

## Mikrobiyal Enzimler Ve Biyoteknolojik Yolla Rennin Üretimindeki Gelişmeler \*

D.: Şeminur TOPAL

TÜBİTAK-MAE, Beslenme ve Gıda Tek. Böl. Araştırma Uzmanı

Enzimler hakkındaki bilgiler eskilere dayanmakla birlikte, mikrobiyal yolla üretimi yakın geçmişte önem kazanmıştır. Yaşayan hücreden aktif enzimin ayrılabilmesi ilk kez 1897'de Buchner tarafından gösterilmiş ve mayanın alkol fermantasyonunun başlangıcında katılması yerine, yaşayan hücre olmadan maya özütünden yararlanılmıştır. Yine küf enzimlerinin ilk kez ticari kullanımları 20. yüzyılın başında, bakteriyel enzimlerin kullanımı ise 1. Dünya Savaşı sırasında olmuştur (CASIDA, 1968).

Mikrobiyal enzim üretiminde fermentasyon metodlarının gelişmesi, çevre koşullarının kontrol altında tutulması ve doğru suşların seçimi ile üretim potansiyeli artmakta ve miktar sınırlandırılması faktörü de ortadan kalkmaktadır. Bu nedenle endüstriyel yolla enzim üretiminde mikroorganizmaların kaynak olarak kullanılması, yetersiz olan üretimde artış sağlanması bakımından en büyük avantajdır.

Diğer bir avantaj da doğru mikroorganizma ve suşlarının seçimi ve iyi bir planlama ile çok sayıda enzim üretiminin mümkün oluşudur (Çizelge 1). Genellikle bu enzimlerin atmosferik basınçta, 3-9 gibi geniş bir pH aralığında, pek çoklarının 45 - 55°C'lerde ağırıklı olmak üzere (bir grubun da 25 - 90°C'ler arasında) çalışabilmesi avantajdır. Ayrıca etki spesifikliği nedeniyle doğru kullanımında istenilen son ürünün mutlak elde edilebilmesi, arzulanan önemli özelliklerindedir.

Ayrıca yatırım masrafının nispeten düşük ve fabrika dizaynının kolay olması gibi üstünlükleriyle bugün pek çok mikrobiyal enzim üretim ve kullanımı gerçekleştirilmektedir. Bu enzimler arasında; takadiastaz, amilaz ( $\alpha$  ve glikoamilaz = amiloglikozidaz), invertaz, pektinaz (poligalakturonaz), proteaz (Subtilin, Rennin v.b.), penisilinaz, glikoz oksidaz, lipaz, keratinaz, fosfodiesteraz, glikoz izomeraz, laktaz ( $\beta$ -galaktozidaz), penisilinaçilaz (penisilin amidaz) sayılmaktadır (PEKİN, 1983).

Dünyadaki endüstriyel enzim üretimi 1985 yılı tahminlerine göre 75000 tondur. Bu üretimin parasal değeri ise, 600 milyon Amerikan Doları olup; % 60'ı proteinaz, % 30'u karbonhidraz, % 3'ü lipaz ve % 7'si de diğer özel amaçlı enzimlerdir (SHEPPARD, 1986).

Bugün endüstriyel olarak mikrobiyal enzim üretiminde en çok kullanılan 11 küf, 8 bakteri ve 4 maya vardır. Bunlar toksikolojik açıdan incelenerek, özellikle gıda üretimlerinde kullanılabilmeye elverişliliği bildirilmiştir. Gıdalarda enzim kullanımına ait örnekler olarak; nişasta ve unlu ürünler yumuşak içecekler, şeker şurupları, bira, şarap gibi alkollü içki endüstrisi, peynircilik, çerez ürünleri, ekmekçilik, meyve ve meyve suyu endüstrisi, yumurta konsantreleri, aroma ve renk maddeleri, modifiye proteinler, hidrolize bitki proteinleri, diyet gıdalarındaki uygulamalar verilebilir (KLİBA-NOV, 1983; SHEPPARD, 1986).

### MİKROBİYEL ENZİM ÜRETİMİ :

Mikrobiyal enzim üretiminin başlangıç yıllarında az sayıda mikroorganizma ile çalışmalara başlanmıştır. Ancak çalışmalar ilerledikçe, gelişen saflaştırma tekniklerine de bağlı olarak birçok farklı ekstrasellüler enzimin fermantasyon ortamından izolasyonu mümkün olmuştur.

