

Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'nin Yeri

Şeminur TOPAL

TÜBİTAK Marmara Araş. Enst. Gebze - Kocaeli

Enzim, sözlük anlamı ile canlı bitkisel ve hayvansal hücrelerde biyolojik olayların kimyasal reaksiyonlarını katalize eden kompleks organik substanslar (maddeler) dir. Diğer bir deyişle hücre içindeki maddelerin değişimleri, parçalanmaları ve biyosentezleri; biyolojik katalizator olan enzimler tarafından sağlanır. Yaşam için büyük önem taşıyan her bir metabolitin bir başka metabolite dönüşmesinden spesifik (özel) bir enzim sorumludur. Enzimler, proteinlerden meydana gelmiş olup katalizatorların fonksiyonlarını yerine getirirler.

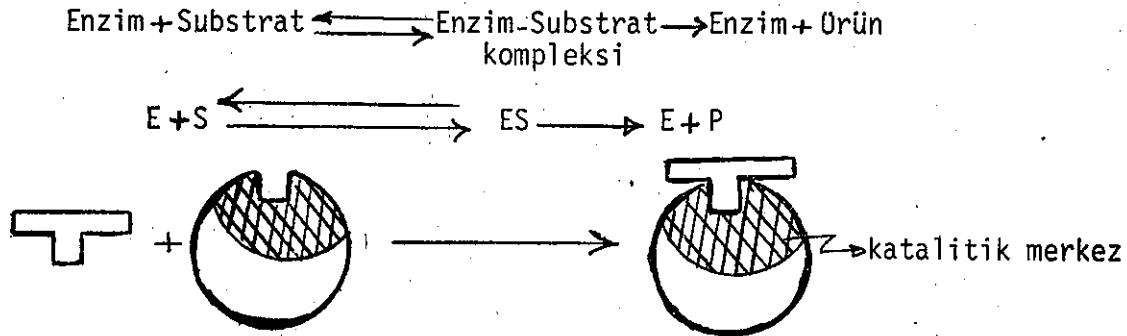
Enzim deyimi ilk defa 1878 yılında Kühne tarafından ferment yerine kullanılmış bir terim olup orjinini Yunanca «maya» kelimesinden almaktadır. Çünkü mayalanma (fermantasyon) bir sıra enzimatik faaliyetler sonucunda meydana gelmekte olup, enzimlerin cins ve miktarları bunları yapan organizmaların genetik yeteneklerine bağlıdır.

Enzim proteininin fonksiyonunu yerine getirebilmesi, metaboliti tanıması ile mümkün olur. Enzimin katalitik reaksiyonunun aktivitesi

ayarlanabilir (veya regüle edilebilir). Enzimin katalize ettiği çevirme, substratın enzim proteinini ile birleşmesiyle başlar. Böylece enzim-substrat kompleksi meydana gelir. Enzim genel olarak bir substratı katalize eder, ve onu ikinci bir metabolite çevirmesi, eşit dengeye getirene kadar devam eder. Buna göre her enzim, belirli bir substrat ve belli bir etki spesifikliğı gösterir. Substrat spesifikliğı birçok substrat içinden sadece birini seçmesidir. Etki spesifikliğı ise, enzimin substratı mümkün olan bir çok çevirme şekillerinden yalnız birine göre olayı gerçekleştirmesidir.

Substratın enzim tarafından tanınması, enzimin substrata bağlanması olayı ile mümkün olur. Substratın enzime bağlanması ise enzim proteininin ancak çok belirli bir noktasında mümkün olur ki; buraya enzimin katalitik merkezi denir. Substratın yapısı ve yüklenme özelliğı enzim tarafından kendinin tanınmasına yardımcı olur. Enzimin katalitik etkisi Michaelis ve Menten tarafından ifade edilen temel denklemde bildirilmektedir.

Michaelis ve Menten Denklemi



Enzim aktiviteleri hücreden arındırılmış sistemlerde kontrol edilebilir. Bir enzimatik reaksiyonda hız çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlere bağlıdır. Bu faktörler :

- 1 — Substrat konsantrasyonu
- 2 — Enzim konsantrasyonu
- 3 — Sıcaklık ve pH

- 4 — Aktivatörün (Na, K iyonları gibi hızlandırıcının) varlığı
- 5 — İntibitörün (ilaçlar, zehirler, antibiyotikler vb. gibi kısıtlayanların) varlığı

Enzimler sınıflandırılırken temel olarak 2 bölümde incelenirler. Intraselüler enzim veya Endoenzim; canlı hücrede, hücre metabolizması için gerekli gıda absorpsiyonunda ve transformasyonunda önemli roller oynar. Bu esnada büyük ölçüde hücrede kullanılan enerji açığa çıkar. Ekstraselüler veya Eksoenzimler, hücre tarafından üretilip dışarı salgılanırlar. Bunlar hücre duvarının etrafından bulunduğu ortama salgılanır. Ve ortamın protein, yağ karbonhidrat gibi organik substanslarını parçalayarak hücreden bağımsız olarak rol oynarlar. Ekso ve Endo enzimlerin genel karakteristikleri şöyle özetlenmiştir.

Endo enzimler

- 1 — Hücre içinde rol oynarlar
- 2 — Oksidasyon - redüksiyon potansiyelini ayarlar.
- 3 — Büyük bir enerji açığa çıkarırlar.
- 4 — Enerji formu hücrede direkt olarak kullanılabilir.

Ekso enzimler

- 1 — Hücre dışında rol oynarlar.
- 2 — Hidrolitik görev görürler.
- 3 — Az bir enerjiyi serbest hale geçirirler.
- 4 — Enerji direkt olarak hücreye yararlı olmayan formdadır.

Enzimlerin gıdaların bünyesindeki etkilerine göre başlıca 3'e ayrıldığı bilinir.

- 1 — Karbon hidratlar üzerinde rol oynayanlar karbohidrazlar,
- 2 — Proteinler üzerinde rol oynayanlar proteinazlar,
- 3 — Yağlar üzerinde rol oynayanlar lipazlar.

Enzimler, Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından, (1965) yılında katalize ettikleri kimyasal reaksiyon tiplerine göre 8 ana grupta toplan-

mış ve bunun içinde de çeşitli grup ve alt gruplara bölünmüştür. (Oksidoredüktaz, transferaz, hidrolaz, liyaz, isomeraz, ligaz, proteaz ve lipaz, Anonymous - 1971).

