

Mikrobiyal Proteinlerin Yüksek Düzeydeki Nükleik Asitlerini Azaltma Yöntemleri

Dr. Mustafa ÖZYURT

Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi,
İSTANBUL

Tarımsal ve endüstriyel artıklardan mikroorganizmalar kullanılarak elde edilen mikrobiyal proteinler (tek hücre proteinleri) bugün için hayvan yemi olarak kullanılabilir (8). Ancak dünya nüfusunun hızla artışı gelecekte ortaya çıkabilecek gıda sorunu karşısında, bu kaynaklardan insanlar tarafından da yararlanılabileceğini akla getirmektedir. Mikrobiyal proteinlerin insan gıdası amacıyla kullanılmasında bu nonkonvansiyonel besin kaynaklarının yüksek orandaki nükleik asit içerikleri bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sorun çeşitli yöntemler kullanarak mikrobiyal proteinlerin nükleik asitlerinin daha düşük düzeye indirilmesi çalışmalarıyla çözümlenmeye çalışılmaktadır. Mikroorganizmaların nükleik asit içeriği (6) : Algler : % 3-8, mayalar : % 6-12, bakteriler : % 8-16; fungusların da % 10'dan azdır.

Purin bazları guanin ve adenin ürik asit'e metabolize olur. Diyetle ilgili nükleik asit nükleazlar tarafından pankreas suyunda depolimerize olur ve sonra absorpsiyondan evvel barsak enzimleri tarafından nükleosidlere çevrilir. Ürik asidin çözünürlüğü sınırlı olduğundan, gut hastalığındaki şartlara benzer şekilde, artan plasma konsantrasyonunun dokularda ve eklemlerde üreat çökeltisiyle sonuçlanacağı beklenebilir. Böbreklerde ve mesanede taşlar teşekkül edebilir.

Yakın zamanlarda, tek hücre proteininin (kurutulmuş mikrobiyal hücreler) nükleik asit içeriğinin azaltılmasıyla ilgili olarak birçok yöntem bilimsel makalelerde anlatılmış veya patent olarak açıklanmıştır. Nükleik asit içeriğinin azaltılmasında aşağıdaki yöntemler kullanılır (15) : 1. Fermentasyon sırasında nükleik asit sentezinin sınırlandırılması, 2. Azaltılmış

nükleik asit içeren protein izolatlarının veya konsantrelerinin üretimi, 3. Çeşitli kimyasal maddelerin faaliyetiyle bütün hücrelerden nükleik asitlerin hidrolizi ve ekstraksiyonu, 4. Exojen (örneğin bovin pankreatik nükleaz, mikrobiyal fosfodiesteraz) veya endojen (RNase) enzimler kullanarak. Bu işlemlerde kullanılacak mikroorganizmalar *Paecilomyces varioti*, *Candida lipolytica*, *C. utilis* ve *C. tropicalis*'dir.

Trevelyan'a (13) göre Baker's mayasının pH 1.4'de sodyum klorür ile ekstraksiyonu RNA içeriğini azaltmanın en verimli yöntemidir. Bunun en belirgin özelliği maya hücrelerinin çok az protein kaybıdır. Hayakawa ve Nomura (3) ICM (Impact-Cell-Mill) yönteminin alkalik ekstraksiyon yönteminden % 20-30 daha yüksek nükleik asit değeri gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Heden ve Molin'e (4) göre nükleik asit alımı günlük 2 gramı geçmemelidir ki bu yaklaşık 10-15 gram mayaya eşdeğerdir. Gierhart ve Potter (2) alkali hidrolizi, enzimik yöntemler ve tamponla yıkama gibi çeşitli yöntemlerle *C. utilis*'in RNA içeriğini % 45-97 oranında düşürerek % 8 gibi bir düzeye indirmeyi başarmışlardır. Schlingmann ve Praeve (11) ise hücre duvarı ve membran lipidlerinin alkol, amonyak solventleriyle eritilmesi ve nükleik asitlerin (DNA + RNA) su ile ekstraksiyonu sonucu yüksek besleyici değeri olan tek hücre proteini elde etmişlerdir. Fencil ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (1) *Candida utilis*, *C. lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* veya *Escherichia coli* proteinleri alkali pH'da ve 4-10 C°'de hücrelerin parçalanmasıyla izole edilmiş, hücre duvarlarının çıkarılması, asidifikasyonla proteinin çökeltmesi, lipidlerin ekstraksiyonu Me₂CHOH ve kurutmaya yapılmıştır. Hücre duvarının çıkarılmasından sonra elde

