

65593

T. C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus subtilis*'te Üreme, Plazmid ve α -Amilaz
Sekresyonu Üzerine Kalsiyum Kanal
Blokörlerinin ve Ağır Metallerin Etkisi**

Fikret UYAR

DOKTORA TEZİ
(BİYOLOJİ ANABİLİM DALI)

Diyarbakır, 1997

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE
DİYARBAKIR

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalı' nda DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Jüri Üyesinin Ünvanı</u>	<u>Adı - Soyadı</u>
BAŞKAN :	Doç.Dr	Seralp ŞENER
ÜYE :	Doç.Dr.	N. Yavuz ENSARİ
ÜYE :	Yrd.Doç.Dr.	Birol OTLUDİL

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

20.10.1997

Prof.Dr. Davut BAŞARAN
Enstitü Müdürü ▼.

İçindekiler

TEŞEKKÜR.....	III
AMAÇ.....	IV
ÖZET.....	V
SUMMARY	VI
1. GİRİŞ	1
1.1 Bakteriyel Ekzoenzimler	1
1.2 Bakteriyel α -amilaz ve Nötral Proteaz	2
1.3 Nişasta	4
1.4 α -Amilazın Etki Mekanizması.....	6
1.5 α -Amilazın Membranda Sentezi.....	7
1.6 <i>Bacillus subtilis</i>	8
1.7 Bakterilerde Hücre Duvarı.....	8
1.7.1 Antibiyotikler	9
1.7.2 Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotikler.....	10
1.8 Bakteriyel Plazmitler	11
1.9 Kalsiyum Kanal Blokörleri (Kalsiyum Antagonistleri).....	13
1.9.1 Voltaja Bağımlı Kalsiyum Kanalları	15
1.9.2 L Tipi Kanalların Moleküler Yapısı	15
1.9.3 Reseptöre Bağımlı Kalsiyum Kanalları.....	15
1.10 Önceki Çalışmalar	16
2. MATERYAL VE METOD	20
2.1 Biyolojik Materyal.....	20
2.2 Kimyasal Maddeler.....	20
2.3 Cihazlar	20
2.4 Besi Yerleri	21
2.4.1 Katı Besi Yeri.....	21
2.4.2 Nutrient Broth (NB) Besi Yeri	21
2.4.3 Çözünür Nişasta-Pepton Broth Ön İnkübasyon Besi Yeri.....	21
2.4.4 Çözünür Nişasta Beef Extract (SB) Besi Yeri	22
2.5 Diyaliz Hortumunun Hazırlanması.....	22
2.6 Plazmit İzolasyonu	22
2.6.1 Kullanılan Çözeltiler.....	22
2.6.2 İzolasyon İşlemi.....	23

2.6.3 Elde Edilen Plazmitlerin Agaroz Jele Verilmesi.....	23
2.6.4 Absorbsiyon Spektroskopisi Yöntemi İle Nükleik Asit Miktarının Tespiti.....	23
2.7 Proteaz Aktivite Tayini.....	24
2.8 Amilaz Aktivite Tayini.....	24
2.9 Bakteri Üretimi.....	24
2.9.1 SB Sıvı Besi Yerinde Kalsiyum Kanal Blokörlerinin Bakteri ile Etkileştirilmesi.....	25
2.9.2 SB Sıvı Besi Yerine Ağır Metal ve Diltiazem'in Bakteri ile Etkileştirilmesi.....	25
2.9.3 Kültürden Bakteri İzolasyonu.....	26
2.10-Amilazın Üretim Zamanının Saptanması.....	26
2.10.1 Antibiyotik Uygulaması.....	26
2.10.2 Membran Çalışması.....	26
2.11 Amino Asit Uygulaması.....	27
2.12 Kalsiyum Kanal Blokörlerinin α -Amilaz İle Etkileştirilmesi.....	28
2.13-Amilaz Saflaştırılması.....	28
2.13.1 DE-32 Kolonunun Hazırlanması.....	29
2.14 Elektroforez işlemi.....	29
2.15 Protein miktar tayini.....	32
3. BULGULAR.....	33
3.1 CaCl_2 Oranlarının NB ve SB Sıvı Besi Yerlerinde α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	33
3.2 SB ve NB Sıvı Besi Yerlerinde pH'nın α -Amilaz Sekresyonu Üzerine Etkisi.....	34
3.3 Kalsiyum Kanal Blokörlerinin Bakteri Üremesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.....	34
3.3.1 Kalsiyum Kanal Blokörlerinin α -Amilaz Sekresyonu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.....	35
3.4 Ticari α -Amilazın CaCl_2 ile Optimizasyonu.....	36
3.4.1 Lacipil ve Diltiazemin α -Amilaz Üzerine In-Vitro Etkisi.....	37
3.5 Kalsiyum Kanal Blokörleri ile Etkileştirilen Bakterilerden Elde Edilen Üst Sıvıların CaCl_2 ile Etkileştirilmeleri.....	38
3.6 In-Vitro Koşullarda Lacipil ve Diltiazeme Artan Oranlarda CaCl_2 Kullanılması.....	39
3.7 SB Besi Yerinde Ağır Metallerin α -Amilaz ve Plazmit Üzerine Etkiler.....	40
3.8-Amilazın Üretim Zamanının Saptanması.....	47
3.9 Nötral Proteaz Aktivitesi Üzerine pH Etkisi.....	49
4. SONUÇLARIN TARTIŞILMASI.....	51
5. KAYNAKLAR.....	58

Teşekkür

Bana bu araştırma konusunu veren, çalışmalarım sırasında desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, sağladığı olanaklar ve yakın ilgilerinden dolayı hocam Doç.Dr. N. Yavuz ENSARİ'ye sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İstatistiki verilerin değerlendirilmesinde yardımlarını gördüğüm Doç.Dr.Hasan AKBAYIN'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Bilgisayarını kullanmam inceliğini gösteren Arş.Gör. Süleyman KIZIL ve bilgisayar dizgisini gerçekleştiren Elektronik Mühendisi Ömer TURSUN'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Kullandığım Biyolojik materyali İngiltere'den gönderen Arş.Gör. Göksel KIZIL'a, tez hazırlama sırasında büyük yardımlarını gördüğüm Yrd.Doç.Dr. Murat BİRİCİK, aynı laboratuvarı paylaştığımız Arş.Gör.Dr. Sema AGÜLOĞLU, Arş.Gör. Ebru İNCE, Arş.Gör. Veysel TOLAN ve bu tezde emeği geçmiş olan D.Ü.Fen-Edebiyat Fakültesi elemanlarına içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca, bu çalışmanın bir bölümünü oluşturan "*B. subtilis* α -Amilazının Üretim Zamanının Saptanması" konulu araştırma projesini (DÜAP-96-FF-322) finansman açısından destekleyen Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılan Kalsiyum Kanal Blokörlerinden Diltiazem'i sağlayan MUSTAFA NEVZAT İlaç Sanayiine içten teşekkürlerimi sunarım.

Amaç

Son yıllarda Biyoteknoloji biliminin gelişmesi ile çeşitli enzim ve proteinlerin üretiminde mikroorganizmalara yönelinmiştir. Bu yolla gelişmiş birçok ülke ekonomilerine büyük katkılar sağlamaktadır.

Çalışma materyali olarak seçtiğimiz *Bacillus subtilis* gerek kolay üretilmesi, gerekse birçok enzim salgılaması nedeni ile uygun bir materyal olarak tespit edilmiştir.

Öncelikle *B. subtilis*'in en iyi ürettiği ve α -amilaz sekresyonunun maksimum olduğu ortam ve koşullar saptanmaya çalışılmıştır. Bu saptamalardan sonra kalsiyum kanal blokörlerinin, *B. subtilis*'in üremesi, α -amilaz sekresyonu, *B. subtilis* plazmiti üzerine etkisi ve in vitro olarak blokörlerin α -amilaz üzerine etkisi araştırıldı. Çalışılan besi yerinde ağır metal optimizasyonundan sonra ağır metallerin tek ve blokörler ile birlikte *B. subtilis*'te α -amilaz sekresyonuna ve *B. subtilis* plazmiti üzerine olan etkisi araştırıldı.

Ayrıca enzimin oluşum sürecinde, belirlenen zaman diliminde Chloramphenicol uygulaması ile membran ve salgılanmış enzim üzerine etkisi saptanmaya çalışıldı.

İn vitro olarak nötral proteaz ile yapılan çalışmada, bu enzimin kofaktörü olan Zn^{+2} , farklı pH'lar denenerek enzimden ayırmaya çalışılarak miktar tayini yapılmaya çalışılmıştır. Zn^{+2} 'nin enzime kuvvetli bağlılığından dolayı ayrılıp ayrılmayacağı araştırıldı.

Özet

Bu çalışmada Nottingham Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü'nden ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilen *B. subtilis* kullanıldı.

Bakterilerin Nutrient Broth (NB) ve Starch Beef (SB) ortamında daha iyi üreme gösterdiği saptanarak, bu besi ortamlarında α -amilaz sekresyonunun hangi sürede maksimuma ulaştığı aktivite tayin yöntemi ile tespit edilip elektroforez ile teyit edildi.

Bakteri, SB sıvı besi yerinde çeşitli kalsiyum kanal blokörleri ile kontrol eşliğinde etkileştirilerek, bu blokörlerin, üreme, α -amilaz üretimi ve bakteri plazmitleri üzerine etkileri araştırıldı. Blokörlerin üreme ve α -amilaz sekresyonunu inhibe ettiği saptandı. Kalsiyum kanal blokörlerinin α -amilaz enzimi üzerine in vitro etkisinin olmadığı gözlemlendi.

Bakteri, SB sıvı besi yerinde ağır metaller ile beraber kalsiyum kanal blokörü olan Diltiazem ile kontrol eşliğinde etkileştirilerek, üreme, α -amilaz üretimi ve bakteri plazmitleri üzerine etkileri araştırıldı. HgCl_2 'nin üreme ve α -amilaz sekresyonunu inhibe ettiği saptandı. ZnCl_2 'nin üreme ve amilaz sekresyonu üzerinde etkili olmadığı, Diltiazem'in yalnız başına plazmit üzerine bir etkisinin olmadığı, ancak her iki ağır metalin Diltiazem eşliğinde plazmit amplifikasyonuna neden olduğu saptandı.

NB sıvı besi yerinde bakteri üretiminin belirlenen zaman diliminde ortama ilave edilen Chloramphenicol ile protein sentezi durdurularak, membrandaki ve salgılanmış enzim aktivitelerine göre α -amilazın sentez ve olgun hale geliş süreleri belirlendi. İnhibisyonun tamamlanıp ribozom üzerinden membrandan çıkış süresi 70-80 dakika olarak tespit edildi.

pH etkisine maruz bırakılan nötral proteaz enziminin, aktivitesinde meydana gelen değişiklikler belirlendi. Enzimin maksimum aktiviteyi pH 7'de gösterdiği ve dializ ile prostetik grubu olan Zn^{+2} 'nin enzimden ayrılmadığı saptandı. Optimal dışındaki pH'larda enzimin üç boyutlu yapısının pH'ya bağımlı bozulması ile aktivitesini kaybettiği saptandı.

Summary

In this study, *B. subtilis* was used, obtained from Nottingham University, Medical School in Microbiology Department and Ankara University, Agriculture Faculty, Food Engineering Department.

It has been established that Nutrient Broth (NB) and Starch Beef (SB) are more convenient media in terms of the growth of the bacteria. The maximum activity time for α -amylase secretion was determined by the activity determination method. These results were confirmed by electrophoresis.

Bacteria was interacted with various calcium canal blockers in the SB liquid medium. The effects of blockers on the bacterial growth, α -amylase production and bacterial plasmids were investigated. It has been established that bacterial growth and α -amylase secretion were inhibited by blockers. Calcium canal blockers had no effect on the α -amylase in *in vitro*.

Bacteria was interacted with Diltiazem, a calcium canal blocker, along control experiment in the SB liquid medium in the presence of heavy metals, and their effects on bacterial growth, α -amylase production and bacterial plasmids were investigated. Bacterial growth and α -amylase secretion were inhibited by HgCl_2 , but not by ZnCl_2 . Diltiazem alone did not show any effect on the plasmid, however, both heavy metals caused plasmid amplification in the presence of Diltiazem.

The protein synthesis was blocked by adding Chloramphenicol in the NB liquid medium at a certain period of the bacterial growth. The durations of α -amylase synthesis and of its maturation in terms of the enzyme activity on membrane and of the secreted enzyme activity were determined. The time for the excretion through membrane along ribosome following completed inhibition was measured as a 70-80 minutes.

The effect of pH on the neutral protease activity was determined. The enzyme showed maximum activity at pH 7. It was observed that Zn^{2+} , its prosthetic group, was not removed during dialysis. The enzyme loses its activity because of the degeneration of its three dimensional structure at pH's deviated from optimal range.

1. GİRİŞ

1.1 Bakteriyel Ekzoenzimler

Birçok bakteri üredikleri ortamdaki besin maddelerinden faydalanmak için üredikleri besi yerine ekzoenzim veya ekstraselüler enzim denilen enzimler salgırlar. Çoğunluğunu hidrolaz ve proteazların oluşturduğu bu enzimlerin temel fonksiyonlarından biri mikroorganizmaya kullanılabilir besin sağlamaktır. Diğer bir fonksiyonu ise enfeksiyon esnasında saldırgan mekanizma olarak iş görmektir.

Ekstraselüler enzimler olarak da bilinen ekzoenzimler hücreden tamamen bağımsızdırlar. Bu enzimler ile hücre duvarı veya membrana bağlı enzimler arasında bir sınır vardır.

Ekzoenzimler, ekstraselüler ve stoplazmik moleküller olarak bir arada sentez edilemezler. Stoplazma içinde ekzoenzimlerin farklı zamanlarda oluştuğunu ileri süren üç yol bulunmaktadır. Birincisi, *Bacillus amyloliquefaciens*'te α -amilaz ve proteazların intrasellüler düzeyi hemen hemen ihmal edilecek kadar azdır. İkincisi *B. amyloliquefaciens*'in stoplazmasında bir ekstraselüler ribonükleaz (RNAaz) inhibitörü olarak bulunurlar. Enzim-inhibitör kompleksinin oluşumu tersinmez olduğundan dolayı hücre içinde doğal enzimin bulunması olasılığı azdır. Üçüncüsü ekzoenzimlerin sentezi ile bunların sekresyonu arasında kapalı bir bağlanma vardır.

Ekstraselüler enzimlerin sentezi sporlaşmadan önce geç üssel ve erken durağan fazda maksimuma ulaşır. Bu durumu ekzoenzim sentezi ve sporlaşma arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarır. Bununla birlikte üssel fazdan, durağan faza geçişte büyüme, ortamdaki karbon kaynağının azalması ile gerçekleşir (1).

Son yıllarda bakterilerin ekzoenzimleri üzerinde çalışmalar oldukça yoğunlaşmıştır. Bu ekzoenzimlerden salgılayan ve üzerinde çokça çalışılan bir bakteri de *Bacillus subtilis*'tir (2).

1.2 Bakteriyel α -amilaz ve Nötral Proteaz

Amilaz terimi ilk defa nişasta ve nişastanın parçalanma ürünleri olan polisakkaritlerin α -(1-4) glikozidik bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimleri tanımlamak için kullanılmıştır (3-5).

Amilaz; pankreas, tükürük bezleri, mantarlar, arılar, bitkiler ve bakteriler tarafından üretilen bir enzimdir. Bunlardan özellikle bakteriler tarafından üretilen amilazlar termostabil (ısıya dayanıklı) olmaları nedeni ile büyük bir ticari öneme sahiptirler. Bu bakterilerden *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* gibi *Bacillus* türleri ön sırayı alırlar. Bu bakteriler uygun besi yerlerinde amilazı ekstraselüler olarak ortama salgırlar (6).

Çeşitli canlılardan izole edilen α -amilazlar substratı olan nişastayı hidrolizleme konumlarına göre endo ve ekzo amilazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bir endo amilaz olan α -amilaz nişasta molekülü ile etkileştiği zaman hidroliz, molekülün orta kısımlarında olur. Bir ekzo amilaz olan β -amilaz, nişasta molekülü ile etkileştiği zaman hidroliz sadece indirgen olmayan uçlardan başlar ve devam eder. Bunlardan başka bir de γ -amilazlar vardır. Bu enzimler amilopektinin dallanma noktalarındaki glikozidik bağları kırarlar (7). α -amilazın aktivite gösterebilmesi için kofaktör olarak Ca^{2+} iyonlarına ihtiyaç vardır (8).

Son yıllarda özellikle *B. subtilis*'ten izole edilen α -amilaz üzerinde yoğun çalışmalar vardır (2). Ortamda, bir karbon kaynağı ve inorganik tuzlar varlığında amilaz üretimi bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (9). Bakteriyel enzimlerin termostabilitesi yine araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (2,10).

Deschreider, çalışmasında α -amilazın varlığını poli akrilamid jel elektroforezinde göstermiş ve izolasyonu ile ilgili çalışmalar yapmıştır (11).

Ortamda protein, peptit, pepton gibi organik maddelerin varlığında bakterinin bunları kaynak olarak kullanarak ekzoenzim sentezini arttırdığı saptanmıştır (2). Farklı karbon ve azot kaynakları kullanılarak üretilen bakterilerde, amilaz üretimi ile üreyen bakteri miktarı arasında bir orantı olmadığı, karbon kaynağı olarak nişasta kullanılmasının şekerlere oranla daha yüksek amilaz üretimini gerçekleştirdiğini, azot kaynağı olarak da organik azot kaynaklarının amilaz üretimini arttırdığını, inorganik

azot kaynaklarının kullanımının ise amilaz üretimini çok olumsuz etkilediği belirtilmiştir (12). Chandra ve arkadaşları, diğer organik azot kaynaklarının peptona nazaran daha düşük amilaz üretimi gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir (13). Düşük molar kütleli metabolize edilebilen şekerlerin enzim biyosentezindeki represyonundan dolayı amilaz sentezini düşürdüğü bildirilmiştir (14). İkili besi yeri çalışıldığı zaman ön inkübasyondan besi yerine aktarımı esnasında yüksek inokülüm yoğunluğunun amilaz üretimini inhibe ettiği iki araştırmacı tarafından bildirilmiştir (12-15). Yine enzim sekresyonunun ön inkübasyonun yaşı ile ilgili olduğu bildirilmiştir (16-18).

α -Amilaz aktivitesi üzerine Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ve K^{+} 'nin stimülatör etkisi, Hg^{2+} , Ni^{2+} , Ag^{+} , Cd^{2+} ve Fe^{3+} 'nin 1mM'da bile güçlü inhibisyon etkisi, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} ve Al^{3+} 'nin ılımlı inhibisyon etkisi vardır. EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) inhibisyonunun dozuna bağlı olduğu, PCMB (p-Chloromercuribenzenesulfonic Acid) ise α -amilaz üzerine güçlü bir inhibisyon yarattığı, EDTA ile meydana gelen inhibisyonun Ca^{2+} ile, PCMB ile oluşan inhibisyonun ise GSH (Glutathione) ile geri dönüşümlü olabileceği açıklanmıştır (19).

Proteolitik enzimler endüstriyel enzimlerin 1/2 - 1/3'ünü oluşturmaktadır (9).

B. subtilis'in çeşitli nesillerinden izole edilen ekstraselüler proteazların iki tipinden biri olan metalo enzimler nötral pH'da diğeri olan serin enzimler ise bazik pH değerlerinde aktiftirler (20,21). Schaeffer, çalışmasıyla proteolitik aktivitenin sporlaşmaya bağlı olduğunu (22), Gerald, üssel fazın sonunda sporlaşmanın başlangıç ve paralelinde proteaz sekresyonu ve üretiminde artış olduğunu göstermiştir (23).

Bir metaloenzim olan nötral proteazın bir Zn^{+2} atomu içerdiği ve EDTA ile inaktif hale getirilebileceği gösterilmiştir. Nötral proteaz sırasıyla kazein, hemoglobin, albumin ve jelatini daha iyi bir şekilde hidrolizlediği bildirilmiştir. Bu enzimin papain, kimopapain, tripsin ve kimotripsinden 5-6 kez daha aktif olduğu, enzimin yağ asitleri veya amino asit esterlerini hidrolizlemediği, Ca^{+2} ve diğer toprak alkali metaller varlığında stabil ve otolizinin en az olduğu ve saflaştırma esnasında enzimin spesifik aktifliği ile Zn^{+2} bileşenleri arasında direkt orantı olduğu gösterilmiştir. Enzimin her bir molünde 1 atom gram Zn^{+2} içerdiği ve molekül ağırlığının 30000 - 40000 dalton arasında olduğu bildirilmiştir (20). Yapılan çalışmalarda bu enzimin prostetik grubunun Zn^{2+} olduğu saptanmıştır. Sporlaşmanın başlangıç ve paralelinde üretilmeye

başlanan alkali serin proteaz (subtilisin) ve nötral proteaz (metalo) kültür süpernatant sıvısındaki total proteaz aktivitesinin %96-98'ine sahip olduklarından bunlara major ekstraselüler proteaz denmiştir (24-27). Minör ekstraselüler proteaz olarak adlandırılan metaloproteaz ve bacillopeptidaz saflaştırılıp izole edilmişlerdir (28-30).

B. subtilis'in nötral proteazı, *B. thermoproteoliticus*'tan saflaştırılan termolizinle %56 homoloji gösterdiği saptanmıştır (33). Bu iki enzimin x-ray kristallografisi incelenmiş ve %47 oranında bir benzerlik bulunmuştur. Yine substrat ve çinko bağlama bölgesi, katalizi ve amino asit kalıntıları arasında büyük benzerlik olduğu bildirilmiştir (34-37).

Nötral proteaz; tek bir polipeptid zincirinden oluşan, aktif bölgesinde bir Zn^{2+} atomu içeren ve enzimin stabilitesinde 2-4 Ca^{2+} iyonlarının belirgin bir rol oynadığı bu enzim *B. subtilis*, *B. thermoproteolyticus*, *B. stearothermophilus*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*'ten izole edilmiştir. Bunların amino asit dizilerinde önemli bir farkın olmadığı da belirtilmiştir (36-45).

Nötral proteaz *B. subtilis*'in *nprE* geninde bir pre-pro protein olarak, 27-28 amino asitten oluşan bir işaret dizisi, pro dizisi 193-194 amino aside kadar uzayan, olgun proteini 300 amino asitten oluşan bu enzimin düzenleyici geninin *nprR* olduğu rapor edilmiştir (45,46).

1.3 Nişasta

Nişastaya patates gibi yumrulu bitkilerde ve mısır, fasulye, buğday ve pirinç gibi tahıllarda daha çok rastlanmakla beraber bütün bitki hücreleri nişasta yapma kabiliyetine sahiptir. Nişasta hücrede iki yapısal formda bulunmaktadır. Bunlarda birisi α -amiloz, diğeri ise amilopektindir.

α -amiloz tahıl nişastasının %10-20'sini oluşturur. Dallanma göstermeden düz zincirler halinde uzamakta ve D-glukoz ünitelerinin $\alpha(1-4)$ bağı ile birbirine bağlanması sonucu meydana gelmiş bir depo polisakkarittir. Amiloz polisakkariti düz zincir yerine helezonlar yaparak uzamaktadır. Amiloz, sol el heliks yapısı meydana getirerek helezonlar oluşturmaktadır. Heliksin her bir dönüşüne 6 glukoz ünitesi girer.

Amiloz, suda çözünür ve iyot ile mavi renk verir. Molekül ağırlığı 50.000-500.000 dalton arasında değişir, yani yaklaşık olarak 200-2000 glukoz biriminden oluşur.

Amilopektin, tahıl nişastasının %80-90'ını oluşturur. Düz zincir amilozda olduğu gibi glukoz ünitelerinin $\alpha(1-4)$ bağı ile birbirine bağlanması ile uzamaktadır. Türden türe değişiklik göstermek üzere her 20 ile 30 glukoz ünitesinden sonra bir dallanma noktası ortaya çıkmaktadır. Dallanma bir glukoz ünitesinin 1 nolu karbon atomu ile, diğer glukoz molekülünün 6 nolu karbon atomları arasında $\alpha(1-6)$ glikozidik bağı oluşması ile meydana gelmektedir. Amilopektin, suda çözünmez ve iyot ile mavi-kırmızı renk verir. Molekül ağırlığı 60.000-1.250.000 dalton arasında değişir, yani yaklaşık olarak 250-5000 glukoz biriminden oluşur.

Nişastanın ana maddesi enzimatik olarak iki ana yolla hidrolize edilmektedir. Amiloz eskiden beri bilinen α -amilaz enzimi tarafından hidrolize edilmektedir. α -amilaz enzimi amiloz ve amilopektinde bulunan $\alpha(1-4)$ bağlarını hidrolize etmektedir. Malta bulunan β -amilaz enzimi α -amilazdan biraz farklı davranır, amiloz ve amilopektinden çok az miktarda glukoz ünitelerini koparıken çoğunlukla bir disakkarit olan maltoz ünitelerini meydana getirmektedir. α - ve β -amilaz amiloz ve amilopektindeki $\alpha(1-4)$ bağlarını koparır ve bu enzimlerin etkisi amilopektindeki $\alpha(1-6)$ glikozidik bağa gelince durur. Bir hayli büyük bir molekül olan bu dallı zincire limit dekstrin adı verilmektedir. Amilopektindeki dallanma noktasına etki eden başka bir enzim vardır. Amilopektinin dallanma noktasında bulunan $\alpha(1-6)$ glikozidik bağları $\alpha(1-6)$ glikozidaz enzimi tarafından kırılmaktadır. Amilopektindeki $\alpha(1-6)$ bağlarının hidrolize edilmesi ile yine $\alpha(1-4)$ bağları ortaya çıkmaktadır. $\alpha(1-4)$ bağları yine α - ve β -amilaz enzimleri tarafından koparılmaktadır (47). Şekil 1'de α -amiloz molekülünün α -heliks yapısı şekil 2'de ise amilopektin ünitesindeki düz zincirler, D-glukoz ünitelerinin birbirlerine $\alpha(1-4)$ glikozidik bağı ile bağlanması ve dallanma noktalarındaki iki şeker ünitesinin birbirine $\alpha(1-6)$ glikozidik bağı ile bağlanması görülmektedir.

