

## Endüstriyel Mikroorganizmaların Genetik Programlanması

Yard. Doç. Dr. Emir CANSUNAR

H. Ü. Fen Fak. Biyoloji Böl. Uygul. Mik. Birimi, Beytepe — ANKARA

Bir mikroorganizma, amaçları doğrultusunda evrimleşmiş, oldukça karmaşık bir makina olarak değerlendirilebilir. Bu amaçlar : **Yaşamını sürdürme** ve **çoğalma**'dır. Wild-type veya «sokak tipi» bir bakteri veya maya hücresi, doğal seleksiyon sonucu çevresiyle ve çevresindeki diğer mikroorganizmalarla rekabet etmeye adapte olmuş durumdadır. Ancak, bu hiçbir zaman insanın ihtiyacı olan bir maddeyi yapmaya adapte olmuş anlamına gelmez. İşte, modern endüstriyel mikrobiyoloji, genetik olarak istenen bir metabolik ürünü yapmaya programlanmıştır veya böyle bir mikroorganizmayı «anormal» bir tip olarak doğada bulmayı amaçlamaktadır. Aslında normal koşullarda mikroorganizmadan beklenen metabolit, o mikroorganizmanın enerji kaynaklarını kurutacak düzeydedir. Ama bu yüksek dozdaki ürün isteğini, ancak «anormal» olarak adlandırabileceğimiz tipler sağlayabilmektedir.

Mikrobiyolojik proseslerin kontrolü ve gelişimi yolundaki ilk adımlar ancak yüz sene kadar öncelere dayanmaktadır. İstenen ürünleri yapabilen bakteri veya funguslar, izole edilir ve saf kültür halinde üretilip, istenen amaç doğrultusunda kullanılırdı. Mikrobiyal genetik kavramının yakın zamanda ortaya çıkmasıyla, özel endüstriyel suşların üretilmesi de başlamış oldu.

Önce mutasyon mekanizmaları keşfedildi. Bunda, kalıtsal bilgiyi taşıyan gen, yeni bir şekle sokulabiliyordu. x ışınları kullanılarak yapılan mutasyon çalışmaları 1927'lere dayanmaktadır. 1945'den sonra diğer mutajenik ajanların bulunması, mikrobiyologlara kültürlerinin genetik kompozisyonunu değiştirme yönünde önemli fırsatlar yarattı. 1940'ların ortalarında, aynı zamanda iki veya daha fazla mikroorganizmanın genlerinin rekombinasyonu sonucu yeni tipler elde etme çalışmaları da devam etmekteydi.

2. Dünya Savaşı'nı takip eden yıllarda, fermentasyon endüstrisinde önemli değişiklikler oldu. Bunların başında antibiyotik üretimi gelmekteydi. Penisilin savaş sırasında üretilmişti. Bunu giderek artan ölçüde bakteriyel ve fungal

hastalıklara etkili diğer antibiyotiklerin üretimi izledi. Sonraları, amino asitler veya nükleotidlerin mikroorganizmalarca üretildiği yeni fermentasyon tipleri geliştirildi. Bu kimyasal maddelerin ekonomik olarak «normal» mikroorganizmalarca üretilmesine olanak yoktu. Ancak bazı genetik manipulasyonlar sonucu sentezlenebiliyorlardı. Bu nedenle, fermentasyon teknolojisindeki gelişmeye paralel olarak mikrop genetiği de ilerledi.

1973'lerde DNA yapısındaki yeni bulguların ışığında yeni teknikler ortaya atıldı. Buna göre değişik kaynaklardan genler, mikroorganizmalara transfer edilebilecekti. Böylece, insan insülin'i veya büyüme hormonları gibi yeni ürünlerin özel endüstriyel suşlarca sentesi söz konusu olacaktı. Nitekim, bunlar başarılıydı. Bunun yanı sıra, klasik mikrobiyolojik ürünlerin de daha kusursuz hale getirilmesinde büyük ilerlemeler kaydedildi.

«Normal» bir bakteri veya fungustan «israrlı» bir endüstriyel mikroorganizma oluşturmak için genetik bilgisi o şekilde değiştirilmelidir ki, istenen özellikler belirginleşsin, istenmeyenler ortadan kalsın. Bu tip değişiklikleri yapmanın bazı yolları vardır. Bu yol, mutasyonları kullanmak veya oluşmasını sağlamaktır. En basit mutasyon tipi, nokta mutasyonu'dur. Bunda bir baz çifti (A-T) yerine bir başka çift (ör. G-C) gelmektedir.

