

ÖZET

C5 ŞEKER İÇEREN BİR ALTLIK ÜZERİNDE BİYOKÜTLENİN ÜRETİLMESİNE YÖNELİK MAYA SUŞLARI

5

Mevcut buluş, endüstriyel maya üretimi ile uyumlu bir çoğalma hızı ve oranına sahip en az bir C5 şeker içeren bir altlık üzerinde çoğalmaya uygun olan yeni *Saccharomyces cerevisiae* maya suşları ile ilgilidir. Buluş aynı zamanda kültürün bir uygulama etkinliğine, başka bir ifadeyle tatmin edici bir etkinliğe sahip olan mayaların elde edilmesine olanak sağladığı yeni suşlar ve bunların ekmek yapımı, biyokütle üretimi, aroma üretimi, ikincil metabolitlerin üretimi, protein üretimi, etanol üretimi, bira yapımı, şarap yapımı veya maya özütü üretimi gibi endüstriyel bir uygulamada kullanılmaları ile ilgilidir.

10

İSTEMLER

1. En az bir C5 şekeri içeren bir altlık üzerinde aerobik koşulda çoğalmaya uygun olan *saccharomyces* cinsinde maya suşu olup; ksiloz üzerinde bir büyüme testini karşılaması ile veya CP ortamı üzerinde bir büyüme testini karşılaması ile ve genomunda pentozlar yoluyla RPE1, RKI1, TKL1 ve TAL1 genlerinin deregüle edilmesi, bir aldoz redüktazı kodlayan GRE 3 geninin kopyaları silinmesi, XKS1 doğal geninin aşırı eksprese edilmesi, bir ksiloz dehidrojenazı kodlayan bir *Pichia Stipitis* geninin en az bir kopyası dahil edilmesi ve bir ksiloz izomerazı kodlayan bir genin en az bir kopyası dahil edilmesi,
burada CP ortamı üzerinde büyüme testinin, 10 g/kg EXL tipi J100 ve 10 g/kg bakteopeptonun yanı sıra, 100 g/kg sakkaroz içeren 50 mL'lik bir CP kültür ortamı barındıran bir çözeltinin bulanıklığının gelişiminin 600 nm'lik bir dalga boyunda spektrofotometri ile zaman içinde takip edilmesinden oluşması söz konusu ortamda, 150 rpm'lik sabit karıştırma altında 30°C'de 10⁸ test edilecek hücre ile inoküle edilmesi ve burada CP ortamı üzerinde söz konusu büyüme testinin, optik yoğunluk gelişimi 3,5 ve 7,5 saat arasında üssel olduğu zaman karşılanması ile karakterize edilmektedir.
2. Ksiloz izomerazı kodlayan genin, *Clostridium* ve tercihen *Clostridium phytofermentans* cinsinde bakterilerden elde edilmesi ile karakterize edilen, İstem 1'e göre suş.
3. Bir ksiloz üzerinde büyüme testini karşılaması ile ve bir CP ortamı üzerinde büyüme testini karşılaması ile karakterize edilen, önceki istemlerden birine göre suş.
4. *Saccharomyces* ve tercihen *Saccharomyces cerevisiae* cinsinden seçilen önceki istemlerden birine göre suş.
5. Bir kurutma testini karşılaması ile karakterize edilen, İstemler 1 ile 4'ten herhangi birine göre suş.
6. Referans niteliğindeki uygulama etkinliğinin en az %80'ine eşit, tercihen en az %95'ine eşit ve daha tercihen en az %105'ine eşit oranda bir uygulama etkinliğine (EA) sahip olması ile karakterize edilen, İstemler 1 ile 5'den herhangi birine göre suş.
7. Uygulama etkinliğinin fermantatif kuvvet, yaşayabilirlik; biyokütle, aroma, ikincil

metabolit, protein, RNA veya etanol üretme verimini içeren gruptan seçilmesi **ile karakterize edilen**, İstem 6'ya göre suş.

5 **8.** Ekmek yapımına yönelik bir maya suşu olan, İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre maya suşu.

10 **9.** Uygulama etkinliğinin fermantatif kuvvet olduğu ve 20 g undan 2 saatte 100 mL CO₂ oranında olan referans niteliğindeki fermantatif kuvvetin en az %95'ine eşit olduğu, İstem 8'e göre suş.

15 **10.** CNCM'de no.I-4670 altında 23 Ağustos 2012 tarihinde depolanan, İstem 9'a göre maya suşu.

20 **11.** CNCM'de no.I-4671 altında 23 Ağustos 2012 tarihinde depolanan, İstem 9'a göre maya suşu.

25 **12.** Ekmek yapımında biyokütle üretimi, aroma üretimi, ikincil metabolitlerin üretimi, protein üretimi, RNA üretimi, etanol üretimi veya maya özütü üretimi arasından seçilen endüstriyel bir uygulamada, İstemler 1 ila 11'den herhangi birine göre tanımlandığı üzere suşların kültürlenmesi ile elde edilen mayaların kullanılması

30 **13.** İstemler 1 ila 11'den birine göre bir suştan, en az bir C5 şekeri içeren bir altı üzerinde aerobik "Fed Batch" maya üretim yöntemi.

35 **14.** Ekmek yapımında biyokütle üretimi, aroma üretimi, ikincil metabolitlerin üretimi, protein üretimi, RNA üretimi, etanol üretimi, bira yapımında şarap yapım veya maya özütü üretimi arasından seçilen endüstriyel bir uygulamada, İstem 13'e göre yöntem doğrultusunda üretilen mayaların kullanılması

40 **15.** Söz konusu C5 altı en az bir C6 şeker içermesi **ile karakterize edilen**, İstemler 1 ila 11'den herhangi birine göre suş veya İstem 13'e göre yöntem.

45 **16.** C5/C6 şeker oranı 0,1 ve 2 arasında bulunması **ile karakterize edilen**, İstem 15'e göre suş veya yöntem.

17. C5 şekerin ksiloz olması **ile karakterize edilen**, İstem 15'e veya İstem 16'ya göre suş veya yöntem.

5 **18.** C6'lar $\square$ glukoz, fruktoz, galaktoz, mannoz arasından seçilmesi veya sakkaroz, meltoz, trehaloz veya izomaltoz gibi disakkarit bozunmasından elde edilmesi **ile karakterize edilen**, İstemler 15 ila 17'den herhangi birine göre suş veya yöntem.

TARİFNAME

C5 ŞEKER İÇEREN BİR ALTLIK ÜZERİNDE BİYOKÜTLENİN ÜRETİLMESİNE YÖNELİK MAYA SUŞLARI

5

Teknik alan:

Mevcut buluş, biyokütle üretimi, özellikle maya üretimi alanı ile ilgilidir. Buluş, en az bir C5 şekeri içeren bir altlık üzerinde mayaların üretilmesi ile ve daha özellikle lignoselülozik malzemelerin hidrolizinden elde edilen bir altlık üzerinde mayaların üretilmesi ile ilgilidir. Buluş aynı zamanda ekmek yapma, biyokütle üretimi, aroma üretimi, ikincil metabolitlerin üretimi, protein üretimi, RNA üretimi, etanol üretimi, bira yapma veya maya özütü üretimi gibi maya endüstrisi için uygulamalarda üretilen mayaların kullanılmasına ilgilidir.

10

15

Önceki teknik:

Aerobik solunum süreci ile çoğalma için mayaların aşağıdakilere ihtiyaçları bulunmaktadır

- karbon ve enerji kaynağı olarak karbonlu bileşikler,
- amonyum formunda indirgenmiş azotlu bileşikler, bununla birlikte bazı mayalar proteinlerin ve nükleik asitlerin sentezi için organik veya oksitli bileşikleri (örneğin nitratlar gibi) kullanabilmektedir,
- çeşitli mineral elementleri, vitaminler ve mayalara göre değişen büyüme faktörleri.

20

25

Mayanın örneğin karbonlu altlık olarak fruktoz şurubu veya glukoz şurubu ve azot ve fosfat kaynakları olarak amonyum ve fosfor tuzları bazı belirli bir bileşim ortamı üzerinde üretilmesi durumunda kültür ortamı mineral tuzları, vitaminler ve oligoelementler oranı tarafından tamamlanmalı ve bu üretimi karmaşık ve pahalı hale getirebilmektedir.