Mikrobiyal enzim üretiminde ilk basamak, özgün enzim üretme özelliğine sahip, uygun mikroorganizma kültürünü seçmektir. Bu suşların stabil ve yüksek verimli olma özellikleri yanında, aşağıdaki hususlar da seçimde göz önüne alınmalıdır. Buna göre;

- 1) Amaçlanan üretime uygun suşlar seçilmelidir.
- 2) Patojenik veya toksik özellikte olmayan suşlar seçilmelidir.
- 3) Seçilen suşlar biyolojik stabilite göstermelidir.

(\*) TARMİK, 1987 Dizi Seminerlerinde Sunulan Tebliğden özetlenmiştir.

- 4) Saf ve çok iyi koşullarda saklanmış, mutasyona uğramamış, canlı ve aktif suşlar olmalıdır.

Her kültürün kendine özgü bir çevre optimumu bulunmaktadır. Proses kontrolünde primer olarak önem taşıyan fiziksel değişkenler sıcaklık, basınç, pH, oksijen ihtiyacı v.b. faktörlerdir. En önemli çevresel isteklerden biri de yüksek ürün eldesi için uygun besi ortamının sağlanmasıdır. Üretim ortamlarına ali-

nacak ve bir kolleksiyon merkezinden genellikle liyofilize olarak sağlanmış saf kültür için; uygun karbonhidrat, protein ve mineral maddelerce zenginleştirilmiş steril temel besi ortamları gerekir. Genellikle üretim ortam tankı, aynı ortamı taşıyan ana üretim fermentörünün hacminin % 10'u olarak ayarlanır ve çoğaltma süresi 100 saatin üzerinde olabilir. Enzim fermentasyonlarında özgün besi ortamları için kullanılacak ham materyal Çizelge 1 de sunulmuştur.

**Çizelge 1. Enzim Fermantasyonları İçin Kullanılabilecek Ham materyal (\*)**

**Sağladığı Besin Ögesi**

Karbonhidratlar

Proteinler

**Ham Materyal**

Nişasta hidrolizatı, melas, sakkaroz, mısır, arpa, buğday

Soya fasulyesi unu, pamuk tohumu unu, yerfıstığı unu, mısır ıslatma suyu, maya hidrolizatı, peynir altı suyu, gluten

(\*) SHEPPARD (1986).

Ayrıca seçilecek fermentasyon tipine bağlı olarak, sıvı ve katı ortam oluşuna göre köpük kırıcı ilavesi, viskozite ve eriyebilirliği ayarlayıcı faktörlerin düzenlenmesi de önem taşımaktadır. Mikrobiyal enzim üretimindeki safılaştırma basamağında enzimden kolayca ayrılabilen basit inorganik bir ortam, daha kompleks protein yapılı ve enzimden zor ayrılabilen ortama tercih edilebilir. Bu bakımdan ortam seçimi, üretim ve randımanı etkileyen primer faktördür. Bazı mikrobiyal enzim proseslerinde ise, ortamdaki besin unsurlarının fermentasyonun belli dönemlerinde desteklenmesi gerekir. Bu tip proseslerde bütün gereksinimin başlangıçta verilmesi inhibitör etkisi yapabilmektedir (BECKHORN, 1967).

Ortamın pH durumu bir diğer gelişme faktörü olup, oksijen isteği ile birlikte ayarlanmalıdır. Bu faktörler de kullanılan kültürün özgün isteğine göre çeşitli varyasyonlar gösterir. Genellikle enzim üretimlerinde oksijen gereksinimi fazla olan aerobik kültürler kullanılır. Bu nedenle iyi hesaplanmış bir adaptörle fermentasyonlarda ortamın yüzey alanı, hava-

landırma açısından önemli faktördür. Derin fermentasyon tanklarında boru ile fermentöre steril hava verilir ve tüm ortama dağılması sağlanır.

Sıcaklık yine önemli diğer bir faktördür, derin fermentasyonda sıcaklık stabilitesi daha kolay sağlandığı halde, yüzey fermentasyonda sıcaklık havalandırma ile etkilenebilir. Bu faktörler bugünkü üretimlerde kompitürize sistemler ile kontrol edilebilmektedir.

Fermentasyonda kullanılan ekipmanların cinsi de çok önemli olup, paslanmaz çelikten yapılmalıdır. Derin fermentasyon tankları üretim kapasitesine göre değişmekle birlikte 10 - 100 m<sup>3</sup> arasında değişen hacimlerde olabilir. Yüzey fermentasyonda kullanılan tavalar için de, paslanmaz çelik malzeme esastır.

