

**ABİYOTİK STRES KOŞULLARININ BAZI TİCARİ EKMEK
MAYASI SUŞLARINDA ÜREME ÖZELLİKLERİNE VE
AMİLAZ, PROTEAZ, İNVERTAZ ENZİM AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

HİLAL SEZER DEMİREĞEN



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ABİYOTİK STRES KOŞULLARININ BAZI TİCARİ EKMEK MAYASI SUŞLARINDA
ÜREME ÖZELLİKLERİNE VE AMİLAZ, PROTEAZ, İNVERTAZ ENZİM
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

HİLAL SEZER DEMİREĞEN
0000-0002-1931-3176

Prof.Dr. Sezai TÜRKEKEL
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA– 2022
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ABİYOTİK STRES KOŞULLARININ BAZI TİCARİ EKMEK MAYASI SUŞLARINDA ÜREME ÖZELLİKLERİNE VE AMİLAZ, PROTEAZ, İNVERTAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hilal SEZER DEMİREĞEN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Sezai TÜRKEKEL

Ekmek mayası üretimi endüstriyel fermantasyon uygulamalarının en başarılılarından biri olarak kabul edilmekte ve mikrobiyal hücre üretiminde en ekonomik proses olarak tanımlanmaktadır. Ticari ölçekte ekmek ve unlu mamuller üretiminde kullanılan başlıca maya türü *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Fermantasyon işlemleri sırasında maya hücrelerinin çoğalmasını ve fermantasyonunu engelleyen stres faktörleri oluşur. Üretimde bu tür streslere dirençli *S. cerevisiae* suşları tercih edilir. Maya üretimi konusunda dünyada önemli bir yere sahip olan ülkemizde ticari mayaların mikrobiyal ve biyokimyasal özellikleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu araştırma kapsamında ülkemizde ekmek üretiminde kullanılan dört farklı ticari maya suşunun stres direnç profilleri incelendi. Bu maya suşlarına ozmotik stres, metal iyon stresi, kalsiyum stresi ve sıcaklık stresi uygulandı. Bu streslere maruz bırakılan maya hücrelerinin hücre morfolojileri, mitotik indeksleri, enzim aktiviteleri ve üreme hızları incelendi. Elde edilen araştırma sonuçları kalsiyum ve bakır iyon stresinin seçilen ticari maya suşlarında hücre morfolojisine etkilerinin olmadığını gösterdi. Ancak, kalsiyum stresi ve ozmotik stresin seçilen *S. cerevisiae* suşlarında farklı hücre döngüsü aşamalarına etki ettikleri bulundu. Buna ek olarak, bu ticari maya suşlarının sıcaklık stresine karşı dayanıksız oldukları ve hücre dışı amilaz ve proteaz aktivitelerinin de olmadığı görüldü. Ayrıca, ozmotik stresin invertaz aktivitesini önemli derecede azalttığı da tespit edildi. Elde edilen sonuçlar ticari ekmek mayası suşlarının çeşitli stres faktörlerine farklı seviyede yanıt oluşturduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Saccharomyces cerevisiae*, stres toleransı, maya endüstrisi, enzim aktivitesi

2022, IX + 54 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ABIOTIC STRESS CONDITIONS ON THE GROWTH FEATURES AND AMYLASE, PROTEASE, INVERTASE ENZYME ACTIVITIES OF THE COMMERCIAL BAKERS YEASTS

Hilal SEZER DEMİREĞEN

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof.Dr. Sezai TÜRKEL

Baker's yeast production is considered one of the most successful industrial fermentation applications and is defined as the most economical process in microbial cell production. The main yeast species used in the production of bread and bakery products on a commercial scale is *Saccharomyces cerevisiae*. During the fermentation processes, stress factors prevent the proliferation and fermentation of the yeast cells. *S. cerevisiae* strains resistant to such stresses are preferred in industrial application processes. In Turkey, which has an important place in yeast production in the world, there is not enough information about the microbial and biochemical properties of commercial yeasts. In this research, stress resistance profiles of four different commercial yeast strains, which are used in bread production in our country, were studied. Osmotic stress, metal ion stress, calcium ion stress, and temperature stress were applied to these selected baker's yeast strains. Growth rates, cell morphologies, and certain enzyme activities of these selected yeast strains that were subjected to stress factors were analyzed. Results of this research indicated that calcium and metal ion stress did not have any significant effect on the cell morphologies of selected commercial yeasts. However, our results indicated that calcium and osmotic stress affected different stages of *S. cerevisiae* cell division cycles. It was also found that the commercial yeasts, which could not maintain their viability under heat stress, did not show extracellular amylase and protease activities. It was also found that osmotic stress significantly decreased the invertase activity of the yeast strains analyzed in this research. Results of this study indicated that commercial yeast strains differ in their responses to stress factors.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, stress tolerance, yeast industry, enzyme activity.

2022, IX + 54 pages.

ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR

Bursa Uludağ Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü yüksek lisans öğrencisi olarak 2019 yılında başlamamla birlikte, üniversite ve akademik yaşamıma destekleri, engin bilgi ve deneyimleriyle daima yanımda olan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bölüm başkanım ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sezai TÜRKEL'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans tez savunmamda yer alan değerli tez jürisi hocalarıma ve her zaman yanımda olan deneyimlerini benimle paylaşan kıymetli arkadaşlarıma yardımları için teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimime başladığım ilk günden beri maddi ve manevi her koşulda yanımda olan, evlatları olduğum için her an şükrettiğim sevgili annem Songül SEZER ve babam Erdoğan SEZER'e, ilkokuldan beri eğitimime önemli katkılar sağlayan ağabeyim İbrahim Okan SEZER'e tüm desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Üniversite ve akademik hayatımın her sürecinde 2014 yılından beri yanımda olan, en büyük destekçim, yol arkadaşım sevgili eşim Arkın DEMİREĞEN'e, bana ve çalışmalarına olan inanç ve desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Hilal SEZER DEMİREĞEN
18 / 01 / 2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nın Ekmek Mayası Üretiminde Kullanımı.....	4
2.2 Türkiye'de ve Dünyada Ekmek Mayası Üretimi.....	6
2.3. Ekmek Mayası Üretim Süreci ve Karşılaşılan Zorluklar	6
2.4 <i>S. cerevisiae</i> Üreme Koşulları ve Genel Stres Tepkisi	9
2.4.1. Ozmotik stres	11
2.4.2. Metal İyon Stresi (Bakır).....	12
2.4.3. Kalsiyum Stresi	13
2.4.4 Sıcaklık Stresi	15
2.5. <i>S.cerevisiae</i> 'da Hücre Döngüsü	15
2.6. Ekmek Mayasında Amilaz, İnvvertaz, Proteaz Enzimlerinin Görevleri.....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Araştırmada Kullanılan <i>S. cerevisiae</i> Suşları ve Üreme Koşulları	19
3.2. Abiyotik Stres Koşullarının Belirlenmesi	19
3.3. Stres Koşullarının Üreme Durumuna Etkilerinin Kalitatif İncelenmesi	20
3.4. Sıvı Kültürde Stres Koşullarında Üretilen Suşların Hücre Morfolojisindeki Değişiklerin Mikroskop Altında Gözlemlenmesi	20
3.5 Stres Koşulların Mitotik İndekse Etkilerinin İncelenmesi	21
3.6. Stres Koşullarında Maya Suşlarının Üreme Hızlarının Tayini.....	22
3.7 Sıcaklık Stresinin Maya Hücrelerinin Canlı Kalma Sürelerine Etkisinin İncelenmesi.....	22
3.8 .Ticari Mayaların Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	23
3.8.1. Hücre dışı α -Amilaz aktivitesinin kalitatif tayini	23
3.8.2. Hücre dışı proteaz aktivitesinin kalitatif tayini.....	23
3.8.3. İnvvertaz aktivitesinin kantitatif tayini.....	23
4. BULGULAR	26
4.1. Abiyotik Stres Koşullarının Ticari Maya Suşlarının Büyüme Morfolojileri Üzerine Etkileri.....	26
4.2. Stres Koşullarının Maya Hücre Morfolojine Etkileri	29
4.3. Stres Koşulların Ticari Maya Suşlarının Hücre Döngüsüne Etkileri	31
4.4. Stres Koşullarının Ticari Maya Suşlarının Üremesine Etkileri	33
4.5. Sıcaklık Stresinin Maya Suşlarında Hayatta Kalma Sürelerine Etkileri	35
4.6 Abiyotik Stres Koşullarında Ticari Mayaların Enzim Aktivitesi	36
4.6.1 İnvvertaz aktivitesi.....	36
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	40

KAYNAKLAR.....	43
EKLER.....	51
EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması	52
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Simgeler	Açıklama
α :	Alfa
Cu^{2+} :	Bakır iyonu
CuSO_4 :	Bakır (II) Sülfat
β :	Beta
Zn^{2+} :	Çinko
Fe^{2+} :	Demir
$^{\circ}\text{F}$:	Fahrenheit
γ :	Gamma
g:	Gravity (santrifujbirimi)
Ca^{2+} :	Kalsiyum iyonu
CaCl_2 :	Kalsiyum klorür
Cl^{-} :	Klor
Mn^{2+} :	Mangan
Mo^{2+} :	Molibden
$^{\circ}\text{C}$:	Santigrat derece
NaCl:	Sodyum klorür
%:	Yüzde

Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
Dk:	Dakika
DNA:	Deoksiribonükleik asit
G0:	Gap0
G1:	Gap1
G2:	Gap2
GRAS:	Generally Recognized as Safe
pH:	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
HOG:	High Osmolarity Glycerol
Kbp:	Kilo basepair
MAT:	Matingtype, <i>S. cerevisiae</i> 'da eşleşme tipi
mRNA:	Mesajcı ribonükleik asit
μg :	Mikrogram
μl :	Mikrolitre
μM :	Mikromolar
M.Ö:	Milattan önce
mg:	Miligram
ml:	Mililitre
mm:	Milimetre
mM:	Milimolar
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase
M:	Molar
OD:	Optical Density
RPM:	Rotation per minute

<i>S. cerevisiae:</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>SNF1:</i>	Sucrosenon-fermenting 1 geni
<i>SUC2:</i>	Sucrose 2
TMY:	Ticari maya
YPD:	Yeast extract Pepton Dextrose

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2. 1. Kültür ortamı olarak melas kullanan fermantasyon ile çoğalım şeması.	7
Şekil 2. 2. Streslerin maya üzerindeki ana etkileri üzerine güncel çalışmalar..	10
Şekil 2. 3. <i>S. cerevisiae</i> 'da bakır stres yolağı.....	13
Şekil 2. 4. Kalsiyum sinyal ağının dört birimi	14
Şekil 2. 5. <i>S. cerevisiae</i> mitotik hücre döngüsü.....	16
Şekil 3. 1. Hücre döngüsü analizinde referans olarak kullanılan <i>S. cerevisiae</i> fenotiplerinin şematik gösterimi.....	21
Şekil 4. 1. Kalsiyum stresinde ticari mayaların strese tepkisi.	27
Şekil 4. 2. Bakır stresinde ticari mayaların strese tepkisi	28
Şekil 4. 3 NaCl stresinde ticari mayaların stres tepkisi	29
Şekil 4. 4. Stres koşullarının ticari maya suşlarının çoğalmasına etkileri.....	30
Şekil 4. 5. Kalsiyum stresinin <i>S. cerevisiae</i> 'da hücre morfolojisine etkileri	31
Şekil 4. 6. Kalsiyum stresinin ticari mayaların üremesine etkileri	34
Şekil 4. 7. Hüperozmotik stresin ticari mayaların üremesine etkisi	34
Şekil 4. 8. Bakır iyon stresinin ticari mayaların üremesine etkileri.....	35
Şekil 4. 9. Sıcaklık stresinin ticari mayaların üremesine etkisi.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 4. 1. Stres koşullarının TMY1 suşunun mitotik indeksine etkisi.....	32
Çizelge 4. 2. Stres Koşullarının TMY2 suşunun mitotik indeksine etkisi.....	32
Çizelge 4. 3 Stres Koşullarının TMY3 suşunun mitotik indeksine etkisi.....	33
Çizelge 4. 4 Stres Koşullarının TMY4 suşunun mitotik indeksine etkisi.....	33
Çizelge 4. 5. Ticari mayaların repres-derepres koşullarda invertaz aktivitesi	37
Çizelge 4. 6. Hiperozmotik strete ticari mayaların invertaz aktivitesi	38
Çizelge 4. 7. Melas ortamında üretilen ticari mayaların invertaz aktivitesi.....	38
Çizelge 4. 8. Kalsiyum stresinde ticari mayaların invertaz aktivitesi.....	39
Çizelge 4. 9. Bakır stresinde ticari mayaların invertaz aktivitesi	39

1. GİRİŞ

Unlu mamuller, yüzyıllardır dengeli beslenmenin hayati bir bileşeni olarak kullanılmıştır. Bugün, fırıncılık endüstrisi, dünya çapında gıda endüstrisinin en büyük sektörlerinden biridir ve binlerce istihdam yaratır ve milyarlarca dolar gelir elde eder. Bu sürekli büyüme, tüketicinin taze, rafta dayanıklı, besleyici ve uygun şekilde paketlenmiş ve birinci sınıf unlu mamullere olan taleplerinden kaynaklanmaktadır. Dünyanın çeşitli yerlerinde çok sayıda maya üretim endüstrisi bulunmaktadır. Bu endüstriler, farklı türlerde ekmek mayası ve diğer unlu mamullerin üretiminde yer almaktadır (Dangi, Dubey ve Shukla, 2017). En büyük fermantasyon endüstrilerinden biri maya endüstrisidir ve fermantasyon endüstrileri içerisinde en ekonomik hücre üretme süreci olarak da bilinmektedir. Dünyadaki ekmek mayası üretimi kurutulmuş formda yılda yaklaşık iki milyon tondur (Aran, 2019). Ekmek mayası üretimi ve tüketimi genellikle doyumluğa ulaşmış bir sektör olarak kabul edilmektedir. Dünyanın önemli bir bölümünde sektör büyümesi nüfus artışına paralel olmakla birlikte Hindistan ve Çin gibi nüfusu kalabalık olan ülkelerin özellikle buğday tüketimini tercih etmesi sonucunda bu bölgelerdeki sektör büyümesi dünya ortalamasının üzerinde seyredebilmektedir (Aran, 2019). 2016 verilerine dayanılarak Hindistan'da, unlu mamul ürünlerinin tahmini cirosu 1,3 milyar ABD dolarıdır ve aynı zamanda en büyük imalat sektörlerinden biridir (Dangi ve diğerleri, 2017). Ülkemizde kişi başına düşen maya tüketimi ortalama yılda 1 kg, ekmek tüketimi ise yılda 150 kg kadardır (Aran, 2019). Ülkemizde yıllık ekmek mayası ihtiyacı %1 kullanım esas alındığında ortalama yılda 100 000 ton seviyesindedir ve 2008 yılından itibaren maya fabrikası sayısı ise dördü farklı firma olmak üzere toplam yedi adettir (Aran, 2019). Bu fabrikalarda üretilebilecek potansiyel maya miktarı ise kurutulmuş ürün esas alındığında ortalama yılda 400 000 ton kadardır. Bu miktarlardaki maya miktarı, iç tüketimin çok üzerindedir. Bu sebeple maya, ülkemizin önemli ihracat ürünleri arasında yer almaktadır (Aran, 2019). Diğer bir ifadeyle dünyada üretilmekte olan toplam mayanın yaklaşık % 20'si Türkiye'de üretilebilmektedir ve Türkiye dünyanın önemli maya üretim merkezlerinden biridir (Aran, 2019).

Ekmek mayası üretimi, seçilen maya türünün bir karbon kaynağı olarak şeker üzerinde çok aşamalı yayılmasını içerir. Ekmek mayası genellikle, uygun bir sıcaklık ve pH'ta

temel besinlerin (melas, amonyak veya amonyum tuzları, fosfat ve vitaminler) sıvı bir çözeltilisine eklenen az miktarda mayadan başlayarak üretilir. Hücre popülasyonuyeterince çoğaldığında, yeni bir üreme aşaması için daha büyük bir biyoreaktöre aktarılır; Tatmin edici bir üretim miktarına ulaşmak için genellikle dört veya beş aşama gereklidir (Di Serio, Aramo, de Alteriis, Tesser ve Santacesaria, 2003). Endüstriyel ölçekte ekmek mayası, sonuçta ürün verimini düşüren ve aynı zamanda unlu mamullerin kalitesini olumsuz yönde etkileyen çok sayıda ve değişen çevresel strese maruz kalır (Gibson, Lawrence, Leclaire, Powell ve Smart, 2007). Ek olarak, bu çevresel kısıtlamalar büyük ölçüde hücre metabolizmayı ve canlılığı etkiler (Dangi ve diğerleri, 2017).

Fırıncılık işleminin çoğunda maya suşu, sıcaklık, basınç, pH, su içeriği, ozmotik, oksidasyon ve çeşitli kimyasal bileşikler gibi çeşitli çevresel koşullara maruz kalır (Takagi, 2017). Bu sert koşullar, hücre organellerine ve membranlarına ciddi hasara neden olur ve bu da sonuçta üremenin engellenmesine veya hücre ölümüne yol açar (Takagi ve Shima, 2015). Bu sebeple, mayaların fermantasyon kabiliyetini veya üretim verimliliğini daha da geliştirmek için, maya hücrelerinin stres tepkisi, adaptasyonu ve toleransının altında yatan ayrıntılı mekanizmalar anlaşılmalıdır (Takagi ve Shima, 2015).

Ekmek mayasının ticari fermantasyonunu ve üretim sürecini geliştirmek için çeşitli streslere karşı daha yüksek toleranslı maya suşları oluşturmak gerekir (Takagi ve Shima, 2015). Hamur kabartma aktivitesi ve ürünün raf ömrü göz önüne alındığında ticari olarak üretilen ekmek mayasının kalitesinin kullanılan kültüre bağımlı olduğu görülmektedir. Elde edilen ürünün piyasa koşullarında diğer özellikler açısından da rekabet gücüne sahip olması gerekmektedir. Konuya bu açıdan bakıldığında son zamanlarda üreticilerin taleplerinde önemli değişimler gözlenmekte ve kültür farklılıkları her geçen gün daha da önem kazanmaktadır (Aran, 2019). Maya tüketicisi olan fırıncılar, mayanın zaman ve kullanılan miktar açısından tasarruf sağladığı için kabarma gücünün yüksek olmasını, raf ömrünün uzun olmasını, tek bir tip maya satın alarak tüm formülasyonlarda kullanılabilmesini, asidik hamurlarda kullanılabilmesini arzu etmektedir. Ayrıca mayanın yüksek şeker ve yağ konsantrasyonlarından olumsuz yönde etkilenmemesi, kullanılan antifungal bileşiklerin maya hücresi üzerine olan

inhibisyon etkisinin asgari düzeyde olması arzu edilmektedir (Pretorius ve Van Rensburg, 2003).