30

Pancar ve şeker kamışından üretilen şeker melasları şeker (glukoz ve fruktoz), organik bileşikler ve mineral bileşiklerinden oluşmaktadır. Bu nedenle bu melaslar ekonomik ve teknik açılarından seçilen altlıklardır ve günümüzde mayaların endüstriyel olarak üretimi için kullanılan ana ham maddedir.

35

Bununla birlikte şeker kamışı ve pancar melasları, özellikle biyoetanol üretimi için masif

kullanılmaları bağli olarak seyrekleşmesi bu üretim türünü tehlikeye sokmaktadır. Melaslar tarafından sağlanan sakkaroz ikameli yeni karbonlu altlıkların bulunması gerekmektedir.

5 Bununla birlikte endüstriyel biyoetanol, özellikle de ikinci jenerasyon biyoetanol üretimi diğer fermantasyon altlıkları kaynakları uygunluğunu açığa çıkarmaktadır. Nitekim ikinci jenerasyon biyoetanol endüstrisi, bitkilerden türetilen lignoselülozik malzemeler kullanmaktadır. Bitkisel olanların büyük çoğunluğunu oluşturan bu malzemeler selüloz, hemiselüloz ve linyinden oluşmaktadır. Hidrolizden sonra bu lignoselülozik malzemeler C6 (6 karbon atomu) ve C5 (5 karbon atomu) şekerlerinin bir karışımını vermektedir.

10

Mayaların tümü C6 şekerler metabolize edebilmektedir, buna karşın ve genel olarak C5 şekerler, *Saccharomyces*, özellikle *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) cinsinde mayalar tarafından düşük oranda fermente edilebilmektedir, hatta hiç edilememektedir.

15 İkinci jenerasyon biyoetanol üretimine ilişkin yakın zamandaki literatür, C5 şekerleri fermente etmeye uygun hale getirilmeleri için modifiye edilmiş Sc mayaları açıklamaktadır. Bu dokümanlar arasından örnek olarak başvuru sahibi adına ait olan WO 2011/128552 ve WO 2012/72793 numaralı patent dokümanlarından bahsedilebilmektedir.

20 WO 2011/128552 numaralı patent dokümanı bir Ksiloz redüktaz (XR) kodlayan bir gen ve bir Ksiloz dehidrojenaz (XDH) kodlayan bir genin suş genomuna dahil edilmesini içeren genetik modifikasyona yönelik bir yöntem ile elde edilen bir maya suşunu açıklamaktadır.

25 WO 2012/72793 numaralı patent dokümanı ise bir kodlayan izomerazı kodlayan bir ekzojen geninin bir kopyasını suşun genomuna dahil edilmesini içeren bir yöntem ile elde edilmektedir; söz konusu gen tercihen *Clostridium phytofermentans*'tan ve bir dehidrojenaz ksilitolü kodlayan bir genin en az bir kopyasından elde edilmektedir, söz konusu gen *Pichia stipitis*'ten elde edilmektedir.

30 Attfield ve ark.'a ("Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source", Fems Yeast research, Wiley-Blackwell Publishing LTD, GB, NL, cilt. 6, no. 6, Eylül 2006, sayfalar 862-868) ait makale tek karbon kaynağı olarak ksiloza sahip olan aerobik koşullarda çoğalmaya uygun, rekombinant olmayan suşların üretilmesini açıklamaktadır.

35

Bu dokümanlarda açıklanan suşların bir C5 şekeri içeren bir altı üzerinde çoğalabilmelerine rağmen, mevcut buluş sahipleri bir C5 şekerinden oluşan veya bunu içeren bir altı üzerinde çoğalma hızını düşük oranda kaldırmış ve herhangi bir durumda endüstriyel bir maya üretimi için uygun olmadığını ortaya koymuştur.

5

Üstelik buluş sahipleri, örneğin ekmek yapma ilişkin fermantasyon mayalar veya maya özütlerinin üretimi için tasarlanan mayalar, vs. gibi nihai endüstriyel kullanımlarında, bu şekilde elde edilen mayaların modifiye edilmemiş kökenli suşlardan elde edilen mayaların etkinliğine göre düşük bir etkinlik sergilediğini de ortaya koymuştur.

10

Dolayısıyla ekonomik ve endüstriyel kullanımla uyumlu maya üretimi ve verimlerine sahip, karbonlu altı olarak C6 şekerlerinin tamamen veya kısmen değiştirilmesine olanak sağlayan mayaların üretilmesine yönelik yeni suşlara yönelik gerçek bir ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bu tür suşların kültürü, endüstriyel olarak kullanılmaları sırasında ilgi çekici ve tatmin edici bir etkinlik sergileyen mayalar vermek zorundadır.

15

Buluşun kısa açıklaması

Mevcut buluş, endüstriyel maya üretimi ile uyumlu bir çoğalma hızına ve oranına sahip en az bir C5 şekeri içeren bir altı üzerinde çoğalmaya uygun olan yeni Sc maya suşları ile ilgilidir.

20

Buluş aynı zamanda kültürün bir uygulama etkinliği, başka bir ifadeyle nihai endüstriyel kullanımlarında tatmin edici olan, başka bir ifadeyle referans niteliğinde uygulama etkinliğinin en az %80'ine, tercihen %95'ine eşit ve daha tercihen %105'ine eşit olan bir etkinlik sergileyen mayaların elde edilmesine olanak sağladığı yeni suşlar ile ilgilidir.

25

Buluşun bir başka amacı ekmek yapma, biyokütle üretimi, aroma üretimi, ikincil metabolitlerin üretimi, protein üretimi, RNA üretimi, etanol üretimi, bira yapma, şarap yapma veya maya özütü üretimi arasından seçilen endüstriyel bir uygulamada, buluş yöntemi ile elde edilen mayaların ve/veya yeni mayaların kullanılmasıdır.

30

Şekillerin kısa açıklaması

Şekil 1, örnek 1'deki PCR analizinin sonucudur. Jelin sol kısmında belirtilen değerler, baz çiftleri olarak belirtilen, boy işaretlerinin DNA fragmentlerinin boylarına karşılık

35

gelmektedir (kısım 1). Kısımlar 2 ila 5 ise sırasıyla X10S1, X10S2, Kontrol Mat a ve Kontrol Mat alfaya karşı gelmektedir.

5 Şekil 2, CP ortamında 150 rpm'de (dakikada devir sayısı) ve 30°C'de kültürlenme süresine (saat cinsinden verilmiştir) göre Log 10(DO_{lambda = 600 nm}) cinsinden ifade edilen ortam bulanıklığının gelişimini gösteren bir grafikdir.

10 Şekil 3, bir YFX ortamında 150 rpm'de ve 30°C'de, saat cinsinden verilen kültürlenme süresine göre 600 nm'lik bir dalga boyunda, DO cinsinden ifade edilen ortam bulanıklığının gelişimini gösteren bir grafikdir.

Şekil 4, dakika cinsinden verilen süre içinde normal hamurda dakika başına MI cinsinden verilen gaz salınımını gösteren bir grafikdir.

15 **Buluşun ayrıntılı açıklaması:**

Mevcut buluş, en az bir C5 şeker içeren bir altı üzerinde çoğalmaya uygun olan yeni bir maya suşunu amaçlamakta olup; bir ksiloz üzerine büyüme testini karşılaması ile veya CP ortamı üzerinde büyüme testini karşılayacak şekilde maksimal bir çoğalma hızına sahip olması ile karakterize edilmektedir.

Ksiloz üzerinde büyüme testi:

25 Bu test, 150 rpm'lik sabit karıştırma altında 30°'de 10⁸ test edilecek suş hücreleri ile inoküle edilen YFX kültür ortamından 50 mL oranında barındıran bir çözeltilinin bulanıklığının gelişiminin 600 nm'lik dalga boyuna sahip bir spektrofotometri ile zaman içinde takip edilmesinden oluşmaktadır. Test, 24 saatte Optik Yoğunluk (DO) 2'nin üzerinde ve 48 saatte en az 3, tercihen en az 10 olduğu zaman karşılanmaktadır.

