

Cilt:2 EYLÜL 1979 Sayı:1  
KÜKEM 1.Kongresi özel sayısı

# KÜKEM DERGİSİ



Kültür Koleksiyonları ve Endüstriyel  
Mikrobiyoloji Derneğinin Yayın Organıdır.

# KÜKEM DERGİSİ

## Sahibi

KÜKEM Derneği adına Dernek Başkanı  
Prof Dr Enver Tali Çetin

## Yazı İşleri Müdürü

Prof Dr Ömer Kasımoğlu

## Yazı İnceleme Kurulu

AKSU Samim K Y Müh  
ANG Özdem Prof Dr  
BAYTOP Turhan Prof Dr  
BERKİTEN Rahmiye Uz Dr  
ÇETİN Enver Tali Prof Dr  
ECZACIBAŞI Nejat K Y Müh  
GEMİCİOĞLU Neriman Uz Dr  
KASIMOĞLU Ömer Prof Dr  
NOYAN Turgut Prof Dr  
TÖRECI Kurtuluş Prof Dr  
ULUBELEN Ayhan K Y Müh

## Yayın Kurulu

AYVAZ Suphi Uz Dr  
BADUR Selim Ecz  
BERKİTEN Rahmiye Uz Dr  
BÜYÜKBABA Şengül Mik Uz  
ERAKSOY Halûk Dr  
GORLER Bülent Kim Y Müh  
SÜR Dehen Ecz

## Dergi Düzeni

ÖZGÖREN Şükran Y Dekoratör

## Yazışma Adresi

Prof Dr Ömer Kasımoğlu  
İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji,  
Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji  
Kürsüsü, Temel Bilimler Binası,

Çapa - Topkapı/İstanbul



# KÜKEM DERGİSİ

İçinde

KIRKCI Özgür, Elçi, Dönmez, Özdemir

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Prof. Dr. Özgür, Özdemir

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

Yeni bir tıp türü

ÖZGÜR, ÖZDEMİR, DÖNMEZ, ELÇİ

Yeni bir tıp türü

Prof. Dr. Özgür, Özdemir

İLANLAR MATBAACILIK SANAYİ

ve TİCARET KOLLEKTİF ŞİRKETİ

Prof. Dr. Kâzım İsmail Çarhan cad.

No. 18 - 18 Çarşamba Tel: 22 97 22



İstanbul - Tophane

# KÜKEM DERGİSİ

Cilt : 2

Eylül 1979

Sayı : 1

## İÇİNDEKİLER

Dr Zühdi Berke Hocamız  
Dr J Roger Porter'in kaybı

### Çalışmalar

Enzim immobilizasyonunda kullanılan kimyasal yöntemler  
*Dr Azmi TELEFONCU*

Enzymatic saccharification of various agricultural wastes  
*Dr Güniz KAYTAN, Dr Nazif KOLANKAYA*

Mantar kültür koleksiyonlarının önemi ve mantar kültür koleksiyonu  
hazırlama yöntemleri  
*Doç Dr Emel TUMBAY*

Zeytin suyundan üretilen mikrobiyal proteinin (*Aspergillus niger* M1) fareler  
ve sıçanlar üzerindeki etkisi  
*Dr Mustafa ÖZYURT*

B<sub>12</sub> vitamininin fermentasyonla elde edilmesi  
A — B<sub>12</sub> vitamininin saflaştırılması  
*Prof Dr Enver Tali ÇETİN, Kim Y Müh Bülent GÜRLER*

B<sub>12</sub> vitamininin fermentasyonla elde edilmesi  
B — B<sub>12</sub> vitamininin aktivitesini tayin yöntemleri  
*Prof Dr Enver Tali ÇETİN, Kim Y Müh Bülent GÜRLER, Ecz Selim BADUR*

Soya fasulyesi ve küspesinden hazırlanan besiyerleri  
*Prof Dr Enver Tali Çetin, Bio Neriman Büğet, Dr Gülten Ötük*

Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Enstitüsü (KÜKENS)in kuruluşu  
*Prof Dr Enver Tali ÇETİN*

Genetik sözlüğü  
*Prof Dr Engin BERMEK*

### Derleme

Lejyonerler hastalığı  
*Dr Halûk ERAKSOY*

### Özetler

### Haberler

*Dergi yazı kuralları*

KÜLTÜR KOLEKSİYONLARI ve ENDÜSTRİYEL  
KÜKEM  
1. Kongresi  
28-29 Eylül 1979  
MİKROBİYOLOJİ  
(KÜKEM) DERNEĞİ

# PROGRAM

FIRST CONGRESS OF CULTURE COLLECTION AND  
INDUSTRIAL MICROBIOLOGY KUKEM

28 - 29 Eylül, 1979 İSTANBUL

28 - 29 Eylül, 1979 İSTANBUL



**DÜZENLEME KURULU**

**ONURSAL BAŞKAN**

Halûk ALP (İstanbul Üniversitesi Rektörü)

**BAŞKAN**

Güngör ERTEM (İstanbul Tıp Fakültesi Dekanı)

**GENEL SEKRETER**

Türkân ERBENGİ

**GENEL SEKRETER YARDIMCISI**

Enver Tali ÇETİN

**ÜYELER**

Samim AKSU

Özdem ANĞ

Turhan BAYTOP

Rahmiye BERKİTEN

Bayhan ÇUBUKÇU

Neriman GEMİCİOĞLU

Nuran GÖKHAN

Ömer KASIMOĞLU

Olcay NEYZİ

Turgut NOYAN

Mustafa ÖZYURT

Nadir SARIŞEKER

Ergin SENCER

Kurtuluş TÖRECİ

Tuncay YURTESİN



Bu Kongre İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi ve  
KÜKEM Derneği tarafından düzenlenmiştir

**Kültür Koleksiyonları ve Endüstriyel  
Mikrobiyoloji (KÜKEM)  
1. Kongresi**

**TOPLANTI YERİ :** Sheraton Oteli, Taksim ve Çapa Kampusu

**KAYIT :** (Otel girişinde)

27 Eylül 1979, Saat: 14.00 - 17.00

28 Eylül 1979, Saat: 8.00

**KAYIT ÜCRETİ :** 300 TL. dir.

**KONGRE YEMEĞİ :** 27 Eylül akşamı saat: 21.00 de Kervansaray'dadır.  
Biletlerin kayıt masasından satın alınmasını rica ederiz.

**DİAPOZİTİFLER :** Konuşmacılar 5 cm X 5 cm büyüklüğünde slayt gösterebileceklerdir.

**POSTERLER :** Her sunucu için 100 cm X 100 cm boyutlu bir yer ayrılacaktır.

**SOSYAL PROGRAM :** İstanbul Tıp Fakültesi 5. Kongresi aktivitesi içinde olacaktır.

**28 Eylül 1979, Cuma (Öğleden önce)**

8.00 : Kayıt

9.45 : Açılış (Programı ayrıca verilecektir)

10.15 - 10.45 A r a

10.45 - 12.45 1. Simpozyum

### **BASİT VE KOMPLİKE FERMENTÖRLERİN TANITIMI**

Düzenleyen : Kimya Y Müh **Nadir Sarışeker**

- |                   |   |                        |
|-------------------|---|------------------------|
| 1 — 10.45 - 11.05 | Fermentörlerin tanımı ve çeşitleri                                    | <b>Hilmi Pamir</b>     |
| 2 — 11.05 - 11.25 | Endüstriyel fermentörlerin temel boyutları                            | <b>Tuncay Yurdesin</b> |
| 3 — 11.25 - 11.45 | Aerobik endüstriyel derin fermentasyonda havalandırma parametreleri   | <b>Selçuk Gökçen</b>   |
| 4 — 11.45 - 12.05 | Endüstriyel fermentasyonda sterilizasyon parametreleri                | <b>Nadir Sarışeker</b> |
| 5 — 12.05 - 12.25 | Laboratuvar çalışmalarında kullanılan çeşitli fermentörlerin tanıtımı | <b>Mustafa Özyurt</b>  |
| 12.25 - 12.45     | Tartışma  |                        |



28 Eylül 1979, Cuma (Öğleden sonra)

14.00 - 17.15 2. Simpozyum

**KOK ŞEKLİNDEKİ BAKTERİLERİN TANISI VE KOLEKSİYONU**

Düzenleyen : Prof Dr **Kurtuluş Töreci**

6 — 14.00 - 14.10	Kok şeklindeki bakterilerin sınıflanması	<b>Kurtuluş Töreci</b>
7 — 14.10 - 14.30	Mikrokok ve Stafilokokların tanısı	<b>Necdet Sevük Rasim Cicioğlu</b>
8 — 14.30 - 14.45	Streptokokların tanısı	<b>Rahmiye Berkiten</b>
9 — 14.45 - 15.00	Enterokokların biyokimyasal ve serolojik tanısı ve Ankara'da izole edilen suşların özellikleri	<b>Sabahattin Payzın İ Tuncer G Wells E Berkman O Tural</b>
10 — 15.00 - 15.15	Streptokok infeksiyonlarında serolojik tanı yöntemleri	<b>Ekrem Gülmezoğlu</b>
11 — 15.15 - 15.25	Pnömonokokların tanısı	<b>Ömer Kasımoğlu</b>
15.25 - 15.55	A r a	
12 — 15.55 - 16.10	Neisseria cinsi bakterilerin tanısı	<b>Şengül Büyükbaba</b>
13 — 16.10 - 16.20	Meningokokların serotiplendirimi	<b>İsmet Candan</b>
14 — 16.20 - 16.35	Anaerop kokların tanısı	<b>Kurtuluş Töreci</b>
15 — 16.35 - 16.45	Kokların koleksiyonu	<b>Emel Tümbay</b>
16.45 - 17.15	Tartışma	

**29 Eylül 1979, Cumartesi (Öğleden önce)**

9.30 - 12.40 3. Simpozyum

**TEK HÜCRE PROTEİNİ (SINGLE CELL PROTEIN)**

Düzenleyen : Prof Dr **Enver Tali Çetin**

	9.30 - 9.40	Simpozyumun açılış konuşması	<b>Atıf Şengün</b>
16 —	9.40 - 9.55	Dünyanın ve Türkiye'nin beslenme sorunu	<b>Nadir Hatemi</b>
17 —	9.55 - 10.10	Tek hücre proteini (Single cell protein)	<b>Mehmet Karapınar</b>
18 —	10.10 - 10.25	Diğer besinlerle tek hücre proteininin karşılaştırılması	<b>Türker Aşan</b>
19 —	10.25 - 10.40	Tek hücre protein kaynakları	<b>Enver Tali Çetin</b> <b>Selim Badur</b>
20 —	10.40 - 10.25	Bakterilerden tek hücre protein eldesi	<b>Ali Matur</b>
	10.55 - 11.20	A r a	
21 —	11.20 - 11.30	Alglerden tek hücre protein eldesi	<b>Gülten Ötük</b> <b>Candan Johansson</b>
22 —	11.30 - 11.45	Artık maddelerin değerlendirilmesi ile tek hücre protein eldesi	<b>Nazif Kolankaya</b>
23 —	11.45 - 12.00	Selülozlu artıklardan alkol ve tek hücre protein üretimi	<b>Güzin Kaytan</b>
24 —	12.00 - 12.10	Zeytinsuyunun tek hücre protein eldesinde kullanılışı	<b>Mustafa Özyurt</b>
	12.10 - 12.40	Tartışma	

29 Eylül 1979, Cumartesi ( Öğleden sonra )

13.30 - 14.30 POSTER SUNUSU

- |  |   |
|--|---|
| 25 — Enzim immobilizasyonunda kullanılan kimyasal yöntemler  | <b>Azmi Telefoncu</b>                                     |
| 26 — Çeşitli tarım artıklarının enzimatik olarak sakkarifikasyonu  | <b>Güniz Kaytan<br/>Nazif Kolankaya</b>                   |
| 27 — Spirulina maxima ve Chlorella ellipsoides numuneleri üzerinde renk giderme çalışmaları ve bu işlemin numunelerin amino asit miktarları üzerine etkisi | <b>Candan Johansson</b>                                   |
| 28 — Mantar kültür koleksiyonlarının önemi ve mantar kültür koleksiyonu hazırlama yöntemleri.  | <b>Emel Tümbay</b>  |
| 29 — Zeytin suyundan üretilen mikrobiyal proteinin ( <i>Aspergillus niger</i> M 1) fareler ve sıçanlar üzerindeki etkisi.                                  | <b>Mustafa Özyurt</b>                                     |
| 30 — B <sub>12</sub> vitamininin fermentasyonla elde edilmesi A-B <sub>12</sub> vitamininin saflaştırılması  | <b>Enver Tali Çetin<br/>Bülent Gürler</b>                 |
| 31 — B <sub>12</sub> vitamininin fermentasyonla elde edilmesi B-B <sub>12</sub> vitamininin aktivitesini tayin yöntemleri                                  | <b>Enver Tali Çetin<br/>Bülent Gürler<br/>Selim Badur</b> |
| 32 — Alglerin üretilmesi   | <b>Gülten Ötök</b>  |
| 33 — Stafilokok fajlarının üretilmesi  | <b>Tümer Vural</b>  |
| 34 — Nocardia'ların çeşitli besiyerlerinde üretilmesi  | <b>Gülşen Aktan<br/>Neriman Büğet</b>                     |
| 35 — Anaerob bakterilerin üretilmesi   | <b>Nezahat Tosunoğlu</b>                                  |
| 36 — Bira ve şarap teknolojisinde kullanılan mikrobiyal enzimler   | <b>Yılmaz Sekir</b>                                       |
| 37 — Ankara'da toplu beslenme yapılan değişik kurumlardan toplanan tahıl ve türevlerinde üreyen küfler   | <b>Mine Yurttagül<br/>Nuran Yuluğ<br/>Ayşe Baysal</b>     |

**29 Eylül 1979, Cumartesi (Öğleden sonra)**

**14.15 - 16.30 SERBEST BİLDİRİLER**

Oturum Başkanları : Prof Dr **Sabahattin Payzın**, Prof Dr **Ekrem Gülmezoğlu**

- 37 — 14.15 - 14.25 Tobramycin'e dirençlilik ve plazmidlere bağlı transferi  
**Muvaffak Akman**  
**Muzaffer Baykal**  
**Gürdal Alaeddinoğlu**  
**Nurhan Akyüz**
- 38 — 14.25 - 14.35 Isının, kültür kullanmanın ve ambalaj işleminin kaşar peynirinde kalite, tad ve aromaya etkileri üzerinde araştırmalar.
- 39 — 14.35 - 14.45 Süt ve mamullerinde enterokok grubu bakteriler ve tanımı  
**Erol Ergüllü**
- 40 — 14.45 - 14.55 Anthracycline sınıfı antibiyotik üreten bir streptomyces türünün Kurylowicz ve arkadaşlarının sayısal taksonomisindeki yeri  
**Ürfet Orhon**  
**Seza Bilgin**  
**Banu Yılmaz**  
**Herman Amato**
- 41 — 14.55 - 15.05 Zeytin katı artığının besin değerinin mikrobiyal yöntem ile yükseltilmesi  
**Mehmet Karapınar**
- 42 — 15.05 - 15.15 Fitoplankton kültürü yetiştirilmesinde mikrobiyal proteinlerin kullanılması
- 15.15 - 15.40 A r a
- 15.40 - 17.00 Oturum Başkanları:  
**Prof. Dr. Muvaffak Akman**  
**Prof. Dr. Şevket Yaşarol**  
**Nezihe Tunail**
- 43 — 15.40 - 15.50 Laktik asit bakterilerinin starter olarak seçilmeleri
- 44 — 15.50 - 16.00 Protozoon kültürlerinin sürekliliğinin tanı için önemi, bilim ve yurt bakımından yararı  
**Şevket Yaşarol**
- 45 — 16.00 - 16.10 Trichomonas vaginalis'in besiyerlerinde üretilmesi ve sürekliliği  
**Nilgün Özler**  
**Nedim Çakır**
- 46 — 16.10 - 16.20 Entamoeba histolytica'nın çeşitli besiyerlerinde üretilmesi ve sürekliliği  
**Nilgün Özler**  
**Mucide Ak**
- 47 — 16.20 - 16.30 Soya fasulyası küspesi besiyeri  
**Enver Tali Çetin**  
**Neriman Büget**  
**Gülten Ötük**
- 16.30 - 17.00 Tartışma

KÜLTÜR KOLEKSİYONLARI  
ve  
(KÜKEM)

1. KONGRESİ  
28 - 29 Eylül, 1979  
( *Istanbul Sheraton Oteli* )

Kongre açılış programı ( Saat : 9.45 - 10.15 ) 28 Eylül, 1979

*Prof. Dr. Halûk Alp*

Istanbul Üniversitesi Rektörü

*Prof. Dr. Güngör Ertem*

Istanbul Tıp Fakültesi Dekanı

*Prof. Dr. Enver Tali Çetin*

KÜKEM Derneği Başkanı

Kongre kayıdı : Sheraton Oteli girişinde  
27 Eylül 1979, Saat : 14.00 - 17.00  
28 Eylül 1979, Saat : 8.00 den itibaren

Kongre yemeği : 27 Eylül Saat 21.00 de Kervansaray'dadır (ücretli)  
Biletlerin kayıt masasından alınmasını rica ederiz.

Kokteyl : Istanbul Tıp Fakültesi Dekanı ve Eşi tarafından  
28 Eylül, Saat 19.30 da, Istanbul Üniversitesi  
Profesörler evi, Beyazıt



**Dr. Zühtü BERKE**  
Hocamız

Prof Dr Mehmet Zühdü Berke Aydın'da 1897 yılında doğmuştur. İlk, orta ve lise tahsilini Aydın ve İzmir'de yaptıktan sonra, Yüksek Askeri Veteriner Okulu'na girmiştir. 1918 yılında pekiyi derece ile bitirerek veteriner hekim diplomasını aldıktan sonra, Askerî Bakterioloji-Hane'i Baytari'de görevlendirilmiştir. Bu görevine devam ettiği sürede İstanbul Tıp Fakültesi'ne de öğrenci olarak devam etmiş ve 1926 yılında tabib diplomasını almıştır.

1927 yılında muhtelif enstitülerde bilimsel araştırmalar yapmak üzere Almanya'ya gönderilmiştir ve 32 ayı aşan bir süre içinde birinci sınıf meslekî dergilerde 7 orijinal çalışması yayınlanmış ve 1930 yılında Paris'te toplanmış bulunan Birinci Uluslararası Mikrobiyoloji Kongresi'ne katılmış ve tebliğ sunmuştur.

1933 yılında, İstanbul Üniversitesi kurulurken, jüri tarafından Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Salgınlar Bileisi Enstitü Doçentliğine seçilmiştir. Prof Dr Hugo Braun'a değerli bir yardımcı olmuştur. Enstitü kuruluncaya kadar

ders ve tatbikat malzemesini görevli bulunduğu belediye laboratuvarında hazırlamıştır.

1935 yılında Bakanlar Kurulu Kararı ile Milli Eğitim Bakanlığı tarafından yeni kurulmakta olan Kâbil Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne Bakterioloji, Enfeksiyon hastalıklar ve Hijyen dersleri Profesörlüğüne gönderilmiştir. Üç yıl için istenmiş olan Prof Dr Zühdü Berke, başarılı çalışmaları nedeni ile 12 yıl Afganistan'da kalmıştır. Kâbil'de Bakterioloji, Seroloji, Çiçek, Kuduz, Kolera ve Tifo aşı laboratuvarlarından oluşan bir Bakterioloji ve Hıfzısıhha Enstitüsü de kurmuş, halka, modern tababete inanç ve güven sağlamıştır. Afganistan'da kaldığı sürede Kâbil Tıp Fakültesi Dekanı olarak ve Başbakanlığa bağlı olan "Mustakil Sıhhiye Reisliğinde" Reis olarak çalışmıştır. Kendisine, yaptığı hizmetler için Maarif Veziri tarafından takdirname, Kral tarafından da birinci derecede altın maarif nişanı verilmiş ve Afganistan tarihinde unutulmayacak hizmetleri nedeni ile T.C. Hükümetine yardımları için teşekkürler arz edilmiştir.

Prof Dr Zühdü Berke 1947 yılında Türkiye'ye dönmüş, Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı, Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsünde Aşı ve Serum Şubesi Müdürü olarak çalışmaya başlamıştır. Enstitüdeki çalışmaları daha sonra virus araştırmaları yönünde gelişmiştir. 1950-51 influenza salgınında etken virus izole edilip tiplendirilmiş olduğundan Enstitü Dünya Sağlık Merkezi tarafından, Dünya grip merkezine bağlı, Türkiye grip merkezi olarak kabul edilmiş ve Z Berke Türkiye Viroloji eksperisi tayin edilmiştir. 1958 yılında, virus aşılarını, virus araştırma ve doku kültürleri laboratuvarını da içine alan Viroloji Şubesi kurulmuş ve kendisi bu şubenin ilk müdürü olmuştur. Enstitüde standart stok virus susları ile izole edilen virus suslarından



XIV. Avrupa Poliyomyelit ve diğ er Virus Hastalıkları Simpozyumu 1973.

oluş an bir virus kültür koleksiyonu yapılmasına öncülük etmiştir. Emekliye ayrılıncaya kadar (13 Temmuz 1962) Viroloji Ş ubesi Müdürü görevini başarı ile sürdüren Zühdi hocamız yalnız resmî kayıtlara göre emekli olabilmıştır. Tükenmeyen memleket ve bilim sevgisi ile, hiç bir maddi karş ılığ ı olmadan, kurmuş olduğı Viroloji Ş ubesi'ndeki çalışmalarına hiç aksatmadan devam etmiş ve 1974 yılında, 1919'dan

1961'e kadar yapmış olduğı yayınlarına, "Tıbbi Viroloji" adı altında bir eser katmıştır.

Örnek insan, bilim adamı, araştırmacı ve idareci olarak 6 Temmuz 1979'da kaybetmiş olduğumuz Zühdi Hocamız gönüllerimizde mikrobiyoloji ve özellikle viroloji bilim dallarının temel taşı olarak yaşayacaktır.

*Neriman GEMİCİOĞ LU*



DR J ROGER PORTER'İN KAYBI

Dünya çapında tanınmış Amerikalı Mikrobiyoloji profesörü, Amerikan Mikrobiyoloji Cemiyeti eski başkanı, 28 yıl başkanlık yaptığı Iowa Üniversitesi Mikrobiyoloji Departmanından 1977 yılında emekliye ayrılan ve 1978 yılında Uluslararası Mikrobiyoloji Dernekleri Birliği (IAMS)'nin gelecek başkanı (President-Elect) seçilen Dr J Roger Porter kısa bir hastalıktan sonra 24 Mayıs 1979 da hayata gözlerini yummuştur.

John Roger Porter, Alma (Nebraska) da doğmuştur. Bakteriyolojide "bachelor" ve "master" derecelerini Iowa State College'den ve "Ph.D." derecesini Yale Üniversitesinden almıştır. Akademik yükselmelerini yaptığı Iowa şehri tıp okulunun mikrobiyoloji departmanında "Profesör" ve 1946 yılında departmanın başkanı olmuştur. "Bacterial Chemistry and Physiology" adlı klasik ders kitabı 1946 yılında basılmış ve dünyanın her yanındaki mikrobiyologlar tarafından benimsenerek derslerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Başkanı bulunduğu departmanı mükemmel idaresi

ve mikrobiyoloji araştırma literatürüne sayısız katkısı ile ün yapmış, aynı zamanda Amerikan Mikrobiyoloji Derneği (ASM)'nde lider durumunda olmuştur. ASM'nin bir önceki başkanı, bir önceki Uluslararası Aktivite Komitesi üyesi ve IAMS'nin Bakteriyoloji Seksiyonu Konsülü üyeliğini yapmıştır. Ayrıca ASM'nin çeşitli komitelerinde üyelik yaparak sayısız görevleri ile büyük hizmetlerde bulunmuştur.

J Roger Porter diğer profesyonel organizasyonlarda da önemli görevler almıştır. Amerikan Biyoloji Bilimleri Enstitüsü'nde başkan ve ikinci başkan olarak hizmet etmiştir. Amerikan Bilim Gelişmesi Derneği ve Amerikan Kimya Derneği üyesi olarak yayın işlerinde görev almıştır.

Son yıllarda Dr Porter uluslararası bilime hizmete yönelmiştir. 1969 da UNEP /UNESCO/ICRO Mikrobiyoloji Paneli Başkanlığı, 1974 de UNESCO'nun 18 inci Genel Konferansında USA delegeliği ve Uygulamalı Mikrobiyolojinin Dünyaca Pekiştirilmesi İkinci Uluslararası Konferansı'nda USA delegeliği görevlerini yapmıştır. 1977 de Uluslararası İlişkiler Komisyonu NAS-NRC tarafından desteklenen Faydalı Mikroorganizmalar ve Onların Üretilmeleri Üzerinde Çalışan Komitenin Başkanlığına seçilmiştir. 1977 yılında Iowa Üniversitesi Mikrobiyoloji Departmanından emekliye ayrılmış ve Emeritus Profesör olmuştur.

Dr Porter 1978 Eylül ayında Münih'te toplanan Uluslararası Mikrobiyoloji Dernekleri Birliği (IAMS) nin Genel Kurul toplantısında oy birliği ile IAMS nin gelecek başkanı (President-Elect) seçilmiştir. 1982 de Boston'da yapılacak genel kurul toplantısının kapanışından sonra Profesör HPR Seeliger'den başkanlık görevini devralacaktı.

Dr Porter Mikroorganizmaların dünyadaki önemini, mikroorganizma ürünlerinin ekonomik değerini mikrobiyoloji âleminin dışındakilere de duyurmuş ve





3-8 Eylül 1978 Münih 16. Uluslararası Mikrobiyoloji Kongresi.  
Sağdan 1. Dr Porter, 5. Mrs Porter

benimsetmiştir. Son yıllarda mikrobiyolojinin uluslararası düzeyde ilerlemesini amaç edinmiştir. UNEP/UNESCO/ICRO Mikrobiyoloji Paneli onun öncülüğünde gelişmiş, UNESCO dan konferans, kurs ve burs için en büyük desteği mikrobiyoloji almıştır.

Dr Porter'ı 14-19 Mart 1979 da Bombay'da toplanan Üçüncü Uluslararası Kültür Koleksiyonları Konferansı'nda tanımak bahtiyarlığına eriştim. İsteğimizi benimseyerek 1977 yılının sonlarında Kürsümüzü şereflendirmiştir. Kürsümüzde bakteriyoloji, seroloji, mikoloji, parazitoloji ve viroloji rutin çalışmalarımız ve araştırmalarımız hakkında bilgi almış, bilhassa geliştirmeğe çalıştığımız

Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları ve Endüstriyel Mikrobiyoloji çalışmalarımızla ilgilenmiştir. Kürsümüzdeki genç araştırmacıların herbiri ile meşgul olmuş ve çalışmalarını teşvik etmiştir. USA ya döndükten sonra ilgilenerek Osaka Üniversitesi Fermentasyon Kürsüsü'nde kürsümüzden bir doktora öğrencimize iki yıl süreli burs sağlamıştır.

Dr Porter KÜKEM Derneğinin kurulmasından ve KÜKEM Dergisi'nin yayınlanmasından büyük memnuniyet duymuştur. KÜKEM'in 1. sayısında bu memnuniyeti ifade eden bir paragraf yazısı bulunmaktadır. 22 Şubat 1979 da yazdığı son mektubun ilgili paragrafları da şöyledir :

"Dear Doctor Cetin :

Thank you for sending a copy of the first issue of the periodical of the KÜKEM association, and also for your nice letter.