Enzimler karakteristikleri itibariyle çeşitli kaynaklardan elde edilirler ki, bunlar;

- 1 — Pankreatik enzim, pepsin, katalaz, rennin gibi enzimlerin elde edildiği hayvansal organ ve dokular,
- 2 — Malt diastasi, papain, bromelin, fisin gibi enzimlerin elde edildiği bitkisel dokular,
- 3 — Amilaz, proteaz, invertaz, glukoz - oksidaz, selülaz gibi enzimlerin elde edildiği mikroorganizmalar olmak üzere gruplandırılabilen biyolojik kaynaklardır.

Enzimler hayati önemleri yanında gıda ve diğer endüstrilerde ayrıca teknolojik yönlerden de önem taşırlar. Örneğin; şarap, bira, meyve suyu, süt ve çikolata kaplamalı gıda sanayiinde, tekstil, yün, deri, kağıt endüstrilerinde, çeşitli organik maddelerin ticari preparasyonlarında kullanılır. Her ne kadar ticari enzim üretim endüstrisi, geniş bir gelişme halinde ise de, enzimlerin kimyasal bileşimleri hakkında fazla birşey bilinmediği zamanlarda da peynir, bira fermantasyonu diğer alkollü içkilerin üretiminde de bunların kullanımı söz konusu idi. Enzimlerin bu yararlı etkilerinin yanında, gıda maddelerinin bozulma ve saklanmalarında çeşitli sorunlar doğurduğu da bilinmektedir. Bu nedenlerle gıda sanayiinde enzim teknolojisi ayrı bir önem taşır.

Enzim hakkındaki bilgiler eskilere dayanmakla beraber, mikrobiyal yolla üretimi daha yakın bir geçmişte önem kazanmıştır. Literatüre (Casida - 1964) bu yolla üretilen fungal enzimlerin ilk defa ticari kullanımlarının 20. yüzyılın başında, bakteriyel enzimlerin kullanımının ise 1. Dünya Savaşı sırasında başladığı bildirilmektedir. İlk kez yaşayan hücreden aktif enzimin ayrılabilceğinin demonstrasyonu 1897 de Buchner tarafından yapılmıştır. Bu işlemi; mayanın alkol fermantasyonunun başlangıcında katılması yerinde, yaşayan hücre olmadan maya ekstraktından yararlanılmak suretiyle göstermiştir.

Başlangıç yıllarından itibaren, yapılan pek çok araştırmalar içinde uygulamada en çok önem taşıyan ve patentle sonuçlanan ilk 3'ü şunlardır;

- 1 — Jokichi Takamine tarafından, küflerden diastatik enzim üretimi prosesine ait 1894 de alınan patent,
- 2 — Otto Röhm'e ait 1908'de alınan ve dericilikte yararlanılan pankreatik enzime ilişkin patent,
- 3 — 1911'de Leo Wallerstein'e ait, bira endüstrisindeki proseste kullanılan proteolitik enzimlerin tanıtılması ile ilgili patent.

Her ne kadar hayvansal ve bitkisel hücrelerden yararlanarak enzim elde etme olanakları varsa da, teknik ve ekonomik yönden mikrobiyal kaynaklı endüstriyel enzimler daha avantajlıdır. Çünkü hayvansal enzimler ancak endüstrisinin yan ürünleri olduğu zaman ekonomik olurlar ve önem kazanırlar. Hayvansal ve bitkisel kaynaklı dokuların miktarları kısıtlıdır. Çünkü bunlar kullanılabilir toprak alanına, işgücüne, mevsim ve iklim şartlarına bağlı olarak değişir ve elde edilen ürünün kalite ve kantitesi de bu faktörlere bağlı olarak standart olmaktan uzaklaşır. Ayrıca bitkisel kaynaklardan ekonomik olarak üretilen enzim sayısı çok kısıtlıdır. Buna karşılık mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimlerin çok geniş çeşitleri vardır (2500 dolayında olduğundan bahsedilmektedir) ve uygun suş seçimi ile arzu edilen enzimin çok yüksek oranlarda verimliliği sağlanabilir. Bu nedenlerle hayvansal orijinli enzim ihtiyacındaki açığın kapatılması için tedbirler alınma zorunluğu doğmuştur. Mikrobiyal enzim üretimine yönelik talepte kısıtlı değildir.

Mikroorganizmalardan enzim üretiminde, kullanılan fermentasyon metodları geliştirildikçe ve çevresel faktörler kontrol altında tutuldukça bu tamamlayıcı güç artacak ve miktarın

sınırlandırılması faktörü de ortadan kalkacaktır. Bu nedenlerle endüstriyel yolla enzim üretiminde mikroorganizmalardan kaynak olarak yararlanılması, yeterli olmayan potansiyelin tamamlanması bakımından ilk ve en büyük avantajdır.

İkinci büyük avantaj, mikroorganizmalardan pek çok sayıda enzimi ekonomik olarak elde etmek mümkündür. İyi seçilmiş ve planlanmış organizma suşları ile herhangi bir enzim üretimi genellikle mümkündür. Ancak tek bir organizma ile çalışmak bazan dezavantaj olabilir. Genellikle bir endüstriyel proses yalnızca spesifik bir enzimatik değişimi talep eder, ancak bir enzim kontaminasyonu söz konusu ise, bu takdirde istenmeyen ve farklı sonuçlar veren reaksiyonlara sebep olacaktır. Bu nedenle istenmeyen enzim kontaminasyonunu uzaklaştırmak gerekir ki; bu ise zor ve pahalı olabilir. Herşeye rağmen differansiyel inaktivasyon, fraksiyonel presipitasyon ve kolon kromografisi gibi enzim saflaştırma metodlarının geniş ölçüde uygulanabilirlik kazanması neticesinde, enzim üreticileri için uygun ticari ürünler elde edilmiştir.

Enzimatik işlemler aslında 4 yüzyıldan beri kullanılmaktadır. Hatta bira, şarap ve peynir yapıcılığı bildirilen bu tarihten de eski bir geçmişe sahiptir. Bütün fermentasyonlar canlı organizmaların metabolizmaları doğrultusunda ki ortamın enzimatik değişimleridir. Çeşitli değişimlerden sorumlu olan biyokatalitik enzimlerin etkilerinin anlaşılmasından ve öğrenilmesinden sonra daha iyi araştırmalar yapılmış, daha uygun ve ucuz, benzeri enzimler ortaya çıkarılmıştır. Enzim sisteminde geniş ölçüde üretim metodlarının geliştirilmesi ve devamlı ıslahı ile; ticari ve endüstriyel kullanımların da iyi neticeler alınması ve kontrolleri üzerinde durulmaktadır.

