

## Rekombinant DNA Teknolojisinin Gıda Enzimlerinin Üretiminde Kullanılma Olanakları

Hamit KÖKSEL<sup>1</sup> — Doç. Dr. Sedat DÖNMEZ<sup>2</sup> — Prof. Dr. Hazım ÖZKAYA<sup>2</sup>

1) *Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü — ANKARA*

2) *A.Ü. Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü — ANKARA*

### 1. GİRİŞ

Gıda endüstrisinde yaygın biçimde kullanılan enzimler uzun yıllardan beri bitkisel, hayvansal ve mikrobiyel kaynaklardan elde edilmektedir. Ancak bu organizmalardan çoğunun gelişme hızları yavaş ve üretimleri az olup çeşitli faktörlere bağlı olarak dalgalanma gösterebilir. Bu nedenlerle enzimler üzerinde çalışan araştırmacılar bunları üretmek için daha etkin yollar bulmak, mevcut olanların özelliklerini geliştirmek ve tamamen yeni enzimler yaratmak amacıyla moleküler biyoloji, genetik, protein mühendisliği v.b. alanlarındaki gelişmeleri yakından izlemektedirler. Bu doğrultuda yapılan araştırmalar rekombinant DNA (rDNA) teknolojisinin, genetik mühendisliği ve biyoteknolojinin diğer teknikleri ile birlikte kullanılarak spesifik bir enzimi kodlayan genlerin, özellikle bir bakteriye transfer edilerek mikrobiyel yolla üretilebilmesi için önemli potansiyele sahip olduğunu kanıtlamışlardır.

Bilindiği gibi enzimler protein yapısında olup, özellikleri bünyelerindeki amino asitlerin dizilim sırası ile belirlenir. Bu özellik ise ilgili DNA zincirindeki baz diziliş sırası tarafından kontrol edilmektedir. Mikroorganizmalardan insana kadar tüm canlılardaki genetik materyal olan DNA aynı temel yapıya sahip olup, aynı kod sistemi tüm canlılarda geçerlidir. Bu nedenlerle değişik tipteki organizmalardan alınan DNA parçalarını genetik mühendisliği tekniklerini kullanılarak birleştirmek olasıdır. Yani bir yabancı DNA parçası, bakteri veya diğer bir organizma bünyesine katılıp burada DNA kopyaları yapılabilir, bundan mRNA üretilebilir ve mRNA'dan da protein sentezlenebilir. Sentezlenen bu ürün herhangi bir protein olabileceği gibi, gıda endüstrisinde ihtiyaç duyulan bir enzim de olabilir.

Bu yazıda rekombinant DNA teknolojisi kısaca tanıtilip, bu tekniğin günümüzde gıda en-

zimlerinin üretimindeki uygulamaları ve yakın gelecekteki kullanım olanakları incelenmiştir.

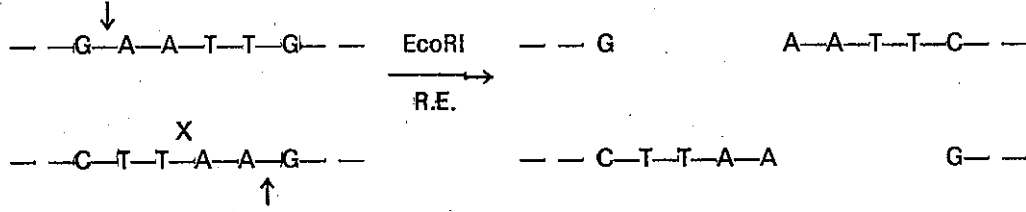
### 2. Rekombinant DNA Teknolojisi

rDNA teknolojisinin esası; farklı kaynaklardan DNA parçalarını izole edip, daha sonra bu parçaları in vitro olarak birleştirerek fonksiyonel bir hibrid-DNA molekülünün oluşturulmasıdır. Bunun için önce istenilen özellikteki geni içeren DNA parçasının donör organizmadan izole edilip saflaştırılması gerekir. Çeşitli yöntemlerle saflaştırılan DNA «restriksiyon endonükleaz»lar adı verilen bir enzim grubu ile parçalara ayrıldıktan sonra kullanılır.