The periodical is a fine start for your association and I wish you much success for the future. I apologize for not sending you an article sooner for your publication, but I promise this will be done in a month or so. It seems as though when I have had a little time to collect my thoughts a distraction comes along to interfere with writing.

Your program for the 1st Congress of the KÜKEM associations was interesting, and that of the 2nd is worthwhile. You are doing an excellent job of getting the association organized."

Dr Porter 1978 de Münih'te toplanan 16. Uluslararası Mikrobiyoloji Kongresi'nde bizi büyük bir dostlukla karşılamış ve kürsü çalışmalarımız hakkında bilgi istemiştir. Dr Porter dünya çapındaki şöhretini yalnız mikrobiyoloji alanındaki geniş bilgisi ve çalışmaları ile değil, insancıl, samimi, sıcak ve sevgi dolu kişiliği ile yapmıştır. Kendisini yarıktan tanıma fırsatını son iki yılda bulabildiğimiz halde, aramızda kırk yıllık dost gibi bir bağ oluşmuştur.

Dr Porter'ın kaybı ülkesinde ve dünya mikrobiyoloji âleminde büyük yankılar yapmıştır. Kürsümüzde büyük bir dostunu kaybetmenin elemiini duymaktadır.

*Enver Tali ÇETİN*

# Enzim immobilizasyonunda kullanılan kimyasal yöntemler

Azmi TELEFONCU \*

## ÖZET

Enzimlerin uygun taşıyıcılara bağlanması ile kararlı, suda çözünmeyen ve daha ekonomik katalizörler yani 'immobilize enzimler' elde edilir. Enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler, kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki büyük gruba ayrılır. Bu makalede yalnız kimyasal yöntemler üzerinde detaylı olarak durulmuş, fiziksel yöntemler ve immobilize enzimlerin uygulama alanları üzerinde durulmamıştır. Ancak immobilize enzimlerin son yıllarda analitik, endüstri ve tıbbi amaçlarla geniş ölçüde kullanıldığını belirtmekte yarar vardır.

## SUMMARY

*Chemical methods using for immobilization of enzymes. It is possible to obtain water-insoluble, stable and more economical catalysts, that is immobilized enzymes by linking the enzymes to suitable carriers. Methods using for im-*

mobilization of enzymes can be divided into two major groups, namely physical and chemical. In this article, only chemical methods are described in detail, the physical methods and the use of immobilized enzymes are not described. However it is necessary to point out that in recent years, immobilized enzymes have found wide use in analytical, industries and in medical field.

## 1. GİRİŞ

Bilindiği gibi enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür hatta çoğu kez olanaksızdır. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir

\* E. Ü. Kimya Fakültesi Biyokimya ve Mühendisliği Bölümü Bornova İzmir Turkey

kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok artırmaktadır. Yukarıda da belirttiğimiz gibi katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar.

Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümlenebilmek, enzimleri kimya endüstrisi için daha çekici hale getirmek için özellikle son on yılda enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmış olup bu alanda yapılan yayınların sayısı yıldan yıla üstel katlarla artmaktadır.

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler. Enzim immobilizasyonunun endüstriyel önemi kavrandıktan sonra son yıllarda "enzim mühendisliği" adı altında yeni bir mühendislik dalı doğmuştur.

Konunun çok geniş olması nedeniyle bu yazıda ancak kimyasal yöntemlerle enzim immobilizasyonu üzerinde durulacaktır. Fiziksel yöntemlerle enzim immobilizasyonu ve immobilize enzimlerin uygulama alanları diğer yazılarımızda tüm ayrıntılarıyla tartışılacaktır.

Özellikle son beş yıldan beri mikroorganizmaların immobilizasyonu üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmış ve immobilize mikroorganizmalardan endüstride yararlanılmaya başlanmıştır (17, 18, 60).

## 2. KİMYASAL YÖNTEMLERLE ENZİM İMMOBİLİZASYONU (1, 16, 27, 33, 35, 39, 40, 50, 68, 72)

Bu yöntemler enzim molekülünün reaktif bir taşıyıcıya kovalent bir bağla bağlanması temeline dayanır. Ancak dikkat edilmesi gereken en önemli nokta; bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinde olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeniyle bu grupların rahatsız edilmemesidir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağla bağlanması enzim zincirindeki amino asitlerin taşıdığı reaktif gruplar yardımıyla olmaktadır. Bağlanmada etkin olan amino asitler; lizin ( $\xi$ -amino grubu), tirozin (fenolik-OH grubu) aspartik ve glutamik asit (karboksil grubu), histidin (imidazolil grubu), arginin (guanidino grubu), sistein (-SH grubu) ve triptofan (imino grubu)dır. Kimyasal yöntemler tersinir olmadıklarından immobilizasyondan sonra serbest enzimin geri kazanılması olanaksızdır. Kimyasal yöntemlerle enzim immobilizasyonu üç grupta incelenebilir.

### 2. 1. Enzimin suda çözünmeyen reaktif taşıyıcıya bağlanması.

Bu tip immobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar doğal veya sentetik olabileceği gibi organik veya anorganik de olabilirler. Bu amaçla en çok kullanılan sentetik taşıyıcılar; polistiren, polimetakrilik asit, poliakrilamid, polimaleik anhidrit türevleri ve polipeptitlerdir. Doğal taşıyıcılar ise; selüloz, nişasta, dekstran, agaroz ve camdır. Immobilizasyonda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. Immobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH v.s.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofob tipte de olmamalı, suda ıslanabilmeli ayrıca mekanik olarak kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde, enzim-

polimer bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında, taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizmaların üremesine olanak vermemesi, pH ve çözümlere karşı dayanıklı olması gibi özelliklere sahip olmasına dikkat edilir.

Bu tip immobilizasyon üç biçimde uygulanmaktadır.

1. *Reaktif taşıyıcı + enzim çözeltisi*  $\longrightarrow$  *imm. enzim.*
2. a) *Taşıyıcı + reaktif*  $\longrightarrow$  *Reaktif taşıyıcı,*  
b) *Reaktif taşıyıcı + enzim çöz.*  $\longrightarrow$  *imm. enzim.*
3. *Taşıyıcı + enzim çöz. + reaktif*  $\longrightarrow$  *imm. enzim.*

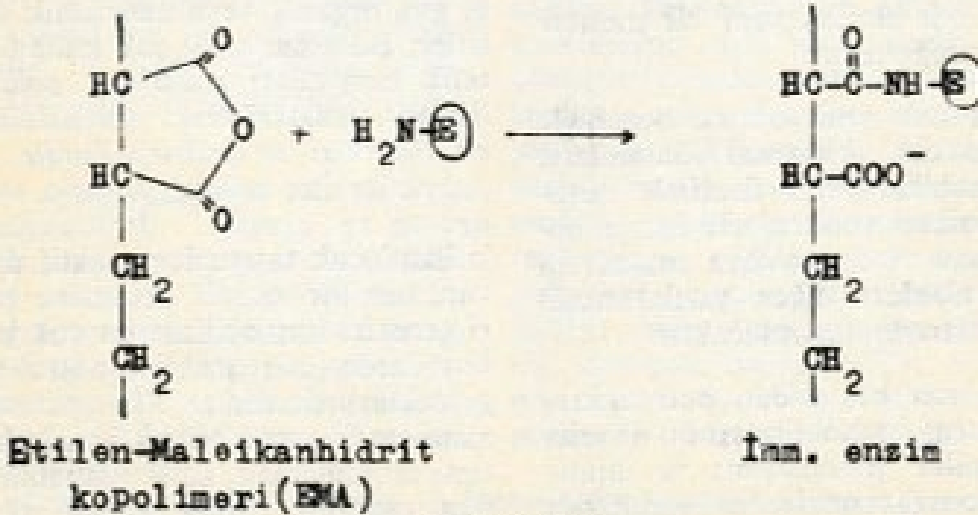
2. 1. 1. Bu yöntem ile immobilizasyon, reaktif bir taşıyıcı ve enzim çözeltisinin karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Taşıyıcı genellikle reaktif bir monomer polimerleştirilerek hazırlanır. Bu tip taşıyıcılar suya duyarlı olduklarından susuz ortamda hazırlanır ve enzim çözeltisi ile karıştırıldıklarında enzim üzerindeki reaktif gruplarla reaksiyon verirler (14, 24, 26, 51, 75).

Örnek : Polianhidritlerle enzim immobilizasyonu (Formül 1).

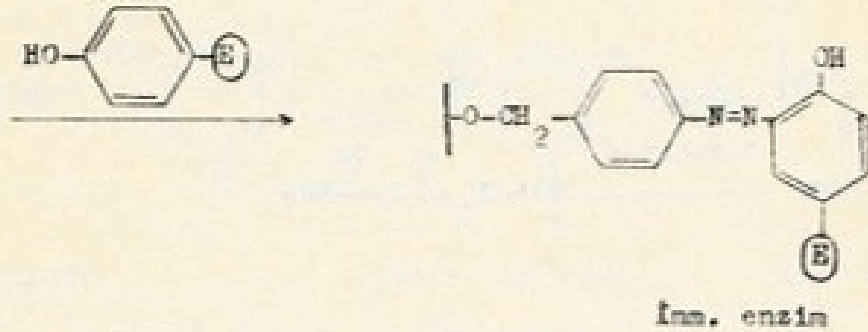
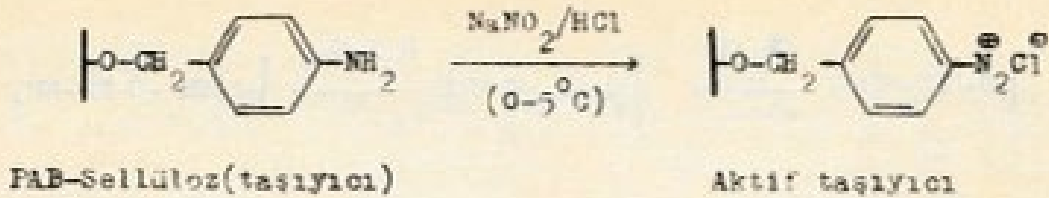
Bu immobilizasyon zayıf bazik ortamda gerçekleştirildiğinden karboksil grupları iyonik haldedir. Ayrıca bir enzim molekülü üzerinde birden fazla serbest amino grubu bulunacağından enzim molekülünün birden fazla noktadan taşıyıcıya bağlanması da doğaldır.

2.1.2. Reaktif olmayan taşıyıcı önce aktive edici bir reaktif ile reaksiyona sokulur ve böylece elde edilen reaktif taşıyıcı ilk işlemde olduğu gibi enzim çözeltisi ile karıştırılarak immobilizasyon gerçekleştirilir. Bu tip taşıyıcılara literatürde çok sık rastlanmaktadır (41). Aşağıda bu konuda bazı örnekler sunulmuştur.

Örnek I : Aril amino grubu içeren taşıyıcılar : Bu tip taşıyıcılar diazonyum tuzuna dönüştürülerek aktive edilirler (7-9, 14, 19, 20, 25, 26, 28, 30, 37, 45, 57, 59). Kenetlenme reaksiyonu genellikle enzimin tirozin artıkları üzerinden gerçekleşmektedir (Formül 2 a).

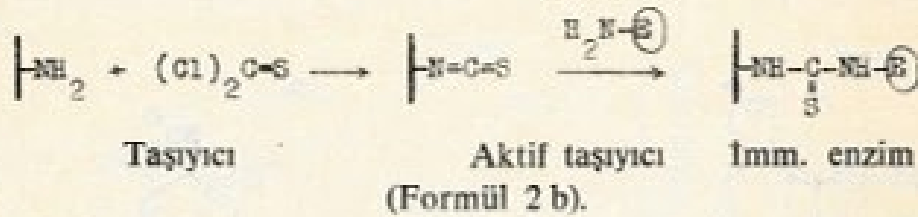


(Formül 1).



(Formül 2 a)

Örnek II : Amino grubu (alifatik ve ya izotiyosiyanat (3, 7-9, 41, 42, 44, 68) içeren polimer taşıyıcılar : Bu tip taşıyıcılar izosiyanat (12, 13) ve ya izotiyosiyanat (3, 7-9, 41, 42, 44, 68) şekline dönüştürülerek aktive edilirler (Formül 2 b).



(Formül 2 b).

Bağlanma, enzimin lizin artıklarının içerdiği ε-amino grupları ve protein zincirinin N-ucundaki serbest amino grupları üzerinden gerçekleşmektedir.

Örnek III : Karboksil grubu içeren polimer taşıyıcılar: Bu tip taşıyıcılar; azit (29,30,37,38,45,58), 0-açıl üre (19, 36, 47, 48, 65, 69) türevlerine dönüştürülerek veya Woodward Reaktifi K (WRK) ile (15, 51, 52, 63) reaksiyona sokularak aktive edilirler (Formül 3).

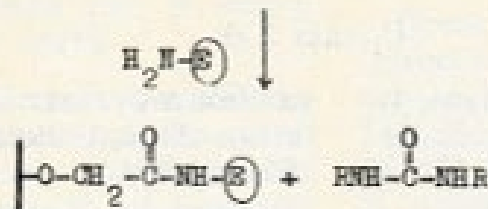
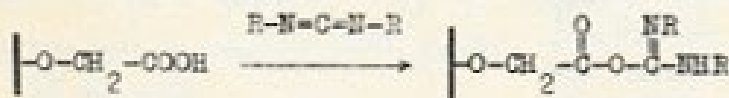
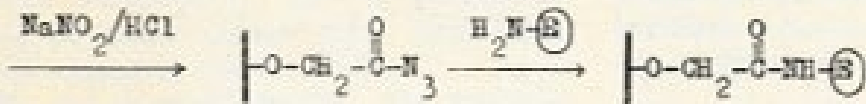
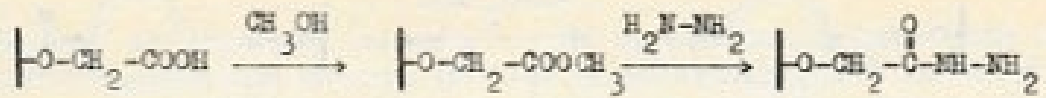
Örnek IV : Alkol grubu içeren polimer taşıyıcılar : Sentetik polialkoller yanında ilk akla gelen önemli doğal polihidroksi polimerleri; selüloz, nişasta ve agarozdur. Bu taşıyıcıların alkol grubu

üzerinden aktivasyonları; siyanobromür (2, 5, 11, 22, 48, 62), s - triklorotriazin (34, 46, 56, 57, 70, 73) ve  $\text{TiCl}_4$  (10) ile gerçekleştirilir. Bu tip reaktif taşıyıcılar artık ticari olarak da hazırlanmaktadır. (Formül 4).

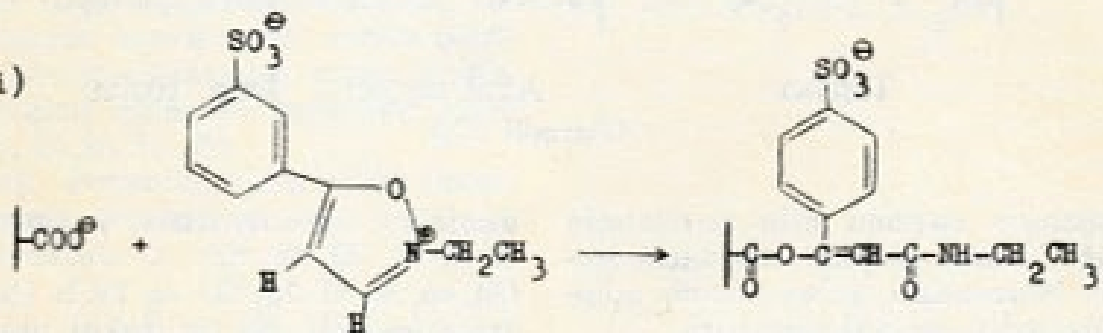
Örnek V : İnorganik taşıyıcılar : Bu tip taşıyıcılar içinde en önemlisi camdır (2, 10, 49, 54, 66, 68). Gözenekli cam 3-aminopropiltrietoksisilan ile reaksiyona sokulduğunda camın 3-aminopropildietoksisilan türevi elde edilir. Bu türev, aşağıda anlatılan biçimlerde aktive edilerek enzimler için taşıyıcı olarak kullanılır. (Formül 5 a).

Enzimlerin (I) numaralı taşıyıcıya bağlanılır. (Formül 5 a).

lanması; diazonyum tuzu veya izotiyosiyanat üzerinden gerçekleşmektedir. (II)

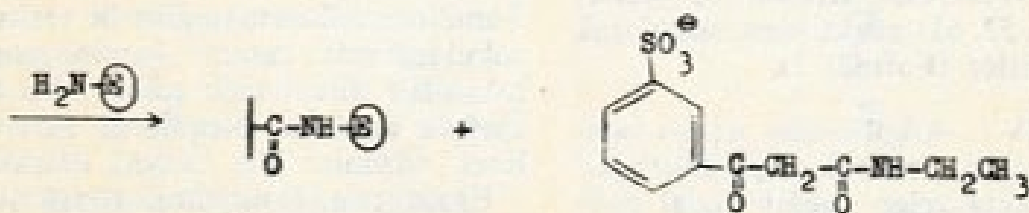


iii)



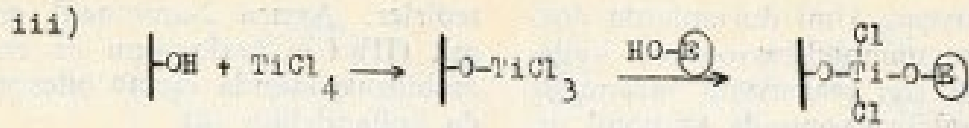
Polimer taşıyıcı WFK

Aktif taşıyıcı



Imm. enzim

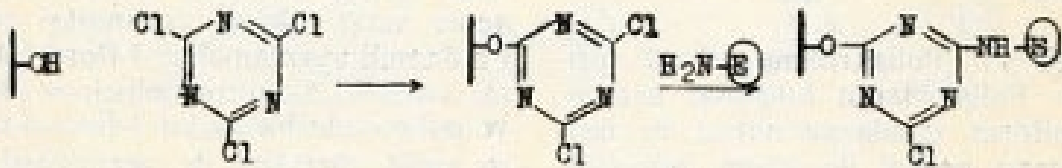
(Formül 3)



Taşıyıcı

Aktif taşıyıcı

Imm. enzim

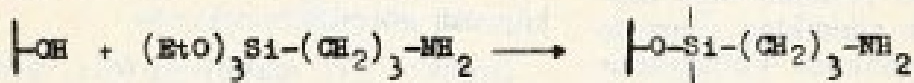


Taşıyıcı

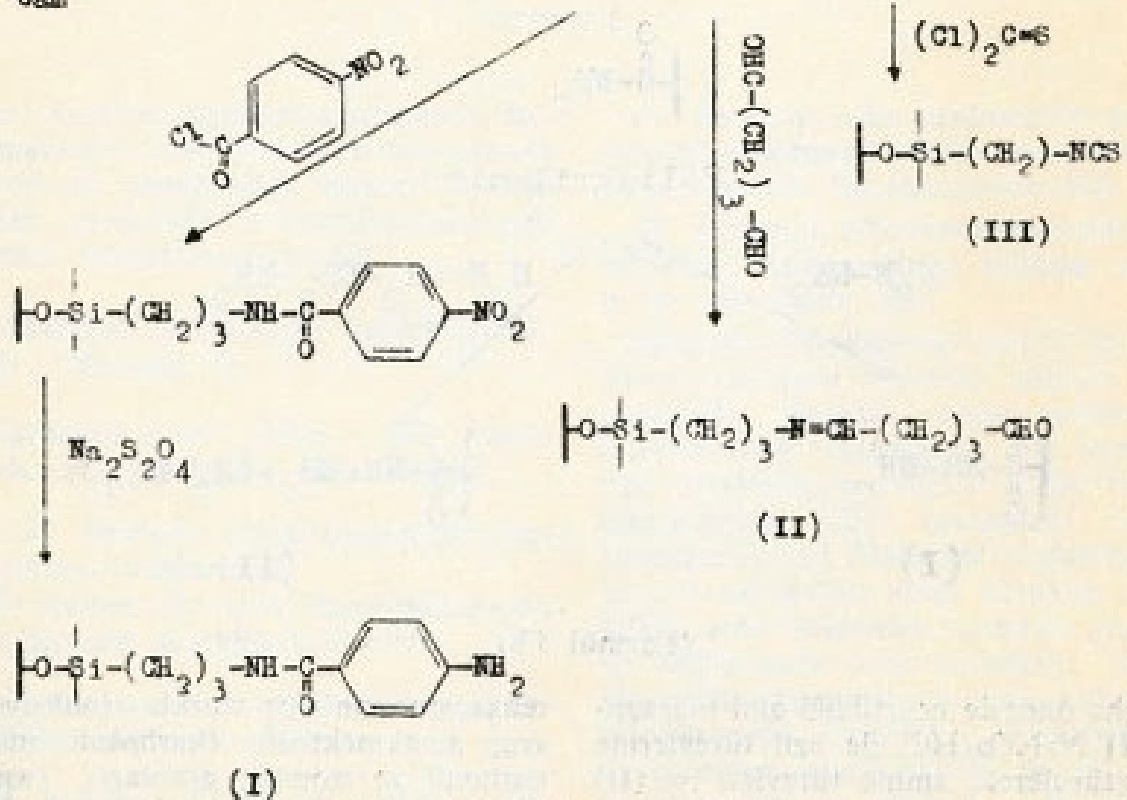
Aktif taşıyıcı

Imm. enzim

Formül 4.



Cam



Formül 5a



numaralı taşıyıcı kimi durumlarda doğrudan enzim immobilizasyonunda kullanılırken asıl Ugi reaksiyonu yardımıyla enzim immobilizasyonunda karbonil ortağı olarak kullanılmaktadır (4, 62). (III) numaralı taşıyıcı bir izotiyosiyanat olduğundan daha önce de belirtildiği gibi doğrudan enzim immobilizasyonunda kullanılır.

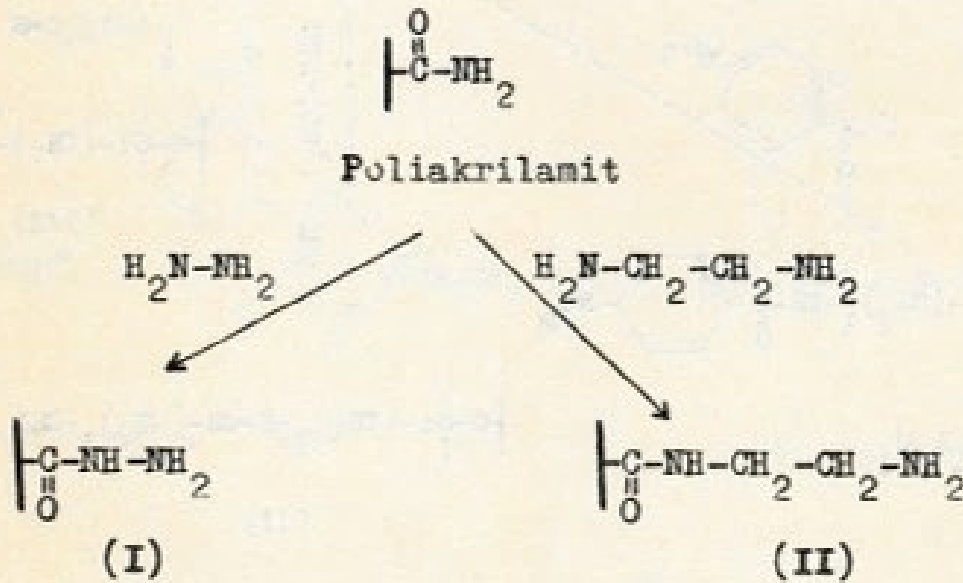
**Örnek VI:** Poliakrilamid tabanlı taşıyıcılar: Poliakrilamid kimyasal kararlılığı, uniform yapıda ve nötral bir taşıyıcı olması nedeni ile enzim immobilizasyonunda değişik biçimlerde modifiye edilerek geniş ölçüde kullanılmaktadır. Poliakrilamidin enzim immobilizasyonunda kullanılan iki önemli türevidir; hidrazin ve etilendiamin ile verdiği türevlerdir (21, 31). Ayrıca gerek poliakrilamid gerekse yine bir poliamit olan naylon kısmen hidroliz edildikten sonra da enzim immobilizasyonunda kullanılırlar (26 b.) (Formül 5 b).

tedirler. Ayrıca 2-aminoetil poliakrilamid (II) Ugi reaksiyonu ile enzim immobilizasyonunda amino bileşeni olarak da kullanılabilir (4).

**Örnek VII:** Floroaril grubu içeren taşıyıcılar: Bu tür taşıyıcılar özellikle düşük sıcaklıklarda nitrolanarak aktive edilirler. Nitrolama sırasında ve nitrolama işlemi bittikten sonra taşıyıcının neme karşı çok iyi korunması gerekir. En önemli uygulamalar; 3-floro-2,4-dinitro, 4-floro-3,5-dinitro polistiren türevleri ve polimetakrilik asidin 3-floro-4,6-dinitro anilit türevleri ile gerçekleştirilmiştir (44a, b, 41) (Formül 6).

2. 1. 3. Bu tip immobilizasyonda taşıyıcı, aktive edici reaktif ve enzim aynı çözeltide bulunur. Reaktif aynı anda hem taşıyıcı hem de enzim ile reaksiyon vermekte ve ikisi arasında bağlantı köprüsü görevi görmektedir.

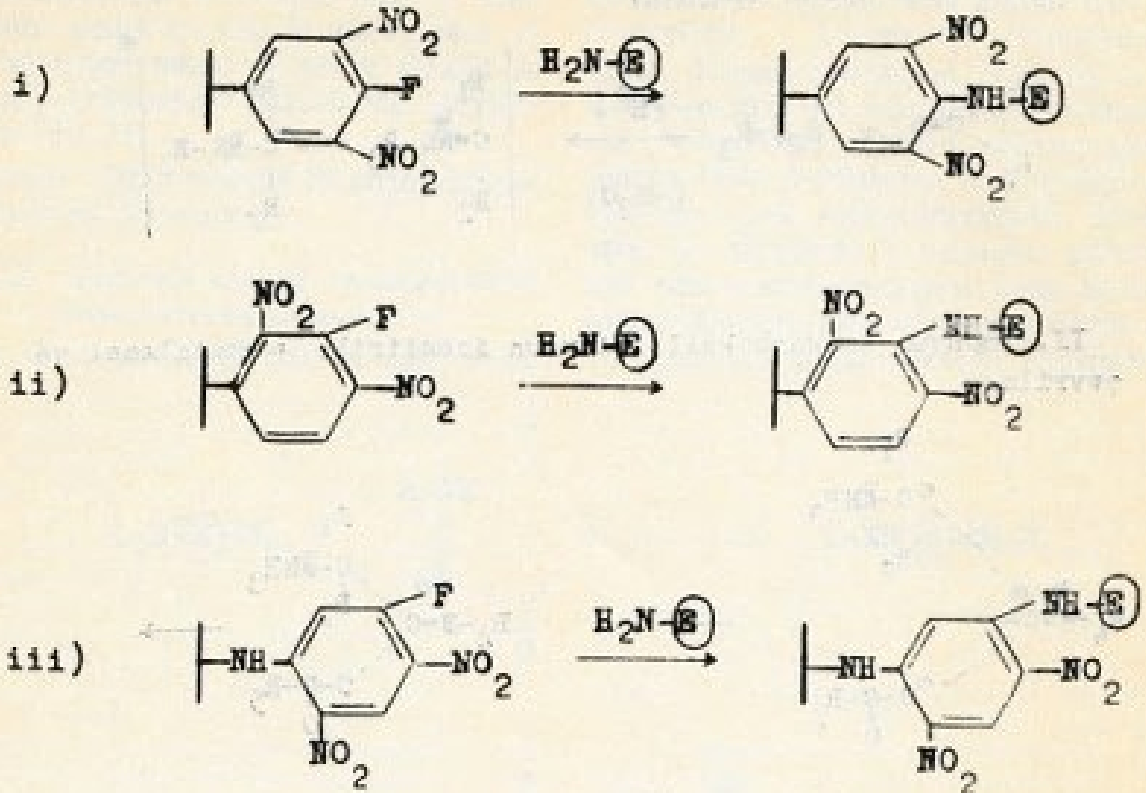
**Örnek:** Ugi reaksiyonu (61) yardımı ile enzim immobilizasyonu (4, 62): Bu



(Formül 5 b)

Daha önce de belirtildiği gibi hidrazitler (I)  $\text{NaNO}_2/\text{HCl}$  ile azit türevlerine dönüştürülerek, amino türevleri ise (II) diazonyum tuzu veya izotiyosiyanat türevlerine dönüştürülerek aktive edilmek-

reaksiyon için dört farklı fonksiyonel grup gerekmektedir (karboksil, amino, karbonil ve izonitril grupları). Taşıyıcı adı geçen gruplardan birini taşımalıdır. Enzim molekülü üzerinde gerek serbest



Formül 6

amino gerekse karboksil grubu zaten bulunmaktadır. Izonitril içeren taşıyıcıların sentezi güç olduğundan izonitril bileşeni olarak genellikle 3-dimetilaminopropil izonitril kullanılmaktadır (4).