S. cerevisiae, unlu mamuller ve diğer endüstrilerde kullanılan faydalı mayalardan biri olarak bilinmektedir. Kolayca kültürlenebildiği için biyolojik çalışmalarda ökaryotikmodel organizma olarak kullanılır. Yuvarlak-oval bir şekle sahiptir ve tomurcuklanma mekanizması ile çoğalır (Feldman, 2012; L. J. Walker ve diğerleri, 2004).

Ekmek mayası, üretimi veya uygulaması sırasında ciddi hasarlara maruz kalmaktadır. Ayrıca, üretim süreci sırasında metabolitlerin (etanol ve organik asitler gibi) birikmesi ve yüksek sıcaklık veya tuz ilavesi, ekmek mayasını etkilemektedir (Tsolmonbaatar ve diğerleri, 2016). Önceki çalışmalar, streslerin mayanın fenotipi üzerinde çeşitli etkileri olduğunu doğrulamaktadır (Alhoch ve diğerleri, 2019; Câmara, Maréchal, Tourdot-Maréchal ve Husson, 2019; García ve diğerleri, 2019; Vázquez ve diğerleri, 2019).

Enzimler, çoğu unlu mamul ürünlerinde kullanılan önemli bileşenlerdir. Daha yakın zamanlarda, özellikle ekmek ve diğer fermente ürünlerin imalatında kimyasal katkı maddelerinin kullanımındaki kısıtlamalar nedeniyle, enzimler fırıncılık endüstrisinde daha da büyük bir önem kazanmıştır (Melim Miguel, Souza, Costa Figueiredo, Paulo Lobo ve Maria, 2013).

Bu çalışmadaki amacımız, maya üretiminde ve ihracatında önemli bir konumda olan ülkemize maliyeti daha düşük, dirençli maya suşları hakkında daha çok bilgi sağlayabilmektir. Bu amaçla ülkemizde en çok tercih edilen dört farklı ticari maya suşu laboratuvar ortamında kültüre alınıp, bu suşların stres koşulları altındaki üreme hızları, mitotik bölünme indeksi, enzim aktiviteleri, stres koşullarında hücre morfolojilerindeki değişiklikler belirlenerek stres toleransı yüksek suşları, suşlar arasındaki farklılıkları tespit etmek hedeflenmektedir. Bu araştırma ülkemizde bulunan ticari ekmek mayalarının stres koşullarında üreme ve enzim aktivitelerinin aydınlatılmasına fayda sağlaması açısından önemlidir. Ülkemizde üretilen ve unlu mamul üretim sektöründe kullanılan ticari ekmek mayası suşlarının farklı endüstriyel işlemlere uygun olarak geliştirilmesi için gerekli olan bilgiyi sağlayacak öncü çalışmalar yeterli değildir. Bu tez çalışmasının sonuçlarının ülkemizde bulunan ticari ekmek mayalarının stres koşullarında üreme ve enzim aktivitelerinin aydınlatılmasına fayda sağlaması açısından önemli olacağı öngörülmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 *Saccharomyces cerevisiae*'nin Ekmek Mayası Üretiminde Kullanımı

Mayalar, şüphesiz, günümüzde insanlık tarafından ticari olarak üretilen ve güvenle tüketilen en önemli mikroorganizma grubudur. Ekmek mayasının endüstriyel üretimi, Avrupa ve Kuzey Amerika'da 100 yıldan daha uzun bir süre önce başladı. Ancak maya, ekmek yapımında hamurun mayalanması için binlerce yıldır kullanılmaktadır. İlk ekmek kaydı M.Ö. 2600 civarında ortaya çıktı. Babil'de, M.Ö. 12. yüzyıla gelindiğinde, Hammurabi zamanında pişirme özel bir zanaata dönüştü. Mayalı ekmeğin keşfi genellikle eski Mısırlılara atfedilir. İlk zamanlarda, fermente bira ve buğday ununun karıştırılması muhtemelen saray fırıncıları tarafından yapılıyordu. Daha sonra bu, tüm Mısırlı fırıncılar tarafından kabul edilen bir ekşi hamur süreci olarak ortaya çıktı. Ekmek pişirme teknolojisi, M.Ö. 13. yüzyılda Mısır'dan Akdeniz'in diğer bölgelerine yayıldı. Ticari fırıncılar, maya tedariklerini 19. yüzyıla kadar yerel bira fabrikalarından temin etmiş ve böylece bira mayasını mayalanma geleneği 19. yüzyıla kadar devam ettirmiştir (Trivedi, Jacobson, Tesch ve Friend, 1986).

19. yüzyılda, gıda üretiminin sanayileşmesi ve bilim olarak mikrobiyolojinin ortaya çıkışı, ekmek yapım uygulamalarında değişikliklere neden oldu (Blandino, Al-Aseeri, Pandiella, Cantero ve Webb, 2003; Ndiaye, Chiron, Della Valle ve Roussed, 2005). Spontan fermantasyonlar geleneksel olarak tahıl bazlı ürünlere gelişmiş teknolojik, besleyici ve organoleptik özelliklere sahip olmak için kullanılmaktadır. 1930'larda üretim süreçlerinin gelişmesiyle birlikte, düşük fiyata yüksek kaliteli ekmek mayası üretmek mümkün hale geldi. Ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*), genellikle fırınlamada kabartma maddesi olarak kullanılan maya türlerinin ortak adıdır. Satış hacmi ve dünya nüfusunun büyük bir kesimi için temel gıda olan ekmek yapımında kullanımına dayalı olarak hala en önemli fermantasyon ürünlerinden biridir. Aynı zamanda, içeceklerin ticari üretimi, endüstriyel etanol, antibiyotikler, endüstriyel enzimler, kimyasallar, gıdalar ve besin takviyeleri gibi birçok endüstriyel uygulamaya sahip olması nedeniyle en önemli biyoteknolojik ürünlerden biridir (Nasr, Zaky ve Daw, 2010). Temel olarak ekmek mayası formundaki *S. cerevisiae* biyokütlesi, dünyadaki herhangi bir tek hücreli mikroorganizmanın en büyük toplu üretimini temsil eder. İnsan

gıdası için her yıl birkaç milyon ton taze ekmek mayası üretilir (Di Serio ve diğerleri, 2003). Ekmek mayasının ekmek yapımındaki işlevi şu şekilde özetlenebilir: (1) fermantasyon sırasında gaz oluşumu ile hamur hacmini artırmak, (2) hamurda yapı ve doku geliştirmek ve (3) hamura ayrı bir tat katmak (Shima ve Takagi, 2009).

Ekmek mayası kullanımı, pişirme teknolojisinin doğuşunda ve ekmek kalitesi algımızda belirleyici bir faktördü (Randez-Gil, Corcoles-Saez ve Prieto, 2013). Ekmek mayası hücrelerinin faaliyeti, hamurun şekerlerin (esas olarak maltoz) alkollü fermantasyonu yoluyla mayalanması için gereken gazı sağlar. Tipik ekmek aromasının oluşmasında önemli olan fermente edilmemiş ekmek hamurunun iç yapısını geliştirir ve kimyasal bileşimini değiştirir (Cho ve Peterson, 2010). Maya ayrıca maya bazlı ürünlerin beslenme kalitesine katkıda bulunur ve sağlık üzerinde etkiler sağlar (Poutanen, Flander ve Katina, 2009). Tipik olarak ekmek mayası, bir protein veya aminoasidin yanı sıra bir vitamin takviyesi, enerji güçlendirici ve bağışıklık güçlendirici olarak da kullanılabilir (Mazo, Gmoshinski ve Zorin, 2007). Ekmek mayası suşları, uygun fermantasyon özelliklerine sahip doğal soylar arasındaki sınırlı çaprazlamadan ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, ekmek mayası suşları, şarap, sake ve bira mayaları gibi insan etkisine bağlı diğer *S.cerevisiae* soylarından daha düşük genetik çeşitliliğe ve daha yüksek sayıda kromozoma sahiptir (Liti ve diğerleri, 2009).

Saf kültürler yapma ve maya hücrelerini kurutma imkânı endüstriyel mayalama başlatıcılarının geliştirilmesine yol açtı (Gélinas, 2010). Bu gelişme, ekmek üretimini ve pişirmeyi önemli ölçüde değiştirdi. Bu değişikliğin sonuçları, çoğu ekmeğin ticari mayası *S. cerevisiae* kullanılarak yapıldığı modern zamanlarda belirgindir (Carbonetto, Ramsayer, Nidelet, Legrand ve Sicard, 2018). Ekmek mayası, mayalı ekmek, kek, hamur işleri ve diğer unlu mamullerin üretiminde kullanılan bir maya türüdür ve ekmek mayası, hamurdaki fermente olabilen şekerleri karbondioksit ve etanole dönüştürür (Mohammedaleid, 2012). Ekmek mayası, kuru maya (keklerde veya granüllerde olabilen) ve sıvı maya dahil olmak üzere çeşitli formlarda ve aktif veya susuz formlarda kullanıcıya sunulacak şekilde işlenebilir (Mohammedaleid, 2012)

Ekmek mayası, metabolize edilebilir karbon, enerji, azot, mineraller ve temel vitamin kaynakları içeren substratlardan üretilir ve *S. cerevisiae* için kolayca metabolize edilebilen karbon ve enerji kaynakları içeren substratlar, doğrudan ekmek mayası üretimi için kullanılabilirken, tahıllardaki nişastalar ve yeşil veya odunsu bitkilerdeki

selüloz gibi kompleks karbonhidratlar içerenler, kullanımdan önce maliyetli hidrolitik işleme ihtiyaç duyar (Mohammedaleid, 2012). Bugün dünyada ekmek mayası üretimi için tercih edilen substrat, pancar veya şeker kamışından elde edilen melastır (Mohammedaleid, 2012). Mayanın çoğalabilmesi için melasın belirli bazı mineral maddelerle zenginleştirilmesi gereklidir. Fermantasyon ortamına eklenen Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mo^{2+} ve Mn^{2+} verim artışı sağlamaktadır. Ortama ilave edilen iz elementler ve minerallerin miktarı kullanılmakta olan melasın elde edildiği kaynağa bağlı olarak değişmektedir (Reed ve Peppler, 1973).

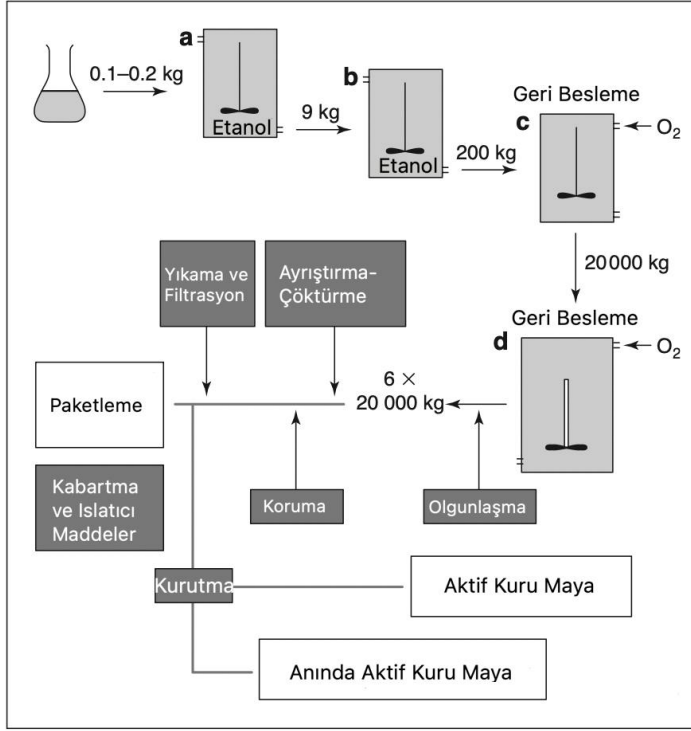
2.2 Türkiye’de ve Dünyada Ekmek Mayası Üretimi

Unlu mamul ürünleri, yüzyıllardır dengeli beslenmenin hayati bir bileşeni olarak kullanılmıştır. Bugün, unlu mamuller endüstrisi, dünya çapında gıda endüstrisinin en büyük sektörlerinden biridir ve binlerce istihdam yaratır ve milyarlarca dolar gelir elde eder. Bu sürekli büyüme, tüketicinin taze, rafta dayanıklı, besleyici ve uygun şekilde paketlenmiş uygun ve birinci sınıf unlu mamullere olan taleplerinden kaynaklanmaktadır. Çok sayıda maya üretim endüstrisi dünyanın çeşitli yerlerinde bulunmaktadır. Bu endüstriler, farklı türlerde ekmek mayası ve diğer unlu mamullerin üretiminde yer almaktadır (Dangi ve diğerleri, 2017).

Maya sanayii ana ürünleri, yan ürünleri, atık ve artık ürünleri, çevre teknolojileri gibi alanlar ve bu alanlarda yapılacak olan araştırma geliştirme faaliyetleri Türkiye için diğer ülkelerde olduğundan çok daha önemli bir yere sahiptir. Özellikle maya hücrelerinin gelecekte kullanılabilecek potansiyel alanları da göz önüne alındığında Türkiye’nin elindeki bu biyoteknoloji potansiyeline yatırımlarda bulunması oldukça fazla önem taşımaktadır (Aran, 2019).

2.3. Ekmek Mayası Üretim Süreci ve Karşılaşılan Zorluklar

Ekmek mayasının ticari üretimindeki en önemli gereksinimler, hızlı büyüme ve yüksek biyokütle verimi ile birlikte iyi hamur mayalama aktivitesidir. Bunlar, fermenter boyutunda ve havalandırma ve besleme koşullarında farklılık gösteren ardışık aşamalara sahip, iyi kurulmuş bir kesikli beslemeli fermantasyon yönteminin kullanılmasıyla elde edilir (Randez-Gil, Sanz ve Prieto, 1999)(Şekil 2.1).



Şekil 2. 1.Kültür ortamı olarak melas kullanan fermantasyon ile çoğalım şeması (Randez-Gil ve diğerleri, 1999)'dan değiştirilerek alınmıştır.

Ekmek mayası genellikle, uygun bir sıcaklık ve pH'ta temel besinlerin (melas, amonyak veya amonyum tuzları, fosfat ve vitaminler) sıvı bir çözeltisine eklenen az miktarda mayadan başlayarak üretilir. Hücre popülasyonu yeterince çoğaldığında, yeni bir büyüme aşaması için daha büyük bir biyoreaktöre aktarılır; Tatmin edici bir üretim miktarına ulaşmak için genellikle dört veya beş aşama gereklidir (Di Serio ve diğerleri, 2003).

Endüstriyel ölçekte ekmek mayası, sonuçta ürün verimini düşüren ve aynı zamanda unlu mamullerin kalitesini olumsuz yönde etkileyen çok sayıda ve dalgalanan çevresel strese maruz kalır (Gibson ve diğerleri, 2007). Ek olarak, bu çevresel kısıtlamalar büyük ölçüde hücresel metabolizmayı ve canlılığı etkiler (Dangi ve diğerleri, 2017).

Fırıncılık işleminin çoğunda maya suşu, sıcaklık, basınç, pH, su içeriği, ozmotik, oksidasyon ve çeşitli kimyasal bileşikler gibi çeşitli çevresel koşullara maruz kalır (Takagi, 2017). Bu sert koşullar, hücresel organellere ve zarlara ciddi hasara neden olur ve bu da sonuçta büyümenin engellenmesine veya hücre ölümüne yol açar (Takagi ve

Shima, 2015). Bu sebeple, mayaların fermentasyon kabiliyetini veya üretim verimliliğini daha da geliştirmek için, maya hücrelerinin stres tepkisi, adaptasyonu ve toleransının altında yatan ayrıntılı mekanizmalar anlaşılmalıdır (Takagi ve Shima, 2015).

Genel olarak, mikroorganizmalar çevresel strese bir dereceye kadar uyum yeteneğine sahiptir. Maya hücrelerinin ayrıca stres proteinlerinin indüklenmesi, stres koruyucularının veya uygun çözünen maddelerin birikmesi, membran bileşiminin değişmesi ve stresle tetiklenen sinyal iletim yolları aracılığıyla karşılık gelen gen ekspresyonunu düzenleyerek translasyonun baskılanması gibi çeşitli stres adaptasyon mekanizmaları edinmesi gerekir. Protein denatürasyonunu ve ROS (reaktive oxygen species- reaktif oksijen türleri) oluşumunu indükleyen, büyüme inhibisyonuna veya hücre ölümüne yol açan şiddetli stres koşulları altında, mayanın fermentasyon kabiliyeti oldukça sınırlıdır. Endüstriyel uygulamalar açısından, stres toleransı maya hücrelerinin temel özelliğidir. Ekmek mayasının ticari fermentasyonunu ve üretim sürecini geliştirmek için çeşitli streslere karşı daha yüksek toleranslı maya suşları oluşturmak gerekir (Takagi ve Shima, 2015). Halen kullanılmakta olan ekmek mayası starter kültürleri klasik çaprazlama ile geliştirilip, istenen özellikte olanlar seçilmektedir (Hansen, 2002). Taksonomik açıdan incelendiğinde ekmek mayası kültürlerinin büyük bir çoğunluğu *S.cerevisiae* türüne aittir. Çok özel durumlarda bazen yöresel ekmek yapımında *S.cerevisiae* dışında türlere de rastlanabilmektedir (Zinser ve Daum, 1995). Ekmek yapma işlemi sırasında, ekmek mayası, havada kurutma, donma-çözülme ve yüksek sükröz konsantrasyonları gibi birçok çevresel strese maruz kalır (Attfield, 1997). Ekmek yapımında kullanılan maya hücreleri, hamur fermentasyon süreçleri sırasında farklı sakkaroz konsantrasyonlarına alışmak zorundadır (Tanaka, Ando, Nakamura, Takagi ve Shima, 2006). Tatlı hamur (yüksek şekerli hamur), un ağırlığı başına kabaca %30'a kadar sakkaroz içerir. Bu tür yüksek sakkaroz konsantrasyonları, hücresel mekanizmaya ciddi şekilde zarar verene ve mayanın optimal fermentasyon yeteneğini engelleyen yüksek ozmotik stres uygular (Verstrepen ve diğerleri, 2004).

Ekmek maya hücreleri ozmotolerans elde etmek ister, ancak ozmotoleranslı ekmek mayası suşlarının ilerlemesi, yüksek sükröz stres toleransı ile ilgili moleküler mekanizma hakkında bilgi gerektirir (Shima ve Takagi, 2009).