#### 2.1. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri

Gerçekte, restriksiyon endonükleazlar bakterilerin doğal savunma sistemlerinin bir parçasıdır. Bir bakterinin bünyesine başka bir bakteri türünün DNA'sı girdiğinde, bu yabancı DNA spesifik bir nükleaz tarafından belirli bölgelerden kesilir. Bu bölgelerde, konukçu bakterinin DNA molekülünde bulunan metil gruplarının yabancı DNA da bulunmaması, endonükleaz enzimlerinin yabancı DNA'yı tanımasını sağlar. «Modifikasyon metilaz» olarak adlandırılan başka bir enzim ise, her tür için spesifik olan bu metilasyonu yapmakla görevlidir. Yabancı DNA da aynı baz diziliminin bulunduğu bölgede metil grupları bulunmadığından endonükleaz enzimlerinin etkisiyle parçalanır (1).

Günümüzde 600'den fazla restriksiyon endonükleaz enzimi tanımlanmış olup bunlar DNA zincirlerini spesifik tanıma bölgelerinden kırmakta kullanılırlar (2). Bu enzimlerin çoğunun ticari preparatları saf olarak pazarlanmaktadır (3, 4). En yararlı endonükleaz enzimlerinin DNA yı tanıyıp kestiği bölgede merkezi bir nokta etrafında dahili simetri vardır. Bu simetrik merkezi, aşağıda gösterilen EcoRI endonükleazları için «X» işareti ile belirtilmiştir.



Yukarıda gösterilen DNA parçası, simetri merkezi etrafında  $180^\circ$  döndürüldüğünde, döndürmeden önceki halden bir farklılık göstermeyecektir. Şekildeki oklar ise DNA'nın endonükleaz enzimi tarafından kesildiği noktaları göstermektedir. Böylece EcoRI gibi bazı restriksiyon endonükleaz enzimleri, yapışkan uçlar olarak adlandırılan, çıkıntılı uçlar oluşturarak DNA'yı keserler. Bu yapışkan uçlardaki bazların hidrojen bağları ile tekrar birleşmeleri mümkün olduğundan başlangıçtaki kesilme bölgesi tekrar oluşturulabilir. Bu sırada aynı restriksiyon enzimi tarafından kesilmiş olan fakat farklı kaynaklardan gelen veya kimyasal yolla entezlenen DNA parçaları da birleştirilebilir. Bu yolla yeni genetik kombinasyonlar meydana gelmektedir. Bu yeni hibrid DNA molekülü rekombinant DNA (rDNA) olarak adlandırılır.

Yapışkan uçlarda hidrojen bağları ile birleşmiş olan DNA parçalarının stabil bir rDNA'yı oluşturabilmeleri için her bir DNA zincirinde birer adet açıklığın kovalent bağla bağlanması gerekir. İşte bu kovalent bağ T4 DNA Ligaz enzimi yardımıyla oluşur (5).

## 2.2. Rekombinant DNA'nın Konukçu Hücreye Sokulması

Farklı kaynaklardan izole edilen DNA parçalarını birleştirmenin temel amacı, elde edilen hibrid DNA'nın uygun bir konukçu bünyesine sokularak ürünü olan proteinin üretilmesini sağlamaktır. *Escherichia coli* bakterisinin yapısı detaylı olarak incelendiği için bir çok bilim adamı tarafından konukçu organizma olarak kullanılmaktadır. Spesifik bir DNA segmentini *E. coli* veya diğer uygun bir konukçu organizma bünyesine sokabilmek için bu DNA segmentinin host organizma bünyesinde replikasyon yeteneğine sahip olan bir klonlama vektörüne sokulması gerekir. İstenilen spesifik bir DNA segmenti ile vektörün birleştirilmesi ise yukarıda anlatılan *in vitro* rekombinasyon yöntemleri ile gerçekleştirilir. Aktarı-

mak istenen DNA dizilimi uzun bir DNA zincirinin parçasıdır. Bu uzun DNA zinciri restriksiyon enzimi ile kesildiğinde çok sayıda DNA parçası elde edilir ve bunlar vektörlerle birleştirildiğinde çok sayıda hibrid DNA molekülü yaratılır. Bunların bakteri hücrelerinde replikasyonu sağlanarak farklı DNA klonlarının bir kütüphanesi oluşturulur. Arzu edilen klonların belirlenebilmesi amacıyla özel tarama yöntemleride geliştirilmiştir (5).

