

ŞEKER ŞURUPLARININ MİKROPSAL ÜRETİMİ: II. GLIKOZ İZOMERAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR.

Dr. Necdet SAĞLAM(*)

Besin ve içecek endüstrilerinde sükröz gibi tatlı olan şeker karışımlarının mikropsal üretiminde önemli bir aşamayı oluşturan glikoz izomeraz, (E.C.5.3.1.5.) glikozu geri dönüşümlü olarak fruktoza izomerize eden bir enzimdir(1). Genellikle, bir çok mikroorganizma tarafından hücre-içi (Intracellular) karekterde sentezlenmekte ve özellikle fruktoz içeren mısır şuruplarının üretiminde kullanılmaktadır (2). Bu enzimi yüksek verimlilikte üreten prokaryotik mikroorganizmalara örnek olarak; *Actinomyces phaeochromogenes*, *Aerobacter aerogenes*, *Actinoplanes missourienses*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas hydrophila*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces bikiniensis* türlerini vermek mümkündür (3-4-5-6). Özellikle, *Bacillus*, *Arthrobacter* ve *streptomyces* türleri'nden elde edilen glikoz izomeraz, ticari amaçlarla üretilmektedir (7-8). Yüksek miktarda fruktoz şuruplarının üretiminde serbest ve tutuklanmış enzim sistemleri kullanılmakta olup özellikle sürekli fruktoz şurubu üretimi için tutuklanmış hücre veya enzim tercih edilmektedir (9).

Glikoz izomeraz enzimi, aldo formundaki (glikoz) basit şekerleri keto formuna (fruktoz) izomerize ederken katalitik aktivitesi için Mg^{+2} ve Co^{+2} gibi iki değerli katyonlara gereksinim duymaktadır (10). Magnezyum, enzimin katalitik aktivitesinde aktivatör olarak rol oynarken, kobalt, enzimin sıcaklığa karşı dayanıklılığını arttırmaktadır (3-5-11). Bununla birlikte kobaltın kültür ve tepkime ortamlarında kullanılması bu katyonun toksik ve çevresel tehlike olması nedeniyle pek arzu edilmemektedir (12). Bu nedenle, glikoz izomerazın mikropsal kaynaklı üretiminde son yıllarda bu katyona gereksinim mikroorgaizmalardan üretimi hedeflenmiştir. Nitekim yapılan araştırmaların ışığında bazı *Aerobacter* türlerinden (*A.aerogenes*) kobalta gereksinim duymayan enzim üretimi gerçekleştirilmiştir (3). Ayrıca, Ca^{+2} glikoz izomeraz için inhibitör bir katyon olarak bilinmektedir (13). Fruktoz şuruplarının üretiminde üç enzimatik aşama mevcut olup bunlar;

(*) Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Araştırma görevlisi

sıvılaştırma, şekerleştirme ve izomerizasyondur (14). Glikoz şuruplarının fruktoza izomerizasyonunda sıvılaştırma aşamasında *Bacillus licheniformis* alfa-amilazları tercih edilmektedir. Çünkü alfa-amilazlar (özellikle *B. subtilis* kaynaklı olanlar) kalsiyum-metallo enzimleridir. Buna karşın, *B. Licheniformis* Alfa-amilazları daha az kalsiyuma gereksinim duyarlar ve bu maddenin ortamda çok düşük miktarda olması durumunda (1 ppm'nin altında) magnezyum iyonlarının vasıtasıyla, izomerizasyon aşamasında rol oynayan glikoz izomeraz üzerindeki inhibitör etkisi baskılanmaktadır. Bu nedenle, *B.licheniformis* alfa-amilazları daha az kalsiyum gereksinim duyması ve sıcaklığa daha dayanıklı olması özelliğinden ötürü, sıvılaştırma aşamasında tercih edilmektedir.

Glikoz izomeraz üreten mikroorganizmaların genellikle mezofilik ve termofilik özellikte olduğu ve enzim üretimimin, üremenin idofaz (*streptomyces türleri*) ile trifaz (*bacillus türleri*) evrelerinde yüksek miktarlarda sentezlendiği gözlenmiştir (3-11). Yine enzim üretim için uygun fizyolojik ve kültürel koşulların belirlenmesine yönelik çalışmalarda yüksek verimlilikte enzim üretimi için inkübasyon sıcaklığını 28-30 °C, pH'nın 7.0-8.5 olduğu saptanmıştır (3-5-13).

