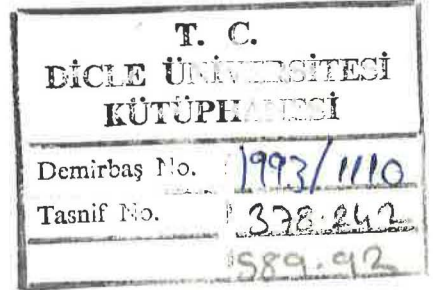


ÇERMİK KAPLICALARINDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus subtilis*'in
BAZI EKSOENZİMLERİNİN ÇEŞİTLİ ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE BAZI
ANTİBİYOTİKLERİN BU BAKTERİNİN PROTEİNLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)



BİROL OTLUDİL



074
1991

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
TEŞEKKÜR.....	1
GİRİŞ.....	2
TEZİN AMACI.....	14
MATERYAL VE METOD.....	15
BULGULAR.....	25
TARTIŞMA.....	34
ÖZET.....	36
KAYNAKLAR.....	37

TEŞEKKÜR

Bana bu araştırma konusunu veren, değerli yardım ve uyarılarını esingemeyen D.Ü.Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Y.Doç. Dr. N.Yavuz ENSARI'ye teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında değerli bilgilerinden yararlandığım ayrıca bir çok olanaktan yararlanmamı sağlayan D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Y.Doç. Dr. Çetin AYTEKİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi'nde gerçekleştirmeme yardımcı olan Sayın Prof.Dr. Ali SÖNMEZ'e ve Y.Doç.Dr. Hasan AKBAYIN'a D.Ü. Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Ana Bilim Dalı elemanlarına tezin yazımında yardımını gördüğüm Y.Doç.Dr. Erhan ÜNLÜ'ye, Arş.Gör. Murat KIZIL, Zübeyde KAYA, Arş.Gör. Fikret UYAR'a teşekkürlerimi sunarım.

GİRİŞ

Termofil ve Termotoleran Bakteriler

Yaşayan Dünyamızda Mikrobiyal hayat tüm ilginçliği ile devam etmektedir. Bu ilginç mikroorganizmalardan bir grup, bulunduğumuz Yüzyıl içinde tanımlanan ancak son 30 yıldır yoğun bir şekilde çalışılan yüksek ısıya dirençli termofil ve termotolerant bakterileridir(1).

Termofil ve termotoleran bakteriler değişik ısılarda yaşarlar Tablo 1. Termofil bakteriler özellikle kaplıca ve volkanik sularda yaşamaya adepte olmuşlardır. 60 °C ile 120 °C arasındaki ısılarda yaşayabilirler. Bunlara örnek olarak *Bacillus stercorarius*, *Thermophilus*, *Thermus aquaticus* vs. verebiliriz. Termotolerant bakteriler ise termofil bakterilere göre daha düşük sıcaklıklarda yaşayan bakterilerdir. Bunlar 20-50 °C arasında yaşayan organizmalardır. Toprakta, havada, sularda, kaplıca sularında yaşarlar. Yüksek ısıya dayanıklı olmaları onların doğada yaygın bir grup olmalarını sağlamıştır(2). Bunlara örnek olarak saman basilli de denilen *Bacillus subtilis*'i verebiliriz. Bu bakterilerin yüksek ısıya dayanıklılık göstermeleri birçok çalışmaya ve görüşlerin ortaya atılmasına neden olmuştur. Bu görüşler özellikle bakterial enzim faaliyetleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Zira mikrobiyal hücrelerde oluşan tüm metabolik faaliyetleri enzimler yönetmektedir. Sıcaklıkta enzim aktivitesi üzerine etkili bir faktördür(3). Lauder ve Heinen yaptıkları çalışmalarda protein termostabilitesini artırmada üreme sıcaklığının etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. *B. flauthermus* alanin dehidrojenaz ve diğer bazı soluble proteinleri termostabilitesi üzerine üreme sıcaklığının etkili olduğunu göstermişlerdir(4). Mc Linden ve arkadaşları üreme sıcaklığına bağlı olmaksızın mezofil bakterilerde ısıya duyarlı protein sentezinin mümkün olduğunu göstermiştir. Hücrenin iyonik güç ve iyonik bağlarının artmasının buna neden olduğunu ileri sürmüştür(5). Bazı enzimler efektör moleküller ya da

substratlar tarafından stabilize olabilirler. Wedler ve Hofman 65°C ta amonyum, glutamat ve ATP varlığında *B. sterothermophilus* glutamat sentetaz stabilitesini göstermişlerdir(6). Ortamdaki çözücünün miktar ve çeşidine göre de proteinlerin termostabilitesi değişim gösterir(4).

Üreme Görülen Sıcaklık Aralıkları	
Termotolerantlar	
<i>Bacillus licheniformis</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	20-50
Fakültatif termofiller	
<i>Bacillus coagulans</i>	30-60
<i>Streptomyces thermovioliaceus</i>	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	25-50
<i>Torula thermophila</i>	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	
<i>Melanocarpus albomyces</i>	
Zorunlu termofiller	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	40-80
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	45-79
<i>Thermus aquaticus</i>	
<i>Thermomonospora chromogena</i>	37-65
<i>Mastigocladus laminosus</i>	35-64
<i>Synechococcus lividus</i>	55-74
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	45-75
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	40-78
<i>C. thermocellum</i>	40-68
Kaldoaktifler	
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	50-90
<i>Thermothrix thioparus</i>	55-85
Barotermofiller	
<i>Pyrodictium brockii</i>	80-110

Tablo 1 Yüksek Sıcaklıklarda Üreyebilen Termofilik Mikroorganizmaların Farklı Grupları.

MİKROORGANİZMALARIN EKONOMİK ÖNEMİ

Daha önceleri patojeniteleri ile dikkat çeken mikroorganizmalar son yirmi yıl içinde biyoteknoloji biliminin gelişmesi ile ekonomik olarak değer kazanmışlardır. Mikroorganizmaların ekonomik önemini şu şekilde özetleyebiliriz;

a) Mikroorganizmalardan fermentasyon yolu ile elde edilen ürünler

b) Endüstriyel alanda mikroorganizmaların kullanılması

c) Gen klonlaması ile çeşitli proteinlerin üretimi

a) Mikroorganizmalardan fermentasyon yolu ile elde edilen başlıca ürünler şunlardır.

Laktik asit	2,3 Bütandiol
Aseton-Bütanol	Bakterial proteazlar
Amilaz	Dekstran
Kobalamin	2-Keto-glukonik asit

Ayrıca bakteriler antibiotiklerin üretilmesinde de kullanılmaktadır. Örneğin *Bacillus* türlerinden elde edilen Gramicidin, Bacitracin, Subtilysin sayılabilir (7). *B. subtilis*'den elde edilen bazı alkali proteazlar özellikle deterjan sanayinde kullanılmaktadır(8).

b) Endüstriyel alanda özellikle tekstil sanayi ve şarap sanayinde kullanılmaktadır.

c) Son yıllarda özellikle insanlar için elzem proteinlerin üretilmesinde mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bunun için ilgili proteinin geni uygun bir plazmide çeşitli yöntemlerle eklenerek bu plazmidin CaCl_2 varlığında genellikle ait olduğu bakteriye aktarılması ile proteinin üretilmesi sağlanır(9).

B. subtilis üzerinde çeşitli genetik çalışmaların yapıldığı bir bakteri türüdür. Ayrıca birçok fermantasyon ürününün elde edilmesi bakterinin ekonomik önemini artırmıştır. Termofil ve termotolerant bakterilerden elde edilen termostabil enzimler endüstri açısından önemli bir yer tutmaktadır(Tablo 2).

BAKTERIAL EKSOENZİMLER

Birçok bakteri üredikleri ortamdaki besin maddelerinden faydalanmak için üredikleri besiyerine eksoenzim veya ekstrasellüler enzimler denilen enzimler salgırlar. Çoğunluğunu hidrolaz ve proteazların oluşturduğu bu enzimler besiyerinde bulunan substratı bakterinin kullanabileceği formlara katalizler(10). Tablo 3 bunların bir listesini ve katalizlediği reaksiyonları göstermektedir. Termotolerant bakteriler tarafından üretilen Proteaz, Amilaz gibi bazı enzimlerin sıcaklığa karşı dirençli oldukları birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (11,12).

BAKTERIAL α - AMİLAZ VE ETKİ MEKANİZMASI

α -Amiloz dallanma göstermeden düz zincirler halinde uzamakta ve D-Glukoz ünitelerinin α (1-4) bağı ile birbirlerine bağlanması sonucu meydana gelmiş bir

Enzim	Kaynak	Termotoleransı
Proteazlar		
<i>Thermolysin</i> (nötral proteaz)	<i>B. thermoproteolyticus</i>	Ca iyonları varlığında 80 °C'ta 1 saat stabildir.
<i>Aqualysin I</i> (alkalin proteaz)	<i>T. aquaticus</i>	
<i>Aqualysin II</i> (nötral proteaz)	<i>T. aquaticus</i>	
<i>Caldolysin</i> (pH 4-12 de 75 °C'ta stabildir)	<i>T. aquaticus</i>	Ca iyonları varlığında 80 °C'ta 30 saat stabildir.
Sellulazlar		
<i>Sellulaz</i>	<i>C. thermocellum</i>	70 °C'ta 15 dakika stabildir.
<i>Hemisellulaz</i>		
<i>Sellobiaz</i>	<i>Termofilik Bacillus sp.</i>	15 dakika 70 °C'ta stabildir.
Amilazlar		
α - amilaz	<i>Termofilik Bacillus sp.</i>	90-95 °C'ta aktivite gösterebilir.
β - amilaz	<i>B. licheniformis</i>	
Diğerleri		
<i>Glikoz izomeraz</i>	<i>B. coagulans</i>	
<i>Alkol dehidrojenaz</i>	<i>Thermoanaerobium ethanolicus</i>	
β -Galaktosidaz	<i>T. aquaticus</i>	65 °C'ta 36 gün sonra %10 ak- tivite kaybeder.

