

## ENDÜSTRİYEL ÜRETİMDE GEN TEKNOLOJİLERİ

**Gülay ÖZCENGİZ\***

*Modern biotechnology is now over 25 years old. In 1972, the birth of recombinant DNA technology propelled biotechnology to new heights and led to the establishment of a new industry. Within four years of the discovery of recombinant DNA technology, genetically engineered bacteria were making human insulin and human growth hormone. This led to an explosion of investment activity in new companies, mainly dedicated to the innovation via genetic approaches in pharmaceutical, food, beverage and many other sectors.*

### Giriş

***I***nsanoğlu mikroorganizmaları yüzyıllardır kendi yararı için kullanmaktadır. Bu süreçte, bilimsel gelişmelerin mikroorganizmaların rolünün anlaşılabilmesine izin vermesiyle birlikte biyoteknoloji terimi ilk kez 1919'da kullanılmış ve " faydalı ürünlerin ham materyalden canlı organizmalar tarafından oluşturulması" şeklinde tanımlanmıştır. Günümüzde bu tanım, canlı organizmaların ya da onların ürünlerinin insan yaşamını ve çevresini olumlu yönde değiştirecek biçimde kullanılmasını sağlayan teknolojilerin bir toplamını içerecek şekilde genişletilmiş, çoğunlukla gen teknolojileri ve genetik rekombinasyon (genetik materyalin yenibileşimi) terimleri ile birlikte kullanılabilir hale gelmiştir. Mikroorganizmaların (bakteriler, mayalar, küf ve diğer mantarlar, algler) metabolik aktiviteleri sonucu faydalı ürünler (metabolitler) oluşturmalarına dayanan ve fermentasyon endüstrisi adı verilen sektörün önemi, temelini oluşturan mikroorganizmaların 5 ayrı özelliğinden kaynaklanmaktadır: (1) Hücre yüzey alanının hücre hacmine oranı yüksek olduğundan, mikroorganizmalar besinleri hızla hücre içine alabilir, böylece hızlı üreyebilir ve kısa sürede bol miktarda ürün oluşturabilirler, (2) Biyokimyasal aktiviteleri müthiş bir çeşitlilik gösterir, dolayısı ile çok çeşitli ürünlerin elde edilmesinde kullanılabilirler, (3) Farklı çevresel ortamlara kolaylıkla uyum gösterebilirler, bu nedenle doğadan elde edilen mikroorganizmalar rahatlıkla bir laboratuvarın kültür şişesinde ya da bir fabrikanın fermentör adını verdiğimiz büyük üretim tanklarında ucuz besin maddeleri kullanılarak üretilirler, (4) Bileşiklerin aktif ve inaktif formlarının karışık olarak sentezlendiği kimyasal sentezin aksine, mikroorganizmaların biyosentezle oluşturdukları bileşikler genellikle aktif formdadır, ve (5) Hücrelerini ya

\* Prof. Dr., Orta Doğu Teknik Üniversitesi , Biyoloji Bölümü

Avrasya Dostyası, Moleküler Biyoloji ve Gen Teknolojileri Özel, Sonbahar 2002, Cilt: 8, Sayı: 3, s. 104-119.

da genlerini manipüle ederek daha fazla ürün vermelerini sağlamak, ürün yapı ve aktivitelerini değiştirmek, hatta yeni ürünler sentezlemelerini sağlamak mümkündür.

Mikroorganizmalar, binlerce yıl öncesinden bu yana ekmek, şarap, bira, sirke yapımında kullanılmış, bu tür uygulamalar geleneksel mikrobiyal biyoteknolojinin ilk fazını oluşturmuştur. Geleneksel biyoteknolojinin ikinci fazı I. Dünya Savaşı yıllarında aseton-bütanol ve gliserol fermentasyonlarının geliştirilmesi ile başlamış, 1960 yılına dek sitrik asit, amino asitler, vitaminler ve antibiyotiklerin üretilebildiği mikrobiyal prosesleri içermiştir. Geleneksel biyoteknoloji ile moleküler biyoloji ve genetiğin, bir diğer deyişle gen teknolojilerinin 1977 yılında yaptıkları evlilik ise üçüncü fazı; yani modern biyoteknolojiyi oluşturmuştur. 1976 yılında kurulan Genentech isimli şirketin bir insan proteinini bir mikroorganizmanın üretmesini sağladıklarını rapor etmesi bu faza başlangıç teşkil etmiştir. 1980'li yılların başlangıcında, düzinelerce biyoteknoloji şirketi kurularak rekombinant DNA teknolojisi ile tıpta tedavi amacıyla kullanılan proteinlerin yapımına başlanmış, genetik değişikliğe uğratılmış *Escherichia coli* isimli bağırsak bakterisi tarafından üretilen insan insülini FDA tarafından onaylanarak pazara sunulan ilk ürün olmuştur. Hızla gelişen biyofarmasötik endüstri, moleküler modelleme, protein mühendisliği ve antisens tekniklerinin de kullanılmasıyla, biyoaktivite ve biyogüvenlik açısından çok daha üstün ikinci ve üçüncü kuşak farmasötik ürünlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu rekombinant ilaç/aşı/aktif madde/teşhis kiti endüstrisinin global pazarı 1990'da 1.5 milyar dolar iken, bu rakam 2000 yılında 12 milyar doları aşmaktadır. Rekombinant kan faktörleri, rekombinant hormonlar, hematopoietik büyüme faktörleri, rekombinant interferonlar ve interlekinler, rekombinant aşular, monoklonal antikorlar ve oligonükleotid yapıda ilaçlar şeklinde sınıflandırılacak önleme/teşhis/tedavi ürünlerini içeren toplam 84 adet rekombinant ürün günümüzde kullanımdadır. Bunların yanısıra beş yüzün üzerinde yeni farmasötik, halen klinik denemeler aşamasındadır. Denemede olan ürünlerin hemen hemen yarısı kanser tedavisi için geliştirilmiş ürünlerdir. Biyofarmasötik teknolojiden yakın gelecek için en önemli beklentilerden birisi de, "farmakogenomikler" adı verilen ve bireyler arasındaki genetik değişiklikleri temel alarak tedavi yönünde daha etkili ya da yan etkileri görülmeyecek "kişiye özgün" ilaçların yapılmasıdır.