Bu tip değişiklikler, herhangi bir DNA da kendiliğinden zaman içinde olabilir. Fakat bu, yüz milyon replikasyonda olabilecek bir şeydir.

Mutasyon sıklığı, mikroorganizmalar U.V., x gibi ışınlara veya özel kimyasal maddelerle muamele edilecek olursa en az bin kez artırılabilir. Mutagenlerin genler üzerine olan etkisi tesadüfidir. Her ajanın özgül olarak etki yaptığı baz veya bazlar olabilir. Örneğin U.V. radyasyonu bir DNA ipliğindeki komşu timin bazlarının dimer oluşturmaya neden olur. Bu nedenle, belli bir gende isteyerek bir mutasyon oluşturmak son derece zordur. Mutasyon

ile bir suşu geliştirmek için bazı duyarlı deneyler yapmak gerekir. Bazı yöntemler doğrudan uygulanır. Üremeyi inhibe eden bir kimyasal maddeye dirençli bir tip bulmak için, bu maddeyi içeren besi yerlerine çok sayıda bakteri ekilir. Ortamda ancak dirençli olanlar üreyeceğinden, bunlar izole edilebilir. Diğer tip mutantlar için rastgele seçilmiş koloniler ayrı ayrı denenerak özellikleri saptanmaya çalışılır ki, bu oldukça zahmetli ve uzun bir yoldur.

Mutasyonla yeniden programlamada endüstriyel mikroorganizmaların özellikle iki tip ürün eldesi için geliştirilmeleri çok farklı çalışmalar gerektirir. Bu ürünler amino asitler ve antibiyotiklerdir.

Lizin hayvan beslenmesinde esansiyel bir amino asittir. Hayvanlar bunu sentezleyemezler. Birçok bitki proteini de bu amino asiti içermez. Bu nedenle, lizin fermentasyon yoluyla sentezlenip, hayvan yemlerine katılır. Sentez işleminde, fermentasyon ortamındaki şekerin 1/3 ünden fazlasını, ortamın 1 litresinde 75 gr lizin olacak şekilde kullanabilen mutant **Brevibacterium flavum** ve **Corynebacterium glutamicum** suşları kullanılır. Bu bakteriler lizin, metabolik yoldaki son ürünlerden biridir. Diğer ürünler methionin ve threonin dir. Normalde bu ürünler, belli bir yoğunluktan sonra, son ürün inhibisyonu ile baştaki enzimi inhibe ederek daha fazla lizin sentezini sağlamaktadır.

Birinci tip mutantda, homoserin dehidrogenaz enzimini kodlayan gen çalışmamaktadır. Bunun sonucu olarak, ürünlerden olan threonin ve methionin sentezlenememektedir. Bu okzotrof, ortamda ancak üremeyi sağlayacak fakat aspartat kinaz'ı inhibe etmeyecek düzeyde threonin ve methionin ile üretilecek, olursa, lizin'e giden metabolik yol tam hızla çalışacaktır.

Okzotrofik mutantlar mutagen ile muamele edilmiş binlerce koloni denenerak bulunmaktadır. Bunlar, uygun büyüme faktörlerinin eksik olduğu ve penisilin içeren ortamlara, mutajenize kültürler ekilerek daha verimli olarak izole edilebilmektedirler. Penisilin sadece üremekte olan bakterileri öldürdüğünden, okzotroflar büyüyememekte ve böylece kurtulmaktadırlar. Mutasyona uğramamış olanlar ise ölmektedirler.

Değişik bir mutant ise, aspartat kinaz'ın değişmiş bir formudur. Bu, enzim olarak iyi görev yapmakta ancak lizin ile reaksiyona girmemektedir. Böylelikle de son ürün inhibisyonu yapamamaktadır. Sonuçta, fermentörde yüksek oranda lizin birikmektedir. Bu mutantlar AEC adlı bir maddeye karşı dirençli olmalarından yararlanılarak seçilmektedirler. AEC, lizin'e çok benzemekte ve ortamda lizin sentezlenmezken bile, aspartat kinaz'ı inhibe etmektedir. Böylece normal suşlar ölmekte, zira lizin eksilmekte, mutantlar ise üreyebilmektedirler. Zira mutantlar AEC den etkilenmemektedirler.