30 YFX ortamı aşağıda belirlendiği şekildedir:

YFX	g/kg	mL
Yeterli miktarda damlatılmış su	1000	
Ksiloz	70	
EXL tipi J	5	

DAP	4,7	
Sitrik asit	11,4	
Trisodik sitrat	13,5	
ZnSO ₄ (10,6 g/L)		2
MgSO ₄ 7H ₂ O (400 g/L)		2,5
Tiyamin Vit B1(18,24 g/L)		1
Piroksidin Vit B6 (5,28 g/L)		1
Biyotin (1,76 g/L) + KOH		1
Pantotenat (3,8 g/L)		1
Nikotinik asit (4 g/L)		4
Mezoinositol (50 g/L)		1
Riboflavin (1 g/L)		1
Para aminobenzoat (1,2 g/L)		1
Tween 80		1

CP ortamı üzerinde büyüme testi:

Bu test, 10 g/kg EXL tipi J100 (Biospringer) ve 10 g/kg baktepeptonun yanı sıra, 100 g/kg sakkaroz içeren 50 mL'lik bir CP kültür ortamı barındıran bir çözeltinin bulanıklığının gelişiminin 600 nm'lik bir dalga boyunda spektrofotometri ile zaman içinde takip edilmesinden oluşmaktadır. söz konusu ortam, 150 rpm'lik sabit karıştırma altında 30°'de 10⁸ test edilecek hücre ile inoküle edilmektedir. Test, DO gelişimi 3,5 ve 7,5 saat arasında üssel olduğu zaman karşılanmaktadır. DO gelişimini temsil eden denklem $DO_{tf} = DO_{ti} e^{n(tf-ti)}$ formundadır, burada n 0,35 ve 0,9 arasında, tercihen 0,45 ve 0,80 arasında ve tercihen 0,65 ve 0,75 arasında bulunmaktadır.

Avantajlı bir yapılandırma biçimine göre buluşa göre suşlar hem ksiloz üzerinde büyüme testini hem de CP ortamı üzerinde büyüme testini karşılamaktadır.

15

Buluşa göre maya suşu *Saccharomyces* ve tercihen *Saccharomyces cerevisiae* cinsinden seçilmektedir.

Buluşa göre C5 şeker ile 5 karbon atomu içeren bir oz veya pentoz anlaşılmaktadır. C5 şeker arabinoz, ksiloz ve bunların karışımları içeren grup içinden seçilmektedir. Tercihen C5 şeker ksilozdur.

20

Buluşa göre en az bir C5 şeker içeren altı ayrı en az bir C6 şeker, başka bir ifadeyle 6

karbon atomu barındıran bir oz veya heksoz içermektedir. C6 şeker glukoz, fruktoz, galaktoz, mannoz arasından seçilmektedir veya sakkaroz, meltoz, trehaloz veya izomaltoz ve bunların karışımları gibi disakkarit bozunmasından elde edilmektedir.

- 5 Tercihen buluş altlığı, 0,1 ve 2 arasında bulun bir C5/C6 oranı ile en az bir C5 şeker ve en az bir C6 şeker içermektedir.

- 10 Buluşa göre suşların çoğalmasıyla elde edilen mayalar ekmek yapımı, biyokütle üretimi, aroma üretimi, ikincil metabolitlerin üretimi, protein üretimi, etanol üretimi, bira yapımı, şarap yapımı veya maya özütü üretimi arasından seçilen endüstriyel uygulamalarda faydalı performanslar sergilemektedir. Başka bir ifadeyle buluşa göre suşların kültürlenmesi ile elde edilen mayalar amaçlanan nihai endüstriyel kullanımda etkilidir. Bu etkinlik mevcut başvuru dokümanında "uygulama etkinliği" olarak adlandırılmaktadır.

- 15 Hedeflenen endüstriyel kullanımların tümü için, buluş suşların kültürlenmesi ile elde edilen mayaların kurutmada bozunmaması gerekmektedir, yani mayaların %20'den azı kurutmadan sonra inaktiftir.

- 20 Özel bir yapılandırma biçimine göre buluşa göre suşlar, aşağıdaki kurutma testini karşılayacak şekildedir:

Kültürlemeden sonra elde edilen biyokütle, %18-22 oranında kuru özüt ("maya kreması") içeren maya konsantre süspansiyonunun elde edilmesi için isteğe bağlı olarak yıkama aşamalarının kullanılması suretiyle santrifüj ile ortamdan ayrılmaktadır.

- 25 Bu süspansiyon, %28-34 oranında kuru özüt içeren bir hamursu kütlenin ("preslenmiş maya") elde edilmesi için filtreleme ile bir dehidrasyon aşamasına tabi tutulmaktadır.

- 30 Bu kütle daha sonra akışkan yataklı bir kurutucu içinde sıcak hava akışı ile kurutulan, 0,2 ila 2 mm'lik çapa sahip olan ince şeritlerin (erişteler) elde edilmesi için bobinaj işlemine (kalıptan çekme) tabi tutulmaktadır.

Kurutma koşulları (sıcaklık baremi), ürünün sıcaklığının 50°'nin altında olması için kat bir şekilde kontrol edilmektedir. İnce eriştelere formunda bulunan nihai kuru maya en az %95 oranında kuru özüte sahiptir.

- 35 Kuru mayanın hücrelerinin yaşayabilirliğinin iyileştirilmesi için mayaya (süspansiyon veya

preslenmiş maya) %0,2 ila 2 oranında yükseklikte emülsifiye edici maddeler olarak koruma etkili katkı maddeleri eklenebilmektedir ve bunlar arasında sorbitan monostearat (MSS) sıkı sıkıya kullanılan standart bir katkı maddesidir.

- 5 Suşlar, kurutmadan sonra yaşayan mayaların sayısını kurutmadan önce yaşayan mayaların en az %80'ine eşit olması durumunda testi karşılamaktadır

Bir başka yapılandırma biçimine göre buluşa göre suş, referans niteliğindeki uygulama etkinliğinin en az %80'ine eşit, tercihen en az %95'ine eşit ve daha tercihen en az %105'ine eşit oranda bir uygulama etkinliği (EA) sahiptir. Mevcut buluş kapsamında suşların bir uygulama etkinliği, söz konusu mayaların nihai endüstriyel kullanımda kültürleme ile elde edilen mayaların tatmin edici bir etkinliği, başka bir ifadeyle bu kullanım için bir referans suşunun kültürlenmesi ile elde edilen bir mayanın uygulama etkinliğinin en az %90'ına eşit olan bir uygulama etkinliği (EA) anlaşılmaktadır. Belirli bir kullanım için referans suşu, bu kullanım için klasik olarak kullanılan bir suştur. Dolayısıyla kültürün ekmek yapım endüstrisi için tasarlandığı bir suş için uygulama etkinliği fermantatif kuvvet olacaktır ve referans uygulama etkinliği ise no.I-2970 altında Ulusal Mikroorganizma Kültürleri Koleksiyonunda (CNCM, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15) 12 Şubat 2003 tarihinde depolanan suşunki olacaktır ve 20 g undan 2 saatte salınan 120 mL CO₂ oranında olacaktır. Belirleme yöntemi, Burrows ve Harris (Journal of Institute of Brewing, cilt LXV, no .1, Ocak-Şubat 25, 1959) fermentometresi yardımıyla gerçekleştirilen Rizograf olarak adlandırılan yöntemdir.

Biyokütlenin üretilmesi, "aerobik Fed Batch yöntemi" olarak adlandırılan, "yarı sürekli modda kültür" veya "yarı sürekli kültür" veya "yarı sürekli mod" olarak da adlandırılan yöntem doğrultusunda gerçekleştirilmekte olup, burada kültür ortamı tarafından aşamalı olarak beslenen bir fermantör (veya reaktör) içinde bir kültürü belirtmektedir ancak hiçbir ortam hacmi çekilmemektedir. Bu tür bir yöntemde kültür hacminin fermantör içinde değişkendir (ve genellikle artmaktadır), besleme debisi sabit veya değişken olabilmektedir.

30

"Fed Batch" yöntemi genellikle Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8 tarafından yayımlanan, "Yeast Technology", Bölüm 6, 2.baskı 1991, G. Reed ve T.W. Nagodawithana referans kitabında açıklanan koşullarda gerçekleştirilmektedir.

35 Kültürün biyokütle üretimi için tasarlandığı bir suş için uygulama etkinliği üretim verimi

olacaktır ve referans uygulama etkinliği ise no.995 altında NCYC (National Collection of Yeast Cultures, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich, Birleşik Krallık, NR4 7UA)'de 26 Şubat 1981 tarihinde depolanan suşunki olacaktır ve kullanılan C6 şekerine göre %80 oranında verim, yani akan g melas başına 80 g maya oranında olacaktır

5 Test, üretilen kuru malzeme miktarının ölçülmesiyle gerçekleştirilecektir.

Kültürün alkol üretimi için tasarlandığı bir suş için uygulama etkinliği etanol üretimi verimi olacaktır ve referans uygulama etkinliği ise no.I-4071 altında Ulusal Mikroorganizma Kùltürleri Koleksiyonunda (CNCM, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15) 4 Eylül 2008 tarihinde depolanan suşunki olacaktır ve kullanılan g C6 şeker başına üretilen etanol 0,40 g oranında olacak şekildedir. Etanol ve C6 şeker miktarları HPLC veya enzimatik dozlama ile ölçülmektedir.