Mikrobiyal enzim üretiminde son ürünün verimliliği, aktivitesi, rengi, stabilitesi ve genel durumunu etkileyen faktörler açısından sterilizasyon ve kontrol yöntemleri, fermentasyon kontrolleri, havalandırma ve karıştırma hızı, fermentasyon süresi v.b. parametreler de

önem taşır. Buna göre söz konusu üretimlerde ham maddeden, bütün fermentasyon koşul ve parametrelerine kadar olay bir bütün olarak ele alınmalıdır (UNDERKOFER, 1972).

#### a — Mikrobiyal Enzimlerin Üretim Teknikleri :

Mikrobiyal enzim üretimi bir fermentasyon tekniği olup, biyolojik sistemde gelişmektedir. Bu biyolojik sistemde iki ana yöntem uygulanmaktadır (UNDERKOFER, 1976).

1. Yüzeysel Fermentasyon Kültür Yöntemi (Surface Culture)
2. Derin Fermentasyon Kültür Yöntemi (Submerged Culture)

Yüzeysel fermentasyon tekniği II. Dünya Savaşından bu yana ticari üretimlerde kullanılmaktadır. Derin fermentasyon tekniği ise daha yeni olmakla birlikte, özellikle aerobik kültürlerin kullanıldığı üretimler için daha yaygın olarak ticari uygulamalara girmiştir. Bu süreçte mikroorganizmalar sıvı ortamda kültüre alınır, tüpler, erlenmayerler, ara ve ana kültür tanklarında üretimi takip eder. Buna göre enzimin ve kültürün durumu dikkate alınarak her iki yöntemden biri seçilir.

#### b — Mikrobiyal Enzimin Biyolojik Sistemden Ayrılması ve Sıfırlanması :

Fermentasyon sonunda genellikle 30 - 50°C olan sıcaklık süratle 5°C civarına indirilir. Böylece hem ürün stabilitesi artar, hem de kontaminasyon riski azalır. Soğutmayı takiben proses gereği katı ve sıvı fazlar ayrılır ki, bu da santrifuj veya filtrasyon ile yapılır. Sıvı fazdaki enzimin sıfırlanması için ise; düşük sıcaklıkta vakum evaporasyon veya ultra-filtrasyon teknikleri uygulanır. Ancak aseptik şartlardaki filtrasyonun öncesinde veya sonrasında kalsiyum tuzları ( $Cl_2$  veya  $PO_4$ ), nişasta hidrolizatı veya şeker alkollerini, sodyum klorit stabilizer olarak; yine sodyum klorit, benzoat veya sorbat da prezervatif olarak kullanılır. Katı enzim konsantratlarının eldesi için aseton, alkol veya inorganik tuzlar [ $(NH_4)_2SO_4$ ], kazein, diatome toprağı, jelatin, laktöz, nişasta kullanılarak, presipitasyon yapılır ve sıcaklığa

stabil olanlar için püskürtmeli kurutucudan yararlanılır. Bunun dışında dondurarak kurutma veya vakumda kurutma tekniklerinden yararlanılabilir. Presipitasyon, dializ, absorpsiyon, fraksiyonel presipitasyon gibi yöntemlerin uygulanması ekstrasellüler (hücre dışı) enzimler için söz konusu olup, intraselüler (hücre içi) enzimler için zor ve pahalı yöntemler olan, çeşitli ekstraksiyon teknikleri uygulanır. Bunun içinde homojenizasyon, hücreyi kırarak öğütme gibi tekniklerle enzimlerin hücreden ayrılmasından sonra sıfırlanması amacıyla ekstrasellüler enzimlerde izlenen yöntemler kullanılır. Ancak, bu kez hücre parçaları ve nükleik asitlerin varlığı, işlemleri daha kompleks hale koyar.

Granül formdaki üretimler, genellikle düşük enzim üretimleri için kullanılmaktadır. Bu durumda enzim konsantratları için NaCl ve bağlayıcı maddeler ile selüloz mikrofiliferi önerilmektedir. Bunu izleyen işlemlerde titanyum dioksit ve polietilen glikol ile kaplanmış granüller, hızlı eriyebilen ve mekanik aşınmalara dayanıklı bir enzim haline gelmektedir. Bu tekniğin özellikle deterjan sanayii için önemli olduğu bildirilmektedir (SHEPPARD, 1986).