Ticari enzimler bakteri, küf ve mayalardan olmak üzere her üç mikroorganizma grubundan da üretilmiştir. Bunlar ve kaynak oldukları enzimler şunlardır :

	Organizmalar	Enzimler
Küfler :	Aspergillus oryzae	Amilaz, Proteaz
	» niger	Amiloglu oksidaz, katalaz, Amilaz Sellulaz, Pektinaz, Glikoz oksidaz.
	Rhizopus spp.	Amilaz, Amiloglukoksidaz, lipaz.
	Penicillium spp.	Pektinaz, Lipaz
	Mucor spp.	Proteaz, Lipaz
	Trichoderma viride	Sellulaz
Bakteriler :	Bacillus subtilis	Proteaz, Amilaz
	» mesentericus	Proteaz
	Micrococcus lysodeikticus	Katalaz
	Streptococcus hemolyticus	Streptokinaz - Streptodornaz
Mayalar :	Saccharomyces cerevisiae	Invertaz
	» fragillis	Laktaz

Yukarıda da görüldüğü gibi bazı mikroorganizmalar veya bunların suşları bütün metabolik reaksiyonlarında veya besin maddelerinin hidrolizinde görev yapacak pek çok sayıda enzim meydana getirir. Ayrıca aynı tür ve suşlar arasında çeşitli sayıda ayrı özel enzim üreticileri de mevcuttur. Genellikle bu mikroorganizmaların ürettiği enzimler kendilerine has isimleriyle de anılır. Örneğin, Oryzae enzimi, Niger enzimi, Subtilis enzimi gibi.

Endüstriyel enzim üretimi gittikçe artan bir önem kazanmakta ise de, bugün henüz tam pazarını bulamamıştır. Gelişmiş bazı ülkeler (Japonya, Kanada, A.B.D. gibi) uygulamaya girmiştir. Ancak ileride oldukça önemli uygulama ve pazar alanı bulabileceği bildirilmektedir.

Endüstriyel enzim üretiminde en önemli basamak spesifik enzim üretme özelliğine sahip kültür suşlarının seçimidir. Bu suşların stabil olması ve yüksek ürün meydana getirebilmesi aranan en önemli özelliklerin birisidir. Bu seçimi yaparken dikkat edilecek hususlar şöyle özetlenebilir;

- 1 — Üretime uygun suşların seçilmesi,
- 2 — Patojenik olmayan suşların seçilmesi,
- 3 — Toksik olmayan ürünler veren suşların seçilmesi,

4 — Biyolojik stabilite göstermesi.

Ayrıca kültürler saf suşlar halinde olup, çok iyi şartlarda saklanmış olması gerekir. Bunlar liyofilize veya yatık agar kültürleri halinde saklanmış olabileceği gibi, optimum şartlarına çok dikkat etmek ve her pasajında kontaminasyon kontrolü yapmak gerekir. Bunun yanında kültürün mutasyona uğramamış olması da gerekmektedir.

Her kültürün ayrı bir çevre optimumu bulunduğu bilinmektedir. En fazla ürün alabilmek bakımından saflık kontrolleri yapılarak seçilen organizmanın spesifik çevresel istekleri sağlanmalıdır. En önemli çevresel faktör olarak ortamın besin maddesi bakımından ayarlanıp düzenlenmesi gerekir ki; bu maksimum ürün eldesine hizmet edebilecek ilk faktördür. Bu maddeler arasında, karbonhidrat, nitrogen, mineral madde bakımından desteklenmiş, yeterli temel besi elementi içeren ortamlar gelir. Ayrıca seçilecek fermantasyon tipine bağlı olarak sıvı veya katı ortam oluşuna göre, çeşitli köpük kırıcı, ilavesile viskosite ve eriyebilirliği ayarlayıcı faktörlerin düzeltilmesi de önem taşır. Yine yüzey fermantasyon kültürleri için ortamın yüzey alanı da önemli bir faktördür. Ortam seçimi enzimin üretiminde saflaştırma basamağında da önem taşır. Çünkü enzimden

kolayca ayrılabilen basit inorganik bir ortam; saflaştırmada, daima kompleks protein yapılı ve enzimden zorlukla ayrılabilen ortama tercih edilebilir. Bazı mikrobiyal sistemlerde ise, ortamdaki besin maddesi miktarı toplam gereksinmeye yetmeyebilir. Bu ise fazla olduğunda, gelişme gösteren mikroorganizmanın enzim üretimine inhibitör etkisi yapabileceği gerekçesiyle fermantasyon sırasında ilâve edilebilir. Ortamın pH durumu da bir gelişme faktörü olup, oksijen isteği ile birlikte ayarlanması gerekir. Ancak bilindiği gibi bu değerler her mikroorganizma için ayrı talep seviyesinde olup, çeşitli kültürlerle göre geniş varyasyonlar gösterir. Genellikle enzim üretiminde oksijen gereksinimi büyük olan aerobik kültürler kullanılır. Bu nedenle iyi düzenlenmiş bir adaptörle ortama hava verilmesi gerekir. Semisolid (yarı katı) kültürlerde bu istek yüzeydeki havadan sağlanabildiği halde; derin fermantasyon ortamlarında, fermentöre boru ile steril havanın enjektörü gerekmektedir ve hava akımının dağıtılmak suretiyle yayılmasında yarar bulunmaktadır. Bu işin sıcaklıkla birlikte kontrollü olarak yapılması önemlidir. Sıcaklık, pH, havalandırma ve ortamın besin değeri gibi çevresel faktörlerin mikrobiyal gelişme yanında enzim sentezi ve enzim inaktivasyonu üzerindeki etkisi bilinmektedir. Sıcaklık kontrolü derin fermantasyon tanklarında nispeten kolay olduğu halde semisolid (yarı katı) kültürlerde zordur. Çünkü yüzeyden olan hava sirkülasyonu durumu etkileyebilir. Fermantasyonda çevre şartlarını kontrollü yapan otomatik sistemler mevcuttur. Bütün bu faktörlere göre hazırlanıp, enzim ve organizmanın niteliğine göre seçilecek üreme periyotları ve fermantasyon işlemine göre inokülasyon işlemi uygulanır. Enzim üretim prosesinde iki ana teknik uygulanabilir. Bunlarda;

- 1 — Submerged (derin fermantasyonu) tekniği,
- 2 — Semisolid (yarı katı = yüzey) kültür tekniği.