Klonlama başka bakteriler ve mayalarda da gerçekleştirilebilir, fakat *E. coli*'ye dayalı sistemler oldukça gelişmiştir. Geniş anlamda ele alındığında *E. coli* de kullanılan vektörler üç tiptir, bunlar plazmid'ler, bakteriofaj lambda ve kozmid'lerdir.

### 2.2.1. Plazmidler

Plazmidler, prokaryotik ve eukaryotik hücrelerin normal olarak sahip oldukları kromozomların dışında, bünyelerinde bulunan fakat dışardan alınmış olan (ekstrakromozomal) çift zincirli, sirküler yapıda DNA molekülleridir. Plazmidler üzerindeki genler, kendileri dışındaki kromozomlardaki genlerle birlikte, fakat onlardan bağımsız olarak replikasyon, transkripsiyon ve protein sentezi aşamalarından geçerler (6). *E. coli* de klonlama amacıyla sıklıkla kullanılan pBR 322 plazmidinin DNA'sı 4362 baz çiftinden oluşmuştur ve baz dizilimi tamamen aydınlatılmıştır. Bu plazmid, tetrasiklin ve ampisilin antibiyotiklerine direnç genlerini de taşımaktadır (5). Bir plazmid, yabancı DNA'yı sokmak için restriksiyon enzimleriyle kesildiğinde, kesme noktalarının bazıları antibiyotik-direnç geni içerisine tekabül edebilir. Bu noktadan yabancı bir DNA'nın bağlanması antibiyotik-direnç genini inaktive eder, ki bu olgu rekombinant plazmidin (veya onu taşıyan organizmanın) seleksiyonunda çok kullanılır (5). *E. coli* veya diğer bakteriler üzerinde en çok kullanılan plazmid vektörlerini gösteren listeler çeşitli kaynaklarda bulunabilir (7).

Plazmidler, *E. coli* hücrelerine transformasyon yapılarak sokulur. Bunun için bakteri hücreleri  $Mg Cl_2$  çözeltisi ile yıkanır ve  $Ca Cl_2$  içerisinde inkübe edilir. Canlı kalan bakteri hücrelerinin % 20'si plazmidi kabul edebilecek duruma gelir. Transformasyon işleminin etkinliği, küçük yabancı DNA parçaları içeren sirküler plazmidlerde en fazladır. Bu nedenle uzun DNA zincirlerinin klonlanmasında plazmidler dışında, ki vektörler tercih edilirler (5).

### 2.2.2. Bakteriofaj Lambda

Lambda genomu, bakteriofaj partikülü içerisinde paketlenmiş olan ortalama 50 Kb'lık çift zincirli bir DNA molekülünden ibarettir. Bu genomun 5' uçlarında, birbirleri ile hidrojen bağı yapabilen ve yapışkan uçlar oluşturan onikişer bazlık çıkıntılar vardır. Bu, bakteriofaj DNA'sının *E. coli*'nin enfekte edilmesinden sonra bir halka oluşturmasına olanak sağlar (5). Bakteriofaj genlerinin sadece yarısı, bakteriofajın gelişimi için mutlak gereklidir. Bunun dışında kalan genler çıkarılıp yerlerine yabancı DNA parçaları yerleştirilebilirler. Ancak lambda vektörleri, 18000 - 21000 baz çiftinden daha büyük olan yabancı DNA'ları klonlamakta kullanılamazlar. DNA'ların *E. coli* hücrelerine sokulması (transdüksiyon) fajın normal enfeksiyon mekanizması ile olur ve lambda DNA'sı host kromozomu ile birlikte replike edilir (5).

### 2.2.3. Kozmidler

Bunlar, plazmidlerle lambda fajının bazı avantajlarını birleştiren hibrid klonlama araçlarıdır. Kozmid vektörleri, lambda ve plazmid DNA'sının yapışkan uçlarına (cohesive sites *cos.*) sahiptirler, ayrıca bakteriofaj lambda partiküllerine *in vitro* olarak bağlanabilirler fakat lambda DNA'sının çoğu çıkarılmıştır. Bu yolla 52000, baz çifti içeren yabancı DNA kozmid bünyesine kolayca paketlenir. Paketlenen DNA, *E. coli* hücrelerinin bünyesine transdüksiyon ile etkin olarak sokulabilir. Hücre içerisine giren kozmidler tıpkı plazmidler gibi replikasyona uğrarlar.

