

Gıdaların İşlenmesinde Kullanılan Enzimlerin Rekombinant DNA Teknolojisi ile Üretimi

Burcu Çerçi¹, Ali Koçyiğit², İsmail Karaboz³

Özet

Gıdaların işlenmesi için birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Enzimler de gıdaların işlenmesinde ve gıda katkı maddelerinin üretiminde oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadırlar. Enzimler mikroorganizmalardan olduğu kadar bitkilerden ve hayvan dokularından da elde edilmektedirler. Fakat genellikle klasik yöntemlerle elde edilen bu enzimler günümüzde kullanılan modern gıda üretim yöntemlerine uyum sağlayamamaktadırlar. Rekombinant DNA teknolojilerinin gelişmesi ile gıdalarda rekombinant mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin kullanılması fikri önem kazanmıştır. Rekombinant mikroorganizmaların kullanılması düşük maliyet ve yüksek verimlilikle enzim eldesini sağlamaktadır. Fakat elde edilen enzimler gıdalarda kullanılacağı için, konak mikroorganizmaların patojenik ve toksijenik potansiyelleri önemlidir. Bu sorun da konak organizmaların mutasyonla güvenilir hale getirilmesiyle veya fermantasyon koşulları düzenlenerek toksin üretilmesine engel olunmasıyla aşılmaktadır.

İŞLENMİŞ GIDALAR

Enzimler gıda endüstrisinde oldukça önemli rol oynamaktadırlar. Yüzyıllardır süregelen ekmek ve peynir üretimi enzimlerin aktivitelerine dayanmaktadır. Yine yoğurt ve fermente ürünler de enzimatik reaksiyonlar sonucunda üretilmektedirler fakat bu ürünlerde, saflaştırılmış enzimlerden çok organizmalar bu reaksiyonları gerçekleştirirler (1). Enzimler, gıda proseslerinde, biyodönüşüm ve sentez, ekstraksiyonların geliştirilmesi, viskozitenin azaltılması ve tattaki değişimler gibi pek çok işlem için kullanılmaktadır. Gıda uygulamalarında kullanılacak olan enzimler GRAS (Generally Recognized as Safe) olarak değerlendirilmiş kaynaklardan elde edilmelidir. Çünkü elde edilecek rekombinant enzimin üretiminde kullanılan konak organizmaların patojenik ve toksijenik potansiyelleri oldukça önemlidir (2).

Gıdaların işlenmesinde kullanılan enzimlerin endüstriyel olarak üretimi 1874'lere uzanmaktadır. Danimarkalı araştırmacı Christian Hansen peynir işleme için buzağuların karınlarından rennin (kimosin) ekstrakte etmiştir (3).

¹Araş. Gör. Uzman, ²Araş. Gör. Dr., ³Prof. Dr, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, 35100, İzmir. Yazışmadan sorumlu yazar ismail.karaboz@ege.edu.tr

Kimosin günümüzde rekombinant DNA teknikleri ile bovine prokimosin genine sahip mikroorganizmalarca üretilmektedir. Bovine kimosin *E. coli* K-12'de ifade edilmiştir ve US Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanan ilk rekombinant enzimdir (3).

Enzimlerin ekspresyonu için temel olarak üç bileşeni gerektirir: bir gen, geni içeren vektör ve ekspresyonu gerçekleştirecek konak hücre (4). Enzim eldesinde ürünün miktarı da oldukça önemlidir. Dolayısıyla konak hücrelerin rekombinant enzim üretiminde önemli rolleri bulunmaktadır.

Konak mikroorganizmalar

B. subtilis, *B. licheniformis*, *A. niger*, *A. oryzae* gibi birçok bakteriyel ve fungal strain gıda proseslerinde kullanılan enzimlerin üretimi için konak hücre olarak kullanılmaktadırlar. Bu organizmalar uzun yıllardır enzim üretiminde kullanılmakta olup, endüstriyel üretim koşulları altında oldukça iyi üretilmektedirler. Bunlar aynı zamanda genetik manipülasyonlara uygundur ve fermantasyon ortamında bol miktarda enzim üretebilirler. Bu organizmaların dışında, *E. coli* K-12, *F. venenatum*, *P. fluorescens* gibi doğal enzimlerin üretiminde kullanılmayan pek çok mikroorganizma, gıda proseslerinde kullanılan enzimlerin üretiminde kullanılmaktadırlar (3).

