

EKMEK MAYASI SUŞLARININ İYİLEŞTİRMESİ İLE İLGİLİ SON GELİŞMELER

THE LATEST PROGRESS IN THE IMPROVEMENT OF BAKER'S YEAST STRAINS

Nuray KARAKAŞ, Merih KIVANÇ

Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, ESKİŞEHİR

ÖZET: Günümüzde kullanılan geleneksel ekmeğ mayası suşları, ekmeğ mayası üreticilerinin farklı isteklerine cevap verememektedir. Hem üreticiler hem de tüketiciler için ekmeğ mayası suşlarının kalitesinin düzeltilmesi amacıyla, genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak, suş iyileştirilmesi programları geliştirilmektedir. Bu derlemede, bu amaçla hedeflenen çalışmalar özetlenmiştir.

ABSTRACT: Nowadays, the traditional baker's yeast strains have become inadequate to satisfy the baker's diverse needs. Strain improvement programs to better quality, for both consumer and manufacturers, by using genetic engineering techniques have been developed. In this review, the possible targets of these programs are summarized.

GİRİŞ

Çoğunluğu Ascomycetes sınıfına dahil olan mayalar, mantarların taksonomik ve filogenetik açıdan çeşitlilik gösteren bir grubunun üyeleridir. Günümüzde maya; tomurcuklanma ya da bölünme ile çoğalan tek hücreli fungus veya çok hücreli bir fungusun yaşam döngüsünde özel, tomurcuklanan tek hücreli durum olarak tanımlanır. (KREGER-VAN RIJ, 1984). WINGE (1935) tarafından başlatılan maya genetiği çalışmaları sayesinde, ökaryotik organizmalarda genetik materyal ve mekanizmaların aydınlatılmasında önemli mesafeler alınmıştır. Ekmeğ mayası, nişastalı substratlardan veya melastan üretilen üst fermentasyon tipi kültür mayasıdır (CANBAŞ, 1995). Ekmeğ mayası üretiminde kullanılan işletme kültürü, saf bir maya kültüründen üretilen spor veya hücre kültürü olabilir. Yılda 2 milyon tona yaklaşan ekmeğ mayası endüstrisinde alt türler arası farklar, türler arası farklılıklardan daha önemlidir. Bu konu gelecekte patent korunması bakımından daha da önem kazanacaktır. Ekmeğ mayacılığında kullanılacak suşların seçimi ve iyileştirilmesinde, suşun iyi kabarmama-yalanma aktivitesine sahip olması ve az masraf ile iyi ürün elde edilmesi hedeflenmektedir. Bu nedenle kullanılan geleneksel maya suşları, son yıllarda maya üreticisinin farklı ve kompleks isteklerine cevap verememektedir. Çeşitli araştırma laboratuvarlarında yürütülmekte olan maya genetiği ve biyolojisi çalışmalarından elde edilen bilgilerin ışığında, ekmeğ mayası üretiminde kullanılan geleneksel maya suşlarının iyileştirilmesi ve geliştirilmesi ile ilgili konu başlıkları aşağıda verilmiştir.

1. MALTOZU KULLANABİLEN EKMEK MAYASI

Ekmeğçilik sistemleri içerdikleri şeker miktarına göre sınıflandırılırlar. Sade (zayıf) hamurda sonradan ilave edilmiş şeker bulunmaz ve mayanın fermente edebileceği şeker, un içinde doğal olarak bulunan α ve β amilazlar ile parçalanmış nişasta moleküllerinin hidrolizi ile elde edilen maltozdur. Bu tip hamurlarda maltozu iyi derecede fermente eden maya suşları tercih edilmektedir. Mayalarda maltoz kullanımı ile ilgili enzimler, ortamda maltozun bulunması ve glukoz konsantrasyonunun % 0.1'den daha az olması durumunda stimüle edilir. *S. cerevisiae* suşlarında maltoz kullanımı ile ilgili α -D glukozidaz (maltaz) ve maltoz permeaz enzimleri var-

dır. Ortamda glukoz bulunmadığında, spesifik olmayan trasport ile birkaç maltoz molekülü hücreye girerek, hücreye maltoz girişini sağlayacak maltaz ve maltoz permeaz enzimlerini aktive eder. Maltoz hücrede maltaz enzimi ile iki glukoz molekülüne yıkılarak metabolize edilir. Bu iki enzim için lag periyodu suşa bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle, genetik olarak modifiye edilmiş maya suşlarında ortamda glukoz bulunduğunda, maltozu kullanabilme standart hamurda önemli bir üstünlük sağlamaktadır. Suşların modifikasyonu ya sürekli maltoz ve maltoz permeaz aktivitesine sahip suşların yapımı ya da MAL genlerinin kopya sayısının artırımı ile gerçekleştirilebilir. Maltozun karbon kaynağı olarak kullanması ile ilgili beş bağımsız genden oluşan MAL gen sistemindeki bir mutasyon maltoz enziminin sürekli sentezlenmesine neden olur (KHAN ve EATON, 1971). Bu mutasyona sahip mayaların pek çoğu ekme mayacılığı için uygun suşlar değildir. Fakat ekme mayacılığı suşları ile bu mutant suşların çaprazlanmasından elde edilen hibridlerde lag periyodu gözlenmeden maltozun fermente edildiği saptanmıştır. A.B.D., Fransa ve Hollanda'da yapılan çalışmalarda klasik hibridizasyon ve protoplast füzyon teknikleri ile, bu hibridlerin ozmotolerans, kabarma aktivitesi gibi karakterler bakımından da iyileştirilebilecekleri gösterilmiştir.