### 2.3. Rekombinant DNA İçeren Hücrelerin Seçimi

Yabancı DNA'yı bir konukçu hücre bünyesine sokma işlemi, etkinliği oldukça az olan bir

işlem olduğundan, bu genleri bünyesine almış olan hücreleri belirlemek için çeşitli seçim yöntemleri uygulanır.

a) Belirli antibiyotiklere direnç genleri, rekombinant organizmanın seçiminde en fazla kullanılan tarama yöntemidir.

b) Seçici bir besiyeri kullanarak, sadece arzu edilen geni taşıyan organizmaların gelişmeleri sağlanabilir.

c) Seçilen hücreler belirli bir aktivite bakımından test edilebilirler (örneğin enzim aktivitesi).

d) Söz konusu genin oluşumunu kodladığı ürün, immünolojik yöntemlerle saptanabilir. Eğer uygun bir antikor varsa, bakteri kolonileri spesifik immünopresiptasyon reaksiyonu ile taranabilirler (5).

e) Ayrıca, tamamlayıcı DNA zinciri (Complementary DNA veya cDNA) yardımıyla yada uygun bir radyoaktif DNA ve RNA hibridizasyon probu ile klonlanan DNA'yı içeren bakteri kolonileri, DNA'larındaki spesifik bir dizilim bakımından taranabilirler.

Bu konudaki spesifik yöntemler çeşitli kaynaklarda bulunabilir (5, 8, 9, 10, 11).

Söz konusu rDNA'yı içeren konukçu hücre çeşitli yöntemlerle belirlendikten sonra, genetik yapısı birbirinin aynı olan bir grup bakteri oluşur. Her yavru hücrede tamamen aynı olan DNA kopyaları mevcuttur. Başlangıçta konukçu hücreye verilen rDNA, replikasyona uğrayarak çok sayıda yavru hücreye geçmiştir.

### 2.4. Rekombinant DNA'nın Taşıdığı Genin Ürünü Olan Proteinlere Dönüştürülmesi (expression)

Rekombinant DNA teknolojisinin ticari önemi, bir bakteri bünyesine sokulan yabancı genlerdeki DNA diziliş sırasını kodladığı proteine dönüştürülmesinden kaynaklanır. Böylece bakteri istenilen enzimi fazla oranda üreten bir fabrikaya dönüştürülmüş olmaktadır.

rDNA teknolojisinin önemli amaçlarından birisi organizmaya dışarıdan sokulmuş olan genin, organizmanın kendi genlerine kıyasla ekspresyonunun daha fazla yapılmasıdır. Örneğin,

triptofan amino asidini sentezleyemeyen bir *E. coli* mutanı, bu amaçla kullanılmaya çok uygundur. Bu bakterinin bünyesine girebilecek bazı plazmidler triptofan sentezini kodlayan genleri içerirler. İşte, üretilmek istenilen enzimin geni, plazmid üzerindeki triptofan geninin yakınına yerleştirildiğinde, esansiyel bir amino asit olan triptofan bakteri hücresi tarafından fazlaca sentezlenmek zorunda olduğundan dışarıdan sokulan gende triptofan geni ile birlikte tercihli olarak gen ürünlerine dönüştürülür (12).

Bakteri hücresi yeni enzimi üretmeye başladıktan sonra yeni problemler ortaya çıkabilir. Örneğin, bakteri ürettiği yeni enzimi yabancı bir madde kabul edip, hemen parçalayabilir. Eğer enzim stabil ise, dışarıya salgılanmadan hücre içinde birikebilir. Ancak günümüzde, üretilen bu tip proteinlerin hücre dışına salındığı teknikler var olup, buradan alınıp kolayca saflaştırılmaktadırlar.

Bu konudaki diğer bir güçlük ise, enzim proteinine bağlı olan karbonhidratlar gibi bazı grupların sentezlenmesinde ortaya çıkmaktadır. Örneğin *E. coli* bakterisi glikoproteinler gibi kompleks proteinleri sentezleyememektedir. Buna karşın, bir eukaryot olan bira mayası glikoproteinleri sentezleyebilmektedir. Ayrıca, mayaların toksin oluşturmamaları ve mutasyonlara karşı stabil olmaları gibi başka avantajları da vardır. Bu özelliklerinden dolayı *Saccharomyces cerevisiae* mayası insan interferonu üretimi ile ilgili çalışmalarda seçilerek kullanılmıştır (13).