II. Dünya Savaşından bu yana, ticari mikrobiyal enzim üretimlerinde semisolid (yarı katı) kültür metodu uygulanmaktadır. Derin

fermentasyon kültür metodu ise, yeni olmakla beraber aerobik organizmalar için elverişli olarak bilinmekte ve kullanılmaktadır. Bu proseste organizmalar sıvı ortamda kültüre alınıp, havalandırılabilen tüpler, erlenmayerler veya fermentör kullanılabilir. Bu iki metodun avantaj ve dezavantajları işe şöyle verilebilir:

Yarı katı kültür metodu

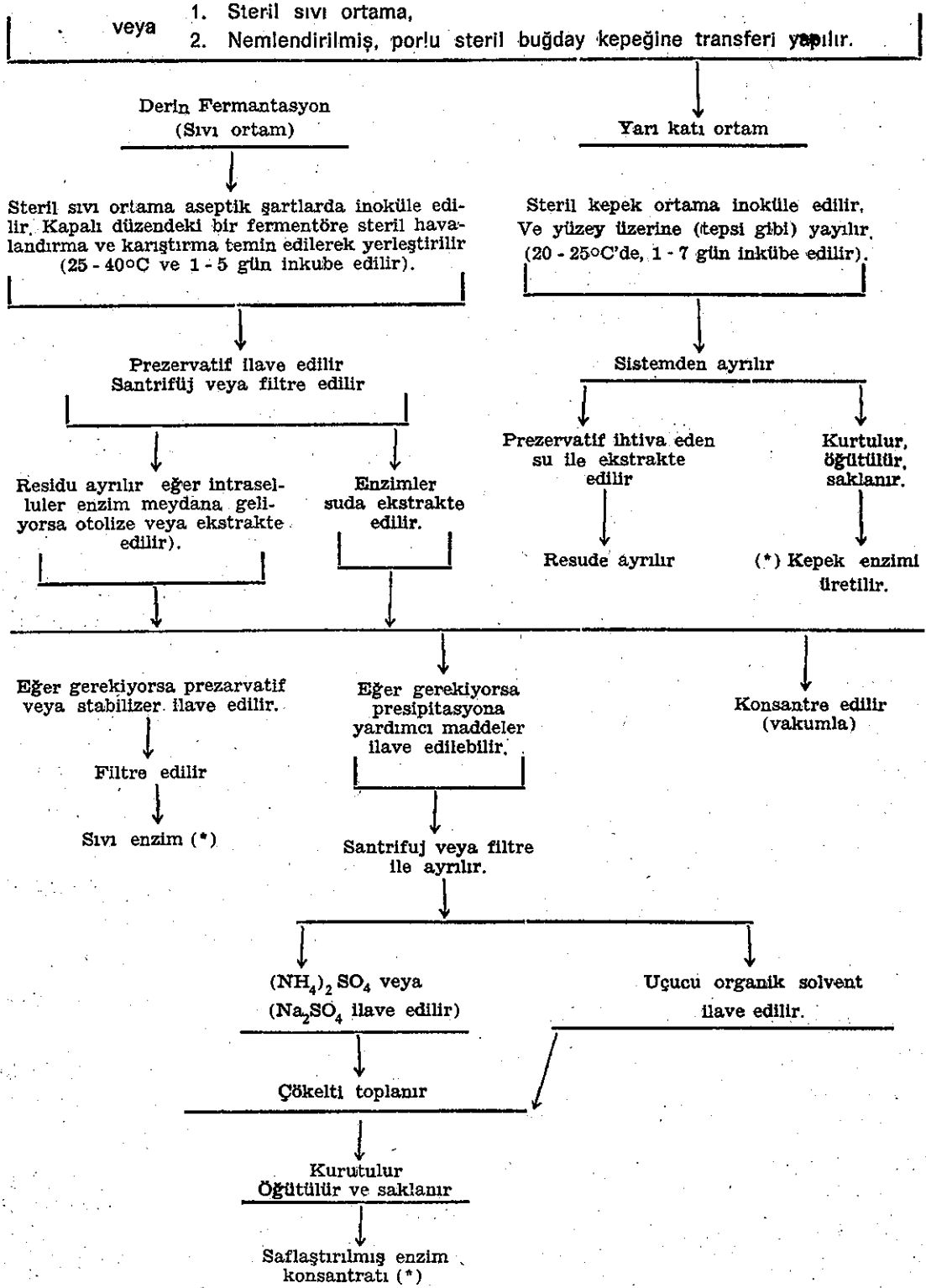
- 1 — Özel tavalar şeklinde ekipman gerektirir.
- 2 — Çok fazla el emeği gerektirir.
- 3 — Düşük basınçlı hava üfleyicileri gerektirir.
- 4 — Küçük gücü ekipman gerektirir.
- 5 — Minimum kontrol gerektirir.
- 6 — Kontaminasyon problemi azdır.
- 7 — Geri almada sıvı solusyonla ekstraksiyonu gerekir, filtrasyon veya santrifuj işleminden sonra gerekirse evaporasyon veya presipitasyona tabi tutulur.

Derin fermantasyon kültür metodu

- 1 — Kapalı fermentör sistemi kullanılır.
- 2 — El emeği ihtiyacı minimumdadır.
- 3 — Yüksek basınçlı hava ister.
- 4 — Havalandırma ve hareket için önemli ölçüde güce ihtiyaç vardır.
- 5 — Dikkatli bir kontrolü gerektirir.
- 6 — Sık-sık kontaminasyona bağlı problemleri doğurabilir.
- 7 — Geri alma işleminde filtrasyon ve santrifuj ile gerekirse evaporasyon veya presipitasyon uygulanır.

Bu durumda şartlara göre, her iki metodun biri kültürün ve enzimin karakterleri de dikkate alınmak kaydıyla seçilir. Her iki metodun temel olarak ana hatları şöyle şematize edilebilir.

Liyofilize veya yatık ağıar halinde saklanan, patojen veya toksik olmayan mikroorganizmanın seçilen kültürü (**)



(*) Bu enzimler standart aktiviteye ayarlanır.

(**) Mikrobiyal enzim manipasyonu akış şeması (J. Agr Food Chem 13, 30, 1969) Beckhorn E.J., MD, Labbee ve L.A. Under kofler'den alınmıştır.

Her ne kadar genel prensip itibariyle enzim üretiminde; endüstriyel ölçüyle, laboratuvar üretimi aynı ise de pratikte ekipman ve materyalin miktarına göre çeşitli farklar doğacağından buna bağlı problemlerle uygulamada sık sık karşılaşılabilir.

Yarı katı yüzey ferm, kültür metodu, çoğunlukla enzim üretiminde bir ticari enzim üretim metodu olarak kullanılmaktadır. Bu metod ilk kez Takamin tarafından Takadiastar adı ile anılan fungal amilazın büyük ölçüde üretiminde geliştirilmiş ve A.B.D. ve Japonya'da kullanılmak üzere olduğu bildirilmektedir. Bu metod bugün; 1947 de Shellenberger ve yine aynı yıl Underkofler ve ark. ile 1948 de Jeffrey'nin gerçekleştirdiği küçük modifikasyonlarla kullanılmaktadır.