Tablo 2 Termofillerden Elde Edilen Bazı Önemli Enzimler.

Eksoenzimler	Katalizlediği Reaksiyonlar
Proteazlar	Proteinleri protoz, pepton, peptitlere ayırır.
Gelatinaz	Gelatini hidrolizlemek üzere birçok bakteri tarafından sentezlenir.
Pepsin	Hayvanlarda bulunan proteinleri hidrolizler.
Tripsin	Hayvanlarda bulunan proteinleri hidrolizler.
Karbonhidratazlar	Polisakkaritler ve Disakkaritleri hidrolizler.
Sellulaz	Seluloz — $C_{12}H_{22}O_{11}$ (sellobioz)
Amilaz	Nişasta — $C_{12}H_{22}O_{11}$ (maltoz)
Maltaz	$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$ — $2C_6H_{12}O_6$ (glüköz)
β -Galaktosidaz	$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$ — $C_6H_{12}O_6$ (glüköz) + $C_6H_{12}O_6$ (galaktöz)
Sukraz	$C_{12}H_{22}O_{11}$ (sukroz) + H_2O — $C_6H_{12}O_6$ (glüköz) + $C_6H_{12}O_6$ (fruktoz)
Lipazlar	Yağları gliserin ve yağ asitlerine parçalar.

Tablo 3 Bakterilerin Eksoenzimlerinden Bazıları ve Katalizlediği Reaksiyonlar.

depo polisakkarittir. Molekül ağırlığı birkaç binden 500.000 dalton'a kadar değişmektedir. Amilopektin daha yüksek molekül ağırlığına sahip bir depo polisakkarittir(13).

Nişastanın ana maddesi enzimatik olarak hidrolize olmaktadır. Tükrükte ve sindirim kanalında bulunan α -amilaz nişastanın α (1-4) bağlarını hidroliz etmektedir. Tükrük ve sindirim kanalına salgılanan α -amilaz dışında bakteriler tarafından salgılanan α -amilazda nişastayı hidrolize etme yeteneğindedir. Son yıllarda özellikle B. subtilis'ten izole edilen α -amilaz (14) üzerinde yoğun çalışmalar vardır. Ortamda bir karbon kaynağı ve inorganik tuzların varlığında amilaz üretimi birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir(15). Bakterial amilaz'ın termostabil özellik gösterdiği yine birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir(14,16).

Deschreider çalışmalarında α -amilaz'ın varlığını poliakrilamid jel elektroforezinde göstermiş ve izolasyonu ile ilgili çalışmalar yapmıştır(17). Ramesil yaptığı çalışmalarda termostabil α -amilaz'ın 4 °C'taki ekstraksiyonu ve 28 °C'taki ekstraksiyonunu karşılaştırdığında 4 °C ta % 12'lik bir artışın olduğunu göstermiştir(18). Yine yapılan çalışmalar α -amilazın termostabil özelliğini kofaktörden kaynaklandığını göstermiştir(18,19). Ortamda protein, peptit, pepton gibi organik maddelerin varlığında bakterinin bunları kaynak olarak kullanarak eksoenzim sentezini artırdığı saptanmıştır. Anderson ve arkadaşları hazırladıkları birçok organik ve inorganik madde içeren puding'te Bacillus türlerini üreterek fazla miktarda aktivitesi yüksek termostabil α -amilaz üretimi gerçekleştirmişlerdir(14). Özellikle üretim sırasında sıcaklıktan dolayı α -amilaz aktivitesinin korunması için yapılan deneylerde ortamda albumin varlığında amilazın korunduğu gösterilmiştir(14,16). Ortamda Ca^{++} iyonları,

nişasta ve albumin varlığında amilazın stabilize olduğu ancak ısının 143 °C tan düşük olması gerektiği gösterilmiştir(20).

PROTEAZLAR

Proteolitik enzimleri endüstriyel enzimlerin 1/2, 1/3'ünü oluşturmaktadır(15). Bunların 25 tanesi termostabildir. Alkalın proteazlar deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır.

B. subtilis'ten iki tip proteaz izole edilmiştir. Bunlar nötral pH'da aktif metal enzimleri (21,22) ve alkali pH'da aktif serin enzimleridir(23,24). Bu enzimlerin inhibitörlere karşı davranışlarında da farklılık gözlenmiştir. Enzimlerin estrolitik aktivitelerinde de yine farklılıklar gösterilmiştir(21,22,25). Millet yaptığı çalışmalarda proteazların B. subtilis'in sporlaşma döneminde metabolik rolleri olduğunu ileri sürmüştür. Yaptığı diğer çalışmalar ile bu proteazların kinetiklerinin özel inhibitörler ile incelenebileceğini göstermiştir(26). Minamiura ve arkadaşları B. subtilis'in alkali proteazlarının etkisiyle parçalanmış kazein'in peptitlerinin amino asit dizilerini araştırmışlardır(27). Millet yaptığı çalışmalarda proteazların eldesi için 0,40 gr/ml amonyum sülfat çökeltmesinin uygulanması ile total proteazların elde edildiğini elektroforetik olarak ispat etmiştir(28).

PROTEİN SENTEZ İNHİBİTÖRLERİ

Protein sentezi karakteristik olarak birçok antibiotik tarafından inhibe edilmektedir. Antibiotikler bazı mikroorganizmalar tarafından kimyasal savunma aracı olarak sentezlenmektedir. Organizmanın sentez ettiği bu bileşikler kendileri dışında kalan diğer mikroorganizmalar için son derece toksiktir. Faaliyet mekanizmaları spesifik

olan antibiotikler biokimyasal çalışmalar için son derece faydalı bileşiklerdir.

CHLORAMPHENICOL : Ribozomun 50S subunitesinde bulunan peptidil transferaz aktivitesini inhibe ederek protein sentezini engeller.

TETRACYCLIN : Ribozomun 30S subunitesine bağlanır ve aminoasıl-tRNA'nın bağlanmasını inhibe eder.

STREPTOMYCIN : Sentezin başlamasını inhibe eder ve mRNA üzerinde yanlış okumalara neden olur.

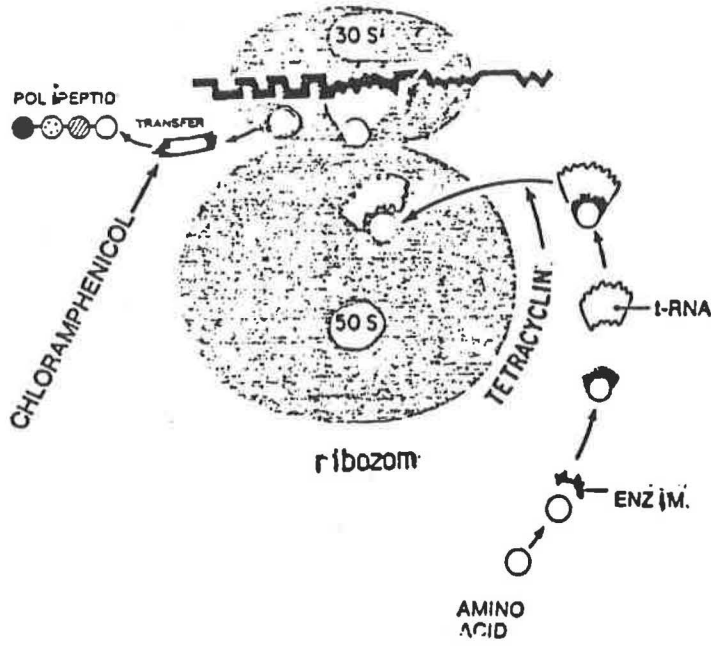
PUROMYCIN : Aminoasıl-tRNA analogu olarak hareket eder 70S ribozomun aminoasıl bölgesine bağlanır. Varolan protein ile peptit bağı yapar ve protein zincir uzaması durur kısa zincirli proteinlerin ortama salınmasına neden olur.

BETA-LAKTAM GRUBU : Ampicillin ve Cephalospirin grubu antibiyotikler bu gruba girerler. Hücre duvar yapısında bulunan murein sentezini inhibe ederek etki gösterirler(29).