Hamur kabartma aktivitesi ve ürünün raf ömrü ticari olarak üretilen ekmek mayalarının kalitesinde oldukça önemlidir ve bu özelliklerin ekmek mayasının üretiminde kullanılan kültüre bağımlı olduğu görülmektedir. Piyasa koşullarında elde edilen ürünün diğer özellikler açısından da rekabet gücüne sahip olması gerekmektedir. Bu sebeple son zamanlarda üreticilerin üründen beklediği taleplerde önemli değişimler gözlenmekte ve kültür farkları her geçen gün daha fazla önem kazanmaktadır (Aran, 2019).

2.4 S. cerevisiae Üreme Koşulları ve Genel Stres Tepkisi

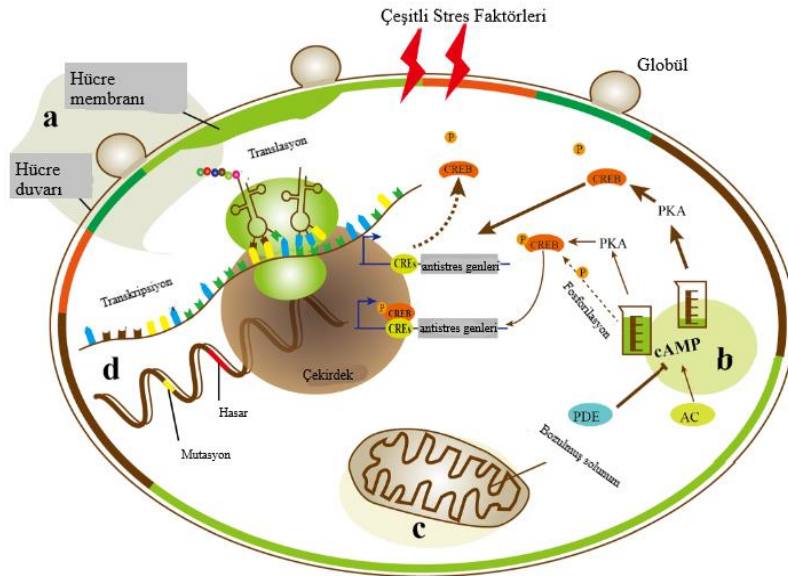
Günümüzde ekmek mayası üretimi endüstriyel fermentasyon uygulamalarının en başarılılarından biri olarak kabul edilmekte ve mikrobiyal hücre üretiminde en ekonomik işlem olarak tanımlanmaktadır. Ticari ölçekte ekmekçilikte kullanılan başlıca maya türü *S. cerevisiae*'dir. *S. cerevisiae*'nin birçok alt türü farklı metotlar uygulanarak zamanla seçilmiştir. Endüstriyel fermantasyon sürecinde kullanılan türler arasında ortaya çıkan verim farklılıkları üreticilerin tercihlerini etkilemiştir ve bu da bu organizmaların piyasa koşullarında bir rekabet ortamı oluşturmasına sebep olmuştur (Aran, 2019).

S. cerevisiae, fırıncılık ve diğer endüstrilerde kullanılan faydalı mayalardan biri olarak bilinmektedir. Ekonomik bir fiyata kolayca kültürlenebilir (Salari ve Salari, 2017). Mayalar genellikle zararlı olmayan mikroorganizma grubundandır. Endüstride çeşitli endüstriyel uygulamalar için kullanılan mayaların çoğu "GRAS" (Generally Regarded As Safe) mikroorganizmadır.

Maya hücreleri haploid ve diploid formlarda çoğalabilirler. Haploid hücreler gibi diploid hücreler mitotik yaşam döngüsünü gösterir, ancak yüksek stres durumlarında mayoz yaşam döngüsüne girer ve dört haploid spor üretir. Bölünme süreleri yaklaşık 90 dakikadır (Salari ve Salari, 2017). *S. cerevisiae* aerobik ve anaerobik olarak büyüebilir. Farklı şekerleri kullanma yeteneği, hangi şekilde çoğaldığına bağlıdır. Aerobik olarak çoğalır, galaktoz ve fruktoz en iyi fermente şekerlerdir. Tüm suşlar üremek için azot ve fosfor kaynaklarına ihtiyaç duyar. Azot kaynağı olarak amonyak ve üre kullanılabilir. Fosfor kaynağı olarak da dihidrojen fosfat kullanırlar. Ayrıca optimum büyüme için kükürt ve magnezyum gibi çeşitli minerallere ihtiyaçları vardır. Cinsiyet farklılaşması nedeniyle, maya hücrelerinin iki çiftleşme türü vardır: a ve α farklı tipte iki haploid maya hücresi birbiriyle çiftleşebilir. Hemen hemen tüm mayaların tomurcukları vardır.

Hücreler çoğaldıkça tomurcuklar da olgunlaşana kadar büyür. Daha sonra ebeveynlerinden ayrılırlar (Kraft ve diğerleri, 2005).

Ekmek mayası, üretimi veya uygulaması sırasında ciddi hasarlara maruz kalmaktadır. Ayrıca, üretim süreci sırasında metabolitlerin (etanol ve organik asitler gibi) birikmesi ve yüksek sıcaklık veya tuz ilavesi, pişirme mayasını etkilemektedir (Tsolmonbaatar ve diğerleri, 2016). Sonunda, maya üreme sırasında artan stresle karşılaşır. Bunlar oksidasyon, hipertonsite, iyon stresi, yüksek sıcaklık, düşük pH, etanol ve beslenme kısıtlamalarını içerir (Greetham ve diğerleri, 2013; Koziol, Zagulski, Bilinski ve Bartosz, 2005; Mendoza, Quintero, Bressan, Hasegawa ve Pardo, 1996; Navarro-Tapia, Querol ve Pérez-Torrado, 2018; Sekova, Dergacheva, Tereshina, Isakova ve Deryabina, 2018; Wenger ve diğerleri, 2011). Önceki çalışmalar, streslerin mayanın fenotipi üzerinde çeşitli etkileri olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 2.2) (Alhoch ve diğerleri, 2019; Câmara ve diğerleri, 2019; García ve diğerleri, 2019; Vázquez ve diğerleri, 2019).



Şekil 2. 2. Streslerin maya üzerindeki ana etkileri üzerine güncel çalışmalar (Qiu ve diğerleri, 2019) dan değiştirilerek alınmıştır. (a) Hücre membranındaki değişiklikler: Farklı renkler, farklı lipid bileşimlerini temsil eder. (b) Sinyal molekülünün içeriğindeki değişiklikler, antistres genlerinin ifadesinde değişikliklere yol açar. (c) Mitokondrideki hasarlı solunum zincirleri. (d) DNA hasar görür veya mutasyona uğrar ve hücre transkripsiyonu ve translasyonu değiştirir.

Tüm organizmalar, özellikle mayalar gibi tek hücreli ökaryotlar, metabolizmalarını değişen çevresel koşullara uygun şekilde ayarlamak için karmaşık mekanizmalar geliştirmiştir (Rodicio, Rosaura and Heinisch 2009).

2.4.1. Ozmotik stres

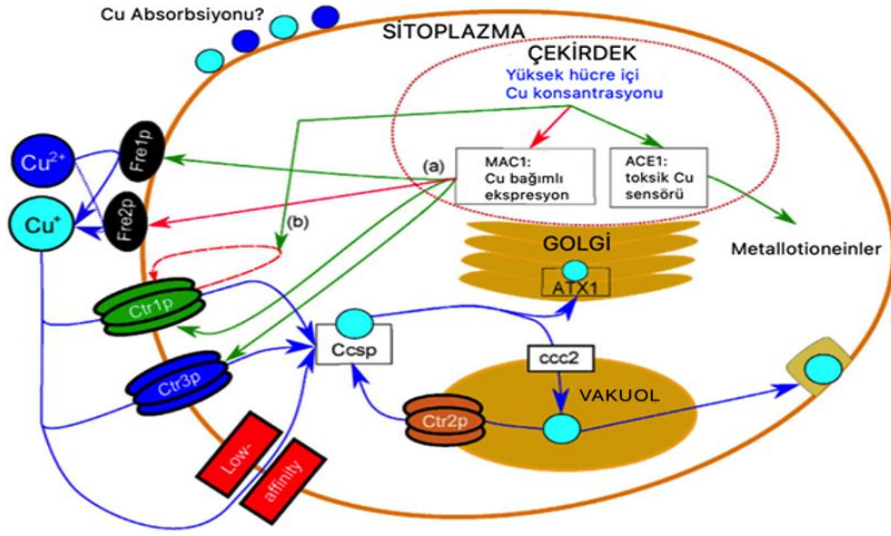
Organizmalar çevresel değişimlere uyum sağlamak ve hayatta kalmak için hücrel mekanizmaları kullanırlar. Hiperozmotik stres, bir hücrenin hücre dışında, içeriden daha yüksek çözünen konsantrasyonu yaşadığı, önemli çevresel stres faktörlerinden biridir. Bu, hücreden su kaybına neden olarak daha yüksek hücre içi iyon ve metabolit konsantrasyonuna ve sonunda hücrel aktivitenin durmasına neden olur. Hiperozmotik stres, yüksek konsantrasyonlarda şeker veya sodyum klorür (NaCl) gibi tuzdan kaynaklanır (Dhar, Sagesser, Weikert, Yuan ve Wagner, 2011). Yüksek tuz stresi, hiperozmotik stresin özel bir durumudur ve hücre üzerinde yüksek konsantrasyonda şekere benzer etkilere sahiptir (Causton ve diğerleri, 2001; Gasch ve diğerleri, 2000). Ayrıca hücre içine alınan ve hücrel iyonik dengeyi bozabilen sodyum ve klor iyonlarının yüksek hücre dışı konsantrasyonları nedeniyle hiperiyonik strese neden olur. Sodyum stresine tolerans bu nedenle hiperozmotik stres tepkisi için gerekli olanlarla birlikte ek iyon taşıma ve detoksifikasyon mekanizmalarına ihtiyaç duyar. Mayalarda hiperozmotik stres tepkisi, bir MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) yolu olan yüksek ozmolariteli gliserol (HOG) yolu tarafından aracılık edilir (Brewster, de Valoir, Dwyer, Winter ve Gustin, 1993; Dihazi, Kessler ve Eschrich, 2004; Hohmann, 2002; Saito, 2004). İki hücre membranına bağlı sensör, Sho1p ve Sln1p, ozmotik değişikliği saptar, bu da HOG yolu genlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır, bu da sırasıyla tuz toleransı ve adaptasyonu ile ilişkili genlerinin aktivasyonuna yol açar (Gorner ve diğerleri, 1998; Hansen, 2002; Martínez-Pastor ve diğerleri, 1996; Ostrander ve Gorman, 1999; Reiser, Salah ve Ammerer, 2000; Rep ve diğerleri, 1999; Rep, Krantz, Thevelein ve Hohmann, 2000; Schmitt ve McEntee, 1996).

Değişmiş ozmolariteye adaptasyon, ozmotik değişikliklerin algılanmasına ve hücrel aktiviteyi sürdürmeyi amaçlayan uygun hücrel tepkilere dayanan aktif bir süreçtir. Bir hiperozmotik şoktan sonra adaptasyon birkaç saat sürebilir (Hohmann, 2002). Marshall ve Odame-Darkwah'ın (1994) bulduğu gibi, NaCl'nin varlığı genel fermantasyon oranını

azaltır. Ek olarak, aynı çalışma, daha yüksek NaCl konsantrasyonlarının hamurda bulunan birkaç maya türünün hayatta kalmasını engellediğini ortaya koydu (Shokoohi, Tsigounis, Urmaza ve Perez, 2016).

2.4.2.Metal İyon Stresi (Bakır)

Bakır, canlı hücre ve organizmaların normal metabolizması için eser miktarda gerekli olan geçiş metallere biridir (Ruta ve Farcasanu, 2021) . Diğer geçiş metalleri gibi, bakır (Cu^{2+}), canlı organizmalar için temel bir mikro besindir, ancak fazla olması durumunda toksik hale gelebilir (Cadiou ve diğerleri, 2017). Bu nedenle, canlı organizmalar, bu metal iyonunun içeriğini kontrol etmek ve toksisitesini önlemek için düzenleyici mekanizmalar geliştirmiştir (Nevitt, Öhrvik ve Thiele, 2012). Bakır iyonu, evrensel Cu/Zn süperoksit dismutaz ve sitokromC oksidaz dahil olmak üzere solunum, demir taşınması ve antioksidan savunma gibi hücresel süreçlerde önemli rollere sahip çeşitli enzimler için bir kofaktör olarak gereklidir (Ruta ve Farcasanu, 2021). Fakat yüksek konsantrasyonlarda bakır iyonu, oldukça toksik olan reaktif oksijen türleri üretir. *S.cerevisiae*'de bakır iyonları, iki transkripsiyonel aktivatör olan Ace1 ve Mac1 aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenler. Ace1, stresli seviyelerde bakır tuzlarına maruz kalan hücrelerde bakır kaynaklı gen ekspresyonuna aracılık ederken, Mac1 bakır eksikliği olan koşullar altında bir gen alt grubunu aktive eder (Gross, Kelleher, Iyer, Brown ve Winge, 2000).



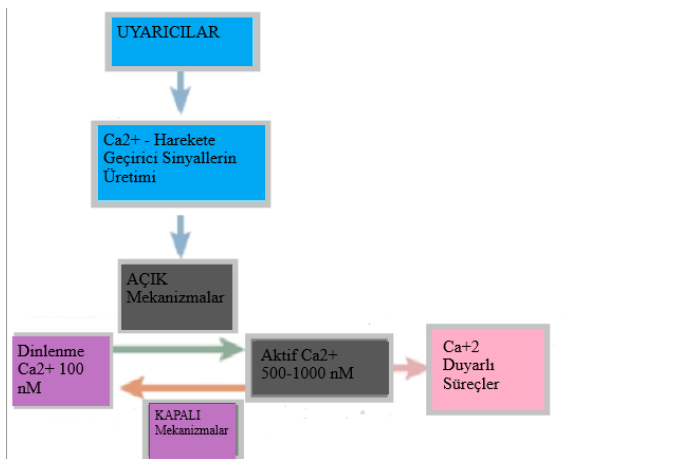
Şekil 2. 3. *S.cerevisiae*'da bakır stres yolağı (Cadiou ve diğerleri, 2017)'den değiştirilerek alınmıştır.

Şekil 2.3'de *S cerevisiae*'da bakır akışı verilmiştir. Bakır akışı mavi oklarla temsil edilir. Düzenleyici döngüler kırmızı (etkinleştirme) ve yeşil (baskı) olarak gösterilir. Tek değerli ve iki değerli bakır, sırasıyla koyu mavi ve açık mavi dairelerle temsil edilir. Bakır iyonu taşınımının ilk adımı, Cu(II)'nin Ferroredüktazlar tarafından Cu(I)'ye indirgenmesidir, ardından yeşil (*Ctr1p*) ve mavi (*Ctr3p*) ile temsil edilen yüksek afiniteli taşıyıcılar veya düşük afiniteli taşıyıcılar yoluyla yapılır (Şekil 2.3). Bakır daha sonra hücre sitoplazmasının farklı bölümlerinde *Ccsp*, *ATX1* veya *ccc2* gibi farklı protein şaperonları tarafından taşınır. Bakır taşınması, yüksek hücre içi Cu bakır konsantrasyonlarını algılayan *MAC1* tarafından düzenlenir ve yüksek afiniteli taşıyıcılar *CTR1* ve *CTR3*'ün ve redüktaz *FRE1*'in ekspresyonunu aşağı düzenlerken, *FRE2* redüktaz ekspresyonunu aktive eder (Cadiou ve diğerleri, 2017).

2.4.3.Kalsiyum Stresi

Kalsiyum iyonları hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda birçok hücresel süreci düzenler (Xu, Fang, Yan ve Jiang, 2019). Hücre içi kalsiyum homeostazının düzenlenmesi ve kalsiyum/kalsinörin sinyal yolu ökaryotik hücrelerde yüksek oranda korunmuştur (Cui, Kaandorp, Slood, Lloyd ve Filatov, 2009; Serra-Cardona, Canadell ve Ariño, 2015). Ökaryotik hücrelerde, kalsiyum iyonu (Ca^{2+}), hücre çoğalması, kas

kasılması, programlanmış hücre ölümü vb. gibi sayısız biyolojik süreci düzenleyen her yerde bulunan hücre içi haberciler olarak işlev görür (Cui ve diğerleri, 2009). Tomurcuklanan maya *S. cerevisiae*'de sitozolik kalsiyum homeostazı, plazma ve organel membranlarındaki Ca^{2+} taşıyıcıları tarafından düzenlenir. Sitosolik Ca^{2+} 'daki geçici artışlar, kalsiyum/kalsinörin sinyal yolunu aktive eder (Xu ve diğerleri, 2019). *S. cerevisiae*'da diğer ökaryotlarda olduğu gibi sitozolik serbest kalsiyum konsantrasyonunu $[Ca^{2+}]$ hücre plazma zarı boyunca ve hücre içi membran sistemleri boyunca geçişini aktif bir şekilde son derece düşük seviyede tutar (Cunningham ve Fink, 1994). Maya hücrelerinde, vakuol ana Ca^{2+} deposudur. Katyonun bu organelden giriş ve çıkışına farklı taşıyıcılar aracılık eder (Puigpinós, Casas ve Herrero, 2015). *S. cerevisiae*'da, hipoozmolarite, ısı şoku, feromonlar, E.R stresi ile Cch1-Mid1 plazma membran kanalının uyarılması sitozolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonunun artmasına ve Crz1 gibi hedef proteinlerini defosforile eden kalsinörinin aktivasyonuna neden olur. Ca^{2+} iyonları sitoplazmaya dış ortamdan ya da plazma zarı Ca^{2+} kanal kompleksi Mid1/Cch1 veya endoplazmik retikulum, katyon kanalı yvc1 veya mitokondri yoluyla vakuol gibi hücre içi kalsiyum depolarından hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu artırır (Bonilla ve Cunningham, 2003; Thewes, 2014). Hücre içi $[Ca^{2+}]$ konsantrasyonu artışı çeşitli mekanizmalar ile etki ederek Ca^{2+} taşınımına neden olan sinyalleri devreye sokar ve artan Ca^{2+} seviyesi birçok hücre yolunu tetikleyerek Ca^{2+} duyarlı süreçleri uyarır. Yanıt olarak da $[Ca^{2+}]$ konsantrasyonu bazal seviyeye çekilir (Şekil 2.4.).



Şekil 2. 4. Kalsiyum sinyal ağının dört birimi (Berridge, Lipp ve Bootman, 2000)'den değiştirilerek alınmıştır.