Sistemde genel olarak yapılan filtrasyondan sonra extraselluler enzimler çalışılıyorsa, sıvı kısım alınır. Intraselluler enzimler çalışılıyorsa, filtrat CaCl_2 ve $\text{Ca}(\text{PO}_4)$ ile suda ekstrakte edilir. Safılaştırma ise enzim solusyonunun; ortamdaki materyalin ihtiva ettiği katı maddelerden, mikroorganizma hücrelerinden ve misellumlardan ayrılması için çeşitli maddeler kullanarak (genellikle % 1 veya daha az oranlarda katılması ile) yapılır. Bu safılaştırma maddeleri ortama konduktan sonra ekstraktın temizlenmesi filtrasyon veya santrifuj ile yapılır. Enzim ekstraktlarında kullanılan safılaştırma maddeleri şunlardır; Amonyum fosfat (mono ve dibasik), Askorbik asit, Kalsiyum tuzları (klorit, format, sulfat ve fosfat), Selüloz lifleri, Sistein Diatome toprağı, Gelatin, Gum arabik, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, hidroklorik asit, fosforik asit, sodyum tuzları (sitrat, glukonat, monobasit, fosfat, sodyum sulfat gibi) olabilir. Ancak bu sırada düşük sıcaklıkla çalışmak gerekmektedir.

Kristal halde enzim eldesi için presipitasyon işlemine yer vermek gerekir ki, bunun için; dializ, adsorbsiyon, fraksiyonel presipitasyon teknikleri uygulanır. Presipitasyon maddeleri olarak da Aseton, Ammonium sulfat, Kazein, diatome toprağı, disodyum fosfat, Etil asetat, Etil alkol, jelatin, Laktoz, Metanol, Sodyum sulfat, Nişasta kullanılabilir. Safılaştırılması yapılarak elde edilen ticari enzimlerin aktivite

kontrolleri yapılması gerekir ki; Standart aktivite değerleri saptanmış enzimler ticari önem taşırlar ve bunlar; (enzime bran — =kepek enzimi) sıvı ve presipitasyonu ile safılaştırılması tam yapılmış toz enzimler halindedirler. Kristal halde ve tam anlamı ile saf enzim üretmek uygulamada ekonomik değildir. Çünkü normal bir üretimle ucuza mal olabilen enzim safılaştırıldığında (kristal formda) yüklece katına yükselen bir maliyet gösterdiği bildirilmektedir. Eğer uygulamada prezervatif madde kullanmak gerekiyorsa toluen, organik asitler ve onların tuzları, fenolik bileşikler, quaternary amonyum bileşikleri ve sodyum florid kullanılabilir. Ayrıca sıvı olarak saklanacak ürünlerde istenmeyen mikrobiyal gelişmeyi ve depolama sırasında enzim aktivitesinin kaybolmasını önlemek amacıyla stabilizerler katılabilir ki; bu maddeler arasında sodyum - benzoat, prohidroxy benzoik asit esterleri, glycerol, propylen glycol, sorbitol, sodyum klorit sayılabilir. Katı ürünler ise nişasta, laktoz, dextroz, sakkarozun, tuz, jelatin ve kazein katılarak standart kapasiteye ayarlanır.

Bu enzim yapısı ve endüstriyel enzim üretimine ait vermeye çalıştığım genel bilgiden sonra biraz da «RENNİN» üzerinde durmak ve bu teknolojiye yerine değinmek gerekmektedir kanısındayım.

Peynir mayası olarak adlandırılan rennin, sütün peynir yapısına dönüşmesini sağlayan pıhtı oluşmasında esas görevi üstlenen proteolitik karakterli ekstraselluler bir enzim olup bunu belirli şartlar altında ve kazein presipitasyonuna katalitik etkide bulunarak yapar. Daha sonra olgunlaşma sırasında proteolitik etkisini sürdürür.

Rennin, kristal haldeki molekül ağırlığı 30.000 civarında olan ve genel sınıflamada Eksoenzim olup, hidrolazlar grubundan, proteazlar alt grubuna girer. pH değişmelerine çok duyarlı olup, proteolitik etkisini hafif asit ortamda korur. pH 4.8'in altında az dayanıklıdır. Hafif alkali reaksiyon gösterdiğinde pH 7.4'e doğru pıhtılaşma hiç olmaz. pH 8'de ise tekrar eksi haline dönemeyecek şekilde inaktive olur.

Rennin, bu yaygın ismi yanında bazı yerlerde Chymosin, Rennase, Lab., Abomasal en-

zim, Lab. ferment gibi değişik isimlerde de ifade edilmektedir. (Bazı görüşlere göre de peynir mayasına rennet, rennetteki süt pıhtılaştırıcı enzime de rennin adı verilir).

Bilindiği gibi peynir, peynir mayası veya zararsız organik asitlerle (süt asidi gibi) sütün pıhtılaştırılması ve çeşitli şekillerde işlenip olgunlaştırılması esasıyla imal edilir. Genellikle kullanılmakta olan peynir mayası, henüz süt emme çağında bulunan geviş getiren hayvanların dördüncü midesi olan (Abomasum) (şirdenlerden) maserasyon (özütleme) yoluyla elde edilen bir maddedir. Bu maddenin esas yapısını rennin enzimi teşkil etmektedir.

Bazı bitki ekstratları da (yoğurt otu, enginar, boru çiçeği, yağ otu, incir bu amaçla kullanılmaktadır. Ülkemizde bu enzimin elde edilmesi son derece ilkel ve hijyen şartlarından uzak tekniklerle yapılmakta ve asla standart bir ürün elde etme olanağı bulunmamaktadır. Ayrıca şirdenden elde olunan rennin ekonomik olması düşüncesi ile yavrunun doğumunun ilk günlerinde alınması gerekir. Çünkü bu enzim şirdende en çok ilk günlerde bulunur ve giderek yerini pepsine bırakmaya başlar. Böylece şirdenden çıkarılacak mayanın miktarı azaldığı gibi, kalitesi de bozulmaya başlar yani ticari değeri düşer. Bu ise hayvanın kasaplık değerinin çok az olduğu bir dönem olup, ekonomik açıdan da kayıplara neden olur. Çeşitli bildirimlerine göre Türkiye'de yılda 4.5 milyon ton süt üretilmekte ve bunun % 20'si, yani 885.000 tonu peynire işlenmektedir. Bu ise 210.000 ton'luk bir peynir üretimidir ki, önemli bir tüketim maddesi olduğu ortadadır.