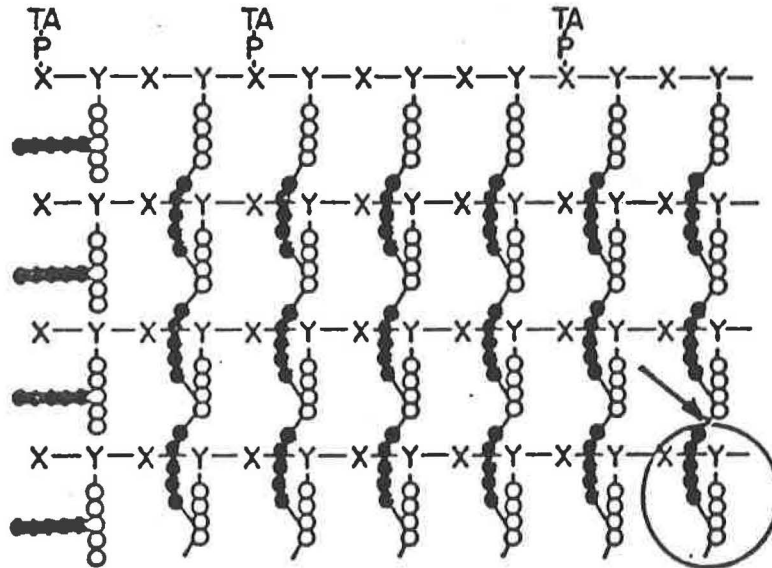
ERİTROMİSİN : Ribozomun 50S subunitesine bağlanır ve translokasyonu inhibe ederek protein sentezini engeller.

SİKLOHEKSİMİD : Ribozomun 60S subunitesinde bulunan peptidil transferas aktivitesini inhibe ederek protein sentezini engeller.

DİFTERİ TOKSİNİ : Ökariyotik hücrelerde EF2' ye bağlanarak protein sentezini inhibe eder.



Şekil 1 Chloramphenicol ve Tetracycline'in Etki Mekanizması (13)



X Asetilglukozamin Y Asetilmuramikasit

TA-P .Takoik asit

Şekil 2 Beta-laktamların Etki Mekanizması(13).

BACILLUS SUBTILIS PROTEİNLERİNE ANTİBİYOTİKLERİN ETKİLERİ

Günümüz dünyasında prokaryot protein sentezinin kontrol altında tutulması endüstriyel alanda ve patojen mikroorganizmalara karşı açılan savaşta önemli ilerlemeler kaydettirmiştir. Bu amaçla kullanılan antibiyotikler protein sentezine inhibe ederler. Bunlardan chloramphenicol tRNA'nın ribozoma bağlantı yerlerinin bloke etmek sureti ile amino asitlerin uzun zincirler oluşturmasını engeller(30).

Yüksek konsantrasyonlarda verilen antibiyotiklerin protein sentezi üzerine değişik etkileri vardır.(Chloramphenicol, Chlortetracyclin, Eritromisin) bazı antibiyotikler protein oluşumunu tamamen baskılarken protein başlangıç seviyesini korur (serin deaminase, alkalın fosfataz). Bazı antibiyotiklerde inhibisyon protein bozulumu ile birlikte seyrederek (β - galoksidaz, sitokrom B-0). Bunun yanında bazı proteinler inhibitör varlığında daha fazla sentezlenmektedir. Örneğin Aktinomisin varlığında sitokrom A'nın sentezi artar(31).

Antibiyotiklerin düşük konsantrasyonda kullanılmasında ise mitekondrial DNA'nın (Chloramphenicol, Eritromisin varlığında) protein sentezi inhibe olur(32).

Antibiyotığın bakteiostatik konsantrasyonlarda bulunmasında ise ,inhibitör varlığından etkilenmeyen % 5-15 bakterinin kuru ağırlığının ve canlı hücre total sayısının arttığı bildirilmiştir(33).

Bermek yaptığı çalışmalarda invitro % 50 chloramphenicol inhibisyon değerinin 100 mM olduğunu göstermiştir(34).

Prokaryot hücrelerinde diğer birçok rezistanlık gibi antibiyotiklere karşı rezis-

tanlığında plazmidler tarafından sağlandığı bilinen bir gerçektir. Nowick antibiyotiklerin belirli konsantrasyon ve sürede bakteride plazmitlerin sayısının arttığını göstermiştir. Ayrıca artan bu plazmidlerin "Relaxed" kontrol altında bulunan yani replikasyonları dışardan gelen faktörlere bağlı olan plazmidler olduğunu göstermiştir. "Stringent" kontrol altındaki yani replikasyonları kromozomal DNA'ya bağlı olan plazmidlerin sayısının artmadığını göstermiştir(35). Clewell besi yerinde 170 µg/ml konsantrasyonda Chloramphenicol varlığında ve 2,5 saatlik inkübasyon sonunda Relaxed kontrol altındaki plazmid sayısının bir kaç bine çıktığını göstermiştir(36). Bu gelişmeleri takiben plazmid sayısını amplifiye edecek miktarda antibiyotik içeren ortamlardaki plazmid gen ekspresyonları Clewell, Nowick ve Royston tarafından uzun süren çalışmalara neden olmuştur(37,35,38).

Beta-laktam antibiyotik grubu üzerine yapılan çalışmalarda onların da plazmid sayısını artırmada etkili olduğu gösterilmiştir(39). Young B. subtilis'te Chloramphenicol Acetyltransferaz geninin amplifikasyonu üzerine yaptığı çalışmalarda, sentezlenen protein miktarının kullanılan antibiyotik ile kontrol edilebileceğini göstermiştir(40).

TEZİN AMACI

Son yıllarda özellikle biyoteknoloji biliminin gelişmesi ile çeşitli enzim ve proteinlerin üretiminde mikroorganizmalara yönelinmiştir. Bu yolla gelişmiş bir çok ülke ekonomilerine büyük katkılar sağlamaktadırlar.

Çalışma materyali olarak seçtiğimiz Çermik Termal Kaplıcalarından izole edilen B.subtilis gerek kolay üretilmesi gerekse bir çok eksoenzim salgılaması nedeniyle uygun bir materyal olarak tesbit edilmiştir. Üretim ve saflaştırma aşamalarından sonra elde edilen amilazın uygun aktivitede olması ve ortamda albumin varlığında amilaz miktarının artış göstermesi biyoteknolojideki yeni gelişmelere neden olacağı sanılmaktadır. Bu bakteriden elde edilen amilazın biyokimyasal özellikleri saptanmaya çalışılmıştır. Ayrıca bakterilerin ürettikleri proteazların bazı etkileri incelenmeye çalışılmıştır.

Son yıllarda bakteriler üzerinde yapılan çalışmalarda inhibitörlerin onlar üzerindeki etkisi araştırılarak tedavide kullanılmaya arz edilmektedir. Çalışmanın bir bölümünde özellikle bazı antibiyotiklerin B.subtilis proteinleri üzerindeki etkileri incelenmeye çalışıldı.

MATERYAL VE METOT

a) Kullanılan Kimyasal Maddeler

Elektroforetik malzemeler Acrylamide, bis-acrylamide, MET (2-Mercaptoetanol), SDS(Sodyum dodesil sülfat), TEMED, Riboflavin, Glicine, Coomassive brilland blou-R250, standart proteinler (Albumine bovine, albumine egg, tripsinojen, tripsin inhibitör, carbonic anhidres) Sigma, st.Louis'ten,

Antibiyotikler chloramphenicol, cephalixin, cefotaxim ve Ampicillin Sigma, st. Louis'ten,

Amidon Boehringer manheim,

K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , KOH, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$, Na_3 -Citrate, I, KI, NaCl, NaOH, $NaCO_3$, Tris base, Tris HCl, Na-K- tartarat, TCA (Triclorasetik asit), D-Glucose, $CuSO_4$, Sukroz, % 96'lık Etanol ve diğer analitik saflıktaki maddeler Merck, Darmstadt'tan, BSA(Bovine serum albumin) Behringwerke A.G Marburk Ionn'dan, α - Amylase Fluka, Buchs'tan

NB(Nutrient Broth) bacto'dan temin edilmiştir.

b) Biyolojik Materyal : Çermik termal kaplıcalarından izole edilerek tür teşhisi yapılan termotolerant Bacillus subtilis kullanıldı.

c) Besi yeri, tampon ve çözeltilerin hazırlanması : NB(Nutrient Broth) sıvı besiyeri hazırlamak için 8 gr. NB 1 lt. saf suda çözülerek otoklavlandı. Spinzer'in glikoz-mineral besiyeri (41) 14 gr. K_2HPO_4 , 6 gr. KH_2PO_4 , 2 gr $(NH_4)_2SO_4$, 1

gr. $\text{Na}_3\text{-Citrate. 2H}_2\text{O}$, 0.2 gr. $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 lt saf suda çözümlenerek otoklavlandı. Otoklavlamadan sonra 5 gr. D-glükoz steril şartlarda ilave edildi. Ayrıca BSA-glükoz-mineral besiyeri için aynı besiyerine 250 $\mu\text{g/ml}$. konsantrasyonu sağlayacak şekilde BSA ilave edildi. Tüm besi yerleri kullanılıncaya kadar +4 $^{\circ}\text{C}$ de saklandı.

Dializ Tamponu: 14 gr K_2HPO_4 , 6 gr KH_2PO_4 1gr $\text{Na}_3\text{-Citrate.2H}_2\text{O}$, 100 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 litre saf suda çözümlenerek hazırlandı.

Fosfat tamponu: 19ml 0.2M KOH, 50 ml 0.1M KH_2PO_4 100ml'ye seyreltilerek hazırlandı.

Bakteri yıkama tamponu 0.05 M Tris base pH 7.5 olacak şekilde konsantre HCl ile ayarlandı.

Lugol Çözeltisi: Stok 0.1 M iyot I_2 KI içinde hazırlandı. Kullanılacağı zaman 1/15 seyreltilerek hazırlandı.