Son yıllarda ekme mayacılığı endüstrisine sunulan instant active dry yeast (IADY) Spesifik kabarma karakteristiklerine sahiptir. Bu suşların yapımından sürekli olarak maltaz veya maltoz permeaz sentezi amaçlanmıştır. Çalışmalar maltoza hızla adaptasyonunun sadece hamur aktivitesini düzeltmekle kalmayıp, kuruma süresince de stabilite sağladığını göstermiştir. MAL genleri sayesinde büyüme süresince trehaloz birikimi, mayayı kurumaya karşı dirençli hale getirmekte etkili bir faktör olabilir. Bu genetik özelliklere sahip suşlar hamurda iyi mayalanma özelliği de göstermektedirler.

Hamura sadece glukoz veya sukroz eklendiğinde MAL gen sistemi enzimlerinin sürekli sentezinin hamur üzerine etkisi çok azdır. Hollanda'da Gist-Brocades firması genetik mühendisliği teknikleri ile glukoz varlığında, maltozu kullanabilen ve hamurda %20 daha yüksek perfermonsa sahip bir ekme mayası suşu geliştirmişlerdir. Oluşturulan yeni ürün İngiltere'de kullanım iznine sahip olmasına rağmen, halkın tepkisi düşünülecek henüz piyasaya sürülmemiştir (DAĞAŞAN, 1994).

2. OZMOTÖLERANT MAYA

Ekme mayacılığında kullanılan geleneksel maya suşlarında mayalanma aktivitesi hamurda (özellikle tatlı hamurda) şeker ya da tuz konsantrasyonu kritik seviyeye ulaştığında inhibe edilmektedir. Geleneksel maya suşları kullanılan proseslerde inhibisyonun etkisi yüksek oranda maya kullanılarak giderilmeye çalışılmaktadır. Ekonomik açıdan olaya bakıldığında ozmotolerant ekme mayası suşlarının geliştirilmesi kaçınılmazdır. Mayalarda ozmotolerans ile ilgili genetik sistemler tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalara göre ozmotolerant maya suşunun; yüksek ozmotik basınçta dengeleme yapabilmesi için, yüksek seviyede intraselüler gliserol biriktirebilmesi, karbon kaynağı olarak ve belki membran bütünlüğü için yüksek derecede trehaloz seviyesine ve özellikle şeker kaynağı olarak sukroz kullanıldığında, düşük ozmotik basıncı korumak için düşük invertaz aktivitesine sahip olması gerekmektedir. Araştırmacılar osmofilik ve ozmosensitive maya suşlarındaki farklı bazı proteinlerin temelde aynı olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu iki mayada intraselüler komponentler farklıdır ve bu mayaların yüksek seviyede polihidrik alkol üreten ve biriktiren suşlarında yüksek ozmotik basınca belirli bir tolerans vardır. Ozmoregülasyon ile ilgili çalışmalarda ozmotolerant bir maya olan *S. rouxii* kullanılmıştır. *S. rouxii* 0.6-1.0 değerleri arasındaki su aktivitesinde (Aw) gelişebilir. Çok duyarlı *S. cerevisiae* suşları şekerli ortamda Aw 0.9'da gelişir. *S.rouxii* düşük su aktivitesine hücre içinde hızlı gliserol üretimi ve birikimi ile cevap verir, bu durumda *S.rouxii* hücre membranı gliserole geçirgen değildir. Aynı şartlarda *S. cerevisiae* hücre membranı gliserole karşı geçirgen olduğundan, üretilen gliserol hücre içinde birikmez (BROWN ve EDGLEY, 1980). Suş iyileştirilmesi çalışmalarında, *Saccharomyces* türlerinin sporulasyon ve eşleşme kabiliyetlerinin düşük olması nedeni ile, hibridizasyon teknikleri başarısız olmuştur. KOSIKOV ve MIEDUIEDIEVA (1976) iyileştirilmiş ozmotolerant mutantlar izole etmişlerdir; fakat, bu mutantlar ticari suşlar ile hibridizasyona

uygun değildirler. Yinede bazı araştırmacılar kullandıkları hibridizasyon teknikleri ile ozmotolerant maya suşları elde etmişlerdir. LEGMAAN ve MORGOLITH 1983 de protoplast füzyonu ile yüksek fermentasyon kabiliyetine sahip *S. cerevisiae* ve ozmotolerant *S. rmellis* suşlarından stabil hibritler elde etmişlerdir. Bu suş sadece alkol endüstrisinde kullanılmıştır. diğer alanlarda kullanımına dair bir rapor henüz yoktur. 1985'de SPENCER ve arkadaşları tatlı hamur sisteminde performans gösteren *S. diastaticus* ve *S. rouxii* hibritini protoplast füzyonu ile elde etmişlerdir. Ayrıca, IADY de kullanılabilir yeterli tatlı hamur aktivitesine sahip, stabil ozmotolerant suş da yapılmıştır. 1996 da GAXIOLA Meksika'da NaCl ye oldukça dayanıklı ilk halotolerant *S. cerevisiae* mutan-tını izole etmiştir.