Uyarıcılar, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunda bir artışı tetiklemek için çeşitli AÇIK mekanizmalar üzerinde hareket eden Ca^{2+} mobilize edici sinyaller üreterek hareket eder. Artan Ca^{2+} seviyesi, birçok farklı hücrenel yolu tetiklemek için çeşitli Ca^{2+} 'ya duyarlı süreçleri uyarır. Yanıt, Ca^{2+} 'ı dinlenme düzeyine geri getiren KAPALI mekanizmaları tarafından sonlandırılır. Aynı renk kodlamasına sahip bu dört fonksiyonel birimin detayları Şekil 2.4'de gösterilmektedir (Berridge ve diğerleri, 2000).

2.4.4 Sıcaklık Stresi

Bir maya hücresinin yaşadığı en temel stres ortam sıcaklığıdır. *S.cerevisiae*, güneşli bir güne eşdeğer olan 25° ile 30° (77°–86°F) arasında optimum büyüme sergiler. Bununla birlikte, 36–37° (yaklaşık 100°F) sıcaklıklarda, maya hücreleri, ısı şoku yanıtı (HSR-heat shock response) olarak adlandırılan koruyucu bir transkripsiyonel programı aktive eder ve membran bileşimi ve karbonhidrat akışı dahil olmak üzere fizyolojilerinin diğer bileşenlerini değiştirir. *S.cerevisiae* ve diğer mezofilik mayalar, 42°(107°F)'ye kadar olan sıcaklıklarda üremeyi sürdürürler, ancak daha yüksek sıcaklıklara kronik maruziyetle baş edemezler (Morano, Grant ve Moye-Rowley, 2012).

Spesifik olarak, soğutma maliyetlerini büyük ölçüde azaltacak ve kontaminasyonu önlemeye yardımcı olacak olan 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda fermantasyonu gerçekleştirmek için daha yüksek termotoleranslı mayalara ihtiyaç vardır (Shahsavarani, Sugiyama, Kaneko, Chuenchit ve Harashima, 2012; Shi, Wang ve Wang, 2009).

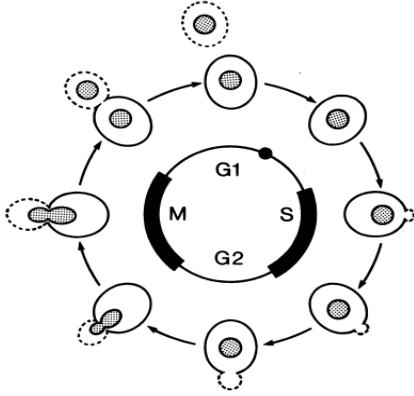
2.5. *S.cerevisiae*'da Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, büyümekte olan bir hücrenin tüm bileşenlerini kopyaladığı ve onları iki yavru hücre arasında yaklaşık eşit olarak böldüğü olaylar dizisidir, böylece her yavru hücre süreci tekrarlamak için gerekli bilgi ve mekanizmayı içerir (Mitchison, 1994).

Ökaryotik hücre döngüsü dört faza ayrılır: G1 (gap1), S (DNA sentezi), G2 (gap2) ve M (mitoz).S fazı sırasında kromozomal DNA büyük bir doğrulukla kopyalanırken, G1 ve G2 fazları sırasında sırasıyla DNA replikasyonunun ve ardından mitozun başlangıcını hazırlamak ve kontrol etmek için olaylar gerçekleşir (Alberghina ve diğerleri, 2012).

Ancak *S. cerevisiae*'da sentromer işlevini gerçekleştiren yapı nükleus zarında bulunan Spindel Pole Body (SPD) cisimciğidir (Feldman, 2012). Yüksek organizasyonlu, doku organ farklılaşması gösteren ökaryotlardan farklı olarak *S. cerevisiae*'da mitozda

nükleus zarı kaybolmaz. Bu tür bölünmeye kapalı mitoz denir. *S. cerevisiae*'da ökaryotlardan farklı olarak lizozom da bulunmaz. Lizozom işlevi vakuol tarafından gerçekleştirilir (Feldman, 2012). *S. cerevisiae*'da hücre bölünmesi işlevsel olarak normal mitoz olsa da bazı kaynaklarda halen tomurcuklanma ile bölünme olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 2. 5. *S. cerevisiae* mitotik hücre döngüsü (Herskowitz, 1988).

Hücre döngüsünün aşamaları, uzunluklarıyla yaklaşık orantılı olarak çizilir. Ana hücre düz bir çizgi ile çizilir; yavru tomurcuk ve hücre noktalı bir çizgi ile çizilir. Gölge malzeme hücre çekirdeğini temsil eder. S, DNA sentezi; M, mitoz (nükleer bölünme). G1 içindeki daire, maya hücrelerinin çifteleşme faktörleri tarafından durdurulduğu konumu gösterir (Herskowitz, 1988).

Memeli hücre döngüsünün G1 fazındaki kontrol noktası (Checkpoint), hücre büyümesini ve bölünmeyi düzenleyen iyi bilinen bir kontrol elemanıdır (Cooper, 2003). Kontrol noktasından geçmeden önce, bazı hücreler ve çevresel koşullara bağlı olarak hücre döngüsü durdurularak hücreler G0 veya latent faz adı verilen proliferatif olmayan bir faza girebilirler. Bu durum, geri dönüşümsüz olan yaşlılık veya terminal farklılaşma gibi diğer hücre döngüsü çıkışlarından farklıdır. Çevresel veya hücre içi koşullar normal duruma geldiğinde hücreler, G0'dan tekrar G1'e geçerek hücre döngüsüne devam edebilirler (Grant ve Cook, 2017).

2.6.Ekmek Mayasında Amilaz, İnvvertaz, Proteaz Enzimlerinin Görevleri

Enzimler, çoğu fırıncılık ürününde kullanılan önemli bileşenlerdir. Daha yakın zamanlarda, özellikle ekmek ve diğer fermente ürünlerin imalatında kimyasal katkı maddelerinin kullanımındaki kısıtlamalar nedeniyle, enzimler unlu mamul üretiminde daha da büyük bir önem kazanmıştır (Melim Miguel ve diğerleri, 2013).

Amilaz, dekstrin ve glikoz birimlerinden oluşan giderek daha küçük polimerler dahil olmak üzere çeşitli ürünler vermek üzere nişasta moleküllerini hidrolize eden enzimdir (Chi ve diğerleri, 2009; Gupta, Gigras, Mohapatra, Goswami ve Chauhan, 2003). Amilazlar, ekmek ve fırıncılık endüstrisinde, nişasta sıvılaştırma ve şekerleme, kağıt endüstrisi, deterjan endüstrisinde, tıbbi ve klinik kimya, gıda ve ilaç endüstrilerinde analizlerde birçok uygulamaya sahiptir. Amilaz, biyoteknoloji alanında çok önemli bir rol oynayan önemli ve vazgeçilmez bir enzimdir (Yalcin ve Corbaci, 2013). Amilazlar genel olarak α , β ve γ alt tiplerine ayrılır ve bunlardan ilk ikisi en çok çalışılanlardır (Gopinath ve diğerleri, 2017). Nişasta, düşük fiyatı ve dünyanın birçok bölgesinde kolayca bulunabilen hammaddesi nedeniyle maya hücrelerinin ve onların fermantasyon ürünlerinin büyük ölçekte üretimi için en iyi substrattır (Chi ve diğerleri, 2009). Bu sebeple fırıncılık endüstrisinde kullanılan maya suşunun amilaz aktivitesinin iyi olması önem arz etmektedir.

İnvvertaz, bitkiler ve mikroorganizmalar arasında yaygın olarak bulunan ve disakkarit sükrozun glikoz ve fruktoza hidrolizini katalize eden bir enzimdir (Sainz-Polo ve diğerleri, 2013). İnvvertaz özel bir enzim türüdür. *S.cerevisiae*, karakteristik yüksek sükroz fermente edilebilirliği nedeniyle invertaz üretimi için tercih edilen organizmadır (Shankar, Thangamathi, Rama ve Sivakumar, 2014).

S.cerevisiae'deki *SUC2* yapısal geni, salgılanan ve sitoplazmik invertaz için farklı mRNA'ları kodlar (Perlman, Raney ve Halvorson, 1984). *SUC2*, %2 glikoz tarafından baskılansa da, indüklenmesi için düşük bir glikoz konsantrasyonu (%0,2'nin altında) gerektirir (Ozcan, Vallier, Flick, Carlson ve Johnston, 1997). Yüksek seviyede glikoz, *Saccharomyces cerevisiae* mayasında *SUC2* geninin ekspresyonunu baskılar.

Ekmek hamurundaki diğer önemli enzim ise **proteaz**dır. Proteaz, amino asitler arasındaki peptid bağlarını kırarak protein zincirlerine etki eder. Proteazlar hamurun kıvamını etkilemenin yanı sıra lezzetini de etkiler. Proteazlar, protein zincirinin son

peptit bağını kırdıklarında tek amino asitlerle sonuçlanır. Bu amino asitler, pişirme sırasında kabukta meydana gelen lezzet ve esmerleşme reaksiyonlarına katılabilir (Buehler, 2012).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan *S. cerevisiae* Suşları ve Üreme Koşulları

Bu tez araştırması için ülkemizde ekmek üretiminde kullanılan ticari mayalardan 4 farklı marka seçildi. Bu markalara ait yaş mayalardan 1 gram tartılarak 10 ml sterildistile suda süspanse edildi. *S. cerevisiae* suşlarına ait örnekler ayrı ayrı YPD (%1 Yeast Extract, %2 Peptone, %1 Dextrose) petrilerine çizgi ekimi yapılarak yeniden üretilmek ve canlılıklarını doğrulamak için 30 °C'de, 48 saat inkübatörde üremeye bırakıldı. Normal veya zengin besiyeri olarak da adlandırılan YPD ortamında üretilen maya suşları tez deneyleri sırasında sıvı kültür başlatmak için +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi. Ticari olarak temin edilen mayalar TMY1 (ticari maya 1), TMY2, TMY3, TMY4 şeklinde isimlendirildi. *S. cerevisiae* suşlarının üretilmesinde kullanılan besiyeri içerikleri ve uygulanan standart yöntemler açıklandığı şekilde yapıldı (Rose, M., Winston, F., Heiter, 1990). Çalışmada kullanılan besiyeri içerikleri Ek 1'de verildi.

3.2. Abiyotik Stres Koşullarının Belirlenmesi

Abiyotik stres koşullarını belirlerken endüstriyel fermentasyon sürecinde sıklıkla karşılaşılan stres faktörleri seçildi.

S. cerevisiae depolama, ekmek ve diğer ürünlerin üretimi sırasında yaygın olarak tuzlara, özellikle NaCl'ye maruz kalır (Barnett, 2003), bu nedenle artan tuz direncine çok önem verilir. Bu tez çalışmasında da hiperozmotik stresin ticari mayalar üzerine etkisinin incelenmesi için 0,8 M NaCl konsantrasyonu abiyotik stres faktörü olarak belirlendi.

Kalsiyum iyonları hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda birçok hücresel süreci düzenler. *S.cerevisiae*'da sitozolik Ca⁺ 'daki geçici artışlar kalsiyum/kalsinörin sinyal yolunu aktive eder. *S.cerevisiae*'da diğer ökaryotlarda olduğu gibi serbest Ca²⁺ konsantrasyonunun hücre plazma zarı boyunca son derece düşük seviyede tutar (Cunningham ve Fink, 1994). Ticari mayaların kalsiyum stresinde gösterdiği metabolik değişiklikleri incelemek için bu tez çalışmasında 200 mM CaCl₂ stres faktörü olarak belirlendi.

Bakır organizmaların normal metabolizması için eser miktarda gerekli olan geçiş metallere aittir. Bakır solunum, demir taşınması ve antioksidan savunma gibi

hücresel süreçlerde önemli rollere sahip çeşitli enzimler için kofaktör olarak gereklidir. Fakat yüksek konsantrasyonları oldukça toksik olan reaktif oksijen türleri üretir. Bu çalışma boyunca da 200 µM CuSO₄ stres faktörü olarak belirlendi.

Mikroorganizmaların çoğalmasını en çok etkileyen en önemli fiziksel parametrelerden biri sıcaklıktır. Mikroorganizma çoğaltılacak olan biyoreaktörde uygun sıcaklık söz konusu değilse mikroorganizma normal büyüme, gelişme, çoğalma gibi yaşamsal faaliyetler gösteremez. Laboratuvar şartlarında üretilen mayanın optimum büyüme sıcaklığı 20° C -30° C aralığındadır. *S.cerevisiae* için maximum değer 35°C -43° C aralığında olduğu bilinmektedir. Fakat pişirme esnasında hamur içi sıcaklığın 60° C kadar çıkabildiğinden ticari mayaların sıcaklığa direnç göstermeleri gerekir. Bu çalışmada ticari mayaların 55° C ‘decanlı kalma süreleri tayin edildi.

3.3.Stres Koşullarının Üreme Durumuna Etkilerinin Kalitatif İncelenmesi

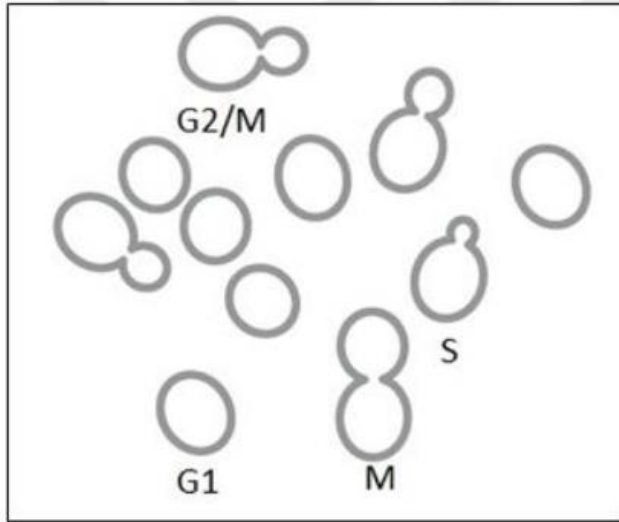
YPD (kontrol) ve 0,8M NaCl, 200 mM CaCl₂, 200 µM CuSO₄ eklenerek YPD katı besiyerleri hazırlandı. TMY1, TMY2, TMY3 ve TMY4 suşları kontrol ve her bir stres ortamına yayma ekim tekniğiyle ekildi ve 30° C etüvde büyütüldü. Böylece stres ortamındaki büyüme morfolojilerindeki farklılıklar ve strese adaptasyon süreleri 24., 48., 72. saatte kontrolle ve birbirleri arasında kıyaslanarak tespit edildi.

3.4. Sıvı Kültürde Stres Koşullarında Üretilen Suşların Hücre Morfolojisindeki Değişiklerin Mikroskop Altında Gözlemlenmesi

Kalsiyum, metal iyon ve hiperosmotik stresinin hücre döngüsüne ve hücre morfolojisine etkileri fenotipik olarak incelendi. Normal üreme ortamı olan 10 ml YPD’de logaritmik aşamaya kadar üretilen maya suşları bu aşamada 5’er ml’lik iki kısma bölündü. Bir kısmına son konsantrasyonu 200 mM olacak şekilde steril CaCl₂ eklendi ve standart üreme koşullarında 4 saat inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda maya kültürlerinden direkt olarak 25-50µl kadar numune alınarak ışık mikroskopunda 10x40büyütme ile incelendi. Aynı deneyler son konsantrasyon 0,8M NaCl ve 200µM CuSO₄ olacak şekilde strese maruz bırakılarak mikroskopta inceleme yapıldı.

3.5. Stres Koşullarının Mitotik İndekse Etkilerinin İncelenmesi

CaCl₂, CuSO₄ ve NaCl stres faktörlerinin hücre döngüsü aşamalarına ve mitoz geçiren hücre oranına (mitotik indekse) etkileri de tüm ticari maya hücrelerinde asenkronize şekilde gerçekleştirildi ve fenotipik olarak incelendi. Normal üreme ortamı olan 20 ml YPD'de logaritmik aşamaya kadar üretilen maya suşları bu aşamada 5'er ml'lik dört kısma bölündü. Kontrol grubu ve diğerlerinin son konsantrasyonu 200 mM CaCl₂, 200µM CuSO₄, 0.8M NaCl içerecek şekilde stres faktörleri eklenmiş büyüme ortamı hazırlandı ve standart üreme koşullarında 4 saat inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda maya kültürlerinden direkt olarak 25-50µl kadar numune alınarak ışık mikroskopunda 10x40 büyütme ile incelendi. *S. cerevisiae* hücrelerinin farklı hücre döngüsü aşamalarındaki fenotipik görüntülerinin tayini ve hücre döngüsü aşamalarına karar vermek için Şekil 3.1'de verilen fenotipik referanslar temel alındı. Bu fenotiplerde tomurcuk içermeyen hücreler G1, tomurcuk uzunlukları eşit olan ana ve yavru hücreler mitoz, tomurcuk uzunluğu ana hücre uzunluğunun yaklaşık 2/3 kadarı olan hücreler G2 ve tomurcuk başlangıcı ise hücre döngüsünün S fazı olarak kabul edilmektedir. Mitotik indeks değerleri görüntü alanında sayılan 100 maya hücresinden mitoz aşamasında olanların % oranı olarak verildi.



Şekil 3. 1. Hücre döngüsü analizinde referans olarak kullanılan *S. cerevisiae* fenotiplerinin şematik gösterimi.

3.6. Stres Koşullarında Maya Suşlarının Üreme Hızlarının Tayini

Kalsiyumun *S. cerevisiae* suşlarının üreme hızına etkileri ticari *S. cerevisiae* kültürlerinin 200 mM kalsiyum içeren ve içermeyen sıvı kültürde üreme değerlerinin (OD₆₀₀ değerlerinin) ikilenme sürelerine uygun zaman aralıkları ile spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tayin edildi. Bunun için 10 ml YPD ortamında gecelik ön kültürler hazırlandı. Ertesi sabah 200mM kalsiyum içeren ve içermeyen taze 10ml YPD kültürlerine ikişerli olarak başlangıç OD₆₀₀ değerleri ortalama 0.25 olacak şekilde ön kültürlerden ekim yapıldı, başlangıç OD₆₀₀ değerleri 0 zaman olarak kayıt edildi. Bu maya kültürleri standart koşullarda (30 C, 140 rpm dönüş hızı/dakika) çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakıldı ve maya hücrelerinin ikilenme süresi olan her 90 dakikada bir 100µl örnek alınarak maya kültürlerinin OD₆₀₀ değerleri tayin edildi. Aynı deneyler 200 µM CuSO₄ ve 0.8 M NaCl için de tekrarlandı. Elde edilen OD₆₀₀ değerlerinin ortalamaları ve standart sapma değerleri de hesap edilerek örnek alınan zaman aralıklarına göre grafiğe aktarıldı ve üreme eğrileri elde edildi. Elde edilen üreme eğrileri sonuçlar bölümünde verildi.

