

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülten YAĞMUR

MİTOKONDRIYAL MUTANTLARIN BİRA FERMANTASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2006

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİTOKONDRIYAL MUTANTLARIN BİRA FERMANTASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

Gülten YAĞMUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**Bu tez 10/05/2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği
/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.**

İmza.....

İmza.....

İmza.....

Doç.Dr. Hüseyin ERTEN

Prof. Dr. Ahmet CANBAŞ

Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ

DANIŞMAN

ÜYE

ÜYE

Bu tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No :

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir.**

Proje No : ZF.2004.YL.16

Not : Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirimlerin, çizelge şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

MİTOKONDRIYAL MUTANTLARIN BİRA FERMANTASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Gülten YAĞMUR

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Hüseyin ERTEN
Yıl: 2006, sayfa: 56

Jüri : Prof. Dr. Ahmet CANBAŞ
Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ
Doç. Dr. Hüseyin ERTEN

Bu çalışmanın amacı, alt fermantasyon bira mayası *Saccharomyces carlsbergensis* NCYC 1056 ve üst fermantasyon bira mayası *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 mayaları ile yürütülen bira fermantasyonlarından izole edilen mitokondriyal mutantların bira kalitesi üzerine etkisini incelemektir.

Çalışmada malt şıralarına izole edilen mitokondriyal mutantlar 1×10^7 hücre/mL oranında ilave edilmiştir. Mitokondriyal mutant kullanılmayan doğrudan 1×10^7 hücre/mL bira mayası ilave edilen deneme kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmada fermantasyon süresince maya gelişimi ve fermantasyon hızı belirlenmiştir. Elde edilen biralarda yoğunluk, etil alkol, titrasyon asitliği, pH, indirgen şeker ve toplam şeker analizleri ile aroma maddeleri tayini yapılmıştır.

Mitokondriyal mutantlarının kullanıldığı denemelerde fermantasyon hızı ve maya gelişimi kontrol örneğine göre daha yavaş bulunmuştur. Ayrıca, mitokondriyal mutant kullanımı ile elde edilen biralarda etil alkol ve aroma maddeleri miktarı kontrole göre daha düşük değerlerde belirlenmiştir. Bira üretiminde istenmeyen bir aroma maddesi olan diasetil *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayasının mitokondriyal mutantları ile üretilen biralarda daha yüksek bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bira, Mitokondri, Mitokondriyal Mutant, Mutasyon, *Saccharomyces* spp.

ABSTRACT

MSC. THESIS

THE EFFECT OF MITOCHONDRIAL MUTANTS ON BEER

FERMENTATION

Gülten YAĞMUR

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hüseyin ERTEN

Year: 2006, Pages: 56

Jury : Prof. Dr. Ahmet CANBAŞ

Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ

Assoc. Prof. Dr. Hüseyin ERTEN

The objective of this study was to determine the effect of mitochondrial mutants of bottom fermentation yeast of *Saccharomyces carlsbergensis* NCYC 1056 and top fermentation yeast of *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 on beer quality.

Wort inoculated with mitochondrial mutants at 1×10^7 cell/mL. Wort inoculated with main yeasts at 1×10^7 cell/mL was used as control. During the fermentation the yeast growth and fermentation rate were measured. Specific gravity, ethyl alcohol, pH, titration acidity, total and reducing sugars and aroma compounds were determined in the beers.

According to the results obtained, fermentation rate and growth of yeast decreased in the samples produced by mitochondrial mutants. In addition, mitochondrial mutants produced lower amounts of ethyl alcohol and aroma compounds than the main yeasts. The amount of diacetyl which is off flavour and play an important role on the beer quality were found higher in the samples produced by mitochondrial mutant of *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 than that of control.

Key Words: Beer, Mitochondri, Mitochondrial Mutant, Mutation, *Saccharomyces* spp.

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim süresince çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Hüseyin Erten'e,

Ayrıca, jüri üyesi olarak tezimi değerlendiren Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Ahmet Canbaş'a ve Mersin Üniversitesi Rektör Yardımcısı Prof. Dr. H. İbrahim Ekiz'e,

Şıra temininde kolaylık sağlayan Adana Efes Pilsen Bira İşletmesine ve özellikle Teknik Müdür Cengiz Yağmur'a,

Tezimin ilk aşamasından son haline gelinceye kadar tüm aşamalarında emeği geçen ve manevi desteklerini hep gördüğüm sevgili dostlarım Ar. Gör. Hasan Tangüler'e, Gıda Yüksek Mühendisi Esra Özdemir'e ve Gıda Yüksek Mühendisi Aslı Togay'a,

Ayrıca, Ar. Gör. Adnan Bozdoğan'a, Gıda Yüksek Mühendisi Pakize Demir'e, Gıda Mühendisi Emel Ünal'a ve sevgili arkadaşım Sinem Erpek'e,

Bütün öğrenim hayatım boyunca büyük bir sabır içerisinde bana destek olan, maddi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen Annem Nursen Yağmur, Babam Mustafa Yağmur, Kardeşlerim Yunus Yağmur, Ayşegül Yağmur ve Ağabeyim Hasan Yağmur'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın gerçekleşmesinde maddi desteklerinden dolayı Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1.Bira Üretimi	4
2.2. Maya Hücresinin Şekli ve Yapısı.....	6
2.2.1. Hücre Duvarı	7
2.2.2. Hücre Zarı	7
2.2.3. Sitoplazma.....	7
2.3. Bira Mayası	8
2.4. Mitokondriler	9
2.4.1. Mitokondriyal DNA	11
2.5. Bira Üretiminde Mitokondrinin Rolü	12
2.6. Mutasyon.....	15
2.6.1. Mitokondriyal Mutasyon.....	15
2.6.1.1. Mitokondriyal Mutasyonun Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi	18
2.6.1.2. Mitokondriyal Mutasyonun Fermantasyon Hızı Üzerine Etkisi	19
2.6.1.3. Mitokondriyal Mutasyonun Aroma Maddeleri Üzerine Etkisi.....	19
2.6.1.3.(1). Mitokondriyal Mutasyonun Yüksek Alkol Üretimi Üzerine Etkisi	19
2.6.1.3.(2). Mitokondriyal Mutasyonun Ester Üretimi Üzerine Etkisi	21
2.6.1.3.(3). Mitokondriyal Mutasyonun Karbonil Bileşiklerinin Üretimi Üzerine Etkisi	22
2.6.1.4. Mitokondriyal Mutasyonun Bira Mayasının Çökeltme Yeteneği Üzerine Etkisi.....	24
3. MATERYAL VE METOT	25

3.1. Materyal	25
3.1.1. Mayalar	25
3.1.2. Hammadde	25
3.1.3. Deneme ve Analizlerde Kullanılan Araç ve Gereçler.....	25
3.2. Metot	26
3.2.1. Denemelerin Hazırlanması.....	26
3.2.1.1. Mitokondriyal Mutantların Fermantasyon Ortamından İzolasyonu .	26
3.2.1.1.(1). Aşılama Kültürünün Hazırlanması	26
3.2.1.1.(2). Trifeniltetrazolium Klorit Agarın Hazırlanması.....	26
3.2.1.1.(3). YEP-Glikoz Agarın Hazırlanması.....	26
3.2.1.1.(4). YEP-Gliserol Agarın Hazırlanması.....	27
3.2.1.1.(5). Fermantasyon	27
3.2.1.2. Denemelerin Düzenlenmesi	29
3.2.1.2.(1). Aşılama Kültürünün Hazırlanması	29
3.2.1.2.(2). Fermantasyon	29
3.2.2. Analiz Metodları	31
3.2.2.1. Maya Sayımı	31
3.2.2.2. Şırada Yapılan Analizler	31
3.2.2.2.(1). Brix Tayini.....	31
3.2.2.2.(2). pH Tayini.....	31
3.2.2.2.(3). Toplam Asit Tayini.....	31
3.2.2.2.(4). Yoğunluk Tayini.....	31
3.2.2.3. Birada Yapılan Analizler.....	32
3.2.2.3.(1). Yoğunluk Tayini.....	32
3.2.2.3.(2). Etil Alkol Tayini.....	32
3.2.2.3.(3). pH Tayini.....	32
3.2.2.2.(4). Toplam Asit Tayini.....	32
3.2.2.2.(5). İndirgen Şeker Tayini	32
3.2.2.2.(6). Toplam Şeker Tayini	33
3.2.3.3.(7). Aroma Maddelerinin Tayini	33
3.2.3.3.(8). İstatistiksel Analizler	33

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	34
4.1. Denemelerde Kullanılan Şıranın Genel Bileşimi.....	34
4.2. Alkol Fermantasyonunun Gidişi	35
4.3. Bira Fermantasyonunda Mayaların Gelişimi	36
4.4. Biraların Genel Bileşimi	38
4.5. Biraların Aroma Maddeleri	39
5. SONUÇLAR	45
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. İyi bir alt fermantasyon bira mayasında aranan özellikler.....	9
Çizelge 2.2. Bazı aminoasitlerden üretilen yüksek alkoller.....	20
Çizelge 4.1. Malt şirasının bileşimi.....	34
Çizelge 4.2. <i>S. carlsbergensis</i> NCYC 1056 mayası ve mitokondriyal mutanı ile elde edilen biraların genel bileşimi.....	38
Çizelge 4.3. <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 mayası ve mitokondriyal mutanı ile elde edilen biraların genel bileşimi.....	38
Çizelge 4.4. <i>S. carlsbergensis</i> NCYC 1056 mayası ve mitokondriyal mutanı ile elde edilen biraların aroma maddeleri değerleri... ..	40
Çizelge 4.5. <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 mayası ve mitokondriyal mutanı ile elde edilen biraların aroma maddeleri değerleri.....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ	SAYFA
Şekil 2.1. Bira üretiminin aşamaları.....	4
Şekil 2.2. Maya hücresi.....	6
Şekil 2.3. Mitokondrinin yapısı.....	10
Şekil 2.4. Ökaryotik mikroorganizmalarda glikozun yağ asitlerine dönüşümü.....	13
Şekil 2.5. Maya metabolizmasında asetil CoA'nın temel görevleri.....	14
Şekil 2.6. Ester oluşum mekanizması.....	21
Şekil 2.7. Asetaldehitten etanol oluşumu.....	22
Şekil 2.8. Şıra fermantasyonu sırasında valin sentezinin ara ürünü olarak diasetil oluşumu.....	23
Şekil 3.1. Mitokondriyal mutantların fermantasyon ortamından izolasyonu.....	28
Şekil 3.2. Mitokondriyal mutantlarla fermantasyon denemelerinin düzenlenmesi.....	30
Şekil 4.1. <i>S. carlsbergensis</i> NCYC 1056, <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 ve mitokondriyal mutantlarının kullanıldığı denemelerde alkol fermantasyonunun gidişi.....	35
Şekil 4.2. <i>S. carlsbergensis</i> NCYC 1056, <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006 ve mitokondriyal mutantlarının kullanıldığı denemelerde maya gelişimi.....	36

1. GİRİŞ

Bira, arpanın çimlendirilip kurutulması ile elde edilen maltın su ile belirli şartlar altında mayşelenmesi ve elde olunan şıranın şerbetçiotu ile kaynatıldıktan sonra, alkol fermentasyonuna terk edilmesi sonucu meydana gelen, alkol ve CO₂ içeren içkidir (Türker ve Canbaş, 2001).

Bira kalitesini etkileyen unsurlardan en önemlisi kullanılan mayadır. Fermentasyon sırasında şıradaki şekerler maya tarafından esas ürün olarak alkol ve CO₂'e dönüştürülür. Bunlar yanında gliserol, organik asit, yüksek alkol, ester gibi ikincil ürünler de oluşur. Bu ikincil ürünler biraya eşsiz bir aroma kazandırır. Kullanılan maya ırkının fizyolojik durumu oluşacak aroma maddelerinin miktarını etkiler (Guido ve ark., 2003; Walker, 2004).

Bira üreticileri kullandıkları maya suşlarının mutasyona uğramalarını istemezler. Ancak diğer bütün organizmalarda olduğu gibi bira mayası da mutasyona karşı hassastır (Pearson, 1996). Mutasyon, DNA'da meydana gelen kalıtsal nitelikteki yapısal değişiklik olarak tanımlanır ve bu değişikliğe birçok etken neden olur. DNA'da baz sırasının değişmesi birçok şekilde ortaya çıkabilir. Nükleotid yer değiştirmeleri, çikmaları, girmeleri ve yeniden düzenlemeler mutasyonların esas nedenleridir (Arda, 1995).

Tüm organizmalar çevre ile ilişkileri sırasında tesadüfi veya normal olarak mutasyona uğrayabilir. Mutasyonlar doğal yani kendiliğinden oluşan veya fiziksel (UV-ışınları, x ışınları, ısı vb.) ve kimyasal etkenlerin (nitroz asidi, akridin, pürin ve pirimidin analogları vs.) etkisi ile yapay olarak oluşan olmak üzere ikiye ayrılır (Ensari, 2002; Arda, 1995).

Bira mayasında en sık rastlanan ve doğal olarak kendiliğinden ortaya çıkabilen mutasyon "mitokondriyal mutasyon" dur. Bu mutasyona mitokondriyal genomdan kaybolan büyük parçalar neden olur (Bernardi, 1979). Mitokondrisi mutasyona uğramış mayaya mitokondriyal mutant denir. Bu mutantlar mitokondri aktivitesindeki eksikliklerle karakterize edilirler ve havalı ortamda solunum olayını tam olarak gerçekleştiremezler. Ayrıca laktat, gliserol ve etanol gibi fermente olmayan karbon kaynaklarını da kullanamazlar (Ernandes ve ark., 1993).

Mitokondriyal mutantlar ve normal suşlar arasında görülen temel farklılık sitokrom sistemindeki eksiklikten kaynaklanır ve en yaygın görülen eksiklik sitokrom a, sitokrom a₃ ve sitokrom b'nin yokluğudur (Silhankova ve ark., 1970a).

Bira mayası suşlarında alkol fermantasyonu sırasında mitokondriyal mutant oluşum oranı %0.5-5.0 arasında değişir. Sıcaklığa ve kültür koşullarına bağlı olarak bu oran aynı maya suşu için %50'ye kadar çıkabilir (Boekhout ve Robert, 2003; Walker, 2004).

Mitokondriyal mutasyonun fermantasyon performansı ve bira kalitesi üzerine önemli bir etkisi vardır. Mitokondri kaybı hücre gelişimini büyük ölçüde engeller ve fermantasyon hızının azalmasına neden olur (Ernandes ve ark., 1993; Pearson, 1996).

Silhankova ve ark. (1970b), bir alt fermantasyon bira mayası suşundan elde ettikleri beş spontan mitokondriyal mutant üzerinde çalışmışlar ve bu mutantlardan elde ettikleri biraların daha aromatik ve serbest aminoasit ve alifatik alkol içeriğinin daha düşük, pH değerinin ise daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Gyllang ve Martinson (1971), mitokondriyal mutantların ana mayaya göre şekeri, özellikle maltotriozu daha yavaş parçaladığını ve farklı miktarkarda n-propanol, izo-bütanol, 2-metil bütanol ve 3- metil bütanol ürettiğini belirtmişlerdir.

Morrison ve Sugget (1983), mitokondriyal mutantlar ve normal bira mayası suşlarıyla üretilen biraların aromalarının farklı olduğunu, mitokondriyal mutantlarla üretilen biralarda vikinil diketon (diasetil ve 2,3-pentanedion) konsantrasyonunun 0.17 ppm iken normal bira mayası suşlarıyla üretilen biralarda bu değer 0.05 ppm olduğunu bildirmişlerdir.

Good ve ark. (1993), iki alt fermantasyon bira mayası ve onlardan elde ettikleri mitokondriyal mutantların besin ortamına adaptasyonu üzerine yaptıkları bir araştırmada, besin maddelerince zengin bir ortamdan fakir bir ortama aşılana suşların mitokondriyal mutantlardan daha kısa sürede ortama adapte olduklarını bildirmişlerdir.

