

T. C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
KİMYA BÖLÜMÜ

CELLULOMONAS CELLULASEA'DE ÇEŞİTLİ FİZYOLOJİK FAKTÖRLERİN KARBOKSİMETİLSELÜLAZ SENTEZİNE ETKİSİ

THE EFFECT OF VARIOUS PHYSIOLOGICAL FACTORS ON CARBOXYMETHYL CELLULOSE SYNTHETASE OF CELLULOMONAS CELLULASEA

Dehen SÜR *

SUMMARY

The effect of some physiological factors as the yeast extract concentration, the shaking speed, the medium pH, the culture temperature, on the carboxymethylcellulase (CMC'ase) synthesis and the growth rate was investigated. It was established an inverse relationship between the growth rate of the bacterium and the enzyme synthesis.

ÖZET

Maya özütü derişimi, çalkalama hızı, ortam pH'ı, kültürasyon sıcaklığı gibi fizyolojik faktörlerin Cellulomonas celleulasea'de karboksimetilselülaaz (CMC'az) sentezi ve üreme hızı üzerine etkileri incelendi. Bakterinin üreme hızı ile karboksimetilselülaaz (CMC'az) sentezi arasında ters konumlu bir ilişki saptandı.

GİRİŞ

Selülozun parçalanma ürünleri (glüköz, selobioz, selotrioz) kolayca sıvı yakıtı dönüşebilirlikleri ve çeşitli fermantasyonlarda kullanılabilirlikleri açısından araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Selülozun mikroorganizmal kaynaklı enzimlerle parçalanması son derece ekonomik olacaktır. Bu nedenle söz konusu enzimleri en yüksek düzeyde üreten mikroorganizmalar ve bu enzimlerin sentez ve kontrol mekanizmalarının araştırılmasına dayanan bir çok çalışma yapılmaktadır. Daha önce çeşitli karbon kaynakları-

* M. Ü. Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Nişantaşı/İSTANBUL.

nın CMC'az sentezi üzerindeki etkisinin incelendiği Cellulomonas cellulasea'de (1) bu kez fizyolojik faktörlerin aynı enzimin sentezine etkisi araştırıldı.

MATERYEL VE METOD

Kullanılan mikroorganizma

Quartermaster Research and Development Center U.S. Army, Natick, Mass Culture Collection'dan elde edilen Cellulomonas cellulasea QMB 526 bakteri suşu kullanıldı. 10 ml nutrient agar (Difco) içeren yatık katı besiyerinde üretilen bakteri stokları çalışmalarında kullanılmak üzere + 4° C'de saklandı.

Bakterilerin stoktan üretimi

Temel besiyeri olarak Stewart ve Leatherwood (2) tarafından önerilen mineral tuz - maya özütü besiyeri ve bu besiyerin de karbon kaynağı olarak % 0,5 karboksimetilselüloz kullanıldı. Fosfat tuzlarının çökmesini engellemek için K_2HPO_4 çözeltisi milipordan (0,45 mikron çaplı) süzülerek sterilize edildikten sonra otoklavdan çıkan besiyerlerine eklendi. Bakteri süspansiyonları stok kültürlerine 10 ml serum fizyolojik eklenerek hazırlandı. Ekim, 1 ml bakteri süspansiyonu 100 ml besiyeri oranında gerçekleştirildi. Besiyerinin maya özütü derişimi, pH'ı, üretim sıcaklığı, döngüsel çalkalama hızı (Pscyotherm Incubator Shaker New Brunswick Co.) çalışmaların özelliğine göre farklı olarak kullanıldı. 100 ml besiyeri 250 ml'lik Erlenmayer şişelerinde yer aldı.

Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Çalkalamalı şişe üretiminden sonra hücreler kültür ortamından, soğutmalı santrifüjde 7000 X g'de, 0°C'de, 13 dakika santrifüj edilerek (IEV-PR-6 santrifüjü) uzaklaştırıldı. CMC'az aktivitesi süpernatant kısmında incelendi. Selüloz aktivitesi β -1,4 glokonaz yani C_x aktivitesinin ölçülmesiyle gerçekleştirildi. C_x aktivitesinin ölçülmesinde reaksiyon ortamlarında substrat olarak suda çözünür selüloz bileşiği karboksimetilselüloz (CMC) kullanıldığından, C_x aktivitesi özel olarak CMC'az aktivitesi olarak belirtildi. CMC'az aktivitesinin ölçülmesinde Nisizawa ve ark.'nın (3) kullandıkları yöntemden yararlanıldı. İnkübasyon sonunda reaksiyon tüplerinde CMC'az aktivitesine bağlı olarak oluşan indirgen şeker miktarı, dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemiyle ölçüle-

rek (4) bulundu. 1 Ünite CMC'az aktivitesi, deney koşullarında, 1 saatte, 1 mgr indirgen şeker (glukoz) oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı. Diferansiyel sentez hızı,

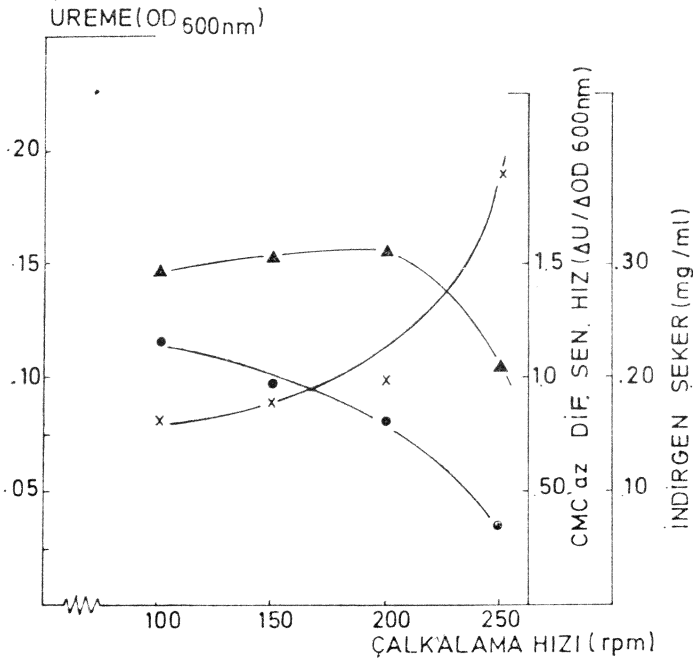
$$\frac{\text{Enzim aktivitesi (U/ml)}}{\text{Üreme (OD)}}$$

şeklinde hesaplandı.

Üreme, diferansiyel sentez hızı ve indirgen şeker değerleri, kültürasyonun 48'inci saatinde incelendi.