### 3. Rekombinant DNA Teknolojisinin Gıda Endüstrisinde Kullanılma olanakları

Biyokimyacılar tarafından izole edilip tanımlanan binlerce enzimden sadece bir kaç gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (14). Bu sanayide enzim kullanımını sınırlayıcı faktörlerden bir tanesi, enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılmalarındaki güçlükleridir.

Gıda endüstrisinde enzim kullanımında rDNA teknolojisi, genetik mühendisliği v.b. tekniklerin kullanılması ile çözümlenebilecek sorunlar aşağıdaki gibi özetlenebilir :

Bir enzimi kodlayan gen bir organizmadan

alınıp, enzimi daha etkin ve verimli bir şekilde üretebilecek başka bir organizma bünyesine yerleştirilerek enzimin ekonomik üretimi sağlanabilir; patojenik bir organizmada bulunan bir enzimin geni, patojenik olmayan başka bir organizmaya taşınabilir; belirli bir organizma endüstride uygulanan ekstrem koşullarda (pH, sıcaklık v.b.) kullanılabilir şekilde değiştirilebilir; doğal enzimlerden daha üstün özellikler gösteren enzimler üretilebilir ve spesifik modifikasyonlarla enzimin özellikleri DNA düzeyinde geliştirilebilir.

### 4. rDNA Teknolojisinin Gıda Enzimlerinin Üretiminde Kullanılması Üzerindeki Çalışmalar

rDNA teknolojisinin gıda enzimlerinin üretiminde kullanılması konusundaki araştırmalarda başarılar elde edilmeye başlanılmış olup, önemli birkaç enzimin genleri klonlanmış bulunmaktadır (15, 16). Genellikle zararsız olarak kabul edilen (GRAS) mikroorganizmalara, bu enzimleri kodlayan genleri transfer edecek ve bunları gen ürünlerine dönüştürmeyi sağlayacak teknikler geliştirilmiştir.

#### 4-1. Rekombinant DNA Teknolojisinin Rennin Üretiminde Kullanılması

rDNA teknolojisi ile enzim üretimindeki ilk uygulamalar rennin de olmuştur. Süt endüstrisinde, peynir yapımında sütü koagüle ettirmede kullanılan renninin aktif bileşeni olan kimozin genetik mühendisliği çalışmalarında birçok araştırmaya konu olmuştur. Ticari rennin, süt emeği buzağuların dördüncü midelerinden (Abomasum) ekstarkisoyla elde edilmektedir. Mikrobiyel kaynaklı renninin, süt pıhtılaştırma özelliği, ısı ve pH stabilitesi ve koagülasyon/proteoliz oranı gibi özellikleri rennine göre farklılık gösterdiğinden kaliteli peynir üretiminde hayvansal rennine büyük bir talep bulunmaktadır. Ancak, bu yola elde edilebilecek rennin miktarı kısıtlı ve maliyeti ise yüksek olduğundan hayvansal rennini mikroorganizmalardan üretmek için yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bir çok araştırma kuruluşu buzağı midesindeki mRNA (elçi RNA) dan oluşturulan cDNA kütüphanelerinden elde edilen kimozin genini klonlamak ve bu genin çeşitli konukçu organizmalarda ekspresyonunu sağla-

mak için stratejiler geliştirmişlerdir. Buzağı kimozininin (Rennin; E.C. 3.4.23.4) prokür soru olan prokimozin geninin klonlandığı ve klonlanan genin ürününün elde edildiği bildirilmektedir (17, 18). Eukaryotik organizmaların bünyesinde doğal olarak çözülmüş halde bulunan rennin, *E.coli* de intraselüler protein agregatlarının meydana gelmesiyle çözünmez hale geçmektedir. Bu protein agregatlarının izolasyonu ve çözünür hale geçirilmesi için bir yöntemin geliştirildiği bildirilmiştir. Bu yöntemle, oldukça saf kimozin elde edilebildiği saptanmıştır (19). Ayrıca, süt endüstrisi ile ilgili iki ayrı kuruluşun rDNA teknolojisi ile elde edilen rennin ile yaptıkları büyük boyutlardaki peynir denemelerinin başarı ile tamamlandığı bildirilmiş ve bu rennin ile hazırlanan çedar peynirinin, ticari buzağı rennini ile hazırlanan peynirle aynı tat, koku ve tekstüre sahip olduğu açıklanmıştır (20). Başka bir araştırmada ise buzağı kimozini *Aspergillus nidulans*'a klonlanmış ve elde edilen rennin ile yapılan peynir denemelerinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir (21).