Reaksiyon iki adımda gerçekleşmektedir : (Formül 7).

Karboksil iyonu yerine  $-OH^-$  iyonu ile de aynı reaksiyon oluşmaktadır.

## 2. 2. Enzimin bifonksiyonel gruplarla çaprazık bağlanması.

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört biçimde gerçekleştirilir (74).

a) Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu (32).

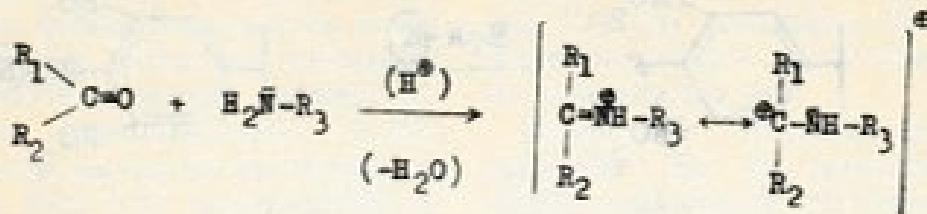
b) Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu (53),

c) Enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu (64),

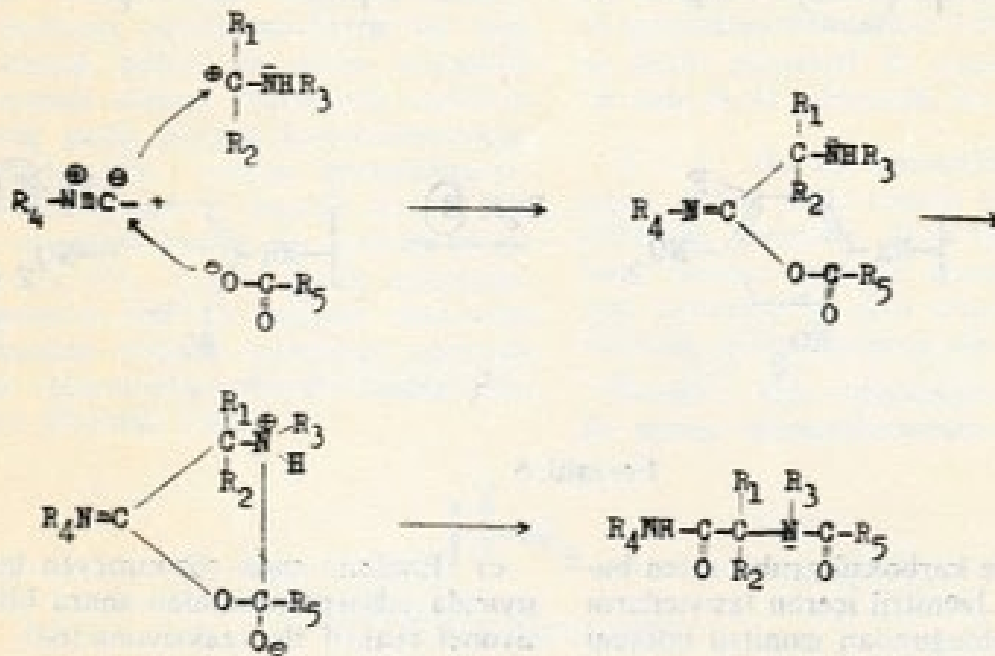
d) Enzimin, bifonksiyonel reaktif tarafından aktifleştirilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu (55).

Enzimin bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu sırasında reaktifin miktarı çok önemlidir. Reaktif, enzim molekülleri arasında bağ oluşturacağı gibi aynı enzim molekülünde molekül içi bir bağ da oluşturabilir. Eğer ortamdaki reaktif konsantrasyonu düşük ise bağlanma daha çok moleküller arası, yüksekse moleküller arası bağlanma yanında molekül içi bağlanmada etkin olacaktır. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan bifonksiyonel reaktifler: Diazobenzidin ve türevleri, glutaraldehit, N, N' -hekzametilenbisiyodoasetamid, hekzametilenendiizosiyanat ve 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzendir.

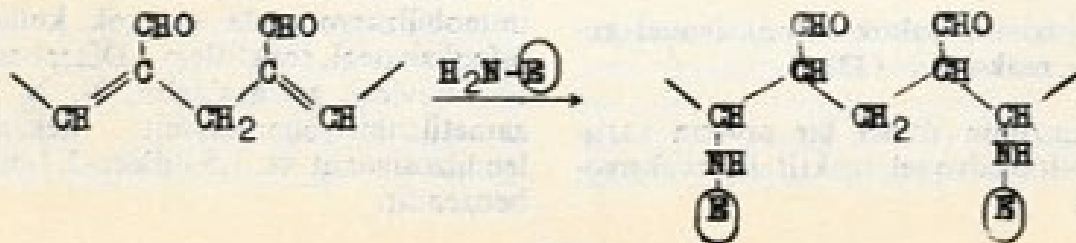
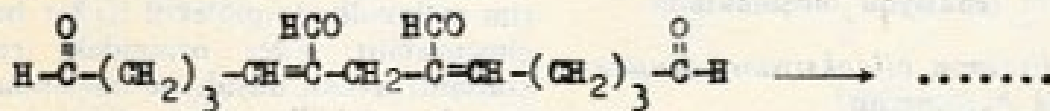
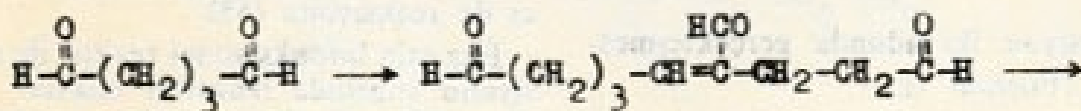
I. İmonyum iyonu oluşumu:



II. İmonyum ve karboksil iyonunun izonitrile  $\alpha$ -katılması ve çevrilme:



Formül 7.



İmmobilize enzim

Formül 8.

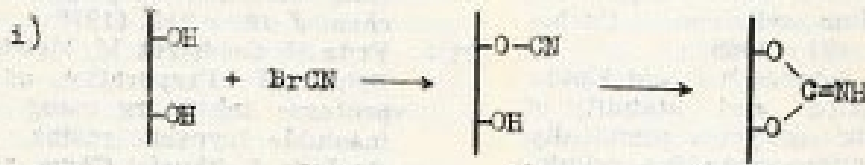
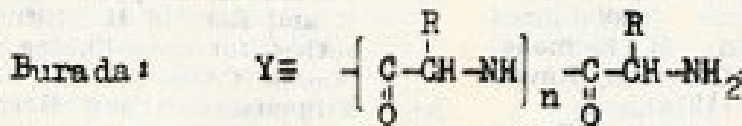
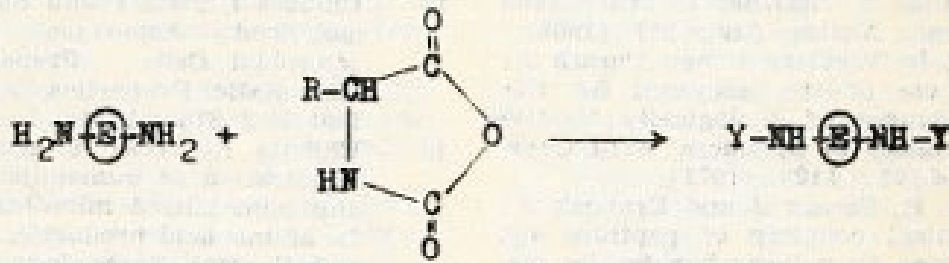
Bifonksiyonel reaktifler protein kimyasında geniş ölçüde kullanılmakta olup bu uygulamalar *Wold* ve *Fasold* ve çalışma arkadaşları tarafından özetlenmiştir (19, 73).

Örnek : Glutaraldehit ile enzim immobilizasyonu (Formül 8).

### 2. 3. Enzimin reaktif monomerlerle kopolimerleştirilmesi.

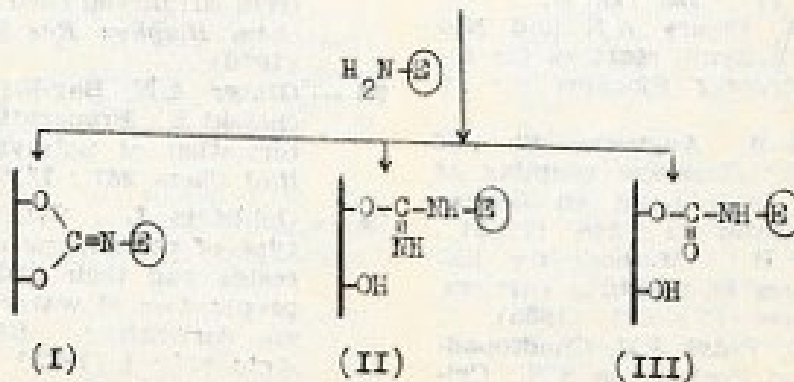
Bu tip immobilizasyona en tipik örnek

N-karboksi amino asit anhidritleri ile enzimlerin kopolimerleştirilmeleridir (23). Kopolimerizasyon enzimin  $\alpha$ - ve  $\xi$ -amino grupları üzerinden yürümektedir. N-karboksi anhidrit olarak; glisin, alanin, lösin, fenilalanin ve izolösinin anhidritleri çok kullanılmaktadır. Prolin, serin ve treoninin N-karboksi anhidritleri enzim immobilizasyonunda kullanılamaz. Çünkü immobilizasyon ürünü su da tamamen çözünmektedir (Formül 9).



Taşıyıcı

Aktif taşıyıcı



Immobilize enzim türevleri

Formül 9.

## KAYNAKLAR

- 1 — Axén R and Porath J : Immobilization of enzymes to agar, agarose and sephadex support, *Methods Enzymol.* Vol 44 p. 19, Ed. K. Mosbach, Academic Press, New York (1976).
- 2 — Axén R, Hellborn E and Winter A : Preparation and properties of cholinesterase covalently bound to sepharise, *Biochim Biophys Acta* 191 : 478 (1969).
- 3 — Axén R and Porath J : Chemical coupling of enzymes to crosslinked dextran, *Nature* 210 : 367 (1966).
- 4 — Axén R, Vretblad P and Porath J : The use of the isocyanid for the attachment of biologically active substances to polymers, *Acta Chem Scand* 25 : 1129 (1971).
- 5 — Axén R, Porath J and Ernback S : Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides, *Nature* 214 : 1302 (1967).
- 6 — Axén R: Methods for Preparing Immobilized Enzymes, *Insolubilized Enzymes*, p. 65 Eds. M. Salmono, C. Saronia and S. Garattini, Raven Press, New York (1974).
- 7 — Barker S A, Somers P J and Epton R : Preparation and properties of  $\alpha$ -amylase chemically coupled to microcrystalline cellulose, *Carbohydr Res* 8 : 491 (1968).
- 8 — Barker S A, Somers P J and Epton R : preparation and stability of exo-amylolytic enzymes chemically coupled to microcrystalline cellulosa, *Carbohydr Res* 9 : 257 (1969).
- 9 — Barker S A, Somers P J and Epton R : Recovery and reuse of water-insoluble amylase derivatives, *Carbohydr Res* 14 : 323 (1970).
- 10 — Barker S A, Emery A N and Novais J M : Enzyme reactors for industry, *Process Biochem* 5 : 11 (1971).
- 11 — Bohnensack R, Augustin W and Hofmann E : Chemical coupling of hexokinase from yeast on Sephadex, *Experientia* 25 : 348 (1969).
- 12 — Branderger H : Methods for linking enzymes to insoluble carriers, *Angew Chem* 67 : 661 (1955).
- 13 — Brown H D, Patel A B, Chadtopadyay S K and Pennington S N : Cellulose-matrix supported biological substances, *Enzymologia* 35 : 215 (1968).
- 14 — Brown H D, Patel A B and Chadtopadyay S K : Ethylene maleic acid copolymer, aminopolystyrene and polyvynylamine matrices for potato apyrase, *Am J Bot* 55 : 729 (1968).
- 15 — Chan W W C : Matrix-bound protein subunits, *Biochem Biophys Res Commun* 41 : 1198 (1970).
- 16 — Chen Li Fu an Tsao G T : Chemical procedures for enzyme immobilization on porous cellulose beads, *Biotechnol Bioeng* 19 : 1463 (1977).
- 17 — Chibata I, Tosa T and Sato T : Immobilized Aspartase Containing Microbial Cells : Preparation and Enzymatic Properties, *Appl Microbiol* 27 : 878 (1974).
- 18 — Chibata I, Tosa T and Sato T : Application of immobilized enzymes and immobilized microbial cells for L-amino acid production, *Immobilized Enzyme Technology*, Eds H. H. Weetal and S Suzuki p. 111, Academic Press, New York (1975).
- 19 — Fasold H, Klappenberger J, Mayer C and Remold H : Bifunctional reactives for cross-linking of Proteins, *Angew Chem* 83 : 876 (1971).
- 20 — Filippusson H and Hornby W E : The preparation and properties of yeast  $\beta$ -fructofuranosidase chemically attached to polystyrene, *Biochem J* 180 : 215 (1970).
- 21 — Fritz H, Gebhardt M, Meister R and Schult H : Preparation of modified protease inhibitors using water-insoluble trypsin resins, *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 351 : 1119 (1970).
- 22 — Givol D, Weinstein Y, Goricki M and Wilchek M A : A general method for the isolation of labelled peptides from affinitylabelled proteins, *Biochem Biophys Res Commun* 38 : 825 (1970).
- 23 — Glazer A N, Bar-Eli A and Katchalski E : Preparation and characterization of polytyrosil trypsin, *J Biol Chem* 237 : 1832 (1962).
- 24 — Goldstein L : Synthesis of a new type of polyanionic and polycationic resins and their utilization for the preparation of water-insoluble enzyme derivatives, *Biochem Biophys Acta* 315 : 1 (1973).
- 25 — Goldstein L, Pecht M, Blumberg S, Atlas D and Levin Y : Synthesis of a new carrier and its utilization for

- Subtilopectidase A, *Biochemistry* 9 : 2322 (1970).
- 26a — Goldstein L, Lifshitz A and Sokolovsky M : Water-insoluble derivatives of naringinase, *Int J Biochem* 2 : 446 (1971).
- 26b — Goldstein L, Freeman A and Sokolovsky M : Chemically modified nylons as supports for enzymes immobilizations, Polyisocyanate-nylon, *Biochem J* 143 : 497 (1974).
- 27 — Goldstein L and Manecke G : The Chemistry of Enzyme Immobilization, *Appl Biochem Bioeng* 1 : 23 Eds. E Katchalski-Katzir and L Goldstein, Academic Press, New York (1976).
- 28 — Grubhofer N and Schleth L : Coupling of proteins on diazotized polyaminostyrene, *Hoppe - Seyler's Z Physiol Chem* 297 : 108 (1954).
- 29 — Hornby L E, Lilly M D and Crook E M : The preparation and properties of ficin chemically attached to carboxymethyl-cellulose, *Biochem J* 98 : 420 (1966).
- 30 — Hornby L E, Lilly M D and Crook E M : Some changes in the reactivity of enzymes resulting from their chemical attachment to water-insoluble derivatives of cellulose, *Biochem J* 107 : 669 (1968).
- 31 — Inman J K and Dintzis H M : The derivatization of crosslinked polyacrylamide beads. Controlled introduction of functional groups for the preparation of special-purpose, biochemical adsorbents, *Biochemistry* 8 : 4074 (1969).
- 32 — Jansen E F and Olson A C : Properties and enzymic activities of papain insolubilized with glutaraldehyde, *Arch Biochem Biophys* 129 : 221 (1969).
- 33 — Jaworek D : New Methods for covalent binding of proteins to synthetic polymers, *Insolubilized Enzymes* p. 65 Eds. M Salmona, C Saronio and S Garattini, Raven Press, New York (1974).
- 34 — Kay G, Lilly M, Sharp A K and Wilsen R J H : Preparation and use of porous sheets with enzyme action *Nature* 217 : 641 (1968).
- 35 — Kuecken G, Broch J and Muecke D : Coupling biologically active substances to polymer carriers and their use, *Wiss Z Univ Rostock, Math-Naturwiss Reihe* 23 : 267 (1974).
- 36 — Line W F, Kwong A and Weetall H H : Pepsin insolubilized by covalent attachment to glass: Preparation and characterization, *Biochim Biophys Acta* 242 : 194 (1971).
- 37 — Lilly M, Money C, Hornby W and Crook E M : Enzymes on solid supports, *Biochem J* 95 : 45 (1965).
- 38 — Lilly M and Sharp A K : The kinetic of enzymes attached to water-insoluble polymers, *Chem Eng No. 215 : CE* 12 (1968).
- 39 — Lilly M : Enzyme immobilized to cellulose, *Methods Enzymol Vol. 44 Immobilized Enzymes*, p. 46 Ed. Mosbach K, Academic Press, New York (1976).
- 40 — Manecke G : Reactive polymer carriers and immobilization of enzymes, *Proceeding of the international symposium on macromolecules*, p. 397 Ed. E B Mano Elsevier Sci Publ, Amsterdam, (1975).
- 41 — Manecke G, Gunzel G and Förster H J : Enzymes covalent bound to various polymers and the effect on the properties of these enzymes, *J Polymer Sci Part C* 30 : 607 (1970).
- 42 — Manecke G and Singer S : Chemical modification of Polyaminostyrene, *Makromol Chem* 37 : 119 (1960).
- 43 — Manecke G and Gunzel G : Polymeric isothiocyanates for the preparation of highly active resins for enzyme studies, *Naturwissenschaften* 54 : 531 (1967).
- 44a — Manecke G and Förster H J : Reactive polystyrene-based polymers as carriers for proteins and enzymes, *Makromol Chem* 91 : 136 (1966).
- 44b — Manecke G and Telefoncu A : (in preparation).
- 45 — Mitz M A and Summaria L J : Synthesis of biologically active cellulose derivatives of enzymes, *Nature* 189 : 576 (1961).
- 46 — Monsan P and Durand G : New preparation of enzymes fixed on inorganic supports, *CR Acad Sci Ser C* 273 : 33 (1971).
- 47 — Mosbach K : Matrix-bound enzymes, Part I, The use of different acrylic copolymers as matrices, *Acta Chem Scand* 24 : 2084 (1970).
- 48 — Mosbach K and Mattiasson B : Matrix-bound enzymes, Part II, Studies on a matrix-bound two-enzyme-system, *Acta Chem Scand* 24 : 2093 (1970).
- 49 — Neutra R A and Weetall H H : Deoxyribonuclease I covalently coupled to porous glass, *FEBS Lett* 8 : 253 (1970).
- 50 — Orth H O and Brümmer W : Carrier-bound, biologically active Substances and their Applications, *Angew Chem* 84 : 319 (1972).

- 51 — Patel A N, Pennigton S N and Brown H D : Insoluble matrix-supported apyrase, deoxyribonuclease and cholinesterase, *Biochim Biophys Acta* 178 : 626 (1969).
- 52 — Patel R P, Hopfkes D V and Brown S P : Derivatives of proteins II. Coupling of  $\alpha$ -chymotrypsin to carboxyl-containing polymers by use of N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonate, *Biopolymers* 5 : 577 (1967).
- 53 — Patramant I, Katsiri K, Pistavou E, Kalogerakos T, Pavlatos M and Evangelopoulos A E : Glutamic-aspartic transaminase-antitransaminase interaction : a method for antienzyme purification, *Eur J Biochem* 11 : 28 (1969).
- 54 — Robinson P J, Dunnill P and Lilly M D : Porous glass as a solid support for immobilization or affinity chromatography of enzymes, *Biochim Biophys Acta* 242 : 659 (1971).
- 55 — Sato T, Mori T, Tosa T and Chibata I : Studies on immobilized enzymes, IX. Preparation and properties of aminoacylase covalently attached to halogenacetylcelluloses, *Arch Biochem Biophys* 147 : 788 (1971).
- 56 — Sharp A K, Kay G and Lilly M D : The kinetic of  $\beta$ -galactosidase attached to porous cellulose sheets, *Biotechnol Bioeng* 11 : 363 (1969).
- 57 — Surinov B P and Manoilov S E : Production and properties of insoluble compounds of certain enzymes with cellulose, *Biokhimiya* 31 : 387 (1966).
- 58 — Surovtsev V I, Kozlov L V and Antonov V K : Investigation of denaturation of  $\alpha$ -chymotrypsin linked by covalent bonds with carboxymethylcellulose, *Biokhimiya* 36 : 199 (1966).
- 59 — Telefoncu A : Immobilization of Papain with 3, 5, 3', 5' -Tetra-amino-hydrobenzcion *J Fac Sci (Ismir) Ser A 1* : 313 (1977).
- 60 — Tosa T, Sato T, Mori T and Chibata I : Basic studies for production of L-aspartic acid by immobilized E coli cell, *Appl Microbiol* 27 : 886 (1974).
- 61 — Ugi I : The  $\alpha$ -adition of immonium ions and anions to isonitries coupled with secondary reactions, *Angew Chem* 74 : 9 (1962).
- 62 — Vretblad P and Axén R. : Covalent fixation of pepsin to agarose derivatives, *FEBS Lett* 18 : 254 (1971).
- 63 — Wagner T, Hsu C J and Kelleher G : A new method for the attachment and support of active enzymes, *Biochem J* 108 : 892 (1968).
- 64 — Walch K A, Houston L L and Kenner R A : Chemical modification of bovine trypsinogen and trypsin, *Structure-Function Relationships of proteolytic Enzymes*, p. 56 Ed, Desnuelle P, Neurath H and Ottesen M, Academic Press, New York (1970).
- 65 — Weetall H H and Weliky N : A new technique for the enzymic detection of hydrogen peroxide, *Anal Biochem* 14 : 160 (1966).
- 66 — Weetall H H : Trysin and papain covalently coupled to porous glass : preparation and characterization, *Science* 166 : 615 (1969).
- 67 — Weetall H H : Storage stability of water-insoluble enzymes covalently coupled to organic and inorganic carriers, *Biochim Biophys Acta* 212 : 1 (1970).
- 68 — Weetall H H : Carrier-bound enzymes and their applications in food and a drink industry, *Chemiker Ztg* 92 : 611 (1973).
- 69 — Weliky N, Brown R S and Dale E C : Carrier-bound proteins: properties of peroxydase bound to insoluble carboxymethylcellulose particles, *Arch Biochem Biophys* 131 : 1 (1969).
- 70 — Wilson R J H, Kay G and Lilly M D : The preparation and properties of pyruvate kinase attached to porous sheets and the operation of two-enzyme continuous-feed reactor, *Biochem J* 109 : 137 (1968).
- 71 — Wingard L B Jr : Immobilized enzyme principle, *Applied Biochemistry and Bioengineering Vol. 1*, 364 Ed, E Katchalski-Katzir and L Goldstein, Academic Press, New York (1976).
- 72 — Wold F : Biofunctional Reagents, *Methods Enzymol Vol. II*, 617 Ed, C H W, Hirs Academic Press, New York (1967).
- 73 — Wykes R J, Dunnill P and Lilly M D : Conversion of tyrosine to L-Dihydroxyphenylalanine using immobilized tyrosinase, *Nature New Biol* 230 : 187 (1971).
- 74 — Zaborsky O R : Immobilization of enzymes by intermolecular cross-linking, *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes Proteins Vol I*, 25 Ed, Chang T M S Plenum, New York (1977).
- 75 — Zingaro R A and Uziel M : Preparation and properties of active, insoluble alkaline phosphatase, *Biochim Biophys Acta* 213 : 371 (1970).



# Enzymatic saccharification of various agricultural wastes

(Bazı tarımsal artıkların enzimatik yolla şekerleştirilmesi)

Güniz KAYTAN \*

Nazif KOLANKAYA \*

demonstrated by chromatographic and chemical methods.

## SUMMARY

Culture filtrates of *Trichoderma viride* qM 9414 were used as enzyme source for the enzymatic saccharification of delignified agricultural wastes. The highest hydrolysis were observed in wheat straw (79 % hydrolysis) which was delignified with 100 % peracetic acid and in corn cob (64.68 % hydrolysis) which was delignified with 20 % peracetic acid and then with 1 % NaOH. An increase in the amount of sugar produced by the hydrolysis of cellulosic material was determined when cellulase and  $\beta$ -glucosidase enzymes were used together. When the adsorption of cellulase on cellulosic materials was studied, we observed that within the first 30 minutes of incubation period, 81-87 % of the original enzyme was adsorbed by its substrate. Enzymatic cellulose hydrolysates were used as nutrient medium for the production of feed yeasts, *Candida utilis* ATCC 9226 and *Candida tropicalis* ATCC 1369. Utilization of sugary compounds by yeasts, in hydrolysates was

## INTRODUCTION

Cellulose is the well known structural compound of woody wastes. Particularly, agricultural wastes are available in large quantities year round in underdeveloped countries. Conversion of cellulose into the sugary compounds such as glucose, will aid in recycling cellulosic wastes into useful products and also pollution abatement.

In saccharification of celluloses using cellulase enzyme was reported to be more feasible when compared with mineral acids in hydrolysis processes (2). Although cheap cellulase preparations have potential applications in the extraction of protein, starch and juice from plant materials (12, 13), there are still some problems in the saccharification of woody materials with cellulase because of their lignin content which limits access of enzyme to the cellulose (11). However, various delignification methods have been developed to delignify the woody materials (3, 14). KATZ and REESE (4) pointed out that it was possible to obtain glucose syrup at 30%

\* Dept. of Gen. Biol., Faculty of Science, Univ. of Hacettepe Ankara Turkey



concentration by saccharifying ground and heated cellulose enzymatically.

By growing yeasts on enzymatic hydrolysates of Solca-Flock, it was shown that sugary solution so obtained would be good fermentation media for single cell protein production (8). The main object of the present work is to obtain sugar solutions by saccharifying various agricultural wastes with cellulase and to investigate the possibility of using these sugar solutions for growth of yeast cells.