Aynı kaynaktan; son bir kaç yıl içinde çok pahalı enzimler için, immobilizasyon (yakalama, tutuklama) tekniklerinin alternatif metod olarak geliştirildiği ifade edilmiştir. Halen en önemli immobilize (tutuklanmış) enzim sistemi olarak «glikol isometaz» örneği verilmiş ve çapraz bağlanmış glutaraldehit yapısına tutuklandığı bildirilmiştir. Ayrıca, absorpsiyon, polimer kafeslere tutuklama, mikrokapsülleme, iyon değiştiriciler aracılığı ile tutuklama, çapraz bağlama, absorpsiyon ile çapraz bağlama, kopolimerizasyon, kovalans bağlama gibi immobilizasyon teknikleri kullanılmaktadır. Bu tekniklerle suda çözünmeyen organik ve inorganik taşıyıcılarla çeşitli yöntemde tutuklanan enzimin özellikleri geliştirilmekte ve endüstride kullanılabilme olanakları artırılmaktadır. Böylece, reaksiyon ortamında çözünmeyen immobilize enzimler; heterojen katalizatörler gibi ortamdan kolaylıkla ayrılıp, daha saf ürün eldesine ve kendilerinin de ard arda bir kaç kez kullanılmasına olanak verirler.

Safılaştırılmış veya ticari enzimlerin aktivite değerleri kontrol edilerek, standardize edilmelidir. Kristalizasyon enzim üretimine çok yüksek maliyetler yükler. Bu bakımdan endüstride genellikle sıvı enzimler tercih edilmektedir. Ancak stabilizatör ve prezervatif madde ilave edilerek depolama döneminde aktivitesini kaybetmemesi sağlanmalıdır. Bunun yanında sıvı enzimler mutlak orjinal, renkli şişelerinde ve soğukta saklanmalıdır (REED, 1969).

### MİKROBİYAL RENNİN ve BUNA İLİŞKİN UYGULAMALAR

Rennin uygulamadaki adıyla peynir mayası, asit proteinaz karakterli ekstrasellüler bir enzimdir. Belirli koşullar altında sütün peynir yapısına dönüşmesini sağlayan pıhtı oluşmasında esas görevi üstlenmiştir. Bunu kazein presipitasyonuna katalitik etkide bulunarak yapar, daha sonra olgunlaşma sırasında da bu proteolitik etkisini sürdürür. Rennin bu yaygın ismi yanında bazı kaynaklarda; Kimosin, Rennaz, Lab, Abomasal enzim, Lab ferment gibi değişik isimlerle de yer almaktadır. Bazı görüşlere göre de, peynir mayasına «rennet», rennetteki süt pıhtılaştırıcı enzime de rennin adı verilir (TOPAL, 1982 a).

Rennin enzimini içeren özütün, peynir yapımında kullanılmak üzere endüstriyel ölçekte ilk kez üretimi, 1885 yılında Blumenthal tarafından başarılmıştır (PEKİN, 1981). Süt endüstrisinde peynir yapımında kullanılan bu enzim, genellikle henüz süt emme çağında bulunan geviş getiren hayvanların dördüncü midesi (Abomasum) olan şirdenden özütlenme yoluyla elde edilmektedir. Dünyadaki hızlı nüfus artışına bağlı olarak toplum beslenmesindeki gelişme ve alışkanlıklar tüketici kesimde peynire karşı talep artışına yol açmış, bu artışa bağlı peynir mayasına olan gereksinim de doğal ola-