Bir çok prokaryotik mikroorganizmadan glikoz izomeraz üretiminde indükleyici madde olarak ksiloza gereksinim duyulmaktadır. Diğer bir ifadeyle, ksiloz enzim için indüktör madde olarak görev görmektedir (7-15-16). Ticari olarak glikoz izomeraz üretiminde saf ksilozun kullanılması, pahalı olması nedeniyle pek arzu edilmemektedir. Bu nedenle yapılan bazı araştırmalar, ksilozun yerine gecebilecek mısır kabuğu, mısır koçanı, ksilan ve saman gibi yapılarında ksiloz bulunan bitkisel kaynaklı maddelerin asit hidrolizatlarının enzim üretiminde, kültür ortamlarında ucuz karbon kaynağı olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir (7-16-17). Yine, mısır koçanını, pancar ve üzüm posası gibi artıklarının asit hidrolizatlarının kültür ortamında kullanılması halinde enzim üretiminin artışı gözlenmiştir (18).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda glikoz izomeraz enziminin fungus kökenli üretimi amaçlanmıştır (19). Bu hedef doğrultusunda tarafımdan yapılan çalışmaları aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür. Çalışmaların başlangıcında, özellikle nişastalı-selülozlu hammadde ve artıklarını hidroliz etme yeteneğinde olan fungus türleri (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Rhizopus*) kullanılmıştır. Ayrıca sözü edilen fungus türlerinden ticari olarak çeşitli enzimler (selülaz, amilaz, amiloglikozidaz v.b) üretilmektedir (2-14). Denenen funguslar arasında en yüksek miktarda glikoz izomeraz aktivitesi *Rhizopus oryzae*'de gözlenmiştir. Ayrıca, hücre-dışı karakterdeki enzim aktivitesi, hücre-içi karakterdekine kıyasla oldukça yüksektir. Yine, *Rhizopus oryzae* kaynaklı glikoz izomeraz, gerek kültür ortamlarında gerekse tepkime ortamlarında kobalt'a gereksinim duymamaktadır. Bunun yanında, hücre-dışı glikoz izomeraz'ın zamana bağlı olarak dayanıklılığının incelendiğinde ilk 10 günde % 4, iki aylık bir sürede ise % 52 civarında aktivitesinin kayb olduğu saptanmıştır.

Yukarıda belirtilen özelliklerden ötürü, fungus kökenli glikoz izomerazın furuktoz şuruplarının üretiminde kullanılması halinde bazı avantajlar sağlamaktadır.

Bunlardan ilki, enzimin hücre-dışı karakterde olması ticari olarak enzim üretiminde özellikle enzim saflaştırılmasında bazı saflaştırma aşamalarını ortadan kaldırmaktadır. Çünkü hücre-içi karakterdeki enzim saflaştırılması zaman ve aşamaları bakımından uzun olup ekonomik olarak yük görmektedir.

İkinci avantajı ise, fungus kaynaklı glikoz izomerazın gerek kültür gerekse tepkime ortamlarında kobalta gereksinim duymamasıdır. Böylece kobaltın toksik ve çevresel tehlike oluşturması nedeniyle ortamdan uzaklaştırılması sağlanmış olmaktadır. Zira, son yıllarda yapılan çalışmaların büyük bir kısmı, bu katyona gereksinim duymayan mikroorganizmalardan enzim üretimini amaçlamaktadır. Ayrıca, ticari olarak glikoz izomeraz üretiminde *Rhizopus oryzae*, ucuz karbon kaynakları olan ve ksilozun yerine alternatif bitkisel kaynaklı çeşitli maddeler üzerinde üretilmesi halinde yüksek verimlilikte enzim aktivitesi göstermiştir. Özellikle parasetik asitle delignifiye edilmiş mısır koçanı içeren kültür ortamlarında glikoz izomeraz aktivitesi diğer kullanılan karbon kaynaklarına (ksilan, bugday kepeği, v.b.) kıyasla oldukça yüksektir.