edilen protein süspansiyonu nükleik asitleri indirgeyen nükleazı aktivite etmek amacıyla 53-60°'de pH 5.9-8.0 olarak bir saat ısıtılmıştır. Elde edilen proteinler insan ve hayvan beslenmesinde yararlı olarak saptanmıştır. Oliveira'ya göre (7) gıda amacıyla kullanılacak maya hücrelerinin nükleik asitlerinin azaltılması maya kültür şartları ile bir dereceye kadar kontrol edilebilir. Bu kontrol faktörlerinin en önemlileri C/P oranı, kullanılan azot kaynağının tipi ve mayanın eldesi sırasındaki gelişim fazı'dır. Bu kültür şartları kültürasyondan sonra hücre materyelinin hidrolizi ile birleştirildiğinde son derece düşük içerikli nükleik asit elde etmek mümkündür. Bu işlemle mayanın günlük doz alımı ile birlikte insan gıdası amacıyla kabul edilebilirliği de artacaktır. Revoy'un çalışmasında (9), *Candida tropicalis* veya *C. lipolytica* tarafından parafin içeren besiyerinin fermentasyonu ile elde edilen proteinlerin nükleik asit yüzdesi hücre materyelinin Me₂CHOH-H₂O ile ön işlemi ve daha sonra NaOH veya KOH ile ekstraksiyonu ile düşürülmüştür. Bu işlemle nükleik asit içeriği % 8'den % 2'ye indirilmiştir. Tannenbaum ve arkadaşları (12) mayalardaki (*Candida utilis*, *C. intermedia*) nükleik asit konsantrasyonunu mayanın 60-70 C°'de 2-20 saniye arasında ısı şokuyla ve daha sonra inkübasyonu ile azaltmışlardır. Bu şekilde, Miller ve Johnson'un besiyerinde sürekli kültürde pH 4'de üretiminden sonra *C. utilis*'in nükleik asit konsantrasyonu % 7 olarak bulunmuştur. Uemura ve arkadaşlarının çalışmasında (14) mikrobiyal hücrelerin parçalanmasından sonra mikrobiyal protein alkali ile ekstrakte edilmiş, alkali solüsyon asidik pH'ya ayarlanmış, homojenize edilmiş ve divalent metal

tuzu katılmıştır. Böylece 5.1 baker's maya hücreleri süspansiyonu 800 kg/cm²'de yüksek basınç homojenizerinde muamele edilmiş ve protein pH 10.5'da parçalanmış hücrelerden ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon pH 6.0'ya ayarlanmış, 45-50C°'ye kadar ısıtılmış ve 400-500 kg/cm²'de homojenize edilmiş, % 5.0 NaCl katılmış, homojenat 20 dakika karıştırılmış ve sonra % 1.1 CaCl₂ ilâve edilmiştir. Çökelti santrifüj edilmiş, suyla yıkanmış ve liyofilize edilmiştir. Nükleik asit oranı % 1.8 olarak bulunmuştur. Diğer bir yöntemde (5) hücrelerin ayrılmasından önce kültür pH'sı ≤ 5'e düşürülmüş, süspansiyon ≤ 60C°'ye ısıtılmış ve pH 6-10'a yükseltilirken sıcaklık 60C°'de tutulmuştur. Bu, hücre homojenizasyonu olmaksızın hücre duvarlarını nükleik asit geçişine geçirgen yapar. Daha sonra ayrılan hücreler vakumla kurutulmuştur. Bu yöntemi kullanarak *Pseudomonas methylotropha*, *P. fluorescens* ve *P. alcaligenes*'de nükleik asit düzeyi % 10.1; 11.7 ve 11.6'dan % 3.5; 4.7 ve 4.9'a düşürülmüştür. Shetty ve Kinsella (10) hücre ayrılmasından sonraki suksinilasyonun yüksek ürün değerinde ve % 2'den daha düşük nükleik asit içeren maya proteininin izolasyonunu kolaylaştırdığını saptamışlardır.