Amidon Çözeltisi: 200mg amidon tartılarak 10 ml kaynar fosfat tamponu içerisinde çözüldü. Daha sonra kaynar haldeki fosfat tamponu içerisine bu çözeltiden damla damla oldukça yavaş damlatılarak hacim fosfat tamponu ile 500 ml olacak şekilde tamamlandı.

Dializ Hortumunun Hazırlanması: 10 mM K-EDTA pH 7, 90 $^{\circ}\text{C}$ 'de kaynatılarak içerisine dializ hortumu 3 dakika süreyle bırakıldı. Üst sıvı dökülüp dializ hortumu bol saf su ile yıkanarak saf su içerisinde +4 $^{\circ}\text{C}$ 'da muhafaza edildi.

Antibiyotiklerin Hazırlanması: Ampicilin 25 mg/ml konsantrasyonda steril saf suda

hazırlanarak besi yerine 500 μg /ml konsantrasyonu ilave edildi(9).

Chloramphenicol: 34mg/ml. konsantrasyonda \times 96'lık etanolde hazırlanarak besi yerine 170 μg /ml konsantrasyon olacak şekilde ilave edildi(36).

Cephalexin: 25mg/ml steril saf su içerisinde hazırlanarak besi yerine 500 μg /ml konsantrasyonda ilave edildi(9).

Cefotaxim: 25 mg/ml konsantrasyonda hazırlanarak besi yerine 500 μg /ml konsantrasyonda ilave edildi(9).

Hazırlanan tüm stok çözeltiler -20°C 'ta muhafaza edildiler.

d) Bakterilerin Üretimi:

Enzimatik çalışmalar için: Bakteriler enzim çalışması için glikoz-mineral ve BSA-Glikoz-mineral besi yerinde antibiyotik çalışması için NB'de üretildiler. Enzim çalışması için şekil (3,4) den görüldüğü gibi önce katı besi yerinden bir koloni 10 ml glikoz-mineral besi yerine, yine bir koloni 10ml BSA-Glikoz-mineral besi yerine ekilerek 9.5 saat çalkalamalı olarak 37°C ta inkübasyona bırakıldı. Bunu takiben 100 μl 'lik kültürler 25 ml'lik besi yerlerine ekildi. 37°C 'ta 9.5 saat çalkalamalı olarak inkübasyona bırakılan kültürlerin tamamı 500 ml'lik besi yerlerine ekilerek 17 saat süre ile 37°C 'ta çalkalamalı olarak inkübe edildi.

katı besi yeri
tek koloni
|
10 ml Glikoz-Mineral besi yeri
| 9.5 saat 37 °C çalkalamalı
100 µl ekim
25 ml Glikoz-Mineral
| 9.5 saat 37 °C çalkalamalı

25 ml ekim 500 ml
Glikoz-Mineral
| 17 saat
| 37 °C çalkalamalı
Bakteri Eldesi

katı besi yeri
tek koloni
|
10 ml BSA-Glikoz-Mineral
| 9.5 saat 37 °C çalkalamalı
100 µl 25 ml BSA-Glikoz-
Mineral
| 9.5 saat 37 °C çalkalamalı
25 ml ekim 500 ml BSA-
Glikoz-Mineral
| 17 saat
| 37 °C çalkalamalı
Bakterilerin eldesi

Şekil(3)

Glikoz-Mineral Besi Yerinde

Bakteri Üretimi

Şekil (4)

BSA-Glikoz-Mineral Besi Yerinde

Bakterilerin Üretimi.

Antibiyotikli ortamlarda Bakteri üretimi ve Plazmid amplifikasyonu: 4 ayrı anti-biyotik için ayrı kültürler hazırlandı. Üretim için şekil 5'ten görüldüğü gibi katı besi yerinden tek bir koloni 10 ml NB sıvı besi yerine ekilerek 37 °C'ta 9.5 saat çalkalamalı olarak inkübe edilen kültürlerden 100 µl 25 ml besi yerine ekildi. 37°C'de 9.5 saat çalkalamalı inkübasyondan sonra bunun tamamı 500 ml'lik besi yerlerine ekilerek 37 °C'ta 9.5 saat çalkalamalı olarak inkübe edilen kültürlere daha önce anlatılan miktarlarda antibiyotikler ayrı ayrı ilave edildi. 2.5 saat 37 °C'ta çalkalamalı olarak inkübe edilen kültürler +4 °C'ta alındı (9,36).

KATI BESİ YERİ

tek koloni

| Ekim

10 ml NB sıvı besiyeri

| 37°C

| 9.5 saat çalkalamalı

100 µl 25 ml NB sıvı besiyeri

| 37°C

| 9.5 saat çalkalamalı

25 ml 500 ml'ye Ekim

| 37°C

| 9.5 saat çalkalamalı

Antibiyotiklerin ilavesi

| 2.5 saat

| 37°C çalkalamalı

Bakterilerin Eldesi

Şekil (5) NB'de bakterilerin üretimi
ve antibiyotiklerin ilavesi

e) Kültürlerden Bakterilerin İzolasyonu:

Kültürler inkübasyon süresi sonunda +4 °C'a alınarak +4 °C'ta 5000 rpm'da 15 dk. santrifüjlenerek bakteriler elde edildi. Supernatantlar daha önceden soğutulmuş erlenelere alınarak ağzıları kapatılıp -20 °C'ta muhafaza edildi. Bakteriler yıkama tamponu ile 2 kez yıkanarak besi yeri artıkları temizlendi. Elde edilen supernatantın belirli bir kısmı bakteri miktar tespiti için standart olarak kullanıldı. Spektronic -20 spektrofotometresi ile OD₄₂₀ nm'de miktar tespiti yapıldı. Bakteriler çalışılıncaya kadar -20 °C'ta saklandı.

f) Amonyum Sülfat Çökertmesi:

(NH₄)₂ SO₄ havanda iyice ezilerek pudra haline getirilip etki yüzeyinin genişletilmesi sağlandı. Enzim çalışması yapılacak olan BSA-Glikoz-Mineral ve Glikoz

mineral supernantları buz içerisine alınarak, içerisine bir magnet atılıp karıştırıldı. 0.4 gr/mL $(NH_4)_2 SO_4$ oldukça yavaş olarak ilave edildi. İşlem bittikten sonra 1 saat karıştırıldı. Çözeltiler 5000 rpm'de +4°C'ta 20 dk santrifüjlenerek çökelti ve supernatant pastör pipetle hassasca ayrıldı. Çökeltiler 5 ml dializ tamponunda çözüldüler.

$(NH_4)_2 SO_4$ çökeltmesi sonuca elde edilen çökelti ve supernatant 2 litre dializ tamponuna karşı gece boyu dializlenerek $(NH_4)_2 SO_4$ 'ten kurtarılırlar.

Bu sayede α -amilaz ve proteazlar ayrı ayrı elde edilirler.

g) Elektroforez İşlemi:

Elde edilen enzim çözeltileri Weber and Osborn (42) yöntemine göre veya Davis yöntemine göre (43) Elektroforez işlemine tabii tutuldular.

h) α -Amilazın Akromik Noktasının Belirlenmesi

Fuwa yöntemine uygun olarak yapıldı(44). 1/15 seyreltik Lugol çözeltisinden mikrotited kuyucuklarına 50 μ l bırakıldı. 37 °C'ta bir tüp içerisine; 2 mL Amidon çözeltisi, 2 mL Fosfat tamponu, 1 cc 0.5 M NaCl ve 1 ml. Enzim çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. İlk andan itibaren lugol kuyucuklarına 30 ar μ l bırakılarak renk stabilitesi incelendi.

1) α -Amilazın Km Değerinin Belirlenmesi:

Lineweaver-burk (45) denkleminde yola çıkılarak Km değerleri elde edildi. Bunun için tablo (5) deki deney serisi hazırlanarak 660 nm'de spectronic 20 spektrofotometrisinde okundu. Bulunan OD değerleri standart Amidon eğrisi ile

karşılaştırılarak Amidon ve ürün miktarları bulundu. 1/Amidon ve 1/ürün değerleri bulunarak grafiğe geçildi. (Tablo 5)

Kullanılan mal / Tüp No	1	2	3	4	5
Amidon Çöz ml	8	6	4	2	-
Fosfat Tamponu ml	2	4	6	8	10
0.5 M NaCl ml	1	1	1	1	1
Enzim Çöz. µl	20	20	20	20	20
‰ 1 NaOH ml	2	2	2	2	2
1/15 seyreltik LUGOL ml	4	4	4	4	4

Tablo(5) Km değerlerinin elde edilmesi için hazırlanan deney sistemi.(20 dk. 37⁰C'ta inkübasyon)

NOT: Glikoz-mineral besi yerinden elde edilen amilaz miktarı az olduğundan deney sisteminde enzim çözeltisinden 1,23 ml bırakılarak deney yapıldı.

i) Optimal pH'nın belirlenmesi

Bunun için değişik pH değerlerindeki fosfat tamponları hazırlanarak Tablo (6)'deki deney düzeneği hazırlandı. 660 nm'de spektro değerleri standart eğri yardımıyla incelenerek ortamdaki amidon ve ürün miktarları bulunup grafiğe geçildi.