Ülkemizin ekonomisi büyük ölçüde tarım ve hayvancılığa dayanmaktadır. Geniş ölçüde tarımı yapılan nişastalı ve selülozlu hammadde ve artıklarından gereği gibi yararlanılamamaktadır. Buna karşı, bir çok dünya ülkelerinde bu maddelerden çeşitli uygulama alanlarında yararlanılmaktadır (20-21). Ülkemizde de bu mevcut potansiyel enerji kaynaklarından çeşitli uygulama alanlarında kullanılarak yararlanmak (şeker şuruplarının üretiminde, etanol ve tek hücre proteini üretiminde, çeşitli delignifiye yöntemlerle hayvan yemi olarak sindirebildiğini arttırmaktadır) mümkündür. Neticede, sözü edilen süreçlerle ülkemizde bol bulunan fakat sınırlı kullanımı olan bu kaynakların geri kazanımı mümkün olacak ve ülke ekonomisinin kalkınmasına bir oranda katkıda bulunacaktır.

KAYNAKÇALAR

1. Huitron, C. and limon-Lason, J. (1978): Immobilizatiton of glyucose isomerase ion-exchange materials. *Biotechnology and Bioengineering*, 20, 1377-1391.
2. Novo, Enzymes in the starch industry, (1981): use of the sweetzyme type Q production of fructose syrup. April, 1-5.
3. Chen, W.P (1980): Glucose Isomerase. *Process Biochemistry*, june/july 1-5 August/september 5-11.
4. Scallet, B.L., Shieh, K., Ehrental, I. and Slepshak, L.(1974): Studies in the isomerization of D-glucose. *Die starke*, 26, 405-408.
5. Sanchez, S. and Smiley, K.L. (1975): Properties of D-xylose isomerase from *Streptomyces albus*. *Applied Microbiology*, 29 (6), 745-750.

6. Park, Y.K. and Thoma, M. (1974): Some interrelation between microbial xylanase and glucose isomerase production. *Journal Applied Microbiology*, 20, 67-69.
7. Chen, W.P., Anderson, A.W and Han, Y.W. (1979): Production of glucose isomerase by *Streptomyces flavogriseus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 37,(2), 324-331.
8. Takzaki, Y. (1973): Japanese Patent, 73, 49-951.
9. Vaheri, M. and Kauppinen, V. (1977): Improved microbial glucose isomerase production process. *Biological Chemistry*, June-July 5-8.
10. Chou, C.C, Ladish, M.R. and Tsao, G. T. (1976): Studies on glucose isomerase from a *Streptomyces* sp. *Appl. Environment. Microbiol.* 32, (4), 489-493.
11. Tsamura, N., Hagi, M. and Sato, T. (1965): Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose; II. Properties of the enzyme from *S. phaeochromogenes*. *Agricultural Biological Chemistry*, 29, 1129-1134.
12. Bucke, C. (1977): Industrial glucose isomerase, In A. Wise-man (ed.), *Topics in enzyme and fermentation biotechnology*. Ellis Harwood limited, Chichester, England, vol:1, 147-171.
13. Aschengeen, N. (1975): Production of glucose/ fructose syrup. *Process Biochem.* 10, (4), 17-23.
14. Matur, A., Sağlam, N. (1982): Glikoz/fruktoz şuruplarının mikrobiyal üretimi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 16, 143-150.
15. Gong, C.S., Chen, L. and Tsao, G.T. (1980): Purification and properties of glucose isomerase of *A. missouriensis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 12, 833-845.
16. Takazaki, Y., Yosugi, K. and Kanbayashi, A. (1969): Glucose isomerase, In Perlman (ed). *Fermentation advances*. Academic Press. Inc. New York, 561-570.
17. Han, Y.W., Lee, J. S. and Anderson, A.W. (1975): Chemical composition and digestibility of ryegrass straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 928-931.
18. Chen, W. P. and Anderson, A.W. (1980): Extraction of hemicellulose from ryegrass straw for the production of glucose isomerase and use of the resulting straw residue for animal feed. *Biotechnol. and Bioeng.* 22, 519-530.
19. Sağlam, N. (1982): Fungus kökenli glikoz izomeraz enzimi üzerine çalışmalar. *Bilim uzmanlığı tezi*, Hacettepe Üniversitesi, G. Biyoloji Bilim Dalı-Ocak.
20. Sağlam, N. (1989): Şeker şuruplarının mikropsal üretimi: I. Fruktoz şuruplarının önemi ve glikoz izomeraz enzimi. *Hacettepe Üni. Eğitim Fakültesi Dergisi*, 4, 321-234.
21. HARVEY, W. B. And wikle, C.R. (1983): Sugars and chemicals from cellulose. *Reviews in Chemical Engineering*, January-March 1, (1), 71-119.