Araştırmacılar ozmotolerans ile ilgili fiziksel bilgilere sahip olmakla birlikte, olayın biyokimyasal temeli çok az bilinmektedir. Ozmotolerant suş elde etmek ve suş iyileştirilmesinde gerekli olan yeni genetik stratejilerin geliştirilebilmesi için öncelikle, ozmotolerans ile ilgili gen sistemleri anlaşılmalıdır.

3. TREHALOZ BİRİKİMİ

Trehaloz indirgenemeyen bir disakkarit olup, mayalarda depo karbonhidratıdır. Hücrede, hücrenin içinde bulunduğu büyüme dönemine göre %0-10 oranında bulunur. Ekmek mayasının raf ömrünün belirlenmesinde çok önemli bir role sahip olan trehaloz, hücre membranının stabilizasyonunda da rol alır. Kompreslenmiş ekmek mayasının raf ömrü ve mayalanma yeteneği ekmekçilik ve ekmek mayacılığı için önemli karakterlerdir. Bu özelliklerde hücrenin trehaloz içeriği, protein içeriği, olgunlaşması ve tomurcuklanan hücrelerin oranı (FBC) ile ilgili (YUAN ve BELLGARDT, 1994). YUAN ve BELLGARDT (1994) yaptıkları çalışmada ekmek mayası üretiminde, kültürün FBC'sini minimuma indirerek, hücrede yüksek trehaloz oranı korunmuş ve daha uzun süreli raf ömrü sağlamışlardır. Fakat kısa süreli saklamada tam tersi bir sonuç almışlardır. Daha sonraki çalışmalar ise, bu yöntemin aktif kuru mayanın kalite kontrolünde kullanılabilirliğini göstermiştir. Trehalozun OH gruplarının fosfolipidlerin fosfat grubu arasındaki H bağı, membranı dehidratasyondan korur. Trehalozun diğer bir özelliğide anti-stres bir madde olmasıdır. Ekmek mayası üretiminin sonunda, beslenme olmadan havalandırmanın hücrede depo karbonhidratları, özellikle trehaloz seviyesinde artış etkisi yaptığı, bunun da mayanın depolanma sabitliğini artırdığı saptanmıştır (REED ve NAGODAWITHANA, 1991). Mayalarda MAL genleri sürekli aktif olduğunda trehaloz birikimi fenotipi ortaya çıkar. MAL da bir mutasyon trehaloz birikimini durdurur. Bu genetik sistem tam olarak açıklığa kavuşmadıkça klasik tarama yöntemleri, suş iyileştirilmesi için kullanılabilir tek yöntem olarak kalacaktır. Son yıllarda mayada trehaloz miktarını arttırmak için trehaloz sentezini sağlayan iki enzimin faaliyetini arttırmaya ya da trehaloz yıkımını sağlayan enzimin inhibisyonunu sağlamaya yönelik çalışmalarda moleküler biyoloji teknikleri yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

4. İNVERTAZ ENZİMİNİN ETKİSİ

İnvertaz enzimi sukrozu glukoz ve fruktoza çevirmede rol alır. Özellikle *S.cerevisiae* bu enzim bakımından oldukça zengindir. Mayalarda iki tip invertaz tanımlanmıştır; çözünmeyen tip; hücre duvarı, periplazmik boşlukta bulunur ve çözünen tip; hücre içinde bulunur. Sukroz hücre dışında glukoz ve fruktoza ayrılır, daha sonra kolaylaştırılmış difüzyon ile hücre içine alınır. Mayada sukroz kullanımı ile ilgili her biri internal glukolize olmamış invertaz enzimini kodlayan 6 bağımsız polimerik gen (SUC) tanımlanmıştır. dış invertaz enzimi hücre yüzeyine geçiş sırasında glukolize olur. Endüstriyel suşlardaki SUC genlerinin sayısı her bir kromozom üzerindeki gen sayısının ve organizmanın poliploidi fonksiyonuna göre değişebilir. Pek çok endüstriyel suşta SUC geni yoktur. Çok miktarda invertaz enzimi üretimi için çok sayıda SUC geni kopyası gerekir. Bu özellik yüksek oranda şeker içeren hamur sistemlerinde mayalanma üzerine etkilidir. Dış invertaz glukoz regülasyonu ile de ilgilidir. Düşük glukoz konsantrasyonunda enzim aktivitesi 1000 kat artar. Tatlı maya sistemlerinde invertaz aktivitesinin minimal seviyeye indirilmesi için, üreticiler maya kremini sülfirik asit ya da fosforik asit ile muamele edip, enzimi etkisiz hale getirmeye çalışmaktadırlar. Bazı araştırmacılar, minimal invertaz aktivitesine sahip hibrid suşlar elde etmek uygun hibridizasyon tekniğini bulmuşlardır (REED ve NAGODAWITHANA, 1991).