Sonuç olarak hayvansal renninin rDNA yöntemleriyle üretiminin, süt endüstrisinde kullanılma olanağının oldukça fazla olduğu söylenebilir.

#### 4.2. Rekombinant DNA Teknolojisinin $\alpha$ - Amilaz Üretiminde Kullanımı

Yüksek früktoz içerikli mısır şurubu (High Fructose Corn Syrup=HFCS) üretiminde ham mısır nişastası,  $\alpha$  - amilaz etkisi ile kısmen parçalanarak dekstrinlere dönüştürülür.

Rekombinant DNA teknikleri kullanılarak üretilen enzimlerin gıda işlemede kullanılmasına izin verilmesi için ABD'deki ilgili kuruluş olan FDA (Food and Drug Administration) ya ilk başvuru bir rekombinant  $\alpha$  - amilaz için olmuştur (22). *Bacillus stearothermophilus*'tan alınıp *Bacillus subtilis*'e klonlanan ısı ve aside dayanıklı  $\alpha$  - amilaz üretimi için patent verilmesi de bu konuda ilk patent uygulamalarındandır (23).

#### 4.3. Rekombinant DNA Teknolojisinin Diğer Gıda Sanayii Enzimlerinin Üretiminde Kullanılması

Yukarıda anlatılanların dışında rDNA teknolojisi, glükoamilaz, sellobiyohidrolaz ve piranoz - 2 - oksidaz gibi enzimlerin üretiminde de uygulanmaktadır (24). *Aspergillus awamori*'den elde edilen ekstraselüler glükoamilaz, nişastanın  $\alpha$  - 1, 4 ve  $\alpha$  - 1, 6 bağlarını kırarak glükoz ünitelerine kadar parçalamaktadır. Bu iki aktiviteye kombine halinde sahip olması bu enzimin nişastanın şekerlendirme işleminde kullanılmasını yaygınlaştırmaktadır. *A. awamori* de glükoamilaz üretimini sağlayan bu gen maya hücresinde replikasyon yeteneğine sahip olan bir vektöre klonlanmıştır (24).

Ekzosellobiyohidrolaz - 1, *Trichoderma reesei* tarafından en fazla üretilen selülozdir. Selüloz zincirlerinin indirgen olmayan uçlarından sellobiyoz birimlerini koparan bu enzimin geni klonlanmış olup *E. coli* ve bazı maya hücrelerinde ekspresyonu üzerindeki çalışmalar sürmektedir (24).

*Polyporus obtusus* tarafından üretilen piranoz - 2 - oksidaz enzimi, glükoz iki numaralı pozisyonunda oksitleyerek glükozon oluşturmaktadır, klükozon ise kimyasal yöntemlerle früktoza indirgenebilmektedir. Bu reaksiyonları katalize eden enzimin geni de klonlanmış bulunmaktadır (24).

Bütün bu örneklerden başka, yüksek sıcaklık derecelerinde çalışabilen bir bakteriyel  $\beta$ -amilazın; spheroplast füzyonu ve rDNA teknolojisi ile yüksek etanol konsantrasyonuna dayanıklı bir maya ırkının geliştirildiği de bildirilmiştir (25). Bir firmaya, termostabil pululanaz enzimi üretiminde kullanılabilecek rekombinant *Bacillus subtilis* ve içerdiği rekombinant plazmidler için patent hakkı verilmiştir (26). Bira ve şarap üretiminde kullanılabilecek rDNA teknolojisi ürünleride geliştirilmiş bulunmaktadır (27, 28).