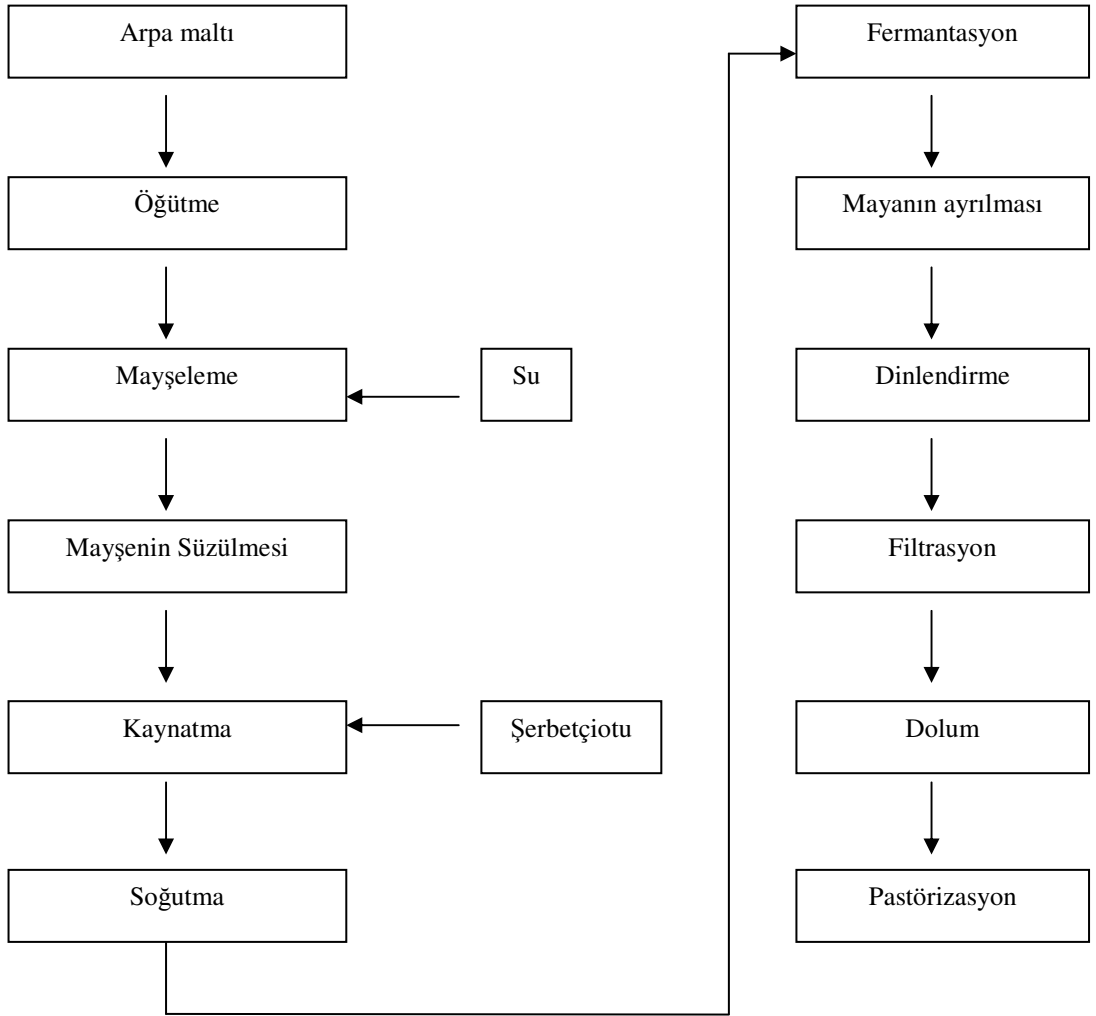
Ernandes ve ark. (1993), mitokondriyal mutantlar kullanılarak üretilen biralarda aroma maddelerinden özellikle diasetil ve izoamilalkol miktarının arttığını, etilasetat ve izoamil asetat miktarının ise azaldığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı alt ve üst fermantasyon bira mayalarından izole edilen mitokondriyal mutantların bira kalitesi üzerine etkisini ortaya koymaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Bira Üretimi

Bira, arpanın çimlendirilip kavrulmasıyla elde edilen maltın daha sonra su, şerbetçiotu ve maya kullanılması ile üretilen alkollü bir içkidir (Türker ve Canbaş, 2001). Bira üretiminin aşamaları Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Bira üretiminin aşamaları (Türker ve Canbaş, 2001).

Biranın başlıca hammaddesi olan malt, arpanın çimlendirilip kurutulmasıyla elde edilir (Türker ve Canbaş, 2001). Malt, şıra üretimi için gerekli olan α -amilaz, β -amilaz ve proteazlar gibi enzimler ve substratlarca zengin bir maddedir. Bira yapımındaki ilk aşama mayşelemedir. Bu aşamada malt öğütülerek sıcak su (50-75°C'de) ile karıştırılır (Moll ve Blauwe, 1994; Tucker ve Woods, 1995). Mayşeleme sırasında malt içindeki maddelerin, özellikle nişastanın, α - ve β -amilaz enzimleri tarafından parçalanıp suda çözünür hale getirilmesi sağlanmış olur. Aynı zamanda proteazlar proteinlere etki ederek mayaların kullanabileceği amino asitleri oluştururlar. Mayşeleme işlemi bitince mayşe süzülerek katı maddeleri ayrılır. Elde edilen sıvıya şıra denir (Lee, 1996; Green, 2002; Bamforth, 2005).

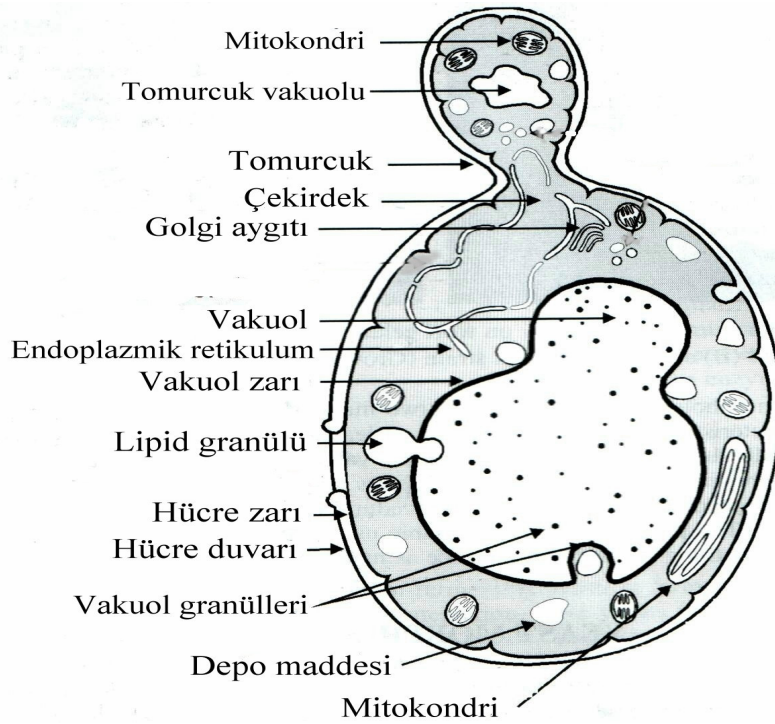
Şıra, biraya özel aromasını vermek için şerbetçiotu ile yaklaşık 1-1.5 saat kaynatılır. Kaynatma sırasında şerbetçiotunun bileşiminde bulunan humulon ve diğer α -asitler izomerize olarak biraya karakteristik acı tat veren izohumulon gibi izo- α -asitlere dönüşür (Varnam ve Sutherland, 1994; Bamforth, 2005). Öte yandan, kaynatma ile birlikte enzimler inaktive edilir, şıra sterilize olur, proteinler çöker ve ekstrakt miktarında artış olur. Şıra, şerbetçiotu ve tortuyu uzaklaştırılmak için filtreden geçirilir veya santrifüjlenir (Potter ve Hotchkiss, 1995; Briggs ve ark., 2004).

Maya ilave edilmeden önce şıranın fermantasyon sıcaklığına kadar soğutulması gerekir. Mayanın sterol ve yağ asitleri gibi hücre zarının yapısında bulunan temel zar bileşenlerinin sentezini yapabilmesi için oksijene ihtiyacı vardır. Bu amaçla, soğutulan şıra havalandırılır ve daha sonra bira mayasıyla aşılır (Iserentant, 2003; Moonjai ve ark., 2003). Bira endüstrisinde kullanılan başlıca iki maya türü vardır. Bunlar *Saccharomyces (S) carlsbergensis* ve *S. cerevisiae*'dir. *S. carlsbergensis*, bir alt fermantasyon mayasıdır, fermantasyonun sonunda kümeleşerek hızla çöker ve fermentörün altında toplanır. *S. cerevisiae* ise bir üst fermantasyon mayası olup, fermantasyon sırasında oluşan CO₂ kabarcıkları ile yükselerek kalın kahverengi bir tabaka şeklinde fermente olan şıranın üzerinde toplanır (Lewis ve Young 1995; Young, 1996). Ancak her iki türde yeni sınıflandırmada *S. cerevisiae* olarak adlandırılmıştır (Stewart ve Russell, 1998). Alt fermantasyon yaklaşık bir hafta, üst fermantasyon ise yaklaşık üç gün sürer.

Fermantasyon sırasında maya, şıradaki şekerleri alkol ve CO₂'e parçalar. Aynı zamanda yüksek alkoller, esterler ve karbonil bileşikleri gibi biranın aromasına önemli katkı sağlayan bileşikler de oluşur. Fermantasyondan sonra bira, maya ve diğer maddelerden ayrılması için filtre edilir (Potter ve Hotchkiss, 1995; Türker ve Canbaş, 2001). Alt fermantasyon biralari, asıl fermantasyondan sonra dinlendirme mahzenlerine alınarak 1°C'de birkaç ay dinlendirilir. Üst fermantasyon biralari ise birkaç hafta dinlendirilir. Buna ikinci fermantasyon da denir. Dinlendirilen bira filtre edilir, şişelenir ve pastörize (60°C'de 20 dakika) edildikten sonra tüketime sunulur (Angelino, 1991; Türker ve Canbaş, 2001).

2.2. Maya Hücresinin Şekli ve Yapısı

Bira mayası *S. cerevisiae*, *Ascomycetes* sınıfına ait ökaryotik bir organizmadır. Fakültatif anaerob'tur. Tomurcuklanarak çoğalır (Lewis ve Young, 1995). Tipik bir mayası hücresi Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Maya hücresi (Stewart ve Russell, 1998).

S. cerevisiae hücresi elips şeklindedir. Hücre duvarı, hücre zarı ve sitoplazma kısmından oluşur. Maya hücrelerinin büyüklüğü 5x10 µ kadardır (Walker, 1998). Hücre büyüklüğü, beslenme ve kültürün yaşına bağlı olarak değişiklikler gösterir (Pamir, 1985).

2.2.1. Hücre Duvarı

Hücre duvarı, hücreyi korur ve ona şeklini verir. Toplam hücre ağırlığının %15-25'ini oluşturur. Geçirgen bir yapıda olması nedeniyle suda çözünen tüm maddelerin hücre içine geçişini sağlar (Şahin, 1995). Hücre duvarının yaklaşık %80-90'nını polisakkaritler (glukan ve mannan) geri kalanını ise proteinler oluşturmaktadır (Briggs ve ark., 2004). Hücre yaşlandıkça hücre duvarı kalınlaşır (Russell, 1995).

2.2.2. Hücre Zarı

Hücre duvarının hemen altında bulunan hücre zarı, iki protein ve bunların arasında yer alan fosfolipid tabakasından oluşmuştur (Walker, 1998). Hücre zarı, besin maddelerinin hücre içine alınmasında, atık maddelerin hücre dışına atılmasında, hücre duvarının sentezinde ve hücre dışı enzimlerin salgılanmasında rol oynar (Russell, 1995; Thieman ve Palladino, 2004).

2.2.3. Sitoplazma

Sitoplazma, hücre organellerini içerir. Kimyasal bakımdan protein yapısında (Şahin, 1995) olup asidiktir ve pH'sı yaklaşık 5.2'dir. Glikoliz ve yağ asitlerinin sentezi gibi metabolik olaylarda yer alan bazı enzimler sitoplazma içerisinde bulunur (Briggs ve ark., 2004).

2.3. Bira Mayası

Bira mayaları *Saccharomyces* cinsinden olup alt fermantasyon biralalarında *S. carlsbergensis*, üst fermantasyon biralalarında *S. cerevisiae* türü kültür mayaları kullanılır (Türker ve Canbaş, 2001; Boekhout ve Robert, 2003). Bu mayaların oksijen ihtiyacı, fermente edebildiği şekerler, oluşturdukları metabolik ürünlerin miktarı ve çökelme özellikleri birbirinden farklıdır (Bamforth, 2005). Alt fermantasyon mayaları fermantasyon sonunda kümeleşerek hızla çöker ve fermentörün altında toplanır. Üst fermantasyon mayaları ise fermantasyon sırasında oluşan köpük ile yükselerek kalın kahverengi bir tabaka şeklinde fermente olan şıranın üzerinde toplanır (Prentis, 1985; Brown ve ark., 1987; Angelino, 1991). Dünyada yaklaşık %80 ve bizde tamamen alt fermantasyon birası yapıldığından daha çok alt fermantasyon mayaları söz konusudur (Türker ve Canbaş, 2001).

İki maya türünü ayırt etmek için kullanılan biyokimyasal özellik; *S. cerevisiae*'nin melibozu fermente edememesi, *S. carlsbergensis*'in ise bu şekeri tamamen fermente ederek glikoz ve galaktoza dönüştürmesidir. Bunun nedeni *S. cerevisiae*'da melibaz (α -galaktozidaz) enziminin olmamasıdır (Boekhout ve Robert, 2003; Bamforth, 2005). Bu türler arasındaki diğer önemli fark bira üretiminde istenen fermantasyon sıcaklıklarının değişik olmasıdır. Alt fermantasyon 5-10°C'de; üst fermantasyon ise 15-20°C'de yapılır (Stewart ve Russell, 1998; Türker ve Canbaş, 2001). Öte yandan, bira üretiminde kullanılan maya suşu biranın aroması üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. İyi bir alt fermantasyon bira mayasında aranan özellikler Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. İyi bir alt fermantasyon bira mayasında aranan özellikler (Walker, 1998).

-
- İyi bir çökelme yeteneğine sahip olmalı,
 - Tekrar kullanmak için depolandığında canlılığını ve genetik stabilitesini kaybetmemeli,
 - İyi bir fermantasyon yeteneğine sahip olmalı,
 - Maltöz ve maltotriozu tam olarak etil alkole fermente edebilmeli,
 - Ozmotik basınca dayanıklı olmalı,
 - Aroma maddelerini yeterince üretmelidir.
-

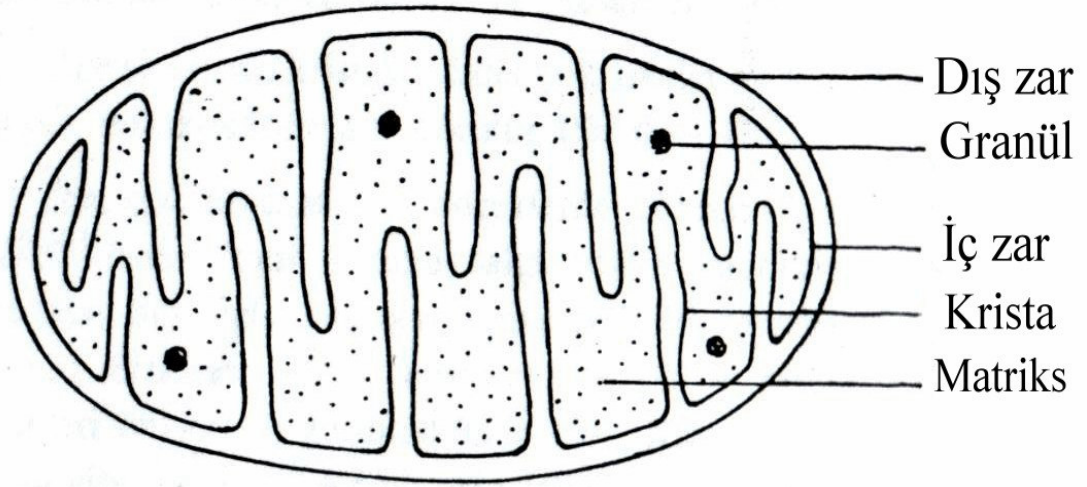
2.4. Mitokondriler

Mitokondriler (Yunanca, mitos-iplik, chondrion-granül) ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunan çomak ya da granül biçimindeki organellerdir (Ozban, 1982; Tuiete, 1989). İlk kez 19. yüzyılın sonlarında Altman ve Benda tarafından keşfedilmiştir. Prokaryotik hücrelerde mitokondri bulunmaz. Bu hücrelerde mitokondrinin görevini hücre zarı üstlenmiştir (Gökalp ve ark., 1992).

Mitokondrilerin şekli oval, uzunluğu 1-2 µm, çapı 0.5-1 µm'dir ve sitoplazma hacminin yaklaşık % 20'sini işgal ederler (Hough ve ark., 1982; Gökalp ve ark., 1992). Mitokondrinin şekli, büyüklüğü ve sayısı genellikle hücreden hücreye, hücrenin fonksiyonel devrelerine ve gelişme şartlarına bağlı olarak değişir (Hough ve ark., 1982; Walker, 1998). Normal bir karaciğer hücresinde ortalama 1000-1600 kadar mitokondri bulunurken bir maya hücresinde bu sayı 4-20 arasında değişir (Ozban, 1982; Pamir, 1985).

Mitokondrinin temel görevi, oksidatif fosforilasyonda yer alarak hücrenin enerji ihtiyacını karşılamaktır. Mitokondrilerde oksidasyon ve fosforilasyon için gerekli olan bütün enzim ve koenzimler bulunur (Houshmond, 1999). Hücre içi solunumun büyük bir bölümü mitokondri içinde yer alır. Mitokondriler DNA, RNA ve ribozom içerdiklerinden amino asitlerden bazı proteinlerin sentezini yapabilir ve buna ek olarak bölünebilirler (Ersoy ve Baysu, 1986; Tuiete, 1989). Mitokondri kendi kendini üretme kabiliyetinde olup, ihtiyaç anında bir mitokondriden birçok mitokondri meydana gelebilmektedir (Gökalp ve ark., 1992).