Bacillus subtilis

B. subtilis uzun yıllardır özellikle alfa amilaz ve proteazlar gibi gıda işlemlerinde kullanılan enzimlerin üretiminde konak organizma olarak kullanılmaktadır. *B. subtilis* tarafından üretilen rekombinant enzimlerin güvenliği FDA'ya (Food and Drug Administration) sunulan GRAS (Generally recognized as safe) tebliğinde ve çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (5-28-29-30). *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus*'un (özellikle alfa amilaz enziminin üretiminde) gıda işlemlerinde açısından konak hücre olarak kullanılmalarının güvenli olduğu belirtilmiştir. Son on yılda, *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* rekombinant enzimlerin ekspresyonunda kolaylıkla kullanılmışlardır. İki endüstriyel *B. licheniformis* straininin tüm genomunun sekansı çıkartılmış ve *B. subtilis*'in sekansına büyük oranda benzer olduğu, fakat insanlarda patojen olan *B. cereus* ve *B. anthracis*'ten farklılık gösterdiği belirlenmiştir (6, 7). *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus* 'un güvenilirliği birçok çalışmada belirtilmiştir (8-10).

Bacillus türlerinin yabancı tip strainleri besin kısıtlanması durumunda sporulasyona girerler. *B. thuringiensis* pestisidal proteinleri gibi bazı önemli ticari bileşikleri sporulasyon esnasında oluştururken, gıda proseslerinde kullanılan enzimlerin üretimi sporulasyon ile engellenirler (11). Bu sebeple sporulasyon oluşturmeyen mutantlar geliştirilip rekombinant enzimler için konak hücre olarak kullanılmaktadırlar.

Bacillus türlerinin heterolog enzimlerin ve diğer proteinlerin üretiminde kullanılmasının avantajlarından biri proteinlerin doğrudan fermantasyon ortamına verilmesidir (12). *Bacillus* türleri tarafından üretilen ekstraselüler proteazların heterolog proteinleri parçalaması ise rekombinant enzim üretiminde önemli bir probleme yol açmaktadır. Ekstraselüler proteazlarla enzim yıkımını engellemek ve enzim verimliliğini arttırmak için enzim üreticileri proteaz üretmeyen mutant strainler geliştirmişlerdir.

***E. coli* K12**

1990 yılında FDA *E. coli* K-12 tarafından üretilen kimosin enzimini GRAS olarak onaylamıştır. *E. coli* K-12, uzun yıllardır laboratuarda kullanılmaktadır. Bu mikroorganizma sindirildiğinde toksin üretmemektedir. *E. coli* K12 çalışması oldukça maliyetli bir bakteridir. 1997'de genom sekansı belirlenmiştir. *E. coli* K-12 kimyasalların ve insanlarda kullanılan ilaçların üretiminde güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır (21 CFR 184. 1685; 13; 14).

Pseudomonas fluorescens

Gram negatif toprak bakterisidir ve insanlarda hastalık yapmamaktadır. Yabani tip strain MB101, Kaliforniya'da marullardan izole edilmiştir ve α -amilaz üretiminde konak organizma olarak kullanılmaktadır. Bu strain 1989'dan beri tarımsal uygulamalarda kullanılan *B. thuringiensis* insektisidal proteininin üretimi için kullanılmaktadır (15).

Aspergillus oryzae* ve *A. niger

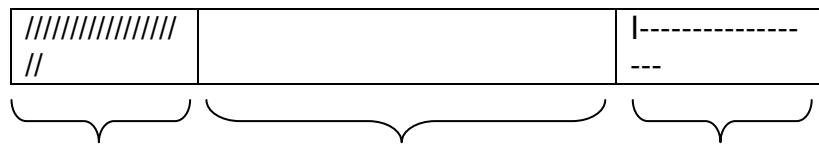
Her iki organizma da ekmek üretim, mayalama ve diğer gıda uygulamaları için kullanılan enzimlerin kaynağıdır. Her iki tür de patojenik veya toksijenik değildir. Bazı strainleri, mikotoksinler gibi toksik sekonder metabolitleri düşük miktarda da olsa üretmektedirler. Fermantasyon koşulları değiştirilerek bu türlerin mikotoksin üretimi engellenebileceği bildirilmiştir (14).