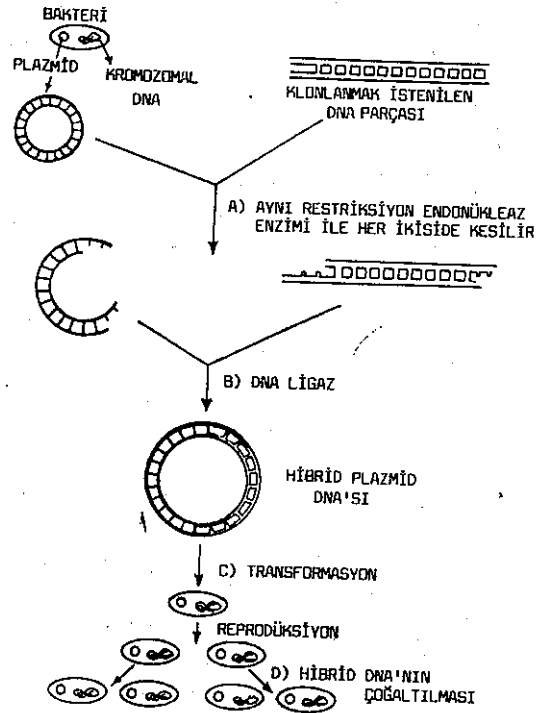
#### 4.4. Rekombinant DNA Teknolojisinin Endüstriyel Boyutlarda Kullanımı

Gıda endüstrisinde kullanılan bazı enzimleri kodlayan genlerin bakterilere klonlanmasına karşın bunların endüstriyel boyutlardaki üretimleri sınırlıdır. Genetik mühendisliğin endüstriyel boyutlardaki kullanımının in-

celendiği bir araştırmada rDNA teknolojisi ile geliştirilmiş bir *Bacillus subtilis* irkının endüstriyel ölçekte  $\alpha$  -amilaz üretiminde kullanıldığı bildirilmektedir. Bu *Bacillus* irkına başka bir irkin  $\alpha$  -amilaz enzimini kodlayan genin çoklu kopyası pKTH10 plazmidini ile aktarılmıştır (16). Elde edilen rekombinant irk ile, eski yöntemlerle geliştirilmiş olan irka oranla laboratuvar ölçeğinde iki kat daha fazla  $\alpha$  -amilaz elde edilebilmiş ve rekombinant irkin stabilitesini endüstriyel boyutlarda bile koruduğu ortaya çıkmıştır (29).

### 5. SONUÇ

Birçok yeni buluşta olduğu gibi rDNA teknolojisi de tahminlerin ötesinde riskler taşıyabilir. Ancak, birçok bilim adamı bu risklerin, yararlarının yanında kabul edilebilir düzeyde olabileceğini savunmaktadırlar. Ayrıca, enzim üretimi ve fermentasyon teknolojisinde uzmanlaşmış pekçok firma biyoteknoloji alanındaki araştırma-geliştirme yatırımlarını giderek artırmaktadırlar. Önümüzdeki yıllarda, genetik mühendisliği ile birlikte doğal bilimlerdeki gelişmelere bağlı olarak endüstriyel enzimlerin sayı ve miktarları artacaktır. Bu-



nun sonucu olarak da enzimlerin büyük boyutlarda ve ekonomik olarak üretimi normal endüstriyel işlemler arasında sayılacaktır.

### KAYNAKLAR

1. Suzuki, D.T., Griffiths, A.J.F. and Levontin, R.C. *Manipulation of DNA. An Introduction To Genetic Analysis*, Chapter 13. W.H. Freeman and Co, San Fransisco. 1981
2. Dubey, A.K., Mukhopadhyay, S.N., Bisaria, V.S. and Ghose, T.K. *Sources, Production, and Purification of Restriction Enzymes*. Proc. Biochem. 22 (1) : 25-34. 1987
3. Haas, M.J. *Methods and Application of Genetic Engineering*. Food Technology. 29 (2) : 69-77. 1984.
4. Roberts. R.J. *Directory of Restriction Endonucleases*. Methods in Enzymology, Vol. 18. Academic Press Inc., New York, N.Y. 1979.
5. Grierson, D., Covey, S.N. *Gene Cloning, Identification and Sequencing*. Plant Molecular Biology, Chapter 1. Blackie and Son Ltd, Glasgow. 1984.
6. Lehninger, A.L. *More About Genes : Repair, Mutation, Recombination and Cloning*. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc, New York, 1982
7. Bolivar. F. and Beckman, K. *Plasmids of E. Coli as Cloning Vectors*. Methods in Enzymology. Academic Press Inc, New York, 1979.
8. Helling, R.B. and Lomax, M.I. *The Molecular Cloning of Genes : General Procedures*. Genetic Engineering, Ed. A.M. Chakrabarty. CRC Press Inc., W. Palm Beach, Florida. 1978.
9. Grunstein, M. and Wallis, J. *Colony Hybridization*. Methods in Enzymology. Academic Press Inc., New York, N.Y. 1979.
10. Clarke, L. and Carbon, J. *Selection of Specific Colonies from Colony Banks*. Methods in Enzymology. Academic Press Inc., New York, N.Y. 1979.
11. Szostak, J.W., Stiles, J.I., Iye B.K., Chiu, P., Sherman, I. and Wu, R. *Hybridization with Synthetic Oligonucleotids*. Methods in Enzymology, Vol. 68. Academic Press Inc. New York. 1979.
12. Abelson. P.H. *Biotechnology : An Overview*. Science 229 : 611-613. 1983
13. Hitzeman, R.A., Lening, D.W., Jeanne Perry, L., Kohr, W.J., Ievine, H.L. and Goeddel,