1.4 α -Amilazın Etki Mekanizması

1963 yılına kadar α -amilazın nişastayı rastgele hidrolizleyip glukoz moleküllerine dönüştürdüğü düşünülürken, *B. subtilis* α -amilazlarının, amiloz üzerine etkisini konu alan bir çalışmada, maltotrioz (G3) ve maltoheksoz (G6)'un baskın olduğu bir karışımın ele geçtiği ortaya konulmuştur. Bu sonuç, α -amilazın nişasta üzerine tesadüfi olarak etki etmediğini kanıtlamıştır (48). Buna göre aktivasyon mekanizması şu şekilde izah edilebilir:

α -amilaz üzerinde 9 glukoz kalıntısının bağlanabileceği bağlanma merkezleri bulunur. α -(1-4) glikozidik bağı hidrolyzleyen aktif merkezin 3. ve 4. glukoz kalıntılarından bağlandığı bağlanma merkezleri arasında kaldığı üzerinde durulmaktadır. Buna göre, hidroliz işleminden sonra soldaki grup enzim üzerinden ayrılırsa, boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere, nişasta molekülleri kendiliğinden hareket eder ve ürün olarak G6 oluşur. Hidrolizden sonra zincirin sağ tarafı ayrılırsa, nişasta zinciri boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sağa doğru kendiliğinden kayar ve ürün olarak G3 meydana gelir.

Amilopektinde ise benzer mekanizma ile maltoz (G1), maltodioz (G2), maltotrioz (G3) ve maltoheksoz (G6) meydana gelir (49). Etki mekanizması Şekil 3 ve 4'de görülmektedir.

Amilolitik aktivite gösteren enzimlerin katalizinde glikozidik bağda bulunan oksijen, enzim üzerinde bulunan bir asidik amino asit ile protonlanır. Substratın indirgen olmayan yarı parçası ayrılınca karbonyum iyonuna benzeyen ara ürün bir karboksilat grubu tarafından kararlı hale getirilir veya bir glikozil enzim ara ürünü oluşur. Her iki durumda da ara ürün suyun saldırısını enzime yönlendirip son ürünün konfigürasyonunu belirler (50). Bu iki mekanizmadan hangisinin geçerli olduğu konusu henüz tartışma halindedir. Ancak reaksiyonun karbonyum iyonuna benzeyen, ara ürün oluşumunun gerçekleştiği mekanizma üzerinden yürüdüğü sanılmaktadır (51).

1.5 α -Amilazın Membranda Sentezi

α -amilaz sentezi sırasında transkribe edilen mesaj (mRNA) stoplazmada henüz açıklanamayan bir mekanizmayla translasyona uğramadan membrana bağlı 30S ribozomal alt birimine bağlanır. mRNA'nın bu stoplazmik davranışı serbest ribozomlarla translasyona direnç gösteren RNA molekülünün konfigürasyonundan kaynaklanabilir. Bu konfigürasyon da mRNA'yı membrana yönlendirir. Ekzoenzim mRNA molekülleri genden membrandaki translasyon bölgelerine göç ettikten sonra membran bölgesinde translasyon olayı başlatılır. Enzimin polar fosfolipoprotein kısmı sentezlenir ve bu membrana sıkı bir şekilde bağlanır. Molekülün geri kalan kısmı sentezlenir sentezlenmez membrana geçer. Enzimin hidrofilliğinin maskelendiği ve hidrofobik bir özellik gösterdiği bir konfigürasyon durumunu alır. Enzim membranda ters döner, membrandan geçer ve dış ortama geçer geçmez dayanıklı hidrofilik bir konfigürasyon durumu alır. Spesifik bir proteaz, enzimin polar NH₂ uç kuyruğundaki lider bölgeyi (sinyal peptid) keser, hücre duvarını geçer ve enzim hücreden ayrılır. Translasyon başlar başlamaz sentezlenen enzim plazma membranına bırakılır. Bu model ekzoenzim mRNA'sını normal hücre mRNA'sından ayırt eden bir özelliktir (52).

Yomamoto ve Lampen, tarafından ileri sürülen bir görüşe göre molekülün 5' ucunun membrana yöneldiği ve bu bölgenin ribozom seçimine yardımcı olduğu savunulmaktadır (53).

Amilaz sentezi membrana bağlanma, prekürsörün translokasyon bölgesine gelişi ve polipeptidin membrandan geçişi, sinyal peptidin sinyal peptidaz tarafından uzaklaştırılışı ve olgun hale gelen polipeptitlerin membrandan ayrılması şeklinde incelenmiştir (54).

Membrana bağlı ribozomların, enzim sentezi ve sekresyonunda rol aldığı konusu tartışmalıdır (55, 56). Pek çok *Bacillus* türünde membrana bağlı ribozomlar gözlenmiştir (57, 58).

Zhou ve arkadaşları, *B. subtilis*, amilazının %4'ünün hücre membranında, %85'inin hücre içinde olduğunu ve ancak %10'unun hücre dışına salgılandığını, ayrıca intrasellüler ve ekstrasellüler amilazın farklı molekül ağırlığına sahip olduğunu göstermişlerdir (59).

1.6 *Bacillus subtilis*

Bacillus cinsine giren türler, gram pozitif (+), aerobik, ısıya dirençli ve endospor oluşturan bir yapıya sahiptirler. Bu cinsin en fazla çalışılmış üyesi *B. subtilis*'tir. Gram (+) bakteri grubu içinde genetik haritası en fazla tanımlanmış tür de *B. subtilis*'tir. Bakteri; yaklaşık 1.5-3 µm boyunda, 0.5-0.8 µm eninde, çomakçık şeklinde bir yapıya sahiptir. Non-patojenik olması genetik çalışmaların bu bakteri üzerinde yürütülmesi için iyi bir nedendir.

B. subtilis termotoleran bir bakteridir. Bu gruba giren bakteriler termofil bakterilere göre daha düşük sıcaklıklarda yaşayan bakterilerdir. Toprakta, havada, suda ve kaplıca sularında 20-50 °C sıcaklıklarda yaşarlar. Isıya dayanıklı olmaları onların doğada yaygın bir grup olmalarını sağlar (60).

1.7 Bakterilerde Hücre Duvarı

Bakteriler için önemli olan hücre duvarı, bakteriye şekil veren ve dış etkenlere karşı dayanıklılığını sağlayan yapıdır. Gram (+) bakterilerde hücre duvarının %50-90'ını peptidoglikan (mukopeptid, glikoaminopeptid, murein) tabakası oluşturur. Bu madde hücre duvarının sağlamlık ve sertliğini sağlar. Peptidoglikan N-asetil muramik asit (NAMA) ile N-asetil glukoz amin (NAGA) moleküllerinin birbirlerini takip eden sıralar halinde, β (1→4) glikozidik bağlarla birleşmesinden oluşmuş bir heteropolimerdir. NAMA molekülünde ayrıca kısa bir peptid, yanzincire katılmıştır. Bu yan zincir genellikle L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin ve D-alanin'den meydana gelmiştir. Bir NAMA molekülünde bulunan tetrapeptidin 3. Pozisyonundaki L-lizin ile diğer NAMA molekülünün tetrapeptidinde 4. Pozisyonunda bulunan D-alanin arasında glisinden oluşan penta-homopeptid bulunur. Böyle devam eden bağlantılarla peptidoglikan oluşturulur. Gram (+) mikroorganizmaların hücre duvarında, bunun kuru ağırlığının %40-50'sini teşkil eden Teikoik asit vardır. Bu da peptidoglikan omurgasındaki NAMA molekülüne fosfodiester bağı ile bağlanmıştır. Polimerin yapısında gliserin veya ribitol gibi bir polialkol bulunur. Lipid oranı %1-2.5'tur. Gram negatif (-) bakterilerde teikoik asit bulunmaz, buna karşılık gram (+) türlerde

bulunmayan aromatik ve kükürtlü amino asitler var ve %25 oranında lipid içerirler. Şekil 5’de Gram (+) ve Gram (-) bakterilerde hücre duvarı şematik olarak görülmektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda membran yapısını aydınlatmak için en uygun model 1972 yılında Singer ve Nicolson tarafından öne sürülen akışkan mozaik modelidir. Önerilerine göre membranların bütünlüğünü oluşturan yapısı iki tabakalı polar lipidten meydana gelmiştir. Bu iki tabakalı lipid akıcıdır. Çünkü polar lipid tabakalarının polar olan baş kısımları membranın iki dış yüzüne dönük, fakat doymuş ve doymamış yağ asitlerinden meydana gelmiş olan hidrofobik kuyruk kısımları membranın içine dönük olup, hücrenin normal sıcaklığında akıcı halde bulunmaktadır. İntegral membran proteinlerinin yüzeyinde hidrofobik olan amino asitler yer almış bulunmaktadır. Bu proteinler, iki tabakalı lipid tabakasının ortasındaki hidrofobik bölgede bu bölge ile bir bütünlük oluşturmaktadır. Diğer taraftan önerilen modele göre periferik ya da ekstrinsik membran proteinleri yüzeylerinde hidrofilik yan zincirleri olan amino asitleri ihtive etmektedir. Yüzeyleri elektrik yükleri ihtiva eden bu proteinler, yine yüzeyinde bulunan polar lipid başları tarafından elektrostatik olarak çekilmekte ve bir arada tutulmaktadır. Enzimleri ve transport sistemlerini de kapsayan integral membran proteinleri iki tabakalı hidrofilik lipid tabakasının içine konmadıkça inaktiftir. Bu proteinler hidrofobik lipid tabakasının içine konunca ancak aktivite göstermek için üç boyutlu konformasyonlarını kazanmaktadırlar. Model, membran yapısında bulunan proteinlere kendi etraflarında lateral hareket imkanı tanımaktadır. Periferik proteinler iki tabakalı lipid denizinin yüzeyinde serbestçe yüzdükleri halde integral proteinler buz dağı gibi hidrokarbon uzantıların içine gömülmüş durumdadır. Böylece akıcı iki lipid tabakası içinde bulunan membran proteinleri muhtemelen bir mozaik ya da yüzey yapısı meydana getirmektedir (61).

1.7.1 Antibiyotikler

Bazı mikroorganizmalar tarafından kimyasal savunma aracı olarak sentezlenen antibiyotikler, kendileri dışında kalan mikroorganizmalar için toksik etkilidir. Ticari önemi olan bazı antibiyotikler sentetik olarak da yapılmaktadır. Günümüzde 5000’den fazla antibiyotik bulunmaktadır. Protein sentezinin pek çok antibiyotik tarafından,

belirli aşamalarda inhibe edildiği bilinmektedir. Etki mekanizmalarının oldukça spesifik olması nedeniyle biyokimyasal çalışmalar için son derece önemlidirler. Biyoteknolojik endüstrilerin en önemli dalını antibiyotik üretimi oluşturmaktadır.

1.7.2 Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotikler

Protein sentezini engelleyen bazı antibiyotikler ve etki mekanizmaları :

Puromisin: Ribozomun büyük alt birimindeki A bölgesine bağlanarak peptidin P bölgesinden daha fazla uzamasını engeller. Aminoasil-tRNA'nın aminoasil adenozin kısmına benzerlik gösterdiğinden ribozomun A bölgesine kolay bir şekilde bağlanan puromisin, aminoasil-tRNA'nın bu bölgeye bağlanmasını engeller. Ayrıca puromisin, içerdiği α -amino grubu ile peptidil transferaz enzimi aracılığı ile tRNA'nın karboksil grubu ile peptid bağı yapar. Böylece sentezlenen peptid, karboksil ucundan puromisine bağlanmış olur. Peptidil-puromisinin ribozomdan ayrılması ile görev yapamayan anlamsız peptidler ortama salınır.

Streptomisin: *Streptomyces griseus* tarafından üretilen bu antibiyotik trisakkarit yapısındadır. Düşük konsantrasyonlarda mRNA'da yanlış okumalara, yüksek konsantrasyonlarda ise polipeptid sentezini tümünden inhibe eder. Ribozomun 30S alt birimine bağlanarak fMet-tRNA'nın ribozoma bağlanmasını engeller ve mRNA'nın yanlış okunarak sentezin doğru başlamasına engel olur.

Tetrasiklin: Ribozomun 30S alt birimine bağlanır, aminoasil-tRNA'nın, A bölgesine bağlanmasını engellemek suretiyle, protein sentezini inhibe eder.

Eritromisin: Ribozomun 50S alt birimine bağlanarak, translokasyonu engelleyerek protein sentezini inhibe eder.

Rifamisin: Bakteriyel RNA-polimeraz enziminin β alt ünitesine bağlanarak, yeni RNA sentezinin başlamasını engeller ancak devam eden RNA sentezini engellemez.

Chloramphenicol: *Streptomyces venezuelae* tarafından üretilen Chloramphenicol (Ch) protein sentezini, ribozom 50S alt ünitesinde bulunan peptidil transferaz aktivitesini inhibe ederek durdurur. Ökaryotlarda 80S ribozomlarındaki protein sentezini inhibe etmez (62).

1.8 Bakteriyel Plazmitler

Plazmitler çeşitli bakteri türlerinde bulunan ekstrakromozomal genetik elementlerdir. Çift zincirli yapıda 1kb ile 200kb arasında nadiren daha büyük molekül ağırlığına sahip DNA molekülleridir. Yapıları genellikle halkasal olmasına rağmen bazı bakterilerde lineer formlarına da rastlanmıştır. Plazmitlerde bulunan genler genellikle bakteriye ortam şartlarında avantaj sağlayan protein dizilerini içerirler. Bu genler ancak belli şartlar altında aktivite gösterirler. Farklı plazmitler tarafından düzenlenen olaylar arasında;

- Antibiyotiklere rezistanlık
- Bazı antibiyotiklerin üretimi
- Kompleks organik bileşiklerin yıkımı
- Kolisinlerin üretimi
- Enterotoksinlerin üretimi
- Modifikasyon ve restrüksiyon enzimlerinin üretimi

sayılabilir.

Dirençlilik: Bakterilerin çeşitli antibiyotiklere, ilaçlara, metallere v.b. dirençliliklerinde plazmitlerin rolü çok fazladır ve bunlara genel olarak rezistanslık plazmitleri (R-plazmitleri) denir. R- plazmitleri bakterinin kromozomu ile birleşebilir ve kendi transferlerini sağlayacak genetik bilgilere de sahiptirler.

Fertilite: Fertilitiyi sağlayan F-faktörünü içeren plazmitler girdikleri mikroorganizmalarda “seks pilusu” oluşumuna yol açarlar ve bu hücreleri F^+ duruma getirirler. İçlerinde böyle bir F-faktörü bulunan hücreler konjugasyonda erkek (verici-donör) olarak adlandırılırlar, içermeyenler ise dişi (alıcı) davranışlıdır.

Bakteriyosin Üretimi: Bazı *E. coli* suşlarında bulunan ve sentezlemeyen türlerin ölümüne yol açan proteinlerin sentezlerini kodlayan plazmitlere kolsinojenik plazmitler (Col-plazmitleri) sentezledikleri maddeye de kolisin denir. Kolisin’ler bu maddeyi sentezlemeyen *E. coli*’lerin stoplazmik membranlarında silindirik kanallar veya delikler açarak hem hücre içine girerler ve hem de bakteri hücresinin iyon dengesini bozarak ölümlerine yol açarlar. Diğer bir çok mikroorganizmalar da benzer tarzda madde sentezlediklerinden bunlara genel bir isim olarak bakteriyosin ve

plazmitlere de bakteriyosiyonejik plazmitler denmiştir. *B. megaterium* tarafından sentezlenen bakteriyosine megasin, *B. cereus*'unkine seresin, *B. subtilis* tarafından sentezlenene de subtilin denir.

Bakteriyosin protein yapısında olup 60.000 dalton civarında molekül ağırlığına sahiptir. 100°C'ye kadar ısılara dayanıklıdır ve pH 2-6 arasında aktiftir. Proteazlarla inaktif hale gelebilir. Bakteriyosinler çok geniş olarak ; bakteriyoloji, moleküler biyoloji, genetik, farmakoloji, toksikoloji, biyokimya ve membran biyolojisi alanlarında kullanılmaktadır. Bakteriyosinlerden, bakteri izolatlarının görünüşü için mikrobiyal ekolojide marker olarak, toksin hareketi için bir model gibi, bakteriler tarafından salgılanan protein çalışmaları için ve yüzey özelliklerinin değişiklikleri ile oluşan mutantların seçimi için bir araç olarak yararlanılmaktadır. Ayrıca plazmit biyolojisi çalışmalarında yaygınca kullanılmaktadır.

Toksin üretimi: Bazı bakterilerde bunların virülensini sağlayan ve arttıran bazı plazmitler görev yapmaktadır. Bu plazmitlerin bakterilerden çıkarılmaları bunları antivirulent hale getirir. Virülensi sağlayan faktörler arasında kapsül ve toksin oluşumu, toksik maddelerin sentezi, hemolizinler, adhezyon molekülleri, bakteriyosinler vs. sayılabilir.

Antibiyotik üretimi: Antibiyotikler bazı mikroorganizmalar tarafından kimyasal savunma aracı olarak sentezlenmektedir. Mikroorganizmaların sentezlediği bu bileşikler kendileri dışında kalan diğer mikroorganizmalar için son derece toksiktir. Bu maddeler tıpta ve besin endüstrisinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

Modifikasyon Enzimlerinin Üretimi: Bakterilerde rastlanan ve bunlara çeşitli etkinlik kazandıran plazmitler arasında metabolik plazmitler yani çeşitli maddeleri fermente eden enzimlerin sentezlerini kodlayan plazmitler yer almaktadır. Örneğin; hızlı büyüyen *Rhizobium* türlerinde nodulasyon (düğüm oluşturma) (Nod⁺) ve nitrojen fiksasyonu (nif) genleri, bir bitki patojeni olan *Agrobacterium tumefaciens*'te tümör oluşumunu indükleyen genler, bir böcek patojeni olan *Bacillus thuringiensis*'teki kristal toksin genleri ve ototrof bir bakteri olan *Alcaligenes eutropos*'daki hidrojenaz için bulunan genler.

Bazı doğal şartlar altında bir çok plazmit bakteriyal konjugasyona benzeyen bir mekanizma ile başka bakterilere geçebilir. Gen klonlamasında kullanılan bir plazmitin

bu özelliği göstermemesi yani konjugatif olmaması gereklidir. Zira konjugatif olan bir plazmitin hem molekül ağırlığı daha büyük hem de bakteri hücresinde kontrolu zordur. Genellikle plazmit DNA replikasyonu, kromozomal DNA'nın duplikasyonunda kullanılan aynı enzimler ile yürütülür (63). Replikasyon tiplerine göre plazmitler iki gruba ayrılır.

Replikasyonları stringent (sıkı denetim) kontrol altındaki plazmitler sadece bir kaç tane kopyaları vardır. Replikasyon kromozomal DNA'nın replikasyonuna bağlıdır. Kromozomal DNA replike olurken onlar da replike olurlar.

Replikasyonları relaxed (gevşek denetim) kontrol altındaki plazmitler. Hücredeki sayıları 10-200 tane olup, replikasyonları ortam şartlarına bağlıdır. Hücrenin protein sentezi durdurulduğunda sayıları artmaktadır. Hücrede protein sentezinin durması ile relaxed plazmitlerin replikasyonları sürerken kromozomal DNA ve stringent plazmitleri replikasyonu durmaktadır (64,65).

Royston, stringent replikasyonuna sahip plazmitleri genomik DNA ile integre olma yüzdelерinin çok yüksek olduğunu bu yüzden replikasyonlarının artmasının dış ortam şartlarına bağlı olmadığını ileri sürmüştür.

1.9 Kalsiyum Kanal Blokörleri (Kalsiyum Antagonistleri)

Hücre membranlarında voltaja bağımlı kalsiyum kanallarından ekstraselüler Ca^{2+} 'nın depolarizasyon sırasında hücre içine girişini bloke eden maddelerdir. Stoplazma membranındaki kalsiyum kanal proteini veya oligomerik kompleksi üzerindeki özel bağlanma yerlerine veya reseptörlerine yüksek affiniteli bir şekilde bağlanarak Ca^{2+} girişini azaltırlar. Kalsiyum kanal blokörleri yapıca farklı üç gruba ayrılırlar:

1.1-4 Dihidropiridin (DHP) türevleri

2.Fenilalkinamin türevleri

3.Benzotiazepin türevleri

Bu etken maddelere göre farklı yerlere bağlanırlar. Membranın iç bölgesine etki edip depolarize membranda kanala oldukça etkili yapışır ve transmembran Ca^{+2} geçişi bloke olur (67).

Yavaş kanal blokörü olarak kabul edilen üç blokörden (Nifedipine, Verapamil) biri olan Diltiazem diğerlerinden farklı olarak yavaş kanalları bloke etmesinin yanında yüksek konsantrasyonlarda hızlı kanalları da bloke eder (68).

Diltiazem özel olarak kalsiyum kanallarına bağlanarak etki gösteren benzotiazepin türevi bir kanal blokörüdür (69).

Kalsiyum antagonistlerinin faydası ve güvenirliliği iyi bir şekilde açıklanmıştır. Bir çok geleneksel kalsiyum antagonistleri kısa süreli etkiye sahiptirler. Son zamanlarda geliştirilmiş bileşiklerin bazıları örneğin: Lacidipine uzun süreli bir etkiye sahiptir. Lacidipine'in kademeli olarak etkisini başarması ve etkisinin uzun süreli kalışı, onun membran bölgelerinde birlikte etkisiyle açıklanabilir (70,71).

Bir dihidropiridin olan Lacidipine'nin klinik ve biyolojik yarı ömürleri membran bölümlerinde birlikte etkisiyle ifade edilir. Lacidipine bu sınıftaki en yüksek etkiye sahiptir. Bu özellik onun membran lipid tabakasının en dip pozisyonunda kalmasına neden olur. Bu özellik blokörün, lipid tabakadaki haznenin içine yavaş bir şekilde difüzyonuna izin verir. Membran (10^{-9} M Lacidipine) ile muamele edildikten 60 dakika sonra yıkanmasına rağmen membran içinde hala Lacidipine'nin kaldığı görülmüştür. Nifedipin (10^{-8} - 10^{-7} M) ve Amlodipine (10^{-8} M) konsantrasyonlarda 30 dakika sonra latent etki göstermediği gözlenmiştir (72).

Lacidipine üzerinde rol oynayan farmakolojik protein reseptör lipid bölgesinde bulunur, Lacidipine burada tutulduktan sonra belirli aralıklarla salgılanır (73-75). Lacidipine etkisinin devam etmesi onun yüksek derecede lipofilitesinin sonucu olabilir. Kalsiyum antagonistleri sitokrom p450'nin alt sınıfına ait ciğer mikrozomal enzimleri ile etkileşmediği bildirilmiştir (76).

Ca^{2+} hücre içine esas olarak membrandaki voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyonu sonucu, konsantrasyon gradiyentine uyarak pasif bir şekilde girer. Ayrıca membrandaki Na^{+} ve Ca^{2+} değiş tokuş mekanizması da hücre içine Ca^{2+} girişine ikincil katkıda bulunur. Ancak, bu değiş tokuş sadece giriş yönünde olmaz, membran potansiyeline ve Na^{+} ve Ca^{2+} 'nın konsantrasyon gradiyentine göre Ca^{2+} dışarı atılabilir. Hücre depolarize ise Ca^{2+} içeri girer, polarize ise dışarı çıkar.

Ca^{2+} 'un girişini sağlayan kalsiyum kanallarının başlıca iki şekli vardır; voltaja-bağımlı kalsiyum kanalları ve reseptöre-bağımlı kalsiyum kanalları.

1.9.1 Voltaja Bağımlı Kalsiyum Kanalları

Bu tür kalsiyum kanalları, kanalın büyüklüğüne, aktive edilme potansiyellerine ve inaktivasyon hızları gibi biyofizik özelliklerine göre, yakın zamana kadar üç ana tipe ayrılırlardı; bunlar L (long-lasting), T (transient) ve N (neural) tip kanallardır. Yeni sınıflandırmaya göre ise düşük voltajla aktive edilen kalsiyum kanalları, önceki sınıflandırmadaki T kanallarını kapsarlar. Bunların yapıları etraflı bir şekilde incelenmemiştir. Yüksek voltajla aktive edilen kanallar grubunun tipik ve organizmada yaygın bulunan örneği L tipi kanallardır. Bu grupta ayrıca omega ve P kanalları ve henüz tam olarak belirlenmeyen diğer kanal tipleri vardır.

1.9.2 L Tipi Kanalların Moleküler Yapısı

L tipi kalsiyum kanallarının, yaklaşık 250 kD molekül ağırlığında ve en az üç alt birimden oluşan oligomerik bir glikoprotein olduğu saptanmıştır. Kanal, glikoprotein kompleksinin ana alt birimi olan α alt biriminde bulunur. Kanalın bir voltaj duyargasının (sensör), dış ağzından iyon seçici bir filtrenin (selektif filtre) ve iç deliğe yakın kısmında kanalı açıp kapatan bir kapısının bulunduğu bir hipotez olarak ileri sürülmüştür. Bu kanal proteinin açılıp kapanma mekanizması ile ilişkili en az üç stereoselektif bağlanma yeri vardır. Bunlar 1, 4 DHP, fenilalkilamin ve benzotiazepin bağlanma yerleri veya reseptörleridir.

1.9.3 Reseptöre Bağımlı Kalsiyum Kanalları

Hücre membranında özel bir G proteini aracılığı ile bir reseptöre kenetlenmiş bulunan ve reseptörün kendine uyan agonist madde molekülleri tarafından aktivasyonu sonucu açılan kanallardır. Kalsiyum antagonistleri bu tip kanalları voltaja bağımlı olan kanallar kadar güçlü bir şekilde bloke etmezler (77).

1.10 Önceki Çalışmalar

Bakteriyal ekzoenzimlerin biyosentezi üzerine yürütülen çalışmalarda enzim üretiminin fizyolojik çevre şartlarından etkilendiği gösterilmiştir (56).

Amilaz üreten bakterilerin büyüme siklusunun 3 önemli faza ayrıldığı, trofofaz potansiyel olarak büyümenin çok fazla olduğu evre, idiofaz amilaz üretiminin olduğu evre ve transisyon faz ikisini birbirinden ayıran evre olarak bildirilmiştir (52).

