

BACILLUS SUBTILIS KÜLTÜRÜNE MİKROTAŞIYICILARIN UYGULANMASI

APPLICATION OF MICROCARRIERS TO BACILLUS SUBTILIS CULTURE

Elif SARIKAYA*, Çervin ÇIRAKOĞLU**

Özet: Mikrotaşıyıcılar önce hücre kültürlerine uygulandı ve kültürdeki hücrelerin üremesini verimli bir şekilde etkilediği rapor edildi. Bu araştırmada kullanılan Cytodex I mikrotaşıyıcısı yüzey özellikleri nedeniyle memeli hücrelerin kolayca yapışarak üremesini sağlar.

B. subtilis hücreleri de mikrotaşıyıcılara yapışarak iyi ürediler. B. subtilis, alfa-amilaz enziminin üretiminde kullanıldı.

Çalışmamızda enzim kaynağı olan bakterinin verimli üretimi için Cytodex I mikrotaşıyıcıları kullanıldı.

Summary: Microcarriers, first applied to cell cultures. It was reported that microcarriers affected cell growth positively. In this study Cytodex I microcarriers were used. Because of their surface characteristics mammalian cells can easily attach to Cytodex I microcarriers and grow well.

B. subtilis cells also attached to microcarriers and grew well.

In this study Cytodex I microcarriers were used for productive bacterial growth.

G İ R İ Ş

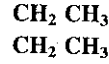
Mikrotaşıyıcılar hücre kültürü tekniklerinde yeni bir yöntem olarak Van Wezel tarafından ileri sürüldü (1). Daha sonra mikrotaşıyıcılar özellikle üretilmesi güç hücrelerin kültürlerinde yaygın olarak kullanıldı. 80'den fazla farklı hücre tipinin Cytodex I mikrotaşıyıcılarda üretildiği rapor edildi (2).

Cytodex I mikrotaşıyıcılar, hücre üremesi için optimal derecede pozitif yüklü N, N-diethylaminoethyl (DEAE) grupları taşıyan çapraz bağlı dextran matrikse sahiptir (Şekil 1). Yüklü gruplar mikrotaşıyıcının tüm yüzeyine dağılmıştır (Şekil 2).

* Arş. Gör., Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

** Prof. Dr., Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, Ankara.

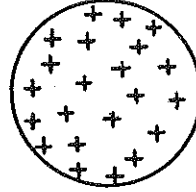
Çapraz bağlı dextran O-CH₂-CH₂-N



Şekil 1 :

Cytodex I mikrot taşıyıcının kimyasal yapısı (1).

Cytodex I
Baştanbaşa
Yüklü Matrix



Şekil 2 :

Cytodex I mikrot taşıyıcının yüzeyindeki yüklü gruplarının şematik görünümü (1)

Hücre kültüründe kullandığımızda çok iyi sonuç aldığımız Cytodex I mikrot taşıyıcıları, B. subtilis kültüründe de mikrot taşıyıcılar üzerinde çok iyi ürediklerini saptadık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan Bacillus subtilis, H.Ü. Moleküler Biyoloji Anabilim Dalından temin edildi ve Nutrient agar stok kültürlerinde muhafaza edildi.

Besiyeri olarak Andersson ve arkadaşları tarafından önerilen besiyeri kullanıldı (3). Bu besiyerinin içeriği litrede: 10 gr D-glukoz, 5 gr yeast extract, 1.5 gr NaCl, 0.5 gr KH₂PO₄, 0.5 gr MgSO₄. 7H₂O, 0.1 gr CaCl₂'dür. Üretim sırasında yukarıdaki steril edilmiş ortama, hacmin % 15'i kadar steril gliserol ilave edildi. Enzim üretimi için gecelik kültür (overnight culture) ortamındaki D-glukoz yerine aynı miktarda çözünen nişasta kullanıldı.

Besiyerlerinin pH'ları sterilizasyondan önce 3 M NaOH ve 3 M HCl ile pH 7.0'ye ayarlandı.

Cytodex I mikrot taşıyıcılar kullanılmadan önce PBS (Phosphate Buffered Saline) de 6 saat hidrate edildi. Daha sonra 1 gece, % 70 V/V etanolde bekletilerek steril edildi.