Mitokondriler dış taraftan her biri 70-80 A° kalınlığında ve 60-80 A° aralıkla birbirine paralel iki zarla çevrilidir. Her iki zarda protein, lipid, protein tabakaları bulunur. Yapılan ilk araştırmalarda mitokondrilerin %60-70 protein, %25-30 lipid içerdikleri ve bu lipidlerin %80-90 kadarının fosfolipid (lesitin ve sefalin) geri kalanının kolesterol ve diğer lipidler olduğu bildirilmiştir (Ozban, 1982). Mitokondrinin yapısı Şekil 2.3' de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Mitokondrinin yapısı (Ozban, 1982).

Dış zar düz olarak uzanır ve mitokondriyi sınırlar. İç zar, mitokondri içine doğru girintili çıkıntılı kıvrımlar yapar. Krista adı verilen bu uzantılar mitokondri içinde yarı ya da yarıdan uzun bölmeler yaparak karşılıklı birbirlerinin içine girerler. Genellikle fazla enerjiye gereksinimi olan hücrelerdeki mitokondrilerde çok sayıda krista bulunur (Ozban, 1982; Russell, 1995; Houshmond, 1999).

İç zarın çevrelediği ve kristaların arasında kalan iç bölme mitokondri matriksi denir (Scheffler, 2001). Matriks genellikle homojen görünürse de bazı durumlarda çok ince filamentlerden oluşur ve yoğun granüller içerir. Granüllerin büyüklüğü değişmekle birlikte bunların mitokondri iyon durumunu ayarladığı, iki değerli katyonları özellikle Mg^{++} ve Ca^{++} u bağlayan yerler olduğu düşünülmektedir (Ozban, 1982).

İç ve dış zarın enzim aktiviteleri farklı olmakla beraber dış zarın enzim aktivitesi fazladır. Membran taşıma enzimleri ve fosfolipit biyosentezine ait enzimler dış zarda bulunurken elektron taşınması ve oksidatif fosforilasyonda yer alan enzimler iç zarda bulunur. Mitokondrilerin matriksi de çeşitli enzimlerce zengindir. Trikarboksilik asit döngüsü ve yağ asitlerinin yıkımında rol oynayan enzimlerin çoğu matrikste bulunur (Russell, 1995; Walker, 1998; Scheffler, 2001). Anaerobik şartlar altında mitokondride oksidatif metabolizma ile ilgili enzimler bulunmaz. Ayrıca elektron transfer zincirindeki proteinleri ve trikarboksilik asit döngüsünde yer alan bazı enzimleri kodlayan genlerin anlatımı (ekspresyonu) söz konusu değildir. Bu şartlar altında oluşan küçük, görülmesi zor organellere promitokondri denir. Promitokondrilerde birkaç tane krista bulunur yada hiç bulunmaz (Briggs ve ark., 2004).

2.4.1. Mitokondriyal DNA

Mitokondride DNA bulunduğu ilk kez 1962 yılında Nass ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Mitokondri DNA'sı tıpkı çekirdek DNA'sı gibi çift sarmal yapıda, bir ya da daha fazla DNA molekülünden oluşur. *S. cerevisiae*'daki mitokondriyal DNA (mtDNA) yaklaşık 25 µm uzunluğunda oval bir molekül olup, 60.000-75.000 baz çifti içermektedir. Molekül ağırlığı 5 milyon daltondur (Pearson, 1996; Groth ve ark., 2000).

Mitokondriyal DNA, çekirdeğin kontrolü altında sentezlenir ve mitokondriye taşınır (Newlon, 1989). Mitokondride bulunan proteinlerin yaklaşık % 5-10'u mtDNA tarafından kodlanır. Bu proteinler solunumda rol oynayan sitokromlar ve ATPaz enzim kompleksi için önemlidir. Mayada mtDNA'nın birçok kopyası bulunur. Aktif olarak solunum yapan hücrelerde bu sayı 100 civarındadır (Hammond, 1996b; Groth ve ark., 2000). Mitokondrinin gelişimi ve aktivitesi mtDNA'da bulunan genlerin kontrolü altındadır (Hough ve ark., 1982).

Mitokondriyal DNA ergosterol ve doymamış yağ asitlerinin sentezinde, şeker taşıma sistemleri ve hücre yüzeyinde meydana gelen diğer maya aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynar (Jeunhomme ve ark., 1985).

2.5. Bira Üretiminde Mitokondrinin Rolü

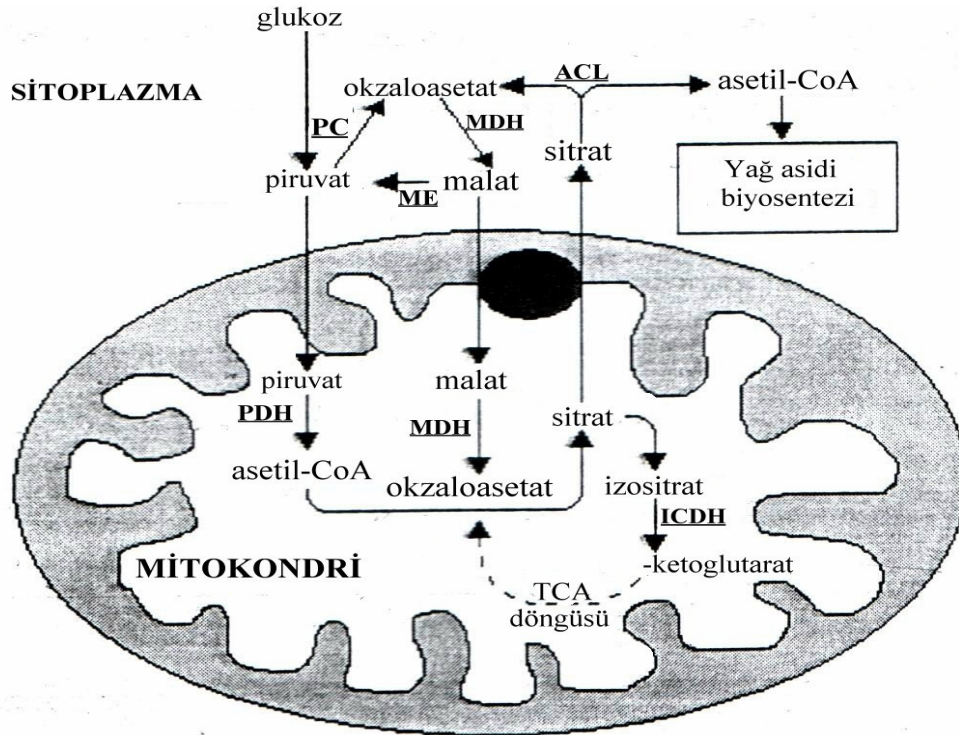
Fermantasyon sırasında, fermantasyon performansı ve son ürünün kalitesinde rol oynayan bazı olaylar mitokondride gerçekleşir. Mitokondri sadece oksidatif ATP sentezinde değil TCA döngüsünde, amino asitlerin, lipidlerin, nükleotidlerin ve aroma maddelerinin sentezinde, aktif taşıma gibi metabolik ve biyosentetik olaylarda yer alan önemli bir organeldir (Sakaki ve ark., 2003; Rasmussen ve ark., 2003). Bu nedenlerden dolayı mitokondrinin gelişmesi fermantasyon için önemlidir (Walker, 1998).

Hücre yapısı (mitokondri oluşumu gibi) ve enzim kompozisyonu üzerinde glikoz konsantrasyonunun etkisi vardır. Bunlardan biride "Glikoz Etkisi"dir. Şırada başlangıçta şeker miktarı %1'in üzerinde olduğunda TCA döngüsü enzimleri, elektron transferinde yer alan bileşikler (sitokrom a, a₃, b₁, c ve c₁) ve mitokondrinin tamamen oluşumu engellenir. Bu durumda maya, fermantasyon yolundaki enzimlerin sentezine devam eder. Bu olay aynı zamanda "Crabtree Etkisi" olarak da bilinir ve oksijen varlığında dahi meydana gelir (Gancedo ve Serrano, 1989; Green, 2002; Verstrepen ve ark., 2004). Ancak glikoz konsantrasyonu %0.4'un altına düştüğünde mitokondri tam olarak gelişir. Mitokondrinin tam olarak gelişmesi için aynı zamanda oksijene ihtiyaç vardır. Ancak şıradaki oksijen, aşılardan sonraki 2-6 saat içinde glukoz konsantrasyonu baskılayıcı seviyenin altına düşmeden tükenir (Hough ve ark., 1982; Varnam ve Sutherland, 1994). Oksijen miktarının yetersiz olması durumunda maya gelişimi için çok önemli olan sterol ve doymamış yağ asitleri sentezlenemez, fermantasyon hızı yavaşlar ve şekerlerin parçalanması tamamlanamaz (Jones, 1985). Bu nedenle ortama oksijen verilmelidir. Oksijen verildikten sonraki ilk bir saat içinde solunum zinciri bileşikleri (sitokromlar) oluşurken üç saat sonra mitokondrinin iç zarı gelişir (Hough ve ark., 1982).

Hücrelerin gelişmesi ve bazı bileşiklerin sentezini yapabilmesi için enerjiye ihtiyacı vardır (Prentis, 1985). ATP, enerji kaynağı olarak kullanılır. Aerobik hücrelerde enerji oluşumu, elektronların oksitlenecek bileşikten (yağlar, karbonhidratlar) taşıyıcı molekül aracılığıyla oksijene verilmesi sırasında gerçekleşir.

Bu taşıyıcı sistem mitokondri içinde kompleks bir şekilde düzenlenmiştir (Yüreğir, 1985; Gancedo ve Serrano, 1989).

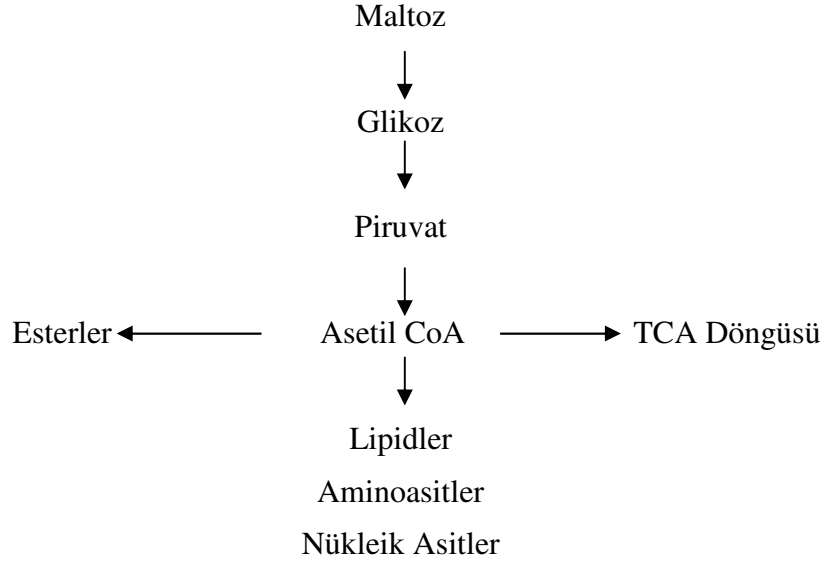
Hücre zarının bileşiminde bulunan en önemli maddeler doymamış yağ asitleri ve sterollerdir. Önemli doymamış yağ asitleri, palmitoleik ve oleik asitlerdir. Maya hücresinde en çok bulunan steroller ise ergosterol ve zymosteroldür (Briggsve ark., 2004). Bu maddeler sırada, optimum maya gelişimi için gerekli olan konsantrasyondan daha düşük miktarlarda bulunurlar. Yeterli maya gelişimini sağlamak için bu bileşiklerin maya hücresi tarafından sentezlenmesi gerekir (Russell, 1995; Pearson, 1996). Mitokondri, yağ asidi ve ergosterol biyosentezinde önemli bir rol oynar. Yağ asitleri ve sterolün sentezi için öncelikle pürüvatın asetil-CoA'ya dönüşmesi gerekir. Öte yandan, piruvatın asetil-CoA'ya dönüşümü ise mitokondri içinde gerçekleşir (Ratledge ve Wynn, 2000). Glikozun yağ asitlerine dönüşümü Şekil 2.4'de verilmiştir.



TCA: Tri karboksilik asit döngüsü, PC: Pirüvat karboksilaz, MDH: Malat dehidrogenaz, PDH: Pirüvat dehidrogenaz, ACL: ATP sitrat liyaz, ME: Malik enzim, ICDH: İzositrat dehidrogenaz

Şekil 2.4. Ökaryotik mikroorganizmalarda glikozun yağ asitlerine dönüşümü (Ratledge ve Wynn, 2000).

Asetil-CoA, sterol ve yağ asidi biyosentezi ile ester üretimini de içine alan bir çok metabolik yolda rol oynayan önemli bir moleküldür. Hücrede bulunması fermantasyon için önemlidir (Dufuor ve ark., 2003). Asetil CoA'nın maya metabolizmasındaki temel görevleri Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Maya metabolizmasında asetil CoA'nın temel görevleri (Peddie, 1990).

Öte yandan, *S. cerevisiae* glikoz etkisi gösteren bir mayadır. Bu nedenle ortamdaki glikoz konsantrasyonundan etkilenir. Glikoz konsantrasyonunun 2 g/L'dan 3 g/L'ye çıkması sonucu *S. cerevisiae*'nin lipid içeriği azalır (Ratledge ve Evans, 1989).

Fermantasyonda amino asit metabolizması da önemlidir. Amino asit metabolizmasının büyük bir kısmı sitoplazmada meydana gelir. Amino asitlerin keto asitlere dönüşümü ise mitokondride gerçekleşir. Keto asitler ise yüksek alkollerin öncül maddeleridir (Hough ve ark., 1982; Pearson, 1996).

Diasetil ve 2,3-pentanedion, birada bulunan çok önemli bir bileşik grubudur. Algılanma eşikleri düşüktür ve bira aromasına istenmeyen tereyağimsi bir aroma kazandırır (Bamforth, 2005). Bu diketonlar, asetohidroksi asitlerin enzimatik olmayan oksidatif dekarboksilasyonu ile oluşurlar. Asetohidroksi asitlerin oluşumundan sorumlu olan bütün enzimler ise mitokondride bulunur. Bu enzimlerin

aktiviteleri, özellikle asetohidroksi asit isomeroreduktaz, diketonların oluşum miktarını etkiler (Hough ve ark., 1982; Pearson, 1996).

2.6. Mutasyon

Mutasyon, DNA'nın nükleotid sırasındaki değişim olarak tanımlanabilir. Mutasyonlar doğal yani kendiliğinden meydana gelebilir ya da mutajen adı verilen kimyasal maddeler ve fiziksel uygulamalarla yapay olarak oluşumları sağlanabilir (Thieman ve Palladino, 2004). Mutasyon oluşumunun farklı nedenleri vardır. Doğal mutasyonlar DNA polimeraz ve rekombinasyon enzimleri gibi enzimlerin işlevinde meydana gelen hatalar sonucu oluşur. Bu mutasyonların oluşum oranı organizmanın gelişme şartlarına bağlı olarak 10^{-10} ile 10^{-8} arasında değişir ve mutajenler kullanılarak bu oran önemli ölçüde arttırılabilir. Genom mutasyonları, kromozom sayısında değişikliklere neden olurken, kromozom mutasyonları kromozomdaki genlerin sırasını değiştirebilir. Öte yandan, genlerde en sık görülen nokta mutasyonları ise genlerdeki baz sekanslarının değişmesine neden olabilir. Mikroorganizmalarda en sık görülen mutasyon türü ise nokta mutasyonlarıdır (Crueger ve Crueger, 1990; Groth ve ark., 2000).

2.6.1. Mitokondriyal Mutasyon

Bira mayasında en sık rastlanan ve kendiliğinden, doğal olarak ortaya çıkabilen mutasyon mitokondriyal mutasyondur. Mayadaki mitokondriyal mutantlar ilk kez 1940'lı yılların sonunda Ephrussi tarafından tanımlanmış ve o zamanlardan beri bir çok araştırmanın konusu olmuştur. Mitokondriyal mutasyona mitokondriyal genomdan çıkarılan büyük parçalar neden olur. Bu parçaların büyüklüğü genom uzunluğunun %20'si ile %99'u arasında değişir (Bernardi, 1979; Netter ve Robineau, 1989; Bingham ve Nagley, 1983).

Mitokondriyal mutasyon sonucu mtDNA'sı eksik (ρ^-) yada mtDNA'dan tamamen yoksun (ρ^0) mutantlar meydana gelir (Rasmussen ve ark., 2003; Giudice ve ark., 2005). Bu mutantlarda elektron transfer zincirinde yer alan bir çok bileşik bulunmaz (Briggs ve ark., 2004). Öte yandan hücre duvarının yapısı ve hücrelerin

şeker kullanım özellikleri değişirken glikoz etkisine karşı olan hassasiyet azalır (Pearson, 1996).