Biyofarmasötik endüstrisindeki uygulamaların yanısıra, rekombinant DNA teknolojisi geleneksel mikrobiyal teknoloji ile üretilebilen ve endüstriyel öneme sahip pek çok ürünün (kimyasallar, enzimler (biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilen protein molekülleri), gıda ürünleri, alternatif enerji kaynakları) yapımında da, üretici organiz-

manın ve/veya ürünün kalitesinin değiştirilmesi ve iyileştirilmesi, organizmanın ucuz besin maddelerini kullanabilmesinin sağlanması, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunun engellenmesi, ürün miktarının artırılması ve sonuçta maliyetin azaltılması bakımından çok önemlidir. Yine rekombinant DNA teknikleri kullanılarak, çevreyi kirleten toksik atıkları parçalayacak (biyoremediasyon işlemleri) endüstriyel mikroorganizmalar geliştirilmektedir.

Mikroorganizmalar, enerjilerini gereksiz yere harcamamak için, hücrelerindeki metabolik aktiviteleri katalizleyen enzimlerin ve dolayısıyla metabolik yolların ara bileşiklerinin sentezini çeşitli metabolik ve genetik mekanizmalar kullanarak sıkı bir kontrol altında tutarlar. Dolayısıyla, endüstriyel üretimde daha iyi verim elde etmek üzere mikroorganizma geliştirilmesinin başlıca yolu bu kontrolleri yok etmektir. Bunun en etkin yolu ise organizmanın genetik yapısında değişiklikler yapmak, onu yeniden programlamaktır. Genetik değişiklikleri 3 şekilde elde etmek mümkündür:

1. Mutasyonların indüklenmesi: Genetik materyaldeki kalıcı değişikliklere mutasyon adı verilir. Mutasyonların ortaya çıkması için, hücre popülasyonu mutasyonlara neden olan fiziksel ya da kimyasal ajanlara maruz bırakılır. Mutasyonlar pratik olarak organizmanın sahip olduğu her gende eşit olasılıkla ortaya çıkabileceğinden mutasyon işleminden sonra hücreler taranarak istenilen özellikleri kazanmış mutant organizmaların seçimi gereklidir.

2. Genetik rekombinasyon: Bir mikrop hücresinden diğerine genetik maddenin aktarılmasıdır. Mikroorganizmalarda istenilen karakterlerin yeni kombinasyonlarının oluşturulmasında kullanılır.

3. Rekombinant DNA teknikleri (genetik mühendisliği, gen manipülasyonu): Hücreden izole edilmiş DNA moleküllerini test tüpü içerisinde çeşitli yöntemlerle manipüle etmek suretiyle istenilen özellikleri kazanmış yeni DNA moleküllerinin oluşturulmasını içerir. Gen klonlaması, manipüle edilmiş DNA moleküllerinin vektör adı verilen uygun bir taşıyıcı DNA molekülü içerisine yerleştirilip uygun bir konakçıya aktarılmasını, bu konakçıda çoğaltılmasını ve ona daha önceden sahip olmadığı özelliklerin kazandırılmasını, ayrıca klonlanan genin ürününün o organizmada yüksek seviyede ifade edilmesini (sentezlenmesini) içerir. Gen teknolojileri başlıca klonlama, DNA sentezi, DNA dizi analizi, bölge hedefli mutasyonlar, kombinatoriyal protein mühendisliği, DNA karması (shuffling), yönlendirilmiş protein evrimi gibi yöntem ve stratejileri içerir.

Canlı hücrelerinde genetik materyalin değişikliğe uğraması ve istenilen karakterlerin kendiliğinden ortaya çıkması son derece yavaş bir biçimde gerçekleşmektedir. Yukarıda söz edilen yöntemlerin tümü bu değişmeyi hızlandırmayı amaçlamakta olup içlerinde hedefe en yakın ve etkin olanı hücreler yerine doğrudan DNA'nın manipüle edildiği genetik mühendisliktir. Bu teknoloji, gereksinim duyulan genetik değişikliğin olması gerektiği yerde meydana gelmesini sağlar, diğer iki teknik gibi istenilen değişikliğin yanısıra istenmeyen ve/veya zararlı değişikliklerin/kombinasyonların ortaya çıkması riskini taşımaz.

Aşağıda, gen teknolojisinin endüstriyel üretimdeki önemi ürün ya da işlem bazında örneklerle açıklanmaktadır. Gen teknolojisinin tıp ve eczacılıktaki etkileri derginin yine bu sayısındaki bir diğer makalenin konusu olduğundan, antibiyotikler ve benzeri metabolitler dışındaki ürünler için mevcut uygulamalara yukarıda özetlendiğinden fazla yer verilmeyecektir.

### **Etil Alkol**

Etil alkol, çeşitli mikroorganizmaların şekerleri fermente ederek oluşturdukları önemli bir üründür. Etil alkolün günümüzde petrokimyasal etilenden sentetik olarak üretimi yılda sadece 1 milyon ton iken, maya hücreleri kullanılarak fermentasyonla üretimi yılda 4 milyon tonu bulmaktadır. Maya hücreleri 5 günlük bir fermentasyonla % 10-12 düzeyinde etil alkol üretirler, daha sonra bu seviyede alkol üretici hücrelere toksik olduğundan hücre çoğalması durur ve fermentasyon sona erer. Bira, şarap gibi alkollü içkilerde bulunan, kimya endüstrisinde kullanılan, farmasötikler ve temizlik malzemelerine katılan etil alkol, bu uygulamaların yanısıra, hava kirliliğine neden olan benzine alternatif bir yakıt olarak çok önemli bir endüstriyel üründür. Etil alkol endüstrisi, gen teknolojilerinden çok büyük yararlar beklenen alanlardan birisidir. Tarımsal atıklar ve bitki biyokütleleri gibi yenilenebilir maddeler hammadde olarak kullanılıp etil alkol üretilmesi ekonomik olarak çok caziptir. Ancak selülozik yapıdaki bitki biyokütleleri maya hücreleri selülozu parçalayamadığından bu hücreler tarafından doğrudan besin kaynağı olarak kullanılamamaktadır. Biyokütlenin kimyasal ya da enzimatik yöntemlerle ön işlemden geçirilmesi ve oluşan şekerlerin besin kaynağı olarak kullanılması ise maliyeti yükseltmektedir. Selülozu parçalayabilen, etanol üreten, oksijensiz ortamda ve yüksek sıcaklıkta üreyen bir bakteri türü bu anlamda maya hücrelerine alternatif bir üreticidir. Ancak bu tip bakteriler etil alkolün yanısıra çeşili organik asitler de ürettiklerinden etanol verimi düşük olmaktadır. Günümüzde gen teknolojileri kullanılarak sözü edilen bak-

terinin istenmeyen son ürünlerine giden metabolik yollarının kapatılmasına (gene knock-out) çalışılmaktadır. Alkol üretebilen ve yukarıda söz edilen üreticilerden farklı özellikler gösteren diğer başka bakteri türleri de yine DNA teknolojileri kullanılarak kullanımlarını sınırlayan mevcut dezavantajlarından arındırılmaya çalışılmaktadır. Yenilenebilir ucuz besin maddeleri değişik şekerlerin bir karışımını içerdiğinden, hem alkol üretebilen, hem de glikozdan farklı şekerleri, örneğin pentozları da besin olarak kullanabilen organizmalar gen teknolojileri kullanılarak elde edilmektedirler. Bir diğer yaklaşımla, alkol üretimi için gerekli genler normalde bu genleri taşımayan, ancak etil alkole oldukça dayanıklı bir bakteride klonlanıp ifade edilmiş, % 43 düzeyinde alkol üretebilen mükemmel bir üretici organizma elde edilmiştir.

