

6 MİKROBİYAL ENZİMLERİN BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI

Süt, maya, unlu gıda ve diğer ana besin endüstrileri hayvansal, bitkisel ve mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlere bağımlıdır. Bu enzimler peynir, ekmek, malt içecekleri üretiminde; meyve ve sebze sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bugün kısmen veya tamamen saflaştırılmış mikrobiyal enzimler glukoz ve fruktoz şuruplarının üretiminde, deterjanlarda ve tekstil üretim aşamalarında kullanılmaktadır. Bu enzimlerin mali boyutları şöyledir (1994 rakamları):

<u>Enzim</u>	<u>Satış değeri (Milyon Dolar)</u>
Proteolitik enzimler	
Alkalın proteazlar	150
Nötral proteazlar	70
Reninler	60
Karbohidrazlar	
Amilazlar	100
İzomerazlar	45
Pektinazlar	40
Lipazlar	20

Besin endüstrisinde, enzim üretimi amacıyla kullanılan 50 civarında bakteri ve mantar vardır. Bunlardan en önemlileri *Bacillus* türleri (*B. subtilis*, *B. licheniformis*), *Saccharomyces cerevisiae* mayası, filamentli mantarlardan *Aspergillus niger* ve *A. oryzae*'dir. Bu organizmalar;

1. Patojenik değildir,
2. Bilinen herhangi bir toksin üretmezler ve
3. Mutlak güvenli oldukları kabul edilir.

Bu şartların tamamını karşılamalarına rağmen, *Lactobacillus* türleri ve bazı *Streptococcus* türlerinin, fermente besinler ve içkilerin üretiminde güvenilir olduğu kabul edilir.

6.1 Enzim İçeren Deterjanlar

Her yıl birkaç milyon dolarlık mikrobiyal proteolitik enzim deterjan katkısı olarak kullanılmak üzere üretilir. Giyeceklerin yıkanması sırasında proteolitik enzimler, besin, kan ve benzeri lekelerde bulunan proteinleri parçalarlar. Lekelenmiş liflere güçlü bir şekilde tutunan bir kir kütesinin protein kısmı parçalandıktan sonra leke kolayca uzaklaştırılabilmektedir. Piyasaya sürülen deterjanların % 80'i ağırlıklarının % 0.015'i ile % 0.025'i kadar peoteolitik enzim içermektedir.

Bir çok farklı tip proteinin, küçük polipeptitlere parçalanmasını gerçekleştirmek için yıkama deterjanında kullanılan enzimin, temel gereklilik olarak **yüksek proteolitik aktiviteye** ve **düşük substrat spesifitesine** sahip olması gerekir. Yıkama işleminin sert şartları altında, uzun süre aktif kalabilmek için bu enzimlerin, aşağıdaki ilave özelliklere de sahip olması gerekir:

1. Yüksek sıcaklıklarda (70°C'ye kadar) stabil kalabilmelidirler,
2. Alkalın pH değerlerinde (pH 8-11) yüksek aktiviteye sahip olmalıdırlar,
3. Noniyonik deterjanların neden olduğu denaturasyona dirençli olmalıdırlar,
4. Katalitik aktivite için metal iyonlarına ihtiyaç duymamalıdırlar (Bunun nedeni, bütün deterjanlar kelatlayıcı ajanlar içerirler. Bu ajanlar metal iyonlarını bağlarlar), ve
5. Beyazlatıcı olarak kullanılan oksitleyici ajanlara (hipoklorit ve perborat) dirençli olmalıdırlar.