Mitokondriyal mutantların izolasyonu ve özelliklerinin belirlenmesi mitokondrinin hücredeki işlevi hakkında biyokimyasal, genetik ve moleküler biyoloji açısından önemli bilgiler sağlamıştır (Walker, 1998). Mitokondriyal mutantların mitokondrisi normal mitokondriden hem morfolojik hem de biyokimyasal olarak farklıdır. Bu mutantların mitokondrisinde en yaygın görülen eksiklik normal hücrelerin mitokondrisinde bulunan sitokrom a, sitokrom a₃ ve sitokrom b eksikliğidir (Gyllang ve Martinson, 1971). Sitokromlar aerobik bütün hücrelerde bulunan ve oksidasyonda yer alan pigmentlerdir (Yüreğir, 1985).

Sitokrom içeriğindeki bu değişikliklerin yanısıra mitokondriyal mutantların enzim aktivitesinde de farklılık görülür. Mutasyonla enzim aktivitesi azalabilir ya da yok olabilir. TCA döngüsündeki süksinik dehidrogenaz ve akonitik hidrotaz enzimlerinin aktivitesi mitokondriyal mutasyonla yok olur (Silhankova, 1970a).

Mitokondriyal mutantlar etanol, gliserol gibi fermente olmayan karbon kaynaklarını kullanamazlar. Glikoz içeren agar üzerinde geliştirildiklerinde ise küçük koloniler oluştururlar (Kennedy ve ark., 2003; Stuart ve ark., 2005). Ayrıca mitokondriyal mutantlar tetrazolyum tuzunu kullanamadıkları için bu koloniler beyaz renkte görünürler (Kennedy ve ark., 2003).

Mitokondriyal mutantların oluşumu akridin yada etidium bromit gibi mutajenler kullanılarak da sağlanabilir. Bu mutajenler mitokondriyal DNA'nın tam kaybına neden olabilirler (Hough ve ark., 1982; Fayeulle, 1985). Sıcaklık artışları da zarın özelliklerini etkileyerek mitokondriyal mutantların oluşumunu arttırabilir (Pearson, 1996). Teknolojinin gelişmesine paralel olarak bira mayasının genetik değişimi üzerine kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır (Heller, 2003).

Fonty ve ark. (1979), kendiliğinden oluşan ve etidium bromit gibi mutajenlerle oluşumu teşvik edilen mitokondriyal mutantların gen dizilimlerinin ana suşdan oldukça farklı olduğunu bildirmişlerdir.

Ferguson ve ark. (1988), yaptıkları bir çalışmada *S. cerevisiae*'da yapay olarak mitokondriyal mutasyon oluşumunu sağlamak için proflavin ve türevleri olan 2,7-dimetil, 2,7-dietil, 2,7-diizopropil ve 2,7-ditert-bütil üzerinde çalışmışlar ve bu

bileşiklerden 2,7-diizopropil ve 2,7-ditert-bütil'in DNA bağlayıcı özelliklerinin bulunduğunu belirlemişlerdir.

Giudice ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada mitokondriyal mutantlarda mtDNA bulunmadığını ve genlerdeki değişiklikler sonucunda TCA döngüsündeki enzimlerin oluşmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca ribozomlarda ki protein sentezini engelleyen ve bir alkaloid olan lyrosine karşı mtDNA'dan yoksun hücrelerin (ρ^0) daha dirençli olduklarını bulmuşlardır.

Murphy ve ark. (1980), 28°C'de geliştirilen mitokondriyal mutantlarda mitokondrideki protein sentezinin bir ara ürünü olan "var1" proteinin oluşumunun azaldığını, 36°C'de ise oluşmadığını, sitokrom oksidaz ve mitokondriyal ATPaz enzimlerinin ise sentezlenmediğini belirlemişlerdir.

Sakaki ve ark. (2003), mtDNA miktarının azalmasıyla ortaya çıkan mitokondriyal mutantların ana suşa göre ısıya daha dirençli olduklarını bildirmişlerdir.

Rasmussen ve ark. (2003), oligomisin ve antimisin A bileşiklerinin mitokondri üzerine etkilerini inceledikleri bir çalışmada bu bileşiklerin mitokondrideki oksidatif fosforilasyonu engellediklerini bildirmişlerdir. Antimisin A'nın mtDNA'da büyük kopmalara neden olarak mitokondriyal mutantların oluşumunu sağlarken oligomisin'in mitokondriyal ATPaz enzimini bağlayarak hem elektron akışını hem de ATP üretimini engellediğini bildirmişlerdir.

Poli ve ark. (1999), yaptıkları bir çalışmada bileosin ve glutation bileşiklerinin *S. cerevisiae*'da mitokondriyal mutasyona neden olduğunu bulmuşlardır.

Mitokondriyal mutantların çok yüksek konsantrasyonlarda bulunması teknolojik işlemlerde istenilmeyen sonuçlar ortaya çıkardığı için bu mutantların bira endüstrisinde kullanımının uygun olmadığı bildirilmiştir (Silhankova ve ark., 1970b; Boekhout ve Robert, 2003). Öte yandan yapılan çeşitli çalışmalarda mitokondriyal mutantların kontrol suşlarına göre fermantasyon hızının daha düşük olduğu ve bu mutantlarla üretilen biralarda daha yüksek oranda şeker bulunduğu belirlenmiştir (Silhankova ve ark., 1970a). Bunun nedeni, mitokondriyal mutantların çoğunun fermantasyon sırasında hızlı bir şekilde çökmesi ve şekerleri daha düşük hızla

asimile etmesidir (Walker, 2004). Trifeniltetrazolyum klorit (TTC) boyama tekniğiyle belirlenen birçok mutant maltotriozu fermente etme yeteneğini kaybeder buna karşın glikoz, fruktoz ve maltozu fermente etme yeteneklerinde ise bir değişme söz konusu değildir (Hammond, 1996b; Boekhout ve Robert, 2003). Öte yandan, bu mutantlar kontrol suşlarına göre farklı miktarlarda n-propanol, izo-bütanol, 2-metil bütanol ve 3-metil bütanol gibi yüksek alkollerü üretirler (Gyllang ve Martinson, 1971).

Jenkins (2003), maya hücrelerinin aşılama için tekrar kullanılması sırasında ortaya çıkan hücre gelişiminin azalması ve performans kaybı gibi problemlerin DNA'nın zarar görmesine ve mutasyona yol açtığını bildirmiştir.

Walker (2004), düşük gelişme hızına sahip olan ve zayıf çökelme özelliği gösteren mitokondriyal mutantların oluşumunun bira üretimi sırasında kontrol edilebilmesi durumunda daha iyi kalitede bira elde edilebileceğini bildirmiştir.

Ernandes ve ark. (1993), şeker kullanımı ve glikoz etkisi gibi fizyolojik özellikleri değiştirilmiş mitokondriyal mutantların etanol üretimi gibi özel endüstriyel uygulamalarda kullanımının önemli olabileceğini bildirmişlerdir.

2.6.1.1. Mitokondriyal Mutasyonun Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi

Hücre zarının bileşiminde bulunan en önemli bileşikler arasında doymamış yağ asitleri ve steroller vardır. Bu bileşiklerin yetersiz miktarda sentezlenmesi hücre zarının yapısında ve zar ile ilgili işlemlerde değişikliğe neden olur ve hücre gelişimi yavaşlar (Hough ve ark., 1982; Moonjai ve ark., 2003). Bu bileşiklerin sentezinde yer alan enzimlerin aktiviteleri mitokondriyal mutantların mitokondrisinde düşüktür. Bu da lipid sentezinin azalmasına neden olur. Öte yandan, bu maddelerin sentezi için ATP'ye ihtiyaç vardır. Mutasyon sonucu mitokondriyal ATP miktarının azalması da bu bileşiklerin sentezinde azalmaya yol açar. Mitokondriyal mutantlarda gelişme hızının düşük olmasının doymamış yağ asidi ve sterol biyosentezindeki azalmayla ilgili olduğu düşünülmektedir (Pearson, 1996).

2.6.1.2. Mitokondriyal Mutasyonun Fermantasyon Hızı Üzerine Etkisi

Mitokondriyal mutasyonun fermantasyon performansı ve bira kalitesi üzerine çok büyük etkisi vardır. Mitokondriyal fonksiyon kaybının hücre gelişimini çok büyük ölçüde engellemesi sonucu şırayı fermente edecek hücrelerin sayısında azalma görülür. Bu durumda fermantasyon hızı azalır (Ernandes ve ark., 1993; Pearson, 1996).

2.6.1.3. Mitokondriyal Mutasyonun Aroma Maddeleri Üzerine Etkisi

Ana maya ve bunun mitokondriyal mutantlarıyla üretilen biraların aroması birbirinden farklıdır. Mitokondriyal mutantlarla üretilen biralar daha aromatiktir (Silhankova ve ark., 1970b). Bu biraların aroması tereyağımsı, karamel/toffee, aşırı tatlı, sabunumsu/yağlı olarak tanımlanırken kontrol suşlarıyla üretilen biraların aroması şerbetçiotumsu, çiçeğimsi/güzel kokulu olarak tanımlanır. Mitokondriyal mutantlarla üretilen biralarda diasetil ve 2,3-pentanedion miktarının yüksek olması güçlü tereyağımsı/toffee aromaya neden olur (Morrison ve Suggett, 1983; Kennedy, 2003).

2.6.1.3.(1). Mitokondriyal Mutasyonun Yüksek Alkol Üretimi Üzerine Etkisi

Yüksek alkoller birada en fazla bulunan aroma maddeleridir (Berry ve Watson, 1987). Birada 45 tane yüksek alkol bulunduğu bildirilmiştir. Fuzel alkol olarak da adlandırılan yüksek alkollerden en önemlileri; 2-metil propanol, 2-bütanol, 3-metil bütanol, 2-metil bütanol, 2-pentil etanol'dür (Verstrepen ve ark., 2003a; Dickinson, 2003). Bu bileşikler biraya meyvemsi ve tatlı bir aroma verirler. Maya ırkı, ortamın bileşimi, fermantasyon sıcaklığı ve havalandırma yüksek alkollerin oluşumunda etkili olan faktörlerdir (Younis ve Stewart, 1998; Boekhout ve Robert, 2003). Fermantasyon teknolojisinde ya da şıranın bileşimindeki değişiklikler sonucu aşırı miktarda yüksek alkol üretilebilir. Yüksek alkollerin dengesiz bir şekilde üretimi biranın aromasını olumsuz etkiler (Quanin ve Duffield, 1985)

Yüksek alkollerin oluşumları aminoasit metabolizmasıyla ilgilidir. Maya, Ehrlich (aminoasit) ve biyosentez (karbonhidrat) yollarını kullanarak yüksek alkoller üretir. Ehrlich yolu, ortamda aminoasitlerin bulunması halinde kullanılır (Henschke ve Jiranek, 1993). Bu yolla bazı aminoasitlerden oluşan yüksek alkoller Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Bazı aminoasitlerden üretilen yüksek alkoller (Hough ve ark., 1982; Henschke ve Jiranek, 1993).

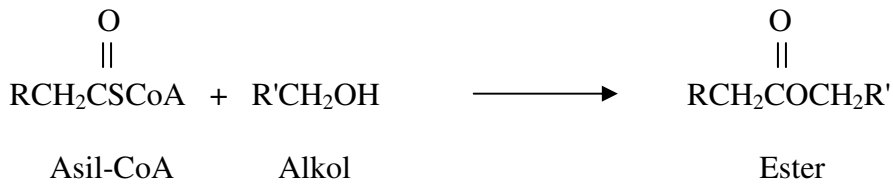
Aminoasit	Keto asit	Aldehit	Yüksek alkol
2-Amino bütirik asit	2-Keto bütirik asit	Propionaldehit	1-Propanol
Valin	2-Keto izo valerik asit	İzobütil aldehit	İzo-butanol
İzolösin	2-Keto3-metilvalerik asit	2-metil bütül aldehit	2-Metil bütanol
Lösin	2-Keto izokaproik asit	İzovale aldehit	3-Metil bütanol
Fenil alanin	3-fenil 2-keto propiyonik asit		2-Fenil etanol
Serin	Hidroksi pürivik asit	Gliksal	Glikol

Hücre içine alınan aminositler önce transaminosyanla ketoasitlere daha sonra dekarboksilasyonla aldehitlere dönüşür. Aldehitlerin yüksek alkollere dönüşümü sırasında ise NAD^+ oluşur. Mitokondriyal mutasyon sonucu aldehitlerin alkollere dönüşümü gibi NAD^+ oluşumuna yol açan reaksiyonlarda artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, mitokondriyal mutantlarda mitokondriyal protein sentezinin olmaması yüksek alkol üretimi için ortamda daha fazla aminoasit bulunacağını gösterir (Pearson, 1996). Ernandes ve ark. (1993), mitokondriyal mutasyonun yüksek alkol üretimini önemli ölçüde arttırdığını bildirmişlerdir.

2.6.1.3.(2). Mitokondriyal Mutasyonun Ester Üretimi Üzerine Etkisi

Bira aromasına önemli ölçüde katkı sağlayan en önemli aroma bileşenlerinden biri de esterlerdir. Esterler, alkollü içkilere meyvemsi tat ve koku verirler ve nispeten düşük algılanma eşiklerine sahiptirler (Güvenç ve ark., 2002; Dufuor ve ark., 2003). Şıranın fermantasyonu sırasında birçok farklı ester oluşur. Birada bulunan başlıca esterler; etil asetat, izoamil asetat, etil kaproat, etil kaprilat ve 2-fenil etil asetatdır (Peddie, 1990; Verstrepen ve ark., 2003b). Ester oluşumu üzerine maya ırkı, şıranın bileşimi, fermantasyon sıcaklığı, basınç, havalandırma gibi faktörler önemli derecede etki eder. Bu parametrelerin değişimi biranın özelliklerinde önemli değişikliklere yol açar (Hammond ve Pye, 1996; Lyness ve ark., 1996).

Esterler, alifatik asitlerin CoA türevleri ve alkoller arasındaki enzimatik reaksiyon sonucu oluşurlar (Dufuor ve Malcorps, 1995; Waites ve ark., 2001). Ester oluşum mekanizması Şekil 2.6'da verilmiştir. Ester sentezinde rol oynayan en önemli enzim alkol asetil transferaz enzimidir. Bu enzim alkol ve asetil-CoA arasında gerçekleşen reaksiyonu katalizler. Asetil-CoA yanında diğer asil-CoA'lar da esterlerin üretiminde rol oynarlar (Rojas ve ark., 2001).



Şekil 2.6. Ester oluşum mekanizması (Lewis ve Young, 1995).

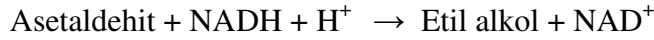
Pürivatın asetil-CoA'ya dönüşümü mitokondrinin matriksinde gerçekleşir ve birçok enzim tarafından katalizlenir. Mitokondriyal mutasyon sonucu mitokondriye pürivat girişinin azalması ya da enzim aktivitesinin düşmesi ile üretilen ester miktarı da azalır (Pearson, 1996).

2.6.1.3.(3). Mitokondriyal Mutasyonun Karbonil Bileşiklerinin (Aldehit ve Keton) Üretimi Üzerine Etkisi

Aldehit ve ketonlar bira aromasında önemli rol oynayan ve algılanma eşikleri düşük olan aroma bileşikleridir. Aldehitler genellikle çimenimsi ve meyvemsi aroma verirler. Maya ırkı, fermantasyon sıcaklığı, pH ve oksijen aldehit oluşumunu etkileyen en önemli faktörlerdir (Varnam ve Sutherland, 1994; Cabaroğlu, 1995).

Aldehitlerden asetaldehit önemli bir bileşiktir ve toplam aldehitin %90'ını oluşturur. Alkol fermantasyonu sırasında pirüvatın dekarboksilasyonu ile oluşur (Waites ve ark., 2001).

Asetaldehit, *S. cerevisiae*'daki glikolitik yolda alkol dehidrogenaz enzimi tarafından etil alkole indirgenir ve bir molekül NAD^+ oluşur (Şekil 2.7).

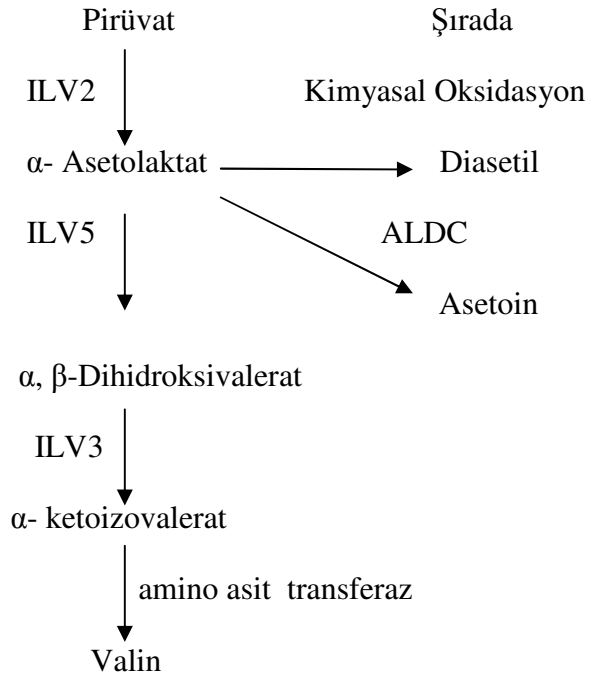


Şekil 2.7. Asetaldehitten etanol oluşumu (Aehle, 2004).

