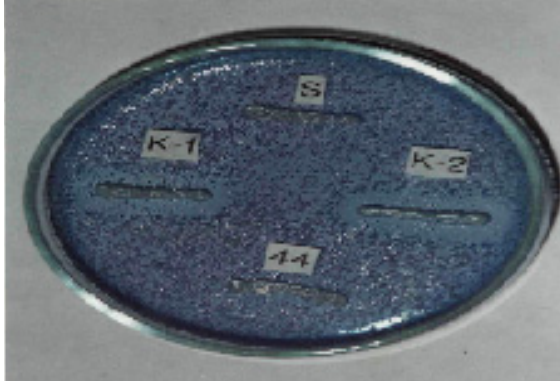
Duyarlı hücrelerin logaritmik gelişme evresi killer toksine karşı en hassas oldukları dönemdir. Elde edilen kurveye göre duyarlı hücrelerin gelişen kültürü killer toksine maruz kaldığı zaman, bazı komponentlerin sentezi giderek durmuş ve killer yüklemesiyle korelasyon içinde olmamıştır. Belirlenebilir inhibisyona kadar %70-80 ölü hücre oluşmuştur. Generasyon zamanının yarısında tamamen duran bir proses söz konusu olmamıştır.

Protein sentezinin inhibisyon zamanı kültürün gelişme hızına dayanmaktadır. Besin ortamında gelişen kültürler minimal ortamda gelişen kültürlerden daha sonra durmaktadır. İnhibisyon, killer eklendikten sonra generasyon zamanıyla orantılı olarak görülmektedir (15).

Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3 ve Şekil 4 maya suşlarının killer özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmış testlere ait görüntülerdir. Şekil 1.'de standart duyarlı suş üzerine sürülen test mayası (Örnek No: 44), K1 ve K2 killer mayalar gibi bir inhibisyon zonu vermemiş, bu nedenle 44 numaralı örneğin killer özellik göstermediği sonucuna varılmıştır. Duyarlılık testinde, test mayası (Örnek No: 23) üzerine sürülen K1 ve K2 tip mayaları bir inhibisyon zonu vermişlerdir. Bu nedenle bu mayanın duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 2.). fakat Şekil 3.'te görüldüğü gibi diğer bir test mayası (Örnek No: 38) üzerine sürülen K1 ve K2 tip killer mayaların her ikisi

Çizelge 3. Değişik hücre duvarı polisakkaritleri ile killer toksinin yarışmalı etkisi (14)

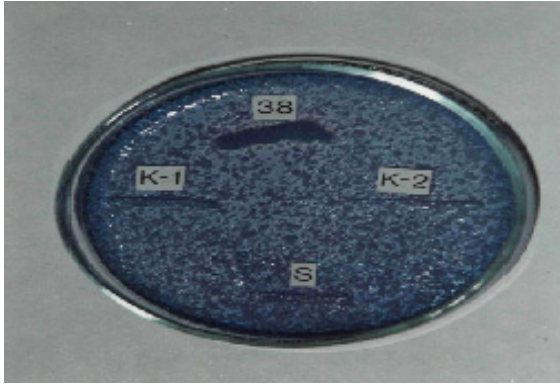
<i>S. cerevisiae</i> Hücreleri (kob/ml)	Polisakkarit	Killer Toksin	Canlı <i>S. cerevisiae</i> Hücreleri (x10 ² kob/mL)
1x10 ⁵	Kontrol (polisakkarit)	Toksin yok	120000
1x10 ⁵	Kontrol (polisakkarit)	16 µg/mL	0,48
1x10 ⁵	Pullulan (g mg/mL)	16 µg/mL	0,56
1x10 ⁵	Mannan 9 mg/mL	16 µg/mL	0,48
1x10 ⁵	Pustulan 9 mg/mL	16 µg/mL	27000
1x10 ⁵	Kitin 9 mg/mL	16 µg/mL	50000
1x10 ⁵	Laminarin 9mg/mL	16 µg/mL	100000
1x10 ⁵	B-Glukan 9 mg/mL	16 µg/mL	110000