3.7. Sıcaklık Stresinin Maya Hücrelerinin Canlı Kalma Sürelerine Etkisinin İncelenmesi

Bir maya hücresinin yaşadığı en temel stres ortam sıcaklığıdır. *S. cerevisiae* ve diğer mezofilik mayalar, ~42° (107°F)'ye kadar olan sıcaklıklarda büyümeyi sürdürürler, ancak daha yüksek sıcaklıklara kronik maruziyetle baş edemezler (Morano ve diğerleri, 2012). Ticari maya suşları belirli sürelerde 55° sıcaklığa maruz bırakıldı. Başlangıç 0.saat olmak üzere maya kültürlerinden her 90 dakikada bir 5 µl örnek alınarak YPD katı besiyerine ekim yapıldı. Suşların büyümesi için etüvde 30° 'de büyümeye bırakıldı. Ertesi gün sıcaklık stresinde hayatta kalabilen ve sıcaklık stresine farklı sürelerde direnç gösterebilen suşlar petride analiz edildi.

3.8. Ticari Mayaların Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.8.1. Hücre dışı α -Amilaz aktivitesinin kalitatif tayini

α -Amilazlar, glikoz, maltoz ve maltotrioz birimleri gibi düşük moleküler ağırlıklı ürünlerde nişastadaki α -1,4-glikosidik bağların hidrolizini katalize eden enzimlerdir (Monteiro De Souza, 2010).

Amilaz deneyleri için %1 nişasta içeren YPD petrileri hazırlandı ve tüm suşlar ekim yapılarak gece boyu etüvde 30°C de bırakıldı. Ertesi gün lugol boyama ile suşların amilaz aktivitesi tayin edildi.

3.8.2. Hücre dışı proteaz aktivitesinin kalitatif tayini

Proteaz deneyleri için %2 kazein içeren YPD katı besiyerlerinde tüm suşların ekimi yapıldı ve gece boyu etüvde 30°C de bırakıldı. Ertesi gün tüm suşlarda proteaz aktivitesi gözlemlendi.

3.8.3. İnvertz aktivitesinin kantitatif tayini

Ticari maya suşlarının hücre dışı invertaz aktiviteleri de yine daha önce tanımlandığı şekilde belirlendi (Goldstein ve Oliver Lampen, 1975; Rothe ve Lehle, 1998). Bunun için *S. cerevisiae* suşları YPD (%1 yeast extract, %2 peptone, %2 glukoz) üreme ortamında repres ve derepres koşullarda üretildi. Repres koşulları için %2 glukoz kullanılırken, derepres koşulları sağlamak için %0.1 glukoz kullanıldı. *S. cerevisiae* suşları 5 ml %2 glukoz bulunan besiyerinde üretilen her ticari suş için gecelik ön kültürler hazırlandı. Ertesi gün sıvı kültürdeki *S. cerevisiae* suşlarının 300 μ l'si taze 10 ml %2 glukoz (repres) ortamına eklendi ve aynı şartlarda logaritmik aşamaya ($OD_{600}=0.8-1.0$) kadar üretildi. Bu aşamada tüm suşlara ait kültürler repres ve derepres şartları oluşturmak için ikiye bölündü. Logaritmik fazdaki *S. cerevisiae* hücreleri santrifüjde 1600 rpm'de 4 dakika çöktürüldü. Çöken *S. cerevisiae* hücreleri süpernatant atıldıktan sonra pellet 5 ml steril suda yıkandı ve tekrar çöktürüldü. Repres koşullarda büyüyen ticari suşlar için yeniden süpernatant atıldıktan sonra pellet 5 ml sodyum asetat (pH:5.2) eklenip vortekslenildikten sonra tekrar santrifüj ile 1600 rpm'de 5 dakika çöktürüldü. Süpernatant atılıp çöken *S. cerevisiae* hücrelerine 250 μ l sodyum asetat eklenerek stok hazırlandı ve OD_{600} değerleri ölçüldü. Diğer 5 ml kültür, derepres

koşulları oluşturmak için çöken *S. cerevisiae* hücreleri süpernatant atıldıktan sonra 5 ml YP' de çözülerek %0,1 glukoz eklenerek logaritmik faza gelinceye kadar büyümeye bırakıldı. Ardından repres koşullar için yapılan tüm işlemler tekrarlanarak stok hazırlandı. Ardından OD₆₀₀ değerleri ölçülerek invertaz deneylerine geçildi. Abiyotik stresin ticari maya suşlarının invertaz aktivitesine etkisini ölçmek için repres ve derepres koşullar daha önce açıklandığı gibi hazırlandı. Logaritmik faza gelen kültürler son konsantrasyonu 0,8 M NaCl, 200 mM CaCl₂, ve 200 µM CuSO₄ içerecek şekilde 2 saat strese maruz bırakıldı. Ardından daha önce anlatıldığı gibi stok hazırlanarak *S. cerevisiae* hücrelerinin OD₆₀₀'de hücre yoğunluğu ölçüldü.

0,684 gr sakkaroz 10 ml steril saf suda çözülerek sukroz çözeltisi hazırlandı. Mikrosantrifüj tüplerine 200 µl sukroz konarak üzerine 50 µl stok hücre eklendi. 37°C'de reaksiyon için 15 dakika beklendi. Bekleme süresi sonunda 50 µl pH:8,8 1M TRİS eklenerek reaksiyon durduruldu. İvertaz aktivitesini belirlemek için reaksiyon sonucunda oluşan glukoz miktarları tayin edildi. Glukoz tayini için spektrofotometrik yöntem olan Glukoz oksidaz-Peroksidaz (GOD-POD) yöntemi kullanıldı. Yöntemin uygulanmasında GOD-POD glukoz tayin kiti üreticisi firmanın (Spinreact-İspanya) verdiği deneysel koşullar kullanıldı (Goldstein ve Oliver Lampen, 1975). Deneyler her bir suş için iki tekrarlı yapılarak ortalama değerler ve standart sapma değerleri hesaplandı.

Melas, ekmek mayası üretimi için ucuz ve yaygın olarak kullanılan bir şeker kaynağıdır (Ferrari, Bianco, Froche ve Loperena, 2001). Ticari üretim sırasında maya, tipik olarak şeker pancarı veya şeker kamışından elde edilen melas ortamında dikkatlice kontrol edilen koşullar altında üretilir. Melas, sakaroz, glikoz ve fruktoz formlarında ağırlıkça yüzde 45 ila 55 oranında fermente edilebilir şeker içeren şeker endüstrisinin bir yan ürünüdür (Nasr ve Zaky, 2011). Optimum maya biyokütle üretimi için fermantasyon karışımı genellikle pH=4.5-5.0'a sabitlenir ve melasın ilk bileşimine bağlı olarak ekstra besinlerin eklenmesiyle zenginleştirilir (Bekatorou, Psarianos ve Koutinas, 2006).

Bu tez çalışması içinde tüm ticari mayalar melas ortamında büyütüldü. Melas büyüme ortamı 250 ml için %5 melas, %0,2 yeast extract, %0,4 amonyum sülfat içerecek şekilde saf suyla tamamlanarak hazırlandı ve pH: 5'e ayarlandı. Ardından melas büyüme ortamı otoklavda steril edildi. Tüm ticari suşlardan 5 ml melas içerisinde gecelik ön kültürler

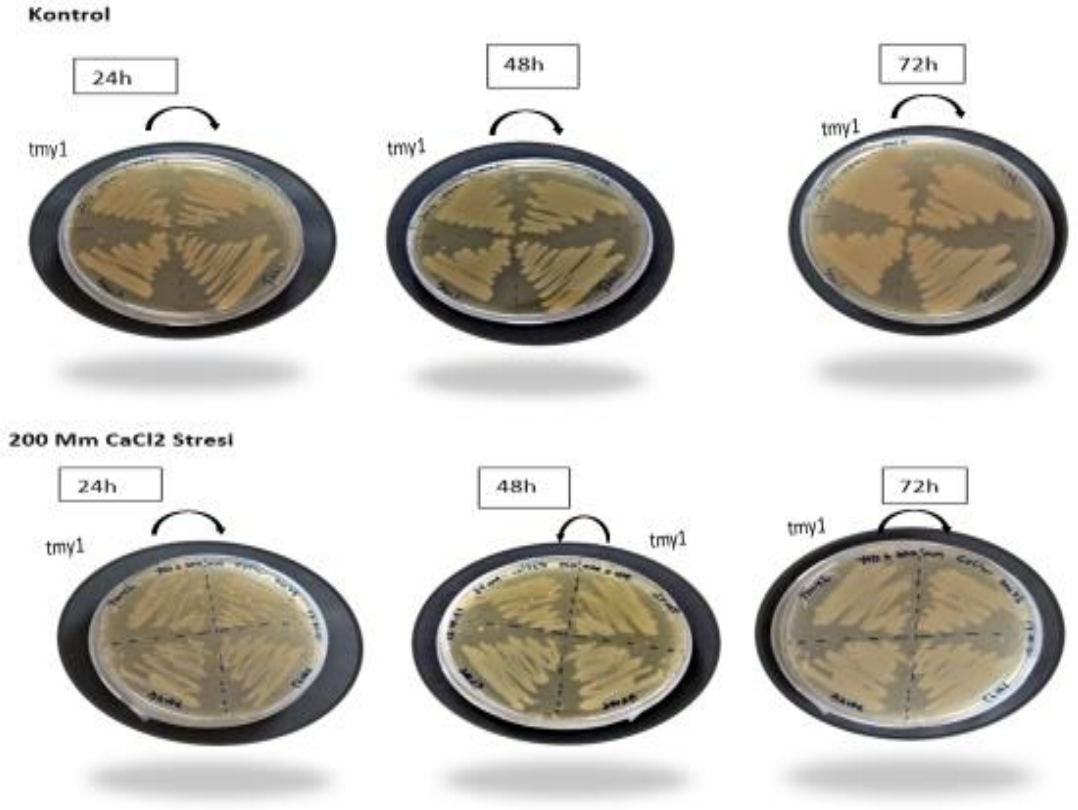
hazırlandı. Ertesi gün logaritmik faza gelen tüm ticari mayalardan daha önce anlatıldığı gibi stok hücre hazırlanıp invertaz aktivitesi GOD-POD glukoz tayin kitiyle belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Abiyotik Stres Koşullarının Ticari Maya Suşlarının Büyüme Morfolojileri Üzerine Etkileri

YPD (kontrol) ve 0,8M NaCl, 200 mM CaCl₂, 200 µM CuSO₄ eklenen YPD katı besiyerinde üretilen ticari suşların üreme durumları zaman aralıklı olarak izlendi. Normal ortamda üretilen kontrol maya suşupetrileri ile ve birbiri arasında kıyaslandığında petrilere üreme durumları arasında inkübasyon süresi sonunda (72. saatte) çok önemli bir fark gözlenmedi. Ancak, inkübasyon süresi başlarında (24. saatte) bazı suşlarda stres koşullarında petrilere üreme durumlarının kontrol deneyine göre daha az seviye olduğu da belirlendi. Ayrıca, bu araştırmada incelenen dört farklı ticari maya suşlarının kendi aralarında da stres koşullarında üreme durumlarında az da olsa farklılıklar olduğu görüldü.

Kalsiyum stresinin 24.saatinde en iyi TMY2 suşunun büyüdüğü gözlemlendi.48. saatte tüm suşlarda üremenin devam ettiği, TMY4 suşunun diğerlerine oranla daha fazla ürettiği gözlemlendi. 72.saatte ise tüm suşların uygulanan stres koşullarına petrilere adaptasyon sağlandığı ve bütün suşların durağan faza ulaştığı görüldü (Şekil 4.1.).



Şekil 4. 1. Kalsiyum stresinde ticari mayaların strese tepkisi (TMY1'den başlamak üzere ok yönünde suşlar sırasıyla TMY2, TMY3, TMY4 şeklindedir).

Bakır stresinin 24.saatinde tüm suşlar diğer stres koşullarına göre daha iyi büyüme gösterdi. 48. saatte tüm suşlar kontrol gruplarından daha iyi büyüme gösterirken TMY2 ve TMY3 diğer suşlardan daha fazla gelişim gösterdiği görüldü.72.saatte tüm suşlar için diğer streslere göre en fazla büyüme bakır stres koşullarında görüldü (Şekil 4.2).

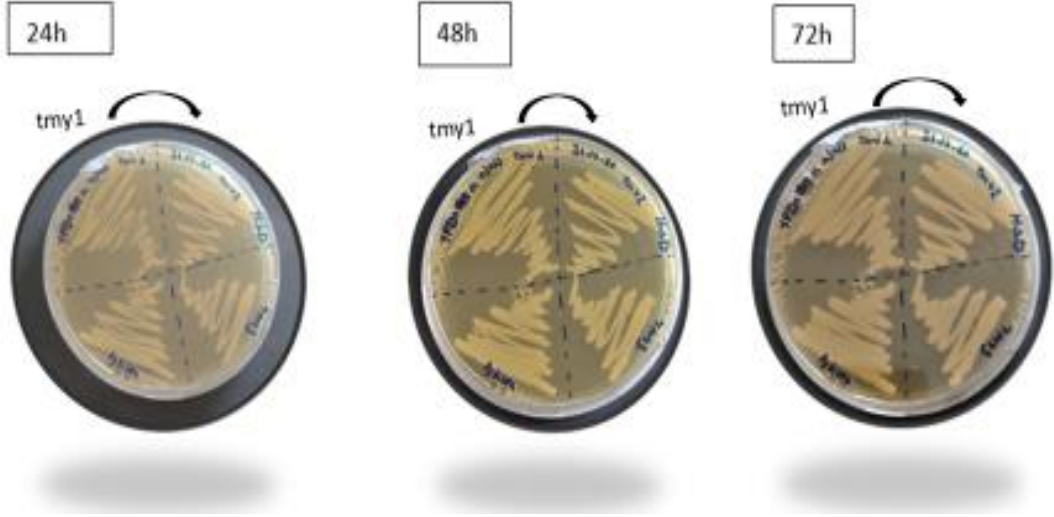
200 μ M CuSO₄



Şekil 4. 2. Bakır stresinde ticari mayaların strese tepkisi(TMY1’den başlamak üzere ok yönünde suşlar sırasıyla TMY2, TMY3, TMY4 şeklindedir).

NaCl stresinde genel anlamda tüm suşlar, kontrol gruplarına ve diğer stres koşullarına göre daha az büyüme gösterdiği tespit edildi. NaCl stresinin 24. ve 48. saatinde TMY1 ve TMY4 diğer suşlara göre daha iyi büyüdüğü görüldü. 72.saatte tüm suşlarda 48.saate göre büyüme görüldü fakat diğer stres koşullarına göre en az adaptasyon NaCl stresinde görüldü (Şekil 4.3).

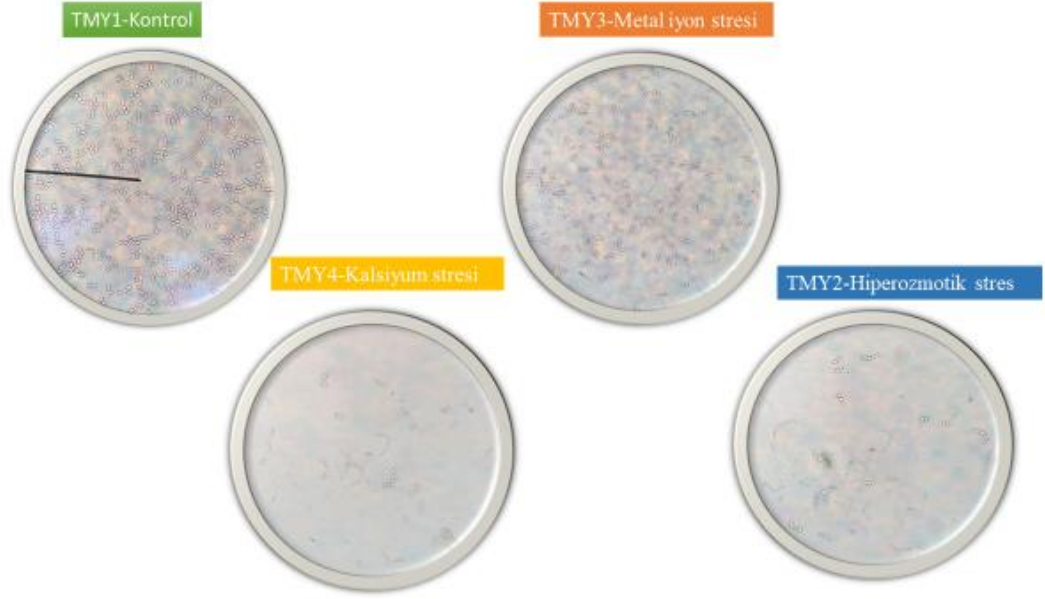
0.8 M NaCl



Şekil 4. 3. NaCl stresinde ticari mayaların stres tepkisi(TMY1’den başlamak üzere ok yönünde suşlar sırasıyla TMY2, TMY3, TMY4 şeklindedir).

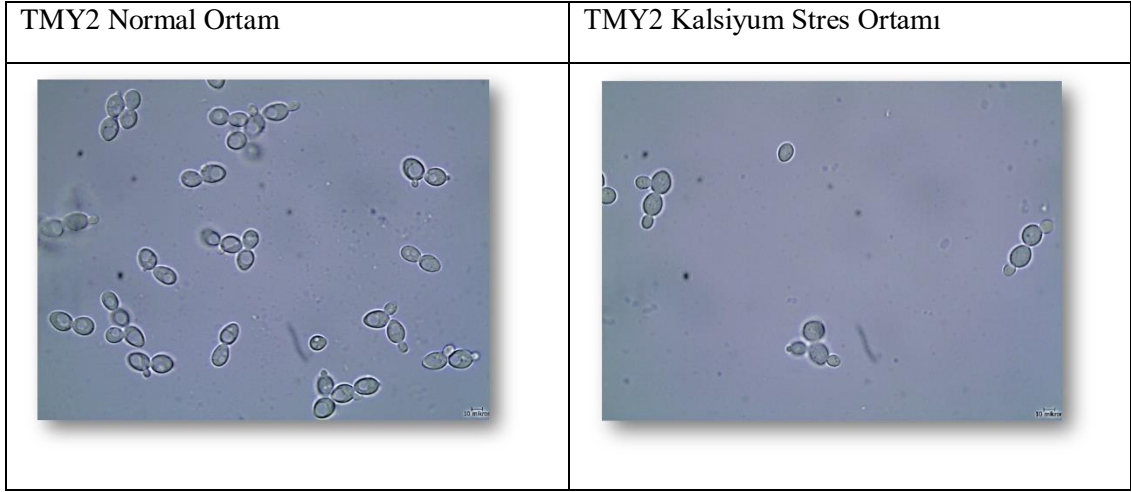
4.2. Stres Koşullarının Maya Hücre Morfolojine Etkileri

Abiyotik stres koşullarının *S. cerevisiae* hücre morfolojisine olan etkileri de mikroskopik olarak analiz edildi. Tüm suşlarda abiyotik stres koşullarında hücre sayısının kontrole göre daha az olduğu görüldü (Şekil 4.4). Strese maruz bırakılan ticari maya suşlarında en çok hücre sayısı bakır stresi ortamında görüldü. Hiperozmotik stresin oluşturulduğu 0,8M NaCl ortamında üretilen ticari mayaların mikroskop incelemesinde hücrelerde kümeleşmeler görüldü.