5. HIZLI FERMENTASYON YETENEĞİ

Ekmek mayacılığında, maya hücrelerinin hızlı gelişmesi ve yüksek miktarda biyokütle ürünü elde edilmesi çok önemlidir. Bunu sağlayan suşlar, mayalanma yetenekleri ile birlikte mayacılıkta aranılan suşlardır. Bu suşlardaki büyüme ve fermentasyon karakterlerini kontrol eden genler, bu genlerin kontrol ve etki mekanizmaları ile farklı özellikteki çok çeşitli fermentasyon karakterlerinin nasıl ortaya çıktığı hala bilinmemektedir. Hibridizasyon çalışmaları ile elde edilen suşlarda hamur mayalanmasında erken ve geç devrelerde fermentasyon aktivitesi iyileştirilememiştir. Protoplast füzyon tekniği, bu karakterin iyileştirilmesi ve rekombinant maya elde etmede ümit vaat etmektedir. Yapılan bir çalışmada, protoplast füzyonu ile sadece tatlı ve klasik ekmek mayalanma sistemlerinde süper mayalanma aktivitesi gösteren bir füzyant bugün ekmekçilik endüstrisinde kullanılmaktadır (REED ve NAGORAWITHANA, 1991). Son yıllarda fermentasyon aktivitesinin genetik temelleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Fermentasyon verimliliği mayanın çeşitli ortam şartlarına toleransının artırılması ile iyileştirilebilir. Mayada bu çeşit genetik değişikliklere klasik teknikler ile ulaşmak oldukça güç gözükmektedir. Fakat genetik mühendisliği teknikleri klasik maya suşlarının daha iyi fermentasyon performansı ile yapılanmasında ümit vaadedicidir.

6. DONMAYA DAYANIKLI EKMEK MAYASI

Hem üreticiye hem de tüketiciye pek çok avantaj sağlayan dondurulmuş hamur endüstrisi hızla gelişmektedir. Dondurulmuş hamur, uygun maya, un ve ilaveler ile üç aydan uzun süre saklanabilmektedir. Sıfırın altındaki sıcaklıkların ve donma/erime şartlarının maya üzerine etkisi araştırılmış ve soğutma hızının dondurma süresince fiziksel ve kimyasal olaylar üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Soğutma hızı optimumdan yavaş ise hücrenin gördüğü zarar çok fazladır. Soğutma hızı optimum olduğunda canlılık oranı maksimumdur. Yüksek soğutma hızında ise, hücre içi buz kristallerinin oluşması nedeni ile canlılık hızla düşer. Bu nedenle dondurma sırasında hücre canlılığının korunması için, hücre içi buz kristallerinin oluşumu engellenmelidir (REED ve NAGODAWITHANA, 1991).

Osmotolerant *S. rosei* ve *S. rouxii* ile yapılan bir çalışmada, bu suşların osmatolerant olmalarının yanı sıra tekrarlanan donma/erime şartlarına maruz kaldıklarında da yüksek oranda canlılıklarını sürdürebildikleri saptanmıştır. Bu durumda, ekmek mayacılığı suşlarının osmotoleransındaki genetik bir iyileşme, donma/erime şartlarında canlı kalma özelliğinde de bir iyileşmeye yol açacaktır. *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. rosei* ve *S. rouxii* arasındaki tür içi ve tür dışı çaprazlamalar dondurulmuş hamur endüstrisinde gelecek vaat etmektedir. Hibridizasyon teknikleri ile donmaya dayanıklı suşlar geliştirilmiş ve bu suşların patentleri araştırmacılar tarafından alınmıştır. Bu konuda yapılan çalışmada haploid suş FD612, bir ekmek mayası suşu ve *S. uvarum* ile tanımlanmış bir *Saccharomyces* suşunun hibridi arasında seçici hibridizasyon ile geliştirilmiştir. Elde edilen hibridin stabilitesi ana suşlar ile yapılan geri çaprazlamalarla sağlanmıştır (REED ve NAGODAWITHANA, 1991). Donmaya dayanıklılıkla ilgili genetik temeller henüz bilinmediği için, moleküler genetik ve genetik mühendisliği tekniklerinin bu konuda kullanımı uzak gözükmektedir. Yinede bir grup araştırmacı hücre içinde oluşturdukları sentetik bir gen yardımı ile balık antifriz proteinine benzer bir ürün yapmayı başarmıştır. Bu genin ürünü maya hücrelerinde çözülme-erime sırasında karşılaşılan buz kristallerinin oluşumunu %50 oranında azaltırken, canlılıkta aynı oranda artırmıştır (DAĞAŞAN, 1994).