## MATERIALS and METHODS

### I. Enzyme source and measurement of enzyme activity.

In the experiments, culture supernatants of *T. viride* qM 9414 grown on cotton seed baggase was used as enzyme source. The conditions for enzyme production were as described in detail previously (6). Enzyme solutions were stored in refrigerator after adding merthiolate at 0.005% concentration to prevent contamination.

Total cellulase activity ( $C_{fp}$  activity) was measured as previously described (6). Unit  $C_{fp}$  activity was expressed as amount of enzyme releasing 1 mg of reducing sugar from 50 mg Whatman No. 1 filter paper in 0.05M Na-acetate buffer, pH: 4.8, at 50°C in 1 hr.

### II. Measurement of sugars.

Amount of reducing sugars in incubation mixtures were determined with DNS method (10). Glucose equivalent of reducing sugar was calculated from a standard curve prepared with glucose. For direct glucose determinations glucose oxidase method (Glucostat - Worthington) as modified by WASHKO and RICE (15), was used. Sugar composition of the cellulose hydrolysates were qualitatively analysed by paper chroma-

tography as described by KOCOUREK et al. (5).

### III. Adsorption of the cellulase and saccharification of the agricultural wastes.

For investigating adsorptional properties of cellulase enzyme, 1 ml of partially purified enzyme solution having  $C_{fp}$  activity: 6.2 U/ml, was added into 90 ml of 1% Avicel RC-581 suspension prepared in 0.05M Na-acetate buffer, pH: 4.8, and the mixture was incubated at 50°C in Psycotherm shaker (New Brunswick Co.) rotating at 150 rpm, for 24 hours. Through the incubation period changes in protein, reducing sugar concentrations and  $C_{fp}$  activities were determined in the samples taken from incubation mixture at various intervals. The effect of substrate concentration on cellulase adsorption was tested by incubating delignified wheat straw at the final concentrations varying between 1-10% in 10 ml of cellulase solution ( $C_{fp}$  : 2.69 U/ml) at 50°C for 30 min. in Psycotherm incubator shaker at 150 rpm. In the same physiological conditions, flasks each containing 10 ml cellulase ( $C_{fp}$  : 3.18 U/ml) solution and delignified corn cobs at the concentrations varying between 1-20% were incubated to find out the effect of substrate concentration on the yield of cellulose hydrolysis. Saccharification of the delignified wastes (wheat straw, corn cobs, sunflower heads and cotton seed baggase) was carried out by adding 0.5 gm from each substrate into the flasks consisting of 10 ml of cellulase solutions ( $C_{fp}$  : 1.8 U/ml and 3.93 U/ml) and 10 ml of 0.05M Na-acetate buffer, pH: 4.8. The flasks were shaken on Psycotherm incubator shaker at 150 rpm and 50°C for 24 or 48 hrs. The controls were containing 20 ml of the buffer solution and 0.5 gm of the wastes. Also, the wheat straw delignified with diffe-

rent peracetic acid concentrations and NaOH, was added into cellulase solution ( $C_{tp}$  : 2.74 U/ml) at ratio of 1/20 (w/v) and incubated at 50°C on rotary shaker at 150 rpm for 24 hrs. Additionally, to determine the effect of the concentration of cellulose on the enzymatic hydrolysis, 2 ml of enzyme solution ( $C_{tp}$  : 3.08 U/ml) and 2 ml of buffer were added on the delignified corn cobs which were at 1%, 2%, 5%, 10% and 20% concentrations.

The hydrolysis ratios of cellulosic wastes were calculated from the formula:

$$\text{Hydrolysis \%} = \frac{\text{Reducing sugar (gm) \%}}{\text{Cellulosic wastes (gm) \%}}$$

To minimize the inhibition effect of cellobiose formed during the hydrolysis but to increase the hydrolysis ratio (4).  $\beta$ -glucosidase (SIGMA) with 5.74 U/ml activity was added to cellulase solution having 2.74 U/ml activity. Delignified corn cob was used at 5% and the reaction mixture was incubated at 50°C for 1-12 days. The cellulase solution was taken as a control.

#### IV. Protein determination.

Amount of soluble protein in the enzyme hydrolysates was measured by using Folin-Ciocalteu method (7). Standard protein was prepared with bovine serum albumin.

#### V. Single Cell Protein production.

In this study, 1.25 % sugar solution obtained by saccharifying sulphite pulp with cellulase was used as growth medium for *Candida utilis* ATCC 9226 and *Candida tropicalis* ATCC 1369 after supplemented with urea and yeast extract at 0.03 % and 0.01 % concentrations, respectively. Following the autoclavation, 250 ml flasks containing 50 ml of growth medium were inoculated with 1 ml cell suspension prepared from agar slants of the yeast cultures with 10 ml sterile

saline solution. Then, flasks were incubated on Psychotherm incubator shaker at 30°C, 130 rpm for 3 days.

## RESULTS

### Adsorption of cellulase by microcrystalline cellulose :

According to the results of the experiment which was carried out by incubating the cellulase with Avicel RC-581 as substrate, in the first 30 minutes of reaction period, 87% of original enzyme activity and 60% of original protein concentration were adsorbed from reaction medium by the substrate (Fig. 1). But

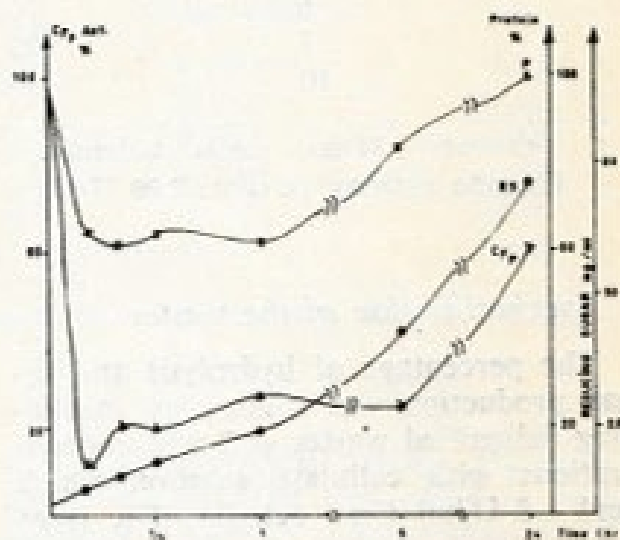


Fig 1 — Adsorption of cellulase on 1% Avicel RC-581. P : adsorbed protein % ,  $C_{tp}$  : enzyme activity % , RS : reducing sugar (mg/ml).

by the 5th hr of incubation,  $C_{tp}$  activity and the amount of protein in the solution began to increase, probably due to enzymatic breakdown of the substrate. At the 24th hr of incubation, 60% of initial  $C_{tp}$  activity and 100 % of initial protein concentration were observed in the reaction mixture. Amount

of reducing sugar was continuously increased through the incubation period.

Adsorption of the cellulase to its substrate was to be proportional to substrate concentrations, when the enzyme was reacted with delignified wheat straw at various concentrations (Table I). Maximum rate of enzyme adsorption was observed in the samples which were containing delignified material at concentration of 10 %.

amount of sugar yield, 1.63 % and high percentage of hydrolysis, 65.24 % was obtained in the reactions performed with wheat straw which had been delignified treating with 100 % peracetic acid solution (Table II). Similar results were obtained in the hydrolysis of various wastes with cellulase having 3.93 U/ml  $C_{tp}$  activity (Table III).

The effect of delignifying method on hydrolysis and saccharification of wheat

TABLE I — Effect of substrate concentration on the adsorption of cellulase.

Subs. conc. (%) *	Adsorbed $C_{tp}$ (U/ml) %	Reducing sugar (mg/ml)
1	68.24	3.08
5	76.35	8.10
7	83.10	9.90
10	93.24	12.20

\* Substrate: Wheat straw delignified with 20% peracetic acid and 1 % NaOH. Enzyme activity ( $C_{tp}$ ): 2.96 U/ml.

*Saccharification of the wastes :*

The percentage of hydrolysis and sugar production was studied by incubating delignified wastes at 2.5 % concentrations with cellulase solution which had 1.8 U/ml  $C_{tp}$  activity. The large

straw was shown on Table IV. In this study, the minimum hydrolysis (7 %) was obtained in the tube containing wheat straw which was not delignified, and maximum hydrolysis (30.94 %) in the tube containing wheat straw deligni-

TABLE II — The hydrolysis and saccharification of various cellulosic materials with cellulase having 1.8 U/ml  $C_{tp}$  activity.

Cellulosic material (2.5 %)	Reducing sugar (gm) %	Hydrolysis %
Wheat straw *	1.63	65.24
Sunflower head	0.78	31.16
Cotton seed baggase	0.48	19.12
Corn cob	1.45	57.96

\* Wheat straw was delignified with 100% peracetic acid, others with 20 % peracetic acid and 1 % NaOH.

TABLE III — The hydrolysis and saccharification of various cellulosic materials with cellulase having 3.93 U/ml  $C_{1p}$  activity.

Cellulosic material (2.5 %)	Reducing sugar (gm) %		Hydrolysis %	
	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Wheat straw *	1.97	2.19	78.80	87.64
Sunflower head	0.70	0.68	28.12	27.36
Cotton seed baggase	0.88	1.03	35.08	41.36
Corn cob	1.62	1.61	64.68	64.36

\* Wheat straw was delignified with 100% peracetic acid, others with 20% peracetic acid and 1 % NaOH.

TABLE IV — Effect of different treatments on cellulose hydrolysis.

Treatment		Reducing sugar (gm) %	Hydrolysis %
		0.350	7.00
1 %	NaOH	0.557	11.14
20 %	Peracetic a.	0.561	11.27
40 %	Peracetic a.	0.701	14.02
100 %	Peracetic a.	1.547	30.94
20 %	Per. a. + 1 % NaOH	0.730	14.60

Reaction mixture: Delignified wheat straw at 5% concentration, enzyme filtrate having 2.74 U/ml  $C_{1p}$  activity.

fied with 100% peracetic acid treatment. Table V shows, the effect of cellulose concentration on the hydrolysis and saccharification. The maximum hydrolysis (66.2%) was obtained with minimum substrate concentration (1%)

TABLE V — Effect of substrate concentration on hydrolysis and saccharification.

Subs. conc. (%) *	Reducing sugar (gm) %	Hydrolysis %
1	0.66	66.20
2	1.17	58.60
5	2.92	58.40
10	3.52	35.52
20	4.99	24.92

\* Corn cob delignified with 20% peracetic acid and 1% NaOH was used as substrate. Enzyme activity ( $C_{1p}$ ): 3.08 U/ml.

and maximum sugar (4.99%) with maximum substrate concentration (20%).

The existence of  $\beta$ -Glucosidase together with cellulase had increased the hydrolysis and saccharification of cellulose. The cellulose was hydrolysed in the ratio of 82.8% and the amount of reducing sugar and glucose were 32.8 mg/ml and 21.75 mg/ml, respectively (Fig. 2).

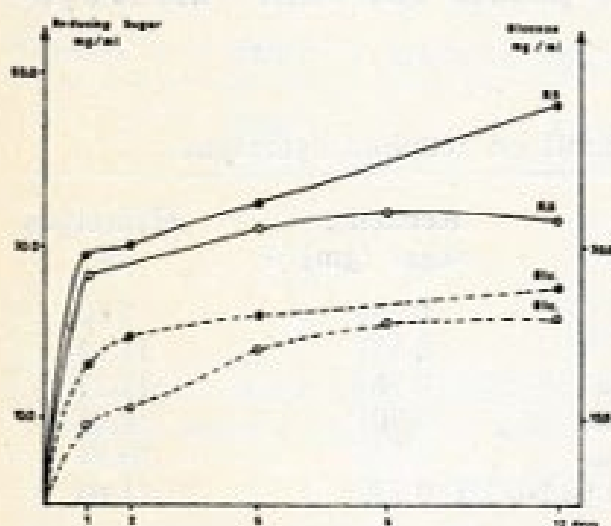


Fig 2— The saccharification of cellulosic material with  $\beta$ -Glucosidase and cellulase. Substrate: Delignified corn cob at 5% concentration, (O)-cellulase ( $C_{fp}$ : 2.74 U/ml), (●)- $\beta$ -Glucosidase (5.74 U/ml) and cellulase.

#### Production of SCP on cellulose hydrolysate:

The hydrolysate of sulphite pulp containing 1.25% sugar was used as growth medium for *C. utilis* and *C. tropicalis* and utilization of sugar by the yeasts was observed. The quality of sugars in yeast culture filtrates and in the hydrolysate were analysed with paper chromatography. When chromatograms were compared with standard sugars xylose, mannose and glucose were observed in the hydrolysate and in yeast culture

filtrates no sugar was determined (Fig. 3). Additionally, when the growth of

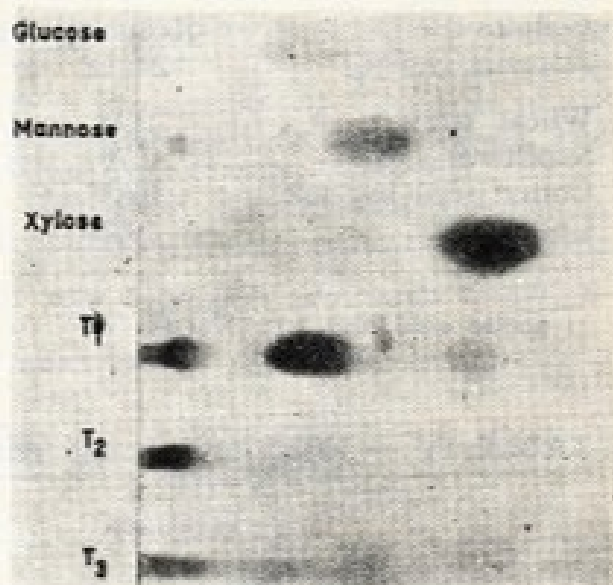


Fig 3— Paper chromatogram showing the utilization of sugars by yeast cells grown on enzymatic sulphite pulp hydrolysates. Standard sugar solutions consisting of 5 mg/ml glucose, mannose and xylose. T<sub>1</sub>: Hydrolysate, T<sub>2</sub>: *C. utilis* culture filtrate, T<sub>3</sub>: *C. tropicalis* culture filtrate.

yeasts were determined, it was observed that *C. tropicalis* and *C. utilis* had utilized 93.2% and 83.68% of the reducing sugar in the medium, respectively (Fig. 4 and 5). However, when the two organisms were compared according to the increase in their protein production, the increase of the amount of protein in *C. utilis* (1.1 mg/ml) was observed to be greater than *C. tropicalis* (0.91 mg/ml).

#### DISCUSSION

Because of the inhibition of cellulase activity which was caused by hydrolysis products such as cellobiose (8), it was proposed that such sugars formed during the hydrolysis was to be removed

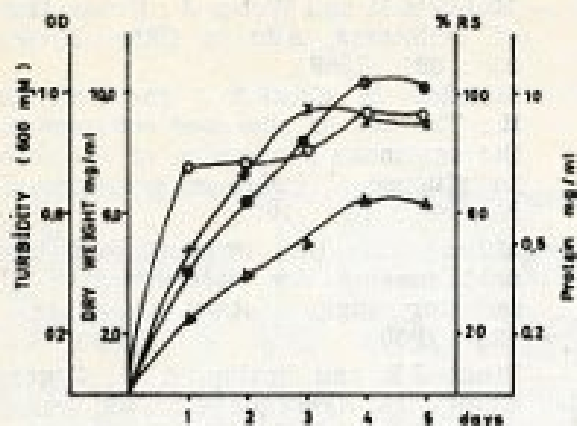


Fig 4 — Growth of *C. tropicalis* on cellulose hydrolysate. (O) utilized reducing sugar %, (X) protein mg/ml, (●) dry weight mg/ml, (Δ) turbidity.

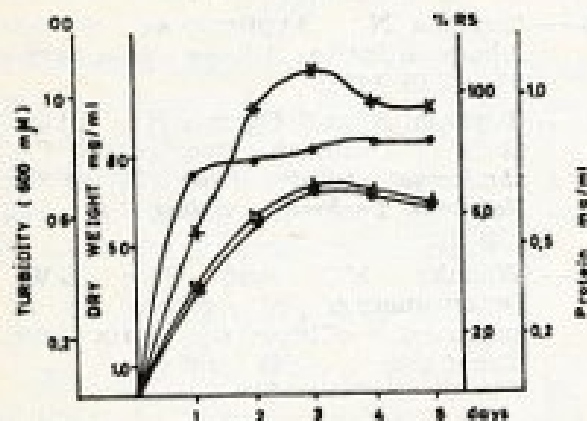


Fig 5 — Growth of *C. utilis* on cellulose hydrolysate. (O) utilized reducing sugar %, (X) protein mg/ml, (●) dry weight mg/ml, (Δ) turbidity.

following hydrolysis from reaction medium. For that purpose, ultramembrane filters were chosen as most suitable filter system for biochemical reactors to produce sugary solutions(1). But, from economical point of view, usage of such filter systems is not seemed to be profitable. Alternatively, coarse filters can be used instead of ultramembrane filters if the enzyme released as a result of hydrolysis, can be adsorbed on cellu-

losics added into medium just before filtration. However, kinetical parameters, associated with adsorptional characteristics of cellulase, has to be determined. As it was reported earlier (9), we also had found out that maximum adsorption of cellulase enzyme has been carried out in first 30 minutes of reaction period, when we have worked with delignified wheat straw at 10 % concentration.

The presence of lignin in lignocellulosic materials effects the rate of the enzymatic degradation of cellulose. In order to decrease this effect, some delignification methods were used (14). In our experiments the concentration of peracetic acid had no remarkable effect on the production of the enzyme but the material delignified with 100 % peracetic acid was highly hydrolysed than the material delignified with 20 % peracetic acid. Hence, the concentration of peracetic acid has an important role on the hydrolysis of lignocellulosic wastes.

During the hydrolysis, the amount of reducing sugar was increased when the substrate concentration was increased. However, the rate of hydrolysis decreased with increasing substrate concentration and this was, probably, due to the product-sugar-inhibition.  $\beta$ -Glucosidase also increased the ratio of hydrolysis when it was used with cellulase. This was because, that  $\beta$ -Glucosidase decreased the inhibition effect of cellobiose on the enzyme.

In SCP production experiments, we observed that *C. utilis*, had utilized the reducing sugar in the cellulose hydrolysate more effectively than *C. tropicalis* and so protein yield was more than *C. tropicalis*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the support of Grant No: TOAG-259 from Scientific and Technical Research Council of Turkey.

## REFERENCES

- 1 — Ghose TK and Kostick J : A model for continuous enzymatic accharification of cellulose with simultaneous removal of glucose with simultaneous removal of glucose syrup *Bitech Bioeng XII* : 921 (1970).
- 2 — Ghose TK and Pathak AN : Cellulases-2 : Applications, *Proc Biochem May* : 20 (1973).
- 3 — Han YW and Callihan DC : Cellulose fermentation : Effect of substrate pretreatment on microbial growth, *App Microbiol 27* : 159 (1974).
- 4 — Katz M and Reese ET : Production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose, *App Microbiol 16* : 419 (1968).
- 5 — Kocourek J Ticha M and Kostir J : The use of diphenylamine-aniline-phosphoric acid reagent in the detection and differentiation of monosaccharides and their derivatives on paper chromatograms, *J Chromatography 24* : 117 (1966).
- 6 — Kolankaya N and Kaytan G : Cellulase production on various agricultural wastes, *Kükem 1* : 11 (1978).
- 7 — Lowry DH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem 193* : 265 (1951).
- 8 — Mandels M and Weber J : Production of cellulases, *Adv in Chem Series 95* : 391 (1969).
- 9 — Mandels M Kostick J and Parizek R : The use of adsorbed cellulase in the continuous conversion of cellulose to glucose, *J Polymer Sci Part C No. 36* : 445 (1971).
- 10 — Miller GL : Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal Chem 31* : 426 (1959).
- 11 — Stone JE and Scallan AM : Digestibility as a simple function of a molecule of similar size to cellulase enzyme, *Adv in Chem Series 95* : 219 (1969).
- 12 — Toyama N : Degradation of food-stuffs by cellulose and related enzymes, *Adv in Enzymic hydrolysis of cellulose and related materials*, p. 235. Ed. ET Reese, Pergamon Press, New York (1963).
- 13 — Toyama N : Applications of cellulases in Japan, *Adv in Chem Series 95* : 359 (1969).
- 14 — Toyama N and Ogama K : Utilization of cellulosic wastes by *Trichoderma viride*, Proc. IV IFS : *Ferment Technol today*, p. 743 (1972).
- 15 — Washko ME and Rice EW : Determination of glucose by an improved «Glucostat» procedure, *Glin Chem 7* : 542 (1961).



# Mantar kültür koleksiyonlarının önemi ve mantar kültür koleksiyonu hazırlama yöntemleri

Emel TÜMBAY

## ÖZET

Mantar kültürlerinin önemi ve oda ısısında agar kültürü; agar kültürlerinin sıvı parafin altında,  $-4^{\circ}\text{C}$  ve  $-20^{\circ}\text{C}$  de tutulması; steril su, steril toprak ve sıvı azot banyosunda tutma ve liyofilizasyon gibi mikotek yöntemleri belirtilmiştir.

## SUMMARY

*The importance of fungus culture collections and various methods of preserving fungi have been briefly discussed.*

Mantar laboratuvarında rutin inceleme veya araştırma yapan her kişi üzerinde çalıştığı mantarları canlı; başlangıçtaki fiziksel, fizyolojik, biyokimyasal ve patojeniteleri var ise virulanslarını koruyacak şekilde referans ve arşiv materyeli olarak muhafaza etmeli ve el altında tutmalıdır. Mantarların bu şekilde yapılan canlı koleksiyonuna "mikotek" adı verilir.

Mikotek, salt mikologlar için değil, aynı zamanda inceleme, araştırma ve öğretim yönünden insan, hayvan ve bit-

ki patoloğları, genetikçiler, taksonomistler ve öğretmenler için de gereklidir. Ayrıca mikotek, mantarların oluşturdukları çeşitli biyokimyasal ve metabolik ürünler, yaptıkları antibiyotikler; canlı yaşamına yapabilecekleri diğer olumlu katkıları veya zararları yönünden de fiziksel, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin araştırılması; bozulma ve çürüme olaylarına olan etkileri; tarımda ve besin üretimindeki katkıları yönünden de endüstride büyük bir gereksinimdir.

Mantarların önemi göz önüne alınarak dünyanın çeşitli ülkelerinde ulusal mantar koleksiyonları geliştirilmiş ve resmi devlet ve/veya endüstri kuruluşlarına ait geniş çapta mikotekler kurulmuştur. Bu koleksiyon merkezleri arasında en önemlileri 1906 da Hollanda'da kurulan Mantar Kültürleri Merkez Bürosu (Centralbureau voor Schimmelcultures-C.B.S.), 1925 te Amerika Birleşik Devletlerinde kurulan Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection-A.T.C.C.) ve 1947 de İngiltere'de kurulan Büyük Britanya

Mikrobiyoloji ve İntan Hastalıkları Kürsüsü Öğretim Üyesi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bornova İzmir.



Milletler Topluluğu Mikoloji Enstitüsü (Commonwealth Mycological Institute-C.M.I.)dür. Türkiye'de ise mikoloji laboratuvarlarının kendilerine ait mantar koleksiyonları olmakla beraber ülke çapında bir mikotek henüz kurulmamıştır.

Ülkede büyük bir koleksiyon merkezi olsun veya olmasın, mantarlarla çalışan her araştırmacı elindeki mantarları —bunlar büyük koleksiyonlarda depolanarak veya çalıştığı sürece ve kendinden sonra gelenlere devretmek üzere— canlı bir şekilde tutmak zorundadır. Bu şekilde çalışılmadığı için büyük bir olasılıkla pek çok kıymetli mantar suşu çalışma sonunda atılmakta veya araştırmacının laboratuvarından ayrılması veya ölümü ile kaybolmaktadır.

Mantarlar canlı olarak muhafaza edilirken bazı önemli noktaların bilinmesi ve bunlara göre önlem alınması gerekmektedir. Özellikle bilinmesi gereken noktalar, sık sık yapılan pasajlar sonucu mantarların seleksiyona uğraması ve mutantların ortaya çıkması; zamanla mantarların ölmesi veya virulanslarını kaybetmeleri; her stoklama yönteminin her mantar için uygun olmayışı; mantar kültürlerinin diğer mantarlar, bakteriler ve böcekler tarafından kontamine olması; stoklama ortamındaki ısı, ışık ve nemin kültürlere yapabileceği olumsuz etkiler ve stok kültürlerine ait yetersiz veya yanlış dökümantasyondur (8).

Mantarların canlı olarak stoklanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar oda ısısında agar kültürü; agar kültürününün oda ısısında sıvı parafin altında, -4°C ve -20°C'de tutulması; mantarları steril su, steril toprak içinde ve sıvı nitrojen banyosunda tutma ve liyofilizasyondur.

1. *Oda ısısında agar kültürü*: Yatık olarak dökülmüş katı besiyerinde mantarın üretilip oda ısısında tutulmasıdır. Her suş için en aşağı iki ayrı ekim ya-

pılmalıdır. Tek tip besiyeri veya farklı besiyerleri kullanılabilir, genellikle gli-kozsuz Sabouraud-Agar, Patates-Dekstroz-Agar, Malt-Agar, Kimmig-Agar v.b. kullanılmaktadır.

Özellikle küçük ve rutin inceleme yapan mantar laboratuvarlarında kullanılan ve uygulaması basit bir yöntemdir. Oda ısısında mantarların büyük bir kısmı kolaylıkla ürer. Katı besiyeri üzerinde tipik mantar kolonilerinin görülmesi nedeni ile stok kültürler inceleme ve öğretimde makroskopik piyes olarak kullanılabilirler. Gerekliğinde her an saf kültür olarak el altında bulunurlar. Mantar suşunun makroskopik görünümündeki her hangi bir değişiklik, örneğin pleomorfizm, hemen kolaylıkla saptanabilir. Ayrıca besiyerinde bakteriler, diğer mantarlar veya mantar-yiyici (mikofaj) böceklerle olan kontaminasyonlar hemen görülüp gerekli önlemler alınabilir.

Oda ısısında agar kültürü olarak mantarları stoklamanın kültürün kuruması, dejenerasyona uğraması ve kontaminasyonu gibi olumsuz yönleri de vardır. Kültürlerin kuruması ortamdaki ısı, nem, kullanılan besiyerinin özelliği, ışık yoğunluğu ve üretilen mantarların cins ve türüne bağlıdır. Bu yönden en duyarlı olanlar dermatofitlerdir. Bu nedenle mantarın duyarlılığına göre değişmek üzere 1-3-6 ayda bir yapılan pasajlarla kültürleri yenilemek gerekir (9). Besiyerinde zamanla toksik maddelerin ve metabolizma artıklarının artması ve bu zehirli maddelerin konsantrasyonunu daha da arttıran su kaybı, mantarlarda çeşitli dejenerasyonlara yol açmakta; başlangıçtaki fizyolojik özellikler, tipik sporülasyon ve virulans zamanla azalmakta veya kaybolmakta; ve ilk ekilen mantardan farklı mutantlar ortaya çıkabilmektedir. Bu yöntemin diğer bir olumsuz yönü de kültürlerin çeşitli bakteriler, saprofit mantarlar ve *Tarsonema* ve *Tyroglyphus* cinsleri gibi mikofaj

böceklerle kontaminasyonudur (9). Kontaminasyon, ekim sırasında ellerden, havadan veya tüp ve şişe kapaklarının arasından sızma ile olabilmektedir.