15 Kültürün maya özütü üretimi için tasarlandığı bir suş için uygulama etkinliği elde edilen maya özütünün azot oranının belirlenmesi olacaktır ve referans uygulama etkinliği *Springer 0203/0-MG-L* referans altında Bio Springer şirketi tarafından piyasaya sürülen maya özütününki olacaktır ve kuru maddeye göre %10 azot oranında olacaktır Azot dozlama yanma yöntemi ile gerçekleştirilmektedir.

20 Bir özel yapılandırma biçimine göre suş, referans niteliğindeki uygulama etkinliğinin en az %80'ine eşit, tercihen en az %95'ine eşit ve daha tercihen en az %105'ine eşit oranda bir uygulama etkinliğine (EA) sahiptir; uygulama etkinliği fermantatif kuvvet, biyokütle, aroma, ikincil metabolit, protein, etanol üretme verimini içeren gruptan seçilmektedir.

25 Avantajlı şekilde buluşa göre suş kurutma testini karşılamaktadır ve referans uygulama etkinliğinin en az %80'ine eşit olan bir uygulama etkinliği (EA) sergilemektedir.

Buluş aynı zamanda aşağıdaki yeni suşları amaçlamaktadır

- 30 - no.I-4670 altında Ulusal Mikroorganizma Kùltürleri Koleksiyonunda (CNCM, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15) 23 Ağustos 2012 tarihinde depolanan maya suşu
- no.I-4671 altında Ulusal Mikroorganizma Kùltürleri Koleksiyonunda (CNCM, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15) 23 Ağustos 2012 tarihinde
- 35 depolanan maya suşu.

Bu suşlar, ksiloz üzerinde büyüme ve CP ortamı üzerinde büyüme testlerinin her birisini karşılayan ve sırasıyla 20 g undan 2 saatte salınan en az 100 mL oranında CO₂ oranında bir fermentatif kuvvet sergileyen ekmek mayası suşlarıdır. Bu suşlar aynı zamanda kurutma testini de karşılamaktadır.

Yukarıda açıklanan üzere bir maya suşunun elde edilmesine yönelik bir yöntem açıklanmaktadır.

10 Bir birinci varyanta göre yöntem bir C5 şekeri metabolize etmeye uygun hale getirilmesi için bir referans uygulama etkinliği sergileyen bir suşun (B) genetik modifikasyonuna yönelik bir aşama içermektedir.

15 Bir ikinci varyanta göre yöntem, bir referans uygulama etkinliği sergileyen bir suş (B) ile bir C5 şekerini metabolize etmeye uygun hale getirilen bir suşun (A) büyümesini içermektedir.

20 Seçilen varyant hangisi olursa olsun burada açıklanan yöntem ksiloz üzerinde büyüme testi, CP ortamı üzerinde büyüme testi ve kurutma testi arasından seçilen testlerden en az birisini karşılayan ve referans niteliğindeki uygulama etkinliğinin en az %80'ine eşit, tercihen en az %95'ine eşit ve daha tercihen en az %105'ine eşit oranda bir uygulama etkinliğine (EA) sahip olan bir suşun (B) seçilmesine olanak sağlayan en az bir eleme aşaması içerebilmektedir.

Eleme aşaması yöntemin son aşaması olarak gerçekleştirilebilmektedir.

25 Buluşa göre bir C5 şekeri metabolize etme kapasitesi, anaerobik durumda bir C5 şekeri içeren bir ortamdan etanol üretme kapasitesine dönüşmektedir. Bir C5 şekerini metabolize etmeye uygun olan suşlar genel olarak, pentoz yolunun her bir geninin deregüle edildiği genetik olarak modifiye edilmiş suşlardır; bir aldoz redüktazı kodlayan *GRE3* geninin kopyaları silinmektedir; ksilülkinazı kodlayan doğal *XKS1* geni aşırı eksprese edilmektedir ve
30 yönlendirilmiş bir gelişime tabi tutulmaktadır.

Bir C5 şekerini metabolize etmeye uygun olan bir maya, bir izomeraz ksilozu kodlayan bir ekzojen genin en az bir kopyası ve tercihen *Pichia stipitis*ten elde edilen bir ksilotol dehidrojenazı kodlayan bir ekzojen geninin en az bir kopyası içeren bir maya suşudur.

Ksiloz izomeraz *Clostridium*, *Piromyces*, *Bacteroidler*, *Streptomyces*, *Haemophilus*, *Burkholderia*, *Enterococcus*, *Thermotoga*, *Fusobacterium*, *Geobacillus*, *Arthrobacter*, *Ciona*, *Physcomitrella*, *Cellvibrio*, *Chitinophaga*, *Saccharopolyspora* veya *Salinibacter*'den elde edilen bir gendir ve tercihen *Clostridium phytofermentans* veya *Piromyces* alt cinsinden elde edilen bir gendir.

Üstelik bir C5 şekerini metabolize etmeye uygun olan suşlar aşağıdaki modifikasyonları içermektedir:

- 10 - bir aldoz redüktaz kodlayan bir genin, tercihen *GRE3* geninin en az bir kopyası, tercihen en az iki kopyası bulunmaktadır, ve
- bir ksilülkinaz kodlayan bir endojen geni, tercihen *XKS1* geni anerobiyoz ile veya herhangi bir karbon kaynağı tarafından indüklenen katabolik represyon ile bastırılmış bir genin bir promotörünün kontrolü altında yerleştirilmektedir ve alkol fermantasyonu sırasında şiddetli bir şekilde eksprese edilmektedir,
- 15 - fosfat pentozlar yolunun oksidatif olmayan kısmında, tercihen *RPE1*, *RKI1*, *TKL1* ve *TAL1* arasından seçilen en az bir endojen geni ve özellikle tercih edilen şekilde bu genlerin tamamı anerobiyoz ile veya herhangi bir karbon kaynağı tarafından indüklenen katabolik represyon ile bastırılmış bir genin bir promotörünün kontrolü altında yerleştirilmektedir
- 20 ve alkol fermantasyonu sırasında şiddetli bir şekilde eksprese edilmektedir.

Genetik modifikasyon yöntemleri WO 2011/128552 veya WO2012/72793 numaralı patent dokümanlarında açıklananlardan birisi olabilmektedir.

- 25 Burada açıklanan hibridasyon yönteminin bir yapılandırma biçimine göre söz konusu yöntem aşağıdaki aşamaları içermektedir:

- bir C5 şekerini metabolize etmeye uygun olan bir suşun (A) seçilmesi;
- bir endüstriyel uygulama ile uyumlu performanslara sahip olan bir suşun (B) seçilmesi;
- 30 - suşun (B) ayrılan bölümleri ile suşun (A) ayrılan bölümünün hibridasyonu.

Bir varyanta göre söz konusu hibridasyon yöntemi aşağıdaki ek aşamaları içermektedir:

- bir C5 şekerini metabolize etmeye uygun olan bir suşun (A) seçilmesi;
- 35 - bir ayrılan bölümün (X) elde edilmesi için söz konusu suşun (A) sporlanması;

- bir endüstriyel uygulama ile uyumlu performanslara sahip olan bir suşun (B) seçilmesi;
- bir ayrılan bölümün (Y) elde edilmesi için söz konusu suşun (B) sporlanması;
- (X) ve (Y)'nin hibridasyonu.

5 Suş (A), pentoz yolunun her bir geninin deregüle edildiği genetik olarak modifiye edilmiş suşlar arasından seçilmektedir, aldoz redüktazlar kodlayan genin kopyaları silinmektedir ve yönlendirilmiş bir gelişime tabi tutulmaktadır

10 Açıklayan bir başka formuna göre bir C5 şekerini metabolize etmeye uygun olan bir suş (A), bir izomeraz ksiloz redüktaz enzimini kodlayan *Pichia stipitis* XR geninin en az bir kopyası ve tercihen ksilotol dehidrojenaz enzimini kodlayan bir *Pichia stipitis* XDH geninin en az bir kopyası içeren bir suştur.