Fiziksel faktörlerin hem üreme hem de α -amilaz üretiminde önemli etkiye sahip olduğu; amilaz için optimal pH'nın 6.5-7.5, sıcaklığında 28-33°C olması gerektiği bildirilmiştir (78).

Ortamda protein, peptit, pepton gibi organik maddelerin varlığında bakterinin bunları kaynak olarak kullanarak ekzoenzim sentezini arttırdığı saptanmıştır (2). Farklı karbon ve azot kaynakları kullanılarak üretilen bakterilerde amilaz üretimi ile üreyen bakteri miktarı arasında bir orantı olmadığı, karbon kaynağı olarak nişasta kullanılmasının şekerlere oranla daha yüksek amilaz üretimini gerçekleştirdiğini, azot kaynağı olarak da organik azot kaynaklarının amilaz üretimini arttırdığını, inorganik azot kaynaklarının kullanımının ise amilaz üretimini çok olumsuz etkilediği belirtilmiştir (12). Chandra ve arkadaşları, diğer organik azot kaynaklarının peptona nazaran daha düşük amilaz üretimi gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir (13). Düşük molar kütleli metabolize edilebilen şekerlerin enzim biyosentezindeki represyonundan dolayı amilaz sentezini düşürdüğü bildirilmiştir (14). İkili besi yeri çalışıldığı zaman ön inkübasyondan besi yerine aktarım esnasında yüksek inokülüm yoğunluğunun amilaz üretimini inhibe ettiği iki araştırmacı tarafından bildirilmiştir (12-15). Yine enzim sekresyonunun ön inkübasyonun yaşı ile ilgili olduğu bildirilmiştir (16-18).

Srivastava, topraktan izole ettiği *B. stearothermophilus*'dan α - ve β -amilaz enzimlerini saflaştırıp özelliklerini incelemiş ve α -amilaz aktivitesi üzerine Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ve K^{+} 'nin stimülatör etkisi, Hg^{2+} , Ni^{2+} , Ag^{+} , Cd^{2+} ve Fe^{3+} 'nin 1mM'da bile güçlü inhibisyon etkisi, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} ve Al^{3+} 'nin ılımlı inhibisyon etkisi olduğunu bildirmiştir. EDTA inhibisyonunun dozuna bağlı olduğu, PCMB ise α -amilaz üzerine güçlü bir inhibisyon yarattığı, EDTA ile meydana gelen inhibisyonun Ca^{2+} ile PCMB ile oluşan inhibisyonun GSH ile geri dönüşümlü olabileceği açıklamıştır (19).

Glukoz, maltoz ve laktozun α -amilaz sekresyonu üzerine etkisini inceleyen araştırmacılar glukoz konsantrasyonu %25 olduğunda, 24. saatte 168 U/ml enzim aktivitesine rastlarken, 120. saatte 25500 U/ml; maltozda 24. saatte 107 U/ml, 72. saatte 13866 U/ml; laktozda ise 24. saatte 178U/ml iken 96. saatte 14325 U/ml enzim aktivitesine rastlarken aktivitenin kontrolde 48. saatte 11642 U/ml olduğunu bildirmişlerdir (79).

Son yıllara kadar değişik kaynaklardan α -amilaz enzimi saflaştırılıp özellikleri belirlenmiş; sıcaklık, pH, çeşitli azot ve karbon kaynaklarının, çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır (80-84).

Belirli nişasta konsantrasyonunun amilaz üretimini arttırdığını, belli bir konsantrasyondan sonra α -amilaz üretiminin inhibisyona uğradığı farklı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (85,86).

Pek çok *Bacillus* türünde membrana bağlı ribozomlar gözlenmiştir (58).

Üreme ve amilaz üretiminin, çalkalamasız kültürde düşük olduğu ve *B. subtilis*'te sıcak şok tepkisi üzerine araştırmalar yapılmıştır (78).

B. subtilis'in çeşitli nesillerinden izole edilen ekstraselüler proteazların iki tipinden biri olan metalo enzimler nötral pH'da diğeri olan serin enzimler ise bazik pH değerlerinde aktiftirler (20,21). Schaeffer çalışmasıyla proteolitik aktivitenin sporlaşmaya bağlı olduğunu (22), Gerald, üssel fazın sonunda, sporlaşmanın başlangıç ve paralelinde proteaz sekresyonu ve üretiminde artış olduğunu göstermiştir (23).

Bir metaloenzim olan nötral proteazın bir Zn^{2+} atomu içerdiği ve EDTA ile inaktif hale getirilebileceği gösterilmiştir. Enzimin her bir molünde 1 atom gram Zn^{2+} içerdiği ve molekül ağırlığının 30000 - 40000 dalton arasında olduğu bildirilmiştir (20). Yapılan çalışmalarda bu enzimin prostetik grubunun Zn^{2+} olduğu saptanmıştır. Sporlaşmanın başlangıç ve paralelinde üretilmeye başlanan alkali serin proteaz (*subtilisin*) ve nötral proteaz (metalo) kültür süpernatant sıvısındaki total proteaz aktivitesinin %96-98'ine sahip olduklarından bunlara major ekstraselüler proteazlar denmiştir (24-27). Minör ekstraselüler proteaz olarak adlandırılan metaloproteaz ve bacillopeptidaz saflaştırılıp izole edilmişlerdir (28-30).

B. subtilis'in nötral proteazı *B. thermoproteoliticus*'tan saflaştırılan termolizinle %56 homoloji gösterdiği saptanmıştır (33). Bu iki enzimin x-ray kristallografi

incelenmiş, %47 oranında bir benzerlik bulunmuştur. Yine substrat ve çinko bağlama bölgesi, katalizi ve amino asit kalıntıları arasında büyük benzerlik olduğu bildirilmiştir (34-37).

Nötral proteaz; tek bir polipeptid zincirinden oluşan, aktif bölgesinde bir Zn^{2+} atomu içeren ve enzimin stabilitesinde 2-4 Ca^{2+} iyonlarının belirgin bir rol oynadığı bu enzim; *B. subtilis*, *B. thermoproteolyticus*, *B. stearothermophilus*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*'ten izole edilmiştir. Bunların amino asit dizilerinde önemli bir farkın olmadığı da belirtilmiştir (36-45).

Nötral proteaz, *B. subtilis*'in *nprE* geninde bir pre-pro protein olarak, 27-28 amino asitten oluşan bir işaret dizisi, pro dizisi 193-194 amino aside kadar uzayan, olgun proteini 300 amino asitten oluşan bu enzimin düzenleyici geninin *nprR* olduğu rapor edilmiştir (45,46).

Amilaz sentezi membrana bağlanma, prekürsörün translokasyon bölgesine gelişi ve polipeptidin membrandan geçişi, sinyal peptidin sinyal peptidaz tarafından uzaklaştırılması ve olgun hale gelen polipeptitlerin membrandan ayrılması şeklinde incelenmiştir (54).

Membrana bağlı ribozomların, enzim sentezi ve sekresyonunda rol aldığı konusu tartışmalıdır (55,56). Pek çok *Bacillus* türünde membrana bağlı ribozomlar gözlenmiştir (57,58).

Streptomyces venezualae tarafından üretilen Chloramphenicol protein sentezini, ribozom 50S alt ünitesinde bulunan peptidil transferaz aktivitesini inhibe ederek durdurur (62).

Royston stringent replikasyonuna sahip plazmitleri genomik DNA ile integre olma yüzdelerinin çok yüksek olduğunu bu yüzden replikasyonlarının artmasının dış ortam şartlarına bağlı olmadığını ileri sürmüştür.

Kalsiyum kanal blokörleri membranın iç bölgesine etki edip depolarize membranda kanala oldukça etkili yapışır. Transmembran Ca^{2+} geçişi bloke olur (67).

Yavaş kanal blokörü olarak kabul edilen üç ilaçtan (nifedipine, verapamil) biri olan Diltiazem diğerlerinden farklı olarak yavaş kanalları bloke etmesinin yanında yüksek konsantrasyonlarda hızlı kanalları da bloke eder (68).

Diltiazem özel olarak kalsiyum kanallarına bağlanarak etki gösteren benzotiazepin türevi bir kanal blokörüdür (69).

Kalsiyum antagonistlerinin faydası ve güvenirliliği iyi bir şekilde açıklanmıştır. Bir çok geleneksel kalsiyum antagonistleri kısa süreli etkiye sahiptirler. Son zamanlarda geliştirilmiş bileşiklerin bazıları örneğin: Lacidipine uzun süreli bir etkiye sahiptir. Lacidipine'in kademeli olarak etkisini başarması ve etkisinin uzun süreli kalışı, onun membran bölgelerinde birlikte etkisiyle açıklanabilir (70,71).

Bir dihidropiridin olan Lacidipine'nin klinik ve biyolojik yarı ömürleri membran bölümlerinde birlikte etkisiyle ifade edilir. Lacidipine bu sınıftaki en yüksek etkiye sahiptir. Bu özellik onun membran lipid tabakasının en dip pozisyonunda kalmasına neden olur. Bu özellik blokörün lipid tabakadaki haznenin içine yavaş bir şekilde difüzyonuna izin verir. Membran (10^{-9} M Lacidipine) ile muamele edildikten 60 dakika sonra yıkanmasına rağmen membran içinde hala Lacidipine'nin kaldığı görülmüştür. Nifedipin (10^{-8} - 10^{-7} M) ve Amlodipine (10^{-8} M) konsantrasyonlarda 30 dakika sonra latent etki göstermediği gözlenmiştir (72).

Ehrlichia ristici 'nin replikasyonu, bir kalmodulin antagonisti, bir kalsiyum kanal blokörü ve bir ekstrasellular kalsiyum şelatörü olan EGTA (Ethylene Glycol-bis(β -amino ethyl eter) N,N,N'-N' - TetraaceticAcid)'nın organizmaya üç saatlik postinkübasyondan sonra eklendiğinde inhibe edildiği bildirilmiştir (87).

2. MATERİYAL VE METOD

2.1 Biyolojik Materyal

Çalışmamızda Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünden ve Nottingham Üniversitesinde Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümünden temin edilen *B. subtilis*, kullanıldı.

2.2 Kimyasal Maddeler

MgSO₄ .7H₂O, K₂HPO₄, CaCl₂, HgCl₂, KCl, FeSO₄, MnCl₂, ZnCl₂, NaOH, HCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, Amonyum Asetat, Sodyum Asetat, Na₂CO₃, Na-K Tartarat, CuSO₄, Na₂WO₄.2H₂O, Na₂MoO₄.2H₂O, H₃PO₄, HCl, LiSO₄, Br₂, Bovine serum albumin (BSA), K-EDTA, 3-5 Dinitrosalisilikasit, Tris Base, Tris HCl, Trichloroaceticacide (TCA), Asetik asit, Gliserin, Etil Alkol, Metil Alkol, İzopropanol, Merck Darmstag'tan.

Organik maddelerden ; Nişasta, Kazein Sigma'dan, Nutrient Broth (N.B) Oxoid'ten, Agar, Yeast extract, Beef extract, Pepton Difco'dan. Soya unu ve Mısır nişastasası ORBA enzim fabrikasından (İstanbul) sağlandı.

Elektroforetik malzemeler ; Akrilamid, N-N'-metilen bis akrilamid, N-N'-N'-Tetrametil etilen diamin (TEMED), Amonyum persülfat, Sodyum dodesil sülfat (SDS), 2-Mercaptoetanol (MET), Coomassie brilland blue R-250 ve standart proteinler Sigma, St.Louis'ten temin edildi.

2.3 Cihazlar

Çalkalamalı su banyosu (Clifton)

Spektrofotometre (UNICAM, 8625, UV/VIS)

Soğutmalı santrifüj (Sigma Christ2K15)
 Mikrosantrifüj (Cliff-DC FAN Model KD 1204)
 Vortex (Stuart)
 Elektroforez cihazı-disk (BIO-RAD)
 Elektroforez cihazı-Horizontal (BIO-RAD midi cell)
 Güç kaynağı (BIO-RAD)
 Liyofilizatör (Edwards)
 Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS)
 pH metre (Denway 3010, PCP501 elektrod)
 Deep-freeze (Harris, -95°C)
 Etüv (Heraus)
 İnkübatör (Sanyo MIR 552, MIR 5520)
 Digital göstergeli hashas terazi (GEC AVERY, 0.0001)
 Otoklav
 Su banyosu (Grant 6G, -20°C +100°C)

2.4 Besi Yerleri

2.4.1 Katı Besi Yeri

15 gr agar, 13 gr Nutrient Broth distile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı.

2.4.2 Nutrient Broth (NB) Besi Yeri

13 gr NB, 1 gr KCl, 0.125 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10^{-3} M CaCl_2 , 10^{-5} M FeSO_4 , 10^{-6} M MnCl_2 , 1 litreye tamamlanıp pH 7'ye getirilip otoklavlandı.

2.4.3 Çözünür Nişasta-Pepton Broth Ön İnkübasyon Besi Yeri

%2 çözünür nişasta, 0.5 gr pepton, 0.25 gr yeast extract, 0.2 gr K_2HPO_4 , 0.1 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 litreye tamamlanıp pH 7'ye getirilip otoklavlandı.

2.4.4 Çözünür Nişasta Beef Extract (SB) Besi Yeri

%2 çözünür nişasta, 1 gr beef extract, 0.02 gr M CaCl_2 , 0.01 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 litreye tamamlanıp pH 7'ye getirilip otoklavlandı.

2.5 Diyaliz Hortumunun Hazırlanması

Diyaliz hortumu kesilerek 10 mM EDTA (pH=7) içeren çözelti 90°C'de kaynatı

olarak diyaliz hortumu 3 dakika bu sıvı içinde bekletildi. Daha sonra bol miktarda saf su ile yıkanarak kullanıldı. Stok olarak kullanılıncaya kadar 4°C'de %30'luk etanol içerisinde bekletildi. Kullanma esnasında distile su ile iyice yıkanıp kullanıldı.

2.6 Plazmit İzolasyonu

2.6.1 Kullanılan Çözeltiler

STET

8 gr Sukroz
5ml Triton X-100
10ml 0.5M EDTA
1.25ml 2M Tris-HCl
100 ml'ye tamamlanıp otoklavlandı.

TBE elektroforez tamponu

10x Stok solusyon, 1lt.
108gr Tris Base
55gr Borik asit
40ml 0.5M EDTA (pH=8)

2.6.2 İzolasyon İşlemi

Bakteriler 8000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi, üst sıvılar ayrıştırıldıktan sonra çökelti 0.4 ml STET'de çözündürüldü. Ependorflara 10 µg/ml olacak şekilde lizozim ilavesi yapıldı, 30 saniye vorteksten sonra buz üzerinde 5 bekletildi. 1 dakika kaynar su banyosundan sonra 10 dakika 14000 rpm'de santrifüjlendi. Çökelti steril bir kürdan ile uzaklaştırıldı, kalan sıvıya 0.2 ml 5M Amonyum asetat ilave edildi. Daha sonra 1ml izopropanol ilavesi ile oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. 10 dakika 16000 rpm'de santrifüjlendi, üst sıvılar vakumla alındı ve çökelti liyofilizatörde kurutuldu. Çökelti 50 µl TBE'de çözüldü. Agaroz jel elektroforezi ile bantlar gözlemlendi. Spektrofotometrik olarak 260, 280 ve 260/280nm değerleri ölçüldü.

2.6.3 Elde Edilen Plazmitlerin Agaroz Jele Verilmesi

%0.7'lik agaroz 1xTBE içinde hazırlandı. Çözelti 50°C'a kadar soğutulduktan sonra 10 µg/ml olacak şekilde etidium bromide katıldı ve jel kabına döküldü. Yaklaşık 30 dakika polimerizasyondan sonra plazmit örnekleri jele yüklendi. Üzerlerine 1'er µl BFB çözeltisi ilave edildikten sonra 1xTBE dolu elektroforez tankına kondu ve 80V elektrik alanında 2 saat yürütüldü. Bu süre sonucunda tampondan çıkarılan jel U.V. translüminatörde gözlenerek Polaroid 667 tip film (3000 ASA) ile fotoğrafları çekildi.

2.6.4 Absorbsiyon Spektroskopisi Yöntemi İle Nükleik Asit

Miktarının Tespiti

Yukarıdaki yöntemle saflaştırılan plazmitlerin, UV visible spektrofotometrede 260 ve 280 nm'de absorbansları alındı. Bu absorbanslardan yola çıkarak 260/280 oranından mililitredeki plazmit miktarı hesaplandı. Örneğin 260/280 oranı 2 ise mililitrede 28 µg çift iplikli nükleik asit var demektir.

2.7 Proteaz Aktivite Tayini

Proteaz aktivite tayini kazein sindirim yöntemine göre yapıldı. Proteolitik aktivite kazein sindirim metodu ile tespit edildi. 0.1 ml enzim çözeltisi, 1.8 ml 0.2 M Tris tamponu (pH=7.2), 0.1 ml 0.06 M CaCl₂ ve 1 ml % 1'lik denatüre edilmiş kazein çözeltisi (pH=7) içeren ortama ilave edildi. 37°C'de 30 dakika. İnkübasyondan sonra %10'luk TCA çözeltisinden 2 ml ilave edilerek tüpler 4°C'de 30 dakika bekletilmeye bırakıldı. Daha sonra filtre edilen çözeltinin absorbansı 275 nm'de okundu (24).

2.8 Amilaz Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi Bernfeld metoduyla tayin edildi (88). Enzim çözeltisinin 1ml'si ile nişastanın (%0.5) 0.05 M Tris (pH=7) tamponu içinde 1 ml'si 25°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 2 ml 3,5-dinitrosalisilikasit ilave edildi. Çözelti 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra 20 ml distile su ile seyreltme yapılarak 489 nm'de çözeltinin absorbansı okundu.

2.9 Bakteri Üretimi

Katı besi yerinde üretilen bakterilerden bir koloni ön inkübasyon ortamına aktarılıp buradan 100 ml'lik taze besi yerine eşit olacak şekilde ekildi. *B. subtilis* hücreleri spektrofotometrik olarak 460 nm'de 0.2 absorbans verdikleri zaman mililitrede yaklaşık olarak 5×10^7 hücre vardır. Buradan hareketle ön inkübasyondaki hücreler tespit edilerek eşit sayıda bakteri taze besi yerlerine inoküle edildi. Burada 24 saat 37°C'de çalkalamalı olarak inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bu ortamdan alınan bir santrifüj tüpü dolusu besi yeri santrifüjlenerek berrak bir üst sıvı elde edildi. Bu üst sıvı bu besi yerinde üremiş olan bakterilerin spektrofotometrik ölçümü için kör ayarı olarak 460 nm'de kullanıldı.

2.9.1 SB Sıvı Besi Yerinde Kalsiyum Kanal Blokörlerinin Bakteri ile Etkileştirilmesi

Katı besiyerinde üretilip 100 ml'lik sıvı besiyeri ön inkübasyon ortamına aktarılan Nottingham Üniversitesinden temin edilen *B. subtilis*'in bir kolonisi 37°C'de çalkalamalı bir ortamda 8 saat süre ile üretildikten sonra, eşit miktarda bakteri içerecek şekilde buradan 100'er ml'lik SB sıvı besiyerine kalsiyum kanal blokörleri ilave edilerek, bu ortamda 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saat süre boyunca üremeye bırakıldılar. Bu süreler sonunda elde edilen üst sıvılar, bakteri miktarı, enzim çalışması ve elektroforez için kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde farklı varyanstan iki grup için t testi uygulandı. Blokörlerde bakteri üremesi ve α -amilaz sekresyonu kontrole nazaran anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.01$).

2.9.2 SB Sıvı Besi Yerine Ağır Metal ve Diltiazem'in Bakteri ile Etkileştirilmesi

Katı besiyerinde üretilip 100 ml'lik sıvı besiyeri ön inkübasyon ortamına aktarılan bir koloni 37°C'de çalkalamalı bir ortamda 8 saat süre ile üretildikten sonra, eşit miktarda bakteri içerecek şekilde buradan 100'er ml'lik SB sıvı besiyerine $HgCl_2$ 0.1-0.7 ppm oranlarında ilave edilerek, bu ortamda 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saat süre boyunca üremeye bırakıldılar. Süre sonunda hangi ppm oranlarında üremenin gözlemlendiği belirlendikten sonra bu oranlarda çalışılmaya devam edildi. Daha sonra ağır metal içeren ve üremenin gözlemlendiği oranlara, Diltiazem ilave edildi. Bu süreler sonunda üst sıvılar enzim aktivitesi ve elektroforez çalışmaları, bakteriler ise plazmit çalışmaları için kullanıldı.

İstatistiksel değerlendirmelerde farklı varyanstan iki grup için t testi uygulandı. 0.1-0.4 ppm $HgCl_2$ ve Diltiazem'i birlikte içeren SB sıvı besiyerlerinde α -amilaz aktiviteleri kontrole nazaran anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.01$).

2.9.3 Kültürden Bakteri İ olasyonu

Bakteriler inkübasyon süresi sonunda 4 C'de 5000 g'de 20 dakika santrifüjleme ile üst sıvı ile çökelti birbirinden ayrıştırılıp üst sıvı enzim çalışması için çökelti ise membran ve plazmit çalışmaları için kullanıldı.

2.10  -Amilazın  retim Zamanının Saptanması

Katı besi yerinde üretilip 100 ml'lik N.B. sıvı besi yerine aktarılan bir koloni 37 C'de çalkalamalı ortamda 8 saat  n inkübasyona bırakıldıktan sonra bakteri miktarı eşitlenerek ile 500'er ml'lik sıvı besi yerine aktararak, bu ortamda 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 saat boyunca  remeye bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda santrifüjleme ile üst sıvı ve çökelti ayrıştırıldı. Üst sıvıda ve membranda  -amilaz aktivitesi saptandı.

2.10.1 Antibiyotik Uygulaması

SB sıvı besi yerinde üretilen bakteriler 10 saat üretildikten sonra 170  g/ml Ch ilavesi yapıldıktan 2.5 saat sonra 20 dakikada bir üst sıvı ve bakteri örnekleri alınarak üst sıvıda amilaz aktivitesine bakteri örneklerinde ise membran çalışması ile elde edilen amilaz aktiviteleri saptandı.

İstatistiksel değerlendirmelerde farklı varyanstan iki grup için t testi uygulandı. SB sıvı besi yerlerindeki üst sıvı ve membrandan elde edilen  -amilaz aktiviteleri kontrole nazaran anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.01$).

2.10.2 Membran  alışması

Katı besi yerinde üretilip 100 ml'lik N.B. sıvı besi yerine aktarılan bir koloni 37 C'de çalkalamalı ortamda 8 saat  n inkübasyona bırakıldıktan sonra bakteri miktarı eşitlenerek ile 500'er ml'lik sıvı besi yerine aktararak, bu ortamda 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 saat boyunca  remeye bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda santrifüjleme ile üst sıvı ve çökelti ayrıştırıldı. *B. subtilis* hücreleri 0.02M MgCl₂ ve 0.05M NaCl içeren 0.13M Tris-HCl (pH=7.5)   zeltisinin 5 ml'si ile süspanse edildi. 50 mg/ml lizozim

ilave edilerek 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Süspansiyonlar 4°C'de 5000 x g'de 15 dakika santrifüjlendi. Çökelti 0.13M Tris-HCl (pH=7.5) içine alınarak, lizis işlemi 0°C'de 30 dakikada tamamlandı. Santrifüjlendikten sonra pelet %10 sukroz içeren 0.13M Tris-HCl (pH=7.5) ile süspanse edilerek %10, 20, 30 ve %40'luk sukroz gradiyentine bırakıldı. 4°C'de 1500 x g'de 90 dakika santrifüjledikten sonra %30'luk tabakada biriken membran uygun bir şekilde alınarak 5000 x g'de 15 dakika santrifüjlendi. Çökelti %1'lik SDS ile etkileştirildikten sonra santrifüjlenerek üst sıvıdaki α -amilaz aktivitesi incelendi (89, 90).

2.11 Amino Asit Uygulaması

Ön inkübasyonu takiben, NB sıvı besiyerine ekim yapılarak, her bir besiyerine %0.1 oranında 20 amino asitten biri ilave edildi. Çalışma, 20 amino asit için 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18. saatler olmak üzere, 8 farklı süre esas alınarak gerçekleştirildi. Çalışmada amino asit ilave edilmiş NB sıvı besiyerinde üretilen bakteriler, belli süreler sonunda santrifüjlenerek üst sıvıda α -amilaz aktivitesine, toplanan bakterilerde ise salgılanmak üzere olan α -amilazı izole etmek için kullanıldı. Sonuçlar amino asit içermeyen NB sıvı besiyeri ile kıyaslandı. İstatistiksel değerlendirmelerde farklı varyanstan iki grup için t testi uygulandı.

Tablo 1: Bakteriyel üst sıvılardan elde edilen α -amilaz aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak kontrolden farklı bulunan amino asitler.

Amino Asit	Veri Sayısı	Hesaplanan t Değeri	Olasılık
Glutamik asit	10	- 2.733	0.023 (P<0.05)
Asparajin	10	- 2.575	0.03 (P<0.05)
Lizin	10	- 3.127	0.012 (P<0.05)
Treonin	10	- 2.841	0.019 (P<0.05)
Metionin	10	- 2.976	0.016 (P<0.05)
Aspartik asit	10	- 4.167	0.02 (P<0.01)
Serin	10	- 3.836	0.04 (P<0.01)
Triptofan	10	- 3.772	0.04 (P<0.01)

Tablo 2: Membran çalışması ile elde edilen α -amilaz aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak kontrolden farklı bulunan amino asitler.