Antibiyotikler ise çok farklıdırlar. Bazı küfelerin, actinomyces'lerin ve sporlanan bakterilerin yaşamlarını belli dönemlerinde sentezlenirler. Genetik kontrolleri henüz çok iyi anlaşılmış değildir fakat oluşan antibiyotik miktarının da birçok faktörde bağlı olduğu bilinmektedir. Hücrenin metabolizması (C, N, P v.s. içermesi) antibiyotik yapımı için bir etkendir.

Antibiyotik verimi yüzlerce gen tarafından kontrol edildiğinden, tek bir mutasyon ile normal bir suşun 1-2 mg/Lt. lik antibiyotik üretimini ekonomik düzeylere çıkarmak imkansızdır. Günümüzde, 20 gr/Lt. düzeyinde penisilin veya tetrasiklin, geliştirilmiş **Penicillium chrysogenum** ve **Streptomyces aureofaciens** endüstriyel suşlarından elde edilmektedirler. Bu «gari» suşlar, birçok mutasyon ve seleksiyon işlemlerinden geçirilerek elde edilmişlerdir. Her aşamada kültür, mutagen ile muamele edilmekte ve kalan binlerce koloni incelenmektedir. Eğer belirgin bir verimlilik artışı gösteren bir mutant'a rastlanırsa, bunun üzerinde yeni mutasyon ve tarama çalışmalarına geçilmektedir. Bu yolla, organizmanın evrimi doğal olmayan bir yola çevrilmiş olur. Bu çalışmalar, ekonomik düzeyde antibiyotik üreten bir mutant bulununcaya dek devam eder. Böyle bir araştırma, uzun, yorucu ve sonucu önceden kestirilemeyen bir çalışmadır. Zira, antibiyotik düzeyi sadece genlerin değil, kültürasyon koşullarının da etkisindedir. Verim artırıcı çalışmanın başlarında, petri kabındaki koloniler sayılırken, sonlarda, gelişmiş mutantın normal üretim koşullarında, yani 80.000 litrelik dev fermentörlerde denemesi, oradaki davranışının da incelenmesi gerekmektedir. Halen, bu tip fer-

mentörlerde 20 senelik bir çalışma sonucu elde edilmiş özel suşlarla üretim yapılmaktadır. Mutasyon bir mikroorganizmanın genlerini değiştirir. Genetik progamada diğer bir yöntem olan rekombinasyon da, genleri veya genlerin bazı bölgelerini yeniden düzenleyerek, iki veya daha fazla organizmadaki özelliklerin tek bir mikroorganizmaya toplanmasına neden olur.

Bakteriyel veya ökaryotik kromozomların DNA baz dizilişleri aynı veya benzerse, homolog rekombinasyonla bu hücreler bir araya geldiklerinde yeni rekombinantlar oluşur. Ökaryotlarda ise, eşeyli üreme yeni bir karışım ve yeni fertlerin ortaya çıkmasına neden olur.

Normalde, yakın türlerin fertleri başarıyla birleşir. Ancak, uzak türlerin rekombinasyonunu önleyen doğal engellerin ortadan kaldırılması gerekir. Bu da, protoplastların oluşturulmasıyla sağlanabilir. Bakteri veya fungusların sağlam duvarları lizozim ile yok edilirse, alttaki ince hücre membranı ortaya çıkar. Hücre membranları birçok türde aynı yapıda olduğundan, bunlar birleştirilerek (polietilen glikol yardımıyla) hibrid oluşturulmakta, böylece genlerin rekombinasyonu için zemin hazırlanmaktadır.

Protoplast birleşmesi, normalde birleşmeleri seyrek organizmalarda, sıklığı artırma açısından etkili bir yöntemdir. Örneğin *Streptomyces*'lerde, hücre duvarı lizozimle muamele sonucu eritilmekte, hücrenin ozmotik şoktan patlamaması için de şekerli su içinde tutulmaktadır. Protoplastların birleşmesi sağlandıktan sonra, hibrid hücrelerin tekrar hücre duvarı sentezi yapmaları beklenmektedir. Bu işlem oldukça etkilidir. Yaklaşık 5 hücreden 1'inde yeni kombinasyonlu genler oluşmaktadır. Bu yolla, mutant hücre gruplarını bir seferde birleştirerek, antibiyotik verimi yüksek tipler oluşturulabilir.

Rekombinasyon için plazmid transferi de kullanılabilir. Bir bakteriden diğerine, konjugasyon, transformasyon veya transdüksiyon yoluyla genlerin aktarılması mümkündür. Örneğin, petrol hidrokarbonlarından bir sınıfı parçalama özelliği taşıyan *Pseudomonas putida*, tekraranan çaprazlamalar sonucu, normalde tek bir türde bulunmayacak 3-4 hidrokarbon parçaları-

cı plazmide sahip duruma gelmiştir. Bu türler, petrol kirlenmeleri veya tankerlerin temizlenmesinde kullanılmaktadır.