Diğer fungal türler

Fusarium venetatum, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Trichoderma reesei* de rekombinant enzim üretiminde kullanılan güvenilir konak mikroorganizmalarıdır (16, 17, 18)

Rekombinant strainlerin geliştirilmesi ve klonların seçimi

Rekombinant enzimleri kodlayan genler, ekspresyon vektörleri kullanılarak konak strainlere aktarılırlar. Ekspresyon vektörü ekspresyon kaseti içeren DNA plazmitidir. Ekspresyon kasetinde temel olarak bulunan bileşenler promotör, enzimi kodlayan gen bölgesi ve terminatördür.



Şekil 1: Ekspresyon kaseti

Promotor Gen Terminatör

Promotor ve terminatör enzim-kodlayan genlerin transkripsiyonunu kontrol eden regülatör sekanslardır.

En yaygın olarak kullanılan plazmitler pUB110, pUC18 ve pUC19'dur. pUB110 plazmiti *S. aureus*'tan izole edilmiştir (19) ve sekansı belirlenmiştir (20-21). pUC18 ve pUC19 plazmitleri *E. coli* 'de klonlama işlemleri için geliştirilmişlerdir (22). pUB110 plazmiti, neo ve nptII geni olarak da bilinen kan^r (kanamisin veya neomisin direnç)

geni ve ph1 (phleomisin direnç) geni taşır (23). Bu plazmitin kullanımı sonucunda elde edilen rekombinant mikroorganizmanın seçimi de bu dirençlilik genleri kullanılarak yapılır. pUC18 ve pUC19 plazmitleri *E. coli*'de aktif olan bir replikasyon orijini ve ampisilin dirençlilik (*amp^r*) geni içerirler. pUC18 ve pUC19 plazmitleri belirli bakteriyel ve fungal ekspresyon vektörlerinin *E. coli*'de oluşturulması için kullanılırlar ve seçici markerları *amp^r* genidir.

Rekombinant enzim üretiminde ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında kullanılan birçok bakteriyel plazmit bulunmaktadır. Bazı durumlarda, iki veya daha fazla plazmitten türevlenen fragmentler birleştirilmiştir. Ekspresyon vektörlerinin çoğu kendi seçilebilir markerlarını içerirler. Yine de bazı durumlarda, iki ayrı vektör oluşturulur; biri ekspresyon kasetini taşırken, diğeri seçilebilir markerı taşır. Böyle bir durumda konak strain her iki vektörle birlikte transforme edilir (3).

Bakteriyel ekspresyon vektörleri ya konak kromozomuna entegre olurlar ya da ekstrakromozomal replikasyonla (otonom) çoğalırlar. Otonom olarak replike olan bakteriyel ekspresyon vektörleri konak bakteri ile uygun replikasyon orijini içerirler ve hedef enzimi yüksek oranda üretebilirler. Mayalarda ve filamentöz funguslarda enzim üretimi için kullanılan ekspresyon vektörleri genellikle konak genomuna entegre olacak şekilde dizayn edilirler (3).

ENZİM ÜRETİMİ

Enzim üretimi biyoteknolojinin büyüyen bir alanıdır. Dünyada yapılan patent başvuruları ve bu konunun araştırılması ile ilgili yayınlar yıldan yıla artmaktadır. Enzim üreticilerinin çoğu farklı fermantasyon teknikleri ile üretimlerini gerçekleştirmektedirler (24).

Mikrobiyel enzimler, doğal ya da rekombinant olsalar da kontrol altında tutulan koşullardaki fermantasyon işlemi ile üretilirler. Enzim üretimini en üst seviyeye çıkarmak için, sıcaklık, pH, havalandırma gibi parametreler kontrol altında tutulurken, fermantasyon ortamının içeriğindeki bileşenler de çok iyi seçilmiş olmalıdır. Dekstroz, nişasta, yeast ekstrakt, amonyum, üre ve mineraller bir fermantasyon ortamında en sık kullanılan bileşenlerdir. Köpük kırıcı ajanlar, pH düzenleyiciler de bir fermantasyon ortamında bulunurlar. Tüm bu bileşenler enzim üretimini olumlu ya da olumsuz yönde etkilemektedir (3).