ATP sentezinde NAD^+ ya ihtiyaç vardır. Bu nedenle NAD^+ oluşumu hücre için önemlidir. Mitokondriyal mutantların etil alkol üretimini arttırdığı dolayısıyla asetaldehit üretimini azalttığı bilinir. Bu durum mutantlarla üretilen biralarda asetat miktarının neden daha düşük olduğunu açıklar. Öte yandan, asetaldehit fermantasyon sırasında maya hücresi tarafından yeniden hücre içine alınır. Mitokondriyal mutasyonla hücre zarının özellikleri değiştiği için asetaldehidin hücre içine alımı daha hızlı bir şekilde gerçekleşebilir. Bu durumda elde edilen birada asetaldehit miktarı daha düşük olur (Pearson, 1996).

Ketonlardan diasetil (2,3-bütanedion) ve 2-3 pentanedion önemlidir. Bu iki bileşik çok küçük konsantrasyonlarda bulunmalarına rağmen bira aroması üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve biraya istenmeyen tereyağımsı bir aroma verirler (Nykänen ve Suomalainen, 1983; Berry ve Slaughter, 2003). Diasetilin öncül maddesi α -asetolaktat ve 2-3 pentanedion'un öncül maddesi ise α -ketobütirattır. Bu asitler sırasıyla valin ve izolösin aminoasitlerinin sentezinde ara ürün olarak ortaya çıkarlar (Iserentant, 2003; Boekhout ve Robert, 2003). α -Asetolaktik ve α -

ketobütirik asitler maya tarafından fermantasyon ortamına verilir ve bunlar fermantasyon ortamında oksidatif dekarboksilasyonla sırasıyla, diasetil ve 2-3 pentanediona dönüşürler (Berry, 1995; Boulton ve Box, 2003). Fermantasyon sırasında diasetilin oluşum mekanizması Şekil 2.8’de verilmiştir.



ILV2: Asetohidroksiasit sentaz, ILV3: Redüktoizomeraz, ILV3: Asetohidroksiasit dehidrataz, ALDC: α -Asetolaktat dekarboksilaz

Şekil 2.8. Şıra fermantasyonu sırasında valin sentezinin ana ürünü olarak diasetil oluşumu (Iserentant, 2003).

Diasetil maya tarafından oluşturulan redüktaz enzimi ile asetoin ve 2,3-bütanediol’e, 2,3-pentanedion ise 2,3-pentanediol’e dönüştürülür (Varnam ve Sutherland, 1994). Diasetilin bu bileşiklere dönüşümü çok yavaş bir biçimde gerçekleşir. Bu durum etil alkol fermantasyonunu yeni tamamlamış biranın olgunlaşması için gereken sürenin uzamasına neden olur. Az miktarda diasetil ve 2,3-pentanedion oluşturan suşları geliştirmek amacıyla *S. cerevisiae* üzerinde çeşitli genetik çalışmalar yapılmaktadır (Varnam ve Sutherland, 1994; Green, 2002). Diasetil oluşumunu azaltarak olgunlaştırma süresini kısaltmak için bir çok yöntem

kullanılmaktadır. α -asetolaktattan direk olarak asetoin oluşumunu sağlamak ya da valin biyosentezinde görevli olan enzimleri kodlayan genleri kontrol ederek diasetil oluşumunu en aza indirmek bu yöntemler arasındadır (Hammond, 1996a; Heller, 2003).

Valin ve izolösin aminositlerinin oluşumunda rol oynayan enzimler çekirdekte kodlanır fakat mitokondride bulunurlar. Mitokondriyal mutasyon sonucu bu enzimlerin aktivitesi azalırken diasetil ve 2,3-pentanedion oluşumu önemli ölçüde artar (Morrison ve Suggett, 1983; Pearson, 1996). Öte yandan Jenkins (2003), diasetil miktarındaki artışın mitokondriyal mutasyon sonucu fermantasyon süresinin uzaması ve maya canlılığının azalmasıyla ilgili olabileceğini ileri sürmüştür.

2.6.1.4. Mitokondriyal Mutasyonun Bira Mayasının Çökeltme Yeteneği Üzerine Etkisi

Yapılan çalışmalarda *S. cerevisiae*'nin mitokondriyal mutantlarında çökeltme yeteneğinin değiştiği gözlenmiştir. Çökeltme mekanizmasını açıklayan değişik teoriler vardır. En çok kabul gören teoriye göre mayanın hücre duvarında bulunan lektin proteinleri, Ca^{+2} varlığında, başka maya hücre duvarlarında bulunan mannozla etkileşime girer. Mitokondriyal mutantlardaki hücre duvarının mannoz kompozisyonunun değiştiği gözlenmiş ve çökeltmede yer alan proteinlerin bir mitokondriyal mutantta olmadığı bulunmuştur (Stewart ve Russell, 1998; Finn ve Stewart, 2002).

Gyllang ve Martinson (1971), mitokondriyal mutantların fermente olan şıradaki süspansiyon halinde kalma yeteneklerini test etmişler ve mutantların çabuk çöktüğünü bulmuşlardır.

3. MATERYAL VE METOT**3.1. Materyal****3.1.1. Mayalar**

Bu çalışmada alt fermantasyon bira mayası *S. carlsbergensis* NCYC 1056 ve üst fermantasyon bira mayası *S. cerevisiae* NCYC 1006 kullanılmıştır. Mayalar, Dr. I. Campbell (Heriot-Watt Üniversitesi, İskoçya, Birleşik Krallık)'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Hammadde

Denemelerde kullanılan malt şırası Adana Efes Pilsen İşletmesi'nden temin edilmiştir. Diğer maddeler bunları satan kuruluşlardan sağlanmıştır.

3.1.3. Denemelerde ve Analizlerde Kullanılan Araç ve Gereçler

Adana Efes Pilsen İşletmesi'nden temin edilen şıra Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümüne getirilmiştir. Sterilizasyon amacıyla "Hirayama" marka otoklav kullanılmıştır. Mayanın çoğaltılması "Mommert" marka orbital karıştırıcıda gerçekleştirilmiştir. Mayaların şıradan ayrılmasında "Eppendorf Centrifuge 5810" marka santrifüj kullanılmıştır. Fermantasyonlar sıcaklığı ayarlanabilen "Sanyo" ve "Velp Scientifica FTC 90E" marka inkübatörlerde gerçekleştirilmiştir. Maya sayımında "Euromex" marka mikroskop kullanılmıştır. Fermantasyon süresince yoğunluktaki değişimin belirlenmesinde "Mettler Toledo" marka yoğunluk ölçer kullanılmıştır. Örnek homojenizasyonu için "Nüve NM 110" marka karıştırıcı, pH tayininde "Inolab" marka pH metre kullanılmıştır. İndirgen ve toplam şeker tayininde "Shimadzu UV-1201" marka spektrofotometre kullanılmıştır. TTC çözeltisinin sterilizasyonu 0.45µm steril filtre kullanılarak, EK filtrasyon düzeneğinde vakum pompasıyla yapılmıştır.

3.2. Metot**3.2.1. Denemelerin Hazırlanması**

Denemeler Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. Mitokondriyal Mutantların Fermantasyon Ortamından İzolasyonu**3.2.1.1.(1). Aşılama Kültürünün Hazırlanması**

Aşılama için, malt ekstrakt agarda geliştirilen mayalardan iki koloni, steril erlenmayer içerisinde bulunan steril şıraya aşılınmış ve daha sonra erlenmayerler orbital karıştırıcıya yerleştirilmiştir. Şıra, 25°C ve 160 devir/dakikada 48 saat bırakılmış ve bu süre sonunda steril tüpler içerisinde 4000 devir/dakikada 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Daha sonra mayalar, iki defa steril su ile yıkanarak 1×10^7 hücre/ml oranında şıraya aşılınmıştır (Erten ve Campbell, 2001).

3.2.1.1.(2). Trifeniltetrazolium Klorit (TTC) Agarın Hazırlanması

Agar fosfat tamponu (0.134 mol/L ve 30 g/L agar, pH:7) 115°C'de 10 dakika steril edildikten sonra 55°C'ye soğutulmuş ve EK filtrasyonu ile steril edilen TTC çözeltisiyle karıştırılmıştır.

3.2.1.1.(3). YEP-Glikoz Agarın Hazırlanması

%2 Glikoz, %1 maya ekstraktı, %1 pepton ve %2 agar kullanılarak hazırlanan çözelti 115°C'de 10 dakika steril edildikten sonra soğutulmuş ve steril petri kutularına dökülmüştür.

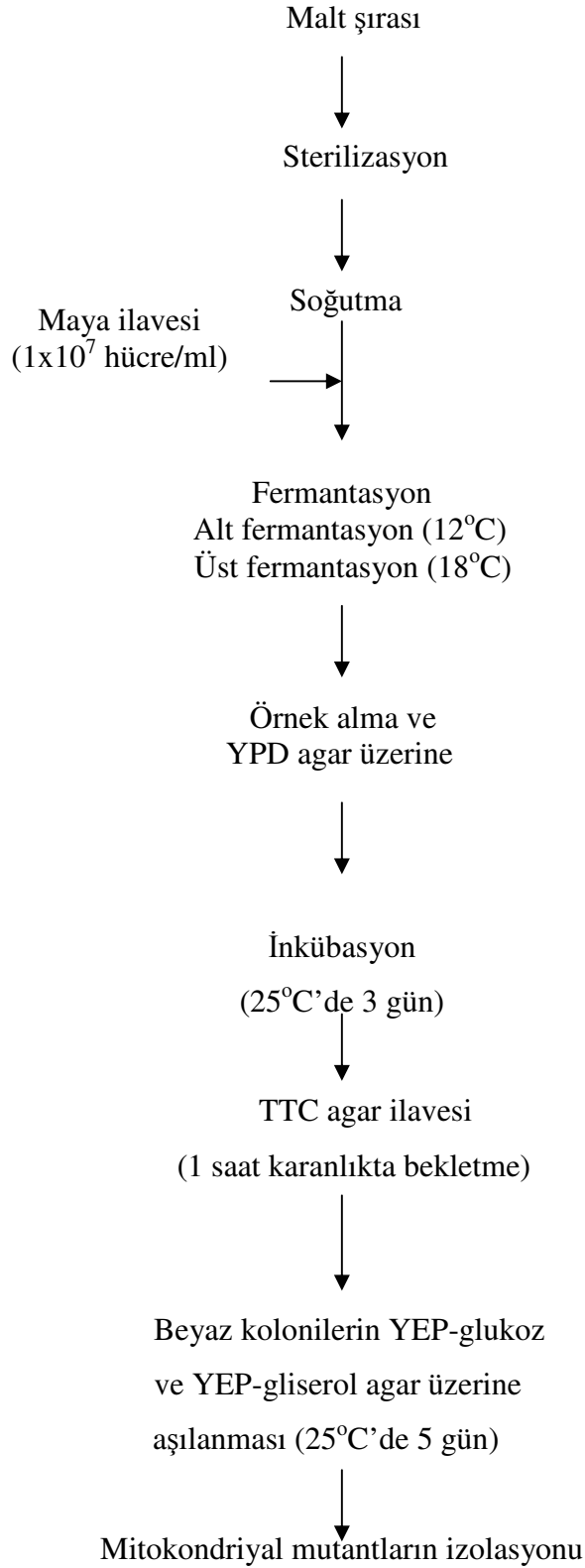
3.2.1.1.(4). YEP-Gliserol Agarın Hazırlanması

%2 Gliserol, %1 maya ekstraktı, %1 pepton ve %2 agar kullanılarak hazırlanan çözelti 115°C'de 10 dakika steril edildikten sonra soğutulmuş ve steril petri kutularına dökülmüştür.

3.2.1.1.(5). Fermantasyon

Mitokondriyal mutantların fermantasyon ortamından izolasyonu Şekil 3.1' de verilmiştir. 1 litrelik erlenmayerlere 800 mL şıra konulmuş ağızları pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılmış ve 115°C'de 10 dak. steril edilmiştir. Soğutulan şıraya 1×10^7 hücre/mL olacak şekilde maya aşılantısı ekilmiştir. Fermantasyonlar paralelli olarak alt fermantasyon bira mayası için 12°C'lik bir inkübatörde, üst fermantasyon bira mayası içinse 18°C'lik bir inkübatörde yürütülmüştür.

Fermantasyon sırasında 1 mL şıra örneği alınarak gerekli oranlarda seyreltilmiştir. Buradan alınan 0.1 mL örnek YPD agar (patates dekstroz agar) üzerine yayma yöntemiyle ekilmiş ve 25°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kolonilerin üzerine 20 mL TTC agar dökülmüş ve 1 saat karanlıkta bekletilmiştir. Bu süre sonunda TTC tuzunu kullanamadıkları için beyaz renkte görünen mitokondriyal mutantlar izole edilmiştir. Bu kolonilerin mutant olup olmadığından emin olmak amacıyla YEP-glikoz ve YEP-gliserol agar üzerine yayma yöntemiyle ekim yapılmış ve 25°C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Glikoz ortamında gelişen ancak gliserol ortamında gelişemeyen kolonilerin mitokondriyal mutant olduğu doğrulanmıştır (Jenkins ve ark.,2003).



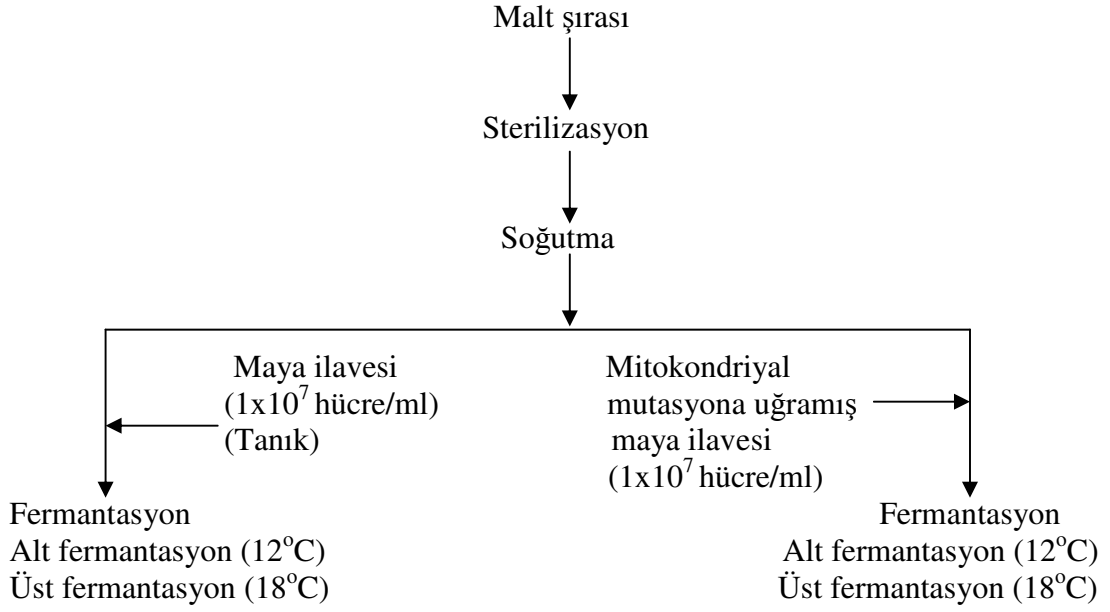
Şekil 3.1. Mitokondriyal mutantların fermantasyon ortamından izolasyonu (Crumplen ve ark., 1990; Jenkins ve ark.,2003).

3.2.1.2. Denemelerin Düzenlenmesi**3.2.1.2.(1). Aşılama Kültürünün Hazırlanması**

Aşılama için, malt ekstrakt agarda geliştirilen mayalardan iki koloni, steril erlenmayer içerisinde bulunan steril şıraya aşılınmış ve daha sonra erlenmayerler orbital karıştırıcıya yerleştirilmiş ve 48 saat süre ile orbital karıştırıcıda bırakılmıştır. Bu süre sonunda steril tüpler içerisinde 4000 devir/dakikada 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Daha sonra mayalar, iki defa steril su ile yıkanarak 1×10^7 hücre/mL oranında şıraya aşılınmıştır (Erten ve Campbell, 2001).