Dünya tüketimi ile ilgili bulunabilen değerler bir yılda üretilen 6.151.000 ton peynir için 1/10000 kuvvetindeki şirden mayasından ortalama olarak 13.000 ton tüketilmiştir. Ancak bu rakam Asya kıtasının Çin, Hindistan, Pakistan gibi büyük devletleri ile Afganistan, Kore, Vietnam gibi bir takım küçük devletlerin ve Güney Amerika ve Afrika'ya ait birçok toplumların dahil olmadığına bakılırsa yılda harcanan maya miktarının çok defa fazla olduğu söylenebilir. Bu hesaba göre, Türkiye için peynir mayası talebi yine 1/10000 kuvvetin-

deki mayadan 420 ton kullanılması gereği hakkında fikir yürütülebilir.

Memleketimizde sıvı şirden mayası halinde üretilen rennin, biri Bozboğaz, diğerleri İstanbul'da olmak üzere 8 kuruluş tarafından üretilmekte ve değişik isimler altında 18 marka halinde pazarlanmaktadır. Kesin üretim miktarına ait kayıtlar bulunmamakla beraber, bu işle uğraşanların 200 ton civarında maya üretildiğini ifade ettikleri bildirilmektedir. Memleketimizde evvelce sadece Ege Bölgesinden bazı kesimlerde incir bitkisi sütünden faydalanılıyorsa da şimdi bunun terkedildiği söylenmektedir. Buna göre tüketime yetmeyen faydalanıyorsa da, şimdi bunun terk edildiği peynir mayası üretimi için ülke dışından çoğunlukla Avusturya, Almanya, Hollanda, Danimarka, Macaristan, İsveç, Norveç gibi ülkelerden şirden ithali yapılmaktadır. İthal edilmiş dane şirden'inin tüm üretilen maya miktarının 3/5'inin ham maddesini teşkil ettiğini, diğer 2/5'inin de yerli şirdenin (buzağı ve kuzu şirdeninin) teşkil ettiğini bildirmektedir.

Bunlar yanında bir miktar da malak ve oğlak şirdeninin kullanıldığı bilinmektedir. Bahsedilen bu dışa bağımlı olma halinin, içinde bulunduğumuz döviz dar boğazında ülkemize ne denli mali yük yüklediği de ortada olan bir gerçektir. Ayrıca çeşitli ülkelerde ortaya çıkan şirden mayası kıtlığı ülkemizde de bütün ağırlığı ile kendini hissettirmektedir.

Dünyadaki hızlı nüfus artışına bağlı olarak toplum beslenmesindeki gelişme ve alışkanlıklar tüketici kesimde peynire karşı bir talep artışına yol açmış, bu artışa bağlı olarak peynir mayasına olan gereksinim de doğal olarak artmıştır. Bunun yanında et gereksinimindeki mevcut artış da şirden eldesi için süt emme devresindeki yavruların kesiminde bir azalmaya neden olmaktadır. Böylece şirden temini zorlaştığı gibi, fiyatlarında da hızlı bir artış söz konusu olmaktadır.

Bu nedenlerle şirden mayasının yerine kullanılabilir ürünler aramaya yönelik çalışmalar başlamıştır. Bu arada, hayvansal kaynaklı olan bu enzim yerine çeşitli bitki ekstratlarının da aynı amaçlarla kullanılabildiği bilinmektedir. Ancak, bu kullanım çok sınırlı ol-

muş, esas II. Dünya savaşından sonra fermentasyon teknolojisindeki hızlı gelişim, peynir yapımında kullanılabilen proteolitik özelliğe sahip enzimlerin elde edilmesine yardımcı olmuştur. Çeşitli küf ve bakteri kaynaklı mikrobiyal enzimler bu amaçla ve başarıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mesentericus*, *Str. liquefaciens* ve *Pediococcus cerevisiae* gibi bakterilerin bazı suşları kullanıldığı gibi *Mucor pusillus*, *M. rouxii*, küflerinin de kullanıldığı bildirilmektedir. Ancak bu üretimde *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* ve *Endothia parasitica* küflerinin en iyi ve en ekonomik sonuçları verdiği çeşitli literatür bildirimlerinde yer aldığı gibi, dünyadaki ticari üretim bu 3 mikroorganizma ile olmakta ve çeşitli ticari adlar ve patentler altında pazarlanmaktadır. Örneğin, *M. pusillus*'tan üretilenler «Emporase» *M. miehei*'den üretilenler «Rennilase», *E. parasitica*'dan üretilenler ise «Suparen» ve «Sure - Curd» ticari adını almaktadır. Bu üretim yanında başta A.B.D. olmak üzere Kanada ve çeşitli Avrupa ülkelerinin gıda tüzükleri bu enzimlerin kullanılmasına olanak tanımışlardır. Bizde ise 6 ay içinde mecburi yürürlüğe girecek yeni maya standardı aynı hükmü getirmektedir (ANONYMOUS - 1983). Bu enzimlerden Emporase, MEITO SANGO adındaki bir Japon firması tarafından *Mucor pusillus* Lint'ten üretilip, Avrupa'da Hollanda firması olan NOURY VAN DERLAND taraından; Suparen ise PFIZER (USA) firması tarafından imal edilip, Belçika'da PFIZER CHEMICALS EUROP firması tarafından piyasaya sürülmektedir. Ayrıca *Bacillus cereus*'un değişik bir türevi olan enzim ise Amerika MILES firması tarafından üretilmektedir.

Mikroorganizmalardan fermentasyon yoluyla elde edilen proteaz enzimleri üzerinde yapılan çalışmalara göre; fermentasyon metodları geliştikçe ve çevre faktörleri kontrol altında tutuldukça, endüstriyel yolla enzim üretiminde mikroorganizmalardan kaynak olarak yararlanılması ilk ve en düşük avantajdır. Çünkü, hayvansal ve bitkisel kaynaklarda olduğu gibi miktarı sınırlayıcı çevre, iklim, işgücü, toprak alanı ve mevsim vb. çeşitli faktörlere bağlı kalmak söz konusu değildir. Uygun suş seçimi ve kontrollü fermentasyon ile kantite

olmadan standart kaliteli ürün eldesi mümkün olmaktadır.

Mikrobiyal yolla peynir mayası üretimindeki diğer bir avantaj da ekonomik oluşudur. Uygun suş seçimi ve kontaminasyondan kaçınma ile en ucuz yolla üretim söz konusudur. Bütün bunlara ek olarak ürünün hijyen şartlarına uygun ve standart bir teknikle elde edilmesi de ayrı bir avantaj sağlamaktadır.