Natarajan ve Rajendran'ın 2009'da yaptıkları çalışmada fermantasyon koşullarının *Lactobacillus plantarum*'dan tannaz üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır ve kültürün kompozisyonu, substrat konsantrasyonu ve kültür koşullarının (pH, sıcaklık, havalandırma vs.) enzim üretimini etkilediğini belirtmişlerdir (25). Yine Sanchez ve ark. 1999'da *Candida rugosa*'dan lipaz üretimi üzerine fermantasyon koşullarının etkisini araştırmışlar ve farklı koşullar altında enzimin farklı aktivitelere sahip olduğunu belirtmişlerdir (26).

Günümüzde üretilen rekombinant enzimlerin çoğu ekstraselülerdir ve fermantasyon ortamına bırakılırlar. Enzim, hücresel kütlede ayrılır, çözdürülür ve konsantre hale getirilir. Son ürün, organizmanın ürettiği metabolitleri veya fermantasyon veya

proseste kullanılan bileşenleri de içerebilir (3). Bu sebeple üretimin ardından enzimlerin içeriği test edilmektedir (27).

SONUÇ

Doğada bulunan enzimler gıdaların işlenmesinde yüzyıllardır kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinin gelişimi ile birlikte kısa sürede, yüksek verimlilikte, maliyeti düşük ve stabilitesi yüksek enzim eldesi önem kazanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelerle birlikte rekombinant organizmalardan enzim elde etme üzerine yapılan çalışmalar artmış ve hala artmaktadır. Enzimleri kodlayan genlerin klonlanması ve yüksek hacimde endüstriyel fermantasyon ortamlarına kolaylıkla uyum sağlayan konak mikroorganizmalarda bu enzimlerin ifade edilmesi sonucunda yüksek miktarda enzim elde edilebilmektedir. Aynı zamanda gıdaların işlem gördüğü sıcaklık ve pH koşullarına da uygun enzim eldesi sağlanmıştır.

Rekombinant enzim üretiminin kilit noktası kullanılan konak hücrenin toksijenik ve patojenik potansiyelidir. Çünkü bu enzimler gıdaların işlenmesinde kullanılacağı için, insan sağlığına olumsuz yönde etki etmemesi gerekmektedir. Bu tür bir olumsuzluğun önüne geçmek için ya çeşitli mutasyon yöntemleri ile organizmanın patojeniteden sorumlu genleri tahrip edilmiş, ya da fermantasyon koşulları optimize edilerek mikroorganizmanın toksinler gibi sekonder metabolitleri üretmesi engellenmiştir.

Bunun dışında mikrobiyel konak strainleri enzim üretimini arttırabilmek için genetik olarak modifiye edilebilmektedir. Örneğin bakteriyel ve fungal türlerin birçoğu hedef enzime zarar verebilen ekstraselüler proteaz üretmektedir. Klasik mutagenезle bu organizmalardan proteaz üretmeyen mutantlar elde edilebilmektedir.

Gıda teknolojisindeki gelişmeler daha etkili ve güvenilir enzim üretimine olan ilgiliyi arttırmakta, istenen özellikleri taşıyan ifade strainlerinin üretilmesiyle ilgili çalışmaları da tetikleemektedir. Moleküler biyoloji, rekombinant DNA teknolojisi ve klonlama ile ilgili elde edilen bilgilerin artmasıyla da hızlı, yüksek verimde ve endüstriyel ölçekte enzim üretimi sağlanabilmektedir.

Kaynaklar:

1. Tucker, G. A., Woods L. F. J. (1995). Enzymes in food processing. Blacie Academic & Professional, Glasgow, U. K.
2. Panesar, P. S., Marwaha, S. S., Chopra, H. K. (2010). Enzymes in food Processing Fundamentals and Potential Applications. I. K. International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi, India
3. Olempska-Beer, Z. S. Merker, R. I., Ditto, M. D., DiNovi, M. J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. Regulatory Toxicology and Pharmacology 45, 144-158.
4. Hartley, J. L., (2006). Cloning technologies for protein expression and purification, Current Opinion in Biotechnology,, 17:359-366