### **Organik Asitler**

Mikroorganizmalar, organik asitlerin ticari üretiminde geniş çapta kullanılmaktadır. Örneğin, asitlendirici, tat artırıcı ve antioksidant özelliği gösteren sitrik asit gıda ve farmasötik endüstrilerinde kullanılmakta olup yarım milyon ton civarındaki yıllık üretiminin pazarı 1.4 milyar doları bulmaktadır. Mikrobiyal fermentasyonla üretilen diğer organik asitler asetik, laktik, glukonik ve süksinik asitlerdir. Bunlardan asetik asit fermentasyonu genetik mühendisliği uygulaması bulmuş, asetik asit biyosentez yolunda kritik olan bir enzimin genleri üretici organizmada klonlanarak gen dozu etkisi ile asetik asit veriminde % 100'ün üzerinde artış elde edilmiştir.

### **Amino asitler ve Vitaminler**

Amino asitler ve vitaminler, insan ve hayvan beslenmesinde ve ayrıca farmasötik ve terapötik amaçlarla kullanılan primer metabolitler olup başka ürünleri oluşturmak üzere başlangıç malzemesi olarak da kullanılırlar (en yaygın kullanılan suni tatlandırıcı aspartam, fenilalanin ve aspartik asitten oluşmuştur). Dünyada her yıl en az 1 milyon ton amino asit üretilmekte olup sadece bu sektörün pazarı 53 milyar doları bulmaktadır. Pek çok vitaminin üretiminde kimyasal proseslerin yerini mikrobiyal fermentasyonlar almıştır. Günümüzde en çok üretilen amino asit, gıdalarda lezzet artırıcısı olarak ve ayrıca terapötik amaçla kullanılan glutamik asittir. İnsanlar ve hayvanlar tarafından tüketilen hububatlar lizin, metiyonin ve triptofan gibi temel amino asitleri içermekte olup hububatlar ancak amino asit takviyesi sonucu dengeli besin haline geçmektedirler. Amino asitlerin en önemli ticari uygulama alanı hayvan yetiştiriciliği olup hayvan yemleri ham proteini minimum

miktarlarda, ancak kristal formdaki lizin, methionin, triptofan ve treonini uygun oranlarda içerecek şekilde formüle edilmektedir. Bu yolla daha pahalı olan ham protein kaynaklarının kullanımı azaltılabildiği gibi, hayvan performansı artırılmakta, bunların yanısıra çevreye verilen atık azot miktarı daha az olmaktadır.

Son yıllarda, rekombinant DNA teknolojisi amino asit ve vitamin üretimi üzerine önemli etkiler yapmaya başlamıştır. Bu metabolitler çok basamaklı metabolik yolların ürünü olup, biriken metabolitlerin metabolik yolun ilk basamağını katalizleyen enzimin sentezini baskılaması ya da mevcut enzimi inhibe etmesi biyosentezlerini sınırlandıran en önemli faktördür. Bu nedenle, yapılan genetik manipulasyonlar öncelikle geleneksel mutajenez metodlarıyla mevcut organizmalarda son ürün baskılaması ve inhibisyonunun engellenmesi, daha sonra da rekombinant DNA, yani gen klonlama teknikleriyle biyosentetik enzimleri kodlayan genlerin kopya sayısının artırılmasını içermektedir. Bu yöntemlerle lizinin endüstriyel üretimi 170 g/L gibi oldukça yüksek bir değere (0.54 mol/mol glikoz) çıkarılmıştır. Bu amino asitin yıllık üretimi 350 bin ton olup pazarı 600 milyon dolardır. Yine aynı yöntemlerle 100 g/L treonin, 40 g/L izolösin, 34 g/L lösin, 31 g/L valin, 28 g/L fenilalanin, 58 g/L triptofan, 26 g/L tirozin, 100 g/L prolin, 65 g/L arjinin ve 40 g/L histidin üretebilen mikroorganizmalar geliştirilmiştir. Üretim miktarlarına ve/veya market değerlerine bakıldığında ise, tablo şöyledir: fenilalanin, 13000 ton, 198 milyon dolar; aspartik asit, 43 milyon dolar; izolösin, 400 ton. Vitaminlerden riboflavin (Vitamin B2) üretiminde günümüzde ana rota fermentasyondur. Yine genetik manipulasyonlarla 30 g/L ribofavin üreten organizmalar geliştirilmiştir. İngiltere’de rekombinant bir bakteri ile üretilen riboflavin 1997 yılında onay almıştır. Vitamin B12 ise 150 mg/L seviyesinde üretilmekte olup her yıl 3 tonluk üretime ve 71 milyon dolarlık bir pazara sahiptir. Rekombinant bir mikroorganizma tarafından üretilen Vitamin B12 ’nin gıda olarak kullanılması kısa süre önce İsviçre’de onaylanmıştır. Geçtiğimiz yıllarda moleküler klonlama ile bir diğer vitamin olan biyotinin üretimi 600 mg/L gibi bir seviyeye ulaştırılmış olup bu verim biyoteknolojik prosesin geleneksel kimyasal sentezle yarışabilmesine izin vermiştir. Günümüzde biyotin pazarı 100 milyon dolardır. Vitamin C (askorbik asit) üretimi ise uzun yıllar kimyasal yöntemle yapıldıktan sonra günümüzde rekombinant bir organizma tarafından glikozun (40 g/L) ketoglikonik asite (20 g/L) dönüşümünü ve ketoglikonik asitin daha sonra asit veya baz uygulaması ile askorbik asite dönüştürülmesini içermektedir.