rak artmıştır. Bunun yanında kasaplık et gereksinimindeki artış da şirden eldesi için süt emme devresindeki yavruların kesiminde bir azalmaya neden olmuştur. Böylece şirden temini zorlaştığı gibi, fiatlarında da hızlı bir artış söz konusu olmaktadır. Bu gün 400 ton civarındaki yıllık rennin gereksinimimizin 2/5 i yerli, 3/5 i ithal şirdenlerden sağlanmaktadır (URAZ, 1976). Ayrıca 1985 yılı itibarıyla, direkt peynir mayası olarak ithalatımızın 5861 kg. olduğu ve bunun da 84.432 A.B.D. doları tutarında bir döviz yükü getirdiği bildirilmiştir (DÖNMEZ, 1986). Yine 1982 yılı kuru şirden ithalatı için 29,5 ton karşılığı, 1.004.000 \$. ödenmiştir (TOPAL ve ark., 1984). Belirtilen bu sınıntının dünya genelinde de söz konusu olması nedeniyle 1950'li yıllardan itibaren mikrobiyal rennin alternatifi geliştirilmiştir. Bu gün mikrobiyal rennin üretimi için en yaygın olarak kullanılan; **Mucor pusillus**, **Mucor miehei** ve **Endothia parasitica**'dır. Bu küfler yanında daha az olmak üzere **Mucor rouxii**, **Mucor hemoris** gibi küfler ve **Bacillus subtilis**, **Bacillus cereus**, **Bacillus mesentericus**, **Streptococcus liquefaciens** ve **Pedococcus cerevisiae** gibi bazı bakteriler de kullanılabilmektedir. Bugünkü ticari uygulamalarda 3 küf türü çeşitli patent isimleriyle kullanılmaktadır. Örneğin **M. pusillus**'tan «Emporase», **M. miehei**'den üretilenler «Rennilase», «Hannilase», **E. parasitica**'dan üretilenler «Suparen» ve «Sure - Curd» ticari adını almaktadır. Bu enzimlerden Emporase MEITO SANGO (Japon) firması tarafından üretilip «NOURY VAN DERLAND» (Hollanda) firması tarafından Avrupa'da; «Suparen» PFIZER (USA) Firması tarafından üretilip «PFIZER CHEMICAL EUROP» Firması tarafından, Rennilase NOVO Firması tarafından ve **B. cereus**'un bir türeviden olan enzimde MILES (USA) tarafından pazarlanmaktadır (TOPAL, 1985). Ticari mikrobiyal renneti sağlayan firmalar ve bu enzimlerin kaynakları Çizelge 2 de sunulmuştur.

Çizelge 2. Ticari Mikrobiyal Rennetler (\*)

Ürün ismi	Sağlayan Firma	Mikrobiyal kaynağı
Emporase	Dairyland Food Laboratories	<i>Mucor pusillus</i>
Fromase	G.B. Fermentation Industries	<i>Mucor miehei</i>
Hannilase	Chr. Hansen's Laboratories	<i>Mucor miehei</i>
Marzyme	Miles Laboratories	<i>Mucor miehei</i>
Milezyme	Miles Laboratories	<i>Aspergillus niger</i>
Morcurd	Pfizer, Inc.	<i>Mucor miehei</i>
Surecurd	Pfizer, Inc.	<i>Endothia parasitica</i>
Rennilase	Novo Laboratories	<i>Mucor miehei</i>

(\*) WARD, 1983.

### MİKROBİYAL RENNİNİN ÖZELLİKLERİ ve BU ALANDAKİ GELİŞMELER

Son 10 yıldır yaygın şekilde kullanılmakta olan mikrobiyal renninin, diğer mikrobiyal enzimlerde olduğu gibi standart, aktif, ekonomik olması ve miktar açısından problem yaratma özellikleri sağladığı avantajlar olarak kabul edilmiştir. Üretimlerinde proteolitik aktivitesinin dengede tutulabilmesi halinde, izin verilen koruyucu ve tuzlarla stabil kalması sağlanmış, sıvı halde tüketimi yerleşmiştir. Özellikle *E. parasitica* enzimi daha az stabil olup katı halde pazarlanmaktadır. Mikrobiyal rennin yaygınlığının asıl sebebi hayvansal enzimin yetersizliği ve bazı dini ve manevi kurallardır. Mikrobiyal rennin uygulamasından sonra ABD'de şirden için yıllık et kesimi % 50 azalmıştır. Mikrobiyal rennetin sütün kappa-kazain fraksiyonu üzerindeki özgün etkisi, şirden renneti ile aynıdır. Bunun sonucu peynir yapımı koşullarında kazein misellerinin stabilizasyonu bozulur. Kalsiyumunda varlığında kazein misellerinin agregasyonu sonucu koagülasyon meydana gelir. Rennin K-kazeinin peptid bandındaki spesifik fenilalanin ve metiyonin yapısını hidrolize eder ve kazeinin pıhtı oluşumu artar. Mikrobiyal renninle yapılan denemelerde oluşan hafif acılığın bazı pıhtılaştırma enzimlerindeki lipolitik ve proteolitik aktiviteden ileri geldiği belirlenmiştir. Bu nedenle belli bir pH da solvent ve tuzlarla yapılan işlemlerle *M. pusillus*'un; silikatlarla absorpsiyonu sonucu da *M. miehei*'nin enzimlerinde bu yabancı proteolitik ve lipolitik aktivitenin uzaklaştırılabildiği ifade edilmiştir (WARD, 1983). Aynı kaynağa göre; mikrobiyal rennet ve şirden rennetinin çeşitli kazein fraksiyonları üzerindeki et-

kilerini poliakrilamid-jel elektroforez ile kıyaslayan araştırmacılar, özellikle *M. miehei* ve *M. pusillus* rennetlerinin şirden renneti ile hidrolize ürünlerinde benzer patternler verdiklerini, ancak, *Endothia parasitica*'nın daha kuvvetli proteolitik aktivite gösterdiğini gözlemişlerdir.