Şekil 4. 4.Stres koşullarının ticari maya suşlarının çoğalmasına etkileri. Görüntü 10x40 ışık mikroskobu ile alınmıştır.

Stres faktörlerinin hücre morfolojilerine etkileri incelendikten sonra, kalsiyum sinyal yolağının hücre morfolojisinde (hücrede büyüme, anormal veya çoklu tomurcuklanma, uzamış sitokinez/telofaz bağlantısı vd gibi) herhangi bir anomaliye yol açıp açmadığı da mikroskobik olarak incelendi. Normal ortamda ve kalsiyum stresi uygulanmış üreme ortamlarında üretilen ticari maya suşlarının mikroskobik görüntüleri incelendi. Yapılan incelemelerde kalsiyum stresinin ticari maya hücrelerinin morfolojisinde önemli derecede bir anomaliye neden olmadığı görüldü (Şekil 4.5). Sadece kalsiyum stresi uygulanmış maya hücrelerinin vakuollerinin kaybolduğu görüldü. Fakat kesin sonuç için daha detaylı mikroskobik analizlerle (örneğin elektron mikroskobu ile) hücre boyutlarının hem G1 hem de diğer bölünme aşamalarında ölçülmesi gerektiği sonucuna varıldı.



Şekil 4. 5. Kalsiyum stresinin *S. cerevisiae*'da hücre morfolojisine etkileri. Görüntü 10x40 ışık mikroskobu ile alınmıştır. (Örnek olarak sadece TMY2 suşu ile yapılan deney sonuçları verildi.)

4.3.Stres KoşullarınınTicari Maya Suşlarının Hücre Döngüsüne Etkileri

Şekil 3.1'de verilen hücre döngüsü aşamalarına ait fenotipik referanslar kullanılarak yapılan incelemelerde tüm suşların, kontrollerine kıyasla stres ortamında mitoza geçen hücre sayısında azalmalar görüldü. Tüm suşlarda kalsiyum stresinde S fazında hücrelerin biriktiği tespit edildi. ÖzellikleTMY1 suşunda kalsiyum stresine yanıt olarak mitotik indeksin normal ortamda %36'den %4'e gerilediği hücrelerin ağırlıklı olarak S fazında hücre döngüsünde durduğu görüldü. TMY1 suşunda NaCl stresinde mitoza giren hücre sayısının kontrole kıyasla yaklaşık 3 kat azaldığı görüldü (Çizelge 4.1). Tüm suşların kontrolden sonra en çok bakır stres ortamında mitoza geçebildiği gözlemlendi. Bakır stresinde en az etkilenen suşun TMY2 olduğu görüldü (Çizelge 4.2).

Çizelge 4. 1. Stres koşullarının TMY1 suşunun mitotik indeksine etkisi.

TMY1	Kontrol	Ca ²⁺	Cu ²⁺	NaCl
G1	%5	%3	%7	%12
S	%25	%63	%32	%35
G2	%34	%30	%35	%40
M	%36	%4	%26	%13

Çizelge 4. 2. Stres Koşullarının TMY2 suşunun mitotik indeksine etkisi.

TMY2	Kontrol	Ca ²⁺	Cu ²⁺	NaCl
G1	%5	%10	%1	%5
S	%31	%50	%19	%28
G2	%35	%33	%48	%50
M	%29	%7	%32	%17

Yapılan çalışmada senkronize maya kültürü kullanılmamasına rağmen hiperozmotik stresin hücre döngüsü ve mitotik indekse etkisi olduğu görülmektedir. Analizler sonucunda suşlar arasında ozmotoleransı en yüksek suşun TMY2 olduğu tespit edildi. Normal ortamda çoğaltılan TMY2 suşunun mitoza giren hücre sayısı, tuz stresine maruz bırakılan hücrelerle karşılaştırıldığında yaklaşık 1.7 kat azalma ile tuz stresine en dirençli suş olduğu analiz edildi. Tuz stresinde ticari mayaların hepsinde de hücrelerin en fazla G2 fazında kaldığı görüldü. Kendi kontrolleriyle kıyaslandığında NaCl stres ortamında mitoza giren hücre sayısı en çok azalan suşun TMY3 olduğu görüldü (Çizelge 4.3) Tuz stresinde G2 fazında kalan hücre sayısı ve kalsiyum stresinde mitoza giren hücre sayısının diğer suşlara göre en fazla olan suşun TMY4 olduğu görüldü (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 3 Stres Koşullarının TMY3 suşunun mitotik indeksine etkisi.

TMY3	Kontrol	Ca ²⁺	Cu ²⁺	NaCl
G1	%2	%5	%13	%13
S	%37	%50	%34	%39
G2	%27	%42	%19	%37
M	%34	%3	%34	%11

Çizelge 4. 4 Stres Koşullarının TMY4 suşunun mitotik indeksine etkisi.

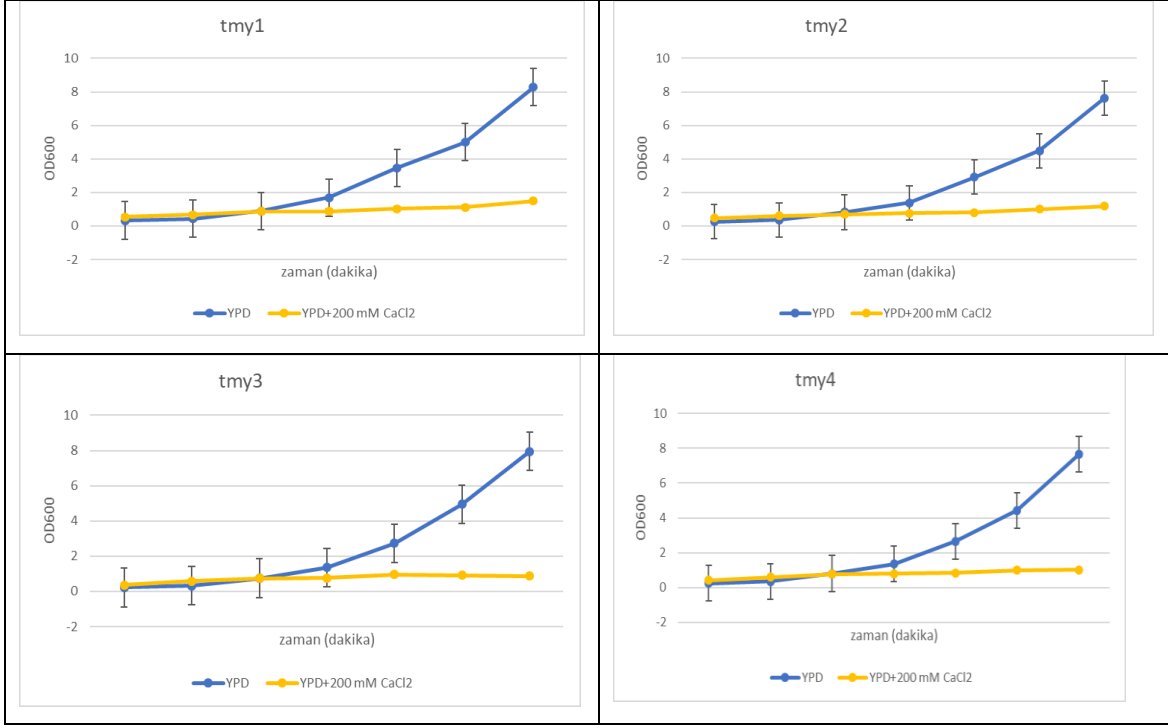
TMY4	Kontrol	Ca ²⁺	Cu ²⁺	NaCl
G1	%9	%7	%13	%8
S	%28	%46	%29	%24
G2	%31	%35	%28	%53
M	%32	%12	%30	%15

4.4. Stres Koşullarının Ticari Maya Suşlarının Üremesine Etkileri

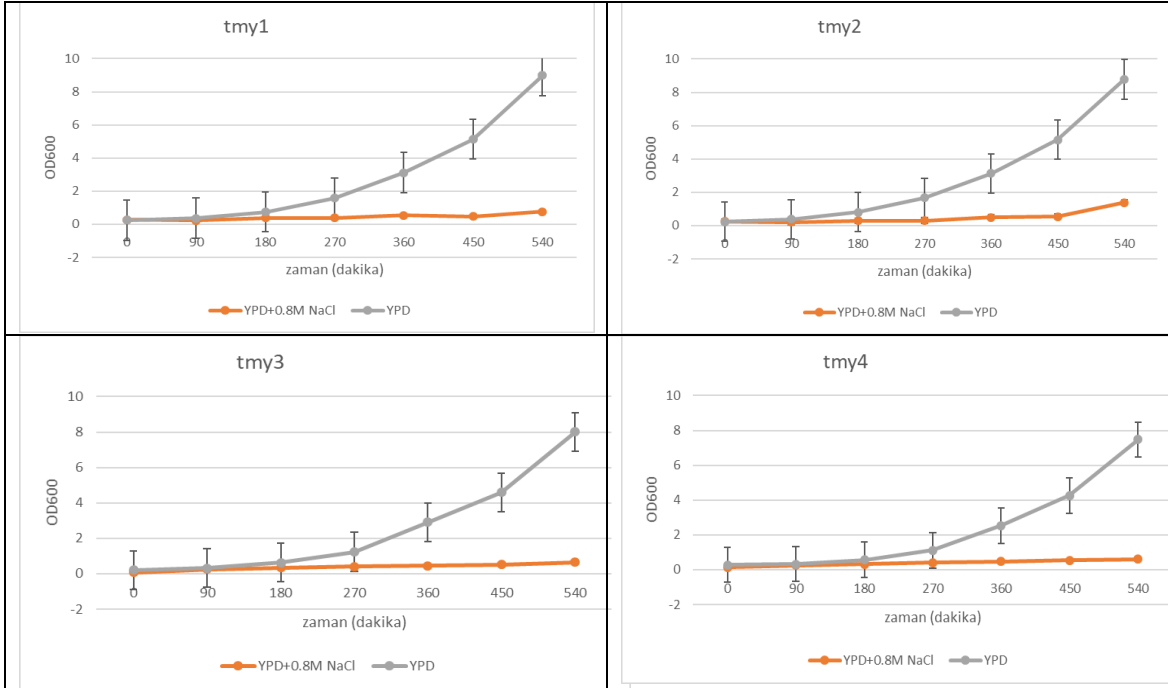
Kalsiyum, metal iyon ve hiperosmotik stresin ticari maya suşlarının üreme hızına etkileri standart koşullarda ve ayrıca stres koşulları altında sıvı kültürlerde üretilmesi ile tayin edildi. Kalsiyumun ve hiperosmotik stresin hücre üremesini logaritmik aşamada önemli derecede yavaşlattığı görüldü. Normal ortamda üreyen mayaların bölünme sürelerinin ortalama 90 dk olduğu bulundu. Bu sonuç kalsiyum stresinin sıvı kültürdeki hücrelerde üreme hızını oldukça yavaşlattığını ve bölünme süresini oldukça uzattığını göstermektedir (Şekil 4.6). Tuz stresinde ticari mayalar üzerinde benzer etkiler gösterdi (Şekil 4.7). Fakat beklenilenin aksine metal iyon stresinde ticari mayalar kendi standart koşullarına yakın bir üreme hızı gösterdi (Şekil 4.8).

Stres koşullarının içerisinde üreme hızını en az etkileyen stres faktörünün tüm ticari suşlarda da uygulanan konsantrasyona göre bakır stresi olduğu tespit edildi. Ticari

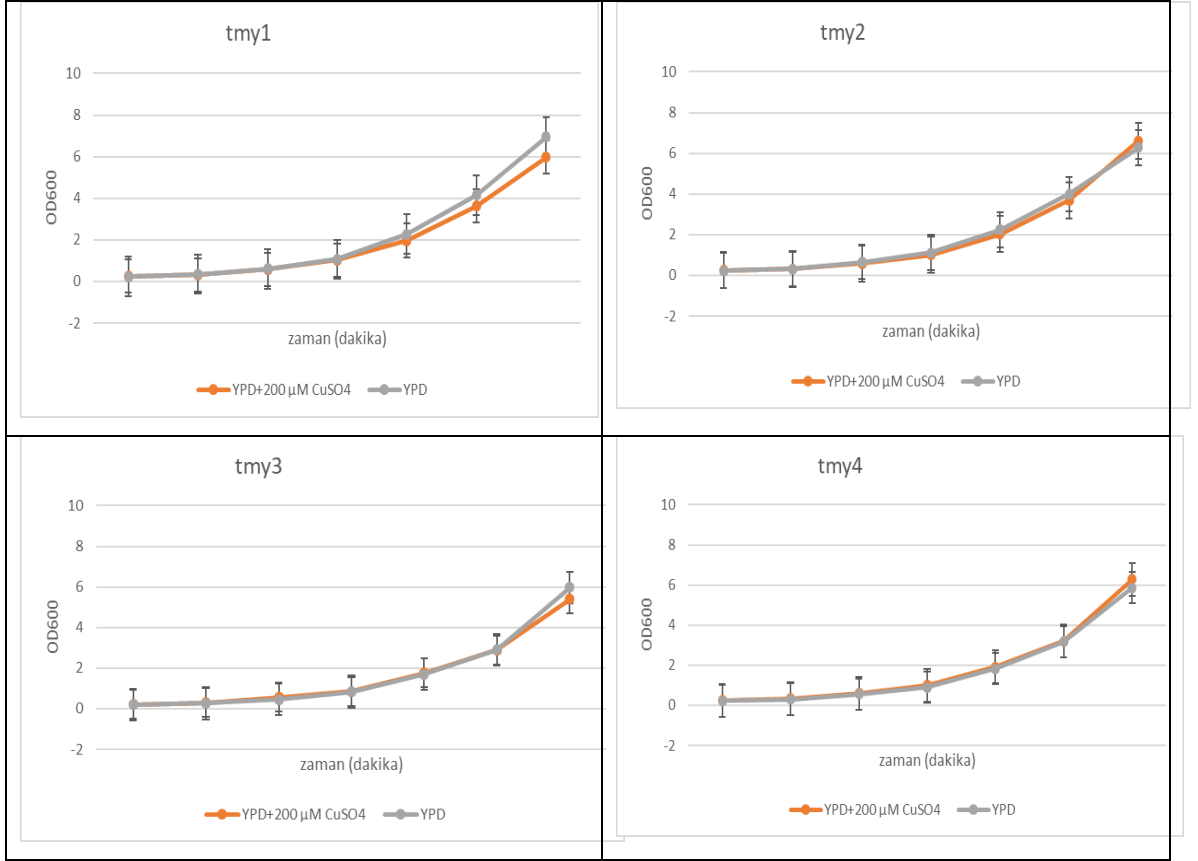
suşlar stres koşullarında üreme hızlarının birbirlerine oldukça benzer şekilde etkilendiği görüldü.



Şekil 4. 6. Kalsiyum stresinin ticari mayaların üremesine etkileri



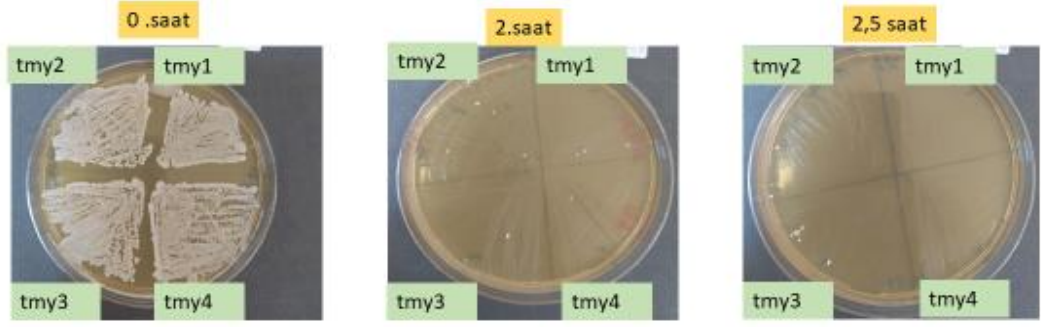
Şekil 4. 7. Hiperozmotik stresin ticari mayaların üremesine etkisi



Şekil 4. 8. Bakır iyon stresinin ticari mayaların üremesine etkileri

4.5. Sıcaklık Stresinin Maya Suşlarında Hayatta Kalma Sürelerine Etkileri

Bütün ticari suşların sıcaklık stresinden ciddi oranda etkilendiği tespit edildi. 55° C sıcaklığa belli sürelerde maruz kalan ticari suşların kısa sürede ve büyük oranda canlılığını kaybettiği YPD katı besiyerinde gözlemlendi. 0. Saat (kontrol) sıcaklığa maruz kalmayan deney grubunda tüm suşlar petride üremeye devam ederken 2. Saatten itibaren suşların canlılıklarında farklılıklar tespit edildi. 2.5 saatin sonunda en dirençli suşun TMY3 olduğu görüldü (Şekil 4.7). 2.5 saatten daha fazla sıcaklığa maruz bırakılan ticari mayaların hiçbirinin yaşamsal faaliyetlerini devam ettiremediği gözlemlendi.



Şekil 4. 9. Sıcaklık stresinin ticari mayaların üremesine etkisi.

4.6 Abiyotik Stres Koşullarında Ticari Mayaların Enzim Aktivitesi

Tüm ticari mayaların hücre dışı amilaz ve proteaz aktivitesi göstermediği petri testleri ile yapılan kalitatif analizler ile tespit edildi.

4.6.1 İnvvertaz aktivitesi

Tüm suşlarda da derepres koşullarda *SUC2* genindeki baskılanmanın kalkmasıyla invertaz aktivitesinin repres koşullara kıyasla beklenildiği gibi önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. Normal üreme ortamında TMY3 suşunun hem repres hem de derepres koşullarda invertaz aktivitesinin diğer suşlara göre yaklaşık 2 kat daha az olduğu görüldü. Derepres koşullarda en fazla invertaz aktivitesinin TMY1 suşunun gösterdiği tespit edildi (Çizelge 4.5).

Çizelge 4. 5.Ticari mayaların repres-derepres koşullarda invertaz aktivitesi.