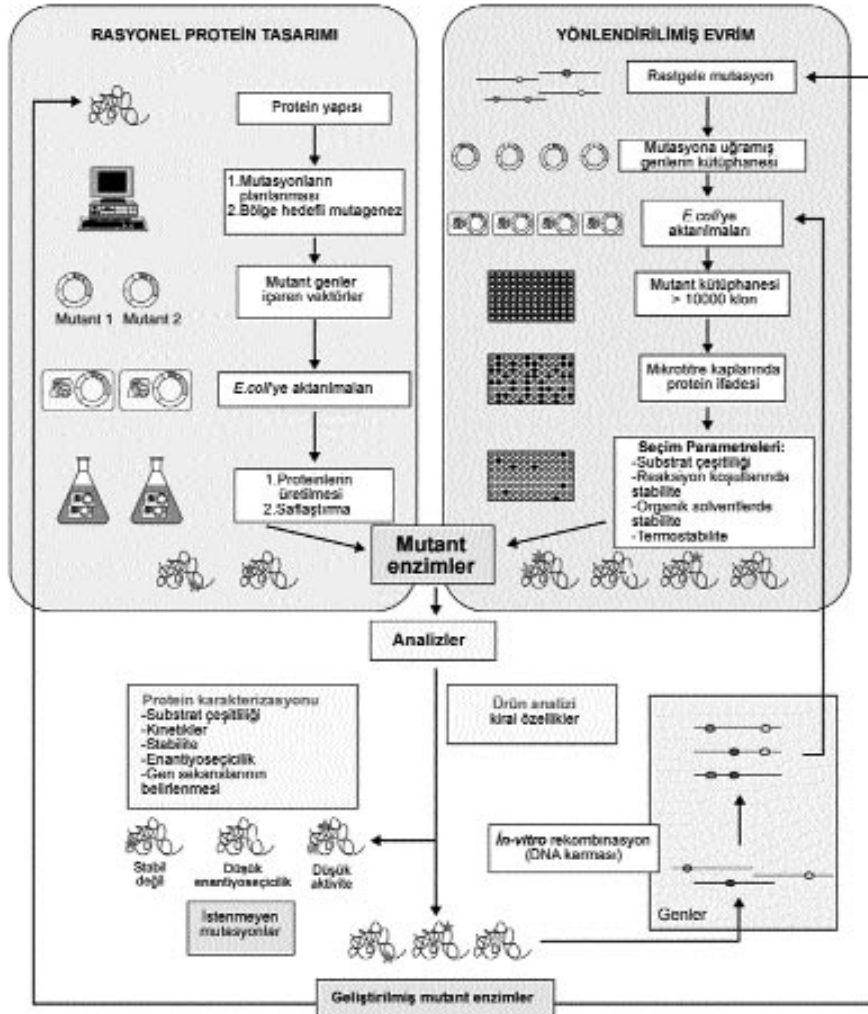
### **Endüstriyel Enzimler**

Enzim teknolojisi, OECD tarafından “sürdürülebilir endüstriyel kalkınmanın önemli bir parçası” olarak kabul edilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisinden en çabuk ve en fazla yararlanmış olan ürünler endüstriyel enzimlerdir. 1980’li yılların başında, o dönemde 300 milyon dolarlık bir markete sahip olan enzim endüstrisi, kendi ürünlerinin sadece tek bir gen tarafından şifrelendiğinin, dolayısı ile kısa sürede yol almanın kolay olacağını bilinci içinde enzim üretimini arttırabilmek ve yeni enzimler yapabilmek amacıyla gen teknolojisini hemen kendisine uyarlamıştır. Sonuçta bugün endüstriyel enzim endüstrisi yılda 1.6 milyar dolarlık bir satış yapmakta, bu enzimlerin % 45’i gıda ve nişasta işlenmesinde, % 34’ü deterjanlarda, % 11’i tekstilde % 3’ü dericilikte ve % 1.2’si kağıt endüstrisinde uygulama bulmaktadır. Leke giderimini kolaylaştırmak için deterjanlara katılan proteaz enzimi (subtilisin) toplam enzim marketinin 200 milyon dolarlık bölümünü oluşturmaktadır. Diğer yandan, tıpta tedavi amacıyla kullanılan enzimlerin de 2.3 milyar dolarlık ayrı bir pazarı vardır.

Günümüzde, mevcut pazardaki enzimlerin % 60’ı gen teknolojisi ile elde edilen rekombinant organizma ürünleridir. Çoğu gıda endüstrisinde kullanılmak üzere en az 19 farklı enzim genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (bunların bir listesi ve ilave bilgiler için: [www.bats.ch/abstr/table13.htm](http://www.bats.ch/abstr/table13.htm)). Rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen ilk enzim, peynir yapımında kullanılan kimozin isimli enzimdir. 1984-1985 yılları arasında Danimarka’da gıda sektörünün önde gelen şirketlerinden Chr. Hansen A/S Bio Ingredients’in laboratuvarlarında bu enzimin genleri dana midesinde izole edilerek bir küf mantarına klonlanmış, 1990 yılında ise bu enzimin gıda yapımında kullanılması onaylanmıştır. Aksi halde hayvan midesinde izolasyonu ve saflaştırılması çok pahalı olan kimozin, gen teknolojisi sayesinde mikrop hücreleri tarafından kısa sürede ve yüksek verimlilikle üretilmektedir. 1993 yılına kadar, farklı firmalar tarafından farklı rekombinant mikroorganizmalar (maya, küf ve bakteriler) tarafından üretilen kimozinin gıda endüstrisinde kullanılması toplam 17 ülkede onaylanmıştır. Avrupa Birliği ülkelerinde düzenleyici kurallar sadece genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmaların kullanımını içermekte olup, genetik mühendisliği ile elde edilmiş enzimlerin kullanımı ile ilgili düzenlemeler standart hale getirilmiştir, her ülkede farklı düzenlemeler vardır. Örneğin İsviçre ve İngiltere’de böyle enzimlerden kullanımına izin verilenlerin bir listesi oluşturulmuştur. Almanya’da gıda ürünlerinde kullanılacak enzimler için (örneğin rekombinant kimozin) onay alınması zorunludur. Diğer bir çok Avrupa ülkesinde ise hiçbir düzenleme mevcut değildir.