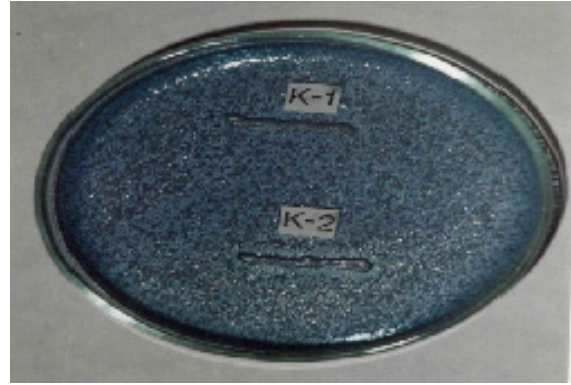
Şekil 1. Test edilen örneğin "killer" özellikli olmadığına dair görüntüsü (4)



Şekil 2. Test edilen örneğin "duyarlı" olduğuna dair görüntüsü (4)



Şekil 3. Test edilen örneğin "nötr" olduğuna dair görüntüsü (4)



Şekil 4. Killer toksin tiplerinin birbirine etkili, fakat kendi toksinine bağımsız olduğuna dair görüntüsü (4)

de inhibisyon zonu vermemişlerdir. Bu nedenle örnek mayanın nötr bir suş olduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 4.'te petri tabanına yayılan K1 mayası üzerine K1 ve K2 killer mayası sürülerek, killer toksin tiplerinin birbirine etkili fakat kendi toksinine bağımsız olduğu kanıtlanmıştır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar K1 toksininin duyarlı hücre plazma membranındaki TOK1 kanallarını direk olarak harekete geçirdiğini (potasyum akışını aşırı miktarda artırır ve hücre ölümüne neden olur) göstermektedir. K1 killer hücreleri iki tür viral komponentten oluşurlar. L-A komponenti viral transkripsiyonu, replikasyonu ve enkapsülasyonu sağlarken; M1 δ - α - γ - β preprotoksini kodlar. Hücre içi enzimler toksin prekürsörünü hazırlar ve hücre olgunlaşmış K1 toksinini 3 disülfid bağı ile bağlı α - β heterodimeri şeklinde salgılar (16).

Öldürme işlemi iki aşamalı bir mekanizmadan oluşur. K1 ilk önce mayanın hücre duvarındaki 1-6- β -D-glukan reseptörlerine atak yapar ve bu proses β zinciri tarafından kontrol edilir. Ardından α zinciri maya hücre plazma membranına etki eder ve düzensiz potasyum akışına, sonra da hücrenin ölümüne neden olur. Ahmed ve arkadaşları TOK1 potasyum kanalını K1 toksini için hedef olan bir plazma membranı şeklinde tanımlamışlardır. Toksin başka bir mayaya veya viral proteine ihtiyaç duymadan TOK1 kanalını aktive eder. Duyarlı hücre tarafından direnç gösterilirken, TOK1 geninin aşırı ifadesi toksine duyarlılığı artırmaktadır (16).

Killer hücrelerin toksinlere karşı nasıl bağımsızlık kazandığı ise hala bir sır olarak durmaktadır. Ancak, uzun zamandan beri, toksinin öldürme ve bağımsızlık mekanizmasını, δ - α - γ - β preprotoksini etki mekanizmasını açıklayarak yapılabileceği düşünülmektedir. Buna ek olarak, bağımsızlığın plazma membranında yer aldığına dair üç bulgu bulunmaktadır. Birincisi; killer hücreler toksini hücre duvarlarında normalde taşırlar ve bağımsız bir

Çizelge 4. Killer toksinler ve hedef hücredeki reseptörleri (14)