<i>Ticari maya suşu</i>	<i>Üreme Ortamı</i>	<i>İnvertaz Aktivitesi</i> ± SS*
<i>TMY1</i>	<i>YPD (repres)</i>	1710,81 ± 130
<i>TMY2</i>	<i>YPD (repres)</i>	1244,08 ± 161
<i>TMY3</i>	<i>YPD (repres)</i>	717,23 ± 62
<i>TMY4</i>	<i>YPD (repres)</i>	1477,38 ± 155
<i>TMY1</i>	<i>YPD Derepres</i>	3161,47 ± 46
<i>TMY2</i>	<i>YPD Derepres</i>	2434,08 ± 4
<i>TMY3</i>	<i>YPD Derepres</i>	1742,76 ± 90
<i>TMY4</i>	<i>YPD Derepres</i>	2280,41 ± 552

± SS*: Standart Sapma değerleri

Hiperozmotik stresin (0,8M NaCl) her iki durumda da (repres-derepres) tüm suşlarda da invertaz aktivitesini olumsuz etkilediği görüldü. Derepres koşullarda olmak üzere hiperosmotik stres ve normal üreme ortamında çoğaltılan hücrelerdeki invertaz aktivitesi karşılaştırıldığında 5 kat azalma ile tuz stresinden en çok etkilenen ticari suşun TMY1 olduğu analiz edildi (Çizelge 4.6).

Çizelge 4. 6. Hiperozmotik streste ticari mayaların invertaz aktivitesi.

<i>Ticari maya suşu</i>	<i>Üreme Ortamı</i>	<i>İnvertaz Aktivitesi</i> ± SS
<i>TMY1</i>	<i>YPD (repres+ 0.8 M NaCl)</i>	503,94 ± 176
<i>TMY2</i>	<i>YPD (repres+ 0.8 M NaCl)</i>	403,62 ± 60
<i>TMY3</i>	<i>YPD (repres+ 0.8 M NaCl)</i>	180,93 ± 37
<i>TMY4</i>	<i>YPD (repres+ 0.8 M NaCl)</i>	583,45 ± 113
<i>Ticari maya suşu</i>	<i>Üreme Ortamı</i>	<i>İnvertaz Aktivitesi</i> ± SS
<i>TMY1</i>	<i>YPD Derepres+ 0,8 M NaCl</i>	630,85 ± 126
<i>TMY2</i>	<i>YPD Derepres+ 0,8 M NaCl</i>	812,92 ± 296
<i>TMY3</i>	<i>YPD Derepres+ 0,8 M NaCl</i>	659,12 ± 289
<i>TMY4</i>	<i>YPD Derepres+ 0,8 M NaCl</i>	752,56 ± 295

Melas ortamında üretilen ticari mayaların invertaz aktivitesinin zengin besiyerinde (YPD) üretilen ticari mayaların invertaz aktivitesinden çok daha farklı sonuçlandığı bulundu (Çizelge 4.7). Melas ortamında üretilen ticari mayalarının hepsinde de invertaz enzim aktivitesinin düşük olduğu tespit edildi. Melas ortamında en fazla enzim aktivitesini TMY1 suşu gösterirken, en düşük ativite TMY3 suşunda görüldü.

Çizelge 4. 7. Melas ortamında üretilen ticari mayaların invertaz aktivitesi.

<i>Ticari maya suşu</i>	<i>İnvertaz Aktivitesi</i> ± SS
<i>TMY1</i>	450,31 ± 23
<i>TMY2</i>	282,01 ± 34
<i>TMY3</i>	169,82 ± 28
<i>TMY4</i>	403,19 ± 92

CaCl₂ stresi derepres koşullarda tüm suşlar için diğer stres faktörlerine göre en yüksek invertaz aktivitesi ile sonuçlandı. Kendi kontrolüyle kıyaslandığında derepres koşullarda

kalsiyum stresinde enzim aktivitesinin yaklaşık 2 kat azalması ile en çok etkilenen suşun TMY1, kalsiyum stresinden en az etkilenen suşun ise TMY3 olduğu görüldü (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4. 8. Kalsiyum stresinde ticari mayaların invertaz aktivitesi.

<i>Ticari maya suşu</i>	<i>Üreme Ortamı (Derepres)</i>	<i>İnvertaz Aktivitesi± SS</i>
<i>TMY1</i>	<i>YPD+ 200 mM CaCl₂</i>	1415,41 ± 150
<i>TMY2</i>	<i>YPD+ 200 mM CaCl₂</i>	1507,25 ± 9
<i>TMY3</i>	<i>YPD+ 200 mM CaCl₂</i>	1458,62 ± 124
<i>TMY4</i>	<i>YPD+ 200 mM CaCl₂</i>	1401,53 ± 46

Kalsiyum stresinden sonra suşların kontrole göre en az etkilendiği stres ortamının ise bakır stresi olduğu tespit edildi. Derepres koşullarda yapılan deneylerde suşlar içerisinde kontrole kıyasla bakır stresinde en çok etkilenen suşun TMY1 olduğu görüldü. Bakır stresinde kontrolüne kıyasla en az etkilenen ve diğer suşlara göre bakır stresinde en çok invertaz aktivitesi gösteren suşun TMY3 olduğu tespit edildi (Çizelge 4.9).

Çizelge 4. 9. Bakır stresinde ticari mayaların invertaz aktivitesi.

<i>Ticari maya suşu</i>	<i>Üreme Ortamı (Derepres)</i>	<i>İnvertaz Aktivitesi± SS</i>
<i>TMY1</i>	<i>YPD+ 200 µM CuSO₄</i>	1230,43 ± 50
<i>TMY2</i>	<i>YPD+ 200 µM CuSO₄</i>	1299,04 ± 93
<i>TMY3</i>	<i>YPD+ 200 µM CuSO₄</i>	1431,58 ± 81
<i>TMY4</i>	<i>YPD+ 200 µM CuSO₄</i>	1214,70 ± 59

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ekmek mayası, unlu mamuller endüstrisinde kullanılan *S.cerevisiae* suşlarını ifade eder (Hirasawa ve Yokoigawa, 2001). Bu suşlar, DNA içerikleri ve kromozomal polimorfizmleri bakımından laboratuvar suşlarından farklıdır; endüstriyel suşların çoğu anöploidlerdir (Codón, Benítez ve Korhola, 1998). Anöploidi, bir genom içindeki kromozomların kaybı veya kazanımıdır. Genellikle zararlıdır ve hücre ölümü ve genetik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (Gilchrist ve Stelkens, 2019). Ekmek mayası, yüksek mayalanma kabiliyeti, ozmotolerans, sıcaklık toleransı, kimyasal tolerans, iyi depolama kabiliyeti ve topaklaşmama gibi çeşitli özelliklere sahip olmalıdır. Bazı ekmek yapım yöntemlerinde bu özelliklerden bazıları zorunlu olmasa da, kaliteli ekmek üretmek ve ekmek yapımında zamandan tasarruf etmek için en önemli özellik yüksek mayalanma yeteneğidir (G. M. Walker, 1998). Endüstriyel uygulamalarda kullanılan ekmek mayası işlemler sırasında birçok stres etmenine maruz kalır. Bunun sonucunda da ürün verimi düşer ve unlu mamullerin kalitesi olumsuz yönde etkilenir. Ekmek mayası *S.cerevisiae*'nin farklı stres koşullarıyla başa çıkma yeteneği, birçok ticari uygulamada önemli bir faktördür (Hernandez-Lopez, Prieto ve Randez-Gií'department, 2003). Yapılan bu çalışmada; Türkiye'de en çok tercih edilen ticari mayalar kültüre alınarak fermentasyon sürecinde karşılaşılan stres faktörlerinin (hiperozmotik, kalsiyum, metal iyon stresi, sıcaklık) seçilen maya suşları üzerine etkileri incelendi. Ticari mayalar arasında enzim aktiviteleri, hücre döngüsüne etkileri, sıcaklık stresinde hayatta kalma sürelerinde önemli farklılıklar tespit edildi. Hiperozmotik stres, endüstriyel süreçte ticari mayanın karşılaştığı önemli zorluklardan biridir. Mayanın hiperozmotik strese maruz kalması, büyümeyi ve gaz üretim kapasitesini sınırlayan hızlı hücre dehidrasyonu ile sonuçlanır (Hernandez-Lopez ve diğerleri, 2003). Bu çalışmada da tuz stresine maruz bırakılan ticari mayaların büyümesinin, mitozaya girebilen hücre sayısının, üreme hızlarının, beklenildiği olumsuz yönde etkilendiği tespit edildi.

S.cerevisiae'nin sükröz olan ortamda üreyebilmesi için hücre dışı invertaz enzim aktivitesinin oldukça fazla olması gerekir. Ancak, invertaz enzim aktivitesi endüstriyel üretim ve sonrasındaki işlemler sırasında *S. cerevisiae*'nin ürediği ortamdaki stres koşullarından etkilenmektedir. Literatürde endüstriyel suşların hiperozmotik streste

invertaz aktivitesinin derepresyonunu durdurduğu bilgisi mevcuttur (Türkel ve Genç Turgut, 2002). Çalışmamızda kullanılan tüm ticari suşlarda da tuz stresinde invertaz aktivitesinin derepresyonunu durdurduğu görüldü. Melas üreme ortamında yapılan deneylerde invertaz aktivitesinin tüm suşlarda düşük olduğu görüldü. Yeast extract peptone dextrose (YPD) besiyeri ortamı zenginleştirilmiş besiyeri olup *S.cerevisiae* için melastan daha iyi bir üreme ortamı sağlar. Bu sebeple ticari suşların invertaz aktiviteleri YPD ile kıyaslandığında daha düşük sonuçlanmış olabilir.

Kalsiyum ökaryotik hücreler için gerekli olan temel bir bileşendir. Düşük konsantrasyonda bulunmasına rağmen, hücre içi Ca^{2+} birçok hücre yolakta yapısal, enzimatik ve sinyalleşme rolleri için önemlidir. Organik anyonlarla çökeltme nedeniyle yüksek seviyelerde sitozolik Ca^{2+} zararlı olarak kabul edilir (Ghanegolmohammadi ve diğerleri, 2017). Ca^{2+} stresine maruz bırakılan ticari mayaların tuz stresine oranla hücre büyüme, bölünme gibi hücresel aktiviteleri daha normale yakın gerçekleştirdiği görüldü. Ticari mayaların kalsiyum stresinden etkilenmemeleri onların poliploid yapılı olmalarına bağlı olabilir.

S.cerevisiae için 100 μM üzeri bakır konsantrasyonları ölümcüldür ve organik bileşiklerin hücreden sızıntısına neden olur (Soares, Hebbelinck ve Soares, 2003). Çalışmamızda tüm deneylerde de 200 μM bakır konsantrasyonu uygulanmasına rağmen beklenmeyen şekilde ticari mayalar kontrole yakın büyüme ve üreme hızı gösterdi.

Çoğu ekmek mayası ve diğer endüstriyel mayalar genetik olarak poliploid veya aneuploiddir. Anöploidiler çok yaygın olduğu için endüstriyel mayaların dengesiz kromozom tamamlayıcılarının avantajlı olduğu öne sürülmüştür (Adams, Puskas-Rozsa, Simlar ve Wilke, 1992; Bakalinsky ve Snow, 1990). Endüstriyel suşlar arasında anöploidi ve/veya poliploidi o kadar yaygındır ki, dengesiz bir kromozom setinin korunmasının avantajlı olduğu öne sürülmüştür (Adams ve diğerleri, 1992; Sancho, Hernandez ve Rodriguez-Navarro, 1986). Bu durumda çalışmamızda kullanılan ticari mayaların stres faktörlerine neden farklı yanıt verdiğini de açıklamaktadır.

Türkiye, maya üretiminde dünyada önemli bir konuma sahiptir. Ülkemizdeki önemli ticari firmaların ekmek yapımında kullandığı endüstriyel suşların fermantasyon sırasında faaliyetlerini etkileyebilecek stres faktörlerinin neler olduğunun belirlenmesi ve bu faktörlerin mayalar üzerinde oluşturacakları etkilerin iyi tanımlanması ürünün daha kaliteli ve uygun maliyetle üretilmesini sağlayacaktır. Aynı zamanda herhangi bir

strese karşı ortaya çıkabilecek sorunları doğru tahmin edilebilen bir fermantatif süreç, son ürünün hep beklenen kalitede olmasını sağlayacaktır. Ekmek mayası üretiminde kullanılan ticari maya suşlarının, gerek tüketicinin gerekse üreticinin beklentilerini karşılayabilecek özellikler taşıması için geliştirilmesi ve üzerinde çalışılması oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasının, hem yurt dışında hem de ülkemizde devam eden ekmek mayası geliştirme uygulamalarına ışık tutacak öncü çalışmalardan olacağı ümit edilmektedir.

Araştırmada kullanılan dört farklı ticari *S. cerevisiae* suşu farklı ticari firmaların geliştirdiği muhtemelen patentli suşlardır. Bu suşların genetik ve fizyolojik özellikleri hakkında ilgili firmalar tarafından bilgi sağlanmamaktadır. Bu suşlar ekmek mayası olarak geliştirilmeleri sırasında bazı stres koşullarına toleransı olanlar arasından da seçilmiş olabilir. Bu durumda araştırmamızda uygulanan stres koşullarına da dayanıklı olmaları beklenebilir.

KAYNAKLAR

- Adams, J., Puskas-Rozsa, S., Simlar, J. ve Wilke, C. M. (1992). Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 22(1), 13–19. doi:10.1007/BF00351736
- Alberghina, L., Mavelli, G., Drovandi, G., Palumbo, P., Pessina, S., Tripodi, F., ... Vanoni, M. (2012). Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: Basic regulatory design and protein–protein interaction network. *Biotechnology Advances*, 30(1), 52–72. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.010
- Alhoch, B., Chen, A., Chan, E., Elkabti, A., Fariña, S., Gilbert, C., ... Keck, W. M. (2019). Comparative Genomic Screen in Two Yeasts Reveals Conserved Pathways in the Response Network to Phenol Stress. doi:10.1534/g3.118.201000
- Aran, N. (Ed.). (2019). *Gıda Biyoteknolojisi*. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.
- Attfield, P. V. (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, 1351–1357.
- Bakalinsky, A. T. ve Snow, R. (1990). The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 6(5), 367–382. doi:10.1002/yea.320060503
- Barnett, J. A. (2003). Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology*, 149(3), 557–567. doi:10.1099/mic.0.26089-0
- Bekatorou, A., Psarianos, C. ve Koutinas, A. A. (2006). Production of food grade yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 407–415.
- Berridge, M. J., Lipp, P. ve Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21. doi:10.1038/35036035
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D. ve Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36(6). doi:10.1016/S0963-9969(03)00009-7
- Bonilla, M. ve Cunningham, K. W. (2003). Mitogen-activated Protein Kinase Stimulation of Ca²⁺ Signaling Is Required for Survival of Endoplasmic Reticulum Stress in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 4296–4305. doi:10.1091/mbc.E03-02-0113
- Brewster, J., de Valoir, T., Dwyer, N., Winter, E. ve Gustin, M. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259(5102), 1760–1763. doi:10.1126/science.7681220
- Buehler, E. (2012). Enzymes: The Little Molecules That Bake Bread. *Scientific American*. <https://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/enzymes-the-little-molecules-that-bake-bread/> adresinden erişildi.
- Cadiou, J.-L., Pichat, S., Bondanese, V. P., Soulard, A., Fujii, T., Albarède, F. ve Oger, P. (2017). Copper transporters are responsible for copper isotopic fractionation in eukaryotic cells. *Scientific Reports*, 7(1), 44533. doi:10.1038/srep44533
- Câmara, A. de A., Maréchal, P.-A., Tourdot-Maréchal, R. ve Husson, F. (2019). Dehydration stress responses of yeasts *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans*: Effects of glutathione and trehalose biosynthesis. *Food Microbiology*, 79, 137–146. doi:10.1016/j.fm.2018.12.008
- Carbonetto, B., Ramsayer, J., Nidelet, T., Legrand, J. ve Sicard, D. (2018). Bakery yeasts, a new model for studies in ecology and evolution. *Yeast*, 35(11).

doi:10.1002/yea.3350

- Causton, H. C., Ren, B., Seok Koh, S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., ... Young, R. A. (2001). *Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes*. *Molecular Biology of the Cell* (C. 12). <http://web.wi.mit.edu/young/> adresinden erişildi.
- Chi, Z., Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L. ve Zhang, T. (2009). Saccharomycopsis fibuligera and its applications in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 27(4), 423–431. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.03.003
- Cho, I. H. ve Peterson, D. G. (2010). Chemistry of bread aroma: A review. *Food Science and Biotechnology*, 19(3). doi:10.1007/s10068-010-0081-3
- Codón, A. C., Benítez, T. ve Korhola, M. (1998). Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of Saccharomyces strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(2), 154–163. doi:10.1007/s002530051152
- Cooper, S. (2003). Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest points. *The FASEB Journal*, 17(3), 333–340. doi:10.1096/fj.02-0352rev
- Cui, J., Kaandorp, J. A., Sloot, P. M. A., Lloyd, C. M. ve Filatov, M. V. (2009). Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Research*, 9(8), 1137–1147. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00552.x
- Cunningham, K. W. ve Fink, G. R. (1994). Ca²⁺ transport in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Experimental Biology*, 196(1), 157–166. doi:10.1242/jeb.196.1.157
- Dangi, A. K., Dubey, K. K. ve Shukla, P. (2017). Strategies to Improve Saccharomyces cerevisiae: Technological Advancements and Evolutionary Engineering. *Indian Journal of Microbiology*, 57(4). doi:10.1007/s12088-017-0679-8
- Dhar, R., Sagesser, R., Weikert, C., Yuan, J. ve Wagner, A. (2011). Adaptation of Saccharomyces cerevisiae to saline stress through laboratory evolution. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(5), 1135–1153. doi:10.1111/j.1420-9101.2011.02249.x
- Di Serio, M., Aramo, P., de Alteriis, E., Tesser, R. ve Santacesaria, E. (2003). Quantitative Analysis of the Key Factors Affecting Yeast Growth. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42(21). doi:10.1021/ie030078z
- Dihazi, H., Kessler, R. ve Eschrich, K. (2004). High Osmolarity Glycerol (HOG) Pathway-induced Phosphorylation and Activation of 6-Phosphofructo-2-kinase Are Essential for Glycerol Accumulation and Yeast Cell Proliferation under Hyperosmotic Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 23961–23968. doi:10.1074/jbc.M312974200
- Feldman, H. (2012). *Yeast: Molecular and Cell Biology*. (H. Feldman, Ed.). Wiley-Blackwell.
- Ferrari, M. D., Bianco, R., Froche, C. ve Loperena, M. L. (2001). Baker's yeast production from molasses/cheese whey mixtures. *Biotechnology Letters*, 23, 1–4. doi:10.1023/A:1026778503871
- García, R., Pulido, V., Orellana-Muñoz, S., Nombela, C., Vázquez de Aldana, C. R., Rodríguez-Peña, J. M. ve Arroyo, J. (2019). Signalling through the yeast MAPK Cell Wall Integrity pathway controls P-body assembly upon cell wall stress. *Scientific Reports*, 9(1), 3186. doi:10.1038/s41598-019-40112-9
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., ... Brown, P. O. (2000). *Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes* □ *D. Molecular Biology of the Cell* (C. 11). <http://www-genome.stanford.edu/yeast> adresinden erişildi.