Amino Asit	Veri Sayısı	Hesaplanan t Değeri	Olasılık
Glutamik asit	10	-3.292	0.009 (P<0.01)
Prolin	10	-3.134	0.012(P<0.05)
Lizin	10	-3.253	0.01(P<0.01)
Metionin	10	- 3.011	0.015(P<0.05)
Lösin	10	- 2.416	0.039(P<0.05)
Valin	10	- 3.840	0.004(P<0.01)
Serin	10	- 2.252	0.051(P<0.05)
Glisin	10	- 3.032	0.014(P<0.05)
Triptofan	10	- 3.250	0.010(P<0.01)
Histidin	10	- 5.527	0.000(P<0.01)

2.12 Kalsiyum Kanal Blokörlerinin α -Amilaz İle Etkileştirilmesi

İn vitro olarak kalsiyum kanal blokörlerinin α -amilaz üzerine etkisi, besi yerinin her bir mililitresindeki blokör miktarı hesaplanarak, aktivite tayini öncesi α -amilaz önce kalsiyum kanal blokörleri ile 30 dakika inkübe edildikten sonra ortama substrat ilave edilerek aktivite tayinine devam edildi.

2.13 α -Amilaz Saflaştırılması

Bakteriyel kültür 18 saat süre üretildikten sonra 4°C'de santrifüjlenerek α -amilaz içeren üst sıvı ile çökelti ayrıştırıldı. Üst sıvıda aktivite tayin yöntemi ile α -amilaz aktivitesi kontrol edildi. -20°C'de soğutulmuş %96'lık etanol 4°C'de karıştırılan üst sıvı üzerine yavaş bir şekilde 1:3 hacminde ilave edildi. Çöken

proteinler 10000 rpm'de 20 dakika soğutmalı santrifüj ile santrifüjlendi. Çökelti 25 ml 0.1M fosfat tamponunda (pH=6.9) çözüldü. Çözelti üzerine %45 doygunlukta $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oldukça yavaş ilave edildi. Karışım 14000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek çökelti atıldı. Üst sıvı üzerine %70 doygunlukta $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilave edildi. 4°C'de 14000 rpm'de 20 dakika santrifüjleme ile elde edilen çökelti 0.1M (pH=8) fosfat tamponunun 25 ml'si ile çözündürüldü. Protein çözeltisi aynı tamponun 2 litresi ile gece boyu 4°C'de dializlenerek $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'tan kurtarıldı. Liyofilizatörde hacim yaklaşık 10 ml'ye indirildi. 0.1M fosfat tamponu (pH=8) ile dengelenmiş olan DE-32 (10x200 mm) kolonuna verilen protein çözeltisi, 0.1-1 M NaCl gradiyenti ile yıkanarak fraksiyonlar toplandı. α -amilaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirilerek gece boyu fosfat tamponu ile dializlenerek tuzdan kurtarıldı (91). Liyofilizatörde hacim 10 ml'ye indirilerek -20°C'de saklandı.

2.13.1 DE-32 Kolonunun Hazırlanması

Anyon değiştirici DE-32 kolon materyali hazırlamak için 1 gr DE 32, 15 ml su içerisinde yarım saat bekletildi. Buhnerden vakum ile süzülen tortu 0.5 M HCl içinde yarım saat bekletildi. Vakumda süzülerek, süzüntü sıvısının pH'sı oluncaya kadar saf su ile yıkandı. Tortu 0.5 M NaOH içinde yarım saat bekletildi. Saf su ile yıkanarak pH 5.0'a getirildi. 10 x 200 mm boyutundaki cam kolona dolduruldu. Kolon potasyum fosfat tamponu ile yıkanarak pH 8 olacak şekilde dengelenip kullanıldı.

2.14 Elektroforez işlemi

Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri büyük ölçüde iki faktör tarafından belirlenir. Molekül büyüklüğü ve elektriksel yük. Bu parametrelerdeki farklılıklara dayanan ayırma yöntemleri geliştirilmiştir. Bunun yanında, bağlanma yeteneğinin spesifik özelliklerinden de faydalanılabilir (affinite kromatografisi).

Bir proteinin taşıdığı net elektrik yükü yapısındaki alt birimlerin taşıdığı negatif ve pozitif yüklerin toplamına eşittir. Bir makromolekülün net elektrik yükü varsa, yükünün işareti ve büyüklüğüne göre elektriksel alanda hareket eder. Bu olaya elektroforez denir. Elektroforez proteinlerin ayrılmasında çok etkin bir yöntemdir.

Daha çok analitik yöntem olarak kullanılır ama değişik proteinlerin preparatif ayrılması için de kullanılabilir. Tampon çözelti ile ayarlanmış belirli bir pH'da değişik proteinler değişik sayıda yük taşırlar. Elektriksel alan uygulandığında protein molekülleri elektriksel kuvvetlere göre yürürler. Yürüme hızı, etkileyen elektriksel kuvveti belirleyen molekül şekli ve büyüklüğüne bağlıdır.

Yük, büyüklük ve biçime bağlı olarak ayırmayı sağlamak için kullanılan en uygun elektroforez metodlarından biri poli akrilamid jel elektroforezidir. Poli akrilamid jel elektroforezinin ayırma gücü proteinlerin molekül ağırlıklarının tayininde kullanılabilir. Bunun için proteinler arasındaki elektriksel yük farkının ortadan kaldırılması ve proteinlerin denatüre edilmeleri gerekir.

Oligomer proteinlerin analizinde, bir deterjen olan ve denatüre edici bir araç olarak Sodyum Dodesil Sülfat ((SDS) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11} \text{OSO}_3^- \text{Na}^+$) kullanılmaktadır. Hidrofobik ve hidrojen bağlarını kıran SDS'nin proteinlerle yaptığı kompleks negatif yüklü ve çubuk şekilli partiküllerden ibarettir. Bu negatif yüklü SDS-protein kompleksleri birbirini itmekte ve proteinlerin bir araya gelmelerini önlemektir. Proteinlerin disülfür bağlarını kırmak için β -Merkapto etanol ($\text{OH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$) kullanılır (92).

Elektroforez işlemi: Proteinler Weber ve Osborn yöntemine göre elektroforez işlemine tabi tutuldular (93).

A Tamponu; 25.54 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.8 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 gr SDS. Hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

B Çözeltisi; 5,5 gr Akrilamid, 0.15 gr N-N' metilen bisakrilamid, 25 ml saf suya tamamlandı.

C Çözeltisi; 15 mg/ml Amonyum persülfat.

D Çözeltisi; 1:1 oranında sulandırılmış A tamponu.

N-N'-N'-N'Tetrametil etilendiamin (TEMED), %10'luk SDS, 14 M β -Merkapto etanol, Brom Phenol Blue (BFB) ve Gliserin.

Boyama solüsyonu; 0.25 gr Coomasie Brilliant Blue R-250, 25 ml Metil alkol, 15 ml Glasiyel asetik asit, 60 ml saf su.

Boya çıkarma solüsyonu; 50 ml Metil alkol, 75 ml Glasiyel asetik asit, hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

Jellerin hazırlanması: Jel solüsyonu olarak kullanılan 15 ml A tamponu, 13.5 ml B çözeltisi, 1.5 ml C çözeltisi ve 45 µl TEMED buz içinde karıştırılarak hazırlandı. 80 x 5 mm ebadındaki jel tüpleri, alt kısmı parafilm ile kapatılmış bir şekilde jel hazırlama aparatına yerleştirildi. Buz içinde sürekli karıştırılarak hazırlanan jel solüsyonu jel tüplerine 6 cm olacak kadar dolduruldu. Jelleşmenin düzgün bir şekilde olması için üzerine 1 ml saf su konuldu. Jelin polimerizasyonu bekletilerek sağlandı. Elektroforez işlemi için hazırlanmış tüplere saf su, 2 µl A tamponu, 5 µl SDS(%10), 1 µl β-Merkapto etanol (14 M) ve saf su ile protein çözeltilerinin bu ilave edilen çözeltiler ile birlikte hacmi 75 µl olacak şekilde saf su ve protein çözeltileri ilave edildi. Proteinlerin denatüre olması için tüpler 10 dakika 90°C'de ısıtıldı. Daha sonra tüplere 10 µl BFB, 20 µl Gliserin, 5 µl β-Merkapto etanol (14 M) ve 50 µl D tamponu ilave edildi.

Jel tüplerinin alt yüzeyini kapatan parafilm çıkarılarak, jel tüpleri elektroforez aygıtına yerleştirildi. Hazırlanmış protein çözeltileri jel tüplerine verildi. Önceden hazırlanan A tamponu aygıtın alt ve üst bölümlerine boşaltıldı. Tamponun üst yüzeylerinin akım geçecek olan elektrodlerle temas etmesi sağlandı. Aynı şekilde jellerin alt ve üst uçlarının solüsyonla temasa etmesi ve uçlarında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Her jel için 8 mA'lık akım uygulanarak elektroforez başlatıldı. BFB boyasının tüp içerisindeki ilerleyişi kontrol edilerek proteinlerin yürümesi izlendi. BFB boyası jel tüplerinin alt kısmına yaklaşıncaya akım kesilerek elektroforez işlemine son verildi. Jel tüplerindeki jeller bir enjektör yardımı ile jel tüplerinden çıkarıldı. BFB boyasının ilerlediği mesafeyi bilmek için boyanın ilerlemiş olduğu kısım bir iğne yardımı ile delindi. Jeller temiz tüplere alınarak, üzerlerine boyama solüsyonu bırakılıp, jellerin boyanması için 30 dakika beklenildi. Jeller boyadan alınarak üzerlerindeki boyanın çıkması için boya çıkarma solüsyonu dökülerek beklendi. Böylece blokörler ve ağır metal ilave edilmiş SB sıvı besi yerinde ki *B. subtilis*'in besi yerine salgılamış olduğu ekzoenzimlerin elektroforez bant profilleri incelendi.

2.15 Protein miktar tayini

Protein miktarları Lowry yöntemine göre saptandı (94).

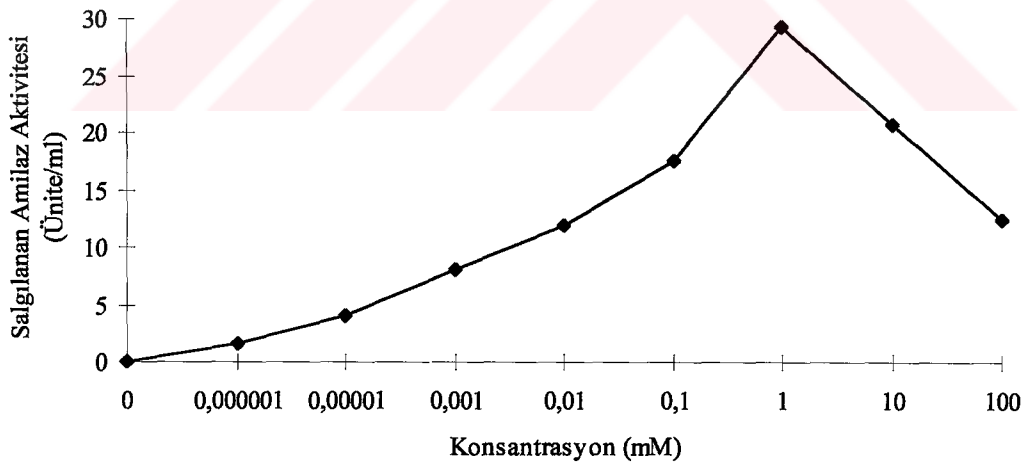
Alkalın çözeltisi: %4 Na_2CO_3 , %4 Na-K Tartarat ve %2 CuSO_4 hazırlandı. Bu çözeltilerin oranı sırası ile 100:1:1 olacak şekilde hazırlanarak kullanıldı.

Folin reaktifi: 100 gr $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 gr $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 ml %85'lik H_3PO_4 , 100 ml derişik HCl, 150 gr LiSO_4 , birkaç damla Br_2 , hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Standart eğriyi çizmek için 1mg/ml'lik Bovine serum albumin (BSA) hazırlandı. Bütün tüplere saf su ve protein miktarı 500 μl olacak şekilde saf su ve protein çözeltileri ilave edildi, sadece bir tüpe 500 μl saf su ilave edildi ve bu tüp kör olarak spektrofotometrede sıfır (0) ayarı için kullanıldı. Tüplerin hacmi saf su ve protein çözeltileri ile 500 μl olduktan sonra her bir tüpe 5 ml alkalın çözeltisi ilave edilip, 15 dakika 40°C'de su banyosunda bekletildi. Daha sonra üzerlerine Folin reaktifinden (1:1 saf su ile sulandırılmış) 500 μl katılarak, 30 dakika karanlıkta bekletildi. Süre sonunda 660 nm dalga boyunda köre karşı absorpsiyon değerleri okundu. A_{660} değerlerine karşılık gelen BSA protein miktarlarından yararlanılarak standart doğru çizildi. Örneklerin protein içeriği, 660 nm'de okunan absorpsiyon değerleri kullanılarak standart eğriden hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1 CaCl_2 Oranlarının NB ve SB Sıvı Besi Yerlerinde α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

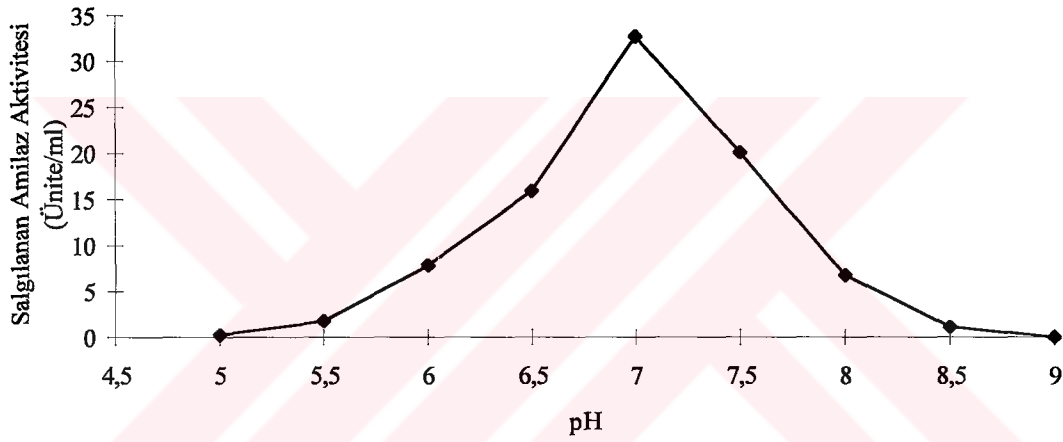
SB ve NB sıvı besiyerinde α -amilaz sekresyonuna CaCl_2 'nin etkilerini inceleyebilmek için 10^{-8} M'dan 100 mM'a kadar CaCl_2 'li olarak hazırlanan besiyerlerine eşit miktarda bakteri ekimi yapıldıktan sonra α -amilaz aktiviteleri Bernfeld metodu ile belirlendi. Grafik (1)'de görüldüğü gibi 7 farklı CaCl_2 oranına sahip sıvı besiyerlerinde optimal α -amilaz aktivitesi gösteren ortamın 1 mM CaCl_2 içeren sıvı besiyeri olduğu belirlendi.



Grafik 1 : SB ve NB sıvı besiyerlerinde 10^{-8} -100 mM CaCl_2 oranları uygulanması ile eşit sürelerdeki α -amilaz aktiviteleri.

3.2 SB ve NB Sıvı Besi Yerlerinde pH'nın α -Amilaz Sekresyonu Üzerine Etkisi

Sıvı besi yerlerinde α -amilaz sekresyonuna pH'nın etkilerini inceleyebilmek için pH 5-9 aralığında NB ve SB sıvı besi yerleri hazırlandı. Bu besi yerlerine eşit miktarda bakteri ekimi yapıldıktan sonra α -amilaz aktiviteleri Bernfeld metodu ile belirlendi. Grafik (2)'de görüldüğü gibi 9 farklı pH oranına sahip sıvı besi yerlerinde maksimum α -amilaz aktivitesi gösteren ortamın pH=7 olduğu belirlendi.

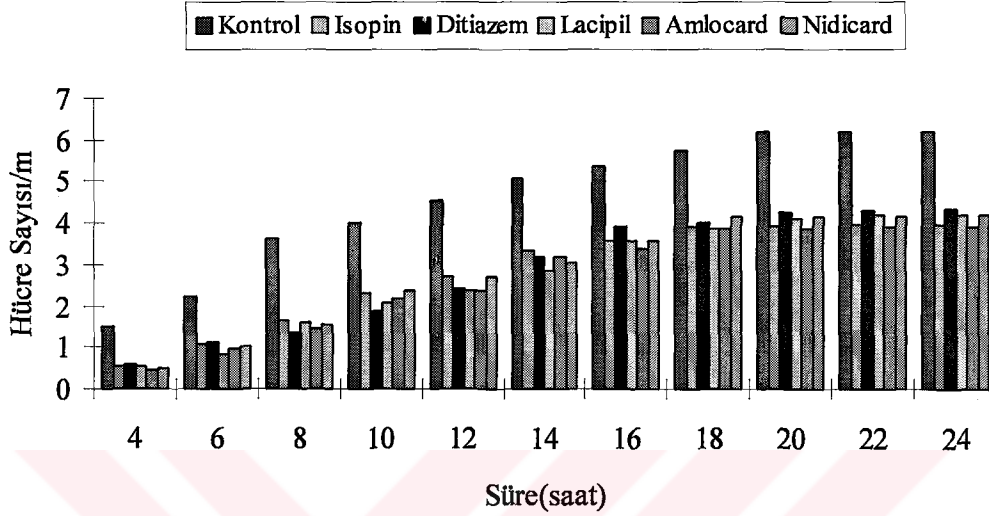


Grafik 2 :SB ve NB sıvı besi yerlerine pH=5-9 aralığındaki pH'larda ve eşit sürelerdeki α -amilaz aktiviteleri.

3.3 Kalsiyum Kanal Blokörlerinin Bakteri Üremesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Katı besi yerinde üretilip 100 ml'lik sıvı besi yerine aktarılan bir koloni 37°C'de çalkalamalı bir ortamda 8 saat ön inkübasyona bırakıldıktan sonra, eşit miktarda bakteri içeren 100'er ml'lik SB sıvı besi yerine kalsiyum kanal blokörleri ilave edilerek, bu ortamda 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saat süre boyunca üremeye bırakıldı. Bu saatler sonunda 460 nm dalga boyunda, kalsiyum kanal

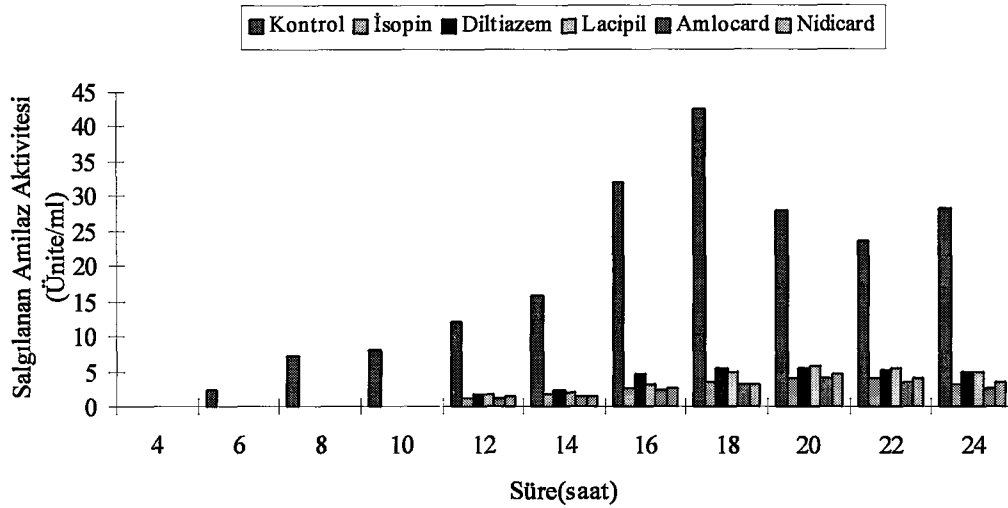
blokörlerinin bakteri üremesi üzerine olan olumsuz etkisinin 4, 6, 8, 10 ve 12. saatte sırası ile % olarak 32, 24, 22, 19 ve 18 değerlerinde iken 14. saatten itibaren üreme üzerine olan etkisinin %15 değerinde kaldığı ve bu değer 24. saate kadar değişmediği gözlemlendi.



Grafik 3 : SB sıvı besi yerinde 4-24 saat süre ile kalsiyum kanal blokörleri ile etkileştirilen bakterilerin 460 nm’de mililitre besi yerindeki sayıları.

3.3.1 Kalsiyum Kanal Blokörlerinin α -Amilaz Sekresyonu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

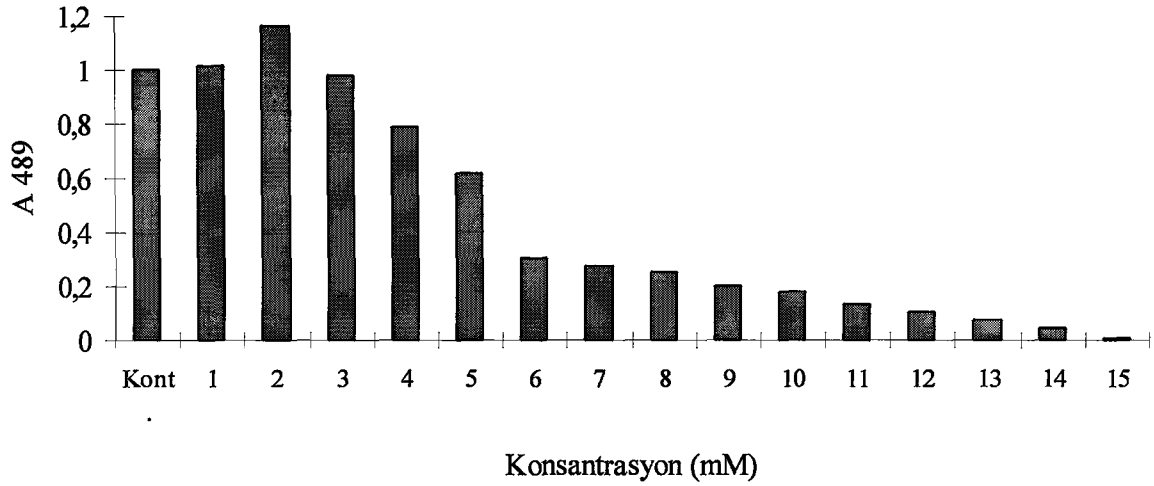
Katı besi yerinde üretilip 100 ml’lik sıvı besi yerine aktarılan bir koloni 37°C’de çalkalamalı bir ortamda 8 saat ön inkübasyona bırakılıp, bakteri miktarı eşitlendikten sonra 100’er ml’lik SB sıvı besi yerine kalsiyum kanal blokörleri ilave edilerek, bu ortamda 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saat süre boyunca üremeye bırakıldı. Bu süreler sonunda üst sıvılarda yapılan α -amilaz aktivite tayininde kontrole nazaran enzim sekresyonunda önemli ölçüde düşüş olduğu tespit edildi. Ayrıca kontrolde 6. saatte α -amilaz aktivitesine rastlanırken blokörlerde aktiviteye 12. saatte rastlandı ve kontrolde 18. saatte aktivite maksimum iken blokörlerde 20. saatte aktivitenin maksimum olduğu saptandı. Kontrol ve blokörlerde enzim aktivitesinin maksimum olduğu saatler poli akrilamid jel elektroforezinde proteinlerin elektroforez profilleri incelendi (Resim 1).



Grafik 4 : SB sıvı besi yerinde 4-24 saat süre ile kalsiyum kanal blokörleri ile etkileştirilen bakteri üst sıvılarındaki α -amilaz aktiviteleri.

3.4 Ticari α -Amilazın CaCl_2 ile Optimizasyonu

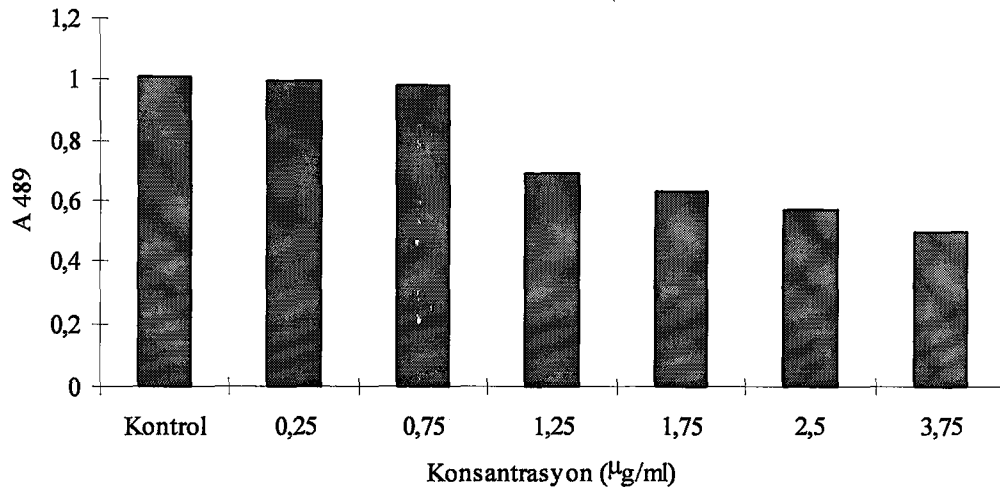
Ticari α -amilazı bu enzimin kofaktörü olan kalsiyum ile 1-15 mM oranlarında aktivite tayininden önce enzim ile etkileştirilerek aktivite tayinine gidildi. Grafik 5’de görüldüğü gibi ticari α -amilaz belirli oranlarda CaCl_2 ile etkileştirildikten sonra kontrole nazaran CaCl_2 konsantrasyonundan etkilendiği en iyi aktivitenin 2 mM CaCl_2 içeren ortamda gerçekleştiği buna karşın 3 mM CaCl_2 konsantrasyonundan itibaren kontrole nazaran giderek aktivite kaybettiği tespit edildi.