Yeni aktiviteler ve/veya daha üstün özelliklere sahip biyokatalizörlere daima gereksinim vardır. Doğadan elde edilen çok sayıda mikroorganizma izolatının yeni enzim aktiviteleri için taranması da her zaman amaca uygun enzimler elde edilmesini sağlamaz. İşte protein mühendisliği ile bu sınırlamanın önüne geçebilmekte, (i) bilgisayar aracılığı ile moleküler modelleme ve bölge hedefli mutasyonlar ya da (ii) yönlendirilmiş moleküler evrim teknikleriyle doğal enzimlerden yeni biyokatalizörler oluşturulabilmektedir. Protein mühendisliğinin bu iki farklı yaklaşımı Şekil 1’de şematik olarak karşılaştırılmaktadır. Bölge hedefli mutasyonları temel alan yaklaşım “rasyonel protein tasarımı” adını alır ve adeta terzi yapımı enzimler elde edilmesini sağlar. Ancak, bu yaklaşımın kullanılabilmesi için enzimin yapısının, yapısını oluşturan amino asitlerin diziliminin ve yapı-fonksiyon ilişkilerinin çok iyi biliniyor olması gerekir. Protein yapısının NMR spektroskopisi ile çözülmesindeki hızlı gelişme artık çok sayıda sekansın herkesin ulaşabildiği databazlarına girmesini sağlamış olup pek çok protein için yeni tasarımları kolaylaştırmaktadır. Mevcut bilgiler ışığında, moleküler modelleme ile enzimin substrat (katalizlediği kimyasal reaksiyonda ürüne dönüştürdüğü bileşik) seçiciliğinin, aktivitesinin ve stabilitesinin hangi tür amino asit değişiklikleri ile gerçekleştirilebileceği kestirilir, daha sonra bu değişiklikleri sağlayacak DNA manipulasyonlarına karar verilir. Bir sonraki aşamada bölge hedefli mutasyon teknikleriyle DNA üzerinde gerekli mutasyonlar yaratılır. Değiştirilen moleküller konakçı hücrelere aktarılır, orada ifade edilerek ürüne dönüşür, daha sonra konakçıdan izole edilerek saflaştırılır ve substrat özgüllüğü, kinetik özellikleri, stabilitesi vb. analiz edilerek istenilen özellikleri taşıyıp taşımadıkları belirlenir. Yönlendirilmiş evrim yaklaşımında ise enzim genini içeren DNA fragmentleri önce rastgele mutasyona uğratılır (polimeraz zincir reaksiyonu veya parçalanmış DNA fragmentlerinin rekombinasyonu ile). Daha sonra mutasyona uğramış fragmentler klonlanarak bir mutant gen kütüphanesi oluşturulur. Bu kütüphane taranarak belirli seçim parametrelerine göre istenilen değişikliklere sahip klonlar seçilir. Bundan sonraki aşamalar, diğer yaklaşımda olduğu gibi enzimin ve ürününün karakterizasyonunu ve geliştirilmiş mutant enzimlerin seçilmesini içerir. Daha ileri bir iyileştirme için, DNA karması (shuffling) adı verilen yöntem uygulanıp yönlendirilmiş evrim protokolu baştan tekrarlanabilir. DNA karması yöntemi rastgele mutajenez sırasında olagelen faydalı mutasyonları biraraya toplamaya yarar. Her iki yaklaşım da, istenilen özellikleri taşıyan biyokatalistler elde edilinceye kadar tekrarlanır. İstenilen özelliğin ya da fonksiyonun mekanistik temelini ne ölçüde anlaşıldığı ve seçim için etkin prosedürlerinin mevcut olup olmadığı iki yaklaşımdan hangisinin daha etkin biçimde kullanılacağını belirleyen faktörler arasındadır. Her ne kadar her iki yöntem de gayet etkin olsa da, her ikisinin bir arada kullanılması en başarılı yol olmaktadır.





Şekil 1. Protein mühendisliğinin iki ayrı yaklaşımı olan rasyonel protein tasarımı ve yönlendirilmiş evrim.

Novo Nordisk firması (Danimarka) araştırmacıları, iki yaklaşımın DNA karması yöntemini entegre edecek şekilde kombinasyonunun ne denli başarılı olabileceğine ilişkin etkileyici bir örnek rapor etmişlerdir. Hedef, çamaşır deterjanlarının kumaşın rengini almaması için deterjanlara katılan hem peroksidaz isimli enzimin stabilitesinin artırılması olmuştur. Sonuçta, termal stabilitesi 174 kat, oksidatif stabilitesi ise 100 kat daha yüksek hem peroksidaz üretebilen bir mutant organizma elde edilmiştir.

### **Biyodönüşüm**

Çok basamaklı enzimatik reaksiyon dizilerini içeren fermentasyona ilaveten, çeşitli küf ve bakteriler belli bir bileşiği stereospesifik biçimde yapısal olarak kendisine yakın, ancak farklı aktiviteye sahip bir diğer bileşiğe dönüştürme kapasitesine sahiptirler. Pratik olarak hemen her tip kimyasal reaksiyon için biyodönüşüm yapabilen mikroorganizmalar mevcuttur. Böyle dönüşümlerde verim % 90-100 gibi yüksek seviyelerde olmaktadır. Yüksek verim, stereospesifiklik, reaksiyon koşullarının basit ve ekonomik olması (yüksek sıcaklık ve basınç gerekmemektedir) biyodönüşümü kimyasal senteze göre çok çekici bir alternatif haline getirmektedir. En önemli biyodönüşüm, sterol-steroid transformasyonudur. Steroidler farmasötik endüstrinin önemli ürünleri arasındadır. Bu maddeleri hayvansal kaynaklardan elde etmek veya kimyasal olarak sentezlemek çok zordur. Örneğin iltihaplamalarda kullanılan kortizonun kimyasal sentezi 31 ayrı reaksiyon basamağı gerektirir. Bu reaksiyon basamaklarından 9'u sterolün 11. karbonunun hidroksillenerek 11-a-hidroksi projesterona (steroid) dönüşmesini içerir. Bu 9 basamaklı kimyasal dönüşüm, mikroorganizmalar tarafından tek bir enzimatik reaksiyonla gerçekleştirilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi, biyodönüşüm süreçlerinin etkinliğinin artırılmasında çok yararlı olmaktadır. Örneğin, tek bir enzimin mayada klonlamasını içeren tek bir manipülasyonla malik asitin fumarik asite dönüşümü 2 g/L'den 125 g/L'ye çıkarılabilmektedir.