3.2.1.2.(2). Fermantasyon

Denemelerin düzenlenmesi Şekil 3.2’de verilmiştir. 1 litrelik erlenmayerlere 800 mL şıra konulmuş, ağzları pamuk ve alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra 115°C ’de 10 dak. steril edilmiştir. Soğutulan şıraya 1×10^7 hücre/mL olacak şekilde bira mayası ve doğal fermantasyon ortamından izole edilen mitokondriyal mutantları aşılınmıştır. Erlenmayerlerin ağzı steril fermantasyon başlıkları ile kapatıldıktan sonra fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyonlar paralelli olarak alt fermantasyon bira mayası için 12°C ve üst fermantasyon bira mayası için 18°C ’de yürütülmüştür. Fermantasyon gidişi yoğunluktaki değişim izlenerek belirlenmiştir. Normal bira mayası ile yürütülen fermantasyonlar kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Mitokondriyal mutantlarla fermantasyon denemelerinin düzenlenmesi

3.2.2. Analiz Metodları**3.2.2.1. Maya Sayımı**

Maya sayımı metilen mavisi kullanılarak mikroskop altında Thoma lamı yardımıyla yapılmıştır (Anon., 1997).

3.2.2.2. Şırada Yapılan Analizler

Şırada brix, pH, toplam asitlik ve yoğunluk analizleri yapılmıştır (Anon, 1997).

3.2.2.2.(1). Brix Tayini

Brix ölçümü, refraktometre ile gerçekleştirilmiştir (Anon., 1997).

3.2.2.2.(2). pH Tayini

pH, doğrudan pH metre kullanılarak ölçülmüştür (Anon., 1997).

3.2.2.2.(3). Toplam Asit Tayini

Toplam asit miktarı, şıranın belirteç olarak fenolftalein eşliğinde N/10'luk NaOH ile titre edilmesi suretiyle belirlenmiştir. Sonuçlar laktik asit cinsinden verilmiştir (Anon., 1997).

3.2.2.2.(4). Yoğunluk Tayini

Şırada yoğunluk, dijital bir yoğunluk ölçerle g/cm^3 cinsinden ölçülmüştür (Anon., 1997).

3.2.2.3. Birada Yapılan Analizler

Biralarda yoğunluk, etil alkol, pH, toplam asit, indirgen şeker, toplam şeker ve aroma maddeleri analizleri yapılmıştır.

3.2.2.3.(1). Yoğunluk Tayini

Yoğunluk tayini, piknometre ile 20°C'de yapılmıştır (Anon., 1997).

3.2.2.3.(2). Etil Alkol Tayini

Alkol miktarı, damıtma sonucu elde edilen alkollü sıvının piknometre ile belirlenen yoğunluğundan çizelgeler yardımıyla önce ağırlık (g/L), sonra hacim (%h/h) olarak bulunmuştur (Anon., 1997).

3.2.2.3.(3). pH Tayini

Biraların pH'sı doğrudan pH metre kullanılarak ölçülmüştür (Anon., 1997).

3.2.2.3.(4). Toplam Asit Tayini

Toplam asit miktarı, şıranın belirteç olarak fenolftalein eşliğinde N/10'luk NaOH ile titre edilmesi suretiyle belirlenmiştir. Sonuçlar laktik asit cinsinden verilmiştir (Anon., 1997).

3.2.2.3.(5). İndirgen Şeker Tayini

İndirgen şeker miktarı mg/L olarak DNS yöntemi ile belirlenmiştir (Ghose, 1984; Gök, 1998).

3.2.2.3.(6). Toplam Şeker Tayini

Toplam şeker miktarı fenol-sülfürik asit yöntemi ile yapılmıştır (Catley, 1988; Amrane ve Prigent ,1996).

3.2.2.3.(7). Aroma Maddelerinin Tayini

Aroma maddeleri tayini 5890 serisi Hewlett-Packard marka (Stockport, İngiltere) gaz kromatografisinde yapılmıştır. Alkol fermantasyonundan sonra biralar santrifüj edilerek maya hücreleri uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 5 mL örnek, 2 g NaCl ve 50 µL iç standart (200 mg/L 3-heptanon ve 18.2 mg/L 2,3-hekzanedion karışımı) özel kromatografi şişelerinde karıştırılmıştır.

Kullanılan dedektörler alev iyonlaşma (FID) ve elektron yakalama (ECD) dedektörleridir. Uzunluğu 60 m ve iç çapı 0.25 mm olan CP-Wax-57-CB (Chromopack, Hollanda) marka kapiler kolon kullanılmıştır. Şişeler 60°C'de 90 dakika asetolaktanın diasetil oluşumu için ısıtılmıştır. Daha sonra 1 mL örnek otomatik olarak çalışan örnek verme sistemi ile kromatografiye verilmiştir. Enjektör sıcaklığı 160°C'dir. Kolon sıcaklığı 43°C'de 2 dakika beklemeden sonra, dakikada 30°C artarak 180°C'ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 4 dakika bekletilmiştir. Taşıyıcı gaz helyum ve akış oranı dakikada 22 mL'dir. Enjektör tipi splitdir. Aroma maddeleri tayini sonuçları iç standart yardımıyla salınma sürelerinden bilgisayar yardımıyla otomatik olarak yapılmıştır (Erten ve Campbell, 2001).

3.2.2.3.(8). İstatistiksel Analizler

Kimyasal analizler ve aroma analizlerinden elde edilen sonuçlar, istatistiksel olarak t-testine tabi tutulmuştur. İstatistiksel analizlerde Windows SPSS 10.0 paket programı kullanılmıştır (Özdamar,1999).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA**4.1. Denemelerde Kullanılan Şıranın Genel Bileşimi**

Denemelerde kullanılan şıranın genel bileşimi Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Malt şırasının bileşimi

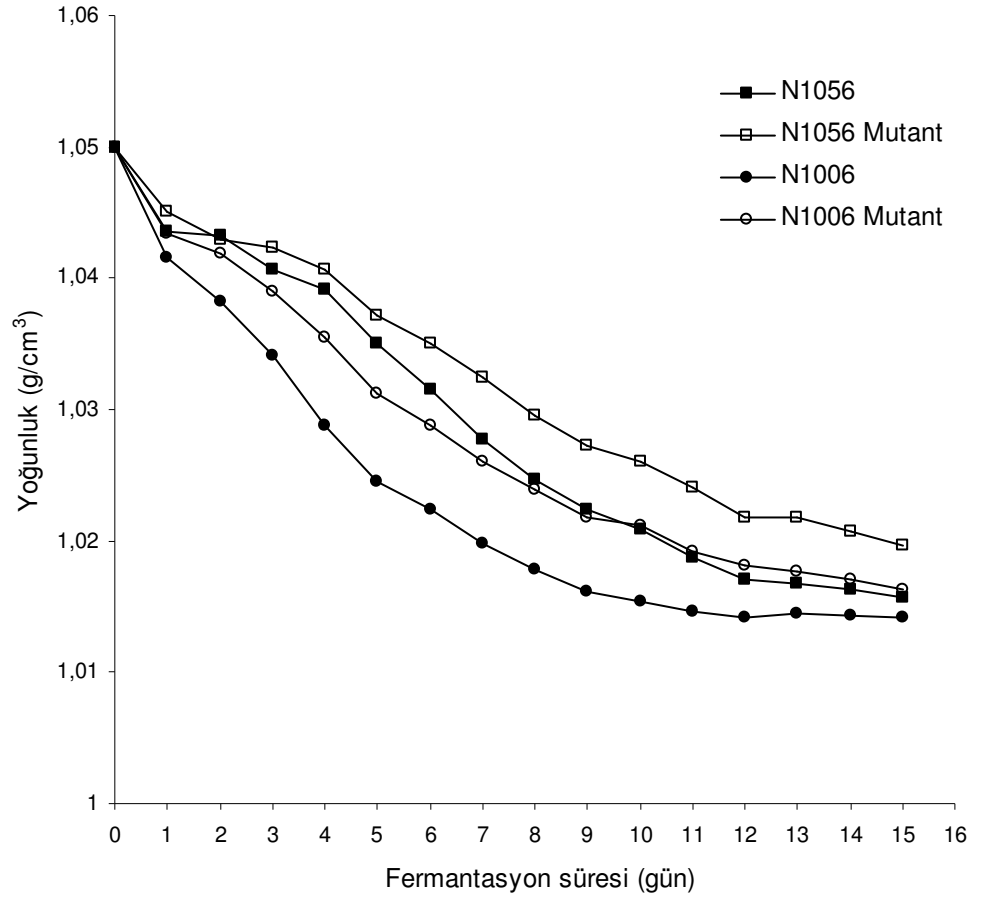
Bileşim	Miktar
Brix	12.5
pH	5.48
*Toplam asitlik (g/L)	2.02
Yoğunluk (g/cm ³)	1.050

* Laktik asit cinsinden

Denemelerde kullanılan şıranın pH’sı ve yoğunluğu daha önce yapılan bazı çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Moll (1991), kaynatma işlemi sonrasında malt şırası için istenilen pH değerinin 5.4 civarında olduğunu bildirmiştir. Silhankova ve ark. (1970b), mitokondriyal mutantlarla ilgili yaptıkları bir çalışmada kullandıkları şıranın yoğunluğunun 1.0404 g/cm³, pH’sının 5.62, toplam asitliğinin ise 1.70 g/L olduğunu bildirmişlerdir.

4.2. Alkol Fermantasyonunun Gidişi

S. carlsbergensis NCYC 1056, *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayası ile bu mayaların mitokondriyal mutantlarının kullanıldığı denemelerle ilgili olarak alkol fermantasyonunun gidişi yoğunluk ölçümleri yapılarak izlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *S. carlsbergensis* NCYC 1056, *S. cerevisiae* NCYC 1006 ve mitokondriyal mutantlarının kullanıldığı denemelerde alkol fermantasyonunun gidişi

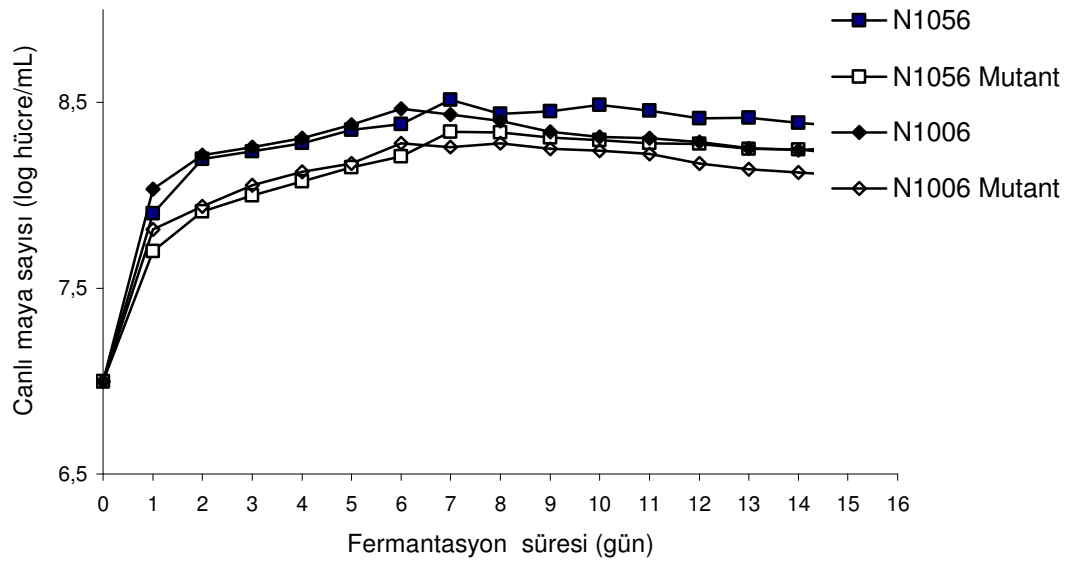
Şekil 4.1'den de görüldüğü gibi her iki bira mayası ve mutantları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde mutant maya hücrelerinde fermantasyon hızı daha yavaştır. *S. cerevisiae* NCYC 1056 mayasının kullanıldığı denemelerde alkol fermantasyonunun gidişi 2. günden sonra mitokondriyal mutantlarına göre daha hızlı

gerçekleşmiştir. Öte yandan *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayasının kullanıldığı denemede ise 1. günden sonra bu düşüş gerçekleşmiştir. Bu durum, ana maya hücrelerinin şekeri mitokondriyal mutantlara göre daha hızlı parçaladığını dolayısıyla fermantasyon hızının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Gerçekleştirilen denemelerde fermantasyon 15 günde tamamlanmıştır.

Ernandes ve ark. (1993), mitokondriyal mutantların bira kalitesi üzerine etkisini incelemişler ve böyle mutantların bira üretiminde kullanılması durumunda fermantasyon hızının azaldığını bildirmişlerdir. Pearson (1996), mitokondrinin görevini tam olarak yerine getirememesi sonucu hücre gelişiminin büyük ölçüde engellendiğini, bu durumun da mitokondriyal mutantlarda fermantasyon hızının azalmasına neden olduğunu belirtmiştir.

4.3. Bira Fermantasyonunda Mayaların Gelişimi

Alkol fermantasyonu sırasında *S. carlsbergensis* NCYC 1056, *S. cerevisiae* NCYC 1006 ve bu mayaların mitokondriyal mutantlarının kullanıldığı denemelerdeki maya gelişimi Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. *S. carlsbergensis* NCYC 1056, *S. cerevisiae* NCYC 1006 ve mitokondriyal mutantlarının kullanıldığı denemelerde maya gelişimi

Denemelerde fermantasyon boyunca ana maya sayısı mitokondriyal mutantlarına göre 1. günden itibaren daha hızlı bir şekilde artış göstererek daha yüksek değerlerde bulunmuştur. Kontrol olarak kullanılan ve ana maya hücreleri ile aşılanan örnekte ve mitokondriyal mutantında en yüksek maya sayısına sırasıyla 8.51 log hücre/mL ve 8.34 log hücre/mL olarak fermantasyonun yedinci gününde ulaşılmış ve bugünden sonra her iki denemede de maya sayısında azalma gözlenmiştir. *S. carlsbergensis* NCYC 1056 mayası kullanılan denemede fermantasyon sonunda canlı maya sayısı 8.37 log hücre/mL olarak belirlenmişken mitokondriyal mutantının kullanıldığı denemelerde 8.21 log hücre/mL olarak belirlenmiştir.

şekilden de görüldüğü gibi *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayasının ana hücreleriyle gerçekleştirilen denemelerde mutant mayaya göre canlı hücre sayısı daha yüksek bulunmuştur. Ana maya ile gerçekleştirilen denemelerde fermantasyonun altıncı gününde maya sayısı 8.46 log hücre/ml olarak en yüksek seviyeye ulaşmış ve daha sonra fermantasyonun onuncu gününden sonra maya sayısında azalma gözlenmiştir. Ancak daha sonra canlı hücre sayısında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Fermantasyon sonunda maya sayısı 8.26 log hücre/ml olarak saptanmıştır. Öte yandan mitokondriyal mutantlarla gerçekleştirilen fermantasyonlarda fermantasyonun birinci gününde maya sayısında artış başlamış ve en yüksek maya sayısına fermantasyonun altıncı gününde 8.28 log hücre/ml olarak ulaşılmıştır. Fermantasyonun yedinci gününde durgun faz başlamış ve onbirinci güne kadar devam etmiştir. Onbirinci günden sonra ise maya sayısında düşüş gözlenmiştir. Fermantasyon sonunda maya sayımı 8.10 log hücre/mL olarak bulunmuştur.

Silhankova ve ark. (1970a) ve Pearson (1996) mitokondriyal mutantlarla yaptıkları bir çalışmada mitokondriyal mutantların gelişme hızının ana maya hücrelerine göre düşük olduğunu bulmuşlardır.

4.4. Biralarm Genel Bileşimi

S. carlsbergensis NCYC 1056, *S. cerevisiae* NCYC 1006 ve mitokondriyal mutantları kullanılarak elde edilen biralarm genel bileşimi Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *S. carlsbergensis* NCYC 1056 mayası ve mitokondriyal mutandı ile elde edilen biralarm genel bileşimi

	Ana maya	Mitokondriyal mutant	S*
Yoğunluk (g/cm ³)	1.015	1.019	**
Alkol % (h/h)	4.4	3.92	*
İndirgen şeker (g/L)	2.11	2.28	**
Toplam şeker (g/L)	66.14	69.96	**
pH	4.53	4.56	ö.d
Titrasyon asitliği	2.14	2.33	*

*S: İstatiksel değerdendirmede önem seviyesi. *: %5, **: %1 önem seviyesinde ve ö.d.: önemsiz.

Çizelge 4.3. *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayası ve mitokondriyal mutandı ile elde edilen biralarm genel bileşimi

	Ana maya	Mitokondriyal mutant	S*
Yoğunluk (g/cm ³)	1.0134	1.0164	**
Alkol % (h/h)	4.32	4.03	**
İndirgen şeker (g/L)	1.68	2.22	**
Toplam şeker (g/L)	50.34	59.61	**
pH	4.60	4.51	ö.d
Titrasyon asitliği	2.43	3.02	*

*S: İstatiksel değerdendirmede önem seviyesi. *: %5, **: %1 önem seviyesinde ve ö.d.: önemsiz.