Enzim üreticilerinin amaçları, doğrudan şirden rennetinin yerine kullanılacak enzimi üretebilmektir. Genellikle *M. miehei*'den bu amaçla yararlanılabilir, mikrobiyal rennet şirden rennetinde olduğu gibi insulinin Glu-Ala ve Leu-Val zincirinde (oksitlenmiş B-zincir) etkinlik göstermektedir. Ancak peynir üretiminde kullanılan diğer alternatif rennetler pıhtı yapısında bazı farklılıklar göstermesinden dolayı olgunlaşma sırasında peynir aroması değişebilmektedir (SHEPPARD, 1986).

Aynı kaynağa göre; mikrobiyal rennetler yüksek sıcaklık stabilitesi gösterebilmesi nedeniyle peynir altı suyunda kalıntı aktivitesi vermekte, bunun sonucu sonradan bazı bebek ve diyet gıdalarında problem yaratabilmektedir. Ancak buna karşı her 100 litre sütte 20 g. lık bir  $CaCl_2$  konsantrasyonu ilavesi pratikteki koşullar için önerilmektedir. Bu ilavenin sonucunda; kalsiyumun *M. miehei* ve şirden rennetlerinin kuagülasyon kapasitesini % 400, *M. pusillus* rennetinin % 600 oranında arttırdığı bildirilmektedir (WARD, 1983). Ayrıca Novo firması bu yüksek sıcaklık stabilitesine karşı 2. ve 3. generasyon (Rennilase<sup>(R)</sup> TL ve Rennilase<sup>(R)</sup> XL) rennetleri geliştirmiştir. Buna göre pH 6 da 15 sn. lık pastörizasyonda aşağıdaki derecelerden sonra mikrobiyal rennetin kalıntı aktivitesi % 1 den aza düşmüştür (Çizelge 3).

Çizelge 3. Rennetlerin sıcaklık stabilitesi

Şirden Renneti 70 °C	Rennilase <sup>(R)</sup> 78°C	Rennilase <sup>(R)</sup> TL. 72°C	Rennilase <sup>(R)</sup> XL 68°C
-------------------------	----------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------------

(\*) (SHEPPARD, 1986)

Yeni bir mikrobiyal rennet alternatifi olarak bir çok firma (Genencor, Genex, Dairyland Food Laboratories v.b.) tarafından bildirildiği üzere, rekombinant DNA teknikleri ile kimoziin üretimi geliştirilmiştir. Yine İngiltere'de hücre teknikleri ile *Saccharomyces cerevisiae*'da buzağı kimoziini ve *E. coli*'den de buzağı prokimoziini sentezlenmiş ve *E. Coli*'den sentezlenen ilk «Cheddar peyniri» yapılarak, ilk bulguların yayımlandığı bildirilmiştir (SHEPPARD, 1986).

Mikrobiyal Rennet üretiminde bu son denemelerden biri de, rekombinant DNA - teknik-

leriyle maya hücresine kimosin geninin kolonlanması ve böylece yüksek kalite de saf kimosin üretiminin mikrobiyal fermentasyonla sağlanmasıdır. Bu tekniğin yakın gelecekte üretimde kullanılacağı belirtilmiştir (REPELIUS, 1987).

Teknolojik değerleri bakımından çeşitli mikrobiyal rennetlerin kıyaslanmasına ilişkin özellikler Çizelge 4 de sunulmuştur.

Çizelge 4. Mikrobiyal Rennetlerin Teknolojik Değerleri (\*)

Rennet Kaynakları	Değerlendirme
<b>Mucor pusillus</b>	Gerek organoleptik, gerekse elde edilen randıman açısından pek çok peynir çeşidi için de önemli bir problem saptanmamıştır. Ancak bazan üretim yöntemi, ya da peynirin olgunlaştırma süresine etkisi önemli olarak bulunmuştur.
<b>Mucor miehei</b>	İyi kalite peynirler üretilebildiği gibi, bazan da şirden rennetinden daha düşük kalitede sonuçlar alınabilmiştir. Nadiren acılık problemi olmuştur.
<b>Endothia parasitica</b>	Bazan iyi kalitede peynir üretilebilmiştir. Bu da yüksek sıcaklık derecesi uygulandığında söz konusu olabilmıştır. Birçok durumlarda başarılı sonuç vermemiştir.
<b>Bacillus polymyxa</b>	Birçok durumlarda elverişsizdir.
<b>Bacillus mesentericus</b>	Bazı tip peynirler için önerilebilme olanağı vardır. Kullanılabilirliğine ilişkin veriler kısıtlıdır.
<b>Bacillus subtilis</b>	Sadece üretim şemasında yapılacak değişiklikten sonra ve/veya renneti ile kombineli olarak kullanılabilir.