Oda ısısında agar kültürlerinin stoklanmasındaki zorluklar göz önünde bulundurulurken, bu tip bir mikotek yapacak kişinin kültürleri düzenli ve sık olarak kontrol etmesi, aksatmadan gereken zamanda pasajlarını yapması, kültürlerin gösterebileceği varyasyon ve her tip kontaminasyonu tanıması, diğer bir deyimle iyi yetişmiş olması gerekir.

## 2. Sıvı parafin altında agar kültürü :

Bu yöntemde, tüp veya şişeler içindeki yatık katı besiyerinde üretilen mantar üzerine —besiyerinin tamamını örtecek şekilde— steril sıvı parafin dökülür ve sonra ağzı sıkıca kapatılan tüp veya şişeler oda ısısında tutulur. Basit ve ucuz bir yöntemdir. Özellikle patojen mantarların bu yöntemle uzun yıllar canlılıklarını korudukları saptanmıştır (1, 7). Bu şekilde stoklanan mantar kültürleri öğretim ve eğitimde makroskopik piyes olarak kullanılabilirler. Çeşitli küf mantarları ile olabilecek kontaminasyonu hemen saptamak ve gerekli önlemleri almak ta kolaydır.

Yöntemin olumsuz yönleri, bütün mantarlar için optimal yöntem olmayışı; bazı mantarların pleomorfizm, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinde değişme göstermeleri; eski kültürlerde parafin altında tipik makroskopik görünümün değişebilmesi; besiyerinin ve böylece mantarın kurumması, küf kontaminasyonunun olabilmesi; ve pasajlar sırasında parafinlenen iğne, öze veya çengel alevde sterilizasyonu yapılırken etrafın sıçrayan materyelden kolaylıkla infekte olabilmesidir. Sıvı parafin altındaki kültürlerin —olabilecek makroskopik değişiklikler göz önünde tutularak— 2-3 yılda bir pasajlarını yenilemek uygundur (9).

## 3. Agar kültürlerinin buzdolabında (4°C de) tutulması :

Yatık katı besiyeri üzerinde önce optimal ısıda üretilen mantarların buzdolabında tutulmasıdır. Özellikle sıcak iklimli bölgelerde kullanılan bir yöntemdir. 4°C de mantar kültürleri —oda ısısında tutulmaya oranla— daha yavaş kurur. Düşük ısı nedeniyle üreme yavaşladığından kültürün varyasyon gösterme özelliği azalır. Kültür makroskopik piyes olarak kullanılabilirliği gibi el altında her zaman kullanılmaya hazır saf kültür olarak ta bulunur. Ayrıca buzdolabı ısısında mikofaj böcekler yaşamadığı için böcek ile kontaminasyon tehlikesi de yoktur (9).

Bu yöntem bütün mantarlar için optimal değildir. Bazı dermatofitlerin ve difazik patojen mantarların 4°C ye duyarlı olup kısa zamanda öldükleri saptanmıştır (8). Ayrıca psikrofil mantar ve bakteriler düşük ısıda üreyip kültürleri kontamine edebilirler. Buzdolabının durması ve bazı diğer teknik bozukluklardan ötürü mantar kültürleri kaybedilebilir.

Yöntemin olumsuz yönleri göz önünde tutularak her mantardan çift ekim yapılarak herbirinin ayrı buzdolabında tutulması; özellikle düşük ısıya duyarlı oldukları bilinen veya şüphe edilen mantarlardan çift ekim yapılarak kültürlerden birinin oda ısısında ve diğerinin buzdolabında korunması; 4-6 ayda bir pasajların yenilenmesi; ve psikrofil bakterilere karşı besiyerine antibiyotik konulması gerekir.

## 4. Agar kültürlerinin -20°C de (derin dondurucuda) tutulması :

Agar kültürlerinin -20°C de, derin dondurucuda tutulmasıdır. Agar kültürleri ya doğrudan doğruya veya kültürün üzerine % 5-10 DMSO veya steril yağsız süt eklenerek dondurulur (9). Derin dondurma, mantardaki varyasyon-

ların ve ayrıca her çeşit kontaminasyonun önlenmesi yönünden yararlı bir yöntemdir. Yalnız dondurma işlemi sırasında oluşan hücre içi buz kristalcikleri hücreye mekanik olarak zarar verebileceği gibi hücre içi biyokimyasal reaksiyonları da bozabilir. Ayrıca derin dondurucuda olabilecek teknik bozukluklar kültürlerin kaybına yol açabilir. Bu nedenle, yalnız derin dondurma yöntemi kullanıldığında her mantardan çift ekim yapıp her kültürü ayrı derin dondurucuda tutmak; daha emin olmak için, çift kültürlerden birini -20°C de tutarken diğerini başka bir yöntem ile muhafaza etmek; ve mantarların farklı direncini göz önünde tutarak her 2-3 yılda bir pasajları yenilemek gerekir.

#### 5. *Kültürlerin steril suda tutulması :*

Mantar kültürlerinin öze, çengel veya iğne ile alınıp kapaklı tüp veya şişe içinde steril damıtık su veya fizyolojik serum içine konulup oda ısısında veya buzdolabında korunmasıdır (2, 4). Basit ve ucuz bir yöntemdir. Mantarlar, en aşağı bir yıl olmak üzere uzun süre canlılıklarını korurlar (3, 4). Özellikle dermatofitler su içinde varyasyon, pleomorfizm göstermezler (2).

Bu yöntemde mantarları makroskopik olarak görme olanağı yoktur ve bu nedenle makroskopik piyes olarak kullanılamazlar. Mantarlar ancak besiyelerine yapılacak pasajlar ile kontrol edilebilirler. Su içine giren bazı bakteriler üreyip kültürü kontamine edebileceğinden steril damıtık su veya fizyolojik su içine antibiyotik katılması gerekir.

#### 6. *Kültürlerin steril toprakta tutulması :*

Tüp veya şişeler içindeki steril toprağa kuru mantar sporlarının veya mantar süspansiyonunun katılması ve oda ısısında veya ilk 10 gün oda ısısında tutulduktan sonra buzdolabında korunması yöntemidir. Basit ve ucuz bir uygulama-

madır. Mantarlar yıllarca canlılıklarını korurlar. Özellikle *Cryptococcus neoformans*'ın stoklanmasında önerilmektedir (9).

Mantarların makroskopik yapılarının görülmemesi, olabilecek değişmelerin ve her türlü kontaminasyonun pasaj yapmadan saptanamaması bu yöntemin olumsuz yönleridir.

7. *Liyofilizasyon :* Mantarların steril serum veya steril yağsız süt içinde liyofilize edilmeleridir. Bu yöntemle mantarların çoğunun fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini değiştirmeden uzun yıllar canlı kalabildikleri saptanmıştır (9, 11). Ayrıca kontaminasyon görülmez. Liyofilize suşları içeren ufak ampuller —az yer kaplamaları bakımından— gerek stoklama ve gerekse diğer laboratuvarlara göndermede kolaylık sağlarlar.

Liyofilizasyon, iyi sporülasyon yapan ve küçük konidyalı mantarlar için (örneğin, mayalar) iyi bir stoklama yöntemi olmakla beraber zayıf sporülasyon gösteren ve iri konidyalı mantarlar için iyi bir yöntem değildir. İkinci grup mantarlar liyofilize edildiklerinde sık olarak dejenerasyon göstermekte ve genel olarak canlılıklarını kısa sürede kaybetmektedirler (9). Bu nedenle liyofilizasyon yanında mantarları diğer ayrı bir yöntemde kullanarak çift olarak stoklamak gerekir.

#### 8. *Mantar kültürlerinin sıvı azotta tutulması :*

Ampuller içindeki katı besiyerinde üretilen veya % 10 gliserin içinde süspansiyonları yapılan mantarların ampuller steril koşullarda kapatıldıktan sonra özel kriyobiyolojik kap içinde bulunan ve ortalama eksi 170°C - eksi 196°C ısı sağlayan sıvı azot içinde tutulmasıdır. Bir çok mantar cinslerinin ve özellikle patojen mantarların bu yöntem ile uzun yıllar canlı kaldıkları ve ayrıca değişme göstermedikleri saptanmıştır

(8). Bu tip stoklama endüstriyel mikrobiyoloji yönünden önemlidir. Ayrıca bu yöntemde kontaminasyon tehlikesi de yoktur.

Pahalı bir uygulamadır. Özel kriyobiyolojik çalışma kabı, donmayı kontrol eden özel bir âlet ve ayrıca güvenilir bir azot kaynağı gerektirir. Stoklanan mantarların makroskopik yapılarını görme ve bunları makroskopik piyes olarak kullanma olanağı yoktur. Ayrıca azot içinden çıkarılan ampullerin patlama olasılığı, yaralanma ve çevre kontaminasyonu tehlikesi, sıvı azot buharına bağlı soğuk yanıklar ve zehirlenme görülebilmesi yöntemin sakıncalı yönleridir.

Görüldüğü gibi, mantar kültürlerinin stoklanmasında değişik yöntemler kullanılmaktadır. Herbir yöntem kusursuz olmaktan uzaktır. Mikotek hazırlanırken kullanılacak yöntemi; mantarların cins ve türleri, laboratuvar olanakları ve teknisyenin bilgi ve tecrübesi göz önünde bulundurularak seçmek ve ayrıca —laboratuvar koşulları elverirse— birkaç yöntemi bir arada kullanmak uygundur.

## KAYNAKLAR

- 1 — Ajello L, Grant V Q, Gutzke M A : Use of mineral oil in the maintenance of cultures of fungi pathogenic for humans, *Arch Derm* 63 : 747 (1951).
- 2 — Benedek T : On Castellani's «Water cultures», *Mycopath Mycol Appl* 17 : 255 (1962).
- 3 — Castagnetta E, Mungelluzi C : Sulla conservazione per lungo tempo dei dermatofiti e altri funghi in acqua distillata secondo il metodo di Castellani per evitare fenomeni pleomorfici, *Arch Ital Sci Med Trop Parasit* 2 : 73 (1962).
- 4 — Castellani A : A brief note on the viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water, *Impr med Lisboa* 24 June (1960).
- 5 — *Laboratory Procedures in Clinical Mycology*, Department of the Army Technical Manual TM 8-227-8 p 8-6 Washington (1964).
- 6 — Lewis G M, Hopper M E, Wilson J W, Plunkett O A : *An Introduction to Medical Mycology*, 4 Edition p 400-402 The Year Book Publishers Inc Chicago (1958).
- 7 — Little G N, Gordon M A : Survival of fungus cultures maintained under mineral oil for twelve years, *Mycologia* 59 : 733 (1967).
- 8 — Booth C : *Methods of Microbiology*, Volume 4 p 113-151 Academic Press, London (1971).
- 9 — Niggeman J T : *Probleme der Konservierung von Menschen und Tierpathogenen Pilzen*, Inaugural-Dissertation, Würzburg Julius-Maximilians-Universität Würzburg (1969).
- 10 — Rebell G, Taplin D : *Dermatophytes, Their Recognition and Identification*, Revised Edition p 114-115 Coral Gables University of Miami Press Florida (1970).
- 11 — Wickerham L J, Flickinger M H : Viability of yeasts preserved two years by lyophilic process, *Brewers Digest* 21 : 1-6 (1964).

KORONER VAZODİLATASYONUN TEMİNİNDE



ERKEN TESİR  
UZUN SÜRELİ TESİR

**isordil**<sup>®</sup>  
(isosorbida dinitrate)

sublingual tablet 5 mg.  
oral tablet 10 mg.



ILAÇLARI A.Ş. Levent - İstanbul

# Zeytin suyundan üretilen mikrobiyal proteinin (*Aspergillus niger* M 1) fareler ve sıçanlar üzerindeki etkisi



Mustafa ÖZYURT

## ÖZET

Bu çalışmada, zeytinyağı sanayiinin artık maddesi olan zeytin suyundan üretilen bir mikrobiyal proteinin fareler ve sıçanlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla fermentasyon sonucu elde edilen mikrobiyal protein farelerin yemine karıştırılarak, sıçanlara da belirli aralıklarla mide tubajı ile verilerek 10 hafta süre ile denenmiştir. Test süresinin sonunda kontrol ve deney hayvanlarının patolojik incelemeleri yapılmıştır. İncelenen organlar içinde sadece bazı test farelerinin karaciğerinde küçük nekrozlar görülmüş, diğer organlarda ise herhangi bir lezyona rastlanmamıştır. Ayrıca sıçanlarda toksik bir etki saptanmamıştır. Gelişim hızı bakımından kontrol ve test fareleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

## SUMMARY

*The effect of microbial protein (Aspergillus niger M1), produced from olive waste, on mice and rats. The microbial protein obtained from olive waste, which is a by-product of olive oil industry, was mixed into the feed of mice and fed to rats by stomach feeding tube. After the 10 wk-test period, the internal organs of the animals were examined to search for the pathological ef-*

fects. No lesions were observed in the stomach, intestines, kidneys, lungs, spleen and heart but little necrosis in the livers of some test mice. There were not any toxic effects on rats. The growth rate did not show a significant difference between the control and test mice.

## GİRİŞ

Son yıllarda araştırma dünyasında sıkça rastladığımız güncel konulardan biri de hiç şüphesiz, çeşitli artık maddelerden mikrobiyal protein üretimidir. Bu araştırmaların kaynaklandığı sorun, hızla artan dünya nüfusunun beslenmesinde gelecekte mevcut gıda kaynaklarının yetersiz kalacağı düşüncesidir. Gerçekten de istatistikî değerler göz önünde tutulursa, çağımızda 4 milyarlık bir nüfusu besleyen bugünkü gıda kaynakları acaba 20-25 yıl sonra 7 milyarlık bir nüfusu besleyebilmek için yeterli olacak mıdır? Bazı düşünürler her ne kadar mevcut gıda kaynakları kapasitesinin daha uzun yıllar dünyayı besleyebileceğini ileri sürüyorlarsa da henüz çağımızda açlık mücadelesi veren, açlıktan ölen milyonlarca insanın dramını göz önünde tutmak gerekir. Bunda dünya ülkeleri arasındaki dengesiz beslenmenin de payı olduğu bir gerçektir. Dünya gıda sorunundaki bu görüntü bilim adamları-

nı bir taraftan klâsik gıda kaynaklarının üretiminin artırılması çalışmalarına yöneltirken diğer taraftan yeni gıda kaynaklarının bulunup insanlığın yararına sunulması için çalışmalar da hızlandırılmıştır. Mikrobiyal protein çalışmalarında şeker pancarı ve kamışı artıkları, hurma, şekerleme ve kâğıt sanayii artıkları gibi birçok artık madde kullanılmaktadır. Shukla ve Dutta (1967) artık melâslar, Barber ve arkadaşları (1971) normal parafin, Vogt, Stute ve Harnisch (1974) peynir altı suyu, Imrie ve Vlitos (1973) keçiyoynuzu, Joson (1971) Hindistan cevizi suyu gibi artıkları mikrobiyal protein üretiminde kullanmışlardır. Çalışmamızda kullandığımız zeytin suyundan mikrobiyal protein üretimi ise önceki araştırmalarımızda ele alınmıştır (14, 15).

Bu çalışmada, zeytin suyundan ürettiğimiz mikrobiyal proteinin (*A. niger* M1) fareler ve sıçanlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan zeytin suyu Zeytincilik Araştırma Enstitüsü zeytinyağı fabrikasından (Bornova-İzmir). *Aspergillus niger* M1 ise Philip Lyle Memorial Research Laboratory'den (Reading, İngiltere) temin edildi. Bu mantar türü, mikrobiyal protein üretimi çalışmalarımızda en iyi verim aldığımız mikroorganizma olarak saptanmıştır. Fermentasyon ortamı şu şekilde hazırlandı: % 50 zeytin suyu (3000 devir/dakikada 20 dakika santrifüj edildi), % 0.5 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, % 0.1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. 500 ml'lik erlenlerde musluk suyu ile 100 ml'ye tamamlandı.

Üretim çalkalama sistemli bir fermentörde (MK VI Orbital Shaker) 30°C'de 250 devir/dakikada yapıldı. Fermentasyon sonunda filtrasyonla ayırım ve distile su ile yıkama işlemini takiben elde edilen ürün 60°C'lik fırında yaklaşık 20 saat süreyle kurutuldu ve daha

sonra havanda dövülerek toz haline getirildi. Fare testi için mikrobiyal protein farelerin yemine % 5 oranında karıştırıldı. Brenne ve arkadaşları (1974) domuzlar üzerinde yaptıkları çalışmada % 6-12 oranında, Doctor ve Kerur (1968) sıçanlar üzerindeki testlerinde % 7.5, Koci ve Petras (1969) piliçler üzerindeki araştırmalarında % 3, 5, 10, 20, 40 ve Ruzicka ile Vavak (1972) da piliçler ve domuzlarla yaptıkları çalışmada % 3-6 oranında mikrobiyal protein kullanmışlardır.

Fare testi için 6 kontrol ve 6 deney hayvanı kullanıldı. Bunlar erkek ve 5 aylık farelerdi. Test süresi 10 hafta olarak saptandı. Mikrobiyal protein testleri 29 gün, 3-5 ay, 112-266 gün, 1-2 yıl gibi değişik periyotlarda yapılmıştır (5, 6, 20, 21, 28, 29). Test süresince kontrol ve deney farelerinin ağırlık artışı kaydedilmiş ve ayrıca deney farelerinin davranışı gözlenmiştir.

Sıçan testi için ise 7 deney hayvanı kullanıldı. Bunlar erkek ve 8 aylık sıçanlardı. Bu test periyodu da 10 hafta olarak saptandı. Sıçan testinde mikrobiyal protein mide tubağı tekniğiyle (13) 100 mg'lık miktarlarda 1 haftalık periyotlarla sıçanlara verildi. Bunun için, 100 mg mikrobiyal protein 1 ml distile su ile karıştırıldı ve nembutal ile bayıtılan sıçanın ağzından mide girişine kadar uzanan plâstik bir boru ve enjektör kullanıldı. Periyodik olarak yapılan bu işlemin dışında sıçanlar normal yemleriyle beslendi. Sıçanlar için bu yöntemin seçilmesindeki neden, lâboratuvar koşullarında ürettiğimiz mikrobiyal proteinin sınırlı oluşunun yanında bu yöntemle sıçanın midesine doğrudan sevkedilen bu miktarın herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığını saptamaktır.

Fareler ve sıçanlar üzerinde uygulanan bu testler sonunda patolojik gözlemler yapılmak üzere her iki gruptaki hayvanlar patoloji lâboratuvarına götürüldü. Otopsiden sonra hayvanların karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, kalp,

mide ve barsak gibi organlarından kesitler alınarak incelendi.

### BULGULAR

Fare testi: 10 haftalık test periyodu sırasında kontrol ve deney hayvanlarında herhangi bir ölüm olmadı. Test farelerinin davranışlarında da herhangi bir anormallik görülmedi. Kontrol farelerinin ağırlıklarında kaydedilen değişiklikler Tablo 1'de, test farelerinininki ise Tablo 2'de verilmiştir.

önemsiz olduğu "t testi" uygulanarak da kanıtlanmıştır.

Patolojik incelemelere gelince: Mide, barsak, böbrek, akciğer, dalak ve kalp'den hazırlanan preparatlarda yapılan gözlemlerde herhangi bir lezyon görülmedi. Ancak test grubu farelerin bazılarının (3 farenin) karaciğerinde küçük nekrozlar görüldü ki bunlardan bir kısmı tek hücre nekrozu şeklinde idi.

Sıçan testi: 10 haftalık test periyodu esnasında herhangi bir ölüm olmadı. Sıçanların davranışlarında da anormal bir

TABLO 1. Kontrol farelerinin ağırlık artışı.

	Test öncesi ağırlık (g)	Test sonrası ağırlık (g)	Ağırlık artışı (g)	Günlük ağırlık artışı (mg)
1	18.00	20.27	2.27	32.9
2	19.03	20.43	1.40	20.3
3	20.62	26.65	6.03	87.4
4	20.08	26.57	6.49	94.1
5	20.73	27.09	6.36	92.2
6	21.20	26.72	5.52	80.0

TABLO 2. Test farelerinin ağırlık artışı.

	Test öncesi ağırlık (g)	Test sonrası ağırlık (g)	Ağırlık artışı (g)	Günlük ağırlık artışı (mg)
1	17.10	23.24	6.14	89.0
2	18.03	23.67	5.64	81.7
3	18.28	22.42	4.14	60.0
4	19.17	19.74	0.57	8.3
5	20.57	26.49	5.92	85.8
6	20.97	27.12	6.15	89.1

Tablo 1 ve 2'den kontrol ve test farelerinin ağırlık artışları karşılaştırılırsa, kontrol farelerinin günlük toplam 406.9 mg, test farelerinin ise toplam 413.9 mg ağırlık artışı gösterdiği saptanabilir. Ancak ikisi arasındaki farkın

durum gözlenmedi. Toksik bir etkinin görülmediği bu testlerde patolojik incelemeler sonunda mide, barsak, böbrek, akciğer, karaciğer, dalak ve kalp'den hazırlanan preparatlarda da herhangi bir lezyona rastlanmadı.



## TARTIŞMA

Yeni bir gıda kaynağının gerek insanlar ve gerekse hayvanlar tarafından güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi için bazı testlerden geçirilmesi zorunludur. Mikrobiyal proteinler de, kökeni daha eskilere dayanmakla birlikte, yeni gıda kaynakları olarak çeşitli canlılar üzerinde denenmiş ve denenmektedir. Bu tip testlerin pilot tesislerde yapılacak üretimle büyük çapta uygulanması ancak daha uygundur. Bizim çalışmamız, laboratuvar olanakları çerçevesinde bir ön çalışma, daha ayrıntılı ve pilot uygulamalara bir basamak olarak yorumlanmalıdır.

Mikrobiyal protein testlerinde kontrol ve deney hayvanlarının ağırlık artışı genellikle saptanır. Brenne ve arkadaşları (1974) artık sülfid sıvısından ürettikleri mikrobiyal proteinle domuzlar üzerindeki denemelerinde, kontrol grubu hayvanların deney grubundakilere göre ağırlık artışını daha fazla bulmuşlardır. Tkachev ve Grigorov (1975) ise hidrokarbon üretimi mikrobiyal proteinle gene domuzlar üzerinde yaptıkları testlerde mikrobiyal protein diyetinin % 10-25 arasında ağırlık artışı sağladığını kaydetmişlerdir. Diğer bazı çalışmalarda da (20, 22) mikrobiyal protein diyetinin ağırlık artışı sağladığı saptanmıştır. Çalışmamızda ise kontrol ve deney farelerinin ağırlık artışları arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

Snyder (1970) maya diyetiyle beslenen hayvanlarda karaciğer nekrozu görüldüğünü, ancak maya diyetine sistin katılmasıyla bu patolojik görüntünün kaybolduğunu rapor etmiştir. Çalışmamızdaki bulgulara göre de bazı test farelerinin karaciğerinde nekroz görülmüştür. Kullandığımız mikrobiyal proteinde de metionin FAO referans düzeyinin altında bulunmuştur (16). Mikrobiyal proteinlerin genellikle sistin ve metionin

bakımından yetersiz olduğu bilinmektedir. Diğer bir çalışmamızda da mikrobiyal proteine bağlı 32p'nin karaciğerdeki dağılımı, incelenen diğer organlara göre yüksek oranda bulunmuştur (19). Imrie ve Vlitos (1973) sıçanlar üzerinde, keçi boynuzundan hazırlanan besiyerinde ürettikleri, mikrobiyal proteinle (*A. niger* M1) yaptıkları çalışmada herhangi bir toksik veya kansorejenik etki görülmediğini saptamışlardır. Daha birçok çalışmada mikrobiyal proteinlerin hayvanlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır (6, 11, 12, 18, 29). İnsan gıdasında da kullanılması düşünülmektedir (3, 10, 24). Mikrobiyal proteinlerin hayvanlar üzerindeki etkileri bir kaynak araştırmamızda daha ayrıntılı incelenmiştir (17).

Bulgularımızda, test hayvanlarının bir kısmında ve sadece karaciğerde patolojik değişiklik olduğu saptanmıştır. Diğer test hayvanlarında benzeri veya başka bir patolojik değişimin görülmeşi bulgularımızın tamamen olumsuz olarak değerlendirilmemesini gerektirmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmama değerli eleştirileriyle katkısı olan Sayın Prof. Dr. Atif Şengün'e, patolojik incelemelerin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen İstanbul Tıp Fakültesi Genel Patoloji ve Patolojik Anatomi Kürsüsü'nden Sayın Prof. Dr. Münevver Yenerman'a, Uzm. Dr. Veli Uysal'a ve Aygün Özel'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca hayvan testlerindeki yardımları nedeniyle de Sayın Yılmaz Köklü'ye teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- 1 — Barber RS, Braude R, Mitchell K G, Myres AW: Value of hydrocarbon-grown yeast as a source of protein for growing pigs, *Brit J Nutr* 25: 285 (1971).