Tüp No	1	2	3	4	5	6
Kullanılan malzeme						
Amidon çözeltisi ml	4	4	4	4	4	0
0.5M NaCl ml	1	1	1	1	1	1
%1 NaOH ml	2	2	2	2	2	2
Enzim çözeltisi µl	20	20	20	20	20	20
Lugol 1/15 seyreltik ml	4	4	4	4	4	4
Fosfat tamponu ml	2	2	2	2	2	6
pH	5.5	6	6.5	7.5	8	Saf su

Tablo (6) Optimal pH değerinin belirlenmesi için yapılan deney sistemi (37 °C'ta 20 dakika inkübasyon sonrası)

j) Optimal Cl miktarının belirlenmesi

Bunun için tablo (7) daki deney düzeneği kurulup inkübasyon sonunda 660 nm'de spektro değerleri okunarak standart amidon eğrisinden bu değerlere karşılık gelen amidon miktarı saptanıp ürün miktarı hesaplanarak grafiğe geçildi.

Kullanılan mal.	Tüp no	1	2	3	4	5
Amidon çözeltisi ml		4	4	4	4	-
Fosfat tamponu ml		7.5	7	6.5	6	12
%1 NaOH ml		2	2	2	2	2
0.5 M NaCl ml		0.5	1	1.5	2	-
Enzim çözeltisi µl		20	20	20	20	20
Lugol ml 1/15 seyreltik		4	4	4	4	4

Tablo (7) Optimal Cl miktarının belirlenmesi için hazırlanan deney sistemi (37 °C'ta 20 dakika inkübasyon sonrası).

k) Albumin, Glikoz, K+, Amilaz Miktar Tayinleri

K+, Albumin, Glikoz ve Amilaz miktar tayinleri Beckman Otoanalizör'de yapıldı.

1) Antibiyotik Çalışması İçin Bakterilerin Parçalanması

2 ml yıkama tamponu içerisindeki bakteriler buz içerisinde ultrasonic sonicator'de (Lab-line) 10 kHz, 100 W'ta 15 dk'lık iki seansta parçalandı. +4 °C'da 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlenerek süpernatant önceden soğutulmuş bir tüpe alındı.. Kullanılincaya kadar -20 °C'ta saklandı(49).

m) Protein Miktar Tayinleri

Lowry ve arkadaşları yöntemine göre (47) veya Warburg Christian (48) yöntemine uygun olarak yapıldı.

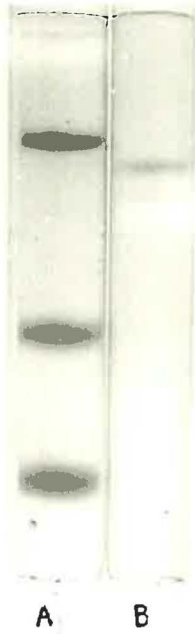
n) Antibiyogram

Disk Difüzyon yöntemine göre yapıldı(46).

BULGULAR

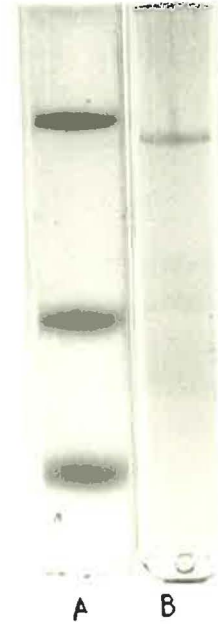
1) α -amilaz ve proteazların eldesi

8 0-60'lık Amonyum Sülfat çökeltmesi ile proteazlar çökelttilerek, α -amilaz ve proteazlar aktif olarak elde edildiler. Şekil (6) ve (7) bunların elektroforez resimlerini göstermektedir.



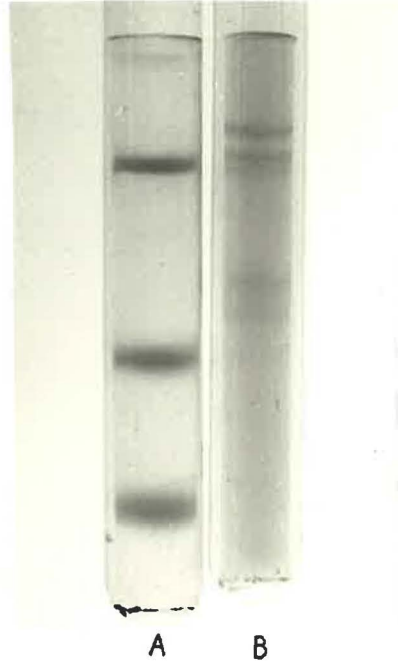
Şekil 6. a

A-Standart proteinler BSA (66.000 dalton)
tripsinojen (24.000 dalton) laktalbumin
(14.200 dalton) B-BSA'lı besi ortamından
elde edilen amilaz (58.000 dalton).



Şekil 7 a

A-Standart proteinler BSA (66.000 dalton)
tripsinojen (24.000 dalton) laktalbumin
(14.200 dalton) B-BSA'sız besi ortamından
elde edilen amilaz (58.000 dalton).



Şekil 6 b

A-Standart proteinler BSA (66.000 dalton)
tripsinojen (24.000 dalton) laktalbumin
(14.200 dalton) B- BSA'lı besi ortamından
elde edilen proteazlar.



Şekil 7 b

A-Standart proteinler BSA (66.000 dalton)
albumin egg (45.000 dalton), Carbonik anhidrase
(29.000 dalton) tripsin inhibitör (20.400 dalton)
B-BSA'sız ortamdan elde edilen proteaz bantları

2) Üreyen Bakteri Miktarları ve Protein Miktarlarının Tesbiti

500 ml'lik BSA'lı ve BSA'sız ortam bakteri üretim miktarları incelendiğinde BSA'lı ortamda üremenin yaklaşık 2,5 kat fazla olduğu gözlemlendi. Her iki ortamdaki protein miktarları amonyum sülfat çökeltilmesinden sonra incelendiğinde BSA'lı ortamda proteazların yaklaşık iki kat fazla sentezlendiği tesbit edildi (Tablo 8 bu değerleri vermektedir).

Üretilen besiyeri	Üreme miktarı	1 gr lizat protein miktarı	Proteaz çöz protein miktarı	Enzim Çöz Protein mik
BSA-Glikoz-Mineral	17.84 gr	51.96 mg/ml	16.9 µg/ml	10.2 µg/ml
Glikoz-Mineral	6.76 gr	14.72 mg/ml	5.4 µg/ml	5.7 µg/ml

Tablo (8) Çeşitli ortamlardaki bakteri lizatların ve üretilen protein miktarları

3) BSA'lı ortamda bakterinin yaklaşık 2.5 kat fazla üremesine rağmen ortamdaki değişen glikoz, K ve amilaz miktarları yaklaşık olarak aynıdır. Tablo (9 ve 10).

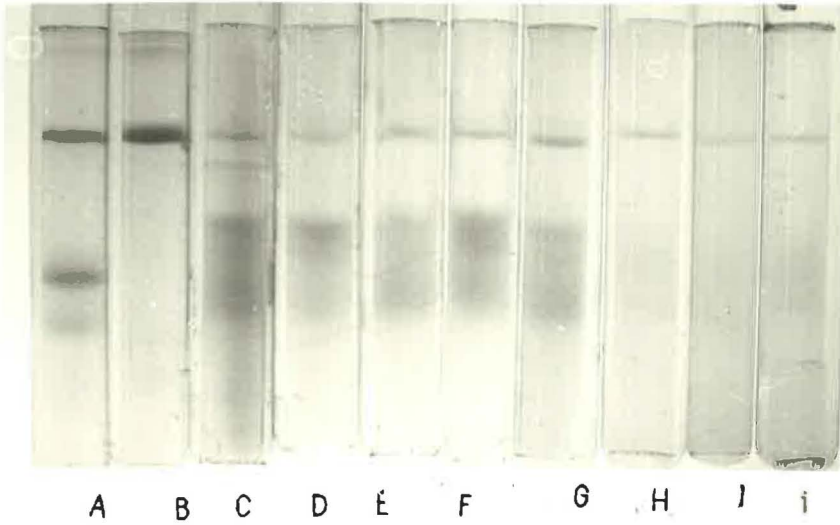
BSA'lı ortam	Başlangıç	Üremesorası
Albumin	250 µg/ml	44 µg/ml
Glikoz	5 mg/ml	2.4 mg/ml
K	205 mM/L	189 mM/L
Amilaz	-	46 unite

BSA'sız ortam	Başlangıç	Üremesorası
Albumin	-	-
Glikoz	5 mg/ml	253 mg/ml
K	205 mM/L	186 mM/L
Amilaz	-	38 unite

Tablo (9-10) BSA'lı ve BSA'sız besi ortamında bakteri üretiminden önce ve sonra maddelerin konsantrasyonları.

4) Proteazların Aktivitesinin Gösterilmesi

Materyal ve metotta belirtildiği şekilde elde edilen proteaz çözeltisinin 40 μ l ile 20 μ l 1 mgr/ml'lik BSA 37 $^{\circ}$ C'da inkübe edildi. Buradan elektroforeze verilen örneklerde 30. saniyede BSA'dan 45000 daltonluk bir parça koparıldığı ayrıca 35000 ile 19000 dalton arasında değişen parçalara ayırdığı gözlemlendi. Yarım saat sonra üst sıvı ile mukayese edildiğinde BSA'nın tümünün parçalandığı gözlemlendi. Şekil (8) Bunların elektroforez bantlarını göstermektedir.