Killer Toksin	Reseptör
K1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	β -1,6-D-Glukan
K2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	β -1,6-D-Glukan
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Kitin
<i>Pichia acaciae</i>	Kitin
HM-1 <i>Williopsis mrakii</i>	Hücre duvarı β -1,6-D-Glukanı
<i>Pichia membranifaciens</i>	β -1,6-D-Glukan
<i>Debaryomyces hansenii</i>	β -1,6-D-Glukan
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	β -1,6-D-Glukan
KT28 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hücre duvarı mannopteini
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Hücre duvarı mannopteini
K5 <i>Pichia anomala</i>	β -1,3-D-Glukan

şekilde dururlar. İkincisi; killer'a karşı dirençli hedef hücrelerin hücre duvarlarında toksin atağını ve toksine duyarlı seroplastları azaltarak direnç göstermesidir. Üçüncüsü ise; bazı direçli türlerin normal hücre duvarı varken toksin atağı sırasında bağışık seroplast üretmesidir (16).

Mayaların hücre duvarları %85-90 oranında polisakkarit ile %10-15 oranında proteinden oluşur. Maya hücre duvarının başlıca komponenti β -1,3-glukandır (%50 civarında bulunur). β -1,6-D-glukan ise %15 oranında bulunmaktadır. Bunun dışında %0,6-9 arasında kitin içermektedir. Bu dağılım türlere göre oldukça değişkendir. Değişik killer toksinler için çeşitli primer reseptörler tanımlanmıştır. β -1,3-D-glukanlar ve β -1,6-D-glukanlar *Hansenula mrakii*'de hücre duvarı reseptörü olarak rol oynayabilirler. β -1,6-D-glukanlar, *S. cerevisiae* K1 ve K2 killer toksinleri ile *Hanseniaspora uvarum* killer toksinleri için primer reseptörlerdir. *S. cerevisiae*'nin KT28 tipi ve *Zygosaccharomyces bailii* için mannopteinler reseptör olarak görev yapmaktadırlar. *Kluyveromyces lactis* killer toksininin reseptörü ise kitindir. *Pichia membranifaciens* ve *Debaryomyces hansenii* killer toksinleri için yine β -1,6-D-glukanlar primer reseptör olarak bulunmuşlardır. Yani, hücre duvarındaki çeşitli komponentler bir killer toksin için primer reseptör olarak rol oynayabilir.

Endüstride killer maya sorunu

Endüstriyel fermentasyonlarda kullanılan starter kültürün istenmeyen mayalarla kontaminasyonu veya fermentasyon sırasında oluşan kontaminasyon ürün verimini ve kalitesini önemli ölçüde düşürebilir. Özellikle de killer toksin üreten mayalarla kontaminasyon fermentasyon endüstrisinde önemli bir problemdir (17, 18). Araştırma sonuçlarına göre, killer mayalar değişik şarap fermentasyonlarında farklı biçimde dağılım göstermektedir. Karyotip analizi, genellikle, şarap fermentasyonunda karışık bir killer popülasyon olduğunu göstermektedir. Killer fenotipin en sık görüleni *Saccharomyces cerevisiae* türü içindedir. Killer türlerin dağılımı ortamın pH değerinden etkilenmektedir (19). Killer mayalar zamanla şarap fermentasyonunda baskın duruma geçmektedirler. Bir killer maya pozitif enolojik karakteristiklere sahip olursa ve starter kültür olarak kullanılırsa şarap fermentasyonu sorunsuz tamamlanacak ve fermentasyon prosesi kendi kendini koruyabilecektir. Starter kültür olarak killer maya seçiminde dikkat edilmesi gereken nokta mayanın kendi doğal çevresinde test edilmesidir. Çünkü killer mayalar büyük ölçekli şarap fermentasyonlarında, yapay besiyeri ortamındaki testlerden daha farklı karakter özelliği gösterirler (20).

Fermentasyon proseslerinde kullanılan mayalar normalde killer özellik göstermezler. Bu killer olmayan endüstriyel türleri killer türlere dönüştürmek fermentasyon prosesini istenilmeyen kontaminasyonlardan önemli ölçüde koruyacaktır. Ayrıca; şarap, bira ve diğer damıtık içkilerin üretimlerine olumlu katkılar sağlayacaktır. Endüstriyel talepler için killer hücrelerden elde edilmiş olan çift zincir RNA'nın *S.cerevisiae*'ya kimyasal yollarla aktarılması protoplast füzyonundan daha avantajlı görülmektedir (21).