- 2 — Brenne T, Naess B, Fastad L: Nutritive value for growing pigs, of single cell protein (*Candida utilis*) produced from sulfite spent liquor, *Acta Agr Scand* 24: 2 (1974).
- 3 — Dam R, Lee S, Fry P C, Fox H: Utilization of algae as a protein source for humans, *J Nutr* 86: 376 (1965).
- 4 — Doctor W M, Kerur L: *Penicillium mycelium* waste as protein supplement in animals, *Appl Microbiol* 16: 1723 (1968).
- 5 — De Groot A P, Til H P, Feron V J: Safety evaluation of yeast grown on hydrocarbons. I. One-year feeding study in rats with yeast grown on gas-oil, *Food Cosmet Toxicol* 8: 267 (1970).
- 6 — De Groot A P, Til H P, Feron V J: Safety evaluation of yeast grown on hydrocarbons. III. Two-year feeding and multigeneration study in rats with yeast grown on gas oil, *Food Cosmet Toxicol* 9: 787 (1971).
- 7 — Imrei F K E, Vlitos A J: Production of fungal protein from Carob (*Ceratonia siliqua L.*), presented at the 2nd Int. Symp. on SCP at M.I.T., Boston, U.S.A., 29th-31st May (1973).
- 8 — Joston L M: Utilization of microorganisms for the production of food and metabolites in the Philippines. «Radiation and Radioisotopes for Industrial Microorganisms», *Proc of a Symp*, Vienna, 29 March-1 April, IAEA (1971).
- 9 — Koci S, Petras G: Nutrition value for chickens of yeasts produced from petrochemical raw materials, *Agrochemia* 9: 317 (1969).
- 10 — Kofranyi E: Microalgae in human nutrition, *Voeding* 30: 719 (1969).
- 11 — Lee P K: Effect of petroleum yeast as a substitute for soybean cake in ration on growth rate, feed conversion and carcass quality of New Zealand withe growing fattening rabbits, *L'ai-icam Nung Yeh Chi K'an* 9: 113 (1973).
- 12 — Lee P K, Yang Y F: Comparative study on petroleum yeast, soybean meal as protein supplements and dried sweet potatoes, Corn meal as basal feeds in the nutrition of growing fattening pigs, *T'ai-icam Nung Yeh Chi K'an* 10: 165 (1974).
- 13 — Moreland A F: Collection and withdrawal of body fluids and infusion techniques. «*Methods of Animal Experimentation*», Vol I, Chap 1, Ed. W 1 Gay, Academic Press, New York, London (1965).
- 14 — Özyurt M: Conversion of black water colive wastes to microbial protein, ÇNAEM-R-144, Ç. Nuclear Research and Training Centre, Istanbul (1975).
- 15 — Özyurt M: Kule fermentasyonu ile endüstriyel mikroorganizmaların zeytin suyunda üretimi, VI. Bilim Kongresi, 17-21 Ekim Ankara (1977).
- 16 — Özyurt M: The amino acid composition of microorganisms grown on olive waste, ÇNAEM-R-167, Ç. Nuclear Research Centre, Istanbul (1977).
- 17 — Özyurt M: Mikrobiyal proteinin hayvan yemi olarak kullanılması, *Gıda*, yıl: 2 sayı: 4/5, 171 (1977).
- 18 — Özyurt M: Mikrobiyal proteinlerin *Dorosophila melanogaster*'in (sirke sineği) gelişimi üzerine etkisi, *Baskıda (Biyoloji Dergisi)*.
- 19 — Özyurt M: Zeytin suyunda üretilen *Aspergillus niger* suşu ML, mikrobiyal proteinine bağlı 32 p'nin sıçan iç organlardaki dağılımı (Yayınlanmamış çalışma).
- 20 — Pathak S G and Seshadri R: Use of *Penicillium chrysogenum* mycelium as animal food, *Appl Microbiol* 13: 262 (1965).
- 21 — Rodrigues A J, et al: Use of penicillin mycelium meal as swine feed supplement, *Bol In Anim* 27-28, 57-63 (1971).
- 22 — Russo V, Mariani P: Use of n-paraffin-grown yeast in the feeding of laying hens, *Zootec Nutr Anim* 2: 237 (1976).
- 23 — Ruzicka B, Vavak J: Nutritive value of feed yeast grown on n-alkanes, *Agrochemia* 12: 90 (1972).
- 24 — Shacklady C A: Safety in use and nutritional value of microbial protein, 3rd Int. Cong. of Food Sci. and Technol, Washington D.C. Aug. 9-14 (1970).
- 25 — Shukla J P, Dutta S M: Production of fungal protein from waste molasses, *Indian J Technol* 5: 27 (1967).
- 26 — Synder H E: Microbial sources of protein, «*Advances in Food Research*», Vol 18: 85 (1970).
- 27 — Tkachev I F, Grigorov V V: Addition of microbial proteins to swine feed, *Int Z Landwirtschaft* 3: 329 (1975).
- 28 — Vogt H, Stute K, Harnisch S: Yeast from whey in poultry rations, *Arch Gefluegelkd* 38: 205 (1974).
- 29 — Volesky B, Zajic J E, Carroll K K: Feeding studies in rats with high protein fungus grown on natural gas, *J Nutr* 105: 311 (1975).

# B<sub>12</sub> vitamininin fermentasyonla elde edilmesi A - B<sub>12</sub> vitamininin saflaştırılması

Enver Tali ÇETİN  
Bülent GÜRLER

## ÖZET

B<sub>12</sub> vitamini sentezini oluşturmak amacıyla *P. freudenreichii* ile fermentasyon çalışmaları yapılmıştır. Kültürde bakteri hücrelerinin içinde B<sub>12</sub> vitamini çözeltisi ile kâğıt kromatografisi yapılmış ve standarda uygun olan fraksiyon alınarak yabancı maddelerden arındırılmıştır. Bu suretle B<sub>12</sub> vitamini saf bir şekilde elde edilmiştir.

## SUMMARY

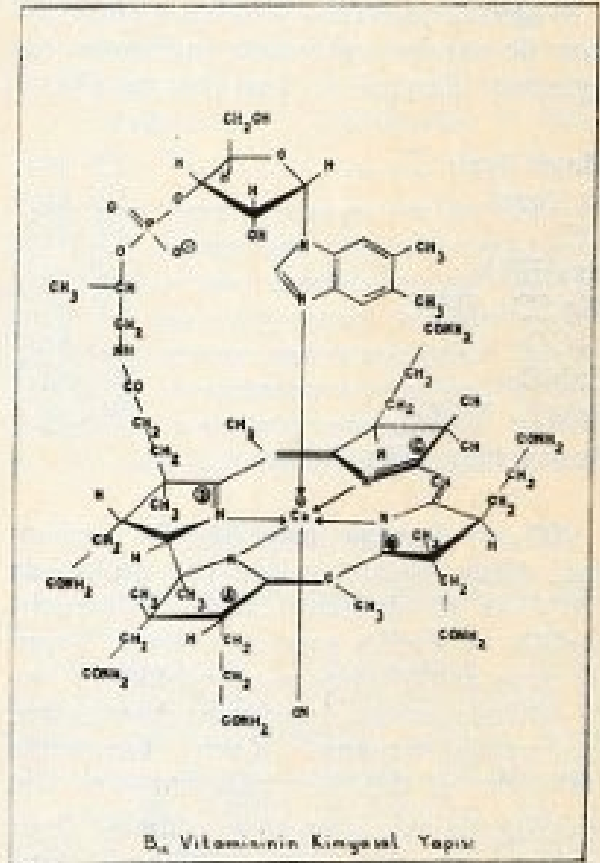
Obtaining Vitamin B<sub>12</sub> through a fermentation process A-purification of vitamin B<sub>12</sub>. A fermentation process was applied with *P. freudenreichii*. In order to obtain vitamin B<sub>12</sub> formed at the end of the fermentation process within the cells, the bacteria were hydrolyzed. The obtained solution of vitamin B<sub>12</sub> was submitted to paper-chromatography and the fraction selected in reference to the standard was purified from the impurities. Thus, pure vitamin B<sub>12</sub> was obtained.

## GİRİŞ

Birçok anemik hastalıkların tedavisinde kullanılması ve hayvan besinlerine

ilavesi B<sub>12</sub> vitamininin ticarî önemini artırmış ve buna bağlı olarak laboratuvar denemelerine daha geniş ölçüde yer verilmiştir.

B<sub>12</sub> vitamininin kimyasal yapısının izahı muhtelif araştırmacıların ortak çalışmaları ile gelişmeler göstermiştir. B<sub>12</sub> vitamininin kimyasal yapısı Şekil 1'de görülmektedir (9).



Şekil 1 : B<sub>12</sub> vitamininin kimyasal yapısı.

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsü  
Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Siyanokobalamindeki kobamid koenzim çekirdeğindeki CN iyonu değişik anyonlarla yer değiştirirse çeşitli kobamid türevleri ortaya çıkar (7). Her kobamid türevinin biyolojik aktivitesi farklıdır ve bu biyolojik aktiviteler birbirleri ile mukayese edilebilir.

Çalışmamızda *Propionibacterium freudenreichii* standart suşu kullanılarak yapılan fermentasyon sonucunda elde edilen kültürdeki bakteri hücreleri parçalanmış, sıvıya geçen B<sub>12</sub> vitamini izole edilmiş ve saflaştırılarak kimyasal tanısı yapılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

I — Besiyerinin hazırlanması ve kültür şartları.

*Propionibacterium freudenreichii* 6207 suşu ile yapılan çalışmada kullanılan besiyerinin bileşimi ve hazırlanması (4) :

Maya özeti .....	2.5 gr/l
Et özeti .....	2.5 gr/l
KCl .....	4.0 gr/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.0 gr/l
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O .....	1.0 gr/l
CaCO <sub>3</sub> .....	1.0 gr/l
CoNO <sub>2</sub> .....	50 mg/l
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O .....	40 mg/l

Besiyerinin pH'ı 7.0 dır.

900 cm<sup>3</sup> damıtık suya MgSO<sub>4</sub> haricindeki diğer maddeler konarak otoklavda 120°C de 15 dakika steril edilmiştir. MgSO<sub>4</sub> ve FeSO<sub>4</sub> ayrı ayrı 50 cm<sup>3</sup> damıtık suda eritildikten sonra otoklavda steril edilmiş, sonra besiyerine katılmıştır. Besiyerinin tamamı Koch kazanında 100°C de 20 dakika bekletilmiştir. Bu maddelerin ayrı ayrı ilâve edilmesi diğer tuzlarla meydana gelen çökmeyi önlemek içindir. Katı besiyeri ise bu sıvı besiyerine % 2 oranında Bacto Agar konularak elde edilmiştir.

Bakteri Petri kutularındaki besiyeri

üzerine azaltma yöntemi ile ekilmiş ve 28° de 9 günlük üreme dönemi sonunda oluşan kolonilerden saf kültür alınarak 10 cm<sup>3</sup> lük sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. Üreme tamamlandıktan sonra bu kültürlerden 5 cm<sup>3</sup> alınarak 500 cm<sup>3</sup> pre-fermentasyon besiyerine ekim yapılmıştır.

Fermentasyon esnasında besiyerine karbon kaynağı olarak glikoz, kobalamin sentezini uyarıcı olarak 5,6-dimetilbenzimidazol ilâve edilmiştir. *P. freudenreichii* ile aynı cinste bulunan bakteriler üreme esnasında propiyonik asit oluşturdıklarından pH devamlı düşmektedir. Bundan dolayı deneylerimizde % 30 luk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile devamlı pH ayarlaması yapılmıştır (2).

II — Bakterilerin parçalanması ve B<sub>12</sub> vitamininin bakterilerden elde edilmesi :

Bu işlem iki şekilde yapılmıştır (3, 5, 8)

a) Santrifüjde çevrilip fermentasyon sıvısından çöktürülerek ayrılan yaş bakteri miktarı tartılarak 12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'ı 3'e ayarlanmış ve içinde % 0.1 KCN ve % 2.25 NaNO<sub>3</sub> bulunan çözeltide % 10-20 süspansiyon yapılarak 15 dakika kaynatılmıştır. Bu işlemle bakterilerin parçalanması sağlanmış ve sıvı International santrifüjde (Rotor No: 822) 4000 rpm'de 15 dakika çevrilip B<sub>12</sub> vitaminini içeren üst sıvı alınmış, sıvının pH'ı 7.0'a ayarlanmıştır.

b) Santrifüjde çevrilerek fermentasyon sıvısından çöktürülüp ayrılan yaş bakterinin miktarı tartılarak bulunmuştur % 0.5 NaNO<sub>3</sub> ve % 0.2 KCN içeren çözelti hazırlanmış bakteri konsantrasyonu % 10-20 olacak şekilde bu çözelti ile sulandırılmış ve % 10 luk asetik asitle pH'ı 4'e ayarlanmıştır. pH'ı ayarlanan süspansiyon 5 dakika kaynatılarak bakterilerin parçalanması sağlanmış ve bakteriler santrifüjde çevrilerek üst sıvı alınmıştır.

### III — B<sub>12</sub> vitamininin saflaştırılması.

1 — Kolon kromatografisi ile saflaştırma ve krezol-bütanol ekstraksiyonu :

Yukarıda bahsettiğimiz yollarla elde edilen B<sub>12</sub> vitamini içeren sıvılar Dowex 50-X (H<sup>+</sup> şeklinde) reçinesinden geçirilerek temizlenmiştir (6). Toplanan fraksiyonların 362 nm dalga boyunda absorpsiyonları okunmuş ve yüksek absorpsiyon gösteren tüpler toplanarak aktivitelere bakılmıştır.

Kolondan geçirilerek yabancı tuzlardan arındırılan B<sub>12</sub> vitamininin sulu çözeltisi elde edilmiştir. Su fazının bir kısmını ayırmak için de krezol-bütanol ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur.

Ekstraksiyon şu şekilde yapılmıştır :

— B<sub>12</sub> vitamini içeren sıvıya % 1 oranında formaldehit ilave edilmiştir.

— pH 4'e ayarlanmıştır.

— 100 cm<sup>3</sup> çözeltiye 10 gr çinko asetat ilave edilip çözündürülmüştür.

— 5N NaOH ile pH 8.5 a çıkarılmıştır.

— Çöküntü santrifüjde çevrilerek ayrılmıştır.

— Üst sıvı 0.1 hacim krezol CCl<sub>4</sub> (0.05 + 0.05 V/V) ile ekstre edilmiştir.

— Sulu faz atılmıştır.

— Krezol-CCl<sub>4</sub> karışımına 0.05 hacim CCl<sub>4</sub> katılmıştır.

— Karışım 0.1 hacim su ile yıkanmıştır.

— Geri kalan sıvıya 0.08 hacim bütanol ve 0.08 hacim CCl<sub>4</sub> eklenmiştir.

— Karışım 0.1 hacim su ilave edilerek B<sub>12</sub> vitamininin sulu çözeltisi hazırlanmıştır.

2 — Kolondan geçirilmeden ekstraksiyonla saflaştırma (1) :

Bakterilerin parçalanması sonucunda elde edilen üst sıvıya % 1 oranında % 37 lik formaldehit ilave edilmiş ve pH 4'e ayarlanmıştır. Bu pH değişimi kobalamin haricinde bulunan diğer tuzları çinko bileşikleri halinde çöktürmüştür. Çö-

ken tuzlar santrifüjde çevrilerek atılmıştır.

Son bölümde, yukarıda bahsettiğimiz şekilde krezol-bütanol ekstraksiyonu yapılmış ve B<sub>12</sub> vitamini çözeltisi elde edilmiştir.

Bu metodlar uygulanarak elde edilen çözeltilerin siyanokobalamin türevinden başka diğer kobalamin türevleri içerip içermedikleri kağıt kromatografisi yapılarak araştırılmıştır.

Kağıt kromatografisi için Whatman 1 nolu kâğıt kullanılmış ve ayrıca üç çeşit çözücü sistemi hazırlanmıştır.

Çözücü 1 :

H<sub>2</sub>O + Asetik asit + Bütan-2-ol  
5 + 1 + 4

Çözücü 2 :

Bütan-1-ol + Propan-2-ol + Bütan-2-ol  
10 + 7 + 10

Çözücü 3 :

Bütan-1-ol + Asetik asit + H<sub>2</sub>O  
4 + 1 + 5

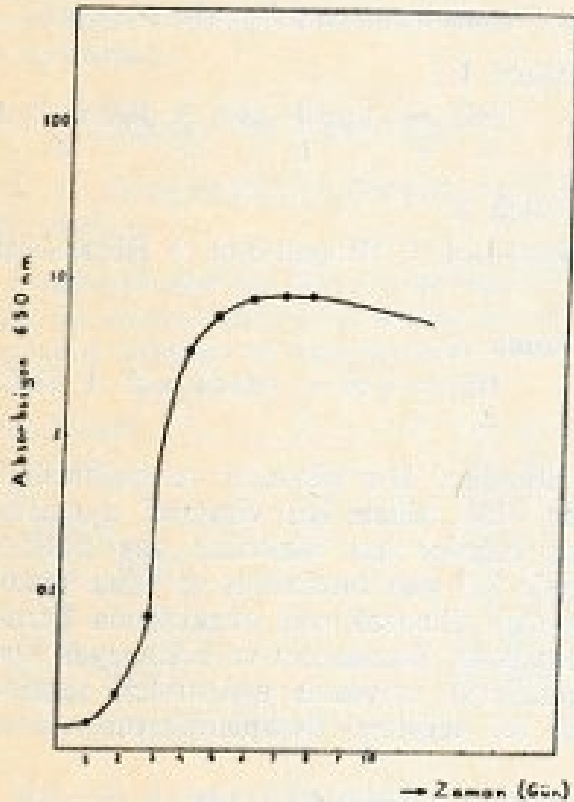
Standart B<sub>12</sub> vitamini ve bakterilerden elde edilen B<sub>12</sub> vitamini uygulanmış kâğıtlar her çözücüde oda sıcaklığında 8,5 saat bırakılmış ve daha sonra kâğıtlar alınarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Standartın ve bilinmeyen numunelerin meydana getirdikleri lekelerin Rf değerleri hesaplanmıştır.

### BULGULAR

I — Besiyerinin hazırlanması ve kültür şartları :

Fermantasyon başlatıldıktan sonra *Propionibacterium freudenreichii*'nin üremesi spektrofotometrik olarak takip edilmiş ve 24 saat sonunda 650 nm dalga boyunda 0.0015 absorpsiyon elde edilmiştir, sonraki günlerde şu değerler bulunmuştur. 2. gün sonunda 0.0024, 4. gün 3.30, 6. gün 6.80, 7. gün 5.80, 8. gün 6.75, 9. gün 6.10 absorpsiyon okunmuş ve fermentasyon sona erdirilmiştir. Bu-

lunan bu değerler yarı logaritmik grafikte apsise zaman gün olarak ve ordinata absorpsiyon değerleri (650 nm de) konularak fermentasyon esnasında üreme grafiği çizilmiştir. Bu grafikten izlendiği gibi üreme 1. gün çok yavaş olmuş, 2. gün ile 5. gün arasında çok hızlı bir üreme görülmüş bundan sonra üreme durgun faza girmiş ve 9. gün lizis devresi başlamıştır. Bu yüzden fermentasyonu 9. gün bitirmek gerekmiştir (Şekil 2, Tablo 1).



Şekil 2 : Fermentasyon esnasında *P. freudenreichii*'nin üreme eğrisi

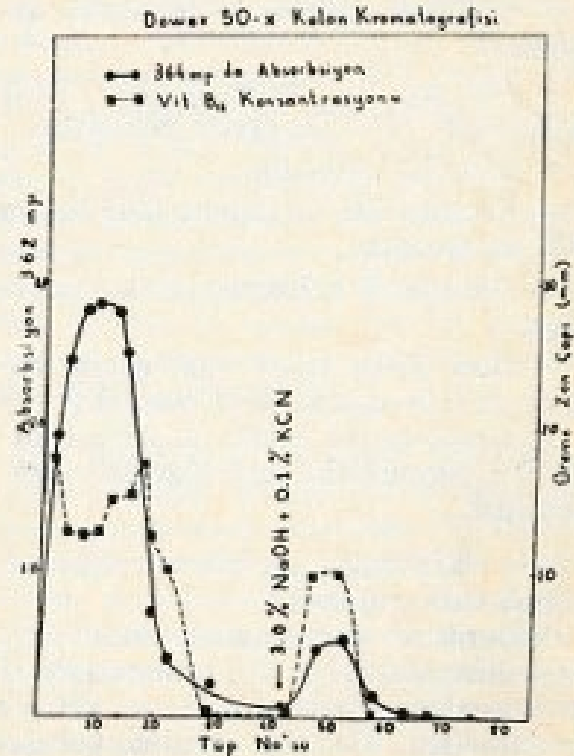
## II — B<sub>12</sub> vitamininin saflaştırılması.

1 — Kolon kromatografisi ile saflaştırma ve krezol-bütanol ekstraksiyonu :

B<sub>12</sub> vitamini, bakteri hücresinin sitoplazmasında sentezlendiğinden, ancak bakteri parçalanarak çeşitli maddelerle

birlikte serbest halde ayrılabilir. Elde edilen B<sub>12</sub> vitamininin saflaştırılması için Dowex 50-X (H<sup>+</sup> şeklinde) kolon kromatografisi yapılmıştır. Sütundan geçirilerek elde edilen fraksiyonlar daha önce numaralanan tüplere dağıtılmıştır. Bu fraksiyonların absorpsiyonları spektrofotometrede 362 nm'de okunmuş ve örneğin 2 no'lu tüpte 0.130, 7-no'lu tüpte 0.280, 12 no'lu tüpte 0.290 değerleri bulunmuştur.

Daha sonraki tüplerde ölçülen değerlerde düşme görülmüştür. 41 no'lu tüpte bu değer 0.008 e kadar inmiştir. 52. tüpe doğru yine değer yükselmesi olmuş ve bundan sonraki tüplerde ölçülen değerlerde ise sıfıra doğru düşüş saptanmıştır. Bu değerler dikkate alınarak grafik çizilmiştir. Ordinata 362 nm'de absorpsiyon değerleri, apsise ise tüp numaraları yerleştirilerek çizilen grafikte de görüldüğü gibi 12 no'lu tüp için bir maksimum değer ve 52 no'lu tüp için de yine absorpsiyonda yükselme saptanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3 : Dowex 50-X (H<sup>+</sup>) kolon kromatografisi.

Tablo 1 — *Propionibacterium freudenreichii* üremesinin spektrofotometrik olarak izlenmesi.

650 nm dalga boyunda absorpsiyon	Zaman (Saat)	650 nm dalga boyunda absorpsiyon	Zaman (Saat)
0.015	24	6.80	144
0.024	48	6.80	160
0.065	72	6.75	192
3.30	96	6.10	240
6.0	120		

Ayrıca her fraksiyondaki aktivite disk metodu ile ölçülmüştür. B<sub>12</sub> vitamini stok çözeltisinden son konsantrasyonu cm<sup>2</sup> de 100-90-80-70-60-50-40-30-20-10-7, 5-5-3-2-1-0.5 µg olacak şekilde konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Test besiyeri ihtiva eden Petri kutularına 5.5 mm çapında steril filtre kağıdı disklerinden dört adet yerleştirilmiştir. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki B<sub>12</sub> vitamini çözeltilerinden diskler üzerine 0.1 cm<sup>2</sup> konmuştur. 37°C lik etüvde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucu meydana gelen zonlar kompasla ölçülmüştür. Örneğin

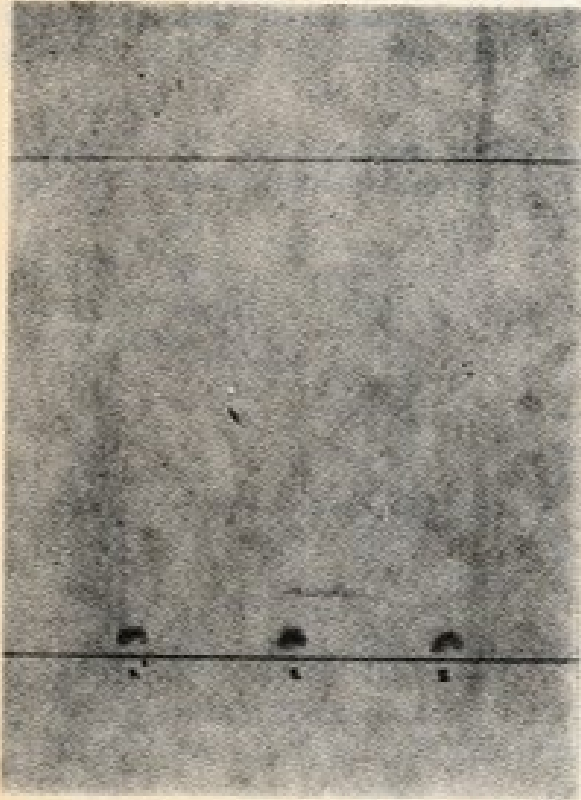
17.0 mm zon çapı veren B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonu 14.0 µg/cm<sup>2</sup> olarak ölçülmüş, 19.8 mm çap için 31.5 µg/cm<sup>2</sup> olarak ölçülmüş, 19.8 mm çap için 31.5 µg/cm<sup>2</sup> en yüksek değer olarak bulunmuştur. Bundan sonra ölçülen zon çapları küçülmekte ve konsantrasyon sıfır değerine düşmektedir. Ordinata üreme zon çapı, apse ise B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonu koyarak çizilen grafikte bu değerler arasındaki değişim belirlenmiştir. Şekil 3 deki kesikli çizgiler bu değişimi ifade etmektedir (Şekil 3, Tablo 2).

Tablo 2 — Dow x 50-x kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların 362 nm dalga boyunda verdiği absorpsiyon değerleri ve B<sub>12</sub> vitamini miktarlarının tayininde disk metodu ile alınan değerler.

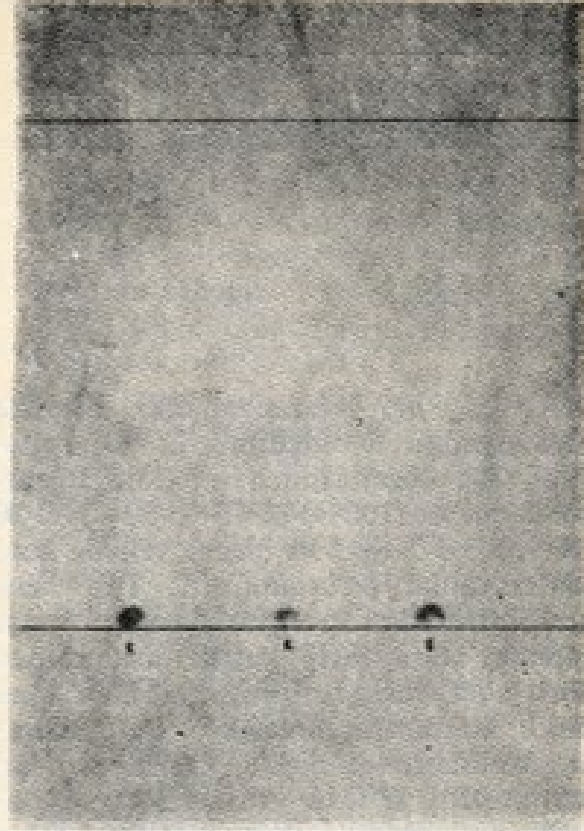
Tüp No	362 nm'de Absorpsiyon	B <sub>12</sub> vitamini Konsantrasyonu (µg/cm <sup>2</sup> )	Zon Çapı (mm)	B <sub>12</sub> vitamini Konsantrasyonu Disk M. (µg/cm <sup>2</sup> )
2	0.130	14.0	17.0	14.0
3	0.190	20.5	18.2	20.5
4	0.240	26.0	19.0	26.0
7	0.280	30.0	19.2	30.0
8	0.285	30.5	19.5	30.5
12	0.290	31.5	19.8	31.5
14	0.242	26.1	19.0	26.1
19	0.070	8.5	8.0	—
22	0.038	3.0	—	—
29	0.022	2.0	—	—
41	0.008	—	—	—
46	0.050	5.5	2.1	—
52	0.056	6.1	2.2	—
56	0.041	—	—	—
61	0.005	—	—	—
67	0.002	—	—	—

2 — Kolondan geçirmeden ekstraksiyonla saflaştırma :

Deney sonrasında elde edilen B<sub>12</sub> vitamini sıvısının saflık dereceleri kağıt kromatografisi ile araştırılmıştır. Gereç ve yöntem kısmında bahsedilen üç tip çözücü kullanılarak, elde edilen numuneleri standart B<sub>12</sub> vitamini çözeltisiyle karşılaştırılmış fakat 1 ve 2 no'lu çözücüler iyi sonuç vermemiştir 3 no'lu çözücüde numuneler iyi ilerlemiş ve birbirine yakın Rf değerleri elde edilmiştir. Bakterinin hemen parçalanmasından sonra alınan numunede Rf değerleri 0.328-0.406-0.530 olan üç leke, ekstraksiyonla saflaştırılan numunede ise Rf 0.533 olan bir leke bulunmuştur. Aynı deneyde standart B<sub>12</sub> vitamininin verdiği Rf değeri 0.533 tür (Şekil 4,5,6).



Şekil 4 : Solvent sistemi 1 ile yapılan kağıt kromatografisi, (H<sub>2</sub>O-Asetik Asit - Bütan-2-ol)



Şekil 5 : Solvent sistemi II ile yapılan kağıt kromatografisi, (Bu.an-1-ol - Propan-2-ol - Bütan-2-ol)

## TARTIŞMA

Fermentasyon üst sıvısındaki B<sub>12</sub> vitamininin tayini çeşitli yollarla yapılmaktadır. Bu yöntemleri mikrobiyolojik ve spektrofotometrik yöntemler olarak ayırabiliriz.