### **Gıda Endüstrisinde "Starter" Kültürler**

Fermente süt ve et ürünlerinin (peynir, tereyağı, yoğurt, salam, sosis gibi) yapımında kullanılan mikroorganizmalar (starter kültürler) fermente olacak ham besinde istenilen metabolik aktivitenin gerçekleşmesini sağlarlar. Halk arasında "mayalamak" olarak bilinen bu işlemde mayalar değil, daha ziyade bakteri kültürleri (laktik asit bakterileri ve diğer bazı bakterilerin karışık kültürleri) kullanılır. Bu kültürler, ürettikleri metabolitler aracılığı ile fermente besinin olgunlaşmasını sağlarlar, ona özel bir tat ve koku verirler. Günümüzde gen teknolojileri, bu tip mikroorganizmaların genetik yapılarının değiştirilmesi ve teknolojik ve hijyenik uygunluklarının artırılması ile tüketiciye ve topluma daha sağlıklı, daha lezzetli, daha ucuz ve daha yüksek kaliteli gıda ürünlerinin sunulması için kullanılmaktadır. Burada, genetik olarak değiştirilmiş organizmaların gıda sanayiinde kullanımının düzenleyici kurallar ve tüketici tarafından kabul gibi çetin engellerden geçmesi gerektiği özellikle not edilmelidir. Bu alanda mevcut uygulamalarla ilgili olarak, Chr. Hansen A/S Bio Ingredients (Danimarka) isimli şirketin

araştırma laboratuvarlarında yürütülmüş, gen teknolojisi ile starter geliştirme çalışmalarından örnekler vermek yararlı olacaktır. Peynir yapımında kullanılan mikroorganizmaların sahip oldukları aminopeptidaz isimli enzim, süt proteini kazeini daha küçük yapı taşlarına (küçük peptidler ve amino asitler) parçalamakta, ortaya çıkan yapı taşları ise peynire tat ve kokusunu veren bileşiklerin yapımı için öncülük etmektedirler. Ancak bu enzimin oluşturduğu bazı peptidler acı bir lezzete sahiptir ve peynirin kalitesini düşürmektedir. Araştırmacılar, kazeini farklı bölhelerden kıran, dolayısıyla farklı peptidler oluşturan 4 farklı amino peptidaz enzimine (genel aminopeptidaz, dipeptidaz, sistein aminopeptidaz ve endopeptidaz) karşılık gelen genleri ayrı ayrı klonlamışlar ve bu genlerin ürünü olan enzimleri yüksek seviyede ifade eden starter organizmalarla pilot seviyede peynir yapımına başlamışlardır. Farklı enzimleri taşıyan starterlarla hazırlanan peynirler, rekombinant olmayan orijinal kültür de kontrolü teşkil etmek üzere belli aralıklarla birçok parametre için karşılaştırılmıştır. İki aylık bir olgunlaştırmadan sonra peynirler arasında önemli bir fark bulunulmamış, ancak 4. aydan itibaren genel aminopeptidazı ve sistein aminopeptidazı ifade eden kültürlerle hazırlanan peynirlerin acılığında önemli bir düşüş belirlenmiştir. Böylelikle, bu enzimlerin gen teknolojisi kullanılarak yüksek seviyede ifade edilmesinin peynirin organoleptik özelliklerini iyileştirdiği gösterilmiştir. Aminopeptidazlarla ilgili bir diğer sorun da bu enzimlerin hücre içi enzimler olması, kazein de hücre içine alınmadığından ancak hücre ölümü ve parçalanması (otoliziz) gerçekleştikten sonra bu enzimlerin peynire geçip kazeini parçalamalarıdır. Araştırmacılar, bu sorunu gidermek için bakteri viruslarının (fajların) bakteri hücreleri içerisinde çoğaldıktan sonra konakçı hücrelerin duvarını yıkarak onları parçalama (lizize uğratma) yeteneğinden yararlanmışlar, bunun için bir önceki aşamada elde ettikleri rekombinant organizmalara ayrıca fajdan izole ettikleri lizin adı verilen protene ait geni klonlamışlardır. Sonuçta, elde edilen rekombinantın daha çabuk otolize olduğu ve bu organizma ile elde edilen peynirin lezzet açısından mükemmel olduğu gösterilmiştir. Bir diğer örnek ise, tereyağı yapımı ile ilgilidir. Tereyağına karakteristik tat ve kokusunu veren, laktik asit bakterilerinin çoğalması ve laktik asit üreterek asiditeyi arttırması sürecinde oluşan diasetil isimli bileşiktir. Starter olarak 3 ayrı tip laktik asit bakterisinin yanısıra *Leuconostoc* adı verilen ve tereyağında istenmeyen bir bileşik olan asetaldehid parçalayan bir bakteri kullanılır. Ancak bu organizma diasetili indirgeyip kokusuz bileşikler olan asetoin ve bütandiyole dönüştürmekte, böylece de stoktaki tereyağı zaman içerisinde tüm koku ve lezzetini kaybetmektedir. Bu sorunu çözmek için, klasik mutajenezden yararlanılarak *Leuconostoc*'un diasetili indirgeme gücü azalmış mutanti elde edilmiş,

diğer yandan da laktik asit bakterileri genetik manipölasyona tabi tutularak daha fazla diasetil üretmeleri sağlanmıştır.

### **Polisakkaritler ve Biyobozunabilir polyesterler**

Mikrobiyal kökenli polisakkaridler (selülöz, agar, aljinat, pektin, ksantan, vb) de ticarî önemi olan ürünler arasındadır. Bunların en önemlisi olan ve gıda, boya ve tekstil endüstrisinde kullanılan ksantan yılda 30 bin ton üretilmekte olup 408 milyon dolarlık bir markete sahiptir. Mevcut gen teknolojisi uygulamaları, ksantanın kimyasal yapısını değıştirmeye yönelik olmuştur.

Bakteriler, karbon ve enerji rezervi olarak hücrelerinde polihidroksi-alkanoit (PHA) granülleri depolama kabiliyetindedirler, bazı tip bakteriler bu maddeleri daha fazla üretip depolarlar. PHA'lar termoplastik özellik gösterirler, belirli bir sıcaklıkta erir, soğutulduğunda ise katılaşırlar. Moleküler yapıları ve fiziksel özellikleriyle polipropilene benzerlik gösterirler, ancak yoğunlukları farklıdır. Polipropilen sudan daha az yoğun olduğu için suda batmaz ve yüzer, PHA'lar ise suda batar ve dip sedimentlerde biyobozunmaya uğrar. Bu özellikleriyle çevreyi kirleten plastiklere üstünlük gösteren PHA'lar önemli uygulamalar bulmakta, günlük hayatta kullanılan biyobozunur şişe ve ambalaj malzemeleri yapımında, tıpta biyobozunur çivi ve teller, çeşitli destek malzemeleri gibi çeşitli cerrahî malzemelerinin yapımında kullanılmaktadırlar. PHA'ların sentezlendiğı biyokimyasal yolu katalizleyen enzimlere ait genler hem endüstriyel PHA üreticilerinde, hem de diğer başka mikroorganizmalarda klonlanmış ve ifade edilmişlerdir. Bir çalışmada rekombinant hücrelere T4 bakteriyofajının lizozim (hüctelerin parçalanmasını sağlayan bir enzimdir) genini taşıyan ve bu genin konakçı hücrelerde düşük seviyede ifade edilmesini sağlayacak bir rekombinant plazmid transfer edilmiştir. Lizozim geninin düşük seviyede ifadesi hücre üremesi ve PHA sentezini olumsuz yönde etkilememiştir. Hücrelerde yeterli miktarda PHA birikmesi beklendikten sonra hücreler hücre zarının bütünlüğünü bozacak bir kimyasalla muamele edilip lizozim enziminin hücre duvarına ulaşip onu parçalaması sağlanmıştır. Bu yolla hücrelerden büyük miktarda PHA salınması sağlanmıştır. Bir diğer uygulamada, üretici organizmaya yeni PHA biyosentetik yolları kazandırılarak organizmanın normalde ürettiğinden farklı yapıda PHA'leri üretmesi sağlanmıştır.