7. MELİBİOZU KULLANABİLEN EKMEK MAYASI

Melas ekmek mayacılığı üretiminde substrat olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Hem şeker kamışı hem de şeker pancarı melasında ana şeker sukrozdur. Sukroza ilaveten %0.5-2.0 oranında rafinoz da bulunur. Ekmek mayası rafinozun 1/3'ünü kullanabilmektedir. Bazı *Saccharomyces* türleri β -fruktozidaz enzimi ile rafinozu fruktoz ve melibioza çevirir. Oluşan fruktoz maya tarafından kullanılabilir. Ekmek mayasında α -

galaktozidaz (melibiaz) bulunmadığı için melibiozu kullanamaz. Bu nedenle melibiozu kullanabilen ekmekek mayası suşlarının ekmekek mayası üretiminde kullanımı hem verimlilik hem de proses ekonomisi (atık sudaki BOD miktarı azalır) açısından çok önemlidir.

SUC genlerinden sadece bir tanesi sukroz fermentasyonu ya da rafinozun 1/3'ünün kullanımı için gereklidir. *S. uvarum* SUC genine ilaveten melibioz ve rafinozun tamamen kullanılmasından sorumlu olan MEL genlerine de sahiptir. Bu genin baz dizilimi bugün bilinmektedir. Melibiozu fermente eden ekmekek mayası suşu, geleneksel suşların *S. uvarum* ile hibridizasyonu ile elde edilmiştir (REED ve NAGODAWITHANA, 1991). Geri çaprazlamalar ile hibridin mayalanma karakterleri sağlamlaştırılmıştır. Düşük oranda sporlanma ve spor canlılığını koruma karakterindeki bu suş hibridizasyon teknikleri ile iyileştirme için uygun değildir. Universal Food Cooperation adlı bir firma 1453-3A laboratuvar suşunu, FG1-4 endüstriyel ekmekek mayası suşu ile protoplast füzyonuna tabi tutmuştur. Elde edilen MBL 7 suşu atasal suşlardan daha fazla melibiozu kullanmasına rağmen endüstriyel olarak kullanıma uygun değildir (REED ve NAGODAWITHANA, 1991). Melibioz kullanımı GAL düzenleme sistemi ile kontrol edilir. Ekmekek mayası galaktoz kullanımı için üç enzime gerek duyar. Rekombinant DNA teknolojisi ile MAL⁺ ekmekek mayası elde edildiği bazı literatürde kaydedilmiştir (ROUHLO ve ark., 1986). Bu çalışmalarda *S. uvarum* MEL1 geni YE_p 13 gibi mekik bir vektöre klonlanarak, hibrid plazmid elde edilmiştir. Oluşan transformantların yüzdesi ve stabilitesinin artırılması LEU2 geni taşıyan bir vektör ile giderilmeye çalışılmıştır. Bu hibrid plazmidin, kromozom 3'ün bir kopyasına integrasyonu ile stabil hale getirilmiştir. Sonuçta transformantlara α -galaktozidaz aktivitesi kazandırılmıştır. Bu suşun mayacılık endüstrisinde kullanımının tek engeli, mekik vektörün taşıdığı bakteriyel DNA'nın halk sağlığı açısından yaratacağı problemlerden kuşku duyulmasıdır.

8. LİPOKSİGENAZ GENİ TAŞIYAN EKMEK MAYASI

Bitki lipoksigenez geninin maya hücresine klonlanması ve ekspirasyonu ile ilgili çalışmalar daha beyaz ekmekek üretimi için yapılmaktadır. Günümüzde lipoksigenez geninin transferi sağlanmıştır, ama ekspirasyonu seviyesi hala çok düşüktür. Burada hedef suş iyileştirilmesinden çok son üründür (DAĞAŞAN, 1994).

9. LAKTOZU FERMENTE EDEN EKMEK MAYASI

Uzun yıllardır melas özellikle ucuz olması ve uygun şeker içeriği bakımından substrat olarak kullanılmaktadır. Fakat şeker endüstrisindeki son gelişmeler ile, şeker pancarından daha fazla şeker elde edilmesi nedeniyle melastaki şeker oranı düşmüştür. Bu da maya üretiminde maliyetin artmasına neden olduğundan, üreticiler daha ucuz substratlara yönelmişlerdir. Peynir altı suyu şeker bazında melastan daha ucuz ve boldur. Bu substrattaki ana şeker laktozdur. Ekmekek mayası suşları glukoz, fruktoz, mannoz, galaktoz, sukroz, maltoz ve trehalozu kullanabilirken, enzim eksikliği nedeniyle laktozu kullanamaz (TOMBS, 1990). *Kluyveromyces marxianus*' gibi bazı maya suşları laktozu kullanırlar, ama suşlar da zayıf gaz oluşturma kabiliyetleri nedeni ile iyi hamur kabartma özelliğine sahip olmadıkları için ekmekek mayası üretimine uygun değildirlere. Bu nedenle peynir altı suyunun substrat olarak kullanılabilmesi için laktozu kullanabilen suşlara ihtiyaç vardır. Bir disakkarit olan laktoz, önce hücre içine transfer edilir, daha sonra hidrolize uğrar. Laktoz transferi ve kullanımı polimerik gen sistemleri tarafından kontrol edilir. Laktoz fermentasyonu için LAC 12 geni tarafından kodlanan bir permeaza (transfer için) ve LAC4 geni tarafından kodlanan bir β -galaktozidaza (laktozu glukoz ve galaktoza yıkmak için) gerek vardır (SHEETZ ve DICKSON 1981). Laktozu kullanabilen ekmekek mayası suşu elde etmek için protoplast füzyonuna baş vurulmuştur. Türler arası protoplast füzyonu başarılı olmuştur, ama tür içi füzyonlarda istenilen sonuçlar alınamamıştır. *K.lactis* ve *S. cerevisiae* protoplast füzyonunda, füzyon ürünü kalıtsal problemler nedeni ile başarılı olamamıştır (REED ve NAGODAWITHANA, 1991). Laktoz regülasyonu ile ilgili bilgilerimiz, genetik mühendisliği tekniklerini kullanmak için yetersiz gibi gözüksede, bütün bu olumsuzluklara rağmen, iki araştırma laboratuvarında laktozu kullanan ekmekek mayası suşunu elde ettikleri ve patent için başvuruda buldukları bilinmektedir (REED ve NAGODAWITHANA, 1991).