İlke olarak mümkün, pratikte ise oldukça zor bir çalışma da, istenilen bir genin klonlanmasıdır. Örneğin, insulin geni... Bunun için, insan DNA sını gen büyüklüğünde parçalara ayırıp *E. coli* ile aynı ortamda koyarak, transforme bakterileri aramak şeklinde bir yöntem düşünülmüştür. Bu hücreler bulunmuştur da. Ancak bu bakteriler hiçbir zaman insulin fabrikaları değillerdi. Zira, ökaryot genleri intronları nedeniyle ifade edilemiyorlardı. Bu yüzden, yapay bir gen gerekiyordu. Bu konuda diğer bir yaklaşım ise, insan pankreas hücrelerinden (insulin yapan) mRNA izole etmektedir. Bu hücreler mRNA ca zengindir. Intronları da atılmıştır. RNA dan DNA sentezleyen reverse transkriptaz enzimiyle yapay bir DNA kopyesi yapılabilir. Bu kopya DNA parçası da klonlanabilir.

Başka bir seçenek de, eğer bir protein'in amino asit dizilişi bilinirse-ki insulin'in bilinmektedir. -genetik kodu oluşturacak DNA nükleotidleri bir araya getirilerek yapay bir gen oluşturabilir. Bu kısa proteinler de yapılmıştır. «Gen makinaları» nın ortaya çıkmasıyla bu metod daha kullanılabilir hale gelmiştir.

Doğa! olarak bu konuda çözülmesi gereken sorunlar vardır. Ne kopya DNA, ne de yapay genler uygun bir promotor bölgeye sahip değildirler. Bunun için genin, bakteri tarafından ifade edilebilmesi için uygun yerlerden kesilmesi ve bakteriyeye iletilmesi gerekmektedir. Buna ek olarak, bakterilerin hücre içine giren yabancı proteinleri parçaladıkları bilinmektedir. Bu yüzden konakçı bakterinin, protein parçalayan bu tip enzimlere sahip olmayan bir mutattan seçilmesi gerekir. Fakat, ticari baskı o kadar büyüktür ki, bu tip proteinlerin (insulin, interferon, büyüme hormonu) üretilmesindeki engeller mutlaka yenilecektir. «Gen makinaları» nın bazı değişik tipleri halen kullanılmaktadır. Bunlar, istenilen dizide kısa, tek zincirli DNA parçacıklarını otomatik olarak ve çok kısa sürede sentezlemektedirler. Burada bir mikroprosesör kontrolünde bazların ve çeşitli solventlerin bulunduğu bölümler istenilen sırayla açılmakta, bunlar bir pompa aracılığıyla bir sentezleyici kolon'dan geçmektedir. Kolon, ince kum iriliğinin-

de silika tanecikleriyle doludur. Her tanecik, üzerinde DNA moleküllerinin olduğu bir dayanak yeni olarak görev yapmaktadır. Her silika taneciğine daha önce bir baz 3' ucundan bağlanmış durumdadır. 5' uçları açıkta olduğundan, mikroprosesörün pompaladığı ikinci bir nükleotid'den milyonlarcası istenmeyen reaksiyonlara karşı 5' uçları korunmuş olarak, bu raya bağlanırlar. Böylece, koruyucu ajan ortadan kaldırılınca, 5' ucu açığa çıkar ve pompala-

nan nükleotid bu uca bağlanır. Bu yolla yaklaşık 40 nükleotidlik zincirler, her 30 dakikada bir nükleotid olmak üzere sentezlenir. Tamamlanan zincirler, silika'dan ayrılarak, toplayıcılara gelir.

Endüstriyel mikrop genetiği şimdilerde «asır» süresini doldurmuş bulunmaktadır. Bir kaç yıl önce düşünülmemeyen teknikler, bugün uygulama aşamasındadır.

#### KAYNAKLAR

1. Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering. D. A. Hopwood, W. H. Freeman Comp. San Fransisco, 1981.
2. Plasmids. P. Broda, W. H. Freeman and Comp. S. F. 1979.
3. Industrial Microbiology. Brinton M. Miller and Warren Litsky. Mc. Graw-Hill Book Comp. London, 1976.
4. Genetics of Microbes. Brian W. Bainbridge. Blackie Book Comp. England, 1980.