Bira üretiminde mitokondriyal mutant kullanımı % alkol miktarının azalmasına neden olmuştur. Çizelgelerden de görüldüğü gibi *S. carlsbergensis* NCYC 1056 ve *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayalarının ana hücreleri kullanılarak elde edilen biralarm alkol miktarı sırasıyla hacim olarak % 4.4 ile % 4.32 ve

mitokondriyal mutantlarla elde edilen biraların alkol miktarı %3.92 ile % 4.03 olarak daha düşük miktarlarda bulunmuştur. Ernandes ve ark. (1993), mitokondriyal mutasyon sonucu alkol üretiminin arttığını bildirmiştir. Jenkins ve ark.(2003) ise bu mutantlarla üretilen biralarda alkol üretiminin az olduğunu bildirmişlerdir.

Bira üretiminde mitokondriyal mutant kullanımı yoğunluğun artmasına neden olmuştur. Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'ten de görüldüğü gibi *S. carlsbergensis* NCYC 1056 mayası ve *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayasının ana hücreleri kullanılarak elde edilen biraların yoğunluk değerleri sırasıyla 1.015 g/cm³ ve 1.0134 g/cm³ iken bu mayaların mitokondriyal mutantları kullanılarak elde edilen biraların yoğunlukları sırasıyla 1.019 g/cm³ ve 1.0164 g/cm³'tür.

Mitokondriyal mutantların gelişme hızları daha düşük olduğu için şekeri tam olarak fermente edemezler. Bu nedenle, bu mutantlar kullanılarak elde edilen biraların şeker içerikleri ve yoğunlukları daha yüksek bulunmuştur. Silhankova ve ark. (1970b), mitokondriyal mutantlarla üretilen biralarda daha yüksek oranda şeker bulunduğunu bildirmişlerdir.

4.5. Biraların Aroma Maddeleri

Bira aromasının önemli bir kısmı mayalar tarafından etil alkol fermantasyonunda oluşturulur. Aroma maddeleri biranın tat ve kokusu üzerinde son derece önemlidir (Campbell, 1987).

S. carlsbergensis NCYC 1056 mayası ve *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayası ile bu mayaların mitokondriyal mutantları kullanılarak elde edilen biralarda belirlenen aroma maddeleri sırasıyla Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. *S. carlsbergensis* NCYC 1056 mayası ve mitokondriyal mutanıtı ile elde edilen biraların aroma maddeleri değerleri

	Ana maya	Mitokondriyal mutanıt	S*
Yüksek alkoller (mg/L)			
n-Propanol	20.40	20.23	ö.d
İzo-bütanol	18.79	19.19	ö.d
2-metil bütanol	21.18	21.39	ö.d
3-metil bütanol	52.02	37.59	**
Toplam	112.39	98.4	
Esterler (mg/L)			
Etil asetat	23.80	10.37	**
Etil bütirat	0.042	0.039	ö.d
İzo-amil asetat	0.48	0.21	*
İzo-bütıl asetat	0.89	0.86	ö.d
Etil hekzonoat	0.04	0.04	ö.d
Etil oktanoat	nd	nd	
Toplam	25.25	11.52	
Karbonil bileşikler (mg/L)			
Asetaldehit	10.15	2.26	**
Diasetil (2,3- bütanedion)	0.47	0.48	ö.d
2,3-pentaedion	0.08	0.07	ö.d
Aseton	0.94	0.87	ö.d
Toplam	11.64	3.68	
Genel toplam (mg/L)	149.28	113.6	

*S: İstatiksel değerlendirmede önem seviyesi. *: %5, **: %1 önem seviyesinde, ö.d.: önemsiz

Çizelge 4.5. *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayası ve mitokondriyal mutanı ile elde edilen biraların aroma maddeleri değerleri

	Ana maya	Mitokondriyal mutant	S*
Yüksek alkoller (mg/L)			
Propan-1-ol	22.39	25.35	ö.d
İzo-bütanol	20.88	22.61	ö.d
2-metil bütanol	23.82	23.52	ö.d
3-metil bütanol	58.37	45.89	**
Toplam	125.46	117.37	
Esterler(mg/L)			
Etil asetat	24.96	17.78	*
Etil bütirat	0.046	0.036	ö.d
İzo-amil asetat	0.72	0.43	*
İzo-bütül asetat	0.98	0.93	ö.d
Etil hekzonoat	0.033	0.033	ö.d
Etil oktanoat	0.04	nd	
Toplam	26.779	19.21	
Karbonil bileşikler (mg/L)			
Asetaldehit	6.72	3.01	*
Diasetil (2,3-bütanedion)	0.15	0.62	**
2,3-pentaedion	0.017	0.084	**
Aseton	0.99	0.93	ö.d
Toplam	7.87	4.64	
Genel toplam (mg/L)	160.110	141.22	

*S: İstatiksel değerlendirmede önem seviyesi. *: %5, **: %1 önem seviyesinde ve ö.d.: önemsiz.

S. cerevisiae NCYC 1006 mayası ve mutantının kullanıldığı denemelerde elde edilen biralardaki toplam aroma maddeleri miktarı *S. carlsbergensis* NCYC 1056 mayası ve mutantının kullanılması ile elde edilen biralardaki toplam aroma maddeleri miktarından daha yüksek bulunmuştur. Öte yandan, mitokondriyal mutasyon aroma maddelerinin üretiminde azalmaya yol açmıştır. *S. carlsbergensis* NCYC 1056 mayası ve *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayası kullanılarak elde edilen biralarda toplam aroma maddeleri miktarı sırasıyla 149.28 mg/L ile 160.110 mg/L iken bu mayaların mitokondriyal mutantları kullanılarak elde edilen biralarda bu değerler sırasıyla 113.6 mg/L ve 141.22 mg/L'dir.

Mitokondriyal mutant kullanımı bira üretiminde toplam yüksek alkol miktarında azalmaya neden olmuştur. *S. carlsbergensis* NCYC 1056 mayası ve *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayası kullanılarak elde edilen biralarda yüksek alkol miktarı sırasıyla 109.53 mg/L ile 125.46 mg/L iken bu mayaların mitokondriyal mutantları kullanılarak elde edilen biralarda bu değerler azalarak sırasıyla 98.4 mg/L ve 117.37 mg/L olarak belirlenmiştir. n-Propanol, izo-bütanol ve 2-metil bütanol miktarlarında önemli bir değişiklik olmamasına rağmen, 3-metil bütanol miktarı mitokondriyal mutantlar kullanılarak elde edilen biralarda daha düşük bulunmuştur. Good ve ark. (1993), mitokondriyal mutantlarla üretilen biralarda yüksek alkol miktarının ana maya hücreleri kullanılarak elde edilen biralara göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın, Silankova ve ark. (1970b) yaptıkları çalışmada yüksek alkol miktarının daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Pearson (1996), mitokondriyal mutasyonun yüksek alkol üretimi üzerine etkisinin maya suşuna bağlı olarak değiştiğini ve 3-metil bütanol miktarının mutasyonla hem arttığını hem de azaldığını bulmuştur.

Çizelge 4.2 ve 4.3'ten de görüldüğü gibi ana maya yerine mitokondriyal mutant kullanımı biralarda toplam ester miktarının da düşmesine neden olmuştur. *S. carlsbergensis* NCYC 1056 ve *S. cerevisiae* NCYC 1006 kullanılarak elde edilen biralarda ester miktarı sırasıyla 25.25 mg/L ile 26.778 mg/L iken bu mayaların mitokondriyal mutantları kullanılarak elde edilen biralarda bu değerler sırasıyla 11.52 mg/L ve 19.21 mg/L bulunmuştur. Öte yandan, mitokondriyal mutasyon sonucu esterlerden özellikle etil asetat ve izo-amil asetat üretiminde önemli bir

azalma olmuştur. Benzer şekilde Morrison ve Sugget (1983) yaptıkları bir çalışmada, mitokondriyal mutantlarla üretilen biralardaki ester miktarının kontrol örneğine oranla daha az olduğunu bildirmişlerdir. Ernandes ve ark. (1993) da ester üretimi ile ilgili benzer sonuçlar bildirmişlerdir. Pearson (1996), mitokondriyal mutasyon sonucu, maya suşuna bağlı olarak, etil asetat miktarının %40-50, izoamil asetat miktarınınsa %50-70 oranında azaldığını bulmuştur.

Bira üretiminde ana maya yerine bunların mitokondriyal mutantlarının kullanımı toplam aroma maddeleri, yüksek alkoller ve esterlerde olduğu gibi karbonil bileşiklerinin miktarında da azalmaya neden olmuştur. Öte yandan Çizelge 4.2 ve 4.3'den de görüldüğü gibi *S. carlsbergensis* NCYC 1056 mayası ve *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayası kullanılarak elde edilen biralarda karbonil bileşiklerinin miktarı sırasıyla 11.64 mg/L ile 7.87 mg/L iken bu mayaların mitokondriyal mutantları kullanılarak elde edilen biralarda bu değerler sırasıyla 3.68 mg/L ve 4.64 mg/L olarak elde edilmiştir.

Bu çalışmada, mitokondriyal mutantlarla elde edilen biralarda önemli bir karbonil bileşiği olan asetaldehit miktarı ana maya ile elde edilenlere göre düşük bulunmuştur. Benzer şekilde, Pearson (1996), mitokondriyal mutasyonun asetaldehit üretimi üzerine olan etkisinin maya suşuna bağlı olarak değiştiğini ve genelde asetaldehit üretiminin azaldığını bildirmiştir.

Öte yandan, birada bulunan diasetil ve 2,3-pentanedion önemli aroma bileşikleridir. Tereyağı benzeri bir aromaya sahip olan bu bileşiklerin birada düşük konsantrasyonlarda olması istenir. 2,3-Pentanedion'un biradaki algılanma eşiği yaklaşık 1 mg/L, diasetilin algılanma eşiği ise alt fermantasyon biralarda 0.07-0.2 mg/L, üst fermantasyon biralarda 0.4 mg/L'dir (Angelino, 1991; Kamimura ve Kaneda, 1992).

S. carlsbergensis NCYC 1056 mayası ve mitokondriyal mutantı kullanılarak elde edilen biralarda hem diasetil hem de 2,3-pentanedion miktarları arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Biralardaki diasetil miktarı sırasıyla 0.47 mg/L ile 0.48 mg/L olup bu değerler algılanma eşiğinin üzerindedir. 2,3-pentanedion miktarları ise sırasıyla 0.08 mg/L ile 0.07 mg/L olarak bulunmuştur. Bu değerler algılanma eşiğinden düşüktür.

Öte yandan, *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayasının mitokondriyal mutantının kullanımını diasetil ve 2,3-pentanedion miktarlarında artışa neden olmuştur. Ana maya hücreleri kullanılarak elde edilen biralardaki diasetil miktarı 0.15 mg/L, 2,3-pentanedion miktarı ise 0.017 mg/L olup algılanma eşiklerinin altındadır. Öte yandan mitokondriyal mutantlarla elde edilen biralarda diasetil ve 2,3-pentanedion değerleri sırasıyla 0.62 mg/L ile 0.084 mg/L olarak belirlenmişt ve algılanma eşiğinin üzerine çıkmıştır. Good ve ark. (1993) mitokondriyal mutantlarla üretilen biralarda diasetil miktarının ana maya ile üretilen biralardan fazla olduğunu bulmuşlardır. Benzer sonuçlar Morrison ve Sugget (1983) tarafından da bildirilmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada doğal fermantasyon ortamından izole edilen mitokondriyal mutantların bira kalitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla bir alt fermantasyon bira mayası olan *S. carlsbergensis* NCYC 1056 ve üst fermantasyon bira mayası olan *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayaları kullanılmıştır. Fermantasyon sırasında maya sayısı ve yoğunluktaki gelişme izlenmiş ve elde edilen biralarda genel bileşimleri ve aroma maddeleri belirlenmiştir.

Mitokondriyal mutantların kullanıldığı örneklerde fermantasyon süresince canlı maya miktarının ve fermantasyon hızının azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, bu mutantlarla elde edilen biralarda alkol miktarının daha az, indirgen ve toplam şeker miktarının ise daha fazla olduğu belirlenmiştir. Mitokondriyal mutasyon sonucu aroma maddelerinin oluşumu azalmıştır. Öte yandan, *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayası ve mutantının kullanıldığı denemelerde elde edilen biralardaki toplam aroma maddeleri miktarı *S. carlsbergensis* NCYC 1056 mayası ve mutantının kullanılması ile elde edilen biralardaki toplam aroma maddeleri miktarından daha yüksek bulunmuştur.

S. carlsbergensis NCYC 1056 mayası ve mitokondriyal mutanı kullanılarak elde edilen biralarda hem diasetil hem de 2,3-pentanedion miktarları arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Öte yandan, *S. cerevisiae* NCYC 1006 mayasının mitokondriyal mutantının kullanılması diasetil ve 2,3-pentanedion miktarlarında artışa neden olmuştur.

Mitokondriyal mutasyon sonucu 3-metil bütanol hariç yüksek alkollerin oluşumunda önemli bir değişiklik meydana gelmezken, etil asetat, izoamil asetat ve asetaldehit miktarı azalmıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre mitokondriyal mutantların bira fermantasyonu, dolayısıyla bira kalitesi üzerinde önemli etkileri vardır. Bu konuda yapılacak fizyolojik ve moleküler çalışmalar konuya açıklık kazandıracaktır.

KAYNAKLAR

- AEHLE, W., 2004. *Enzymes in Industry, Production and Applications*. Second Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, pp:330-331.
- AMRANE, A., PRIGENT, Y., 1996. Behaviour of the Yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* during its Autolysis, *Antonie van Leeuwenhoek*, 69:267-272.
- ANGELINO, S. A. G. F, 1991. Beer. In: *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, Eds. Henk Maarse, Marcel Dekker, Inc., New York, pp:581-616.
- ANONYMOUS, 1997. *Methods of Analysis*. The Institute of Brewing, London.
- ARDA, M., 1995. *Biyoteknoloji: Bazı Temel İlkeler*. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara.
- BAMFORTH, C.W., 2005. *Food, Fermentation and Micro-Organisms*, Blackwell Science, pp:40-88.
- BERNARDI, G., 1979. The Petite Mutation in Yeast. *Trends in Biochemical Science*, 4:197-201.
- BERRY, D. R. 1995. Alcoholic Beverage Fermentation. In: *Fermented Beverage Production*, Eds. A.G.H. Lea and J.R. Piggott, Blackie, London, pp:32-61.
- BERRY, D. R., WATSON, D. C., 1987. Production of Organoleptic Compounds. In: *Yeast Biotechnology*, Eds. D. R. Berry, I. Russell, G. G. Stewart, Allanand Unwin, London, pp:345-368.
- BERRY, D.R., SLAUGHTER, J.C., 2003. Alcoholic Beverage Fermentations, In: *Fermented Beverage Production*, Second Edition, Eds. Andrew G.H. Lea, John R. Piggott, Kluwer Academic, New York, pp: 25-39.
- BINGHAM, C.G., NAGLEY, P., 1983. A Petite Mitochondrial DNA Segment Arising in Exceptionally High Frequency in a *Mit⁻* Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 170(1):88-98.
- BRIGGS, D.E., BOULTON, C.A., BROOKES, P.A., STEVENS, R., 2004. *Brewing; Science and Practice*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 881p.
- BOEKHOUT, T., ROBERT, V., 2003. *Yeast in Food*, CRC Pres, pp:347-383.

- BOULTON, C., BOX, W., 2003. Formation and Disappearance of Diacetyl During Lager Fermentation. In: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Second Edition, Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, London, pp: 183-195.
- BROWN, C.M., CAMPBELL, I., PRIEST, F.G., 1987. Introduction to Biotechnology, London, pp:89-92.
- CABAROĞLU, T., 1995. *Nevşehir-Ürgüp Yöresinde Yetiştirilen Beyaz Emir Üzümünün ve Bu Üzümünden Elde Edilen Şarapların Aroma Maddeleri Üzerinde Araştırmalar*. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 152s.
- CAMPBELL, I., 1987. Microbiology of Brewing: Beer and Lager. In: *Essay in Agricultural and Food Microbiology*, Eds. J. R. Norris, G. L. Pettipher, John Wiley&Sons Ltd.
- CATLEY, B. J., 1988. Isolation and Analysis of Cell Walls. In: *Yeast, A Practical Approach*, Eds. I. Campbell, J. H. Duffus, IRL Press, England, 289p.
- CRUEGER W., CRUEGER, A., 1990. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Second Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 357p.
- CRUMPLEN, R.C., D'AMORE, T., RUSSELL, I., STEWART, G., 1990. The Use of Spheroplast Fusion to Improve Yeast Osmotolerance. *Journal of American Society of Brewing Chemists, Inc.*, 48: 58-61.
- DICKINSON, J.R., 2003. The Formation of Higher Alcohols. In: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Second Edition, Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, pp: 196-212.
- DUFUOR, J.P., MALCORPS, P, 1995. Ester Synthesis During Fermentation: Enzyme Characterisation and Modulation Mechanism. In: *Proceedings of the Fourth Avimore Conference on Malting, Brewing and Distilling*, Eds. I. Campbell, F.G. Priest, The Institute of Brewing, London, pp:137-151.
- DUFUOR, J.P., MALCORPS, P., SILCOCK, P., 2003. Control of Ester Synthesis During Brewery Fermentation. In: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Second Edition, Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, pp:213-233.
- ENSARİ, Y., 2002. *Moleküler Biyoloji*. Dicle Üniversitesi Basımevi Müdürlüğü; Diyarbakır.