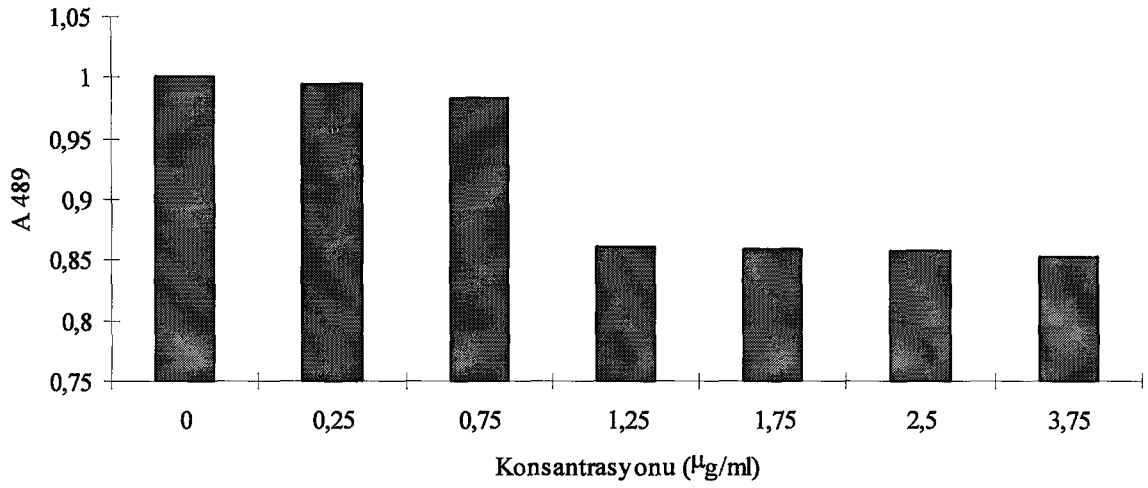
Grafik 5 : Ticari α -amilaz 1-15 mM CaCl_2 ile etkileştirildikten sonra yapılan aktivite tayininde enzimin 489 nm'deki aktivitesi.

3.4.1 Lacipil ve Diltiazemin α -Amilaz Üzerine In-Vitro Etkisi

Kalsiyum kanal blokörlerinden Lacipil ve Diltiazemin, α -amilaz üzerine in vitro etkisinde, besi yerinin mililitresindeki kalsiyum kanal blokörlerinin miktarı hesaplanarak (250 $\mu\text{g/ml}$) ve bu oranların üzerine çıkılarak aktivite tayini yapıldı. Besi yerindeki kalsiyum kanal blokör oran miktarının in vitro olarak etki göstermediği bu miktarın üzerindeki değerlerde kontrole nazaran inhibisyon etkisinin arttığı gözlemlendi.



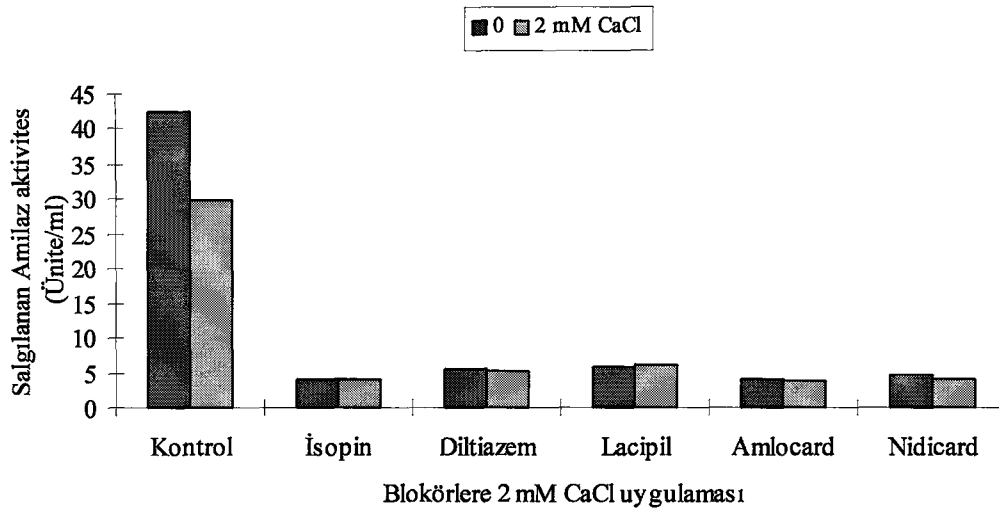
Grafik 6 : SB sıvı besi yerindeki Lacipil (250 $\mu\text{g/ml}$) miktarının in vitro oranlarda uygulanması.



Grafik 7 : SB sıvı besi yerindeki Diltiazem miktarının (250 µg/ml) in vitro oranlara uygulanması.

3.5 Kalsiyum Kanal Blokörleri ile Etkileştirilen Bakterilerden Elde Edilen Üst Sıvıların CaCl_2 ile Etkileştirilmeleri

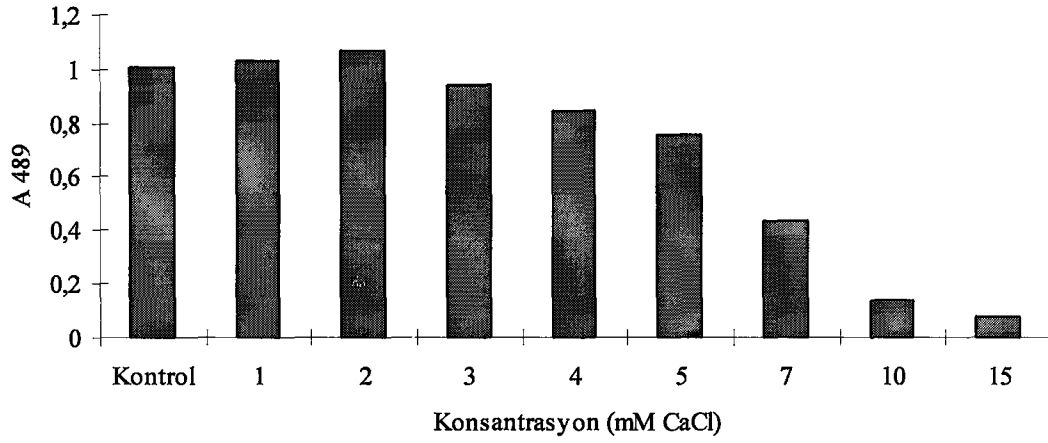
Kalsiyum kanal blokörleri ile etkileştirilen bakterilerden elde edilen üst sıvılardan daha önce yapılan aktivite tayininde en yüksek α -amilaz aktivitesi gösteren örnekler alındı. Bu üst sıvılara 2 mM CaCl_2 ilave edilip aktivite tayini yapıldı. Grafik 8'de görüldüğü gibi bakteriyel üst sıvılara CaCl_2 ilavesinin aktivitede önemli ölçüde bir değişiklik yapmadığı tespit edildi.



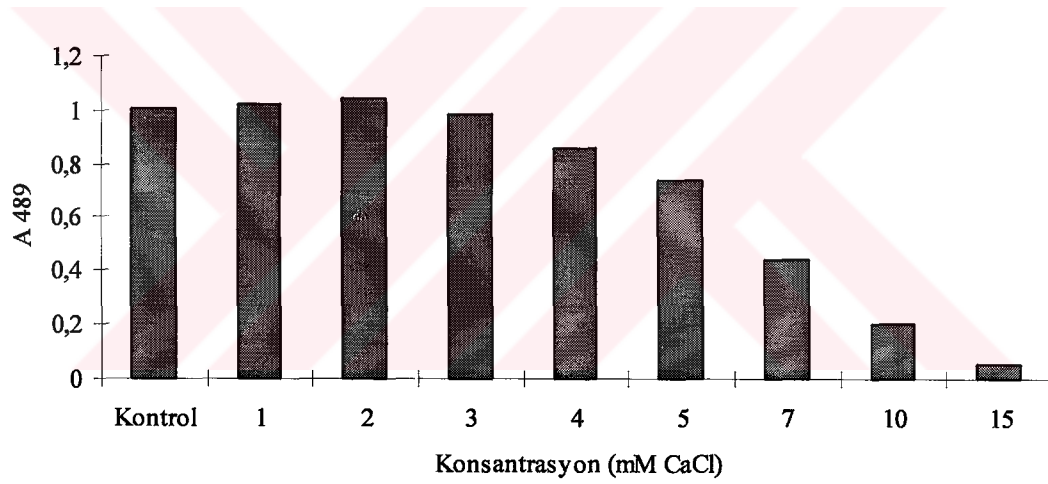
Grafik 8 : Kalsiyum kanal blokörleri ile etkileştirilen bakterilerden elde edilen α -amilaz içeren üst sıvılara 2 mM CaCl₂ uygulaması ile 489 nm'deki α -amilaz aktiviteleri.

3.6 In-Vitro Koşullarda Lacipil ve Diltiazeme Artan Oranlarda CaCl₂ Kullanılması

SB sıvı besiyerindeki Lacipil ve Diltiazem miktarlarına eşdeğer miktardaki Lacipil (250 μ g/ml) ve Diltiazem (250 μ g/ml), 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 ve 15 mM CaCl₂ ile 15 dakika inkübe edilmiş α -amilaz ile etkileştirildikten sonra aktivite tayini yapıldı. Deney sonucunda, her iki blokörde de maksimum aktivitenin 2 mM CaCl₂ içeren ortamda gerçekleştiği, daha yüksek oranların ise artan oranda inhibe ettiği görüldü (Grafik 9-10).



Grafik 9 : SB sıvı besi yerindeki Lacipil (250µg/ml) oranına eşit miktardaki Lacipil'in 1-15 mM CaCl₂ ile etkileştirildikten sonra yapılan aktivite tayinde 489 nm'deki α-amilaz aktiviteleri.

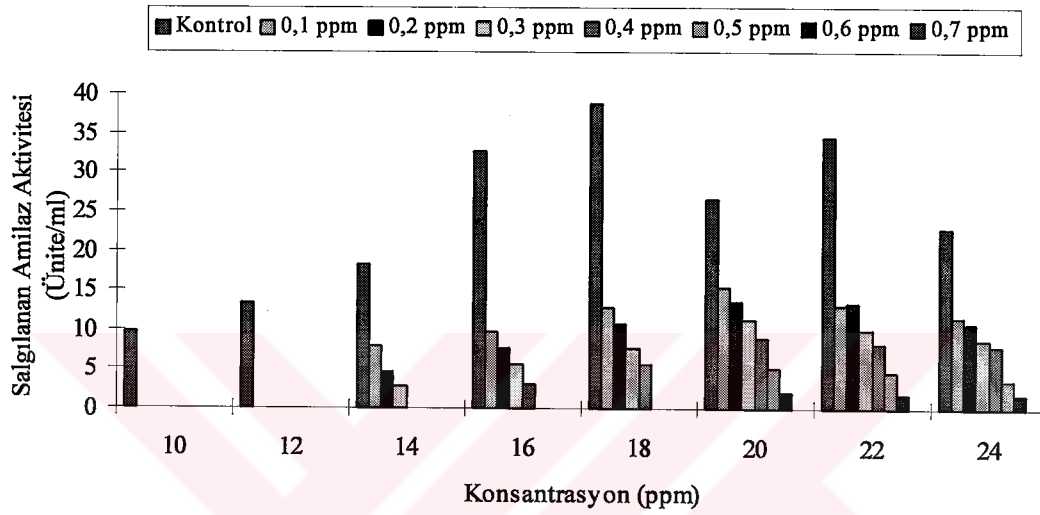


Grafik 10 : SB sıvı besi yerindeki Diltiazem oranına (250 µg/ml) eşit miktardaki Diltiazem'in 1-15 mM CaCl₂ ile etkileştirildikten sonra yapılan aktivite tayinde 489 nm'deki α-amilaz aktiviteleri.

3.7 SB Besi Yerinde Ağır Metallerin α-Amilaz ve Plazmit Üzerine Etkileri

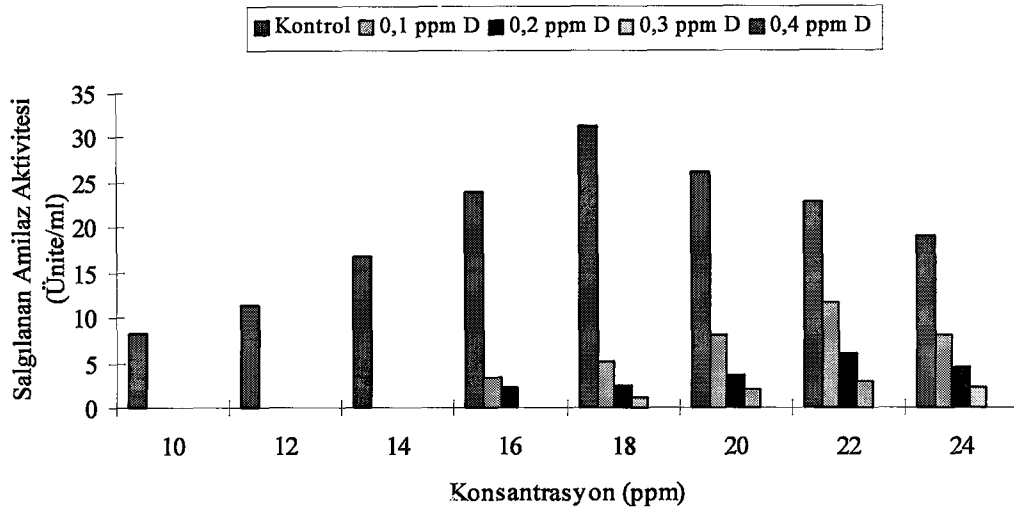
SB besi yerine ağır metal olarak 0,1-0,7 ppm HgCl₂ ilavesi ile sıvı besi yerindeki bakteriyel α-amilaz aktivitesine bakıldı. 0,1, 0,2 ve 0,3 ppm HgCl₂ içeren besi yerlerinde α-amilaz sekresyonuna 14. saatte rastlandı. 0,4 ppm HgCl₂ içeren besi

yerindeki α -amilaz aktivitesine 16. saatte, 0,5 ve 0,6 ppm HgCl_2 içeren besi yerinde ise 20. saatte, 0,7 ppm HgCl_2 içeren besi yerinde ise üreme görülmedi. Kontrol ve (0,1-0,6) ppm oranlarında HgCl_2 ilave edilmiş SB sıvı besi yerinde enzim aktivitesinin maksimum olduğu saatler poli akrilamid jel elektroforezinde proteinlerin elektroforez profilleri incelendi (Resim 2).



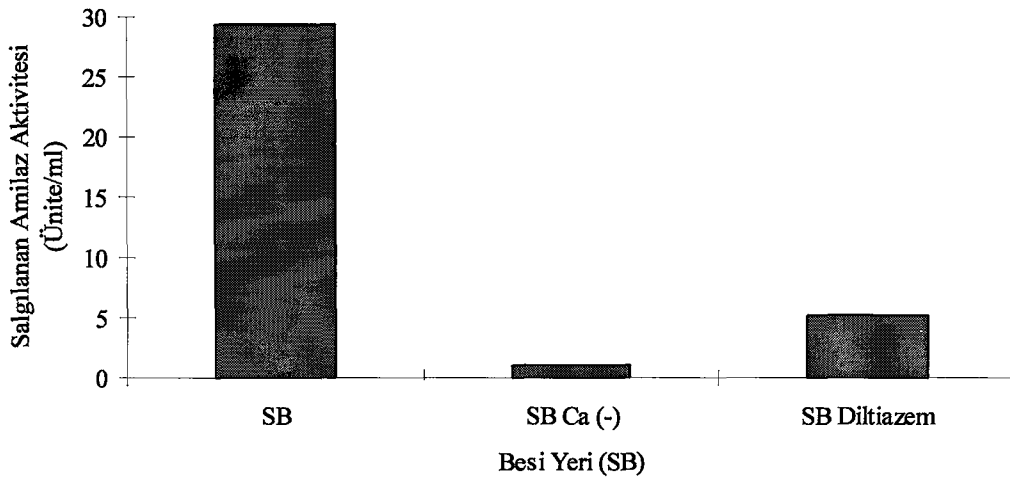
Grafik 11 : HgCl_2 'nin SB sıvı besi yerine 0,1-0,7 ppm değerlerinde kullanılması ile bu besi yerlerinde iki saatte bir üst sıvılarındaki α -amilaz aktiviteleri.

SB besi yerinde ağır metal optimizasyonu yapıldıktan sonra bu besi yerlerine Diltiazem ilave edilip üst sıvıda α -amilaz aktivitesi kontrol ile kıyaslanıp incelendi. 16. saatte 0,1 ve 0,2 ppm HgCl_2 ve Diltiazem'i içeren besi yerinde α -amilaz aktivitesine rastlandı. 0,3 ppm HgCl_2 ve Diltiazem'i içeren besi yerinde ise α -amilaz aktivitesine 20. saatte, 0,4 ppm HgCl_2 ve Diltiazem'i içeren besi yerinde ise üreme görülmedi. Kontrol ve (0,1-0,3) ppm oranlarında HgCl_2 ve Diltiazem'i beraber içeren SB sıvı besi yerinde enzim aktivitesinin maksimum olduğu saatler poli akrilamid jel elektroforezinde proteinlerin elektroforez profilleri incelendi (Resim 3).



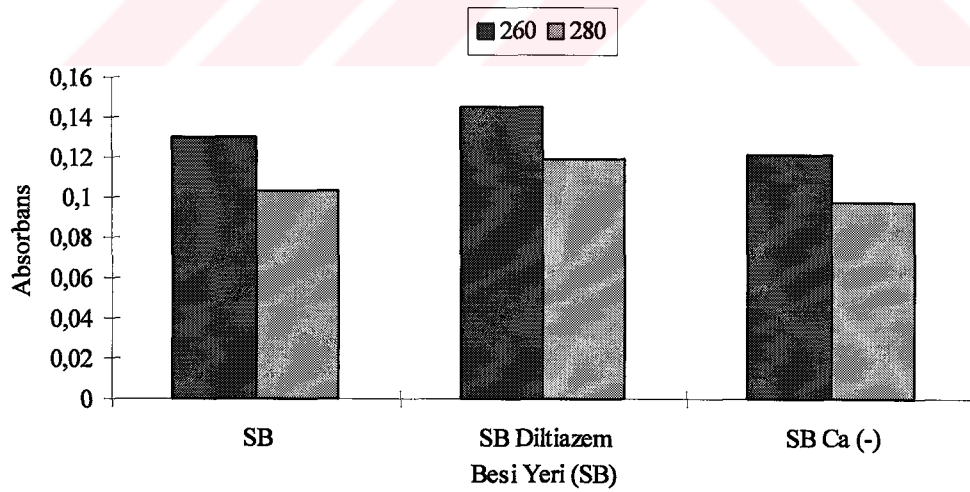
Grafik 12 : SB sıvı besi yerine 0,1-0,4 ppm HgCl_2 'nin ve Diltiazem'in beraber kullanılması ile bu besi yerlerinden 10-24. saatler arası iki saatte bir alınan üst sıvı örneklerindeki α -amilaz aktiviteleri.

SB sıvı besi yeri kontrol olarak hazırlanıp bu besi yerinden CaCl_2 içermeyen besi yeri ve SB sıvı besi yerine Diltiazem ilavesi yapılarak üst sıvıda α -amilaz aktivitesi yapıldı. Çökelti toplanıp bakteri absorbansı eşitlendikten sonra plazmit çalışmasına gidildi. α -amilaz aktivite tayininde kontrole nazaran α -amilaz aktivitesinde önemli ölçüde bir düşüş gözlemlendi. Aktivite kaybının 10^{-3} M CaCl_2 içermeyen SB sıvı besi yerinde, 10^{-3} M CaCl_2 ve Diltiazem'i beraber içeren besi yerine göre daha fazla olduğu görüldü. Kontrol, CaCl_2 içermeyen SB sıvı besi yeri ve Diltiazem içeren SB sıvı besi yerinde enzim aktivitesinin maksimum olduğu saatler poli akrilamid jel elektroforezinde proteinlerin elektroforez profilleri incelendi (Resim 4).



Grafik 13 : SB sıvı besi yeri, SB sıvı besi yerinden CaCl_2 çıkarılması ve SB sıvı besi yerine Diltiazem ilavesi ile yapılan besi yerlerindeki α -amilaz aktiviteleri.

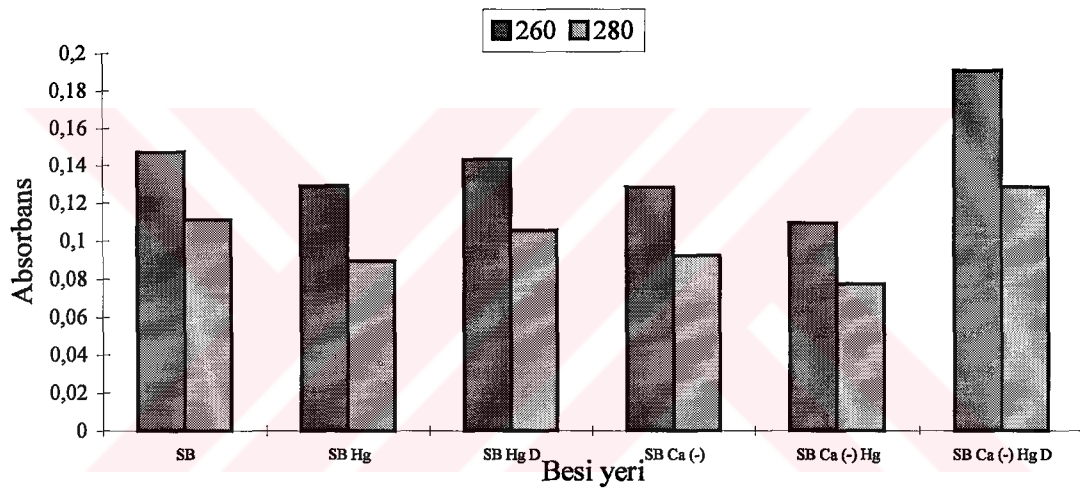
Bu besi yerlerinden elde edilen bakterilerin “boiling metodu” ile yapılan plazmit çalışmasından sonra alınan spektrofotometrik ölçümlerle, saflaştırılan plazmitlerin 260, 280 ve 260/280 oranları tespit edildi. Bu plazmitler agaroz jel elektroforezine verilerek elektroforetik bantları incelendi (Resim 5).



Grafik 14 : SB sıvı besi yeri, SB sıvı besi yerinden CaCl_2 çıkarılması ve SB sıvı besi yerine Diltiazem ilavesi ile yapılan besi yerlerindeki plazmit çalışmasının 260 ve 280 nm’deki absorbans değerleri

SB sıvı besi yeri kontrol olarak hazırlanıp bu besi yerinden 0.2 ppm HgCl_2 ve 0.2 ppm HgCl_2 ile birlikte Diltiazem, CaCl_2 içermeyen besi yeri ve bu besi yerinden

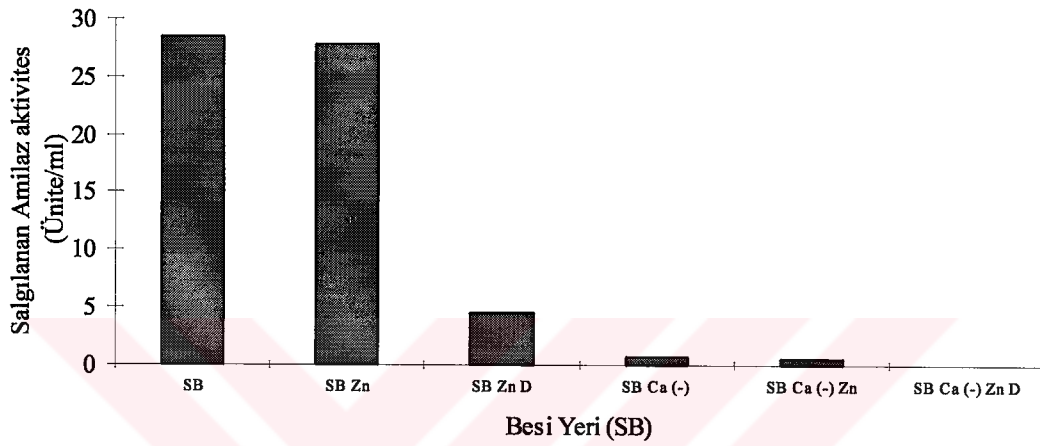
0.2 ppm HgCl_2 ve 0.2 ppm HgCl_2 ile birlikte Diltiazem'i içeren SB sıvı besi yerleri hazırlandı. Üst sıvıda α -amilaz aktivitesi yapıldı ve bakteri absorbansı eşitlendikten sonra çökelti toplanıp plazmit çalışmasına gidildi. α -amilaz aktivite tayininde kontrole nazaran 0.2 ppm HgCl_2 içeren ve CaCl_2 içermeyen SB sıvı besi yerindeki α -amilaz aktivitesinin önemli ölçüde düştüğü, 0.2 ppm HgCl_2 ile birlikte Diltiazem içeren SB besi yerinde ve CaCl_2 içermeyen 0.2 ppm HgCl_2 ve 0.2 ppm HgCl_2 ile birlikte Diltiazem'i içeren SB sıvı besi yerlerinde aktivite gözlenmedi. Bu besi yerlerinin plazmit çalışmalarının 260 ve 280 nm'deki absorbansları Grafik 15'de agaroz jel elektroforezi ise Resim 6'da görülmektedir.



Grafik 15: SB sıvı besi yeri ve bu besi yerine 0.1 ppm HgCl_2 ve HgCl_2 ile Diltiazem ilave edilmiş ayrıca SB sıvı besi yerindeki CaCl_2 çıkarılıp HgCl_2 ve HgCl_2 ile Diltiazem ilave edilmiş SB sıvı besi yerlerindeki plazmit çalışmasının 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri.