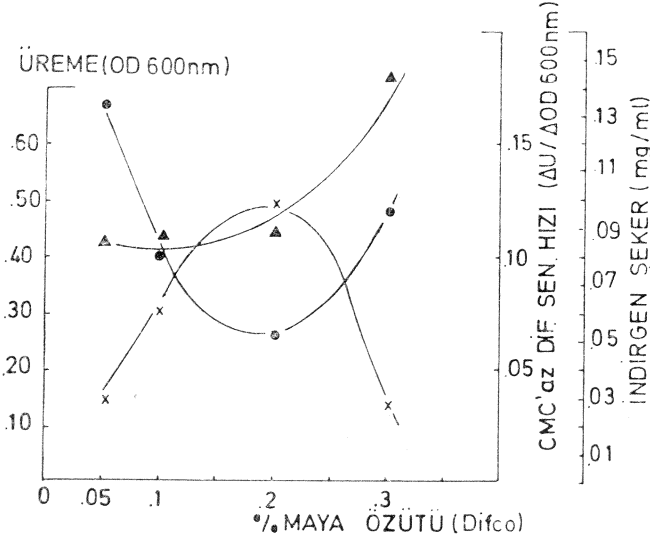
Bulgular

Çalkalama hızının, üreme, CMC'az diferansiyel sentez hızı üzerine etkisinin incelendiği kültürasyonlarda, çalkalama hızının hücrel üremeye doğru orantılı ilişkisi gözlemlendi, ayrıca CMC'az sentez hızıyla üreme arasında ters orantılı ilişki saptandı. Kültürdeki üremenin en yüksek düzeye ulaştığı 250 rpm'de CMC'az diferansiyel sentez hızının en alt düzeye düştüğü, üremenin en düşük olduğu 100 rpm'de ise CMC'az diferansiyel sentez hızının en yüksek düzeyde olduğu görüldü (Şek. 1).



Şekil 1 — Farklı Çalkalama Hızlarında CMC'az Diferansiyel Sentez Hızı (●-●), Üreme (X-X) ve İndirgen Şeker (▲-▲), (maya özütü % 0.05, pH 7, sıcaklık 30°)

Kültür ortamlarında üreme aktivatörü olarak kullanılan maya özütünün farklı derişimlerini içeren ortamlarda yapılan kültürasyonlarda CMC'az diferansiyel sentez hızı ile üreme arasında ters konumlu ilişki saptandı (Şek. 2).

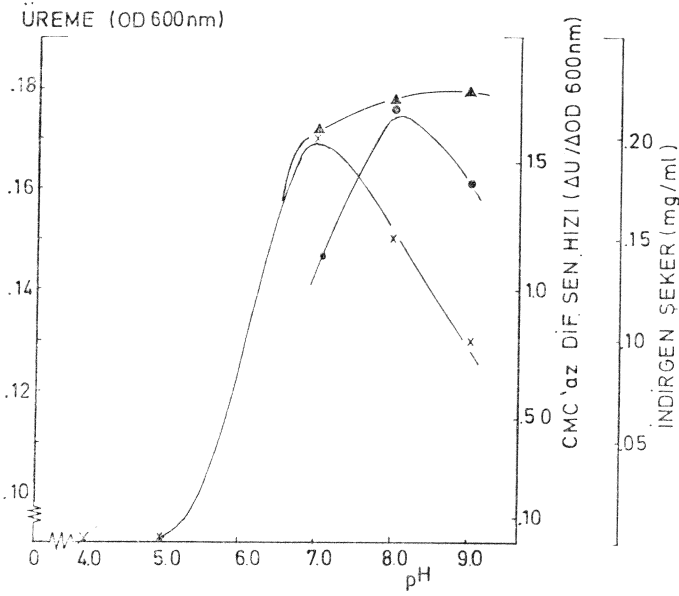


Şekil 2 — Farklı Derişimlerde Maya Özütü İçeren Ortamlarda CMC'az Diferansiyel Sentez Hızı (●-●), Üreme (X-X) ve İndirgen Şeker (▲-▲). (Çalkalama hızı 150 rpm, pH 7, sıcaklık 30°)