- ERNANDES, J.R., WILLIAMS, J.W., RUSSELL, STEWART, G.G., 1993. Respiratory Deficiency in Brewing Yeast Strains- Effects on Fermentation, Flocculation and Beer Flavor Components. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 51:16-20.
- ERSOY, E., BAYSU, N., 1986. *Biyokimya*, Ders Kitabı, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, No: 408, Ankara.
- ERTEN, H., CAMPBELL, I., 2001. The Production of Low-Alcohol Wines by Aerobic Yeasts. *Journal of Insitute of Brewing*, 107(4):207-215.
- FAYEULLE, J.P., 1985. Effets de La Phase Gazeuse De Fumée De Cigarette Sur l'induction De La Mutation Mitochondriale Petite Colonie Par Le Bromure D'éthidium Chez La Levure. *Mutation Research*, 158(1-2):69-75.
- FERGUSON, L.R., DENNY, W.A., FEIGON, J., 1988. 'Petite ' Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* by A Series of 2,7-di-alkyl-substituted Derivatives of Proflavine with Differing DNA-Binding Properties. *Mutation Research*, 201(1):213-218.
- FINN, D.A., STEWART, G.G., 2002. Fermentation Characteristics of Dried Brewers Yeast: Effect of Drying Flocculation and Fermentation. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 60(3):135-139.
- FONTY, G.F., CULARD, F., BALDACCI, G., GOURSOT, R., PRUNELL, A., BERNARDI, G., 1979. The Mitochondrial Genome of Wild-type Yeast Cells VIII. The Spontaneous Cytoplasmic "Petite" Mutation. *Journal of Molecular Biology*, 134(3):493-537.
- GANCEDO, C., SERRANO, R., 1989. Energy Yielding Metabolism. In: *The Yeasts*, Second Edition, 3:206-252.
- GHOSE, T., 1984. Measurement of Cellulase Activities. *Commission on Biotechnology, International Union of Pure and Applied Chemistry*, New Delhi, India.
- GIUDICE, L.D., MASSARDO, D.R., PONTIERI, P., WOLF, K., 2005. Interaction Between Yeast Mitochondrial and Nuclear Genomes: Null Alleles of *RTG* Genes Affect Resistance to the Alkaloid Lycorine in Rho⁰ Petites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 354:9-14.

- GOOD, L., DOWHANICK, T.M., ERNANDES, J.E., RUSSELL, I., STEAWART, G.G., 1993. Rho⁻ Mitochondrial Genomes and Their Influence on Adaptation to Nutrient Stress in Lager Yeast Strains. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 51(1): 35-39.
- GÖK, İ., 1998. Yield and Kinetics of Riboflavin Production by *Assbya Gossypii*. *Master Thesis*, Institute of Natural and Applied Sciences, Gaziantep University, Gaziantep.
- GÖKALP, H.Y., CERTEL, M., NAS, S., 1992. *Biyokimya-1, Temel Yapılar ve Kavramlar*, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Erzurum.
- GREEN, P.J., 2002. *Introduction to Food Biotechnology*, CRC Pres, pp:182-195.
- GROTH, C., PETERSEN, R.F., PI, J., 2000. Diversity in Organization and the Origin of Gene Orders in the Mitochondrial DNA Molecules of the Genus *Saccharomyces*. *Molecular Biology and Evolution*, 17:1833-1841.
- GUIDO, L.F., RODRIGUES, P.G., RODRIGUES, J.A., GONCALVES, C.R., BARROS, A.A., 2003. The Impact of the Physiological Condition of the Pitching Yeast on Beer Flavour Stability: An Industrial Approach-Food Chemistry, 87(2004):187-193.
- GÜVENÇ, A., KAPUCU, N., MEHMETOĞLU, Ü., 2002. The Production of Isoamyl Acetate Using Immobilised Lipases in a Solvent-Free System. *Process Biochemistry*, 38:379-386.
- GYLLANG, H., MARTINSON, E., 1971. Properties of Some Spontaneous Mutants from Brewers Yeast with Increased Sedimentation Rate. *Proceedings of European Brewery Convention*, Estoril, pp: 265-271.
- HAMMOND, J., 1996 (a). Modern Biotechnology-Its Impact on the Future Of Cereal-Based Alcoholic Beverages. In: *Brewing Technology, The Market and The Environment- Proceedings of the Sixth International Brewing Technology Conference*, Eds. J.A. Irvine, R.V. Wenn, Brewing Technology Services, Surrey, pp:91-104.
- HAMMOND, J.R.M., 1996 (b). Yeast Genetics. In: *Brewing Microbiology*, Second Edition, Eds. F.G. Priest, I. Campbell, Chapman & Hall, London, pp: 43-75.

- HAMMOND, J.R.M., PYE, J., 1996. Acetate Ester Synthesis: The Role Of Alcohol Acetyl Transferase. In: *Brewing Technology, The Market and the Environment-Proceedings of the Sixth International Brewing Technology Conference*, Eds. J.A. Irvine, R.V. Wenn, Brewing Technology Services, Surrey, pp:421-430.
- HELLER, K.J., 2003. *Genetically Engineered Food, Methods and Detection*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp: 72-74.
- HENSCHKE, P.A., JIRANEK. V., 1993. Yeasts-Metabolism of Nitrogen Compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*, Ed. G.M. Fleet, Harword, Chur, pp:77-164.
- HOUGH, J. S., BRIGGS, D. E., STEVENS, R., YOUNG, T. W., 1982. *Malting and Brewing Science, Volume II. Hopped Wort and Beer*, Second Edition, Chapman and Hall, London, 914p.
- HOUSHMOND, M., 1999. *Mitochondrial DNA Mutations, Pathogenicity and Inheritance*. Göteborg University, Institute of Laboratory Medicine, Department of Curical Chemistry and Transfusion Medicine, Göteborg, Sweden.
- ISERENTANT, D., 2003. Beers: Recent Technological Innovations in Brewing. In: *Fermented Beverage Production*, Second Edition, Eds. Andrew G.H. Lea, John R. Piggott. Kluwer Academic, New York, pp. 41-58.
- JENKINS, C.L., KENNEDY, A.I., THURSTON, P., HODGSON, J.A., SMART, K.A., 2003. Serial Repitching Fermentation Performance and Functional Biomarkers. In: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Second Edition, Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, pp: 257-271.
- JEUNCHOMME, C.R., DEWERCHIN, M., CARLIER, A., MASSCHELEIN, C.A., 1985. The Potential of Lager Yeast Mitochondrial DNA in the Production of Diacetyl Negative Mutants. *European Brewery Convention Congress*, pp: 283-290.
- JONES, K.L., 1985. Adaptation of Fermentative Organisms to Alcoholic Environments. In: *Alcoholic Beverages*, Eds. G.G. Birch, M.G. Lindley, Elsevier Applied Science, London and New York, pp: 171-177.

- KAMIMURA, M., KANEDA, H., 1992. Off-flavours in Beer. In: *Off-flavour in Foods and Beverages*, Ed. George Charalambous, Development in Food Science, Elsevier, Tokyo, 28:433-472.
- KENNEDY, A.I., TAIDI, B., AITCHISON, A., GREEN, X., 2003. Management of Multi-Strain, Multi-Site Yeast Storage and Supply. In: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Second Edition, Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, pp: 131-137.
- LEE, B.H., 1996. *Fundamentals of Food Biotechnology*. VCH Publishers, Inc., pp: 190-196.
- LEWIS, J.M., YOUNG, T.W., 1995. *Brewing*, Chapman and Hall, London, 252p.
- LYNESS, C.A., STEWART, G.G., STEELE G.M., 1996. Investigating Ester Synthesis in Distilling and Brewing Strains of Yeast. In: *Brewing Technology, The Market and the Environment-Proceedings of the Sixth International Brewing Technology Conference*, Eds. J.A. Irvine, R.V. Wenn, Brewing Technology Services, Surrey, pp: 390-398.
- MOLL, M., 1991. *Beers & Coolers; Definition, Manufacture, Composition*. Intercept Ltd., Andover, 495p.
- MOLL, M., BLAUWE, J.J.D., 1994. *Beers & Coolers-Definition, Manufacture, Composition*. Intercept, Andover, 495p.
- MOONJAI, N., VERSTREPEN, K.J., DELVAUX, F.R., DERDELINCKX, G., VERACHTERT, H., 2003. Unsaturated Fatty Acid Supplementation of Stationary-Phase Brewing Yeast and Its Effects on Growth and Fermentation Ability. In: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Second Edition, Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, pp: 110-119.
- MORRISON, K.B., SUGGETT, A., 1983. Yeast Handling, Petite Mutants and Lager Flavour. *European Brewery Convention Congress*, London, pp:489-496.
- MURPHY, M., CHOO, K.B., MACREADIE, I., MARZUKI, S., LUKINS, H.B., NAGLEY, P., LINNANE, A.W., 1980. Biogenesis of Mitochondria: A Temperature Sensitivity Mutation Affecting the Mitochondrially

- Synthesized Var1 Protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 203(1):260-270.
- NETTER, P., ROBINEAU, S., 1989. The Differential Overamplification of Short Sequences in the Mitochondrial DNA of *Rho*⁻ Petites in *Saccharomyces cerevisiae* Stimulates Recombination, *Gene*, 83(1):25-38.
- NEWLON, C.S., 1989. Deoxyribonucleic Acid Organization and Replication. In: *The Yeasts; Metabolism and Physiology*, Second Edition, Eds. A.H. Rose, J.S. Harrison, Academic Pres, London, 3:102-105.
- NYKÄNEN, L., SUOMALAINEN, H., 1983. *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages*, Dordrecht: D. Reidel.
- OZBAN, N., 1982. *Hücre, Sitoloji Ders Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, no: 172, ss: 77-89.
- ÖZDAMAR, K. 1999. *Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi*, Kaan Kitapevi, Eskişehir, 535s.
- PAMİR, M. H., 1985. *Fermentasyon Mikrobiyolojisi*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 936, Ankara, 328s.
- PEARSON, S., 1996. Fermentation with Petite Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Honours Project, Heriot-Watt University, 47p.
- PEDDIE, H.A.B., 1990. Ester Formation in Brewery Fermentations. *Journal of Institute of Brewing*, 96:327-331.
- POLI, P., BUSCHINI, A., CANDI, A., ROSSI, C., 1999. Bleomycin Genotoxicity Alteration by Glutathione and Cytochrome P-450 Cellular Content in Respiratory Proficient and Deficient Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis*, UK Environmental Mutagen Society, Oxford University Press, 14(2): 233-238.
- POTTER, N.N., HOTCHKISS, J.H., 1995. *Food Science*, Fifth Edition. Chapman and Hall, London, pp: 442-445.
- PRENTIS, S., 1985. *Biotechnology: A New Industrial Revolution*, Obris, London.
- QUAIN, D.E., DUFFIELD, M.L., 1985. A Metabolic Function for Higher Alcohol Production by Yeast. *European Brewery Convention Congres*, pp: 307-314.

- RASMUSSEN, A.K., CHATTERJEE, A., RASMUSSEN, L.J., SINGH, K.K., 2003. Mitochondria-Mediated Nuclear Mutator Phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Researchs*, 31(14):3909-3917.
- RATLEDGE, C., EVANS, C.T., 1989. Lipids and their Metabolism. In: *The Yeasts; Metabolism and Physiology*, Second Edition, Eds. A.H. Rose, J.S. Harrison, Academic Pres, London, 3: 378-379.
- RATLEDGE, C., WYNN, J.P., 2000. Understanding Microbial Obesity. *SIM News, The Official News Magazine of the Society for Industrial Microbiology*, 50 (4):181-185.
- ROJAS, V., GIL, J.V., PIÑAGA, F., MANZANARES, P., 2001. Studies on Acetate Ester Production by Non- *Saccharomyces* Wine Yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 70:283-289.
- RUSSELL, I., 1995. Yeast. In: *Handbook of Brewing*, Ed. Marcel Dekker, pp: 169-202.
- SAKAKI, K., TASHIRO, K., KUHARA, S., MIHARA, K., 2003. Response of Genes Associated with Mitochondrial Function to Mild Heat Stress in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biochemistry*, 134(3):373-384.
- SCHEFFLER, I.E., 2001. Mitochondrion, *Mitochondria*, Ed. Keshav K. Singh, 1(1):6-18.
- SILHANKOVA, L., SAVEL, J., MOSTEK, J., 1970 (a). Respiratory Deficient Mutants of Bottom Brewer's Yeast. I. Frequencies and Types of Mutant in Various Strains. *Journal of the Institue of Brewing*, 76: 280-288.
- SILHANKOVA, L., MOSTEK, J., SAVEL, J., SALINOVA, H., 1970 (b). Respiratory Deficient Mutants of Bottom Brewer's Yeast. II. Technological Properties of Some RD Mutants. *Journal of The Institue of Brewing*, 76:289-295.
- STEWART, G. G., RUSSELL, I., 1998. *Brewing Science and Technology- Brewers Yeast*, The Institute of Brewing, London.
- STUART, G.R., SANTOS, J.H., STRAND, M.K., HOUTEN, B.V., COPELAND, W.C., 2005. Mitochondrial and Nuclear DNA Defects in *Saccharomyces*

- cerevisiae* with Mutations in DNA Polymerase Associated with Progressive External Ophthalmoplegia, *Human Molecular Genetics*, 15(2):363-374.
- ŞAHİN, İ., 1995. *Endüstriyel Mikrobiyoloji*, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları, No:64, Bursa, 151s.
- THIEMAN, W.J., PALLADINO, M.A., 2004. *Introduction to Biotechnology*, Pearson, Benjamin Cummings, pp: 45-49.
- TUCKER, G.A., WOODS, L.F.J., 1995. *Enzymes in Food Processing*, Second Edition, Blackie Academic & Professional, London, pp: 228-232.
- TUITE, M.F., 1989. Protein Synthesis. In: *The Yeasts: Metabolism and Physiology*, Second Edition, Eds. A.H. Rose, J.S. Harrison, Academic Press, London, 3:194-199.
- TÜRKER, İ., CANBAŞ, A., 2001. *Malt ve Bira Teknolojisi*, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Genel Yayın No : 4, Ders Kitapları Yayın No : A-2, Adana, 300s.
- WAITES, M.J., MORGAN, N.L., ROCKEY, J.S., HIGTON, G., 2001. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Blackwell Science Ltd. London. 288p.
- WALKER, G.M., 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*, John Wiley & Sons, 321p.
- WALKER, G., 2004. The 4th Brewing Yeast Fermentation performance Congress, *FEMS Yeast Research*, 4 (4-5): 567-570.
- VARNAM, A.H., SUTHERLAND, J.P., 1994. *Beverages; Technology, Chemistry and Microbiology*. Chapman and Hall, London, 2: 296-352.
- VERSTREPEN, K.J., DERDELINCKX, G., DUFOUR, J-P., WINDERICKX, J., THEVELEIN, J.M., PRETORIUS, I.S., DELVAUX, F.R., 2003 (a). Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2):110-118.
- VERSTREPEN, K.J., MOONJAI, N., BAUER, F.F., DERDELINCKX, G., DUFOUR, J.P., WINDERICKX, J.M., THEVELEIN, J.M., PRETORIUS, I.S., DELVAUX, F.R., 2003 (b). Genetic Regulation of Ester Synthesis in Yeast: New Facts, Insights and Implications for the Brewer. In: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Second Edition, Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, pp: 234-247.

- VERSTREPEN, K.J., ISERENTANT, D., MALCORPS, P., DERDELINCKX, G., DIJCK, P.V., WINDERICKX, J., PRETORIUS, I., THEVELEIN, J., DELVAUX, F.R., 2004. Glucose and Sucrose: Hazardous Fast-Food for Industrial Yeast?. *Trends in Biotechnology*, Elsevier, 22(10):531-536.
- YOUNG, T.W., 1996. The Biochemistry and Physiology of Yeast Growth, In: *Brewing Microbiology*, Eds. F.G. Priest and I. Campbell, Chapman and Hall, London, pp: 13-42.
- YOUNIS, O.S., STEWART, G.G., 1998. Sugar Uptake and Subsequent Ester and Higher Alcohol Production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Insitute of Brewing*, 104:255-264.
- YÜREĞİR, G.T., 1985. *Temel Biyokimya*, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Adana'da doğmuşum. İlk ve orta öğrenimimi bu şehirde tamamladım. 1998 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimime başladım ve 2002 yılında mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimime başladım. 2004-2005 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Merkezi Kafeterya Yemekhanesinde çalıştım. Halen özel bir şirkette gıda mühendisi olarak çalışmaktayım.