Bilinen diğer bir gerçek de, halen uygulamakta olduğumuz şirden mayası üretim tekniğinin çok ilkel ve bütün hijyen şartlarından uzak bulunduğudır. Bunun yanında işletmelerin çok ilkel oluşu da kalitesiz ve standart olmayan bir ürünün pazarlanmasına sebep olmaktadır. Halbuki gelişen teknoloji ile elde edilen bilgiler her iki faktörün de islahı yollarını göstermektedir.

Bütün bu gerçekler göz önüne alındığında peynirciliğin temel sorunu olan maya konusuna çözüm bulmanın kaçınılmaz olduğu ortaya çıkar. Bu nedenle modern teknolojinin geliştirdiği mikrobiyolojik yolla peynir mayası «rennin» üretimini, gelişmiş ülkelerde olduğu gibi yurdumuzda da uygulamak en önemli ve yararlı çözüm yolu olacaktır. Böylece hem döviz kaybı önlenecek, her kaliteli ve standart bir ürüne ekonomik bir üretimle kavuşulmuş olacak, hem de pek çok faktörle kısıtlanmış ve rastgele bir üretime bel bağlanılmamış olunacaktır.

Mikrobiyolojik yolla «rennin» üretimi üzerinde, bildirilen bu gerçekler göz önüne alınarak; konu ünitemizde projelendirilip çalışmalara başlanılmış ve olumlu sonuçlar alınarak uygulanabilirlik kazandırılmıştır.

Bu amaçla denemeye alınan 5 farklı suş numarasına sahip 3 değişik küf kültürü ile çalışılıp, farklı fermentasyon yöntemleri ve parametreleri uygulanarak, her biri için elde edilen ürün nitelikleri incelenmiştir.

Derin fermentasyon yönteminin seçildiği bu çalışmada; *Mucor pusillus*, *Rhizomucor miehei* ve *Mucor miehei* için phtılaştırma aktivitesine sahip ürün eldesi mümkün olurken, *Endothia parasitica*'nın ayrı iki suşu için de istenilen değerde bir aktivite elde edilememiştir. Her üç küf kültürü için de en stabil ürün

verdiği optimum inokulum miktarı ve fermentasyon şartları gibi bir çok parametreler saptanmıştır. Ayrıca kullanılan besi ortamının ülke şartlarında en kolay temin edilebilir ve ucuz olması imkanları araştırılmış ve soya unu yerine kullanılabilir maddeler saptanmıştır. Bazı küspeler (ayçiçeği, fındık ve pamuk küspesi) soya unu yerine protein kaynağı olarak denenmiş ve saptanan miktarda eş değer üretime ulaşılmıştır. Fermentasyon sonucu elde edilen pıhtılaştırma aktivitesine sahip enzim karakterindeki ürünün ortamdan ayrılması, en stabil ve dayanıklı olarak saklanabilmesi için, kısmi saflaştırma yoluna gidilip istenilen karakterde ürün eldesi mümkün kılınmıştır. Bu ürünün genel özellikleri belirlenmiş, üretimde nihai randımanın % 35 - 40 olduğu saptanmıştır. Buradan gidilerek ham maddeye bağlı yaklaşık maliyet hesaplanmıştır. Elde edilen ürünün ham maddeden gelen maliyeti kullanılan ortama göre 1 lt. maya için 21.5 - 100.3 TL. arasında değişen değerler olarak elde edilmiştir. Buna işçilik, amortisman, enerji ve diğer genel masraflar ilave edilerek gerçek maliyet bulunacaktır. Ekonomikliği tartışılmaz durumdadır.

Mikrobiyolojik yolla üretilen rennin için en uygun saklama şartları tespit edildikten sonra, bu üründen beyaz peynir yapılmış ve şahit olarak ele alınan şirden renneti ve Fransa'da üretilip getirdiğimiz mikrobiyal rennetle işlediğimiz peynirlerle karşılaştırılmıştır. Peynir yapısal ve duysal özellikleri itibarıyla incelenmiş ve beğeni topladığı saptanmıştır.

Bundan sonra elde edilen mikrobiyal renninde toksitite deneyleri (larva ve embriyo yöntemleriyle yapılmış ve herhangi bir toksik etki göstermediği saptanmıştır, üründe küf ve bakteri üremesine de rastlanmamıştır. Ayrıca bu konuda dünyada yetkili kurum olan FDA (Food and Drug Administration) dan kullanılan küflerin rennin üretiminde müsaade edildiğine ait hükümler ve resmi kayıtları getirilmiştir.

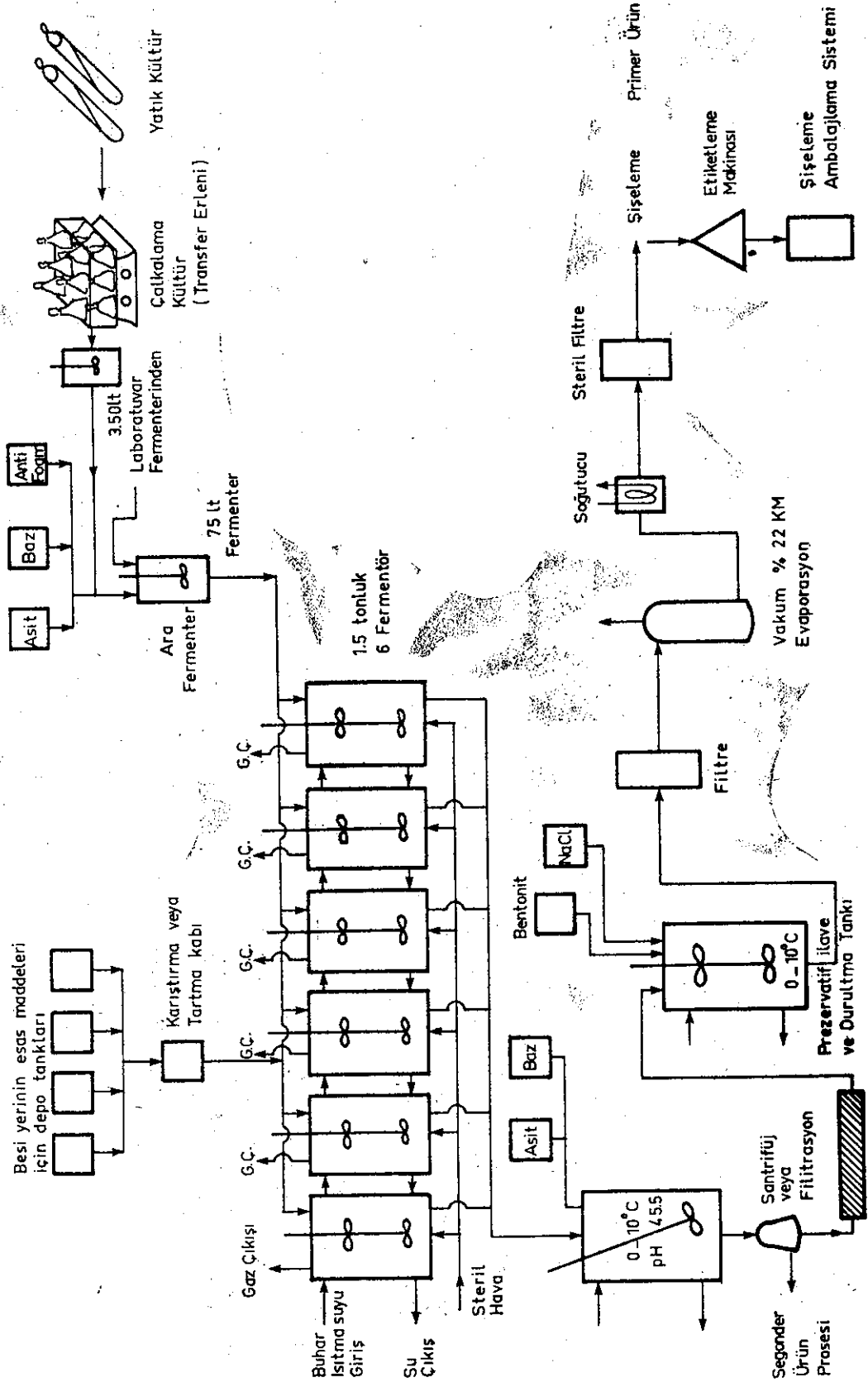
Bu üretim amacına yönelik kurulabilecek tesise ait temel şema geliştirilmiş, konu ile ilgili spesifikasyonların verilmesine gayret edilmiştir (Şema I ve II).