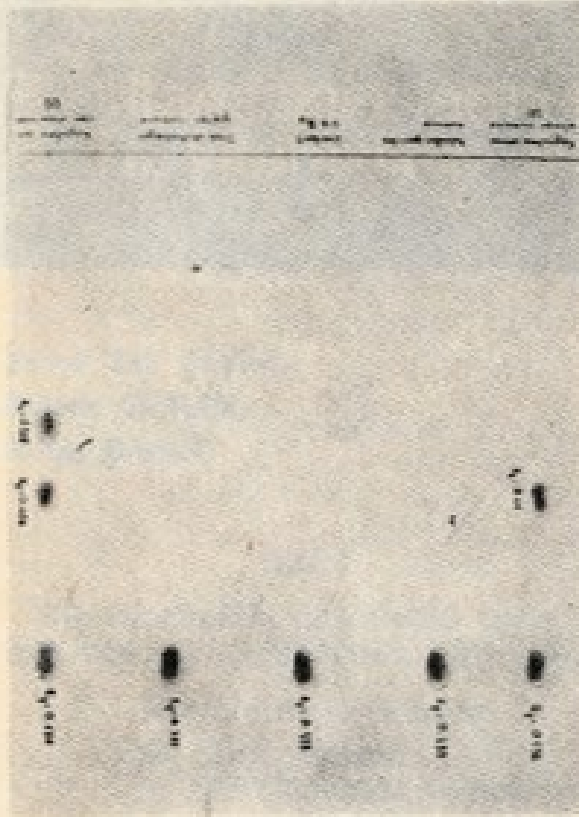
Mikrobiyolojik yöntemlerle ilgili güçlükler :

1 — B<sub>12</sub> vitamininden başka fermentasyon üst sıvısında bulunan maddelere,

2 — B<sub>12</sub> vitamininin benzer maddelerine ve türevlerine karşı bakterinin üreme hassasiyetinden doğar.

Literatürde bu teknik için en çok *Lactobacillus leichmanii* kullanılmıştır. B<sub>12</sub> vitamininin miktar tayininde yanlışlığa yol açan fermentasyon üst sıvısındaki





Şekil 6: Solvent sistem! III ile yapılan kâğıt kromatografisi (Bütan-1-ol - Asetik asit - H<sub>2</sub>O)

maddeler ekstraksiyon yoluyla uzaklaştırılabilir ve B<sub>12</sub> vitamininin benzerleri ve türevleri ancak kromatografi veya elektroforez yoluyla ayrılabilir. Kullanılmış olan mikroorganizmaların hiçbiri si yalnız B<sub>12</sub> vitamini için spesifik değildir. Renkli kirliliklerden, diğer kobalamid türevlerinden ayrılmış olan çözeltideki saf B<sub>12</sub> vitamini miktarı spektrofotometrik olarak tayin edilebilmektedir.

Çalışmalarımızda B<sub>12</sub> vitamini sentezi için kullandığımız *Propionibacterium freudenreichii* suşundan elde etmiş olduğumuz en iyi verim litrede 3.74 mg dır.

Ticari amaç ile yapılan fermentasyon şartlarında elde edilen verime nazaran bu değer in fazla olmamasına karşın, laboratuvar imkânları ile elde edilen verimle mukayese edilirse oldukça iyi olduğu görülmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1 — Backer A F, Boley A E, Shoak E G : Radioactive tracer assay for Vitamin B<sub>12</sub> and other cobalamins in complex mixtures, *Anal* 26 : 1146 (1954).
- 2 — Bakes J, Lauuno A Simonovits S T, Szontagh T : Investigation of acidic metabolites of anaerobic fermentation producing vitamin B<sub>12</sub>, *Proc Hung Annu Meet Biochem* 17 : 65 (1977).
- 3 — Bukin N : Synthese microbiologiques de vitamines (B<sub>12</sub>, B<sub>7</sub>, D), *Zh vsesojuz khim Obshchest D I Mendeleeva SSSR* 17, No :5 521 (1972).
- 4 — Çetin E T, Gürler B : B<sub>12</sub> vitamininin fermentasyonla elde edilmesi için uygun bakteri suşunun seçimi ve kültürü, *Kökem Dergi* 1 : 19 (1978).
- 5 — Demain A C, Daniels H J, Schnoble L, White R F : Specificity of stimulatory effect of betain on Vitamin B<sub>12</sub> fermentation, *Nature* 220 : 1324 (1968).
- 6 — Lester E S, Fantes K H, Ball S, Walker J G, Emery W B : Extractoin of vitamin B<sub>12</sub>, *J Biol Chem* 52 : 389 (1952).
- 7 — Hisanobu O : Biologically significant organometallic complexes, *New developments in vitamin B<sub>12</sub>, Chemistry* 32 : 112 (1977).
- 8 — Pelman D, Barket J M : Biosynthesis of cobalamin analogues by *Propionibacterium arabinosum*, *Can J Microbiol* 4 : 9 (1958).
- 9 — Weissbach H, Brot N : Cobalamins and cobamide coenzymes in *The Encyclopedia of Biochemistry*, (Editor : R J Williams, E M Lansford) p 251 Reinhold Publishing Corp, U S A (1967).

# B<sub>12</sub> vitamininin fermentasyonla elde edilmesi B - B<sub>12</sub> vitamininin aktivitesini tayin yöntemleri

Enver Tali ÇETİN

Bülent GÜRLER

Selim BADUR

## ÖZET

B<sub>12</sub> vitamininin aktivitesini tayin etmek üzere iki çeşit yöntem denenmiştir.

1 — Mikrobiyolojik yöntem.

- a) Disk yöntemi,
- b) Türbidimetrik yöntem.

2 — Spektrofotometrik yöntem.

Disk yönteminde *Lactobacillus leichmani* ATCC 4797 suşu ile 10-100 µg/cm<sup>2</sup> konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Türbidimetrik yöntemde *Lactobacillus leichmanii* 7830 suşu ile 0.01-50 µg/cm<sup>2</sup> arasındaki konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Spektrofotometrik yöntemin değişik konsantrasyonlarda çalışılabilen en uygun ve seri yöntem olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmalarda başlangıç suşundan elde edilen B<sub>12</sub> vitamini miktarı 3.74 mg/l dir.

## SUMMARY

Obtaining vitamin B<sub>12</sub> through a fermentation process.

B — Methods of determining vitamin B<sub>12</sub> activity. Two methods were tried to determine the activity of vitamin B<sub>12</sub>.

1 — Microbiological methods.

- a) The disc method,
- b) The turbidimetric method.

2 — The spectrophotometric method.

In the disc method, the study was carried out with the strain *Lactobacillus leichmanii* ATCC 4796 at concentrations of 10-100 µg/cm<sup>2</sup>. In the turbidimetric method, the strain *Lactobacillus leichmanii* 7830 was used at concentrations of 0.01-50 µg/cm<sup>2</sup>. The spectrophotometric method was found to be the fastest and the most suitable method to use when working with different concentrations.

In these studies, the amount of vitamin B<sub>12</sub> obtained from the initial strain is 3.74 mg/l.

İnsanlarda pernisiyöz anemiyi kontrol eden ve hayvan protein faktörü olarak da kabul edilen B<sub>12</sub> vitamini ilk defa 1948 yılında İngiltere'de Smith ve arkadaşları (9), Amerika'da Rickes ve arkadaşları tarafından karaciğer ekstrelerinden kristal halinde elde edilmiştir. 1948 yılında ise Rickes ve arkadaşları (6) *Streptomyces roseochromogenus* ve *Streptomyces antibioticus* kültürlerinden de B<sub>12</sub> vitamini elde etmişlerdir. Ayrıca fermentasyon sıvısında bulunan B<sub>12</sub> vi-

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Tropikal Hastalıkları ve Parazitoloji Kürsüsü  
Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

tamini aktivitesini Shorp'un (7, 8), mikrobiyolojik yöntemini uygulayarak, *Lactobacillus lactis* bakterisinin üremesini kontrol etmek suretiyle tayin etmişlerdir.

Her yaşta insanların belirli günlük B<sub>12</sub> vitamini ihtiyaçları 1968 yılında "National Academy of Sciences National Research Council'in" tesbit ettiği gibi Tablo 1'de gösterilmiştir (11). Genel olarak günlük B<sub>12</sub> vitamini ihtiyacı 2-5 µg'dır. Fakat saptanmasında genel bir ilke yoktur. B<sub>12</sub> vitamini en fazla et, karaciğer, yumurta, daha az olarak da süt ve peynirde bulunur. Pernisiyöz anemide kandaki B<sub>12</sub> vitamini düzeyi çok düşüktür. Pernisiyöz anemili hastaların dışkıları B<sub>12</sub> vitamini bakımından zengindir, yani bu hastalıkta intrinsek faktör eksikliği nedeniyle B<sub>12</sub> vitamini emilmesinde bir bozukluk vardır (1). İnsan intrinsek faktörü molekül ağırlığı 50.000 civarında olan bir mükoproteindir ve bir molekül B<sub>12</sub> vitaminini kendisine bağlar (4, 11).

## GEREÇ VE YÖNTEM

B<sub>12</sub> vitamininin aktivitesini saptama yöntemleri :

Çalışmalarımızda standart olarak kullanılan B<sub>12</sub> vitamini (B.P. USP Glaxo Laboratories Lt. Goenfort) İngiltere'den sağlanmıştır. Aktivite tayini için mikrobiyolojik ve spektrofotometrik yöntemler kullanılmıştır.

### 1 — Mikrobiyolojik yöntemler :

#### a) Disk yöntemi (3).

*Lactobacillus leichmanii* 4797 (ATCC) liyofilize suşu Difco-Bacto mikrodenej jelozunda üretilmiştir.

Difco mikrodenej jelozu :

Proteaz pepton (No: 3 Difco) ...	5 gr/1
Bacto maya özeti .....	20 gr/1
Bactro dekstroz .....	10 gr/1
Monopotasyum fosfat .....	2 gr/1
Sorbitan monooleat kompleks ...	0.1 gr/1
Bacto agar .....	10 gr/1

Besiyerinin pH'ı 6,7 dir.

*Lactobacillus leichmanii* 4797 liyofilize suşu yukarıdaki besiyerini içeren Petri kutularına ekilmiş, 37°C de 24 saatlik inkübasyonu takiben, üreyen bakterilerden yüksek jelozlara batırma kültür şeklinde saf kültür alınmıştır. Bu batırma kültürlerde bakteriler 15 gün süre ile canlılıklarını koruduklarından stok kültürlerden bakterinin Bacto B<sub>12</sub> inokulum buyyon USP besiyerine pasajı yapılmıştır.

Bacto B<sub>12</sub> inokulum buyyon besiyeri :

Domates suyu .....	100 cm <sup>3</sup> /1
Proteaz pepton (no: 3 Difco) ...	7.5 gr/1
Bacto maya özeti .....	7.5 gr/1
Bacto dekstroz .....	10 gr/1
Sorbitan monooleat kompleks ...	0.1 gr/1
Monopotasyum fosfat .....	2 gr/1

Besiyerinin pH'ı 6,8 dir.

Bu besiyeri onar cm<sup>3</sup> olarak tüplere bölünmüş ve otoklavda 120°C de 15 dakika steril edilmiştir. *Lactobacillus leichmanii* 4797 suşu Petri kutularından bu tüplere ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra bakteriler deney için hazırlanmıştır. Bunun için bakteriler santrifüjde çevrilerek ayrılmış, tekrar 10 cm<sup>3</sup> % 0.85 lik steril tuzlu su ile süspanse edilerek yıkanmıştır. Bu işlem üç kez tekrarlandıktan sonra, bakteriler 10 cm<sup>3</sup> tuzlu suda bırakılmıştır.

Deney besiyeri olarak Bacto CS B<sub>12</sub> vitamini besiyeri kullanılmıştır. 90 gram besiyeri 1000 cm<sup>3</sup> damıtık suda süspanse edilmiştir. Otoklavda 120°C de 15 dakika steril edilen besiyeri 25 cm<sup>3</sup> lük tüplere bölünmüş ve *Lactobacillus leichmanii* 4797 süspanسیونundan 10 cm<sup>3</sup> besiyerinde 0,1 cm<sup>3</sup> bakteri olacak şekilde karıştırılarak Petri kutularına dökülmüş ve Petri kutuları soğuduktan sonra 37°C lik etüvde kurutulmuştur. Hazırlanan Petri kutularına uygulamak için stok B<sub>12</sub> vitamin çözeltisinden son konsantrasyonu cm<sup>3</sup> de 100-90-80-70-60-50-40-30-20-10-7.5-5-3-2-1-0.5 µg olacak şekilde sulandırılmalar yapılmıştır. Test besiyeri içeren Petri kutularına 5.5 mm çapında steril filtre kağıdı disklerinden

Tablo 1 — National Academy of Sciences-National Research Council'in 1968 yılında tebliğ ettiği insana göre insanın günlük B<sub>12</sub> vitamini ihtiyacı.

Yaş	mg olarak günlük B <sub>12</sub> vitamini ihtiyacı	Yaş	mg olarak günlük B <sub>12</sub> vitamini ihtiyacı	Yaş	mg olarak günlük B <sub>12</sub> vitamini ihtiyacı	Yaş	mg olarak günlük B <sub>12</sub> vitamini ihtiyacı
0-1/6	1	1-2	2	10-12	5	10-12	5
1/6-1/2	1.5	2-3	2.5	12-14	5	12-14	5
1/2-1	2	3-4	3	14-16	5	14-15	5
		4-6	4	18-22	5	18-55	5
		6-8	4	22-35	5	55-75	6
		8-10	5	35-55	5	Gebelikte	8
				55-75	6	Emzirmede	6

dörder adet konmuştur. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki B<sub>12</sub> vitamini çözeltilerinden diskler üzerine 0.1 cm<sup>3</sup> damlatılmıştır. 37° lik etüvde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucu meydana gelen zonlar kompasla ölçülmüştür. Elde edilen sonuçların doğruluğunu kontrol amacıyla deney üç kez tekrarlanmıştır.

b) Türbidimetrik yöntem :

Türbidimetrik yöntemde *Lactobacillus leichmanii* 7830 suşu ile çalışılmıştır. Bakteri mikrodenej jelozu içeren Petri kutularına yayılmış ve 37° lik etüvde 24 saatlik inkübasyon sonucu yüksek jeloza batırma kültürü yapılmıştır. Deney yapılacağı zaman bakterinin test besiyeri olan Bacto B<sub>12</sub> inokulum buyyon besiyerine pasajı yapılmıştır. 85 gr Difco Bacto B<sub>12</sub> vitamini deney besiyeri bir litre damıtık suda sıcak su banyosunda eritilmiştir. B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonları yine stok çözeltiden hazırlanmıştır. Her konsantrasyon için üç deney tüpü kullanılmış ve 0.01 µg/cm<sup>3</sup> ile 50 µg/cm<sup>3</sup> arasındaki konsantrasyonlarla çalışılmıştır. Deney tüpüne 5 cm<sup>3</sup> besiyeri, 5 cm<sup>3</sup> damıtık su ve istenilen konsantrasyonda standart B<sub>12</sub> vitamini konularak tüpler hazırlanmıştır. Her deneyde ayrı ayrı damıtık su, besiyeri ve B<sub>12</sub> vitamini bulunan bir besiyeri kontrol tüpü, bir de yine damıtık su ve besiyeri bulunan bakteri kontrol tüpü mevcuttur. Bu tüpler 120°C de 5 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan tüplerdeki besiyerinin rengi kırmızıdan sarıya doğru dönüşmüştür. Tüpler soğuduktan sonra önce hazırlanmış olan *Lactobacillus leichmanii* 7830 süspansiyonundan her tüpe 0.1 cm<sup>3</sup> ekilmiştir. Tüpler 37°C de 24 saatlik inkübasyonu takiben üremeler Unicam 500 spektrofotometrede 650 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her konsantrasyon için üç ölçüm yapılmış ve ortalaması alınmıştır.

2 — Spektrofotometrik yöntem :

B<sub>12</sub> vitamininin sudaki çözeltilisinin konsantrasyonu ışık absorpsiyonu ile ta-

min edilebilir. Yöntem siyanokobalamindeki siyanür grubunun ışığı absorpsiyonuna dayanır (2, 5).

Daha önce hazırlanan stok çözeltiden 100-70-50-30-10 µg/cm<sup>3</sup> olacak şekilde çeşitli konsantrasyonlardaki standart B<sub>12</sub> vitamini çözeltilerinin absorpsiyonları referans olarak alınan damıtık suya karşı 250-650 nm dalga boyları arasında taranmış ve maksimum absorpsiyon noktaları işaretlenmiştir.

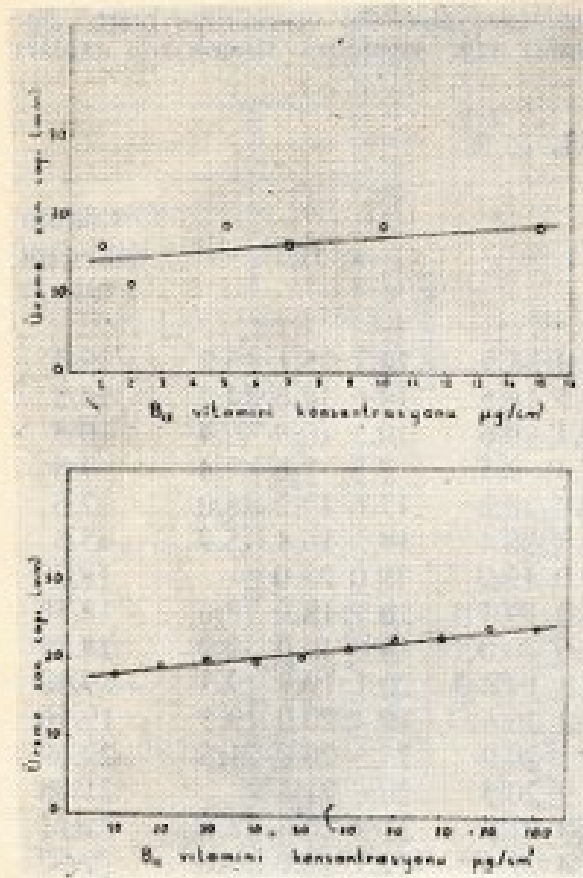
Değişik konsantrasyonlardaki B<sub>12</sub> vitamininin maksimum absorpsiyon verdiği dalga boylarındaki absorpsiyon değerleri arasındaki ilgi belirlenerek grafik çizilmiştir.

## BULGULAR

1 — Disk yöntemi ile aktivite tayininde kullanılan *Lactobacillus leichmanii* 4797 suşunun B<sub>12</sub> vitaminine bağlı olarak değişen üreme zonları vermesi Şekil 1-2 de gösterilmiştir. Deneyler standart ile paralel olarak üç kez yapılmıştır. 0.5 µg/cm<sup>3</sup> ile 100 µg/cm<sup>3</sup> arasında 17 değişik konsantrasyon denenmiştir.

0.5 µg/cm<sup>3</sup> lük B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonu için üç seri deneyin ortalaması zon çapı 15.0 mm olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon 3 µg/cm<sup>3</sup> e çıkarıldığında ortalama zon çapında küçülme olmuş ve 7.5 mm ye düşmüştür. Bundan sonraki konsantrasyonlarda ise B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonları ile ortalama zon çapları arasında lineer bir artış kaydedilmiştir. Örneğin, 10 µg/cm<sup>3</sup> için 18.29 mm, 50 µg/cm<sup>3</sup> için 20.69 mm. 100 µg/cm<sup>3</sup> için 24.41 mm zon çapları bulunmuştur. Bu değerleri grafikte göstermek için de apsise B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonlarını µg/cm<sup>3</sup> olarak, ordinata ortalama zon çapları yerleştirilmiş ve lineer bir doğru elde edilmiştir.

Şekil 1 de B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonları 10 µg/cm<sup>3</sup> e kadar gösterilmiş Şekil 2 de ise 10-100 µg/cm<sup>3</sup> arasındaki konsantrasyonlar için grafik çizilmiştir (Şekil 1-2, Tablo 2).



Şekil 1 : Çeşitli konsantrasyonlardaki B<sub>12</sub> vitaminine bağlı olarak üreyen *Lactobacillus leichmanii* 4797 suşunun üreme grafiği (1 µg/cm<sup>3</sup> ile 10 µg/cm<sup>3</sup> arasında)

Şekil 2 : Çeşitli konsantrasyonlardaki B<sub>12</sub> vitaminine bağlı olarak üreyen *Lactobacillus leichmanii* 4797 suşunun üreme grafiği (10 µg/cm<sup>3</sup> ile 100 µg/cm<sup>3</sup> arasında)

2 — Türbidimetrik yöntemde *Lactobacillus leichmanii* 7830 suşu ile çalışılmıştır. B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonları yine stok çözeltiden hazırlanmıştır. 0.01 µg/cm<sup>3</sup> ile 50 µg/cm<sup>3</sup> arasındaki konsantrasyonlarla çalışılmış ve her konsantrasyon için üç deney tüpü kullanılmıştır. Her deneyde ayrı ayrı damıtık su, besiyeri ve B<sub>12</sub> vitamini bulunan bir besiyeri kontrol tüpü mevcuttur. Gereç ve yöntem kısmında belirtildiği gibi hazırlanan bu tüplere, *Lactobacillus leichma-*

*nii* 7830 süspansiyonundan 0.1 cm<sup>3</sup> ekilmiştir. Tüpler 37°C de 24 saatlik inkübasyonu takiben üremeler spektrofotometrede 650 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bu ölçmeler sonucunda 0.01 µg/cm<sup>3</sup> B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonu için ortalama değer 0.004, 0.2 µg/cm<sup>3</sup> için 0.028, 0.5 µg/cm<sup>3</sup> için 0.037, 1.0 µg/cm<sup>3</sup> için 0.046, 10 µg/cm<sup>3</sup> için 0.325, 50 µg/cm<sup>3</sup> için de 0.498 bulunmuştur. Bu sonuçları kullanarak ordinata 650 nm de absorpsiyonu, apsise ise µg/cm<sup>3</sup> olarak B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonunu yerleştirerek grafik çizilmiştir. Şekil 3 de B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonu 0.01 ile 1 µg/cm<sup>3</sup> arasında, Şekil 4 de ise B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonu 1 ile 50 µg/cm<sup>3</sup> arasında gösterilmiştir. Grafikten de izleneceği gibi B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonu ile 650 nm de ölçülen absorpsiyonlar arasındaki değişim lineer bir doğru vermektedir. Ancak bu lineer değişim Şekil 3 de 0.05 ile 0.2 µg/cm<sup>3</sup> arasında, Şekil 4 de ise 8-10 µg/cm<sup>3</sup> arasında sapma göstermektedir. Spektrofotometrik ölçmeler sırasında bu durum gözönüne alınarak B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonu belirlenmiştir (Şekil 3-4, Tablo 3).

3 — Spektrofotometrik yöntemde B<sub>12</sub> vitamininin sudaki çözeltisinin konsantrasyonu ışık absorpsiyonu ile tayin edilebilir. Bunun için 100-70-50-30-10 µg/cm<sup>3</sup> olacak şekilde çeşitli konsantrasyonlardaki standart B<sub>12</sub> vitamini çözeltilerinin absorpsiyonları referans olarak alınan damıtık suya karşı 250-650 nm dalga boyları arasında taranmış, spektrofotometrenin kaydedicisinde elde olunan grafik Şekil 5 de gösterilmiştir.

Bu grafikte yaptığımız inceleme sonucunda maksimum absorpsiyon noktaları işaretlenmiştir. Bu pikler 278, 362 ve 548 nm dalga boylarında elde edilmiştir. Bu grafikten elde edilen değerler tablo haline getirilmiştir. Örneğin 10 µg/cm<sup>3</sup> B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonu için elde edilen maksimum pikler için, 278 nm dalga boyunda absorpsiyon 0.20,

Tablo 2 — 0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  ile 100  $\text{g}/\text{cm}^3$  konsantrasyondaki  $\text{B}_{12}$  vitaminine bağı olarak üreyen *Lactobacillus leichmanii* 4797 suşunun üreme zon çapları (—) : Zonun oluşmadığı deneyler.

## D E N E Y L E R

$\text{B}_{12}$ vitamini konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )	I			II			III			Ortalama zon çapı (mm)
0.5	14.8	14.9	15.3	14.1	15.0	14.9	14.7	15.1	15.2	15.0
1	14.2	14.6	14.7	14.4	14.6	14.5	14.6	14.6	14.3	14.5
2	10.2	10.6	10.7	10.5	10.4	10.6	10.3	10.8	10.4	10.5
3	7.8	7.2	7.5	7.6	7.4	7.5	7.5	7.6	7.4	7.5
5	16.7	16.9	18.1	17.6	17.8	18.2	17.6	17.2	18.0	17.5
7.5	15.2	15.0	15.0	15.7	15.8	16.4	14.3	16.4	15.9	15.5
10	16.5	15.0	12.8	22.0	19.0	19.0	19.0	21.0	—	18.29
15	17.6	18.0	18.3	17.9	19.0	19.3	18.7	18.9	18.6	18.50
20	16.0	18.9	19.2	19.0	19.0	20.0	19.0	19.0	19.0	18.79
30	17.6	19.9	20.2	19.0	19.8	19.8	20.1	19.7	19.5	19.50
40	21.9	19.0	19.5	20.7	19.2	20.6	19.4	20.0	19.3	19.96
50	19.0	21.1	21.1	18.5	21.5	20.0	23.5	20.0	21.5	20.69
60	20.0	21.0	21.0	21.8	21.9	20.5	20.6	21.8	—	21.08
70	21.7	22.5	21.9	22.4	22.0	22.8	21.9	20.8	22.0	22.11
80	23.0	23.0	22.5	23.0	23.4	22.9	22.1	23.0	23.0	22.97
90	23.0	23.2	23.1	24.7	23.0	24.0	22.3	—	—	23.33
100	23.9	24.0	23.8	22.1	25.1	24.0	24.0	25.0	26.0	24.21

362 nm de ise 0.029 bulunmuştur. Aynı şekilde 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$   $\text{B}_{12}$  vitamini konsantrasyonu için 278 nm de 0.30, 362 nm de 0.458, 548 nm de 0.145 ve 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$   $\text{B}_{12}$  vitamini konsantrasyonu için 278 nm de 0.230 değerleri bulunmuştur. Bu değerler grafiğin maksimum pik yaptığı noktalardan koordinat eksenlerine yapılan interpolasyonla tesbit edilmiştir.

Tablo 4'deki bu değerler gözönüne alınarak ve ordinat eksenine 278 ve 548 nm de absorpsiyonlar, apsise ise  $\text{B}_{12}$  vitamininin konsantrasyonları işaretlenerek çizilen grafiği Şekil 6'da izleyebiliriz. Bu grafikte kesikli çizgi 548 nm dalga boyunda  $\text{B}_{12}$  vitamini absorpsiyonunu, düz çizgi ise 278 nm dalga boyunda  $\text{B}_{12}$  vitamini absorpsiyonunu göstermektedir. Aynı şekilde 362 nm dalga boyunda çizilen grafik ise Şekil 7'de

gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçlardan çeşitli  $\text{B}_{12}$  vitamini konsantrasyonlarında 362 nm dalga boyunda diğer dalga boylarına nazaran daha fazla absorpsiyon yaptığı belirlenmiştir. (Şekil 5-6-7, Tablo 4).