Yukarıdaki açıklamalardan da anlaşılacağı gibi mikrobiyal proteinlerin yüksek nükleik asit içeriği çeşitli yöntemler uygulanarak daha düşük düzeye indirilebilmektedir. Burada tek sorun, bu işlemlerin mikrobiyal proteinlerin maliyetini ne kadar arttırabileceği ve ekonomik olup olmayacağıdır. Bununla birlikte besin kapasitesi milyarlarca insanı beslemekte yetersiz kalacak bir dünyada ekonomik faktörlerin ikinci plânda kalacağı ileri sürülebilir.

KAYNAKLAR

1. Fincl, Z. et al. 1974. Yeast proteins of low nucleic acid content for human and animal nutrition. Czech. Appl. 4170-4172.
2. Gierhart, D.L. and Potter, N.N. 1978. Effects of ribonucleic acid removal methods on composition and functional properties of *Candida utilis*. J. Food Sci. 43 (6), 1705-1713.
3. Hayakawa, I. and Nomura, D. 1977. Preparation of single cell protein (SCP) for food and improving of its spinnability. Agric. Biol. Chem. 41 (1), 117-124.
4. Heden, C.G. and Molin, N. 1971. The Productivity of microorganisms-a catalytic factor for research and transdisciplinary cooperation. «Microbes and Biological Productivity», p.1. Ed. by D.E. Bughes and A.H. Rose. Comb. Un. Press.
5. Imperial Chemical Industries Ltd 1975. Treatment of unicellular proteins. Brit. Appl. 75/29, 841.
6. Kihlberg, R. 1972. The microbe as a source of food. Annual Review of Microbiol. 26, 427-466.

7. Oliveira, S.J. 1976. The reduction of the nucleic acid content in the yeast *Candida utilis*. *Ind. Aliment. Agric.* 93 (6), 689 - 693.
8. Özyurt, M. 1977. Mikrobiyal protein'in hayvan yemi olarak kullanılması. *Gıda*, yıl: 2, sayı: 2-4, 109 - 112.
9. Revoy, A.J.P.E. 1973. Proteins with low nucleic acid content by fermentation. *Brit Appl.* 6213/73.
10. Shetty, K.J. and Kinsella, J.E. 1979. Preparation of yeast protein isolate with low nucleic acid by succinylation. *J. Food Sci.* 44 (3), 633 - 638.
11. Schlingmann, M. and Praeve, P. 1978. Single cell proteins with reduced nucleic acid and fat content. *Fette Seifen Anstrichm.* 80 (7), 283 - 286.
12. Tannenbaum, S.R. et al. 1973. Reducing the nucleic acid content in yeast. *Appl.* 53, 263.
13. Trevelyan, W.E. 1978. Processing yeast to reduce its nucleic acid content. Induction of intracellular RNase action by a simple heat-shock procedure and an efficient chemical method based on extraction of RNA by salt solution at low pH. *J. Sci. Food and Agric.* 29 (2), 141 - 147.
14. Uemura, M. et al. 1976. Microbial protein lower in nucleic acid. *Japan Appl.* 74/143, 462.
15. Viikari, L. and Linko, M. 1977. Reduction of nucleic acid content of SCP. *Process Biochem.* 12 (4), 17 - 19.