10. ÖLDÜRÜCÜ PLAZMİD (Killer plasmid) TAŞIYAN EKMEK MAYASI

İlk defa 1963 yılında Oxford'da bir katolik papaz tarafından gözlenen (PAMİR, 1984) öldürücü aktivite fenomeni mayalarda oldukça yaygındır. Yapılan çalışmalarda yeni izole edilen maya suşlarının yaklaşık %50'sinin öldürücü aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. (RADLER ve ark., 1993, 1985). Öldürücü suşlar ürettikleri protein veya glukoprotein yapısındaki toksin ile bu toksine duyarlı maya suşlarını öldürürler, fakat kendi ürettikleri toksine karşı dirençlidir. REED ve NAGODAWITHANA (1991) bu toksinin bazı fungi ve bakterilere karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir. PFEIFEER ve arkadaşları (1988) ise, duyarlı suşları inhibe eden *S. cerevisiae* KT 28'in birkaç patojenik fungiye, *Trichomonas vaginalis* (protozoon) ve karşı etkili olmadığını ve deneye tabi tutulan hayvanlar üzerinde de herhangi bir farmakolojik etki göstermediğini bildirmişlerdir. *S. cerevisiae*'nin ilk öldürücü suşunun izolasyonundan sonra, çeşitli maya genuslarına ait öldürücü suşlar saptanmıştır (MIDDELBECK ve ark., 1980; RADLER ve ark., 1985; LEHMANN ve ark., 1987; CAILLIEZ ve ark., 1993; ROSINI, 1983). Biyokimyasal yapılarına, etki mekanizmalarına ve ürettikleri suşlara göre en az 11 farklı toksin tanımlanmıştır. Yapılan genetik ve moleküler çalışmalar ile *S. cerevisiae* suşlarının ürettiği K1, K2 ve K28 toksinlerinin genetik ve moleküler temelleri büyük ölçüde ortaya konulmuştur (BUSSEY ve ark., 1990). Ayrıca maya plazmidleri ve kromozomları arasında gen değişimi olduğu da saptanmıştır. ZHU ve BUSSEY (1989) *S. cerevisiae* K1 toksininin *Candida*, *Kluyveromyces* ve *Schwanniomyces* genusuna üye maya sferoplastlarını öldürdüğünü saptamışlardır. Aynı çalışmada hücre duvarı reseptörlerinin toksine duyarlılık ile ilgili olduğu ve hücre duvarı yapısının modifikasyonu ile toksine duyarlı hücrelerin oluşturulabileceği öne sürülmüştür. *Saccharomyces* genusunun ürettiği öldürücü aktivite çift sarmallı RNA PLAZMİD (dsRNA plasmid) varlığına bağlıdır. Bu plazmidler dsRNA virüsleri (virüs benzeri partiküller) olarak da tanımlanır. *S.cerevisiae*'de L ve M olarak isimlendirilen iki dsRNA plazmidini tanımlanmıştır. M dsRNA (1,5 kilobaz) öldürücü toksini ve hücreyi kendi ürettiği toksinden koruyan bağışıklık faktörünü kodlarken, L dsRNA (4,6 kilobaz) ise M ve L dsRNA'yı çevreleyen kapsid proteinleri kodlar. M dsRNA virüsü sadece öldürücü aktiviteye sahip suşlarda bulunur. L dsRNA virüsü ise pek çok maya suşunda bulunur (WICKNER, 1996). Virüs benzeri bu partiküller eşleşme sırasında hücreden hücreye füzyon ile taşınırlar. Öldürücü fenomen ile ilgili ayrıntılı bilgi G. ROSINI (1983) ve POLONELLI ve ark., (1991) dan sağlanabilir. Bu plazmidlere bazı *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ve *Pichia* genusu suşlarında rastlanmaktadır. Diğer maya suşlarında görülen öldürücü aktivitenin kromozomal genler ile kodlandığı (YOUNG, 1987) düşünülmekteyse de, 1988 de ZORG ve ark.: 1993'de RADLER *Hanseniosporum uvarum* ve *Zygosaccharomyces bailii* 412nin dsRNA plazmidine sahip olduklarını göstermişlerdir.