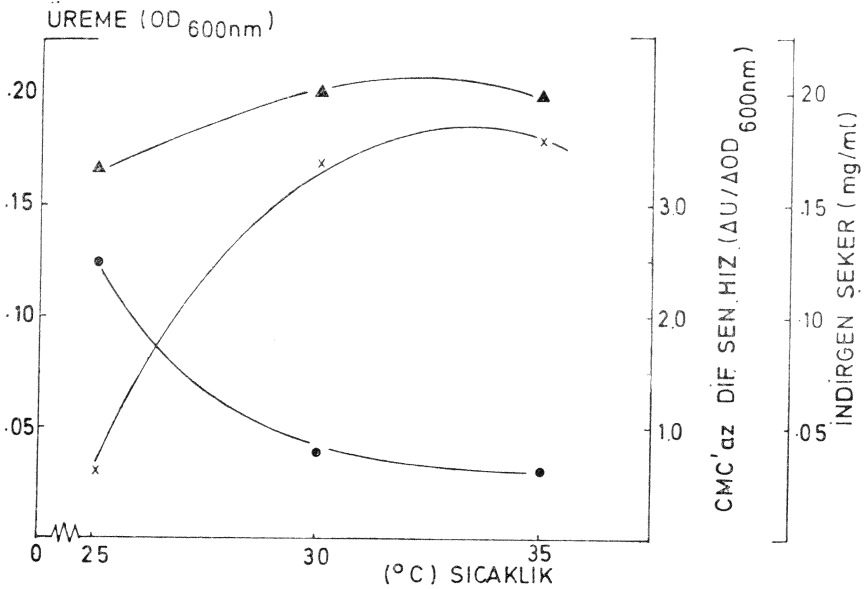
Kültürasyondaki başlangıç pH'larının üreme, diferansiyel sentez hızı üzerindeki etkileri incelendiğinde pH 4 ve pH 5'de üreme görülmedi. Diferansiyel sentez hızının pH 8'de en yüksek değere ulaşmasına karşın üremenin pH 7'de en yüksek değere ulaştığı, pH 9'da üremenin ve enzim sentezinin düştüğü görüldü (Şek. 3).

Çeşitli kültürasyonu sıcaklıklarının üreme ve CMC'az diferansiyel sentez hızı üzerine etkisi araştırıldığında diğer deneylerdeki ters konumlu ilişki saptandı (Şek. 4).

Deneylerde üremenin ortamdaki indirgen şeker miktarına paralel artış gösterdiği (Şek. 1., 2., 3., 4) ancak maya özütü ile ilgili deneyde 0,3 konsantrasyondan sonra (Şek. 2) pH ile ilgili deneyde ise pH 7'den sonra (Şek. 3) indirgen şekerin artmasına karşın üremenin düştüğü gözlemlendi.



Şekil 3 — Farklı Üreme Ortamı pH'larında CMC'az Diferansiyel Sentez Hızı (•-•), Üreme (X-X) ve İndirgen Şeker (▲-▲). (maya özütü % 0.05, çalkalama hızı 150 rpm, sıcaklık 30°)



Şekil 4 — Farklı Kültürasyon Sıcaklıklarının Üreme (X-X), CMC'az Diferansiyel Sentez (•-•) ve İndirgen Şeker (▲-▲). Üzerinde Etkisi. (maya özütü % 0.05, pH 7, çalkalama hızı 150 rpm)

TARTIŞMA VE SONUÇ

C. flavigena ile yapılan bir çalışmada, çalkalama hızı arttıkça üremenin de arttığı bildirilmektedir (5). Nitekim C. cellulasea ile yapılan bu çalışmada da aynı olgu gözlenmiştir. C. flavigena ile yapılan çalışmada (5) ve daha önce karbon kaynaklarının etkisinin incelendiği C. cellulasea ile yapılan çalışmada (1) da saptanan, CMC'az hızıyla üreme arasındaki ters konumlu ilişki bu çalışmada da saptanmıştır (Şek. 1).

Metabolik aktiviteler üzerinde etkili olan maya özütünün kültür ortamındaki farklı derişimleri incelendiğinde, % 0,2'lik maya özütü derişiminin kültürün üremesindeki artış için maksimum derişim değeri olduğu saptanırken, % 0,3'lük derişimin üreme hızında düşmeye neden olduğu, buna koşut olarak da CMC'az sentez hızında artma olduğu gözlenmiştir (Şek. 2). C. flavigena ile yapılan çalışmada da % 0,15 maya özütü derişiminin kültürün üremesindeki maksimum derişim değeri olduğu ve daha yüksek maya özütü derişimlerinde CMC'az sentez hızındaki düşmede bir yavaşlama olduğu belirtilmektedir (5).