5. Zeman, N. W., McCrea, J. M. (1985). Alpha-amylase production using a recombinant DNA organism. *Cereal Foods World* 30, 777–780.
6. Ray, M. W. et al. (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5, R77. 1–R77. 12
7. Veith, B. et al. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7, 204–211.
8. de Boer, A. S., Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1–4
9. de Boer, A. S., Priest, F., Diderichsen, B. (1994). On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 595–598.
10. Pedersen, P. B., Bjørnvad, M. E., Rasmussen, M. D., Petersen, J. N. (2002). Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus sp.* *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36, 155–161
11. Harwood, C. R., (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol.* 10, 247–256.
12. Simonen, M., Palva, I. (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* 57, 109–137
13. Flamm, E. L. (1991). How FDA approved chymosin: a case history. *Bio/Technology* 9, 349–351.
14. Environmental Protection Agency (EPA), (1997). Biotechnology Program Under Toxic Substances Control Act (TSCA). 1996 Final Microbial Assessments (http://www.epa.gov/biotech_rule/rulesupc.htm)
15. Landry, T. D., Chew, L., Davis, J. W., Frawley, N., Foley, H. H., Stelman, S. J., Thomas, J., Wolt, J., Hanselman, D. S. (2003). Safety evaluation of an α -amylase enzyme preparation derived from the archaeal order *Thermococcales* as expressed in *Pseudomonas xuorescens* biovar I. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37, 149–168.
16. Pedersen, P. B., Broadmeadow, A. (2000). Toxicological studies on *Thermomyces lanuginosus* xylanase expressed by *Fusarium venenatum* intended for use in food. *Food Addit. Contam.* 17, 739–747.
17. van den Berg, J. A., van der Laken, K. J., van Ooyen, A. J. J., Renniers, T. C. H. M., Rietveld, K., Schaap, A., Brake, A. J., Bishop, R. J., Schultz, K., Moyer, D., Richman, M., Shuster, J. R. (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Bio/Technology* 8, 135–139.
18. Nevalainen, H., Suominen, P., Taimisto, K. (1994) . On the safety of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.* 37, 193–200.
19. Keggins, K. M., Lovett, P. S., Duvall, E. J. (1978). Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1423–1427.
20. McKenzie, T., Hoshino, T., Tanaka, T., Sueoka, N. (1986). The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* 15, 93–103.

21. McKenzie, T., Hoshino, T., Tanaka, T., Sueoka, N. (1987). A revision of the nucleotide sequence and functional map of pUB110. *Plasmid* 17, 83–85.
22. Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119.
23. Selinger, L. B., McGregor, N. F., Khachatourians, G. G., Hynes, M. F. (1990). Mobilization of closely related plasmids pUB110 and pBC16 by *Bacillus* plasmid pXO503 requires trans-acting open reading frame. *J. Bacteriol.* 172, 3290–3297.
24. Gonzalez- Viniegra, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gomez, S. J., Diaz-Godinez, G., Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biotechnological Engineering Journal* 13; 157-167
25. Natarajan, K., Rajendran, A. (2009). Effect of Fermentation Parameters on Extra Cellular Tannase Production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. *E-Journal of Chemistry* 6(4); 979-984.
26. Sanchez, A., De la Casa, R. M., Sinisterra, J. V., Valero, F., Sanchez-Montero, J. M. (1999). Effect of Fermentation Conditions in the Enzymatic Activity and Stereoselectivity of Crude Lipase from *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 80;65-75
27. Pariza, M. W., Johnson, E. A., 2001. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33, 173–186
28. Andersen, J. R., Diderichsen, B. K., Hjortkjaer, R. K., de Boer, A. S., Bootman, J., West, H., Ashby, R. (1987). Determining the safety of maltogenic amylase produced by rDNA technology. *J. Food Prot.* 50, 521–526.
29. MacKenzie, K. M., Petsel, S. R. W., Weltman, R. H., Zeman, N. W. (1989). Subchronic toxicity studies in dogs and in utero rats fed diets containing *Bacillus stearothermophilus* α -amylase from a natural or recombinant DNA host. *Food Chem. Toxicol.* 27, 599–606.
30. de Boer, A. S., Marshall, R., Broadmeadow, A., Hazelden, K. (1993). Toxicological evaluation of acetolactate decarboxylase. *J. Food Prot.* 56, 510–517.