(\*) WARD, 1983.

Bütün bu özellikleri yanında sağladığı hijyenik, standart, stabil, ekonomik ürün gibi avantajları nedeniyle mikrobiyal rennin kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmakta ve şirden rennetinin yerini almaktadır. Modern teknolojinin ürünü olan mikrobiyal rennin, gelişmiş ülkelerde olduğu gibi yurdumuzda da üretimi ve kullanımı yararlı bir yol olacaktır. Böylece hem döviz kaybı ve dışa bağımlılık önlenecek, hem kaliteli ve standart bir ürüne ekonomik bir üretimle kavuşulmuş olacak, hem de pek çok faktörle kısıtlanmış ve rastgele bir üretime bel bağlanılmamış olacaktır. Bu nedenlerle «mikrobiyolojik rennin üretimi» konusu bölümümüzde projelendirilerek çalışılmış, olumlu sonuçlar alınarak uygulanabilirlik kazandırılmıştır (TOPAL, 1982 b).

Bu çalışmada 5 farklı suş numarasına sahip 3 değişik küf kültürü ile çalışılıp, farklı fermantasyon yöntemleri ve parametreleri uygulanmış ve her biri için elde edilen ürün nitelikleri incelenmiştir.

Denemeler sonucu derin fermantasyon yönteminin seçildiği bu çalışmada; *Mucor pusillus* (CMI - 193 776), *Mucor miehei* (CMI - 147066), *Rhizomucor miehei* (CBS - 267.73), *Endothia parasitica* (CBS-251.51, ATCC-14.729) küf kültürleri kullanılmıştır.

Özetlemeye çalıştığım bu proje çalışmasıyla, bugüne kadar kullanmakta olduğumuz ilkel teknoloji yerine ülkemizde modern teknolojinin gerektiği biçimde, standart ve kaliteli peynir mayası üretimi amaçlanmıştır. Böylece ülkemizdeki kasaplık hayvan gereksinimi en üst düzeydeyken çok genç hayvanların bu ürün için kullanılması önlenerek, etten de ekonomik kazanç sağlanmış olacaktır. Ayrıca şirden

ve maya ithalatının önüne geçilerek yıllık 1.100.000 \$ civarında döviz (yaklaşık 1.000.000.000 TL.) den tasarruf sağlanabilecektir. Fermantasyon atığı hayvan yemi de bu değerlerin yanında ek gelirdir.

Mikrobiyal renninle ilgili yapılan diğer bir çalışmada bölümümüzle DESİYAB'ın ortak çalışması olarak «Mikrobiyal peynir mayası üretim tesisi ön fizibilite etüdüdür (TOPAL ve ark., 1984). Bu çalışmada 100, 200, 300, 400 ton/yıllık üretim kapasiteleri için gerekli bilgiler ve teknik spesifikasyonlar yanında, madde balansı, teknik kapasite kullanım oranı, yerleştirme planı, işletme organizasyon ve personel durumu, tesis dönemi termin planı, proje maliyeti ve bunu oluşturan unsurlar incelenmiş ve işletme sermayesi yatırım hesaplarına ön veriler sağlanmıştır. Ayrıca bu tip bir fabrikaya ait ana makina teçhizatı gideri, atık değerlendirme için yatırım, yardımcı işletme makina teçhizat gider tasarımı hesaplanmış; sigorta, navlun, ithalat ve gümrükleme giderleriyle stok, hammadde, enerji yakıt ihtiyaç bedelleri, ambalajlama ve nakliye yatırımları, istihdam edilecek iş gücü saptanmıştır. Sonuçta 100 ton/yıl üretim kapasiteli alternatifin cazip bir proje niteliğinde olmadığı, kapasite artışına bağlı olarak sağlanan karlılığın da arttığı, 400 ton/yıllık kapasitenin en karlı proje olduğu, ancak yurt içi talebin tümü olması nedeniyle riskli olabileceği ve bu nedenle en uygun alternatifin 300 ton/yıl kapasiteli olduğu saptanmıştır. Yıllık üretim kapasitesi 100 ton da % 19,9; 200 ton da % 45,6; 300 ton da % 60,0 ve % 400 ton da % 69,3 «Mali iç kârlılık» sağlandığı hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucu birim satış fiyatı (1984 fiyatları itibarıyla) 3000 TL/kg olarak belirlenmiştir. Ayrıca kapasiteye göre 71 - 115 kişiye de iş olanağı sağlanabilecektir.