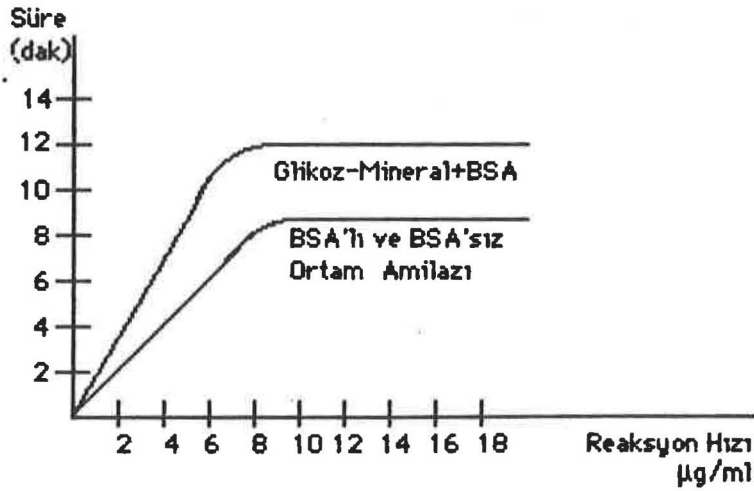


Şekil 8

A-Standart proteinler BSA (66.000 dalton) carbonik anhidrase (29.000 dalton) tripsin inhibitör (20.400 dalton) B- 20 μ l BSA standartı C-30 saniye inkübasyonda kalmış 40 μ l proteaz çözeltisi + 20 μ l BSA D- 1 dakika inkübasyonda kalmış 40 μ l proteaz çözeltisi+20 μ l BSA. E-5 dakika inkübasyonda kalmış 40 μ l proteaz çözeltisi +20 μ l BSA F-10 dakika inkübasyonda kalmış 40 μ l proteaz çözeltisi +20 μ l BSA G- 15 dakika inkübasyonda kalmış 40 μ l proteaz çözeltisi+20 μ l BSA H-30 dakika inkübasyonda kalmış 40 μ l proteaz çözeltisi+20 μ l BSA I- 60 dakika inkübasyonda kalmış 40 μ l proteaz çözeltisi + 20 μ l BSA I-40 μ l proteaz çözeltisi.

5) α - Amilazın Akromik Noktasının Tesbit Edilmesi

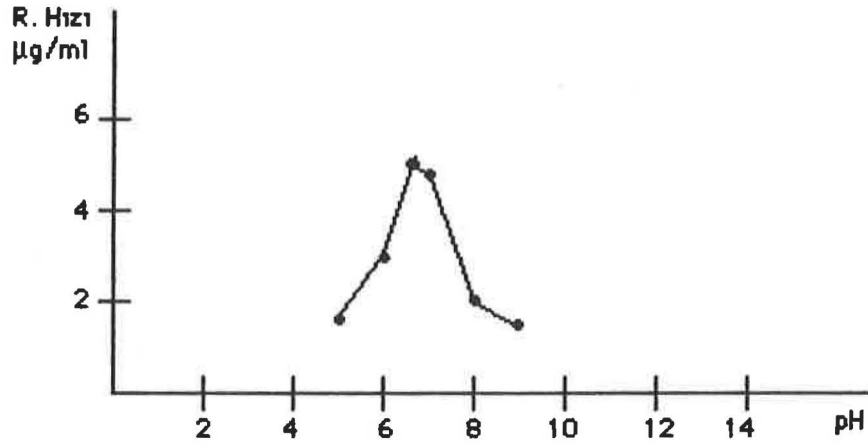
BSA'lı ve BSA'sız ortamlarda üretilen α -amilazın nişasta üzerine etkili olup olmadığını ve etki süresini tesbit etmek için her iki ortamda üretilen α -amilazın akromik noktaları fuwa yöntemine göre tesbit edildi. BSA'lı ortamda akromik nokta 9 dk. BSA'sız ortamda yine 9 dk. olarak saptandı. BSA'nın ortamdaki etkisini incelemek amacıyla glikoz mineral süpernatantına 250 $\mu\text{g/ml}$ BSA ilave edilip akromik nokta tayini yapıldığında 12 dk. olarak tesbit edildi (Şekil 9).



Şekil (9) Çeşitli ortamlarda α -amilazın reaksiyon hızına bağlı olarak akromik noktaları.

6) α - Amilaz Aktivitesi İçin Optimal pH'nın Tesbiti

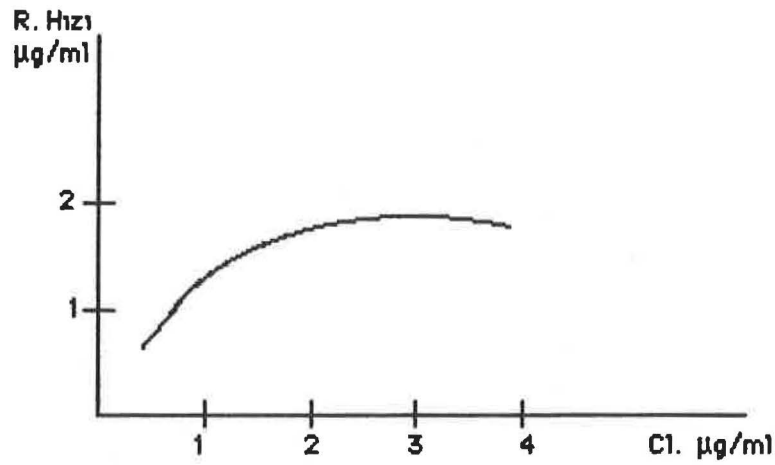
BSA içeren ve içermeyen her iki ortamda da α - amilaz aktivitesi için optimal pH aralığı 6,5 ile 7 arasında olduğu gözlendi. Optimal pH aralığı dışında bir inhibisyonun olduğu gözlendi (Şekil 10).



Şekil (10) BSA'lı ve BSA'sız ortamlardan elde edilen Amilaz'ın optimal pH değerleri.

7) α - Amilazın Aktivasyonu İçin Optimal Cl Miktarının Saptanması

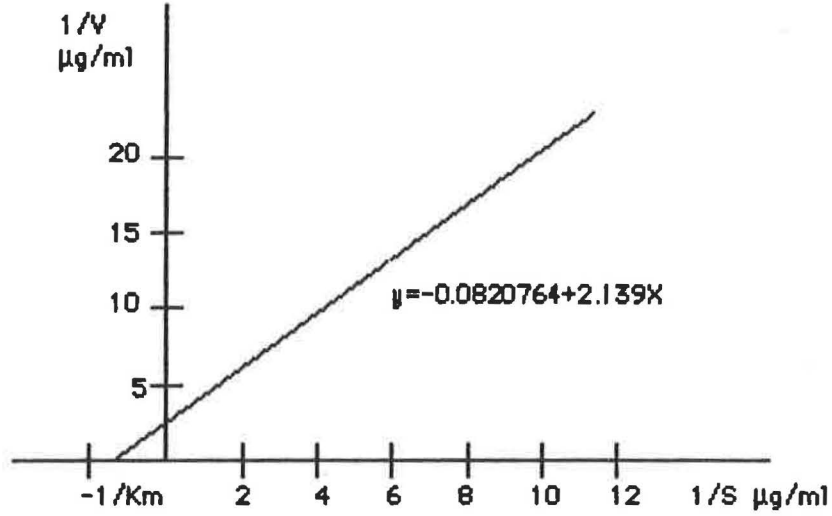
Her iki ortamda üretilen α - amilazın aktivite göstermesi için Cl tyonuna ihtiyaç gösterdiği tesbit edildi. Sistem için en elverişli konsantrasyon 2.6 $\mu\text{g/ml}$ olduğu düşük konsantrasyonların yetersiz kaldığı yüksek konsantrasyonları ise sistemi belli bir oranda inhibe ettiği gözlemlendi (Şekil 11).



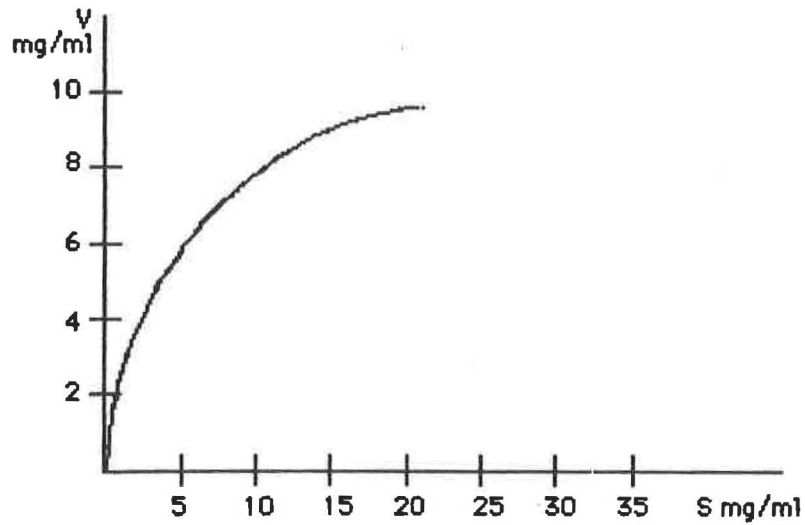
Şekil (11) BSA'lı ve BSA'sız ortamlardan elde edilen Amilaz'ın optimal Cl miktarı.