Şarap taze üzüm şirasının etil alkolle fermentasyonu ile elde edilen alkollü bir içkidir. Şarap teknolojisinde spontan veya saf mayalarla fermentasyon yapılmaktadır. Spontan olarak yapılan fermentasyonlarda istenmeyen

mikroorganizmalar ile kontaminasyon problem yaratmakta, daha çok da şarap fermentasyonunda büyük riskler doğurmaktadır. Çünkü şıra, bira ve ispiroculukta olduğu gibi pastörize edilmediği için içinde şarap mayaları ile birlikte yabani mayalar, bakteriler, küf mantarları ve sporları bulunmaktadır (2).

Bira fermentasyonu üzerine yapılan bir çalışmada bira mayalarının da killer mayaların aktivitelerine karşı duyarlı oldukları ve toplam maya popülasyonu %0,1 oranında killer mayalar ile kontamine olursa, 24 saat içinde duyarlı bira mayalarının ortamdaki kaybolabileceği belirtilmektedir (22).

Şarap fermentasyonunun çok yavaş ilerlediği tanklarda yapılan bir çalışmada, metilen mavisi ile boyanan mayaların %90'ının ölü hücreler olduğu, canlı hücrelerin ise killer özellik gösterdikleri saptanmıştır. Killer özellik gösteren *S.cerevisiae* şarap mayalarının diğer cins ve türdeki mayaları öldürme yeteneklerinin sınırlı olduğu ve genetik yapılarının stabil olmadığı, bu nedenle şarap fermentasyonlarında nötral mayaların kullanılmasının daha uygun olacağı belirtilmiştir (23).

Killer mayaların, şarap fermentasyonunda istenmeyen *S. cerevisiae* türleri ve diğer yabani maya türlerinin gelişmesini önlemede ve fermentasyonda istenmeyen bileşiklerin (örneğin aşırı H₂S oluşumu, uçar asitler) ve flavor oluşumunun iyi bir şekilde kontrolünde kullanılabileceği düşünülmektedir (24, 4).

SONUÇ

Killer mayaların faaliyeti sonucu fermentasyon yavaşlamakta veya durmakta, bu olay fermentasyon süresinin uzamasına ve sek şaraplarda yüksek oranda şekerin kalmasına sebep olmaktadır. Şarap ve bira endüstrisinde son yıllardaki eğilim; killer özelliğe sahip, şaraplık kalitesi iyi bir maya geliştirmektir. Bunun sonucu fermentasyonda önkültür olarak killer maya kullanılırsa, kuvvetli bir ihtimalle killer mayalar dominant olacak ve fermentasyonu tamamlayacaklardır (2).

Bevan ve Makower tarafından *S. cerevisiae*'da killer özelliğin ilk keşfinin ardından ortaya değişik cins ve maya türünde killer tipler çıkmıştır. Birçok araştırmacı killer fenomeni üzerinde değişik alanlarda çalışmalar yapmışlardır. Killer toksinlerin doğası hakkında birçok bilgi bulunmasına rağmen, killer toksin ve bunların etki mekanizması konusundaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Son zamanlarda yapılan bazı araştırmalarda, fermentasyonlarda kullanılabilecek bazı killer türler tanımlanmış olsa da, bunlar üzerinde daha ayrıntılı denemeler yapmak ve genetik olarak bu türlere stabilite kazandırmak gerekmektedir. Bu konu üzerindeki genetik çalışmalar giderek ağırlık kazanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. İzgü F, Altınbay D and Derinel Y. 2004. Immunization of the industrial fermentation starter culture strain of *Saccharomyces cerevisiae* to a contaminating killer toxin-producing *Candida tropicalis*. Food Microbiol., 21, 635-640.
2. Özçelik F, Türkmen U and Ateş S. 1996. Farklı bölgelerden izole edilen şarap mayalarının killer özelliklerinin belirlenmesi. Tr. J. of Biology, 20, 241-249.
3. Van Vuuren HJJ and Wingfield BD. 1986. Killer yeast-cause of stuck fermentation in a wine cellar. S. Afr. J. Enol Vitic., 7(2); 113-118.
4. Türkmen U. 1993. Farklı bölgelerden izole edilen şarap mayalarının killer özelliklerinin belirlenmesi. Ank. Üniv. Gıda Bil. ve Tek. Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 37s.
5. Pommier P, Strehaiano P and Delia ML. 2005. Modelling the growth dynamics of interacting mixed cultures: a case of amensalism. Inter. J. of Food Microbiol., 100, 131-139.
6. Jacobs CJ and Van Vuuren HJJ. 1991. Effects of different killer yeast on wine fermentations. Am. J. Enol. Vitic., 42(4); 295-300.
7. Bartunek M, Jelinek O and Vondrejs V. 2001. Susceptibility of individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* to the killer toxin K1. Biochem. and Biophysic. Research Communications, 283, 526-530.