Kültür ortamlarının başlangıç pH'larının üreme ve CMC'az sentezi üzerindeki etkisi incelendiğinde düşük pH değerlerinin (pH 4 ve 5) ortamın fazla asidik olması nedeniyle üremeyi ve enzim sentezini olumsuz yönde etkilediği ve bu pH'larda üreme olmadığı görülmüştür. Kültürün maksimum düzeyde üreyebilmesi için gerekli pH değerlerinin 7 civarındaki bir değer olduğu gözlenmiştir (Şek. 3). Nitekim C. flavigena ile yapılan bir çalışmada da bu değer pH 7,3 ile pH 7,5 arasında olduğu bildirilmiştir (6). Üremenin yüksek olduğu pH 7'de CMC'az sentez hızının düşük olduğu ve üremenin düşmeye başladığı pH 8'de CMC'az sentezinin en yüksek seviyeye geldiği görülmüştür (Şek. 3). Nitekim C. flavigena ile yapılan çalışmada da (6) üremenin düştüğü pH 8'de CMC'az sentez hızını gösterir eğrinin bir tepe oluşturduğu belirtilmekte ve pH 9'da üremedeki düşüşle birlikte CMC'az sentez hızında da düşme görüldüğü açıklanmaktadır. Bu çalışmada da pH 9'da üremenin düşmeye devam ettiği ve CMC'az sentezinin de düştüğü görülmüştür (Şek. 3). Bu olgu yüksek alkali ortamın enzimi denatüre ettiği şeklinde yorumlanmıştır.

Üreme ve enzim sentezi üzerindeki farklı kültürasyon sıcaklıklarının denendiği çalışmada da üreme ve CMC'az sentezi arasındaki ters konumlu ilişki açısından (Şek. 4) diğer deneyleri ve diğer çalışmaları (1, 5, 6) doğrulamıştır.

Metabolik aktiviteler üzerinde etkili olan fizyolojik etkenlerin incelendiği deneylerde görülen CMC'az sentez hızıyla üreme arasındaki ters konumlu ilişki daha önce çeşitli karbon kaynaklarıyla yapılan çalışmayı (1) destekler mahiyettedir ve bu ilişki çeşitli çalışmalarda (7, 8) belirtilen indüktör-baskılayıcı mekanizmayla açıklanmıştır. Metabolik faaliyetleri yavaşlatıcı koşullar söz konusu olduğunda ortamda CMC yavaş metabolize olmakta ve indüktör bir etki göstermektedir. Metabolik faaliyetleri artırıcı koşullar söz konusu olduğunda ise katabolitler baskılayıcı etki gösterecek düzeye ulaşmaktadır.

Üremenin indirgen şekere paralel artış göstermesi (Şek. 1, 2, 3, 4) ortamdaki şekerin besin kaynağı olarak üremeyi artırıcı etkisiyle açıklanırken, maya özütü ile ilgili deneyde 0,3 konsantrasyondan sonra (Şek. 2), pH'la ilgili deneyde ise pH 7'den sonra indirgen şekerin artmasına karşın üremenin düşmesi (Şek. 3), yüksek miktarda üreme sonucu ortamda üremeyi engelleyen metabolitlerin birikmesine bağlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Sür, D., Kolankaya, N. : *Doğa, Seri A₂*, (8), Sayı 1 76 (1984).
2. Steward, J.B., Leatherwood, J.M. : *J. Bacteriol.*, 128, 609 (1976).
3. Nisizawa, T., Suzuki, K., Nakayama, M. ve ark. : *J. Biochem.*, 70, 375 (1971).
4. Miller, G.L. : *Anal. Chem.*, 31, 426 (1959).
5. Kolankaya, N. : *Nat. Sci. and Eng.*, 9, 1 (1980).
6. Kolankaya, N. : *Cellulomonas Flavigenada Sellülotik Aktivitenin Düzenlenmesi Üzerine Araştırmalar*, Doçentlik tezi, 1979.
7. Horton, J. C., Keen, TN : *Can. J. of Microbiol.*, 12, 209 (1965).
8. Bull, A.T. : *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 22, 261 (1972).

(Received, January 15, 1987)

T. C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
KİMYA BİLİM DALI