- D.V. Secretion of Human Interferons by Yeasts. *Science* 219 : 620-625. 1983.
14. Ulmer, K.M. Protein Engineering. *Science* 219 : 666-671. 1983.
  15. Nishimori, K., Kawaguchi, Y., Hidaka, M., Uozumi, T. and Beppu, T. Expression of Cloned Calf Prochymosin Gene Sequence in *E. coli*. *Gene* 19 : 337-341. 1982.
  16. Palva, I. Molecular Cloning of  $\alpha$  - amylase Gene From *B. amyloliquefaciens* and Its Expression in *B. subtilis*. *Gene* 19 : 81-87. 1982.
  17. Harris, T.J.R., Lowe, P.A., Thomas, P.G., Eaton, M.A.W., Millican, T.A., Patel, T.P., Bose, C.C., Caroy, N.H., and Doel, M.T. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of cDNA coding for Calf Preprochymosin. *Nucleic Acids Res.* 10 : 2177-2187. 1982.
  18. Emtage, J.S., Angal, S., Doel, M.T. Harris, T.J.R., Jenkins, B., Lilley, G. and Lowe, P.A. Synthesis of Calf Prochymosin (prorennin) in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80 : 3671-3675. 1983.
  19. Marston, F.A.D., Lowe, P.A., Doel, M.T., Shoemaker, J.M., White, S. and Angal, S. Purification of Calf Prochymosin (prorennin) Synthesized in *E. coli*. *Bio/Technology*, 2 : 800-804. 1984.
  20. Anonymous. News of the Week. *Chemical and Engineering News*, 68 (2) : 4-6. 1984.
  21. Pitcher, W.H. Genetic Modification of Enzymes used in Food Processing. *Food Technology*, 40 : 62. 1986.
  22. Lawrence, R.H. New Applications of Biotechnology in the Food Industry. *Cereal Food World*. 32 : 758-765. 1987.
  23. Tamuri, M., and Kanno, M. Heat and Acid Stable  $\alpha$ -amylase enzymes and Processes for Producing the Same. U.S. Patent No. 4, 284, 722-1. 1981.
  24. White, T.J., Meade, J.H., Shoemaker, S.P., Koths, K.E. and Innis M.A. Enzyme Cloning for the Food Fermentation Industry. *Food Technology* 38 (2) : 90-98. 1984.
  25. Anonymous. *Enzymology Survey*. *Food Engineering*. 56 (5) : 85-98. 1984.
  26. Clomen, R.D. and McAlister, M.P. Plasmids Containing a gene Coding for a thermostable pullulanase and Pullulanase producing strains of *E. coli* and *B. subtilis* containing the plasmids. U.S. Patent No. 4, 612, 287. 1968.
  27. Yocum, R.R. Genetic Engineering of Industrial Yeasts. 10. *Proceed Bio Expo*. 86. Ed. O.R. Zaborisky. p171-180. Butterworth Publishers, Stoneham, MA. 1986.
  28. Snow, R. Genetic Engineering of a Wine Yeast for Malolactic Fermentation of Wine. *Food Technology*. 39 : 96. 1985.
  29. Vehmaanpera, J. Nybergh, P.M.A., Tanner, R., Pobjonen, E., Bergelin, R. and Korhola, M. Industrial Production of  $\alpha$  - amylase by Genetically Engineered *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.* 9 : 546-549. 1987.