15 Açıklayan bir başka formuna göre bir C5 şekerini metabolize etmeye uygun olan bir suş (A), bir izomeraz ksilozu kodlayan bir ekzojen genin en az bir kopyası ve tercihen *Pichia stipitis*'ten elde edilen bir ksilotol dehidrojenaz kodlayan bir ekzojen geninin en az bir kopyası içeren bir maya suşudur.

20 Ksiloz izomeraz *Clostridium*, *Piromyces*, *Bacteroïdes*, *Streptomyces*, *Haemophilus*, *Burkholderia*, *Enterococcus*, *Thermotoga*, *Fusobacterium*, *Geobacillus*, *Arthrobacter*, *Ciona*, *Physcomitrella*, *Cellvibrio*, *Chitinophaga*, *Saccharopolyspora* veya *Salinibacter*'den elde edilen bir gendir ve tercihen *Clostridium phytofermentans* veya *Piromyces* alt cinsinden elde edilen bir gendir.

25 Üstelik bir C5 şekerini metabolize etmeye uygun olan suşlar (A) aşağıdaki modifikasyonları içermektedir:

- bir aldoz redüktaz kodlayan bir genin, tercihen *GRE3* geninin en az bir kopyası, tercihen en az iki kopyası silinmektedir, ve
- 30 - bir ksilülkinaz kodlayan bir endojen geni, tercihen *XKS1* geni anerobiyoz ile veya herhangi bir karbon kaynağı tarafından indüklenen katabolik represyon ile bastırılmış bir genin bir promotörünün kontrolü altında yerleştirilmektedir ve alkol fermantasyonu sırasında şiddetli bir şekilde ekprese edilmektedir,
- fosfat pentozlar yolunun oksidatif olmayan kısmı, tercihen *RPE1*, *RKI1*, *TKL1* ve *TAL1*
- 35 arasından seçilen en az bir endojen geni ve özellikle tercih edilen şekilde bu genlerin

tamamı anaerobiyoz ile veya herhangi bir karbon kaynağı tarafından indüklenen katabolik represyon ile bastırılmış bir genin bir promotörünün kontrolü altında yerleştirilmektedir ve alkol fermantasyonu sırasında şiddetli bir şekilde ekprese edilmektedir.

- 5 Genetik modifikasyon yöntemleri WO 2011/128552 veya WO2012/72793 numaralı patent dokümanlarında açıklananlardan birisi olabilmektedir.

10 Suş (A), suşun elenmesine yönelik bir yöntem ile seçilebilmektedir. Yukarıda da açıklandığı üzere sadece ksiloz üzerinde büyüme testi ve/veya CP ortamı üzerinde büyüme testini karşılayan suşlar seçilmektedir.

15 Suş (B), suşun elenmesine yönelik bir yöntem ile seçilebilmektedir. Sadece referans niteliğindeki uygulama etkinliğinin en az %80'ine eşit, tercihen en az %95'ine eşit ve daha tercihen en az %105'ine eşit oranda bir uygulama etkinliğine (EA) sahip olan suşlar seçilecektir.

20 Suş bir ekmek suşu olduğu zaman seçilecek olan suş (B), 5 mL.2sa⁻¹. g un⁻¹ oranında üzerinde, tercihen 6 mL.2sa⁻¹. g un⁻¹ oranında üzerinde ve daha tercihen 8 mL.2sa⁻¹. g un⁻¹ oranında üzerinde bir fermantatif kuvvet sergileyecektir.

25 Ayrılan bölümlerin elde edilmesine yönelik aşamaları kullanan yöntem aynı zamanda ayrılan bölümün (X) elenmesine yönelik bir aşama ve/veya ayrılan bölümün (Y) elenmesine yönelik bir aşama içerebilmektedir. Yukarıda da açıklandığı üzere sadece ksiloz üzerinde büyüme testi ve/veya CP ortamı üzerinde büyüme testini karşılayan ayrılan bölümler (X) seçilmektedir. Sadece referans niteliğindeki uygulama etkinliğinin en az %80'ine eşit, tercihen en az %95'ine eşit ve daha tercihen en az %105'ine eşit oranda bir uygulama etkinliğine (EA) sahip olan ayrılan bölümler (Y) seçilecektir.

30 Tercih edilen şekilde ayrılan bölüm (X), no.I-4672 ve I-4673 altında Ulusal Mikroorganizma Kùltürleri Koleksiyonunda (CNCM, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15) 23 Ağustos 2012 tarihinde depolanan suşlar arasından seçilmektedir ve ayrılan bölüm (Y) ise ve no.I-4669 altında Ulusal Mikroorganizma Kùltürleri Koleksiyonunda (CNCM, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15) 23 Ağustos 2012 tarihinde depolanan maya suşudur.

35

Buluş ayrıca yukarıda açıkladığı üzere bir suştan, en az bir C5 şekeri içeren bir altı üzerinde aerobik "Fed Batch" maya üretimine yönelik bir yöntemi amaçlamaktadır. Aerobik "Fed Batch" yönteminden, "yarı sürekli modda kültür" veya "yarı sürekli kültür" veya "yarı sürekli mod" anlaşılabilir, burada kültür ortamı tarafından aşamalı olarak beslenen bir fermantör (veya reaktör) içinde bir kültürü belirtmektedir ancak hiçbir ortam hacmi çekilmemektedir. Bu tür bir yöntemde kültür hacminin fermantör içinde değişkendir (ve genellikle artmaktadır), besleme debisi sabit veya değişken olabilmektedir.

"Fed Batch" yöntemi genellikle Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8 tarafından yayımlanan, "Yeast Technology", Bölüm 6, 2.baskı 1991, G. Reed ve T.W. Nagodawithana referans kitabında açıklanan koşullarda gerçekleştirilmektedir.

Buluşa göre çoğalma oranı genellikle 1,16'dır. Genel bir şekilde buluş suşları ile C5 şekerlerinin kullanımı oranı bu suşların doğasına bağlıdır ve bazı koşullarda %100'e kadar değişebilmektedir. Ekmek yapımında nihai bir uygulama için tasarlanan bir suş, çoğalmasında, fermantasyon altı içinde bulunan C5 şekerlerini %50 oranında kadar kullanabilmektedir, ayrıca etanol üretiminde uygulama için tasarlanan bir suş C5 şekerini %100 oranında kullanabilmektedir.

Buluşun bir başka amacı ekmek yapımı, biyokütle üretimi, aroma üretimi, ikincil metabolitlerin üretimi, protein üretimi, RNA üretimi, etanol üretimi, bira yapımı veya maya özütü üretimi arasından seçilen en az bir endüstriyel uygulamada elde edilen mayaların kullanılmasıdır.

Aşağıdaki örnekler kapsamı belirlemek için buluşu göstermektedir.

Örnekler:

Örnek 1: Ayrılan bölüm (X)'in preparasyonu

CNCM I-4538 suşunun ayrılan bölümlerinin elde edilmesi amacıyla bu suş, 10 g/kg Maya suşu (EXL) tipi J100, 10 g/kg pepton ve 20 g/kg glukoz barındıran YPG ortamında 24 saat boyunca yetiştirilmiştir. Elde edilen hücrelerin süspansiyonu daha sonra 20 g/kg aragoz ve 7,5 g/kg sodyum asetatın oluşan bir SAA ortamı barındıran bir Petri kabı üzerine aktarılmıştır. 30°C'de 5 gün inkübasyondan sonra tetratlar bir mikromanipülatör yardımıyla parçalara ayrılmıştır. Bu şekilde hazırlanan kutular 30°C'de 48 saat inkübe edilmektedir.