8) Km Değerinin Bulunması

BSA'lı ve BSA'sız ortamda üretilen bakterilerden elde edilen amilazın substrat üzerindeki etkinliğini belirleme amacı ile Km değerleri bulundu. BSA'lı ve BSA'sız ortamlarda Km değeri $0,66 \cdot 10^{-2}$ olarak bulundu Şekil (12-13).



Şekil (12) Lineavewear-Burk Denklemine göre BSA'lı ve BSA'sız ortamlardan elde edilen Amilaz'ın Km değerinin gösterimi.



Şekil (13) Michelis Menten Bağıntısına göre substrat ve enzim ilişkisi.

9) BSA'lı ve BSA'sız ortamlarda üretilen B.subtilis'in doubling time süreleri karşılaştırıldığında BSA'lı ortamda bakterilerin 57 dakikada sayılarını iki katına çıkardıkları BSA'sız ortamda ise 88 dakikada sayılarını iki katına çıkardıkları tespit edildi.

10) B.subtilis maksimum üreme sıcaklığı olan 55 °C'ta üretildiğinde BSA'sız ortamda belli bir renk değişimi (kararma)meydana geldiği gözlemlendi.BSA'lı ortam bakterileri ise normal üremesine devam etti. Elde edilen bakteriler NB katı besi yerine ekildiğinde BSA'sız ortam bakterileri oldukça zor ve az miktarda ürediler.

11) Antibiyogram

Disk difüzyon yöntemine göre bakterinin duyarlılığını tespit etmek için yapılan antibiyogramda şu sonuçlar elde edildi.

Tablo (11) B.subtilis'in çeşitli antibiyotiklere karşı antibiyogramı.

Cefolotin SS	Duyarlı
Amoxilin-klavunat	Duyarlı
Amikacin	Duyarlı
Sulbaktam-Ampicilin	Duyarlı
Ampicillin	Duyarlı
Cefoparozone	Az duyarlı
Cephalexin	Az duyarlı
Cefotaxim	Dirençli
Ceftrioxone	Az duyarlı
Ciproflaxin	Duyarlı
Cefuroixine	Duyarlı
Chloramphenicol	Duyarlı

12)Plazmidleri Amplifiye edecek miktarda antibiyotik içeren kültürlerden elde edilen bakteri miktarlarında kontrole göre bir artış vardır. Bu artış dirençliliğe bağlı olarak artmaktadır. Bu değerler 2.5 saatlik ampilifikasyon süresi dahilindedir.Tablo (12).

Ortamın içerdği antibiotik	Üreme miktarı OD ₄₂₀	Üreme miktarı Gram
Normal	0.45	0.11
Ampicillin	0.77	0.19
Chloramphenicol	1.14	0.28
Cephalexin	1.26	0.31
Cefotaxim	1.92	0.47

Tablo (12) Çeşitli Ortamlarda Üretilen Bakterilerin Üreme Miktarları (mg/ml)

13) Supernatant protein miktarları incelendiğinde en fazla protein Ampicillin içeren ortamda en az ise antibiyotik içermeyen ortamda bulunmuştur. Tablo(13).

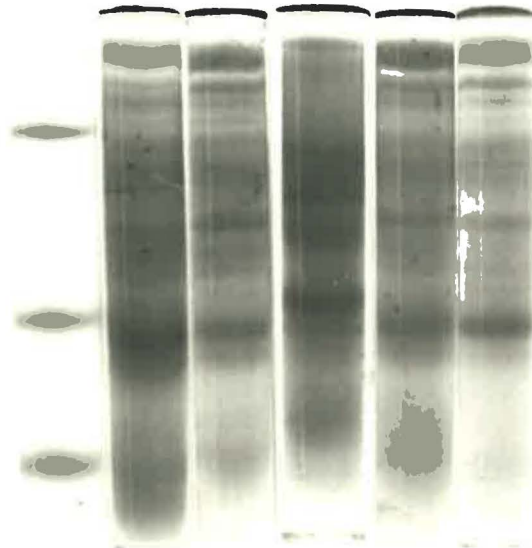
NB Ekim yapılmamış	1.27
NB Ekim yapılan	1.39
Ampicillin	2.27
Chloramphenicol	1.42
Cefotaxim	2.57
Cephalexin	2.12

Tablo (13) Çeşitli Antibiyotik İçeren ve İçermeyen Ortam Supernatantları Protein Miktarları. (mg/ml)

14) Parçalanmış bakterilerin protein miktarları incelendiğinde kontrole nazaran bir düşüş olduğu ve kontrole göre en fazla protein Chloramphenicol içeren ortamda bulundu. Tablo (14) Şekil 14 Parçalanmış bakterilerin elektroforez bantlarını göstermektedir.

Chloramphenicol'ü ortam	2.3177
Cephalexin'li ortam	1.2716
Ampicillin'li ortam	2.1626
Cefotaxim'li ortam	1.056
Normal	2,818

Tablo (14) Çeşitli Antibiyotik Ortamlarında Üretilen 0.11 gr Bakteri Lizatlarının Protein Miktarları(mg./ml)



Şekil 14 A B C D E F

A-Standart proteinler BSA (66.000 dalton)

tripsinojen (24.000 dalton) laktalbumin

(14.200 dalton)B-Kontrol bakterilerinin protein bantları

C-Cephalexin'li ortamdan elde edilen bakterilerin protein bantları

D-Chloramphenicol'lü ortamdan elde edilen bakterilerin protein bantları

E-Ampicillin'li ortamdan elde edilen bakterilerin protein bantları

F-Cefotaksim'li ortamdan elde edilen bakterilerin protein bantları

TARTIŞMA

Çermik termal kaplıcalarından izole edilen termotolerant *Bacillus subtilis* glikoz-mineral besi yerinde uygun üreme gösterdiği saptandı(41).Bu besi yerine BSA ilave edildiğinde üremenin BSA'sıza göre 2.5 kat arttığı gözlemlendi. Bakterilerin amino asit ihtiyaçlarını karşılamak için BSA'sız ortamda amino asitleri kendileri oluşturdukları, ortamda BSA varlığında proteazlar aracılığı ile amino asit sağlamanın bakteri için daha uygun olduğunu düşündürmektedir. Çeşitli araştırmalarda bakterilerin karbon kaynağı olarak öncelikle glikozdan yararlandığı, ortama protein bırakıldığında bu bakterilerin aynı süre içinde daha fazla üremesi glikoz kaynağının yanı sıra, protein kaynağının da kullanıldığı kanısını uyandırmaktadır. Bakterilerin glikozu kullanması gerekirken, üreme sonunda gerek BSA'lı gerekse BSA'sız ortamda yaklaşık aynı miktarda glikoz kullanılması glikozun ortamda belli bir konsantrasyonda bulunmasını sezindirmektedir (1,4). 55 °C gibi yüksek bir ısıda üretim sırasında BSA'sız ortamda üretilen bakterilerin ortama uyum sağlayamaması, BSA'nın yüksek ısıya karşı koruyucu bir rol oynadığı kanısını uyandırmaktadır. Bu görüş Anderson ve arkadaşları tarafından da desteklenmektedir(14). BSA'sız ortamdan elde edilen amilaz üzerine BSA ilave edilmesiyle aktivitenin çok az da olsa azalması bir inhibisyona neden olduğu ve ısıya karşı koruyucu etki gösterdiğini düşündürmektedir (14,16). Çalışmada amilazın aktivasyonu için daha önce belirlenmiş olan Cl gereksiniminden daha fazla Cl'a ihtiyaç göstermesi termotolerantlığa bağlı olduğu kanısını uyandırmaktadır(19,5). Ortama BSA ilave edildiğinde çok kısa bir sürede proteazların BSA'yı parçalaması bakterinin şiddetli bir amino asit ihtiyacı olduğunu sezindirmektedir(1).

Termotolerant *B. subtilis* antibiyogram yapılarak (46) direnç gösterdiği iki antibiyotik ve duyarlı olduğu iki antibiyotiği belirli miktarlarda içeren NB besi yerlerinde üretildiğinde üremenin dirençliliğe bağlı olarak artış göstermesi inhibisyona karşı bakterinin kuru ağırlık ve canlı hücre sayısının artırdığı kanısını uyandırmaktadır. Bu olay Kozyreva ve Plakunow tarafından desteklenmektedir (31,33). Bakterilerde üremenin artmasına karşılık beher bakteride ki protein miktarının azalması yaşam için sınırlı bir protein sentezlenebildiğini düşündürmektedir. Amplifikasyon süresinin 2.5 saat ile sınırlı olmasında bu etkilerde rol oynadığı sanılmaktadır. Chloramphenicol ve Ampicilin'li ortamlarda protein miktarının yüksek çıkması, bazı proteinlerin inhibitör varlığında daha fazla sentezlenebildiği kanısını uyandırmaktadır. Bu proteinler arasında bakterinin solunum yolunda görev alan sitokrom-A ve bazı enzimlerin bakterinin dirençliliğinde rol oynayan Chloramphenicol acetyltransferase gibi bazı proteinleri gösterilmiştir(31). Bakteride antibiyotik varlığında üretilen proteinlerin önemli bir kısmının artan plazmid sayısı ile kontrol edildiği, plazmid sayısının artması ile bazı proteinlerin sentezinin de arttığı sanılmaktadır(40). Bu nedenle protein miktarının en yüksek gözlemlendiği antibiyotikte plazmid anplifikasyonunun en iyi gerçekleştiği sanılmaktadır. Dışarı salınan proteinlerin miktarının farklı antibiyotik varlığında değişim göstermesi özellikle beta-laktam grubu antibiyotik içeren supernatantlarda artış göstermesi, ve duyarlı bulunduğu ampicillin'de en yüksek değerlerin çıkmasına beta-laktamaz (Penicilinase) enziminin neden olduğu sanılmaktadır(29). Son yıllarda beta-laktamaz etkisini inhibe etmek için ampicillin ve sulbactam kombine olarak kullanılmaktadır (39). Bakterinin direnç gösterebildiği 2 cephalosprin grubunda da yaklaşık olarak benzer sonuçların elde edilmesi dirençlilik genlerinin aynı R-Plazmid üzerinde yer aldığı kanısını uyandırmaktadır.