- Gélinas, P. (2010). Mapping Early Patents on Baker's Yeast Manufacture. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5). doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00122.x
- Ghanegolmohammadi, F., Yoshida, M., Ohnuki, S., Sukegawa, Y., Okada, H., Obara, K., ... Ohya, Y. (2017). Systematic analysis of Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* based on chemical-genetic interaction profiles. *Molecular Biology of the Cell*, 28(23), 3415–3427. doi:10.1091/mbc.e17-04-0216
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R., Powell, C. D. ve Smart, K. A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling: Figure 1. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(5). doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x
- Gilchrist, C. ve Stelkens, R. (2019). Aneuploidy in yeast: Segregation error or adaptation mechanism? *Yeast*. doi:10.1002/yea.3427
- Goldstein, A. ve Oliver Lampen, J. (1975). [76] β -d-Fructofuranoside fructohydrolase from yeast. *Methods in Enzymology*, 504–511. doi:10.1016/0076-6879(75)42159-0
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Arshad, M. K. M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U. ve Chinni, S. V. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed Research International*, 2017, 1–9. doi:10.1155/2017/1272193
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., ... Schuller, C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Development*, 12(4), 586–597. doi:10.1101/gad.12.4.586
- Grant, G. D. ve Cook, J. G. (2017). The Temporal Regulation of S Phase Proteins During G1 (ss. 335–369). doi:10.1007/978-981-10-6955-0_16
- Greetham, D., Kritsiligkou, P., Watkins, R. H., Carter, Z., Parkin, J. ve Grant, C. M. (2013). Oxidation of the Yeast Mitochondrial Thioredoxin Promotes Cell Death. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(4), 376–385. doi:10.1089/ars.2012.4597
- Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V. R., Brown, P. O. ve Winge, D. R. (2000). Identification of the Copper Regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA Microarrays. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 32310–32316. doi:10.1074/jbc.M005946200
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. ve Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599–1616. doi:10.1016/S0032-9592(03)00053-0
- Hansen, E. B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 119–131. doi:10.1016/S0168-1605(02)00238-6
- Hernandez-Lopez, M. J., Prieto, J. A. ve Randez-Guía'department, F. (2003). Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiolog* (C. 84). doi:10.1023/A:1025413520192
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4), 536–553. doi:10.1128/mmbr.52.4.536-553.1988
- Hirasawa, R. ve Yokoigawa, K. (2001). Leavening ability of baker's yeast exposed to hyperosmotic media. *FEMS Microbiology Letters*, 194(2), 159–162. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb09462.x
- Hohmann, S. (2002). Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 300–372.

doi:10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002

- Koziol, S., Zagulski, M., Bilinski, T. ve Bartosz, G. (2005). Antioxidants protect the yeast *Saccharomyces cerevisiae* against hypertonic stress. *Free Radical Research*, 39(4), 365–371. doi:10.1080/10715760500045855
- Kraft, P., Pharoah, P., Chanock, S. J., Albanes, D., Kolonel, L. N., Hayes, R. B., ... Wacholder, S. (2005). Genetic Variation in the HSD17B1 Gene and Risk of Prostate Cancer. *PLoS Genetics*, 1(5). doi:10.1371/journal.pgen.0010068
- Liti, G., Carter, D. M., Moses, A. M., Warringer, J., Parts, L., James, S. A., ... Louis, E. J. (2009). Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, 458(7236), 337–341. doi:10.1038/nature07743
- Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. ve Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO journal*, 15(9), 2227–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641288> adresinden erişildi.
- Mazo, V. K., Gmshinski, I. V. ve Zorin, S. N. (2007). New food sources of essential trace elements produced by biotechnology facilities. *Biotechnology Journal*, 2(10), 1297–1305. doi:10.1002/biot.200700015
- Melim Miguel, A. S., Souza, T., Costa Figueiredo, E. V. da, Paulo Lobo, B. W. ve Maria, G. (2013). Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. *Food Industry* içinde . InTech. doi:10.5772/53168
- Mendoza, I., Quintero, F. J., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. ve Pardo, J. M. (1996). Activated Calcineurin Confers High Tolerance to Ion Stress and Alters the Budding Pattern and Cell Morphology of Yeast Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23061–23067. doi:10.1074/jbc.271.38.23061
- Mitchison, J. M. (1994). Beginning to understand the cell cycle. *The cell cycle: An introduction* (1993). By Andrew Murray and Tim Hunt. W. H. Freeman and Co., New York/Oxford University Press. xii+25 lpp. \$45, \$32.50 (hardback); \$22.95, \$15.95 (paperback). ISBN 0-7167-7644-X (hard. *BioEssays*, 16(6), 446–447. doi:10.1002/bies.950160616
- Mohammedaleid, S. (2012). Method Of Producing Baker's Yeast.
- Monteiro De Souza, P. (2010). Application Of Microbial-Amylase in Industry-A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850–861.
- Morano, K. A., Grant, C. M. ve Moye-Rowley, W. S. (2012). The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195. doi:10.1534/genetics.111.128033
- Nasr, N. F. ve Zaky, A. (2011). Five major factors affecting the production of baker's yeast using sugar cane molasses. *International Food Congress: Novel Approaches in Food Industry*, (May 2011). https://www.researchgate.net/publication/260991034_Five_major_factors_affecting_the_production_of_baker%27s_yeast_using_sugar_cane_molasses adresinden erişildi.
- Nasr, N. F., Zaky, A. ve Daw, Z. Y. (2010). *Microbiological Quality of Active Dry and Compressed Baker's Yeast sold in Egypt Antimicrobial effect of plants extracts View project Application of Quality Assurance Programs in Food Plants View project*. <https://www.researchgate.net/publication/235699337> adresinden erişildi.
- Navarro-Tapia, E., Querol, A. ve Pérez-Torrado, R. (2018). Membrane fluidification by ethanol stress activates unfolded protein response in yeasts. *Microbial*

- Biotechnology*, 11(3), 465–475. doi:10.1111/1751-7915.13032
- Ndiaye, A., Chiron, H., Della Valle, G. ve Roussed, P. (2005). A Qualitative Representation of French Breadmaking Process in View to Develop a Computerised Decision Support System: The Mixing Unit Process. *Acta Horticulturae*, (674), 585–592. doi:10.17660/ActaHortic.2005.674.77
- Nevitt, T., Öhrvik, H. ve Thiele, D. J. (2012). Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1580–1593. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.011
- Ostrander, D. B. ve Gorman, J. A. (1999). The Extracellular Domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p Membrane Osmolarity Sensor Is Necessary for Kinase Activity. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2527–2534. doi:10.1128/JB.181.8.2527-2534.1999
- Ozcan, S., Vallier, L. G., Flick, J. S., Carlson, M. ve Johnston, M. (1997). Expression of the SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. *Yeast (Chichester, England)*, 13(2), 127–37. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199702)13:2<127::AID-YEA68>3.0.CO;2-#
- Perlman, D., Raney, P. ve Halvorson, H. O. (1984). Cytoplasmic and secreted *Saccharomyces cerevisiae* invertase mRNAs encoded by one gene can be differentially or coordinately regulated. *Molecular and Cellular Biology*, 4(9), 1682–1688. doi:10.1128/mcb.4.9.1682-1688.1984
- Poutanen, K., Flander, L. ve Katina, K. (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, 26(7). doi:10.1016/j.fm.2009.07.011
- Pretorius, I. S. ve Van Rensburg, P. (2003). *Designer Yeasts for the Fermentation Industry of the 21 st Century*.
- Puigpinós, J., Casas, C. ve Herrero, E. (2015). Altered intracellular calcium homeostasis and endoplasmic reticulum redox state in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking Grx6 glutaredoxin. doi:10.1091/mbc.E14-06-1137
- Qiu, X., Zhang, J., Zhou, J., Fang, Z., Zhu, Z., Li, J. ve Du, G. (2019). Stress tolerance phenotype of industrial yeast: industrial cases, cellular changes, and improvement strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6449–6462. doi:10.1007/s00253-019-09993-8
- Randez-Gil, F., Corcoles-Saez, I. ve Prieto, J. A. (2013). Genetic and phenotypic characteristics of baker's yeast: Relevance to baking. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 191–214. doi:10.1146/annurev-food-030212-182609
- Randez-Gil, F., Sanz, P. ve Prieto, J. A. (1999, 1 Haziran). Engineering baker's yeast: Room for improvement. *Trends in Biotechnology*. Elsevier Current Trends. doi:10.1016/S0167-7799(99)01318-9
- Reed, G. ve Pepler, H. J. (1973). Baker's Yeast Production. *Yeast Technology* içinde (ss. 53–97). The AVI pUBLISHING.
- Reiser, V., Salah, S. M. ve Ammerer, G. (2000). Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmostress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nature Cell Biology*, 2(9), 620–627. doi:10.1038/35023568
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M. ve Hohmann, S. (2000). The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shock. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8290–8300. doi:10.1074/jbc.275.12.8290
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J. M., Hohmann, S., Ammerer, G. ve Ruis, H. (1999). Osmotic Stress-Induced Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

- Requires Msn1p and the Novel Nuclear Factor Hot1p. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5474–5485. doi:10.1128/MCB.19.8.5474
- Rodicio, Rosaura and Heinisch, J. J. (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. (H. König, G. Uden ve J. Fröhlich, Ed.) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-85463-0
- Rose, M., Winston, F., Heiter, P. (1990). *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual*. NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rothe, C. ve Lehle, L. (1998). Sorting of invertase signal peptide mutants in yeast dependent and independent on the signal-recognition particle. *European Journal of Biochemistry*, 252(1), 16–24. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2520016.x
- Ruta, L. L. ve Farcasanu, I. C. (2021). Saccharomyces cerevisiae Concentrates Subtoxic Copper onto Cell Wall from Solid Media Containing Reducing Sugars as Carbon Source. *Bioengineering*, 8(3), 36. doi:10.3390/bioengineering8030036
- Sainz-Polo, M. A., Ramírez-Escudero, M., Lafraya, A., González, B., Marín-Navarro, J., Polaina, J. ve Sanz-Aparicio, J. (2013). Three-dimensional Structure of Saccharomyces Invertase. *Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 9755–9766. doi:10.1074/jbc.M112.446435
- Saito, H. (2004). Regulation of the Osmoregulatory HOG MAPK Cascade in Yeast. *Journal of Biochemistry*, 136(3), 267–272. doi:10.1093/jb/mvh135
- Salari, R. ve Salari, R. (2017). Investigation of the Best Saccharomyces cerevisiae Growth Condition. *Electronic physician*, 9(1), 3592–3597. doi:10.19082/3592
- Sancho, E. D., Hernandez, E. ve Rodriguez-Navarro, A. (1986). *Presumed Sexual Isolation in Yeast Populations during Production of Sherrylike Wine*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (C. 51).
- Schmitt, A. P. ve McEntee, K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in Saccharomyces cerevisiae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12), 5777–5782. doi:10.1073/pnas.93.12.5777
- Sekova, V. Y., Dergacheva, D. I., Tereshina, V. M., Isakova, E. P. ve Deryabina, Y. I. (2018). Carbohydrate Spectrum of Extremophilic Yeasts Yarrowia lipolytica under pH Stress. *Microbiology*, 87(2), 173–182. doi:10.1134/S0026261718020133
- Serra-Cardona, A., Canadell, D. ve Ariño, J. (2015). Coordinate responses to alkaline pH stress in budding yeast. *OPEN ACCESS / www.microbialcell.com* 182 *Microbial Cell*, 2(6). doi:10.15698/mic2015.06.205
- Shahsavarani, H., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Chuenchit, B. ve Harashima, S. (2012). Superior thermotolerance of Saccharomyces cerevisiae for efficient bioethanol fermentation can be achieved by overexpression of RSP5 ubiquitin ligase. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1289–1300. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.002
- Shankar, T., Thangamathi, P., Rama, R. ve Sivakumar, T. (2014). Characterization of invertase from Saccharomyces cerevisiae MTCC 170. *African Journal of Microbiology Research*, 8(13), 1385–1393. doi:10.5897/ajmr2014.6612
- Shi, D., Wang, C. ve Wang, K. (2009). Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(1), 139–147. doi:10.1007/s10295-008-0481-z
- Shima, J. ve Takagi, H. (2009). Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces*

- cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 53(3). doi:10.1042/BA20090029
- Shokoohi, S., Tsigounis, K., Urmaza, L. . M. ve Perez, A. Z. (2016). The effect of stress due to sodium chloride exposure on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Expedition*, 5.
- Soares, E. V, Hebbelinck, K. ve Soares, H. M. (2003). Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(5), 336–343. doi:10.1139/w03-044
- Takagi, H. (2017). Construction of Baker’s Yeast Strains with Enhanced Tolerance to Baking-Associated Stresses. *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi* içinde (ss. 63–85). doi:10.1007/978-3-319-58829-2_3
- Takagi, H. ve Shima, J. (2015). Stress Tolerance of Baker’s Yeast During Bread-Making Processes. H. Takagi ve H. Kitagaki (Ed.), *Stress Biology of Yeasts and Fungi: Applications for Industrial Brewing and Fermentation* içinde (ss. 23–42). Tokyo: Springer Japan. doi:10.1007/978-4-431-55248-2_2
- Tanaka, F., Ando, A., Nakamura, T., Takagi, H. ve Shima, J. (2006). Functional genomic analysis of commercial baker’s yeast during initial stages of model dough-fermentation. *Food Microbiology*, 23(8). doi:10.1016/j.fm.2006.02.003
- Thewes, S. (2014). Calcineurin-Crz1 Signaling in Lower Eukaryotes. doi:10.1128/EC.00038-14
- Trivedi, N. B., Jacobson, G. K., Tesch, W. ve Friend, J. P. (1986). Bakers’ Yeast. *Critical Reviews in Biotechnology*, 4(1). doi:10.3109/07388558609150791
- Tsolmonbaatar, A., Hashida, K., Sugimoto, Y., Watanabe, D., Furukawa, S. ve Takagi, H. (2016). Isolation of baker’s yeast mutants with proline accumulation that showed enhanced tolerance to baking-associated stresses. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 233–240. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.015
- Türkel, S. ve Genç Turgut, T. (2002). Analysis of the effects of hyperosmotic stress on the derepression of invertase activities and the growth of different baker’s yeast strains. *Turkish Journal of Biology*, 155–161.
- Vázquez, J., Grillitsch, K., Daum, G., Mas, A., Beltran, G. ve Torija, M. J. (2019). The role of the membrane lipid composition in the oxidative stress tolerance of different wine yeasts. *Food Microbiology*, 78, 143–154. doi:10.1016/j.fm.2018.10.001
- Verstrepen, K. J., Iserentant, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Van Dijck, P., Winderickx, J., ... Delvaux, F. R. (2004). Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends in Biotechnology*, 22(10). doi:10.1016/j.tibtech.2004.08.001
- Walker, G. M. (1998). *Baker’s yeast*. In : *Yeast Physiology and Bio- technology*. Wiley & Sons.
- Walker, L. J., Aldhous, M. C., Drummond, H. E., Smith, B. R. K., Nimmo, E. R., Arnott, I. D. R. ve Satsangi, J. (2004). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in Crohn’s disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations. *Clinical and Experimental Immunology*, 135(3). doi:10.1111/j.1365-2249.2003.02392.x
- Wenger, J. W., Piotrowski, J., Nagarajan, S., Chiotti, K., Sherlock, G. ve Rosenzweig, F. (2011). Hunger Artists: Yeast Adapted to Carbon Limitation Show Trade-Offs under Carbon Sufficiency. *PLoS Genetics*, 7(8), e1002202.

doi:10.1371/journal.pgen.1002202

- Xu, H., Fang, T., Yan, H. ve Jiang, L. (2019). The protein kinase Cmk2 negatively regulates the calcium/calcineurin signalling pathway and expression of calcium pump genes PMR1 and PMC1 in budding yeast. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 7. doi:10.1186/s12964-019-0320-z
- Yalcin, T. H. ve Corbaci, C. (2013). Isolation and Characterization of Amylase Producing Yeasts and Improvement of Amylase Production. *Turkish Journal of Biochemistry*, 38(1), 101–108. doi:10.5505/tjb.2013.95866
- Zinser, E. ve Daum, G. (1995). Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11(6). doi:10.1002/yea.320110602

EKLER

EK 1 Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

EK 1. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

1: Yeast Ekstrakt, Pepton, Dekstroz (YPD) (Tam Besiyeri)

10 g yeastekstrakt ve 20 g pepton saf suda çözüldü. Katı besiyeri (petriler) için, sıvı besiyeri ortamına 20 gram/litre oluşturacak şekilde Agaragar eklendi ve 120°C sıcaklıkta,

25 dakikasteril edildi. Karbon kaynağı olarak %20'lik stok çözelti halinde glukoz hazırlandı, 120 C'de 25 dakika otoklavda steril edildi. Glukoz, kullanımından önce besiyerlerine son konsantrasyonu %2 olacak şekilde ortama ilave edildi.

2: Kalsiyum Klorür Çözeltilerinin Hazırlanması

(CaCl₂·2H₂O, FW: 147,02 g/mol)

Son konsantrasyonu 200 mM olarak kullanıldı. Stok: 2 M'dir. 2 M stok hazırlamak için 7,35 gr CaCl₂, 25 ml dH₂O'da çözüldü.120°C sıcaklıkta, 25 dakika steril edildi Bu 2 M stoktan 5 ml'lik kültürlere 500 µl eklendi ve 4 saat beklenildi.

3: Sodyum Klorür Çözeltilerinin Hazırlanması

(NaCl, FW: 58,44 g/mol)

Son konsantrasyonu 0,8 M olarak kullanıldı. Stok: 4M'dir. 4 M stok hazırlamak için 5,84 gr NaCl, 25 ml dH₂O'da çözüldü.120°C sıcaklıkta, 25 dakika steril edildi Bu 4 M stoktan 5 ml'lik kültürlere 1 ml eklendi ve 4 saat beklenildi.

4: Bakır (II) Sülfat Çözeltilerinin Hazırlanması

(CuSO₄·5H₂O, FW: 249,68 g/mol)

Son konsantrasyonu 200 µM olarak kullanıldı. Stok: 1mM'dir. 1mM stok hazırlamak için 0,00624 gr CuSO₄·5H₂O, 25 ml dH₂O'da çözüldü. 120°C sıcaklıkta, 25 dakika steril edildi. Bu 1mM stoktan 5 ml'lik kültürlere 1 ml eklendi ve 4 saat beklenildi.