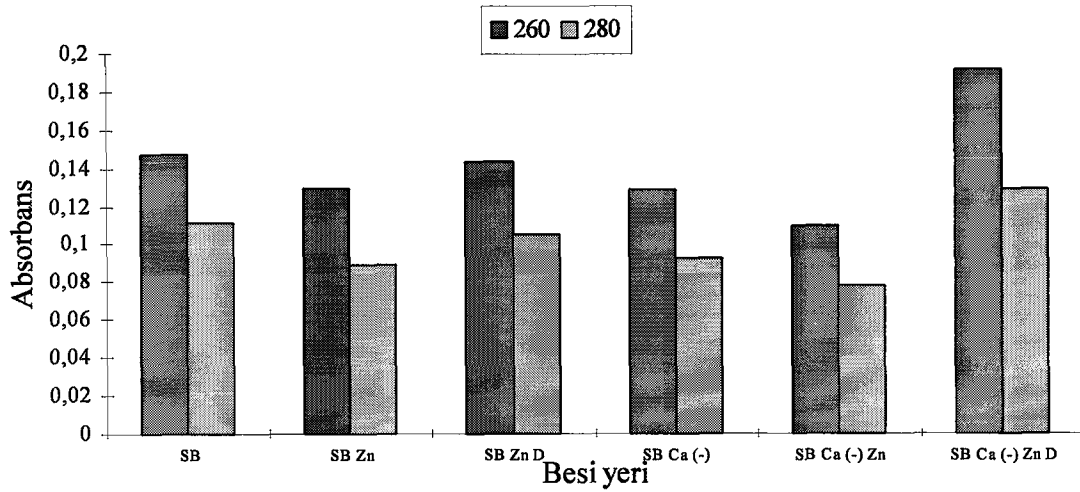
SB sıvı besi yeri hazırlanarak bu sıvı besi yerine ağır metal olarak 10^{-5} M ZnCl_2 ilave edildi ayrıca Zn^{2+} içeren diğer bir SB besi yerine Diltiazem ilave edildi. CaCl_2 'nin etkisini karşılaştırmak üzere SB sıvı besi yeri CaCl_2 içermeyecek şekilde hazırlandı. 10^{-5} M ZnCl_2 ilavesi yapılmış olan SB besi yerinde aktivitenin kontrole nazaran çok az bir düşüş gösterdiği, Diltiazem ilavesi ile 10^{-5} M ZnCl_2 içeren SB besi yerinde enzim sekresyonunun %80 oranında inhibisyona uğradığı saptandı. CaCl_2 içermeyen SB besi yeri kontrol olarak hazırlanıp bu besi yerine 10^{-5} M ZnCl_2 ilavesi ve

yine 10^{-5} M ZnCl_2 'ye ilaveten Diltiazem ilave edilmiş SB besi yerindeki aktiviteler kıyaslandığında sırası ile CaCl_2 içermeyen SB besi yerindeki aktiviteyi, 10^{-5} M ZnCl_2 içeren SB besi yerindeki aktivitenin izlediği görüldü. 10^{-5} M ZnCl_2 ve Diltiazem içerip CaCl_2 içermeyen SB besi yerinde ise üreme görülmeydi. Bu besi yerlerindeki α -amilaz aktiviteleri Grafik 16'da, elektroforez bant profilleri ise Resim 7'de görülmektedir.



Grafik 16 : SB sıvı besi yeri ve bu besi yerine 10^{-5} M ZnCl_2 ve ZnCl_2 ile Diltiazem ilave edilmiş ayrıca SB sıvı besi yerindeki CaCl_2 çıkarılıp ZnCl_2 ve ZnCl_2 ile Diltiazem ilave edilmiş SB sıvı besi yerindeki α -amilaz aktiviteleri.

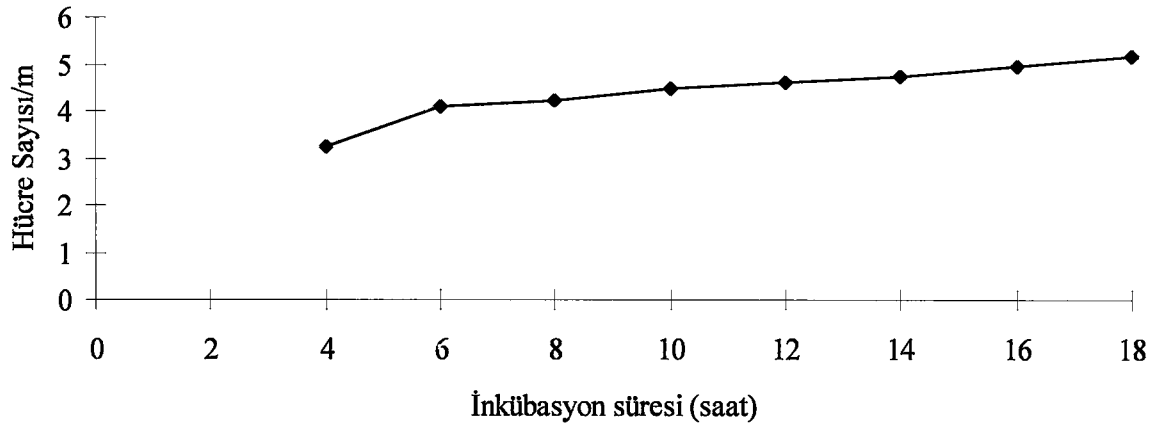
Bu besi yerlerinden elde edilen bakterilerin “booling metodu” ile yapılan plazmit çalışmasından sonra alınan spektrofotometrik ölçümlerle, saflaştırılan plazmitlerin 260, 280 ve 260/280 oranları tespit edildi. Kontrole oranla CaCl_2 içermeyen 10^{-5} M ZnCl_2 ve Diltiazem içeren besi yerinde 260 nm'deki absorbans değerinin yüksek olduğu gözlemlendi.



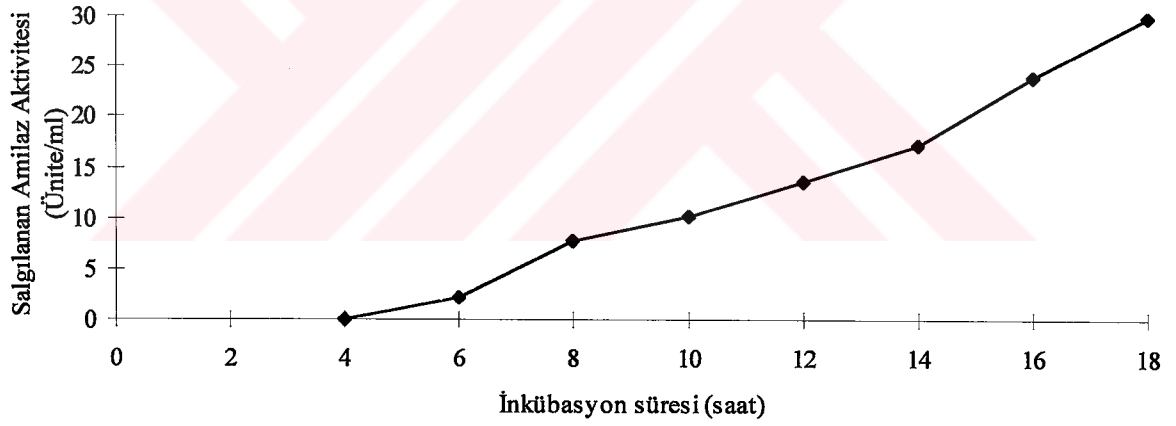
Grafik 17 : SB sıvı besi yeri ve bu besi yerine 10^{-5} M $ZnCl_2$ ve $ZnCl_2$ ile Diltiazem ilave edilmiş ayrıca SB sıvı besi yerindeki $CaCl_2$ çıkarılıp $ZnCl_2$ ve $ZnCl_2$ ile Diltiazem ilave edilmiş SB sıvı besi yerlerindeki plazmit çalışmasının 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri.

3.8 α -Amilazın Üretim Zamanının Saptanması

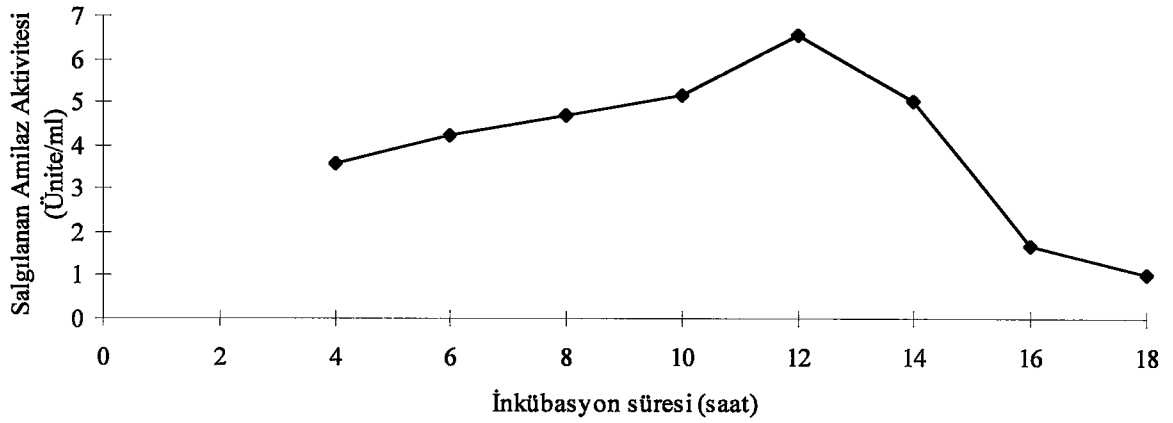
Katı besi yerinde üretilip 100 ml'lik NB sıvı besi yerine aktarılan bir koloni $37^\circ C$ 'de çalkalamalı bir ortamda 8 saat ön inkübasyona bırakıldıktan sonra bakteri miktarı eşitlemesi ile 500'er ml'lik NB sıvı besi yerine aktarılarak, bu ortamda 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 saat boyunca üretildi. Eşit bakteri ekimi ile farklı saatlerde üretilen bakteri kültürleri santrifürlenerek üst sıvıda ve membranda α -amilaz aktivitesi saptandı. Membranda 4. saatten itibaren α -amilaz aktivitesine, dışarıya salgılanan ve santrifüjle üst sıvı olarak elde edilen kısımda ise daha ileriki saatlerde rastlandı. Membranda aktivite 12. Saatte maksimuma ulaştığı tespit edildi. Üst sıvıda ise α -amilaz aktivitesi 18. saatte maksimuma ulaştığı tespit edildi.



Grafik 18 : NB sıvı besi yerinde üretilen *B. subtilis*'in 4-18. saatler aralığındaki 460 nm'de militre besi yerindeki bakteri miktarı

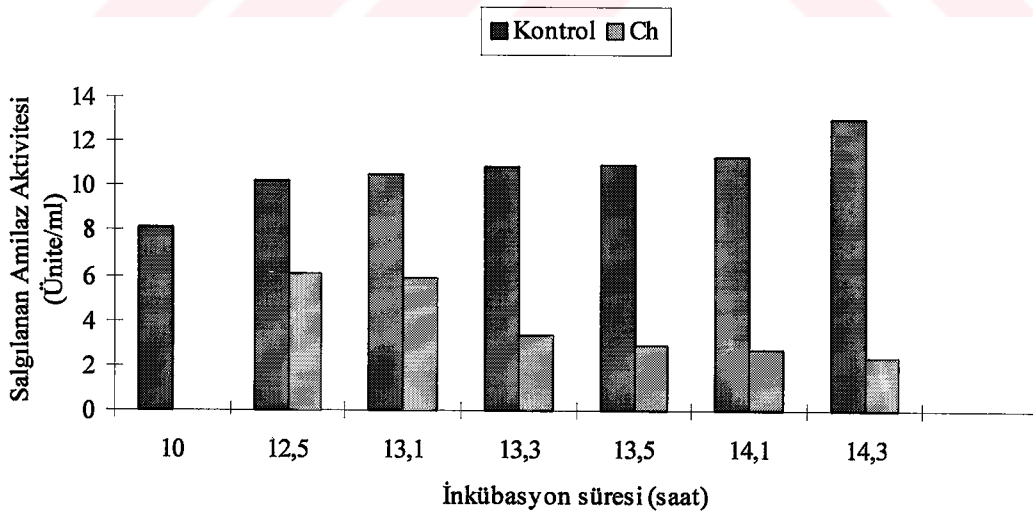


Grafik 19 : NB sıvı besi yerinde üretilen *B. subtilis*'in 4-18. saatler aralığındaki üst sıvılarından elde edilen α -amilaz aktiviteleri.

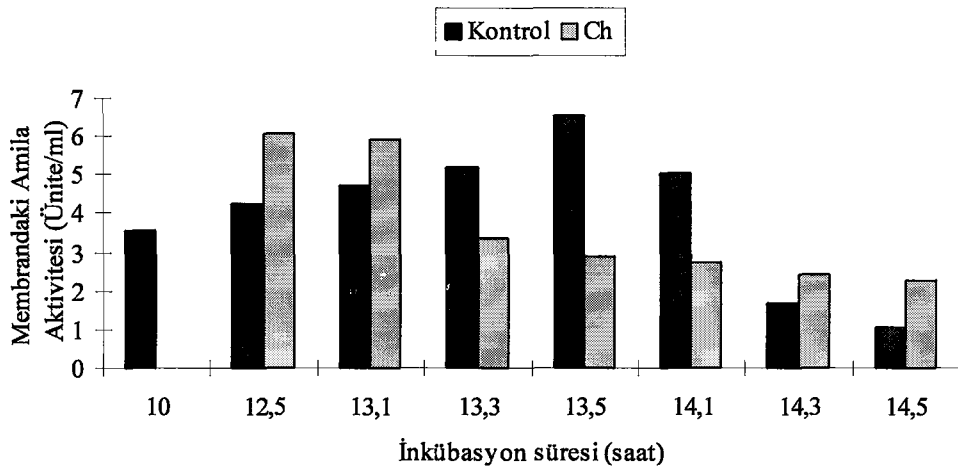


Grafik 20 : NB sıvı besi yerinde üretilen *B. subtilis*'in 4-18. saatler aralığındaki membrandan elde edilen α -amilaz aktiviteleri.

Sıvı besi yerinde üretilen bakterilere 170 $\mu\text{g/ml}$ oranında Ch ilavesi yapıldıktan 2,5 saat sonra 20 dakikada bir üst sıvı ve bakteri örnekleri alındı. Üst sıvıda α -amilaz aktivitesinin geçen süre ile paralel bir artış gösterdiği membran çalışması ile elde edilen α -amilaz aktivitesinin ise kontrole nazaran erken başladığı tespit edildi.



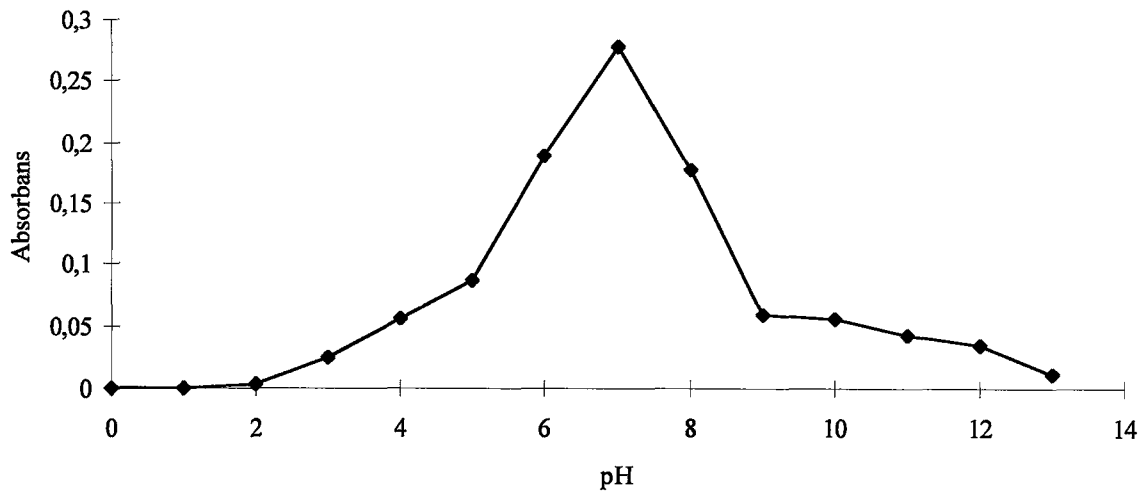
Grafik 21 : Ch ilavesi ile kontrol ve antibiyotikli ortamda üst sıvıda α -amilaz aktivitesi.



Grafik 22 : Kontrol ve Ch ilave edilmiş SB besi yerinde membran çalışması ile elde edilen 489 nm'deki α -amilaz aktivitesi.

3.9 Nötral Proteaz Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

B. subtilis'in salgıladığı iki proteazdan biri olan nötral proteaz çözeltisi 1 mg/ml hazırlanarak, aktivite tayin testinde kullanılan tampon ve kazein çözeltileri pH 1-13 aralığında hazırlanarak enzim bu tampon ve çözeltileri ile etkileştirilerek, nötral proteaz üzerine iyon konsantrasyonunun etkisi incelendi. Aktivitenin pH=7'de maksimum olduğu gözlemlendi.



Grafik 23 : pH 1-13 aralığında nötral proteazın 275 nm'deki absorbansları.

pH 1-13 aralığındaki enzim çözeltilerine kendi tampon ve substratları ile aktivite tayini yapıldıktan sonra bu sıvıların AAS'de Zn^{2+} miktarına bakıldı. Bu pH aralıklarında AAS'de bakılan çözeltilerde Zn^{2+} miktarı olarak bir farklılık gözlenmedi.

pH 2, 7 ve 13'de enzim çözeltisi hazırlanarak bu enzimlere kendi pH, tampon ve kazein çözeltileri ile aktivite tayini yapıldı. Daha sonra her enzim çözeltisi kendi pH değerindeki tamponu ile dializlendi. Dializ sonrası hacimlerine bakıldı. Miktar eşitlemesinden sonra, dializ öncesi aktivite ile dializ sonrası aktivite arasında bir fark olmadığı tespit edildi. Çinkonun bu enzimin aktif merkezinde bulunduğundan yola çıkarak aktivite test sistemine 10^{-5} M $ZnCl_2$ ilave edildi. Dializ öncesi ve sonrası aktiviteye bakıldı. Ortama çinko ilavesinin aktiviteyi etkilemediği gözlemlendi. PH 2, 7 ve 13'deki enzim çözeltilerine Lowry yöntemine göre protein miktar tayin testi kullanıldı. Her üç pH değerinde de protein miktarlarının uygunluk gösterdiği saptandı.

4. SONUÇLARIN TARTIŞILMASI

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği ve Nottingham Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümünden temin edilen *B. subtilis*'ler denenilen birçok besi yerlerinden, NB ve SB sıvı besi yerlerinde iyi üreme gösterdiği, α -amilaz ve plazmit ile yapılan deneylerimiz için en uygun besi yeri olarak tespit edilmesi, besi yeri içeriğinin, bakteriyel α -amilaz üretimi üzerine etkili olduğu izlenimini destekler niteliktedir. Her iki sıvı besi yerinde α -amilaz sekresyonuna CaCl_2 'nin etkileri incelendiğinde, α -amilaz aktivitesinin CaCl_2 oranıyla 1 mM seviyesine kadar doğru orantılı bir şekilde artması, 1mM düzeyinden sonra aktivitede düşüşün saptanması, α -amilazın aktivite gösterebilmesi için kofaktör olarak Ca^{2+} iyonlarına ihtiyaç göstermesi (8) ve Ca^{2+} 'nın α -amilaz aktivitesi üzerine stimülatör etkisi olduğu (19) bulgularını destekler niteliktedir. Besi yerinde fazla miktarda bulunan Ca^{2+} iyonlarının α -amilaz enziminin dializlenmesine ve enzim miktarının aynı oluşuna karşın inhibisyon etkisi yapması enzimin konformasyonunda meydana gelen bir değişikliğin olma olasılığını düşündürmektedir.

NB sıvı besi yerinde azot kaynağı olarak nutrient broth bulunması ve SB sıvı besi yerinde hem organik azot kaynağı (beef ve yeast extract) ve hem de karbon kaynağının (çözünür nişasta) olmasına rağmen α -amilaz sekresyonunun bu iki besi yerinde birbirine çok yakın değerler vermesinin, organik azot kaynaklarının besi yerindeki miktarının karbon miktarından daha fazla olması gerektiğini sezindirmektedir. Ortamda protein, peptid ve pepton gibi organik maddelerin varlığında bakterinin bunları kaynak olarak kullanıp ekzoenzim sentezini arttırdığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (2). Ancak organik azot kaynaklarının besi yerindeki miktarının yeterli olması durumunda karbon kaynağı olarak çözünür nişastaya gereksinim olmadığı NB ve SB sıvı besi yerlerinden elde edilen α -amilaz aktivitelerinin birbirine çok yakın olmasından dolayı anlaşılmıştır, bu durum daha önceki C/N oranının önemli olduğunu savunan araştırmalar ile çelişir bir bulgudur (13).

NB ve SB sıvı besi yerlerinde α -amilaz sekresyonuna pH'nın etkilerini inceleyebilmek için pH 5-9 aralığında hazırlanan sıvı besi yerlerinde pH=5,5'ta aktiviteye rastlandı ve bu pH'dan itibaren pH=7'ye kadar pH artışı ile α -amilaz aktivitesi arasında bir paralellik, pH=7'den sonra aktivitede bir düşüş saptandı. PH=9'da aktiviteye rastlanmadı, bu da daha önceki çalışmalar tarafından desteklenmektedir (78).

Katı besi yerinde üretilip 100 ml'lik sıvı besi yerine aktarılan *B. subtilis*'in bir kolonisi 37°C'de çalkalamalı olarak 8 saat ön inkübasyondan sonra SB sıvı besi yerine kalsiyum kanal blokörleri (İsopin, Diltiazem, Lacipil, Amlocard ve Nidicard) ilave edilerek değişik sürelerde üremeye bırakıldı. Bu saatler sonunda her saatin kontrolü ile blokörlü ortamdaki bakteri miktarları tespit edildi. Bu saatler sonunda, kalsiyum kanal blokörlerinin bakteri üremesi üzerine olan olumsuz etkisinin 4, 6, 8, 10 ve 12. saatlerde sırası ile % olarak 32, 24, 22, 19 ve 18 değerlerinde iken 14. saatten itibaren üreme üzerine olan inhibisyon yüzdesi 15 değerinde kaldığı ve bu değerin 24. saate kadar değişmediği gözlemlendi. Yine bu süreler sonunda santrifüjleme ile elde edilen üst sıvılarda yapılan α -amilaz aktivite tayininde kontrolde 18. saate kadar düzenli bir artış ve 18. saatte maksimum bir aktivite bu saatten itibaren aktivitede düşüş saptandı. Kalsiyum kanal blokörlerinde ise aktivitenin 12. saatte başladığı tespit edildi ve sekresyonun 22. saate kadar düzenli bir artış gösterdiği ve bu saatte maksimuma ulaştığı, daha sonraki saatlerde ise aktivitede bir azalma tespit edildi. α -amilaz aktivitesindeki bu azalmanın bakteri miktarı ile bir ilişkisinin olmadığı, aynı orandaki farklı saatteki kontrol ile kıyaslanınca aktivitenin kontrole göre düşük olduğu görüldü. SB sıvı besi yerinde aktivitenin 6. saate, blokörlerde ise 12. saatte aktiviteye rastlandı. Oysa 12. saatteki blokörler ile etkileştirilen bakteri miktarı 8. saatteki kontrolden daha yüksek bulunduğundan, bakteri miktarı ile α -amilaz sekresyonu arasında bir ilişkinin olmadığı ancak, blokörlerin α -amilaz sekresyonunu sekrete edilen kanalları tıkayarak gerçekleştirdiğini veya Ca^{2+} iyonlarının α -amilazın sentezlenmesinde etkili bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Yine bu kanallardan bakteri büyümesini sağlayan elzem maddelerin geçişi, blokörler tarafından engellendiğinden bakteri büyümesinin kontrole nazaran blokörler tarafından engellendiğini düşündürmektedir. Ayrıca ilerleyen sürelerde blokörlerin hücre içine alınması ile hücre içine alınan blokörlerin

bir kısmının metabolize edilebilmesinden dolayı üremenin kısmen de olsa artmış olabileceği düşünülmektedir. Kontrol ve blokörlerde enzim aktivitesinin maksimum olduğu saatlerin elektroforez bant profilleri incelendiğinde, kontrol ile eşit miktarda verilen blokörler ile etkileştirilmiş bakteri üst sıvılarında protein bantlarının görülmemesi, blokörlerin enzim sekresyonunu engellediği düşüncesini doğrulamaktadır (Resim 1). Bu veriler doğrultusunda α -amilaz sentezinin hücre dışından uyarıldığı düşünülmektedir.

Ticari α -amilaz, 1-15 mM oranlarındaki CaCl_2 ile aktivite tayininden önce enzim ile etkileştirilerek yapılan aktivite tayininde 1 mM CaCl_2 konsantrasyonunun, kontrole nazaran aktiviteyi arttırdığını, 2 mM CaCl_2 konsantrasyonunda aktivitenin maksimum olduğu ve bu konsantrasyondan daha yüksek CaCl_2 konsantrasyonlarında enzim üzerine inhibisyon etkisi yaptığı saptandı. Bu inhibisyonun ortamda bulunan fazla miktardaki CaCl_2 konsantrasyonunun enzimin konformasyonunda yapmış olabileceği değişikliklerden dolayı enzimde aktivite kaybına neden olduğu düşünülmektedir. CaCl_2 konsantrasyonunun artması ile inhibisyonadaki paralellik ve sıvı besi yerinde de 1 mM CaCl_2 konsantrasyonundan sonra enzim aktivitesindeki düşüş bu düşüncelerimizi doğrulamaktadır.

Kalsiyum kanal blokörlerinden Lacipil ve Diltiazem'in α -amilaz üzerine in vitro etkisi incelendiğinde, her iki blokörde de besi yerindeki blokör oran miktarının (250 $\mu\text{g/ml}$) in vitro olarak enzimi etkilemediği ancak, besi yerindeki blokör oranının 5 katı kadar blokör oranında inhibisyon etkisinin gözlemlendiği saptandı. İn vitro olarak besi yerindeki blokör oranından 5 katından fazla oranlardaki blokör kullanımında, blokörlerin enzim üzerindeki inhibisyon etkisinin Lacipil'in enzim üzerinde yapmış olduğu inhibisyonun, Diltiazem'e oranla daha fazla olduğu saptandı. Araştırmacılar Lacidipine'nin diğer kalsiyum kanal blokörlerine oranla daha uzun süreli bir etkiye sahip olduğunu (70-71) ve membran içinde kalış süresinin diğer blokörlere oranla daha fazla olduğunu (72), ayrıca Lacidipine üzerinde rol oynayan farmalojik protein reseptörün lipid bölgesinde bulunması (73-75), Lacipil'in artan oranlardaki miktarının Diltiazem'e oranla enzimi daha fazla etkilemesini açıklamaktadır. Yine artan miktardaki blokör oranlarının oluşturduğu inhibisyonun, blokörlerin kimyasal yapısından kaynaklandığını düşündürmektedir.