Ekmek mayası üretiminde yabancı mayaların kültür ortamına kontaminasyonu verimi düşürmekte, ürün kalitesinin de bozulmasına neden olmaktadır. Ekmek mayası üretiminde sistem şeker limitasyonunda çalıştığı için, ortam yabancı mayalar için oldukça elverişlidir. Öldürücü plazmid taşıyan maya suşlarının kontaminasyonu, bu toksine duyarlı starter suşa zarar vererek, fermentasyon sırasında ve sonrasında istenmeyen sonuçlar doğurmaktadır. Günümüzde seleksiyon veya genetik manipülasyonlar kullanılarak seçilmiş aynı türün pek çok alt türü starter suş olarak kullanılmaktadır. Moleküler biyoloji teknikleri ile öldürücü aktiviteye sahip ve/veya yabancı organizmaların ürettiği toksinlere karşı bağışıklık kazanmış bir starter maya suşunun elde edilmesi olasılığı bu konuda ümit vaatmektedir. Bu özelliğe sahip suşların eski tesislerde kontaminasyon riskini azaltabileceği, yeni tesislerde de sterilizasyon ve pastörizasyonda proses ekonomisi açısından maliyet düşürücü bir faktör olacağı açıktır. Bu suşların kullanımının en önemli avantajlarından biri de patent korunması konusudur. Maya suşlarına öldürücü aktivite kazandırmaya yönelik çalışmalarla, şarapçılıkta kullanılan *S. cerevisiae*'nin protoplast füzyonu ile öldürücü aktiviteye sahip suşu elde edilmiştir. Böyle suşların şarapçılıkta kullanılmasının kontaminasyon riskini azaltacağı saptanmıştır. Günümüzde, gerek şarapçılıkta gerekse ekmek mayası üretiminde her hangi bir mikroorganizma tarafından üretilen toksine dirençli, kendi ürettiği toksin ile geniş bir yelpazedeki diğer maya, bakteri ve funguslara etkili maya suşu üreticinin ideal maya suşu haline gelmektedir. Bu özelliklere sahip bir maya suşunun moleküler teknikler ile yapımının mümkün olduğu ve *S. cerevisiae* K3, *H mrakii* CCY 38-7-1 ve *H.saturanus* var subsufficiens CCY-38-4-2'nin bu konuda ümit vaadedici olduğu MICHALAKOVA ve arkadaşları (1993) tarafından bildirilmiştir. Özetle, ticari olarak kullanılan geleneksel maya suşlarına genetik manipülasyonlar ile, farklı toksinleri üreten plazmidler aktarılabilir. Böylece geniş bir yelpazede yabancı maya kontaminantlarına dirençli, öldürücü aktiviteye sahip suşlar üretilebilir. Bu da starter kültürün bozulması ya da kaybedilmesi riskini ortadan kaldıracaktır.

SONUÇ

Ekmek mayası üretiminde kullanılan geleneksel maya suşlarının, hem tüketicinin hem de üreticinin isteklerine cevap verecek özellikler yönünden geliştirilmesi ve iyileştirilmesi, önümüzdeki yıllarda daha da önem kazanacak bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Patent sağlanması ve korunması açısından da önemli olan bu konuda başarılı bir şekilde yol alınabilmesi için maya fizyolojisi, maya genetiği ve sistemleri konusunda daha ayrıntılı bilgiye ihtiyaç olduğu göz ardı edilemez. Ayrıca genetik mühendisliği ile elde edilen iyileştirilmiş suşların, endüstride uygulama alanına sokulması için, fermentasyon özelliklerinin de ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Bu konulara ilaveten genetik olarak modifiye edilmiş suşlar kullanılarak elde edilen besin maddeleri ve içkiler konusunda tüketicinin korunmasına yönelik yasal düzenlemeler de yapılmalı ve halk bu konularda bilinçlendirilmelidir. Henüz büyük bir çoğunluğu laboratuvar aşamasında olan ekme mayası suşlarının genetik mühendisliği teknikleri ile iyileştirilmesi çalışmaları, karşılaşılan güçlük ve olumsuzluklara rağmen özellikli üreticiler için umut vaat etmektedir.