Elde edilen ayrılan bölümlerin kullanılması ilişkin sonuçlardan birisi cinsiyet işareti ile ilgilidir. Nitekim ksilozu fermente edebilen suşların moleküler biyolojisi ile oluşum sırasında bu yol için esas olan bazı genler, Mat alfaya genetik olarak bağlanan bir lokus içine girmiştir. Bu nokta, 5 CNM I-4538 referanslarında 5 Ekim 2011 tarihinde Ulusal Mikroorganizma Kùltürleri Koleksiyonunda (CNM, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15) depolanan suştan elde edilen ve ksilozu metabolize edebilen ayrılan bölümlerin tümünün Mat alfa işaretidir. Bu kùllamanın kaldırılmasının amacıyla bu ayrılan bölümlerin cinsiyet işareti değiştirilmiştir. Bunun için doğada mevcut olan bir süreci kullandık. Nitekim bazı vahşi 10 mayalar, haploid durumunda oldukları zaman cinsiyet işaretlerini değiştirebilmektedir. Bu süreç rekombinaz HO eylemi altında gerçekleştirilmektedir. Bu, CNM I-4538 referanslarında CNM’de depolanan suş içinde fonksiyonel değildir ve dolayısıyla bu suş içinde artı işlev görmemektedir. İlgili ayrılan bölümlerin içine, fonksiyonel HO rekombinaz kodlayan bir gen barındıran bir replikatif plazmidi soktuk. Bu yöntem 1991 tarihinde yayınlanan Herskowitz ve 15 Jensen’in çalışmalarıyla dayanmaktadır. Bahsi geçen plazmit tarafından taşınan HO geni, galaktoz ile indüklenen bir promotörün bağlanmasıyla altına yerleştirilmiştir. Bu şekilde dönüştürülen ayrılan bölümler, 10 g/kg EXL tipi J100, 10 g/kg Pepton ve 20 g/kg galaktoz barındıran bir ortam içinde 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra 10 g/kg EXL tipi J100, 20 g/kg agaroz ve 20 g/kg glukoz barındıran bir katı ortam üzerine 20 serilmektedir. Klonların elde edilmesinden sonra cinsel işarettaki değişim, cinsel işaretin ekspresyonu lokusu üzerinde bir PCR gerçekleştirilmesi suretiyle doğrulanmıştır. Bu reaksiyon, her bir potansiyel ayrılan bölümün genomik DNA’sının matris olarak kullanılması suretiyle gerçekleştirilmektedir. Oligonükleotidler bir yandan mayanın kromozom III’ü üzerinde eksprese edilen MAT lokusuna has bir primer (primer Mat1 : 25 AGTCACATCAAGATCGTTTATGG) ve birisi Mat alfaya has (primer Mat2 : GCACGGAATATGGGACTACTTCG) ve diğeri Mat a’ya has olmak üzere (primer Mat3 : ACTCCACTTCAAGTAA-GAGTTTG) diğeri iki primerdir.

Mayaların Mat a genotipi, %0,8 oranında agaroz jeli üzerinde saptanabilir 544 baz çiftinin 30 ampikonunun varlığıyla karakterize edilmektedir.

Elde edilen sonuçlar şekil 1’de verilmiştir.

Örnek 2: Ayrılan bölümlerin (Y) preparasyonu ve ayrılan bölümlerin 35 hibridasyondan sonra yüksek bir fermantatif kuvvetini aktarma kapasitesinin

doğrulanması

Ayrılan bölümün preparasyonu: no.I-4669 altında CNCM’de depolanan ayrılan bölüm, no.I-2970 altında CNCM’de depolanan ekmek suşundan hazırlanmıştır. Sonraki preparasyon modu örnek 1’de açıklanan ile özdeştir.

Aktarılan doğrulanması 4539 ve 4550 hibritler, no.995 altından NCYC’de ve no.I-2970 altında CNCM’de depolanan ekmek suşlarından elde edilen ayrılan bölümlerin hibridasyonu ile hazırlanmaktadır.

Aşağıdaki tabloda verilen Normal Hamur (PN) ve 2 g Şekerli Hamur (PS 2g) üzerinde fermentatif kuvvetler, ayrılan bölüm I-4669’un hibridasyondan sonra yüksek bir fermentatif kuvvet aktarabildiğini göstermektedir.

Tablo 1

Suşlar	I-2970	NCYC-995	4539	4550
PN üzerindeki kuvvet	161	146	187	167
PS üzerindeki kuvvet 2g	139	117	155	148

Örnek 3: hibridasyon

Hazırlanan farklı ayrılan bölümler, aşağıdaki tabloda verildiği üzere çaprazlanmıştır.

Tablo 2: Gerçekleştirilen çaprazlamalar

		Mat alfa				
		X10S3	X10S2 CNCM no.I-4673	X10S1 CNCM no.I-4672	PS27	Ps28
Mat a	X10S4				HC5-G	HC5-H
	X10S5				HC5-I	HC5-J
	X10S6				HC5-K	HC5-L
	PS316 I-4669	HC5-A	HC5-C I-4671	HC5-B I-4670		
	P3S8	HC5-D	HC5-F	HC5-E		

Örnek 4: Eleme

Yukarıdaki örnek 3'te elde edilen hibrit suşlar, aşağıdaki farklı uygulamalara tabi tutulmuştur.

1/ Ksiloz üzerinde büyüme testi

- 5 Bu birinci test, karbon kaynağı olarak ksilozun kullanılması suretiyle çoğalma kapasitesine ilişkindir.

Karbon kaynağı olarak ksilozun kullanılması suretiyle suşların çoğalma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla, bileşimin yukarıda verilen bileşim olduğu 50 mL YFX ortamında 2×10^6 hücre/mL yüksekliğinde inoküle edilmiştir ve 150 rpm'lik karıştırma altında 30°C'de tutulmuştur.

Biyokütlenin gelişimi, 600 nm'lik bir dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülen bulanıklığın izlenmesi ile belirlenmiştir. Bu izlemenin sonucu şekil 2'de verilmiştir.

15

YFX ortamı üzerinde biyokütlenin gelişimi 4 suşun seçilmesine olanak sağlamıştır. Karbon kaynağı olarak ksiloz kullanmaya yönelik iyi bir kapasite sergileyen HC5-A, HC5-B, HC5-C ve HC5-D hibritleri söz konusudur. Üstelik bu suşlar, hıç ksiloz yükü alabilmektedir, burada HC5-K ve HC5-L hibritleri, ksiloz üzerinde büyümelerinin başlatılması için gecikme nedeniyle tutulmamıştır.

20

2/ CP ortamı üzerinde büyüme testi

Bir başka önemli kriter ise hücrelerin maksimal çoğalma hızıdır. Bunun belirlenmesi için mayalar, mL başına 2×10^6 yüksekliğinde 50 ml CP ortamında inoküle edilmiştir. Bu ortam, 10 g/kg EXL ve 10 g/kg bakteopepton, ayrıca 100 g/kg sakkaroz barındırması için çok zengindir. Bulanıklık gelişimi 600 nm spektrofotometrisi ile ölçülmüştür. Daha sonra biyokütle üssel şekilde arttığı sürecin tanımlanması suretiyle maksimal çoğalma hızının analiz edilmesi söz konusudur. Şekil 3, logaritmik ölçek doğrultusunda ve kültürleme süresine göre bulanıklık gelişimini göstermektedir.

30

3,5 ve 7,5 saat arasında bulunan alanda bulanıklık gelişimi üsseldir ve bu, bir logaritmik ölçeği kullanan grafiğimiz üzerindeki doğrusal görünüm ile doğrulanmaktadır. Çoğalma hızı zamana göre 600 nm'lik bulanıklık gelişimi türevi olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte farklı düz hatlar paralel gibi görüldüğü için, çoğalma hızları da, bu ortamda NCYC 995 referans

35

altında NCYC’de depolanan suşun ve CNCM I-4538 referansı altında CNCM’de depolanan suşunkiler ile karşılaştırılabilir olarak görüldüğü anlaşılmaktadır

3/ Bir sahte fedbatch sonrasında fermentatif kuvvet testi

5

HC5-B ve HC5-C Hibritleri (I-4670 ve I-4671 suşları) karbon kaynağı olarak rafinozun kullanılması suretiyle yayılmıştır. Bu triholosidin kullanılması şekerin aşamalı olarak mayaya iletilmesine olanak sağlamaktadır. Nitekim mayalar invertaz ile yavaş bir şekilde hidrolize edilmektedir. SMART System5™ (CEM şirketi ABD) aparatının yardımıyla hacim birim başına mayanın kuru madde miktarının ölçülmesi suretiyle farklı üretimlerin biyokütle miktarlarının standardize edilmesinden sonra, bir rizograf fermentometre yardımıyla gaz salınım analizi edilmiştir. Şekil 4’de gösterilen, normal hamur üzerinde gerçekleştirilen bir test için gaz salınım gelişimi aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

- 15 • Bir maya süspansiyonu şu şekilde hazırlanmıştır: test edilecek mayanın 1 g kuru maddesine eş değer miktar süspansiyon haline getirilmiştir ve 27g/L NaCl ve 4g/L (NH₄)₂SO₄’e 100 ml çözeltinin eklenmesi ile tamamlanmıştır.
- Yukarıdaki süspansiyondan 15 ml (ya da mayanın kuru maddesinden 150 mg), 15 dakika boyunca 30°C’lik bir sıcaklıkta dengelenmektedir.
- 20 • Daha önceden 30°C’de bir gece boyunca dengelenmiş olan 20 g un bu süspansiyona eklenmektedir. Karıştırma 35 saniyelik bir süre boyunca homojenize edilmektedir.
- Oluşturulan hamur, 30°C’de yerleştirilmiş olan hermetik şekilde kapatılmış bir kap içinde inkübe edilmektedir. Gaz salınımı (760 mm Hg’nin altında olarak belirtilmektedir), toplamda 120 dakikalık bir süre boyunca kaydedilmektedir.