Kalsiyum kanal blokörleri ile etkileştirilen bakterilerden elde edilen üst sıvılardan, en yüksek aktivite veren, örnekler seçilerek bu üst sıvılar 2 mM CaCl_2 ile etkileştirildikten sonra aktivite tayini yapıldı. Kontrolde 2 mM CaCl_2 konsantrasyon oranının inhibisyon etkisi yarattığı halde blokörlü bakteriyel üst sıvılara CaCl_2 ilavesinin aktivitede önemli ölçüde bir değişiklik yaratmadığı (Grafik 8) gözlemlendi. Bunun da CaCl_2 geçişinin blokör tarafından denetlendiği ve CaCl_2 konsantrasyonunun salgılanacak olan α -amilaz için yeterli olduğu kanısını uyandırmaktadır.

Bazı araştırmacılar tarafından ağır metallerin α -amilaz aktivitesi üzerine güçlü inhibisyon etkisi (19) ve bakteriyel plazmitlerin ağır metallere dirençlilik özelliği gösterdiği bildirilmiştir (63). Sıvı besi yerinde HgCl_2 optimizasyonundan sonra 0.1, 0.2 ve 0.3 ppm HgCl_2 içeren sıvı besi yerlerinde α -amilaz aktivitesine 14. saatte, 0.4 ppm HgCl_2 içeren besi yerinde aktiviteye 16. saatte, 0.5 ve 0.6 ppm HgCl_2 içeren besi yerlerinde ise aktiviteye 20. saatte rastlandı. Bakterinin artan HgCl_2 oranlarında α -amilaz sekresyonunda kontrole nazaran düşüşün protein sentezi inhibisyonundan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

SB sıvı besi yeri kontrol olarak hazırlanıp 0.2 ppm HgCl_2 , 0.2 ppm HgCl_2 ve Diltiazem'i birlikte içeren ve CaCl_2 içermeyen SB kontrol olarak hazırlandı. 0.2 ppm HgCl_2 , 0.2 ppm HgCl_2 ve Diltiazem'i birlikte içeren ancak, kontrolünde CaCl_2 içermeyen besi yerlerinde bakteriler üretilip bakteri sayısı eşitlendikten sonra yapılan plazmit çalışmasında 0.2 ppm HgCl_2 içeren SB besi yerindeki plazmitlerin kontrolüne nazaran 260 ve 280 nm'de daha düşük absorbans verdiği saptandı. Bu plazmitlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü, kontrol ve diğerlerine nazaran daha az plazmit içerdiği tesbit edildi. 0.2 ppm HgCl_2 ile birlikte Diltiazem'li SB besi yerinde ise kontrole yakın bir absorbans ve plazmit fotoğrafında kontrol ile farkedilemeyecek derecede yakın olduğu görüldü. CaCl_2 ile birlikte 0.2 ppm HgCl_2 'ün *B. subtilis* plazmiti üzerinde oluşturduğu inhibisyonun HgCl_2 ve Diltiazem etkileşimi ile ortadan kaldırıldığını düşündürmektedir ki bu yeni bir bulgudur. CaCl_2 içermeyen SB sıvı besi yerlerinde ise 260 ve 280 nm'deki absorbansların ve plazmit görüntülerinin kendi kontrolleri ile bir farklılık göstermemesi, SB besi yerinin CaCl_2 ve 0.2 ppm HgCl_2 içeren modifiye besi yerindeki 260 ve 280 nm'deki absorbans ve plazmit

görüntüsünün, CaCl_2 'nin plazmit yapımını engelleyen veya bakteriyi koruyucu mekanizmanın bir parçası olduğunu düşündürmektedir ki, bu da yeni bir bulgudur.

Diltiazem ilave edilmiş SB besi yeri CaCl_2 içermeyecek şekilde hazırlandı. Bu besi yerlerinin üst sıvılarında yapılan aktivite tayininde kontrole göre sırası ile Diltiazem içeren SB ve CaCl_2 içermeyen SB besi yerinde amilaz aktivitesi çok düşük bulundu. Bu bakterinin α -amilaz sentezi için hücre içine CaCl_2 'nin alınması gerektiğini düşündüren bir bulgudur. Bu besi yerlerinde üretilen bakterilerin sayıları eşitlendikten sonra yapılan plazmit çalışmasındaki sonuçlar agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

Kontrol olarak kullanılan SB besi yerindeki plazmit miktarının, Diltiazem içeren SB besi yerine göre fazla olması, CaCl_2 ile birlikte 0.2 ppm HgCl_2 'nin *B. subtilis* plazmiti üzerinde oluşturduğu olumsuz durumu HgCl_2 ile beraber Diltiazem'in plazmit üzerindeki amplifiye edici etkisi sayesinde ortadan kaldırıldığı gözlemlendi ki, bu bizim bulgumuzu destekler niteliktedir.

SB besi yerine ağır metal olarak 10^{-5} M ZnCl_2 ilave edildi ve ZnCl_2 ile birlikte Diltiazem ilavesi yapıldı. Ayrıca bu besi yerleri CaCl_2 içermeyecek şekilde de hazırlandıktan sonra eşit sayıda bakteri ekimi yapıp üst sıvılarında α -amilaz aktivite tayini yapıldı. 10^{-5} M ZnCl_2 içeren besi yerindeki aktivitenin kontrole göre hemen hemen ihmal edilebilecek derecede inhibisyon gözlenmesi daha önceki çalışmaları doğrular niteliktedir (19). Yapılan plazmit çalışmasında 260 ve 280 nm'deki ölçümlere göre 10^{-5} M ZnCl_2 içeren besi yerindeki plazmitlerin kontrole göre azda olsa olumsuz bir şekilde etkilendiği ve bunun bir ağır metal olan Zn^{2+} 'dan kaynaklandığı düşünülmektedir. Burada dikkat çeken bir olgu olarak ZnCl_2 ilavesinin, plazmit ve α -amilaz inhibisyonlarında bir paralellik olabileceği kanıtlarını vermektedir. SB besi yeri 10^{-5} M ZnCl_2 ve Diltiazem'i birlikte içeren modifiye şeklinde ise α -amilaz aktivitesinin oldukça düşük olması Diltiazem'in, L tipi kalsiyum kanalına bağlanarak Ca^{2+} 'nın hücre içine girişini bloke ederek (77) α -amilaz sekresyonunu engellediğini desteklemektedir. Bu besi yerinin plazmit çalışmasında ise plazmit oranının kontrole yakın bir değerde olması ağır metal ile birlikte ZnCl_2 'nin *B. subtilis* plazmiti üzerinde oluşturduğu inhibisyonun ZnCl_2 ve Diltiazem etkileşimi ile ortadan kaldırıldığını düşündürmektedir ki, bu yeni bir bulgudur ve HgCl_2 'nin Diltiazem ile birlikte plazmit

üzerine etkiside bulgumuzu desteklemektedir. SB sıvı besi yeri CaCl_2 içermeyecek şekilde kontrol olarak hazırlandı. Bu besi yerine ağır metal olarak 10^{-5} M ZnCl_2 ilave edildi ve ZnCl_2 ile birlikte Diltiazem ilavesi yapılp eşit sayıda bakteri ekimi yapıldıktan sonra üst sıvılarında α -amilaz aktivite tayini yapıldı. Aktivitenin her üç besi yerinde de nerede ise sıfıra yakın bir değerde olduğu saptandı ki, bu sonuç bakterinin α -amilaz sentezi için hücre içine CaCl_2 'nin alınması gerektiğini düşündüren bulgumuzu desteklemektedir. CaCl_2 içeren SB besi yerinde 260 ve 280 nm'deki değerleri ile, CaCl_2 içermeyen besi yerlerinden elde edilen bakteri plazmitlerinin 260 ve 280 nm'deki absorbasları karşılaştırıldığında, CaCl_2 'nin plazmit yapımını engelleyen veya bakteriyi koruyucu mekanizmanın bir parçası olduğunu düşündüren bulgumuzu desteklemektedir. ZnCl_2 ile birlikte Diltiazem kullanılan ve CaCl_2 içermeyen SB besi yerinden elde edilen plazmitlerin 260 ve 280 nm'deki absorbanlarının hem kendi kontrolünden ve hem de SB besi yerindeki plazmit değerlerinden yüksek çıkması ağır metal ile birlikte Diltiazem kullanımının plazmiti amplifiye edici bulgumuzu desteklemektedir.

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Fakültesi'nden temin edilen *B. subtilis* katı besi yerinde üretildi. Seçilen bir koloni NB sıvı besi yerine aktararak 37°C 'de çalkalamalı bir ortamda 8 saat süre ile ön inkübasyondan sonra bakteri eşitlemesi ile 500'er ml'lik NB sıvı besi yerine aktarıldı. Bu ortamda 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 saat boyunca üretildi. Bakteri büyümesinin zamana bağlı olarak artış göstermesi beklenen bir sonuçtur. Bu bakteri içeren besi yerleri santrifüjlendikten sonra bu saatlerin tümüne aktivite tayin yöntemi uygulandı. Bakteriler ise membran çalışması için kullanıldı. Membranda 4. saatten 12. saate kadar zaman ile artış gösteren amilaz aktivitesine rastlandı. 12. saatten sonra aktivitede, 18. saate kadar bir düşüş saptandı. Bakteri membranlarındaki α -amilaz varlığının incelenmesi ile membranda aktivitenin maksimum olduğu 12. saatte hücre içinde sentezi tamamlanan α -amilazın membrana taşınıp buradan sekrete edilmesi, membran ile dış ortamdaki α -amilaz aktivitesinin ters orantı göstermesi, 12. saatten sonra α -amilazın membranda fazla tutulmadığını ve dış ortama hemen sekresyonunu sezindirmektedir.

NB sıvı besi yerinde üretilen bakterilere 170 $\mu\text{g/ml}$ oranında Ch ilavesi 10. saate yapıldıktan 2,5 saat sonra her 20 dakikada bir alınan örneklerde bakteri üremesi,

α -amilaz aktivitesi ve membrandan izole edilen α -amilaz aktivitesinin kontrole nazaran çok düşük olması, bakterinin yaşam için sınırlı bir protein sentezlediği kanısını uyandırmaktadır. Ch'nin hücre içine girdiği anın ilave edildikten 2.5 saat sonra olduğu bilinmektedir (62). Ch girişinden sonra başlamamış olan protein sentezi engellenir, başlamış olanlar ise devam eder. Senteze devam eden α -amilazlar bakteriden sentezlenecek son ekstraselüler enzimdir. Bu saatten itibaren inhibisyonun tamamlandığı süre ribozom üzerinde ve membrandan çıkış süresini kapsamaktadır. Çalışmamızda bu süre 70-80 dakika olarak tespit edilmiştir.

PH 1-13 aralığındaki enzim çözeltilerine kendi tampon ve substratları ile nötral proteaz aktivite tayini yapıldı. pH 7'de nötral proteaz aktivitesi maksimum olarak saptandı. pH 2, 7 ve 13'de enzim çözeltileri hazırlanarak bu enzimlere kendi pH, tampon ve çözeltileri ile aktivite tayini yapıldı. Daha sonra enzim çözeltileri dializlendi ve miktar eşitlemesinden sonra dializ sonrası aktiviteye bakıldı. Dializ öncesi ve dializ sonrası aktivite arasında önemli bir farkın olmayışı bize bu enzimin prostatik grubu olan Zn^{2+} 'nin (24) dializ ile enzimden uzaklaştırılamadığını gösterdi. Ayrıca dializ ile tampona geçen Zn^{2+} 'nin AAS ile miktarına bakıldığında miktarın değişmemiş olması, kofaktörün enzime sıkı bir şekilde bağlı olduğunu gösteren bir bulgudur. Aktivite tayin ortamında bulunan Zn^{2+} 'nin enzim üzerine olumsuz bir etki yapmadığı, aktivite tayin ortamına 10^{-5} M $ZnCl_2$ ilavesi ile denendi. PH 2, 7 ve 13'de yapılan aktivite tayininde pH 2 ve 13'de sıfıra yakın değerlerde absorbans okunmasının Zn^{2+} ayrılmadığı halde pH'nın enzim üzerindeki olumsuz etkisi ile açıklamak mümkündür.

5. KAYNAKLAR

- 1- Fergus, G ., American Society for Microbiology ., 41: No 3 ., 711-753, (1977).
- 2- Anderson, J. E ., Adams, D. M and Walter Jr, W. M .; J.Food.Sci. 48, 1622-1626, (1983).
- 3- Barfoed, H. C ., Cereal Foods World. 21, 588-604, (1976).
- 4- Norman, B. E ., Berkeley, R. C. W ., Gooday, G. W & Ellwood, D. C ., New York Academic Press. 339-376, (1979).
- 5- Aungtrup, K ., Applied Biochemistry and Bioengineering. 2, 27-69, (1979).
- 6- Sen, S ., Chakrabarty, S. L ., Journal of Applied Bacteriology. 60, 419-423. (1986).
- 7- Moseley, M. H ., Keay, L ., Biotechnology and Bioengineering. XII, 251-271. (1970).
- 8- Stein, E. A ., Fischer, E. H. 16 : 254, (1958).
- 9- Thomas ., N. G and Kenerly ., W. K ., In Brocks Thermophiles. New York, (1986).
- 10- Heinen ., W and Lauwers ., A. M ., In Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms. Stuttgart, (1975).
- 11- Deschreider, A. R ., Fette Selfen Angtrichm. 74 (1), 33-35, (1972).
- 12- Babu, K. R and Satyanarayana, T ., Folia Microbiol. 38 (1), 77-80, (1993).
- 13- Chandra, A. K ., Medda, S ., Bhadra, A. K ., J.Ferment.Technol. 58, 1-10, (1980).
- 14- Saito, N ., Yamamoto, K ., J.of.Bacteri. 121 ., 848-856, (1975).
- 15- Haddad, M. E ., Gracheva, I. M ., Gryaznova, S. V ., Microbiologiya. 121 ., 848-856, (1975).
- 16- Shinmyo, A ., Kimura, H ., Odaka, H ., Eur.J.Appl.Microbiol. 14, 7-17, (1982).
- 17- Chojecki, A ., Blaschek, H. P ., Jour.Ind.Microbiol. 1, 63-67, (1986).
- 18- Sunna, A ., Hashwa, F ., Biotech.Lett. 12, 433-438, (1990).
- 19- Srivastava, R. A. K ., Enzyme.Microb.Technol. 9, December ., 749-754, (1987).
- 20- McConn, J. W., Tsuru, D. and Yasunobu, K. T., J.Biol.Chem. 239, 3706-3715, (1964).

- 21- Guntelberg, A. V. and Ottesen, M ., C.r.Traw.Lab ., Carlsberg. 29-36, (1954).
- 22- Schaeffer, P ., Bact.Rev. 33-48, (1969).
- 23- Gerald, A., Rufo.Jr. G, A., Barbara, R ., Sullivan, B. J ., Sloma, A ., and Pero, J.
J.of.Bacteri. Feb, 1019-1023, (1990).
- 24- Millet, J ., J.Appl.Bact. 33, 207-219, (1970).
- 25- Tsuru, D ., Kira, H ., Yamamoto, T. and Fukumoto, J ., Agric.Biol.Chem. 30, 856-862, (1966).
- 26- Tsuru, D ., Kira, H ., Yamamoto, T. and Fukumoto, J ., Agric.Biol.Chem. 31, 718-723, (1967).
- 27- Uehara, H ., Yamane, K ., and Marvo, B. J.Bacteriol. 139, 583-590, (1979).
- 28- Sloma, A ., Ally, A ., Ally, D ., and Pero, J. J.Bacteriol. 172, 5557-5563, (1988)
- 29- Sloma, A ., Rufo.Jr. G, A ., Rudolp, C, f ., Sullivan, B .J ., Therisut, K. A ., and Pero, J. J.Bacteriol. 172, 1470-1477, (1990).
- 30- Wu, X. C ., Nathoo, S ., Pang, A .S. H ., Carne, T ., and Wong, S-L. J.Biol.Chem. 265, 6845-6850, (1990).
- 31- Endo, S. J.Ferment.Technol. 40, 346-353, (1962).
- 32- Kobayashi, R ., Yoshimoto, T ., & Tsuru, D. Agric.Biol.Chem. 53, 2737-2749, (1989).
- 33- Yoshimoto, T ., Oyama, H ., Takeshita, T ., Higashi, H ., Xu, S. L ., & Tsuru, D .J.Ferment.Bioeng. 70, 370-375, (1990).
- 34- Holden, H. M ., Tronrud, D. E ., Monzingo, A. F ., Weaver, L. H ., & Matthews, B. W .Biochemistry. 26, 8542-8553, (1987).
- 35- Matthews, B. W ., Jansonfus, J. N ., Colman, P. M ., Schoenborn, B. P ., & Duporque, D. Nature New Biol. 238, 37-41, (1972).
- 36- Feder, J .,Garrett, L. R ., & Wildi, B. S. Biochemistry. 10, 4552-4555, (1979).
- 37- Drucker, H ., & Borchers, S. L. Arch.Biochem.Biophy. 147, 242-248, (1971).
- 38- Woordouw, G ., & Roche, R. S. Biochemistry. 14, 4667-4673, (1975).
- 39- Roche, R. S ., G ., & Woordouw, G. Biochemistry. 5, 1-23, (1978).

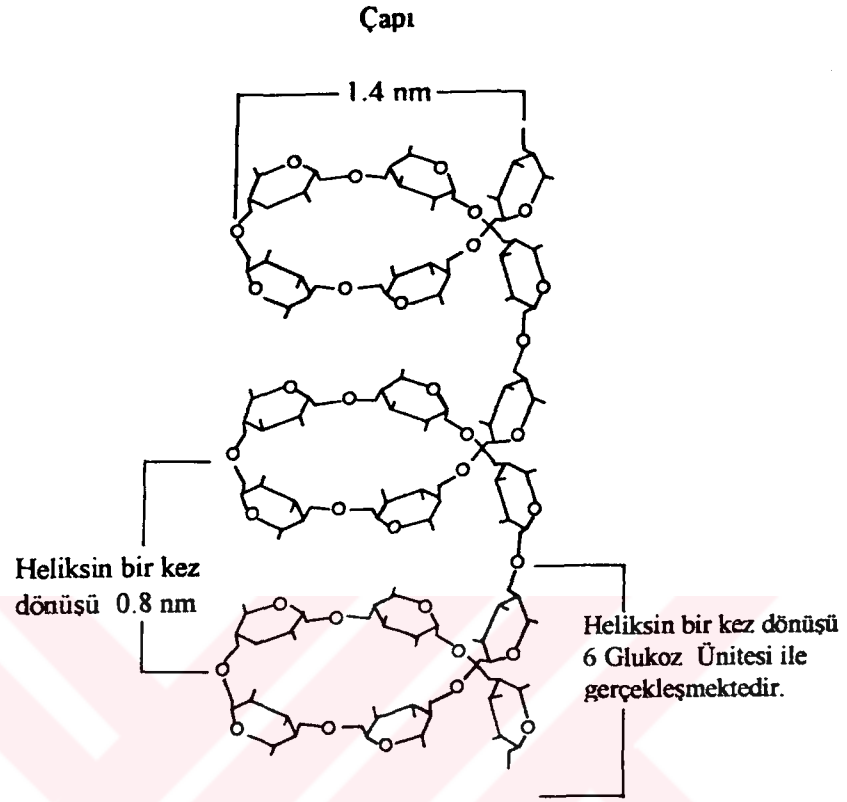
- 40- Titani, K ., Hermodso, M. A .,Ericson, L. H .,Walsh, K. A ., Sidler, W& Neurath, H. *Biochemistry*. 11, 2427-2435, (1972).
- 41- Tagaki, M ., Imanaka, T ., & Abia, S. J.*Bacteriol*. 163, 824-831, (1988).
- 42- Kubo, M ., & Imanaka, T. J.*Gen.Microbiol*. 134, 1883-1892, (1988).
- 43- Sidler, W ., Niederer, E ., Suter, F ., & Zuber, H. *Biol.Chem.Hope-Seyler*. 367, 643-657, (1986).
- 44- Vasantha, N ., Thompson, L. D ., Rhodes, C ., Banner, C ., Naple, J ., & Filipula, D. J.*Bacteriol*. 159, 811-819, (1984).
- 45- Yang, M. Y ., Ferari, E ., & Henner, D. J. J.*Bacteriol*. 160, 15-21, (1984).
- 46- Toma, S ., Del Bue, M ., Pirola, A ., and Grandi, G. J.*Bacteriol*. 167, 740-743, (1986).
- 47- Tüzün, C ., *Biyokimya*. 35, (1991).
- 48- Ohnishi, M ., *Trends Glycosci, Glytechnol*. 2, 343-351, (1990).
- 49- Robyt, J. F ., *Denpun Kagaku*. 36, 287-301, (1991).
- 50- Sinnott, M. L ., *Chem.Rew*. 990, 1171-1182, (1990).
- 51- Hehre, E. J ., *Denpun Kagaku*. 36, 197-206, (1989).
- 52- Ingle, M. B ., Ericson, R. J. *Advances in Applied Microbiology*. 24, 257-264, (1978).
- 53- Yamamoto, S ., Lampen, J. O. J.*Biol.Chem*. 250, 3212-3213, (1975).
- 54- Thomas, L ., Randall, L. L. J.*Bacteriol*. 170, 5654-5661, (1988).
- 55- Priest, F. G. *Biochem.Biophys.Res.Comm*. 63, 606-610, (1975).
- 56- Gleen, A. R ., *Ann.Rev.Microbiol*. 30, 41-62, (1976).
- 57- Coleman, R. D ., Yang, S. S .,Mc Alister, M. P. J.*Bacteriol*. 169, 4302-4307, (1987).
- 58- Fitz-James, P. C. *Can.J.Microbiol*. 10, 92-94, (1964).
- 59- Zhou, Y ., Ru-Zhang, J. *Science in China*, 34, 1082-1091, (1990).
- 60- Öner, M. *Mikrobiyal Ekoloji*. Ege Üniversitesi Basım Evi Bornova İzmir, (1987).
- 61- Brock, T. D ., Madigan, M. T. *Biology of Microorganisms*. (1991).

- 62- Bermek, E ., Matthaei, Hoppe-Seylers, Z.Physiol.Chem, 351-377, (1970).
- 63- Maniatis, T ., Fritsch, E. F ., Sambrook. Molecular Cloning. (1991).
- 64- Nowick, R. P ., Clowes, R. C ., Cohen, N. S ., Curtis, R ., Datta, N ., Falkow, S.
Bacteriol.Rev. 40, 169-186, (1976).
- 65- Clevell, D. B. J.Bacteriol. 110, 667-670, (1972).
- 66- Royston, C. C. Bacteriol.Rev. 36, 361-405, (1972).
- 67- Şimşek, E. Farmakoloji, (1991).
- 68- Khan, M. G. Manual of Cardiac Drug Therapy Baillere Tindal co. 1-15, (1988).
- 69- Khan, M. G. Manual of Cardiac Drug Therapy Baillere Tindal co. 1-13, (1985).
- 70- Perloff, D ., Sokolow, M, Cowan, R. JAMA. 249, 2792-2797, (1983).
- 71- Gould, B. A. Clin.Sci. 61, 478-490,(1981).
- 72- Gracometti, A .,Micheli, D ., Gaviraghi, G. J.Pharmacol.Exp.Ther. 269, 424-429,
(1984).
- 73- Ariens, EJ ., Simonis, AM ., Van Rossum, JM. Molecular Pharmacology Academic
Press. New York, 1, 394-462,, (1964).
- 74- Brittain, RT ., Dean, CM ., Jack, D. Pharmacol.Ther.B. 2, 423-462, (1976).
- 75- Van Zwieten, P ., Pfaffendorf, M. J.Hypertens. 11 (suppl.6), 3-8, (1993).
- 76- Kobayansky, K ., Tarazi, RG. Hypertension. 5 (Suppl II), 45-51, (1983).
- 77- Kayaalp, O. S. Tıbbi Farmakoloji. (1992).
- 78- Wetzstein, M., Volker, U ., Dedio, j ., Lobau, S ., Zuber, U ., Schiesswohh, M.,
Herget, C ., Hecker, M ., Schumsen, W. Journal of Bacteriology, 174, 3300-3310,
(1992).
- 79- Ramesh, M. V ., and Lonsane, B. K. Appl.Microbiol.Biotechnol. 35, 591-593,
(1991).
- 80- Windish, W. W ., and Mhatre, N. S ., Adv.Appl.Microbiol., 7:273-304, (1965).
- 81- Ingle, M. B ., and Erickson ., Adv.Appl.Microbiol., 24: 257-278, (1978).
- 82- Kindle, K. L ., App.Biochem.Biotechnol ., 8: 153-170, (1983).