Ayrıca termantasyon atığı ürünün değerlendirilmesi yolları aranmış ve uygulanacak kısa bir prosesle hayvan yemi olarak değerlendirilebilecek nitelikte ve bileşimi, kullanılan hayvan yemlerinden daha zengin olarak belirlenen bir yan ürün eldesinin mümkün olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma ile bugüne değin kullanılmakta olan ilkel teknolojinin yerine ülkemizde ilk kez modern bir teknolojinin gerektirdiği biçimde standart ve kaliteli peynir mayası üretimi amaçlanmaktadır. Ülkemizdeki kasaplık hayvan ihtiyacı en üst düzeydeyken çok genç hayvanların bu ürün için kullanılması önlenerek ekonomik kazançlar da sağlanmış olacaktır. Şirden ithalatının önüne geçilecek, en az 200.000 \$ lık (75.000.000 TL. lık) bir döviz tasarrufu sağlanacaktır. Fermentasyon atığından ise protein değeri çok yüksek, bu yan üründen hayvan yemi elde edilebilecektir.

Bundan sonraki çalışmada DESİYAB'ca desteklenmiş ve bu konuda ön fizibilite hazırlanması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada gerekli bilgiler ve teknik spesifikasyonlar yanında madde balansı, teknik kapasite kullanım oranı, yerleştirme planı, işletme organizasyon ve personel durumu, tesis dönemi termün planı, proje maliyeti ve bunu oluşturan unsurlar incelenmiş, işletme sermayesi yatırım hesaplamalarına ön veriler hazırlanmıştır. 120 ton/yıl kapasiteli mikrobiyal rennin üreten fabrikaya ait ana makina teçhizatı gideri, atık değerlendirme için yatırım, yardımcı işletme makina teçhizatı olarak gider tasarımı hesaplanmış, sigorta, navlun, ithalat ve gümrükleme giderleriyle, stok, hammadde, enerji yakıt ihtiyacı ve bedelleri, ambalajlama ve nakliye yatırımları hesaplanarak bildirilmiştir.

Şekil II Mikrobiyolojik Yolla Renin Üretim Tesisi Akım Şeması



KAYNAKLAR

1. ANONYMOUS - 1971. Mc. GRAW - HILL. Encyclopedia of Science and Technology. Mc. Graw Hill Book Comp. Vol: 5) 19-30.
2. ANONYMOUS - 1983. Peynir mayası (Rennet) STANDARDI, TS, 3844 (8 Aralık 1983 - Resmi Gazete - Sayfa 26 - 30.
3. BECHORN, E.J. 1960 - Production of Industrial Enzymes. Wallerstein Lab. Commun. (23), 201 - 212.
4. BECHORN, E.J. 1967 - Production of Microbial Enzymes. Microbial Techn. (İnmuştur) Ed. by Henry Pepier, 15. Chap. First E. Reinhold Publ. Corp. 454 S.
5. CASIDA, E.L. 1964 - Industrial Microbiology, John. Wiley and Sons Inc. New York, 460 S.
6. REED, G. 1969 - Enzymes in Food Processing. 2 nd. Ed. Academic Press New York 573 Ş.
7. ŞEHİDİ, G. 1974 - *Endothia parasitica*'dan elde edilmiş pıhtılaştırıcı Anzimle (Suparen) işlenen bazı yerli peynirlerimizin teknolojik nitelikleri üzerinde araştırmalar. (Doktora Tezi, Basılmamış).
8. URAZ, T. (1969) - Hayvansal Peynir Mayası Kıtılığı ve Yerine Kullanılabilecek Maddeler. (Charles Alais'ten çeviri). Ziraat ve Yayın No. 3 Tarım Bak. Zir. İşl. Gn. Müdürlüğü Yayını - Ankara.
9. URAZ, T. 1983 - Peynir mayası sorunları. Zir. Mün. Dergisi 87, Eylül 12-18; Ankara.
10. URAZ, T. (1976) - Türkiye Peynirciliğinde kullanılan mayalar ve bunların elde edildikleri şirdenler üzerinde araştırmalar. Doçentlik Tezi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayını, A.Ü. Basımevi - Ankara 84 S. Yayın No. 625.
11. TOPAL, Ş. 1980 - Mikrobiyal Rennin Üretimi (Tübitak - MAE, Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü Proje Çalışması - Yayın No. 63, MAE Basımevi - Gebze, 78 S.
12. TUNAIL, N. 1974 - Kimyasal Mikrobiyoloji A.Ü. Zir. Fak. Diploma Sonrası Yüksek Okulu Ders Notları (Basılmamış)
13. YÖNEY, Z. 1970 - Süt ve Mamulleri A.Ü. Ziraat Fak. Yayını No. 421. Ders Kitabı - 148. A.Ü. Basımevi - Ankara 218, S.