8. Chen X, Wesolowski-Louvel M, Tnguy-Rougeau C and Fukuhara H. 1991. Promoter activity associated with the left inverted terminal repeat of the killer plasmid K1 from yeast. *Biochemie*, 73, 1195-1203.
9. Pfeiffer P and Radler F. 1984. Comparison of the killer toxin of type K2. *Arch. Microbiol.*, 137, 357-361.
10. Rosini G. 1983. The occurrence of killer characters in yeasts. *Can. J. Microbiol.*, 29, 1462-1464.
11. Seki T, Choi GH and Ryu D. 1985. Construction of killer yeast strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49(5); 1211-1215.
12. Evliya B, Enginkaya Z and Var I. 1996. Bazı fermente gıdalardan öldürücü mayaların (killer yeasts) izolasyonu ve fermente ürünlerde starter olarak kullanma olanaklarının araştırılması. Çukurova Üniv. Proje No: TOGTAG-1233.
13. Soares GAM and Sato HH. 1999. Killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L active against Fleischman and Itaiquara commercial brands of yeast. *Rev. Microbiol.*, 30(3), Sao Paulo July/Sept.
14. Sertkaya A. 2005. Investigation of cytotoxic effect of K5 type yeast killer protein on sensitive microbial cells. Middle East Technical University, The Degree of Master of Science, 87s.
15. Bussey H. 1972. Effects of yeast killer factor on sensitive cells. *Nature New Biology*, 235, 73-75.
16. Sesti F, Shih TM, Nikolaeva N and Goldstein SAN. 2001. Immunity to K1 killer toxin: internal TOK1 blockade. *Cell*, 105, 637-644.
17. Radler F and Schmitt M. 1987. Killer toxins of yeast: inhibitors of fermentation and their adsorption. *J. of Food Protection*, 50(3); 234-238.
18. İzgü F, Altınbay D and Yuceliş A. 1997. Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Food Microbiol.*, 14, 125-131.
19. Kitano K, Sato M, Shimazaki T and Hara S. 1984. Occurrence of wild killer yeasts in Japanese wineries and their characteristics. *J. Ferment. Technol.*, 62(1); 1-6.
20. Zagorc T, Maraz A, Cadez N, Povhe Jemec K, Peter G, Resnik M, Nemanic J and Raspor P. 2001. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiol.*, 18, 441-451.
21. Salek A, Schnettler R and Zimmermann U. 1992. Stably inherited killer activity in industrial yeast strains obtained by electrotransformation. *Microbiol. Letters*, 96, 103-110.
22. Russel I. 1986. Killer yeast identification. *ASBC Journal*, 44(3);123-125.
23. Tredoux HG, Tracey RP and Tromp A. 1986. Killer factor in wine yeasts and its effects on fermentation. *S. Afr. J. Enol Vitic.*, 7(2); 105-112.
24. Jacobsen GK. 1985. Eastern grape grower and winery news. August/September, 29-31.