KAYNAKLAR

- BROWN, A.D., EDGLEY, M. 1980. Osmoregulation in Yeasts. In Genetic Engineering of Osmoregulation, D.W. Rains, R.C. Valentine, A. Hollander (eds). Plenum Press, New York, pp: 75-90.
- BUSSEY, H., BOONE, C., ZHU, H., VERNET, T., WHITEWEY, M., THOMAS, D. Y. 1990. Genetic and Molecular Approches to Synthesis and Action of The yeast Killer Toxin. *Experientia*. 46: 193-200.
- CAILLIEZ, J.C., CANTELLI, C., CONTI, S., GERLONI, M., MAGLIANI, W., MORACE, G., POLONELLI, L. 1993. *Pichia anomala* Killer Toxin Secretion in The Presence of Tuncamycin. *J. of Medical and Veterinary Mycology*. 31: 337-342.
- CANBAŞ, A. 1995. Ekmek Mayacılığı, s: 1-4. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları-Yayın No: 22, Ankara.
- DAĞAŞAN, L. 1994. Maya Teknolojisinde rekombinant DNA Yöntemleri-Uygulamalı Eğitim Kursu Notları-. 12-16 Eylül, 1994, İstanbul Üniversitesi, BİYOGEM.
- GAXIOLA, R., CORONA, M., ZINKER, S. 1996. A Holotolerant Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Bacteriol*. 178 (10): 2978-2981.
- KHAN, N.A., N.R.EATON. 1971. Genetic Control of Maltose Fermentation in Yeast. I. Strains Producing High and Low Basal Levels of Enzymes. *Mol. Gen. Genet*. 112: 317-322.
- KOSIKOV, K.V., MIEDVIEDIEVA, A.A. 1976. Experimental Increase in The Osmophilic Properties of Yeast. *Mikrobiologiya*. 45: 327-328.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. 1984. "The Yeasts". Elsevier, Amsterdam.
- LEGMAAN, R., MARGOLITH, P. 1983. Interspecific Protoplast Fusion of *Saccharomyces cerevisiae* and *S.mellis*. *Eur. J. Appl. microbiol. Biotechnol*. 18: 320-322.
- LEHMAN, P.F., LEMUN, M.B., FERENCAK, W.J. 1987. Antifungal Compounds (killer factors) Produced by *Kluyveromyces* Species and Their Detection on an Improved Medium Containing Glycerol. *Mycologia*. 79(5): 790-794.
- MICHALCAKOVA, S., SULO, P., SAVIKOVA, E. 1993. Killer Yeasts of *Kluyveromyces* and *Hansenula* Genera With Potential Applications in Fermentation and Therapy. *Acta Biotechnol*. 13(4): 341-350.
- MIDDELBECK, E.J., VON DELAAR, H.H.A.M., HERMANS, J.M.H., STUMM, G., VOGELS, G.D. 1980. Physiological Conditions Affecting The Stability of *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin and Energy Requirement For Toxin Action. *Antonie van Leeuwenhoek*. 46: 483-497.
- PAMIR, H.M. 1984. Öldürücü Maya (Killer Yeast)'nın Tanımı. *Gıda*. 1: 47-52.
- PFEIFFER, P., RADLER, F., CASPRITZ, G., HANEL, H. 1988. Effect of a Killer Toxin of Yeast on Eucaryotic Systems. *Appl. and Environ. Microbiol*. 54(4): 1068-1069.
- POLONELLI, L., CONTI, S., GERLONI, M., MAGLIANI, W., CHEZII, C. 1991. Interfaces of The yeast killer Fenomenon. *Critical Rev. in Microbiol*. 18(1): 47-87.
- RADLER, F., HERZBERGER, S., SCHONIG, I., SCHWARZ, P. 1993. Investigation of A Killer Strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J. Gen. Microbiol*, 139:495-500.
- RADLER, F., PFEIFFER, P., Dennert, M. 1985. Killer toxins in new isolates of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *FEMS Microbiology Letters*. 29:269-272.
- REED, G., NAGODAWITHANA, T.W. 1991. Yeast Technology, 2 nd edition. An AVI Book, U.S.A.
- ROSINI, G. 1983. The Occurance of Killer Characters in Yeast. *Can. J. Microbiol*. 29: 1462-1464.
- RUOHOLA, H., LILIJESTROM, P., TORKELI, T., KOPU, H., LEINTINEN, P., KALKKUBEN, N., KORHOLA, M. 1986. Expression and Regulation of The Yeast MEL1 Gene. *FEMS Microbiol. Lett*. 34: 179-185.
- SHEETZ, R.M., DICKSON, R.C. 1981. LAC 4 is The Structural Gene For β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics*. 98: 729-745.
- SPENCER, J.F.T., SPENCER, D.M., BIZEAU, C., MARTINI, A.V., MARTINI, A. 1985. The Use of Mitochondrial Mutants in Hybridization of Industrial Yeast Strains. *Curr. Genet*. 9:623-625.
- TOMBS, M.P. 1990. Biotechnology in The Food Industry. Open University Press, Buckingham, England. s: 182.
- WICKNER, R.B. 1996. Double-stranded RNA Viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev*. 60(1): 250-265.
- YOUNG, T.W.1987. Killer yeasts. In *The Yeasts*. Edited by A. H. ROSE and J.S. Harrison. New York: Academic Press. pp: 131-164.
- YUAN, J. Q., BELLGARDT, K.H. 1994. Investigatio on The Optimal Control of Storage Stability of Compressed Baker's Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Bacteriol*. 32: 261-272.
- ZHU, H., BUSSEH, H. 1989. The K1 Toxin of *Saccharomyces cerevisiae*. Kills Spheroplast of Many Yeast Species. *Appl. and Environment. Microbiol*. 55(8): 2105-2107.
- ZORG, J., KILLIAN, S., RADLER, F. 1988. Killer Toxin Producing strains of The Yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *Arch Microbiol*. 149: 261-267.