### **Antibiyotikler ve Diğer Sekonder Metabolitler**

Enfeksiyon hastalıkları ile mücadelenin yanısıra ziraat ve veterinerlikte de kullanılan antibiyotikler, pazarın büyüklüğü açısından

günümüzde mikrobiyal biyoteknolojinin en önemli ürünleridir. Amino asit, etil alkol, vitamin gibi mikroorganizmaların üremek için sentezlemek zorunda oldukları ürünlerin (primer metabolitlerin) aksine, antibiyotiklerin sentezlenmesi üretici mikroorganizmanın çoğalması için şart değildir, bu nedenle de sekonder metabolitler olarak isimlendirilirler. Antibiyotik aktiviteye sahip pek çok sekonder metabolit ayrıca kolestrol düşürücü ajanları, immünosupressantları, antikanser ajanları, biyoherbisitleri, biyoinsektisitleri, bitki ve hayvan büyümesini teşvik eden ajanları ve ergot alkaloidleri içermekte olup tıp, tarım ve veterinerlikte bu aktiviteleri için kullanılırlar. Yine antibiyotik aktivitesi olmayan, ancak antihelmintik (ör. ivermektin), biyoinsektisid (ör. spinosad), bitki büyüme stimulantları (ör. giberellinler) olarak kullanılan sekonder metabolitler de mevcuttur. Bugüne dek keşfedilmiş antibiyotik sayısı 6 bin kadardır, buna karşın kullanımda olan antibiyotiklere karşı direnç geliştiren patojenlerin sürekli ortaya çıkmasından dolayı yeni antibiyotiklerin araştırılması çalışmaları yoğun bir biçimde sürmektedir. Günümüzde 160 farklı antibiyotiğin ve türevlerinin (penisillinler, sefalosporinler ve diğer b-laktamlar, peptidler, eritromisin, tetrasiklinler, aminoglikozidler vd) üretildiği antibiyotik marketinin 1999 yılı toplam pazarı 30 milyar doların üzerindedir.

Rekombinant DNA teknolojisi, antibiyotik üretiminde de geniş çapta uygulama bulmuştur. Yine de, sekonder metabolitlerin yapımı hücrelerde karmaşık global düzenlemelerle kontrol edildiğinden, primer metabolitlerin üretiminin artırılması için başarıyla kullanılan gen teknolojilerinin sekonder metabolitler söz konusu olduğunda daha düşük etkinlikle kullanılmakta olduğu not edilmelidir. Antibiyotik biosentezini sağlayan çok basamaklı metabolik yolda farklı basamakları katalizleyen enzimlere ait genlerin üretici organizmanın kromozomunda aynı bölgede grup halinde bulunmaları, bu genlerin tamamının izole edilip klonlanmasını kolaylaştırmakta, daha sonra klonlanan gen grubu aynı organizmaya ya da farklı bir organizmaya aktarılarak gen dozu etkisi ile ürün miktarının artırılması yoluna gidilmektedir. Hastalık yapıcı bakterilerin kullanımda olan antibiyotiklere giderek direnç kazanması, yeni ve daha etkili antibiyotiklerin bulunmasını zorunlu kılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi, yeni ya da modifiye sekonder ürünlerin elde edilmesi için de kullanılmaktadır ( "kombinetoryal biosentez"); belirli bir sekonder ürünün sentezi ile ilgili genler bir diğer sekonder ürün yapımcısı başka bir mikroorganizmada klonlandığında her iki üründen de farklı, yeni ve hibrid bir ürün elde edilebilmektedir.

### **Biyopestisidler**

Pek çok ülkede, 20 yılı aşkın bir süredir “biyoinsektisit” olarak da bilinen biyolojik ajanların kimyasal ajanlara tercih edilmekte ve haşere kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tercihte rol oynayan en büyük etken; kimyasal ajanların hemen tümünün, biyolojik olanlarına kıyasla, çevre ve insan sağlığı için tehdit oluşturan zehirli maddelerden kaynaklanmasıdır. *Bacillus thuringiensis* (B t) isimli toprak bakterisi, biyolojik ajanlar içerisinde en yaygın kullanım bulan biyoinsektisit üreticisidir. Bakteri, yaşam döngüsü içinde, böcek türüne spesifik (sivrisinek, karasinek, vb) ve o türün larvaları tarafından besin yoluyla alındığında öldürücü etkisi olduğu bilinen ve kristal protein adı verilen bazı toksin proteinleri sentezlemektedir. Bu proteinler içinde “d-endo-toksin” olarak bilineni, değişik alt gruplara sahip olup, biyoinsektisit olarak dünya çapında kullanım bulmaktadır. Bu toksinlerin, üretim sonrası, formülasyon adı verilen çeşitli ön işlemlerden geçirilmesi halinde, doğrudan haşere mücadelesinde kullanılmaları mümkündür. Mücadele edilecek haşere cinsine göre değişik toksin cinsleri elde edilebilmekte ve bunlardan geliştirilen preparatlar çok çeşitli uygulamalarda (örneğin sivrisineklere ve karasineklere, ayrıca çeşitli sebze, meyve ve orman zararlılarına karşı) kullanılabilir. Gen teknolojileri daha üstün özellikler gösteren biyoinsektisit üreticisi bakterilerin elde edilebilmesi ve ayrıca biyoinsektisilerin doğal üretici olan bakteriler dışında başka canlılar ve hatta haşerelerden zarar gören bitkilerin bizzat kendileri tarafından üretilmesi için çok etkin bir araçtır. Değişik böcek türlerine karşı etkin biyoinsektisidleri kodlayan genlerin tamamı klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Farklı böcek türlerine karşı etkin genlerin tek bir organizmada toplanması yoluna gidilmiş, ancak böyle bir rekombinant organizmada mevcut farklı biyoinsektisit genlerinin birbirlerinin ifade edilmesini, yapımını engellediği ve bu yolla ideal bir insektisit üreticisi elde edilemeyeceği belirlenmiştir. Toksin genleri modifiye edilerek yeni ve daha etkin toksinlerin elde edilmesi bir diğer yaklaşımdır. Tarım zararlılarına karşı etkili toksinler için yapılan genetik mühendisliği çalışmalarında toksin genlerinin ilgili bitkiyle birarada yaşayan, örneğin bitkinin yapraklarında kolonize olan bakterilerde klonlanması, sivrisineklere karşı etkili toksinler için ise sulak alanları tercih eden fotosentetik bakterilerin klonlama konakçısı olması gibi stratejiler de gayet etkin biçimde kullanılmıştır. Yine toprak örneklerinden izole edilen bakteriler gen teknolojileri ile taranmakta, yeni ve daha etkin toksin proteinlerinin bulunması yönünde çaba gösterilmektedir. Biyoinsektisidlerle ilgili olarak gen teknolojisinin bir diğer ilgi alanı da “baculovirus” adı verilen, pest türlerini enfekte edebilen, ancak bitkilere ve omurgalı hayvanlara zarar vermeyen böcek virusları üzerine