## KAYNAKLAR

- BECKHORN, E.J. 1967. Production of Microbial Enzymes (in, Microbial Technology, Ed. by, Pepler, H.J.). Reinhold Publ. New York, p. 366 - 380.
- CASIDA, E.L. 1968. Industrial Microbiology. John Wiley and Sons Inc. New York, p. 460.
- DÖNMEZ, S. 1986. Gıda Sanayinde Kullanılan Enzimler ve Ülkemizdeki Durumu. Gıda Dergisi, 11, (4), 215 - 220.
- KLIBANOV, M.A. 1983. Enzymes: Nature's Chemical Machines, Technol. Rev., 86, (6). 40 - 50.
- PEKİN, B. 1981. Mikroorganizmaların Enzim Kaynağı Olarak Üretimi, Bu Teknolojinin Önemi ve Türkiye'de Gerçekleştirme Olanakları, Kükem - 2. Ulusal Kükem Kongresi Özet Sayısı. Sanal Matbaası, İstanbul, s. 39 - 50.
- PEKİN, B. 1983. Enzimler (Alınmıştır, Endüstriyel Mikrobiyoloji, Düzenleyen, Çetin E.T.) J.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı - EAYDA. Yayın No: 2 Fatih Gençlik Vakfı Matbaası, İstanbul, s. 145 - 160.
- REED, G. 1969. Enzymes in Food Processing. 2nd Ed. Academic Press Ltd. New York, p. 573.
- REPELIUS, C. 1987. Developments in Rennets, (in Proceedings - The First International Symposium on Food Industry «Food» Additives, Çeşme - İzmir, Ed. by Sayın E, Güvenc U., Üçüncü, M. İzmir Büyük Şehir Belediye Matbaası Md.lüğü) p. 449 - 462.
- SHEPPARD, G. 1986. The Production and Uses of Microbial Enzymes in Food Processing (in, Progress in Industrial Microbiology, Ed. by Adams, M.R.), Vol 23. Elsevier Sci. Pub. Com. Inc. Amsterdam p. 237 - 283.
- TOPAL, Ş. 1982 a. Mikrobiyal Rennin Üretimi ve Endüstride Kullanımı. Kükem - İzmir Bilim Komitesi, «Tutuklanmış Mikroorganizmalar Sempozyumu» Tebliği (Özet - Kükem Dergisi, 5, (2), 92 - 93).
- TOPAL, Ş. 1982 b. Mikrobiyolojik Yolla Rennin Üretimi. TÜBİTAK - MAE Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü Yayını, No: 63, MAE Matbaası Gebze, 96 s.
- TOPAL, Ş.; TUĞRUL, K.; HARMANCI, M. 1984. Mikrobiyal Peynir Mayası Üretim Tesisi Ön Fizibilite Etüdü. Desiyab - Araştırma ve Proje Geliştirme Müdürlüğü: PG/2. Ankara, 73 s.
- TOPAL, Ş. 1985. Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Renninin Yeri, Gıda Dergisi, 10, (1), 25 - 37.
- UNDERKOFLEER, L.A. 1972. Enzymes (in Handbook of Food Additives. Ed. by Furia, T.E.) Chemical Rubber Co. Cleveland, p. 27 - 84.
- UNDERKOFLEER, L.A. 1976. Microbial Enzymes. (Industrial Microbiology, Ed. by Miller, B.M. and W. Litsky. Chapter 7.) Mc Graw-Hill Book Comp. p. 123 - 164
- URAZ, T. 1976. Türkiye Peynirciliğinde Kullanılan Mayalar ve Bunların Elde Edildikleri Şirdenler Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik Tezi. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayını, A.Ü. Basımevi. Ankara, 84 s.
- WARD, O.P. 1983. Proteinases in, Microbial Enzymes and Biotechnology. Ed. by Fogarty, W.N., Chapter 6). App. Sci. Publishers, New York, p. 251 - 317.