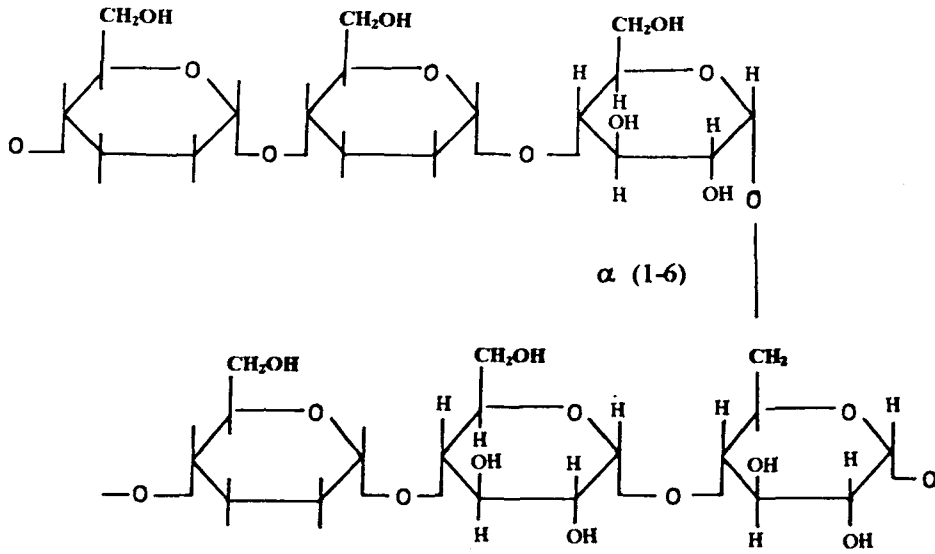
- 83- Taniguchi, H ., Jae, C. M ., Yoshigi, N ., and Maruyama, Y ., Agric.Biol.Chem., 47(3): 511-519, (1983).
- 84- Ratcliffe, C ., Sanders, R. L ., and O'Brien, R. W ., A.J.Biol.Sci., 35:457-467, (1982).
- 85- Ensari, N. Y ., Otludil, B ., Aytekin, M. Ç. Starsh. 47, 315-321, (1995).
- 86- Kekos, D ., Macris, B. J. Enzyme Microb.Technol. 9, 94-97 (1991).
- 87- Rikihisa, Y ., Zhang, Y ., Park, J. Infection and Immunity. 63(6), 2310-2316, (1995).
- 88- Bernfeld, P., Methods in Enzymology. Academic Press ., vol:1., 149-158 (1955).
- 89- Bubela, B ., Holdsworth, E. S ., Biochimica Et Biophysica Acta. 123:376-389, (1966).
- 90- Findlay, J. B. C ., A. Practical Approach. 179-217 IRL Press, Oxford, (1990).
- 91- Segel, I .H ., Biochemical Calculations ., Sons. New York ., (1976).
- 92- Gözükar, E. M ., Biyokimya, Ofset Repromat Ltd. Şti. Ankara ., (1989).
- 93- Weber, K ., Osborn, M. J ., J.Biol.Chem. 244:4406-4412, (1969).
- 94- Lowry, O. H ., Rosebrough, N. J. Farr, A. L ., Randall, R. J ., J.Biol.Chem. 193:265-275., (1951).



Şekiller

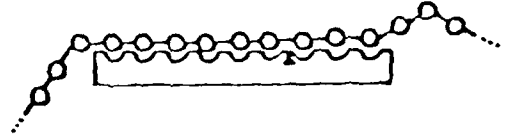


Şekil 1: α -amiloz molekülünün α -heliks yapısı

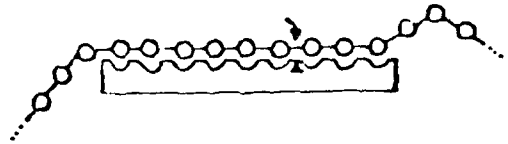


Şekil 2: Nişasta Ünitelerinde Amilopektin Molekülünün Yapısı

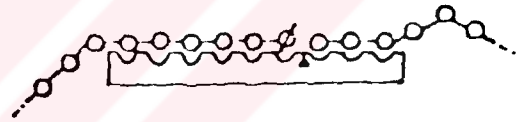
- Enzim-substrat kompleksi oluşur.



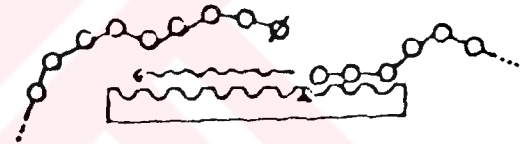
- Glikozidik bağ hidrolizlenir



- Zincirin sol tarafı ayrılır



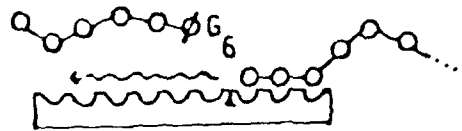
- Zincirin sağ tarafı kendiliğinden bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sola kayar.



- G₆ ürünü vermek üzere glikozidik bağ hidrolizlenir.



- G₆ yı yeniden ürün olarak vermek üzere 4. ve 5. adımlar tekrarlanır.



Şekil 3 : α -Amilazın Etki Mekanizmasında G6 Formasyonu

- Enzim-substrat kompleksi oluşur.

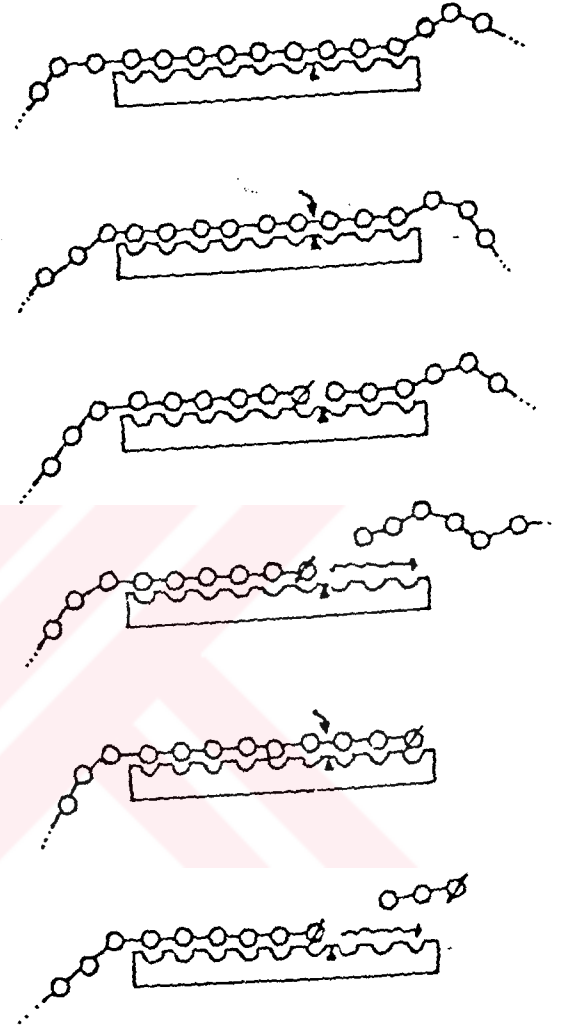
- Glikozidik bağ hidrolizlenir.

- Zincirin sağ tarafı ayrılır.

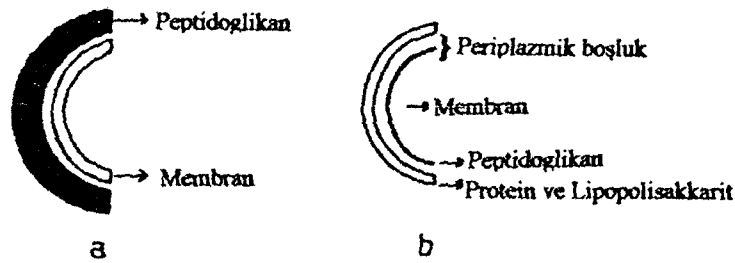
- Zincirin sol tarafı kendiliğinden bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sağa kayar.

- G_3 ürününü vermek üzere glikozidik bağ hidrolizlenir.

- G_3 ü ürün olarak vermek üzere 4. ve 5. adımlar tekrarlanır.



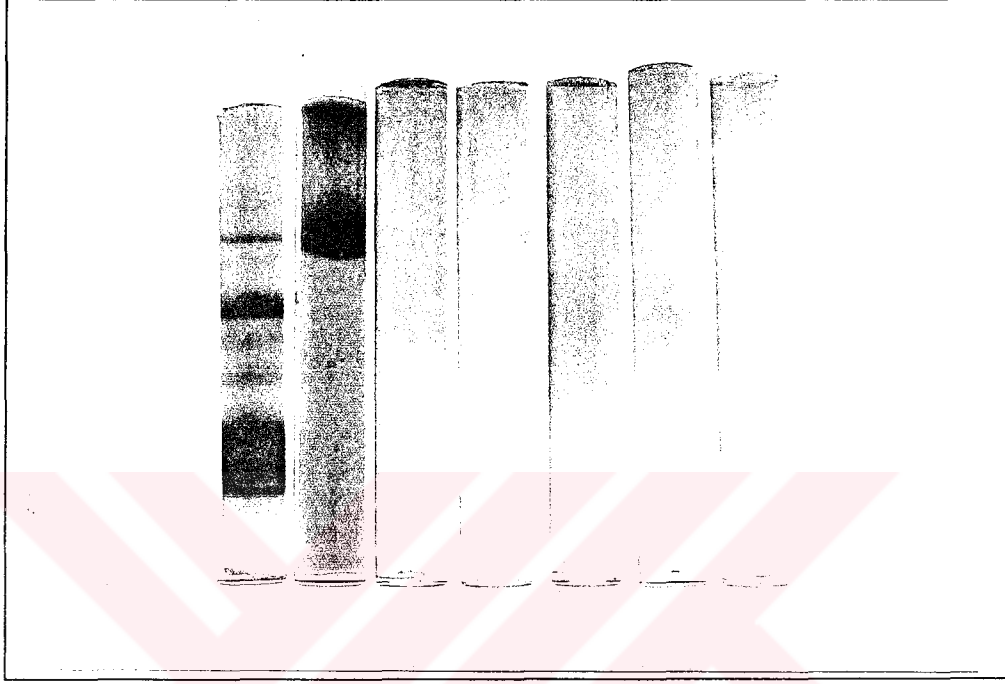
Şekil 4 : α -Amilazın Etki Mekanizmasında G_3 Formasyonu



Şekil 5: Bakterilerde Hücre Duvarı Yapısı, (a) Gram (+), (b) Gram (-)



Resimler



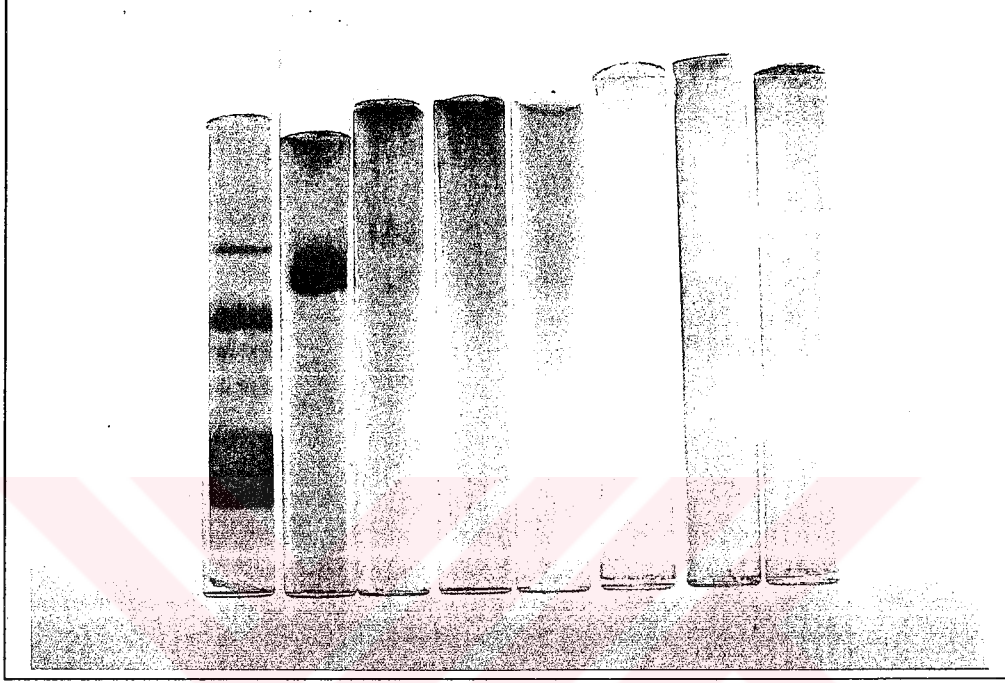
Resim 1: Kalsiyum kanal blokörleriyle etkileştirilen bakterilerin üst sıvı elektroforez bant profilleri.

Soldan sağa sırasıyla: Standart, Kontrol, Isopin, Diltiazem, Lacidipine, Amlocard, Nidicard.

Standart (*yukarıdan aşağıya*): Sığır albumini (66000 Dalton), Yumurta albumini (45000 Dalton),

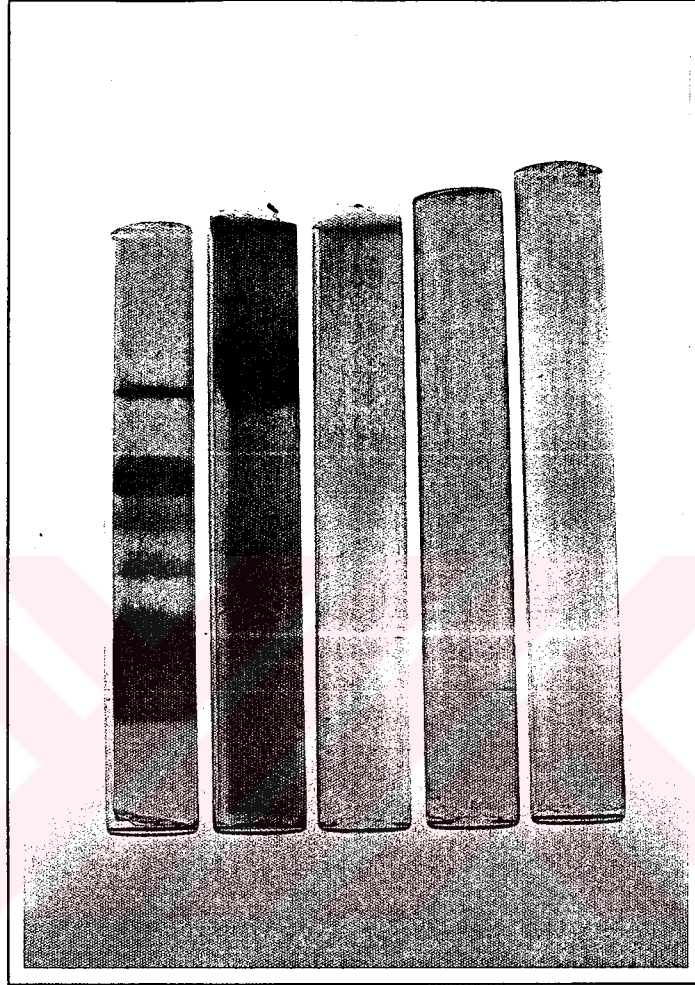
Gliser aldehit 3-fosfat dehidrojenaz (36000 Dalton), Karbonik anhidraz (29000 Dalton), α -

Laktalbumin (14200 Dalton).

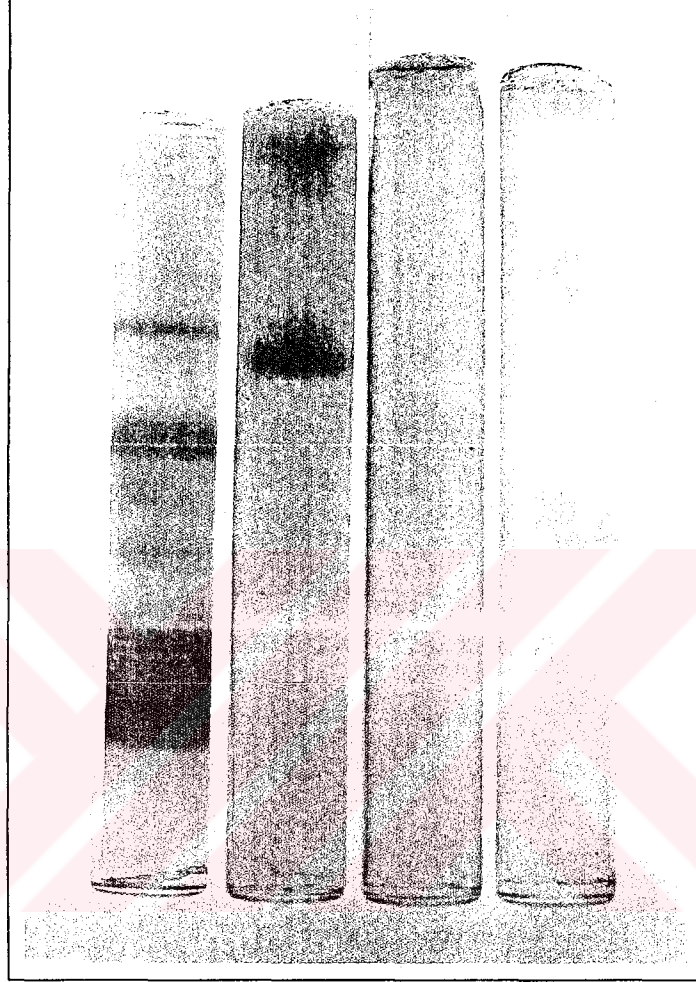


Resim 2: HgCl_2 ile etkileştirilen bakterilerin üst sıvı elektroforez bant profilleri. *Soldan sağa sırasıyla:* Standart, Kontrol, 0,1 ppm HgCl_2 , 0,2 ppm HgCl_2 , 0,3 ppm HgCl_2 , 0,4 ppm HgCl_2 , 0,5 ppm HgCl_2 , 0,6 ppm HgCl_2 .

Standart (*yukarıdan aşağıya*): Sığır albumini (66000 Dalton), Yumurta albumini (45000 Dalton), Gliser aldehyt 3-fosfat dehidrojenaz (36000 Dalton), Karbonik anhidraz (29000 Dalton), α -Laktalbumin (14200 Dalton).

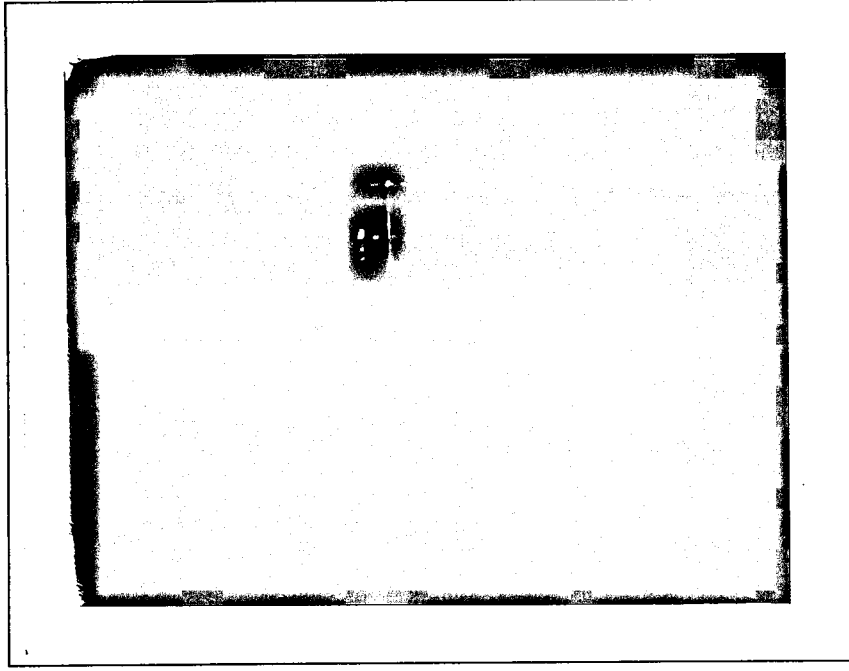


Resim 3: HgCl_2 ve Diltiazem (D.) ile etkileştirilen bakterilerin üst sıvı elektroforez bant profilleri.
Soldan sağa sırasıyla: Standart, Kontrol, 0,1 ppm $\text{HgCl}_2+\text{D.}$, 0,2 ppm $\text{HgCl}_2+\text{D.}$, 0,3 ppm $\text{HgCl}_2+\text{D.}$
Standart (*yukarıdan aşağıya*): Sığır albumini (66000 Dalton), Yumurta albumini (45000 Dalton),
Gliser aldehit 3-fosfat dehidrojenaz (36000 Dalton), Karbonik anhidraz (29000 Dalton), α -
Laktalbumin (14200 Dalton).

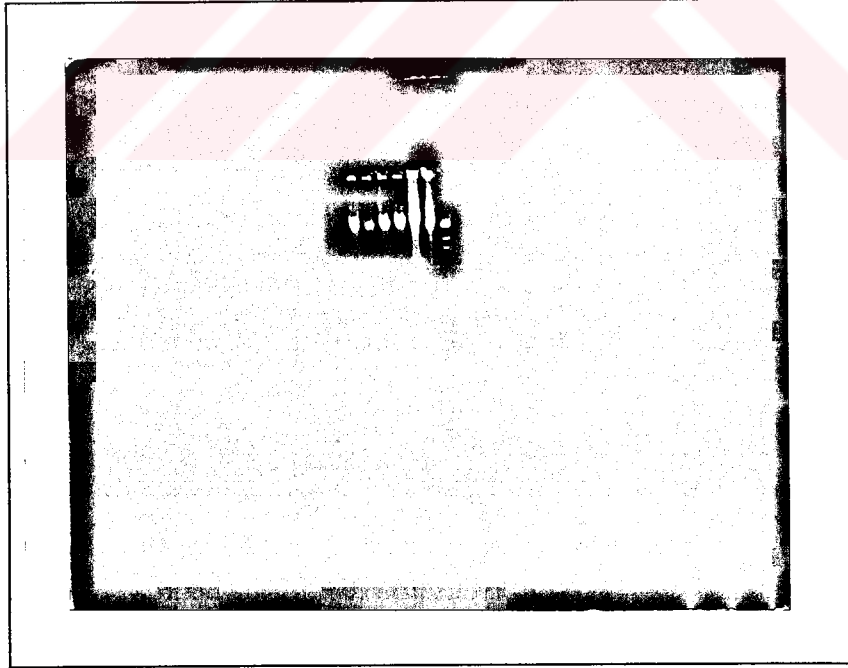


Resim 4: SB besi yeri ve bu besi yerinden CaCl_2 'nin çıkarılması ve SB besi yerine Diltiazem ilavesi ile etkileştirilen bakterilerin üst sıvı elektroforez bant profilleri. *Soldan sağa sırasıyla:* Standart, Kontrol, SB - CaCl_2 , SB + Diltiazem.

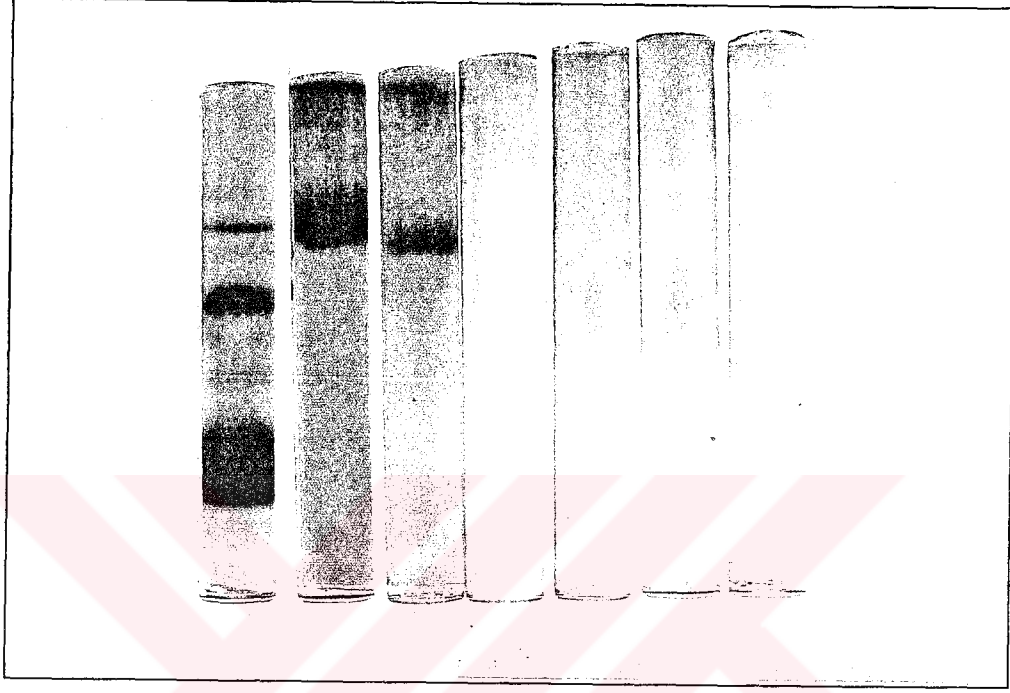
Standart (*yukarıdan aşağıya*): Sığır albumini (66000 Dalton), Yumurta albumini (45000 Dalton), Gliser aldehit 3-fosfat dehidrojenaz (36000 Dalton), Karbonik anhidraz (29000 Dalton), α -Laktalbumin (14200 Dalton).



Resim 5: SB besi yeri ve bu besi yerinden CaCl_2 'nin çıkarılması ve SB besi yerine Diltiazem ilavesi ile etkileştirilen bakterilerden elde edilen plazmidlerin agaroz jel bant profilleri. *Soldan sağa sırasıyla:* Standart (Hind III ile kesilmiş λ -faj DNA'sı), Kontrol, SB - CaCl_2 , SB + Diltiazem.



Resim 6: Ağır metal ve Diltiazem ile etkileştirilen bakterilerden elde edilen plazmidlerin agaroz jel bant profilleri. *Soldan sağa sırasıyla:* SB, SB + HgCl_2 , SB + HgCl_2 + D., SB - CaCl_2 , SB - CaCl_2 + HgCl_2 , SB - CaCl_2 + HgCl_2 + D., Standart (Hind III ile kesilmiş λ -faj DNA'sı).



Resim 7: Ağır metal ve Diltiazem ile etkileştirilen bakterilerden elde edilen üst sıvıların elektroforez bant profilleri. *Soldan sağa sırasıyla:* Standart, SB, SB + ZnCl₂, SB + ZnCl₂ + D., SB - CaCl₂, SB - CaCl₂ + ZnCl₂, SB - CaCl₂ + ZnCl₂ + D.

Standart (yukarıdan aşağıya): Sığır albumini (66000 Dalton), Yumurta albumini (45000 Dalton), Gliser aldehit 3-fosfat dehidrojenaz (36000 Dalton), Karbonik anhidraz (29000 Dalton), α -Laktalbumin (14200 Dalton).

ÖZGEÇMİŞ

- 1964 Diyarbakır'da doğdu.
İlk ve orta öğrenimini aynı kentte tamamladı.
- 1988 Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü'nü bitirdi.
- 1991 Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi
olarak görev aldı.
Aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü'nde
Yüksek Lisans öğrenimine başladı.
- 1993 "*Prokaryotlarda Proteolitik Aktivite*" konulu
Yüksek Lisans tezini verdi.
- 1993 Aynı enstitüde Doktora öğrenimine başladı.
- 1997 Halen Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak
çalışmaya devam etmektedir.