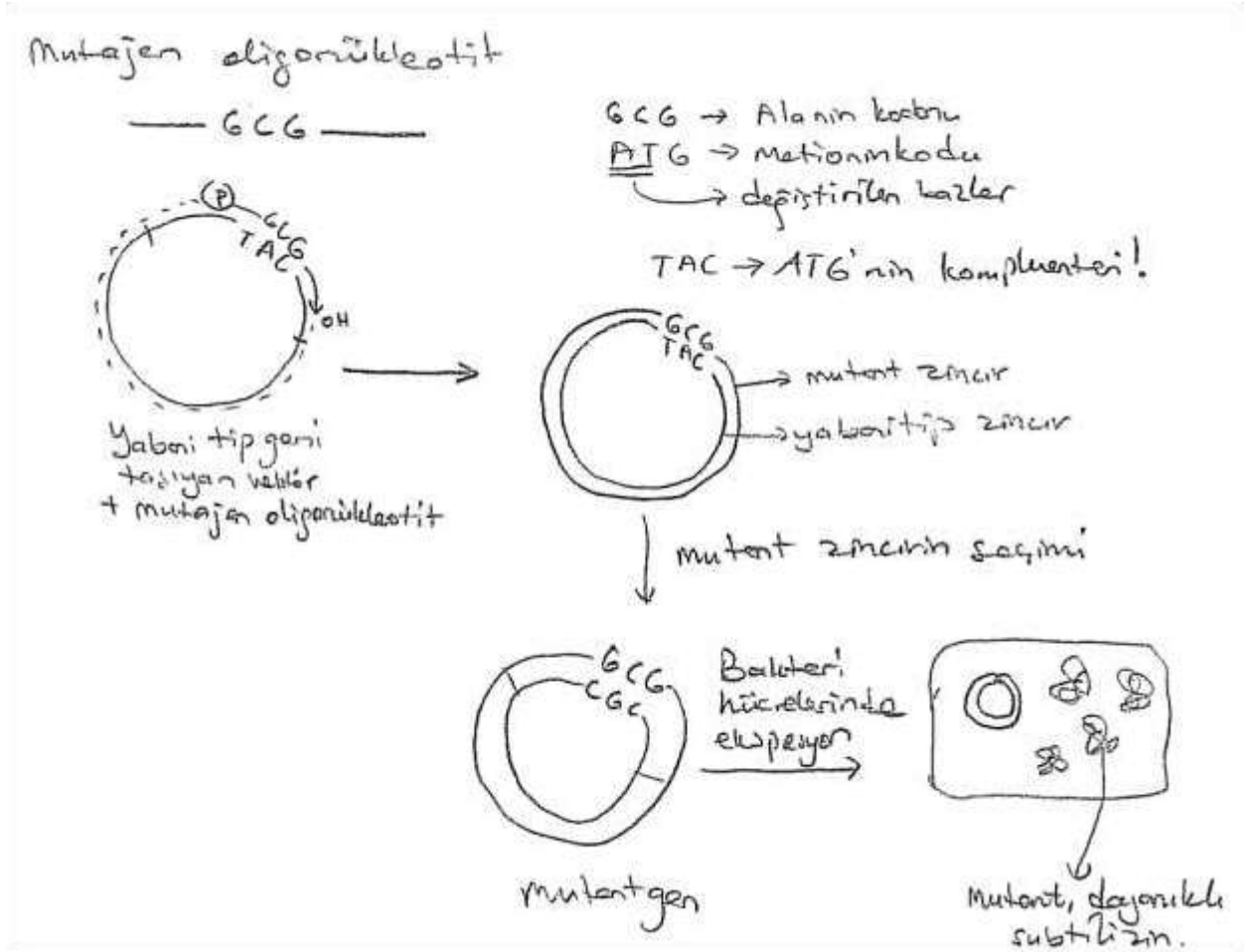
Bu sıkı gereklilikler en iyi **subtilizinler** tarafından sağlanır. Subtilizinler *Bacillus* türlerinin sporlanmaları sırasında salgılanan bir proteolitik enzim grubudur. *B. licheniformis*'in subtilizinleri oldukça tercih edilen özelliklere sahiptirler ve deterjan katkısı olarak yaygın bir şekilde kullanılırlar. Subtilizin enzim grubu, geniş bir substrat aralığına sahiptir, pH optimumu 9'dur, proteinleri hızla suda çözünür oligopeptitlere dönüştürürler. Aynı zamanda uygun sıcaklık stabilitesine sahip olup 65°C'ye kadar yüksek sıcaklıklarda noniyonik deterjanlar içinde aktiftir.

Subtilizinler proteolitik enzimlerin **serin proteaz** sınıfının bir üyesidir. Üçlü bir amino asit grubu kataliz işlevinde rol alır. Ser-221 katalitik merkez olarak, His-64 bir genel baz ve Asp-32'de His-64'ün doğru formda stabilizasyonunu sağlamak üzere iş görürler. Kataliz için bir metal iyonuna ihtiyaç duyulmaz, dolayısıyla enzimin aktivitesi kelatlayıcı ajanların varlığından etkilenmez.

6.1.1 Subtilizin'in genetik mühendisliği teknikleriyle iyileştirilmesi

Subtilizin'in enzimatik aktivitesi perborat varlığında yavaşça azalmaktadır. Ayrıca enzim hidrojen peroksit ile oksidasyona oldukça duyarlıdır. Sıcaklık 60°C'nin üzerine çıktığında perborattan hidrojen peroksit açığa çıkmaktadır. Enzimin aktif merkezini oluşturan Ser-221'e bitişik Met-222'nin oksidasyonu enzimatik aktivitenin % 90 azalmasına neden olmaktadır (% 10 aktif). H₂O₂ ile subtilizinin inaktivasyonu bu enzimi içeren deterjanların üst sıcaklık sınırını düşük tutmakta ve bir çeşit sınırlayıcı rol oynamaktadır. Bununla beraber genetik mühendisliği (rekombinant DNA teknolojisi) oksidantlara (H₂O₂!) daha dirençli subtilizinlerin üretimine izin vermiştir.

Oksidatif inaktivasyon probleminin çözümü subtilizin proteininin yapısının, “bölgeye özel modifikasyonu”nda yatmaktadır (Şekil 6.1). Met-222 doğrudan katalitik aktivite ile ilgili olmadığı için, enzimin katalitik aktivitesi değişmeden Met-222, diğer bir amino asite değiştirilebilir. Protein mühendisliği olarak da isimlendirilen bir rekombinant DNA tekniği olan oligonükleotit-yönlendirilmiş mutasyon tekniği kullanılarak Met-222'nin Ala-222'ye değiştirilmesiyle elde edilen subtilizinler 1 M H₂O₂'te maruz bırakıldığı durumlarda, yabancı tip enzimin katalitik aktivitesinden % 53'üne sahiptir. Böylece yüksek sıcaklıklarda perborat varlığında (H₂O₂ kaynağı!) bu rekombinant enzim %53 verimlilikle kullanılabilir. Doğal enzim aynı şartlar altında %10'luk bir verimlilikle çalışmaktadır.



Şekil 6.1: Oligonükleotit-yönlendirilmiş mutasyon tekniği uygulanarak subtilizinlerin oksidantlara direncini artırmak üzere bir amino asitin değiştirilmesi.