ÖZET

Çermik termal kaplıcalarından izole edilen termotolerant *Bacillus subtilis* glikoz-mineral besi yerinde üretilerek bir takım eksoenzimleri incelenmeye çalışılmıştır. Ortama BSA ilave edilerek bakterinin eksoenzim salgılaması ve BSA'ya karşı salgılamış olduğu proteazlar ve BSA'nın üreme üzerine olan etkileri incelenmeye çalışılmıştır.

Çalışmanın diğer bir bölümünde plazmidleri amplifiye edecek miktarda antibiyotik muamelesine tabi bırakılan *B. subtilis*'in proteinleri ve ortama saldıkları proteinleri incelenmeye çalışılmıştır.

KAYNAKLAR

1. T.K.Sundaram: Physiology and Growth of thermophilic bacteria.In T.D.Brock Thermophiles.New York 1986.
2. M.Öner:Mikrobia Ekoloji,Ege Üniversitesi Basımevi Bornova Izmir 1987.
3. T.D.Brock: Thermophiles,General Molecular and applied Microbiology New York 1986.
4. C.Edwards: Microbiology of extreme environments. Chapter 1 Thermophiles New York 1988
5. M.C.Linden,J.Amurdock,R.Amelunxen: The ionic Bonds of Thermostable proteins .Biochim.et Biophys.acta 871:207-216 1986.
6. F.C. Wedler and F.M. Hoffman: Glutamate dehydrogenase of *B. sterothermophilus*. Biochem. 13: 3225 1974.
7. L.E. Smith, R.L. Hill, I.R. Lehman, R.J. Lefkowitz, P. Handler, A. White: Principles of Biochemistry General Aspects. 7. Edition London 1987.
8. O. Yumiko, O. Yasuyuki, W. Akiyoshi: Thermostable Protease from Thermophilic Bacteria. J. Biol. Chem. 241: 5919-5925 1966.
9. T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook: Molecular cloning a laboratory Manuel. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982.

10. P.L. Carpenter: Microbiology. Four Edition W.B. Saunder Company London 1977.
11. L.L. Campbell and G.B. Manning: Thermostable α -Amylase of *B. sterothermophilus*. J. Biol. Chem. 236: 2962-2965 1961.
12. R. Amelunxen and M. Lins: Comparative thermostability of enzymes from *B. sterothermophilus* and *B. cereus* Arch. Biochem. Biophys. 125: 765-769 1968.
13. E.M. Gözükar: Biyokimya Ders Kitabı. Meteksan Basımevi Ankara 1989.
14. J.E. Anderson, D.M. Adams and W.M. Walter Jr.: Conditions Under Which Bacterial amylases survive ultrahigh temperatura sterilization. J. Food Sci. 48: 1622-1626 1983.
15. N.G. Thomas and W.R. Keneraly: Industrial applications of thermostable enzymes. In Brocks Thermophiles New York 1986.
16. W. Heinen and A.M. Lauwers: Amylase activity and stability at high and low temperatures depending on calcium and other divalent cations. In "Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms". Stuttgart 1975.
17. A.R. Deschreider: Study of proteolytic and amylolytic enzymes for detergents by means of electrophoresis on polyacrylamide gel. Fette selen Anstrichm 74(1): 33-35 1972.

18. M.V. Ramesh : Factors affecting recovery of thermostable α -Amylase from bacterial bran produced under state fermentation. Chem. Microbiol. Technol. Lebensm 11 (5) : 155-159 1988.
19. A.V. Akman Fermentasyon teknolojisinde özel bahisler Ankara Üniversitesi Basımevi Ankara 1958.
20. D.M. Adams: The role of heat resistant bacterial enzymes in UHT processing. In "Proceedings of international conference" on UHT Processing and Aseptic Packaging of milk and milk products. North Carolina State Univ. Raleigh N.C. 1979.
21. J.W. Mc Conn, D. Tsuru and K.T. Yasunobu: Bacillus subtilis neutral protei-nase. I. A. zinc-enzyme of high specific activity. J. Biol. Chem. 239: 3706 1964.
22. J. Feder: Studies on the specificity of B. subtilis neutral protease with synthetic substrates. Biochem. 6:2088. 1967.
23. A.V. Guntelberg and M. Ottesen Purification of the proteolytic enzyme from B. subtilis. C.r. Trav. lab. Carlsberg 29: 36 1967.
24. H.J. Hunt, M. Ottesen: A Comparison of three proteinase from various strain of B. subtilis. Biochim. biophys. Acta 48: 411 1961.
25. H. Tuppy: Über die enzymatische spezifität der Bakteriellen Proteinase, die Ovalbumin in Plakalbumin verwandelt Monatsh. Biochem. 84: 996 1953.

26. J. Millet Characterization of proteinases Excreted by *B. subtilis* Marburg strain during sporulation. *J. app. Bact.* 33: 207-219 1970.
27. N. Minomiura, Y. Matsumura, J. Fukomoto and T. Yamamoto: Bitter peptides in cow milk casein digests with, bacterial proteinase. *Agric. Biol. Chem.* 36(4): 588-595 1972.
28. J. Millet: Etude de la megateriopeptidase, protease exocellulairi de *B. megaterim*. I. Purification et proprietes generales. *Bull. Soc. chim. Biol.* 51: 61 1969.
29. Tetsuo sawai and Akihito Yamaguchi: Mechanism of Beta-Lactamase Inhibition: Differences Between Sulbactam and Other Inhibitors. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 12: 121-129 1989.
30. E. Bermek, H. Matthaei: Human protein synthesis V. The effect of antibiotics on an optimized polyphenylalanine synthesing cell-free system from human lymphatic tissue, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 351- 377 1970.
31. V.K. Plakunov and L.F. Kozyreva: Different sensitivity of the synthesis of bacterial proteins in-vivo to antibiotics. *Mikrobiologiya* 40(6): 981-987 1971.
32. D.H. Williamson: Induction of the cytoplasmic peptide mutation in *Saccoromyces cerevisia* by the antibacterial antibiotics erytromycin and chloramphenicol. *Mol. Gen. Genet. (MGG)* 111(3): 209-223 1971.
33. L.F. Kozyreva and V.K. plakunov: The reasons for Residual growth *Staphylo*

coccus aureus 209 in the presence of bacteriostatic concentrations of antibiotics-inhibitors of protein synthesis Mikrobiologiya 40(2) 311-316 1971.

34. E.Bermek: İnsan ribozomlarında polipeptit zincirlerinin hücreden arınmış sistemlerde biosentezindeki bazı özellikler. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 36 Supplementum 58: 34 1973.

35. R.P. Novick, R.C. Clowes, S.N. Cohen, R. Curtiss, N. Datta and S. Falkow: Uniform nomenclature for bacterial plasmids:a proposal. Bacteriol. Rev. 40: 168 1976.

36. D.B. Clewell: Nature of Col E. plasmid replication in Escherichia coli in the presence of chloramphenicol. J. Bacteriol. 110: 667 1972.

37. D.B. Clewell and D.R. Helinski: Effect of growth conditions on the formation of the relaxation complex of supercoiled Col E. deoxiribonucleic acid and protein in E.coli. J. Bacteriol. 110: 1135 1972.

38. C.C. Royston: Molecular Structure Of Bacterial Plasmids. Bacteriol. Rev. 36: 361-405 1972.

39. D. Jabes, S. Nachman, A. Tomazs: Penicillin-Binding protein families: Evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolated of pneumococci. J. Infect Dis. 159: 16 1989.

40. M. Young: Gene amplification in Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol. 130: 1613-1621 1984.

41. P. Sidney, O.N. Kaplan: Methods in Enzymology Experimental Methods for *B.subtilis*. Volume XVII Part A 1970.
42. K. Weber, M. Osborn: The reliability of molecular weight determinations by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412. 1969.
43. B.J.Davis, C.Kodak, N.Y.Rochester: Preprint "Disc electrophoresis" Distillation. Prod. Div. Eastman Acad. N.Y. 1962.
44. H.Fuwa: a new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J. Biochem.* 41:583 1954.
45. H. Lineweaver, D.Burk: The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 658-666 1934.
46. T.C. Koby, D.H. Randal: Fundamental Experimental microbiology. W.B. Saunders company London 1974.
47. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L.Farr, R.J.Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 239: 3706 1951.
48. O. Warburg, W.Christian: Isolierung und Kristallisation des Garuns ferments Enolase. *Biochem. Zeitschr.* 310: 384 1941.
49. T. Oshima and K. Imohori: Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida, Oshima) non sporulating thermophilic bacterium from a Japanese Thermal spa. *International J.Systematic bacteriol.* 24: 102-112 1974.