25

Şekerli Hamurda (PS) gerçekleştirilen bir test için gaz salınımının ölçülmesine yönelik protokol, şekerin (burada 2g) diğer kuru içerikler ile eklenmemesi dışında PN için gerçekleştirilen ile özdeştir.

- 30 Elde edilen profiller katabolik represyonun, CNCM I-4538 referansı altında CNCM’de depolanan suş içinde büyük miktarda olduğunu ortaya koymaktadır ve bu, “maltoz oyuğu” olarak adlandırılan büyük diauksi olgusunu indüklemektedir ve ekmek yapımı uygulamaları için kaliteyi düşürmektedir. Buna karşın HC5-A, B, C ve D hibritlerinin, no.NCYC 995 altında NCYC’de depolanan suştan daha yavaş olmasına rağmen, ilgi çekici profiller sergilediği fark edilmiştir. HC5-B ve HC5-C Hibritleri (I-4670 ve I-4671 suşları) daha iyi sonuçlar vermiştir.

35

Örnek 5:

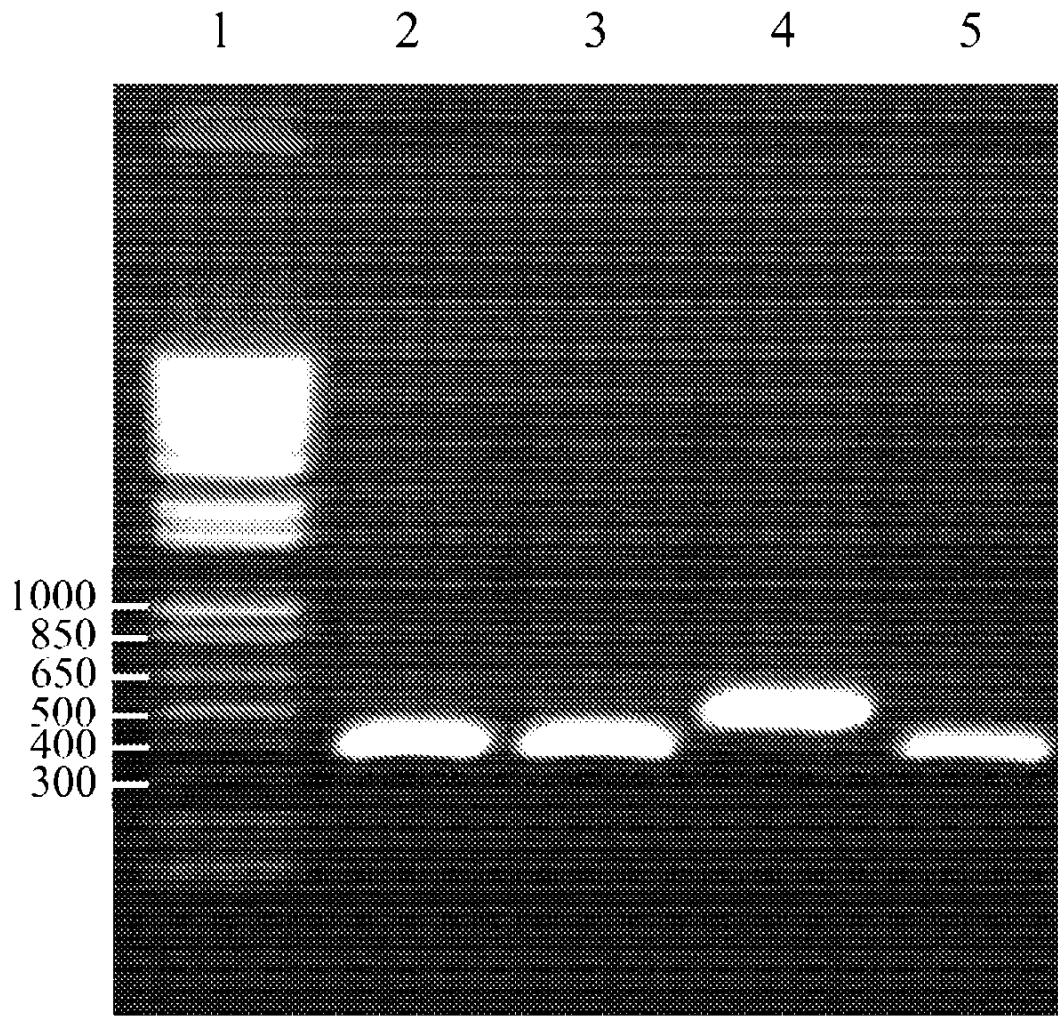
No.I-4670 ve no.I-4671 altındaki depolanan suşların her birisi, ksiloz üzerinde büyüme testine ve CP ortamı üzerinde büyüme testine tabi tutulmuştur ve bunların fermentatif kuvvetleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

Suş	CNCM no.I-4670	CNCM no.I-4671
Ksiloz üzerindeki büyüme (çoğalma hızı)	3,5 saat / jenerasyon	6 saat / jenerasyon
CP ortamı büyümesi (çoğalma hızı)	0.71	0.66
Fermentatif kuvvet	139	143

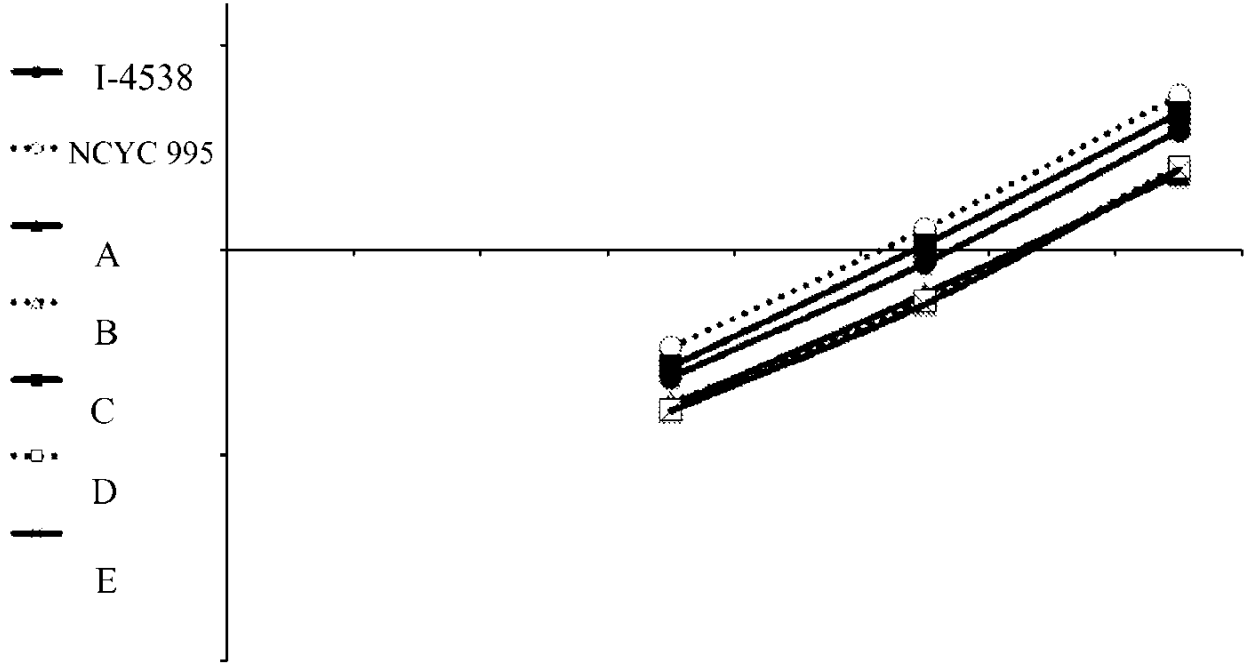
Örnek 6:

No.I-4670 ve no.I-4671 altındaki depolanan suşlardan her birisi, 18 saat boyunca aerobik Fed batch yöntemi doğrultusunda çoğaltılmıştır. Kurutmadan sonra elde edilen mayaların fermentatif kuvvetleri, Normal Hamur (PN) testine göre ve 2 gram Şekerli Hamur (PS2g) testine göre ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir:

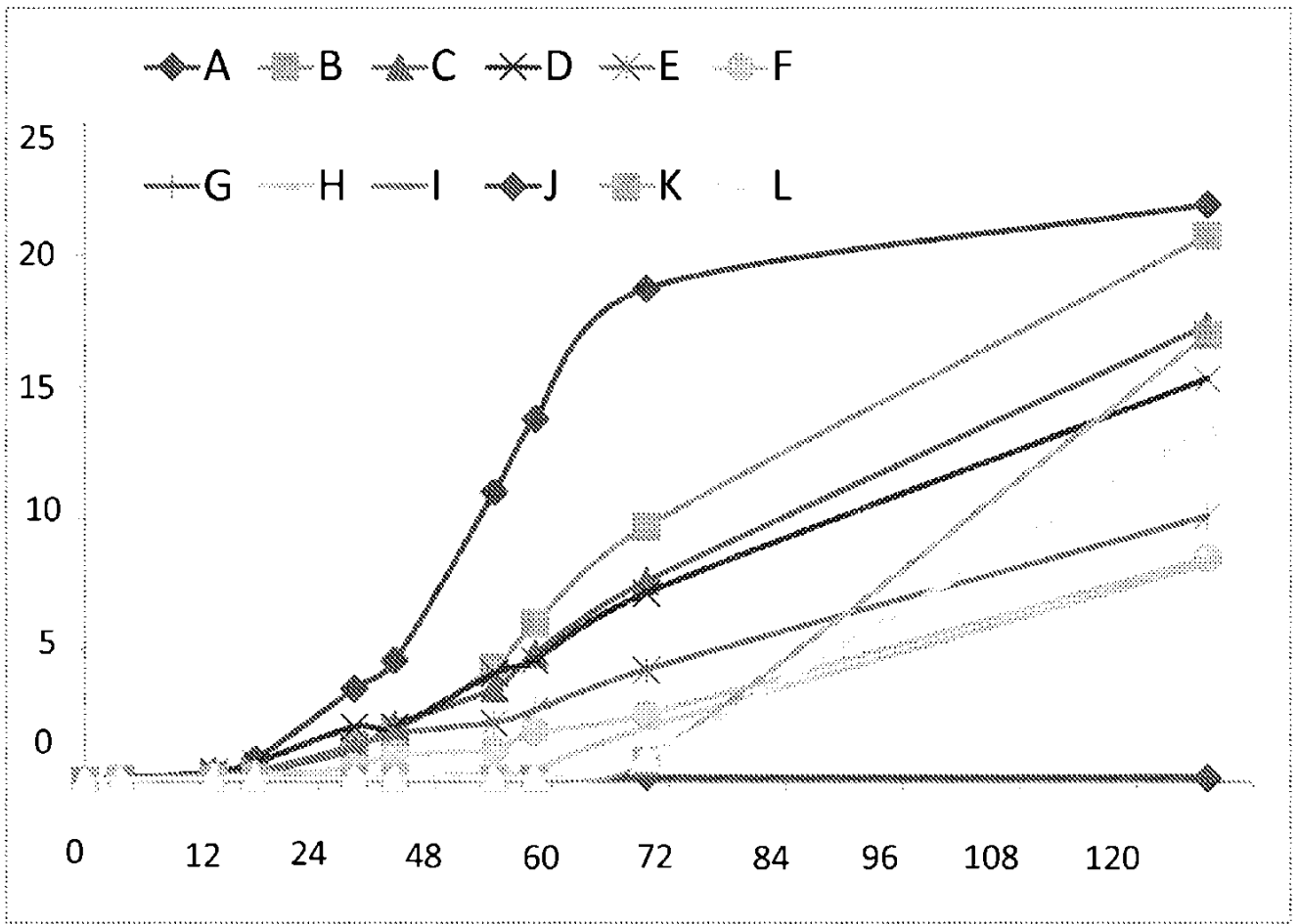
	NCYC 995 referans suşun EA'sı	I-4670	I-4671
kültür ortamı	%100 C6	C5/C6 0,42	C5/C6 0,42
Üretim verimi	%79,2	%65,7	%66,0
PN fermentatif kuvveti	118	119	120
PS2g fermentatif kuvveti	114	116	107



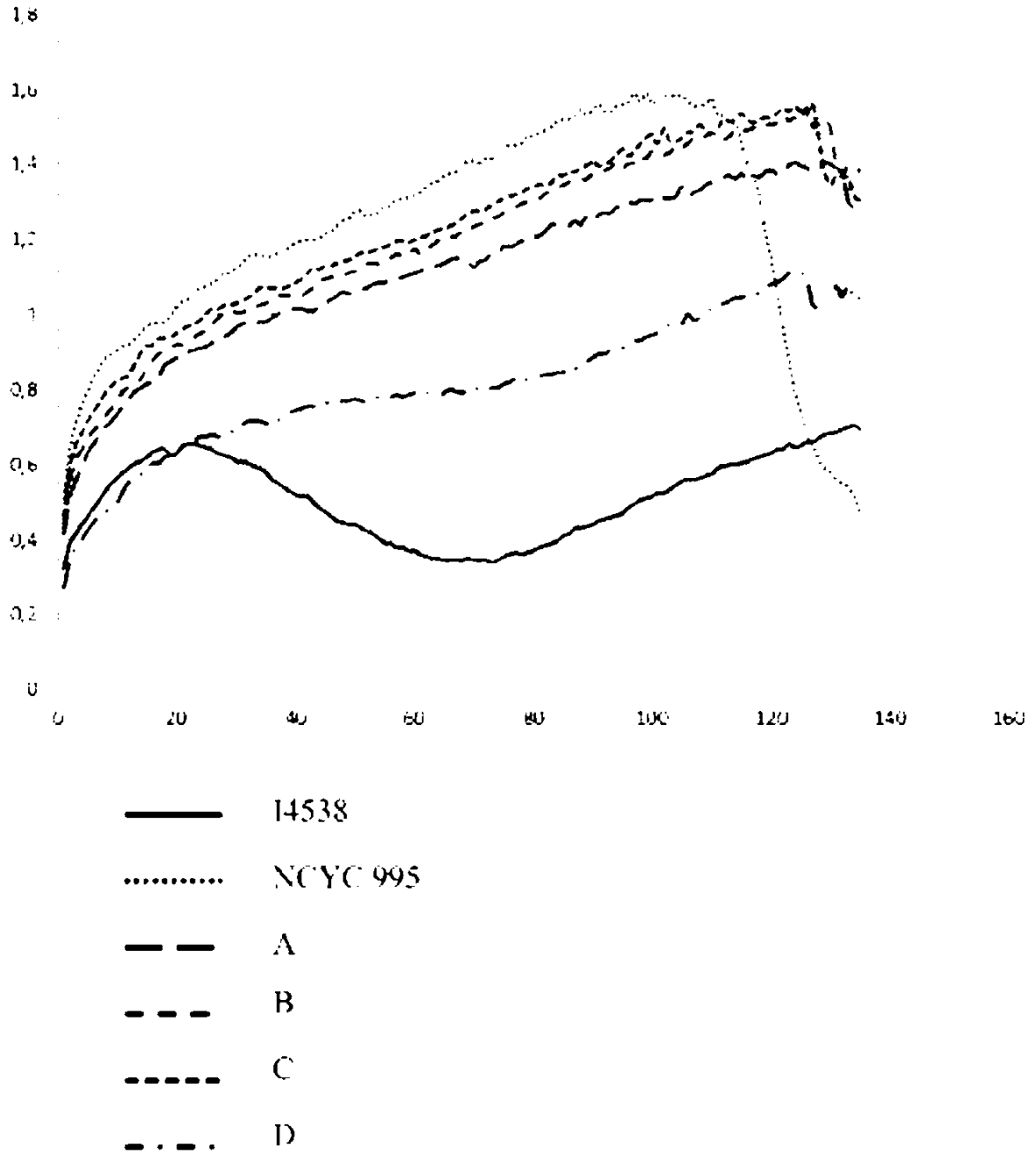
Şekil 1



Şekil 2



Şekil 3



Şekil 4