Sterilizasyondan sonra mikrot taşıyıcılar 3 defa steril PBS ile yıkandıktan sonra bakteri üreme ortamına ilave edildi. Ortamdaki Cytodex I konsantras-

yonu 1 mg/ml idi. Cytodex I mikrotasıyıcı Pharmacia Fine Chemicals'dan sağlandı.

Bakteri üretimi mikrotasıyıcı içeren ve içermeyen ortamda 37°C'de çalkalama hızı 175 r.p.m.'e ayarlanmış çalkalamalı etüvdé yapıldı.

Alfa-amilaz aktivitesi dekstrojenik yöntemle saptandı (4).

B U L G U L A R

Cytodex I mikrotasıyıcıları içeren ortamda üretilen bakteriler, uygun yüzey özellikleri nedeniyle mikrotasıyıcılara bağlanıp iyi ürediler. Fakat Cytodex I mikrotasıyıcıları içeren ortamda alfa-amilaz aktivitesinin kontrole kıyasla % 17 azaldığı saptandı. Mikrotasıyıcı içermeyen kontrol ortamında alfa-amilaz aktivitesi 14 IU/ml iken Cytodex I içeren ortamdaki enzim aktivitesinin 11.6 IU/ml olduğu bulundu.

Cytodex I mikrotasıyıcıların Ca^{++} ve Mg^{++} gibi divalent katyonları bağladığı rapor edildi (5). Bu olasılığı dikkate alarak mikrotasıyıcıların uzaklaştırıldığı enzim çözeltilisine $CaCl_2$ ilave ettiğimizde enzim aktivitesinin 14 IU/ml'ye yükseldiğini saptadık (Şekil 1 ve 2).

T A R T I Ş M A

Bu çalışmada, alfa-amilaz enzimi verimli bir şekilde elde etmek için Cytodex I mikrotasıyıcısı kullanıldı. Bu mikrotasıyıcılar uygun yüzey özellikleri nedeniyle bakterilere kolayca bağlanacakları geniş bir yüzey sağlayarak bol miktarda üremelerine olanak verir.

Bu çalışmada *B. subtilis* hücrelerinin mikrotasıyıcılara bağlanarak çok iyi ürediklerini saptadık. Bu bulgumuz, daha önceki hücre kültürü ile yaptığımız çalışmaya benzerlik gösteriyor (6).

Mikrotasıyıcılar bakteri üremesini olumlu etkilemesine karşın enzim aktivitesinde % 17'lik bir düşüşe neden oldu.

Alfa-amilaz aktivitesi için Ca^{++} a gereksinimi olan bir metalloenzimdir (7). Cytodex I mikrotasıyıcılar ise Ca^{++} iyonlarını bağladıkları için enzim aktivitesinde düşüşe neden oldular.

Bulgularımıza göre, katı ortamda daha iyi üreyen bakterileri sıvı ortamda da verimli üretmek için Cytodex I mikrotasıyıcılar kullanılabilir.

BACILLUS SUBTILIS

KAYNAKLAR

1. Van Wezel AL: Growth of cell strains and primary cells in homogeneous culture. *Nature*, 216: 64-65, 1967.
2. Clark JM, Hirstein MD: American Tissue Culture Assn. 31st Annual Meeting. St. Louis Abstract, 96, 1967.
3. Andersson E, Hahn-Hägerdal B: Alpha-amylase production in aqueous two-phase systems with *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbiol Technol*, 7: 333-338, 1985.
4. Pfueller SL, Elliot WH: The extracellular alpha-amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *J Biological Chemistry*, 244: 48-54, 1969.
5. Tryckeri W: Microcarrier cell culture principle and methods. Pharmacia Fine Chemicals AB, 43-44 Box 175 Uppsala 1, Sweden.
6. Çirakoğlu Ç, Omurtay G, Arkan M: Application of Microcarriers to a Rabbit Kidney Cell Line. *Hacettepe Bulletin of Natural Sciences and Engineering*, 14: 1-6, 1986.
7. Fogarty WM: *Microbial Enzymes and Biotechnology* Applied Science Publisher. 2-72, 1983.