yoğunlaşmıştır. Ancak, bu virusların böcekleri çok yavaş öldürmesi, her birinin sadece tek bir böcek türüne spesifik olması ve güneşin ultraviyole ışınlarına dayanıksızlıkları bunların şimdilik biyopestisid olarak kullanımını sınırlayan faktörler arasındadır. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak bu dezavantajların giderilmesine (örneğin, ultraviyole ışınlarının neden olduğu DNA hasarlarını minimize etmek için etkili DNA tamir sistemlerini şifreleyen genlerin klonlanması) çalışılmaktadır.

### **Biyoremediasyon**

Biyolojik ve jeokimyasal prosesler sonucu oluşan organik maddelerin hemen tümü doğada yapısal parçalanmaya uğrarken, doğal bozunmaya dayanıklı ve pek çoğu endüstriyel ve zirai amaçla yapıyarak sentezlenen organik kimyasallar (halojenli alifatik ve aromatik hidrokarbonlar, polisiklik hidrokarbonlar, nitroaromatikler, vb) çevre kirliliğine neden olmakta, besin zinciri ile konsantrasyonları yükselmekte ve insanlar ve diğer canlılar için çok ciddi bir tehdit oluşturmaktadırlar. Ksenobiyotik adı verilen bu kimyasal kirleticiler ancak belirli mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılıp etkin bir biçimde parçalanabilmektedir. Mikroorganizmaların bu yeteneği gelişmiş ülkelerde uygulama bularak biyoremediasyon endüstrisi oluşturmuştur. Ancak, mevcut mikroorganizmaların parçalama potansiyelleri bazı inatçı kirleticiler için yetersiz kalmaktadır. Böyle durumlarda, ilgili metabolik yollara ve organizmanın fizyolojisine dair bilgilerinin gen teknolojisi ile birleştirilmesi yeni ya da iyileştirilmiş ksenobiyotik parçalama aktivitelerinin deneysel evrimini sağlamaktadır. Genetik mühendisliği uygulamaları, mevcut parçalayıcı enzimlerin özelliklerinin değiştirilmesini, enzim yapımını kontrol eden mekanizmaların yok edilmesini ve farklı parçalayıcı organizmalara ait genetik bilgilerin tek bir organizmada toplanmasıyla belli bir organizmanın parçalayabileceği ksenobiyotik çeşitlerinin artırılmasını hedeflemektedir.

Son yıllarda araştırmaların yoğunlaştığı bir diğer alan da rekombinant mikroorganizmaların "çevresel toksisite biyosensörleri" olarak, yani çevrede toksik kimyasal olup olmadığının belirlenmesinde kullanılmasını içermektedir. Böyle rekombinant mikroplar, ağır metaller ve çeşitli organik kirleticilerin varlığını bir şekilde "farkedip" dışardan teşhis edilebilir bir sinyal vermekteler. Bu amaçla, "promotor" adı verilen, kromozom üzerinde mevcut genlerin hemen önlerinde yer alan ve herbiri önünde yer aldığı genin aktivitesinin (ifade edilmesinin) kontrol edildiği bölge olan DNA dizilerinden yararlanılmaktadır. Bu diziler, ürünleri gözlenebilir bir sinyal (renk, ışık gibi) verdiği için "raportör"

adını alan başka genlere bağlanarak füzyon oluşturulmakta ve elde edilen füzyon uygun bir konakçı organizmaya aktarılmaktadır. Promotor olarak, belirli toksik kimyasallar tarafından spesifik olarak uyarılan genlerin promotorları (örneğin naftalin parçalayan enzime ait genin promotoru), ya da hücrede stres oluşturan koşullarda (ısı şoku, oksidatif stres, ağır metaller ve diğer ksenobiyotikler) devreye giren ve global düzenlemenin birer parçası olan genlerin promotorları kullanılmaktadır. Örneğin ısı şoku promotorları pek çok kirletici kimyasalla uyarılmaktadır. Böyle rekombinant bakteriler, çevreden alınan örnekler üzerinde onların kirletici kimyasal içerip içermediğini belirlemektedir. Kimyasal mevcutsa füzyondaki promotor uyarılmakta, böylelikle bu promotorun kontrolündeki raportör gen ifade olmakta ve ürün, yani pozitif sinyal vermektedir.

### **Sonuç**

Günümüzde mikrobiyal biyoteknoloji, gen teknolojilerini de içeren modern uygulamaları ile sağlık, gıda ve kimya sektörleri başta olmak üzere global endüstrinin ana parçalarından birisini oluşturmaktadır. Modern biyoteknolojinin geleceği için herhangi bir sınır tarif etmek olanaksızdır. Bu bildirim en temel nedenleri, son derece genç bir endüstri olmasına karşın geçtiğimiz 25 yıl içerisinde gösterdiği müthiş gelişme ve insan sağlığı başta olmak üzere hemen her sektörde yaşam kalitesini iyileştirmek üzere sunduğu ve sunabileceği olanaklardır. Gen teknolojisinin sahip olduğu büyük yararlarının yanısıra taşıdığı riskler gözönüne alındığında aynı zamanda doğaya ve insanlığa zarar verme potansiyelini de taşıyan, dolayısı ile ciddi bir biçimde izlenmesi gereken modern biyoteknoloji, doğru bir yönlendirme ile insanlık tarihinin en büyük endüstrilerinden birisini oluşturacaktır.