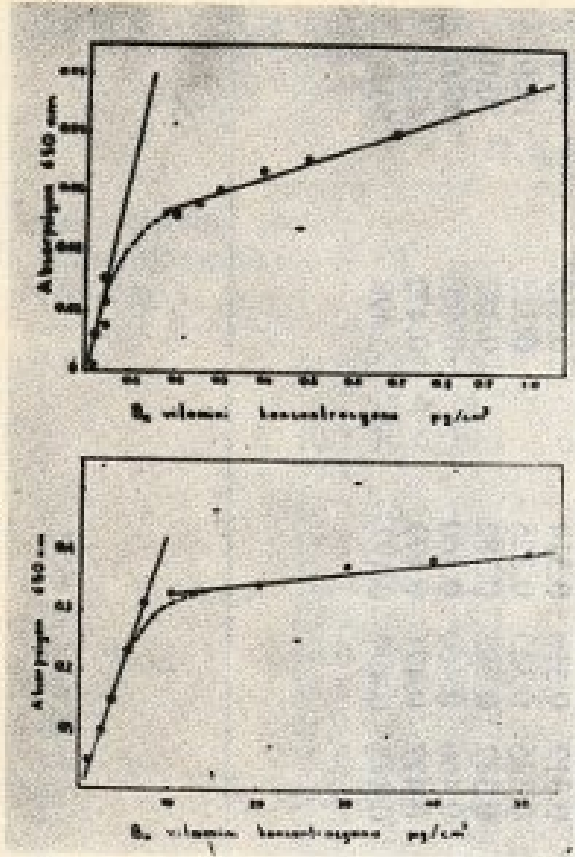
## TARTIŞMA

Son zamanlarda  $\text{B}_{12}$  vitamininin fazla miktarda ve yüksek saflık derecesinde elde edilmesi ile birlikte  $^{60}\text{Co}$  ile işaretlenmiş radyoaktif siyanokobalamin kullanılarak "izotop dilüsyon tayin yöntemi" geliştirilmiştir. Bu yöntem  $\text{B}_{12}$  vitamininin fermentasyon üst sıvısında kantitatif ölçülmesini sağlar. Yöntemin esası bir miktar işaretlenmiş  $\text{B}_{12}$  vitaminini saf olarak elde ederek radyoaktivitesini ölçmek ve saf  $\text{B}_{12}$  vitamini miktarını

Tablo 3 — 0.01 µg/cm<sup>3</sup> ile 50 µg/cm<sup>3</sup> arasındaki B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonlarına bağlı olarak *Lactobacillus leichmannii* 7830 sügunun üremesinin spektrofotometrede 650 nm dalga boyundaki değerleri.

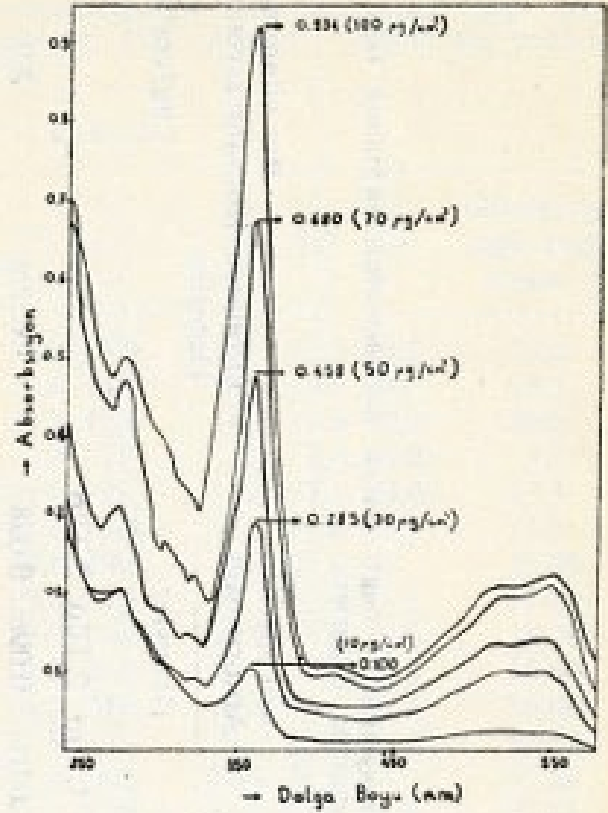
650 nm'de Absorpsiyon			B <sub>12</sub> vitamini Konsantrasyonu (µg/cm <sup>3</sup> )			650 nm'de Absorpsiyon			B <sub>12</sub> vitamini Konsantrasyonu (µg/cm <sup>3</sup> )		
Deneyle			Ortalama Değerler			Deneyle			Ortalama Değerler		
1. Tüp	2. Tüp	3. Tüp	1. Tüp	2. Tüp	3. Tüp	1. Tüp	2. Tüp	3. Tüp	1. Tüp	2. Tüp	3. Tüp
0.004	0.004	0.004	0.004	0.01	0.01	0.01	0.096	0.098	0.098	0.098	2.0
0.006	0.006	0.006	0.006	0.02	0.02	0.196	0.196	0.196	0.196	0.196	4.0
0.008	0.008	0.008	0.008	0.04	0.04	0.283	0.283	0.283	0.283	0.283	6.0
0.0135	0.0135	0.0135	0.0135	0.05	0.05	0.312	0.310	0.314	0.312	0.312	8.0
0.018	0.018	0.018	0.018	0.08	0.08	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	10.0
0.028	0.028	0.028	0.028	0.2	0.2	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	20.0
0.030	0.031	0.029	0.030	0.25	0.25	0.460	0.460	0.460	0.460	0.460	30.0
0.033	0.032	0.032	0.032	0.3	0.3	0.472	0.471	0.473	0.472	0.472	40.0
0.034	0.036	0.035	0.035	0.4	0.4	0.498	0.499	0.497	0.498	0.498	50.0
0.037	0.037	0.037	0.037	0.5	0.5						
0.039	0.038	0.040	0.039	0.7	0.7						
0.046	0.044	0.048	0.046	1.0	1.0						





Şekil 3 : 0.01  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  ile 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  arasındaki  $\text{B}_{12}$  vitamini konsantrasyonlarında *Lactobacillus leichmanii* 7830 suşunun spektrofotometrede 650 nm dalga boyundaki değerleri.

Şekil 4 : 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  ile 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  arasındaki  $\text{B}_{12}$  vitamini konsantrasyonlarında *Lactobacillus leichmanii* 7830 suşunun spektrofotometrede 650 nm dalga boyundaki değerleri.

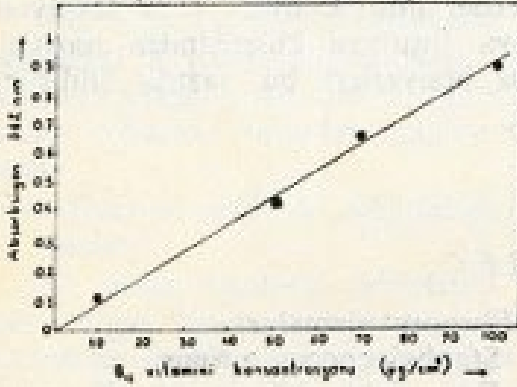
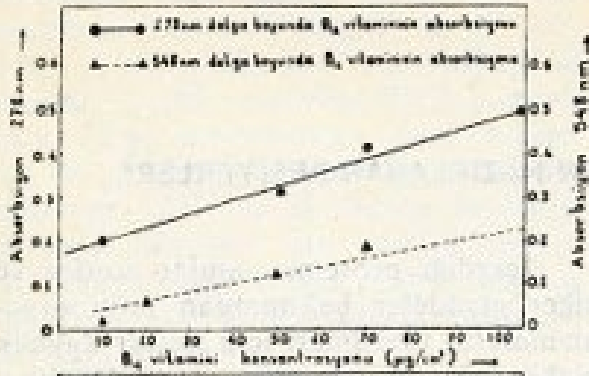


Şekil 5 : Çeşitli konsantrasyonlarda  $\text{B}_{12}$  vitamini çözeltilerinin değişik dalga boylarında verdikleri absorpsiyon pikleri.

spektrofotometrik olarak tayin etmektedir. Orijinal fermentasyon besiyerindeki  $\text{B}_{12}$  vitamini miktarı son saflaştırılmış çözeltideki toplam siyanokobalamin miktarının aynı çözeltideki radyoaktivitenin

Tablo 4 — 278, 362 ve 548 nm dalga boylarında çeşitli  $\text{B}_{12}$  vitamini konsantrasyonlarının verdiği değerler.

$\text{B}_{12}$ vitamini konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )	Dalga Boyu		
	278 nm	362 nm	548 nm
10	0.20	0.100	0.029
20	0.25	0.285	0.089
50	0.30	0.458	0.145
70	0.46	0.680	0.210
100	0.50	0.934	0.230



Şekil 6 : 278 ve 548 nm'de B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonlarının spektrofotometrik değerleri.

Şekil 7 : 362 nm'de B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonlarının spektrofotometrik değerleri.

orijinal fermentasyon üst sıvısındaki radyoaktiviteye oranı ile spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Bu yöntemde hem işaretli, hem de işaretli olmayan maddeler beraber saflaştırıldığı dilüsyon yönteminin elverişsiz yönleri, maddeyi tamamiyle saflaştırma yönünden fazla zaman alması ve radyoaktif siyanokobalaminin kendi radyolizi sonucu meydana gelecek diğer işaretli maddelerden tamamiyle arındırılmasının gerekmesidir (10).

Çalışmamızda izotop dilüsyon yöntemi haricinde diğer yöntemler kullanılmıştır. Bunlar disk, türbidimetrik ve spektrofotometrik yöntemlerdir. Disk yöntemi ile B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonunun ölçülmesinde 10-100 µg/cm<sup>2</sup> arasındaki konsantrasyonlarda çalışılmıştır.

Türbidimetrik yöntem, disk yöntemine göre daha düşük konsantrasyonlarda

B<sub>12</sub> vitamini konsantrasyonunun aktivitesini tayin için uygundur. Spektrofotometrik yöntemin ise çeşitli konsantrasyonlarda uygulanabilmesi, doğru ve çabuk sonuç vermesi nedeniyle en uygun yöntem olduğu saptanmıştır. Bu yöntemlerle çalışma sırasında daha kesin sonuçlar alabilmek için B<sub>12</sub> vitamini çözeltisinin saf olması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1 — Aksoy M : *Megaloblastik Anemiler*, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Ders Kitapları Cilt 2 Kan Hastalıkları, Sermet Matbaası İstanbul (1947).
- 2 — Boxer EG, Richard CJ : Chemical determination of vitamin B<sub>12</sub>. The quantitative and colorimetric determination of millimicrogram quantities of cyanide, *Arch Biochem Biophys* 30 : 372 (1951).
- 3 — Difco Laboratories : *Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagent for Microbiological Laboratory Procedures* 9 th Ed Detroit Michigan (1958).
- 4 — Hagedorn CH, Alpers DH : Distribution of intrinsic factor vitamin B<sub>12</sub> receptor in human intestine, *Gastroenterology* 73 : 1019 (1977).
- 5 — Green M, Tauscher G : The temperature dependence of the visible ultraviolet spectra of some cobalt, vitamin B<sub>12</sub> model compounds, *Biochim Biophys Acta* 538 : 635 (1978).
- 6 — Rickes EL, Brink NG, Konlvszy R E, Wood TR, Folgers K : Comparative data on vitamin B<sub>12</sub> from a new source *Streptomyces griseus*, *Science* 108 : 634 (1948).
- 7 — Shorp MS : Unidentified growth factors for *Lactobacillus lactis* in regained «Liver Extracts», *J Biol Chem* 169 : 455 (1947).
- 8 — Shorp MS : Activity of vitamin B<sub>12</sub> for the growth of *Lactobacillus lactis*, *Science* 107 : 397 (1948).
- 9 — Smith EL, Parker LJ : Some properties of crystalline antipernicious anemia factor, *Biochem J* 43 : 8 (1948).
- 10 — Smith EL : *Lancet* 387 : 21 (1959).
- 11 — White A, Handle P, Smith EL : *Principles of Biochemistry*, 5 th Ed, Mc Graw-Hill Book Comp, Kogakusha Ltd Tokyo (1973).

## SOYA FASULYESİ VE KÜSPESİNDEN HAZIRLANAN BESİYERLERİ

Enver Tali ÇETİN

Neriman BÜGET

Gülten ÖTÜK

Mikroorganizmaların bir besiyerinde üremesi, üreme için gerekli maddelerin bulunmasına, oksijen durumuna neme ve ısıya bağlıdır. İyi hazırlanmış bir besiyeri karbon ve azot kaynaklarını inorganik tuzları ve bazı durumlarda vitaminleri veya diğer üreme faktörlerini içermelidir.

Soya fasulyesi, yapısında çok çeşitli maddeler içeren bir bitkidir. İçerdiği maddelerin miktarı yetiştirme koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Soya fasulyesi proteince oldukça zengin bir bitkidir. Protein miktarı % 45 oranındadır (20). Yapısında sistin (12, 13, 23), triptofan (13, 23), metiyonin (2, 13, 23), arginin (2), histidin (2, 13), lizin (2, 13), treonin (2, 13), alanin (2, 13), tirozin (2, 13), valin (2, 13), isolösin (13), fenilalanin (2, 13), lösin (2, 13), sistein (10) gibi amino asitlerin, vitamin A (11) ve vitamin B<sub>12</sub> nin (21), mangan (19), fosfat, klorür, kükürt, demir, bakır (13) gibi inorganik maddelerin, fitosterolün (22), yağ asitlerinin (4, 14), enzimlerin ve karbonhidratların (17) bulunduğu bildirilmiştir.

Soya fasulyesi insan ve hayvan besini olarak kullanılmakta, soyadan un, çörek, süt, peynir, yağ, sos gibi besin maddeleri hazırlanmaktadır (1, 8, 16, 22, 26). Ayrıca soya proteininin kâğıt sanayiinde kullanılması için çalışmalar yapılmaktadır (9).

İçerdiği protein, amino asitler ve diğer maddeler bakımından mikroorganizmaların üretilmesi için iyi bir kaynak olabileceği düşüncesiyle soya fasulyesi ve soya fasulyesi küspesinden hazırladığımız besiyerleri bu yazıda bildirilecektir.

### GEREÇ :

Mikroorganizmalar

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Haemophilus parahaemolyticus

$\alpha$  hemolitik streptokok

Gram pozitif çomak

Besiyerlerinin hazırlanmasında Sümerbank Ordu Soya Sanayiinden sağlanan soya fasulyesi ve küspesi kullanılmıştır.

Un haline getirilen soya fasulyesi ve soya fasulyesi küspesi pankreatin ile hazmettirilerek ve damıtık suda infüzyon yapılarak iki türlü besiyeri hazırlanmıştır.

*1 — Hazmedilerek hazırlanan besiyerleri.*

a) Soya fasulyesinin hazmedilmesiyle hazırlanan besiyeri : Bunun için 200 gr soya fasulyesi iki litrelik bir şişeye konmuş, üzerine 1 litre damıtık su, 13,3 cm<sup>3</sup> kloroform, 6,6 cm<sup>3</sup> toluol ve 33 mg pankreatin ilâve edilmiş, şişenin ağzı sıkıca kapatılmış ve 37°C de bir hafta hazmolmaya bırakılmıştır (15). Şişenin ağzı açıldıktan sonra su banyosunda 10 dakika kaynatılmış, sıcakken önce

tülbentten sonra süzgeç kâğıdından süzölmüştür. Süzüntü damıtık su ile 1/5, 1/10, 1/20 oranlarında seyreltilmiş ve bunlara % 0.85 oranında NaCl konmuş pH sı 7,2 ye ayarlanmış, katı besiyeri için % 1,5 oranında agar ilâve edilmiş, otoklavda 120°C de 20 dakika bekletilerek steril edilmiştir. Sıvı ve katı besiyerleri tüplere dağıtıldıktan sonra tüplerde otoklavda 120° de 20 dakika bekletilerek steril edilmiştir.

b) Soya fasulyesi küspesinin hazmedilmesi ile hazırlanan besiyeri : Soya fasulyesi küspesinden 200 gr alınmış, işlemler yukarıda anlatılan şekilde yapılmıştır.

## 2 — Infüzyon şeklinde hazırlanan besiyerleri.

a) Soya fasulyesi infüzyonu besiyeri : Soya fasulyesi havanda ezilerek toz haline getirilmiş, bundan 200 gr tartılarak iki litrelik bir balona konmuş, üzerine bir litre damıtık su ilave edilmiş bir saat Koch kazanında bekletilmiş, önce gazlı bezden daha sonra süzgeç kâğıdından berraklaşınca kadar süzölmüştür. Bu süzüntü damıtık su ile 1/5, 1/10, 1/20 oranlarında seyreltilmiş, her seyreltmenin pH sı 7,2 ye ayarlanmıştır. Seyreltmelerin herbirine % 0.85 oranında NaCl ilave edilmiş, katı besiyeri için % 1,5 oranında agar katılmış, otoklavda 120°C de 20 dakika bekletilerek steril edilmiştir. Besiyerleri tüplere dağıtıldıktan sonra da otoklavda 120°C de 20 dakika bekletilerek steril edilmiştir.

b) Soya fasulyesi küspesi infüzyonu besiyeri : Soya fasulyesi küspesi infüzyonu 2 - a kısmında belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Yukarıda belirtilen şekilde soya fasulyesi ve soya fasulyesi küspesinin hazmedilmesi ve infüzyonu ile hazırlanan besiyerlerinden Petri kutularına dökülmüştür. *Haemophilus parahaemolyticus* için, X ve V faktörleri hazırlanan besiyerlerine 20 cm<sup>3</sup> için 0,5 er cm<sup>3</sup> ilave

edilmiştir. Besiyerlerinin yüzeyi kurutulduktan sonra bunlara *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Gram pozitif çomak şeklinde bakteri, *Haemophilus parahaemolyticus*, α hemolitik streptokok suşlarının 24 saatlik kültürlerinden ekim yapılmıştır. Ekim yapılmış Petri kutuları 37° lik etüvde bir gece bekletildikten sonra incelenmiştir.

Kontrol olarak *S.aureus*, *E.coli* suşlarından jeloz, Gram pozitif çomak, α hemolitik streptokok suşlarından Levinthal, *H.parahaemolyticus* suşundan tavşan kanlı jeloz besiyerlerine ekim yapılmıştır.

Soya fasulyesi ve küspesinin infüzyonundan hazırlanan ve 1/5 oranında seyreltilen besiyerlerinde *S.aureus*, *E.coli* ve Gram pozitif çomak iyi üremişler, α hemolitik streptokok ve *H. parahaemolyticus* orta üreme göstermişlerdir. Bu besiyerlerinin 1/10 oranında seyreltilenlerinde *S.aureus*, *E.coli* ve Gram pozitif çomak orta derecede, diğerleri zayıf şekilde üremişlerdir. Aynı besiyerlerinin 1/20 oranında seyreltilenlerinde α hemolitik streptokok ve *H. parahaemolyticus* ürememiş, diğerlerinin üremesi de daha az olmuştur (Tablo 1).

Soya fasulyesinin hazmedilmesi ile hazırlanan ve 1/5 oranında seyreltilen besiyerinde *S.aureus*, *E.coli* ve *H.parahaemolyticus*, çok iyi, α hemolitik streptokok ve Gram pozitif çomak iyi üremişlerdir. Bu besiyerinin 1/10 oranında seyreltilerinde α hemolitik streptokok ve Gram pozitif çomak orta, diğerleri iyi üremişlerdir. Aynı besiyerinin 1/20 seyreltilenlerinde α hemolitik streptokok ve *H.parahaemolyticus* ürememiş, diğerleri orta derecede üremiştir.

Soya fasulyesi küspesinin hazmedilmesi ile hazırlanan ve 1/5 oranında seyreltilen besiyerinde bütün bakteriler çok iyi üremişler, 1/10 oranında seyreltilen besiyerinde bütün bakteriler iyi bir üre-

Bakteriler	İnfüzyon			Hazmedilmiş			Kontrol
	1/5	1/10	1/20	1/5	1/10	1/20	
<i>S.aureus</i>	++	+	±	+++	++	+	+++
$\alpha$ hemolitik streptokok	+	±	—	++	+	—	++
<i>H.parahaemolyticus</i>	+	±	—	+++	++	—	+++
<i>E.coli</i>	++	+	+	+++	++	+	+++
Gram pozitif çomak	++	+	+	++	+	+	+

Tablo 1.: Soya fasulyesinden hazırlanan besiyerlerinde denenen bakterilerin üreme durumu

+++ : Çok iyi üreme

++ : İyi üreme

+ : Orta üreme (koloniler daha küçük ve sayısı az)

± : Zayıf üreme (çok küçük ve az sayıda koloni)

— : Üreme yok

me göstermişlerdir. Aynı besiyerinin 1/20 oranında seyreltilerinde  $\alpha$  hemolitik streptokok ve *H.parahaemolyticus*

ürememiş, diğerleri orta derecede üremişlerdir (Tablo 2).

Bakteriler	İnfüzyon			Hazmedilmiş			Kontrol
	1/5	1/10	1/20	1/5	1/10	1/20	
<i>S.aureus</i>	++	+	±	+++	++	+	+++
$\alpha$ hemolitik streptokok	+	±	—	+++	++	+	++
<i>H.parahaemolyticus</i>	+	±	—	+++	++	+	+++
<i>E.coli</i>	++	+	±	+++	++	—	+++
Gram pozitif çomak	++	+	±	+++	++	—	+

Tablo 2.: Soya fasulyesinden hazırlanan besiyerlerinde denenen bakterilerin üreme durumu

+++ : Çok iyi üreme

++ : İyi üreme

+ : Orta üreme (koloniler daha küçük ve sayısı az)

± : Zayıf üreme (çok küçük ve az sayıda koloni)

— : Üreme yok

## TARTIŞMA

Mikrobiyolojide mikroorganizmaların üretilmesi için besiyerlerine azot kaynağı olarak ilâve edilen pepton, sığır eti, fibrin, kazein, jelatin ve soya fasulyesinden pepsin, pankreatin, papain gibi proteolitik enzimlerin etkisi ile elde edilmektedir (5).

Yurdumuzda kendi doğal ürünlerimizden yararlanmak suretiyle yeni besiyerleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Özek ve Şahin 1950 yılında pankreasla fibrini alınmış sığır kanını hazmettirerek bir besiyeri hazırlamışlardır (15). Braun ve Özek (3) ıspanaklı besiyerini denemişlerdir. Unat ve Çiçekdağ balık hidrolizi ile besiyeri hazırlamışlar (24) ve bu besiyerinin bakterilerin üretilmesi ve tanımı için iyi bir besiyeri olduğu bildirilmiştir (25).

Mikroorganizmaların üretilmesi için soya fasulyesinin ilk kez 1905 yılında Didlak-Marie tarafından kullanıldığı ve soya fasulyesinin infüzyonu ile besiyeri hazırlandığı Palavan tarafından 1944 yılında bildirilmiştir (18). Difco firması soya fasulyesinin enzimatik hidrolizi ile toz besiyeri hazırlamıştır (7).

Çetin ve arkadaşları (6) *Propionibacterium freundenreichii* suşu ile B<sub>12</sub> vitaminini fermentasyonla elde etmek için en iyi verimi soya fasulyesi küspesi ile hazırladıkları besiyerinden sağladıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda soya fasulyesi ve soya fasulyesi küspesinin hazmedilmesi ve infüzyonu sonucu hazırladığımız besiyerlerinde denediğimiz bakterilerin çoğunlukla üredikleri saptanmıştır (Tablo 1, 2). Bu üremelerin hazmedilmiş besiyerlerinde infüzyona nazaran daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Soya fasulyesinin infüzyonu sonucu hazırlanan besiyerlerine Palavan'ın (18) bildirdiklerinin dışında başka bir bilgiye

ve ayrıca soya fasulyesi küspesinden besiyeri hazırlandığına dair bir bilgiye rastlanmamıştır.

Soya fasulyesi küspesinin Kg'ı 9 TL dir. Bir kilo küspeden 25 litre beş defa seyreltilmiş ve çeşitli bakterilerin iyi bir şekilde ürediği besiyeri hazırlanmaktadır. Bir kilo etin 150 TL olduğu ve bundan ancak 2 litre besiyeri hazırlandığı hatırlanırsa, soya fasulyesi küspesi besiyerinin et gibi halkın en önemli besin maddelerinden hazırlanan besiyerlerinden çok daha ucuza elde edildiği anlaşılmaktadır. Soya küspesi besiyerinin özel besiyerleri hazırlanması için kullanılması hakkındaki çalışmalarımız devam etmektedir.

Soya fasulyesi ve küspesinin hazmettirilmesi için pankreatin kullanılmıştır. Pankreatin laboratuvar koşullarımızda kolay hazırlanan bir maddedir. Soya fasulyesi yurdumuzda yetişmektedir. Kürsümüzde üç yıl muhafaza edilmiş soya fasulyesi küspesinden besiyeri hazırlanmış ve besi değerinde azalma olmadığı görülmüştür.

Soya fasulyesi ve soya fasulyesi küspesinin mikroorganizmaların üretilmesi için besiyeri hazırlanmasında kullanılmasının, mikrobiyolojik çalışmalarımızı dışa bağımlılıktan kurtaracağı ve ülkemizin ekonomisine yararlı olacağı kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. Belen'kii D E, Popova, NN : Soy cheese, Russ 32 908 oct 31 1933; CA, 28 : 3808<sup>o</sup> (1934).
2. Belikov, I F, Nedel'ko E Ya : The amino acid content of the proteins of Amur varieties of soybeans, Izvest Sibir Otdel Nauk S S S R No 8 84 (1960); CA, 55 : 3868 g (1961).
3. Braun H, Özek Ö : Über den Spina-nachrboden von A. Besredka und E. Salamon, Ist Ser 224 : 129 (1942).
4. Collins F I, Sedwick V E : Fatty-acid composition of several varieties of soybeans, J Am Oil Chemists'Soc 36 : 641 (1959); CA, 54 : 2789 c (1960)

5. Çetin E T : Genel ve Pratik Mikrobiyoloji, 3. Baskı Sermet Matbaası İstanbul (1973).
6. Çetin E T, Gürler B, Badur S : B<sub>12</sub> vitamininin fermentasyonla elde edilmesi için uygun besiyerinin araştırılması, Kükem Derg 1 : 25 (1978).
7. Difco Manual of Dehydrated Cultures Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures, Ninth Ed Difco Laboratories U S A (1953).
8. Duchange G : Soybean meal, Fr 1 141 860 Sept 11 1957; C A, 55 : 5805 a (1961).
9. Gesin G : Casein in mixtures with a synthetic latex base for the manufacture of coated paper, Lait 40 : 627 (1960); C A, 55 : 9872 c (1961).
10. Gillberg L : A study of the nutritive value of soybean meal and soybean protein isolates, Nurt Rep Int, 16 : 603 (1977); C A, 88 : 21011 m (1978).
11. Ivanova N V : Food value of soybeans Vitamin A proteins and salt composition, Voprosul Pitaniya 4 : 135 (1935); C A, 30 : 3537<sup>a</sup> (1936).
12. Iwamura I : Determination of cystine in soy, Bull Agr Chem Soc Japan 12 : 89 (1936); C A, 30 : 6840<sup>a</sup> (1936).
13. Milleux et Réactifs de Laboratoire Pasteur, Institut Pasteur Production 1 Ed Paris (1978).
14. Nedel'ko E Ya : Temperature effect on denaturation of protein substances and the content of amino acids in the process oil extraction from soybeans, Biol Resursy Dal'n Vost Sbornik 162 (1960); C C, 55 : 11885 d (1961).
15. Özek Ö, Şahin V : Pankreasla hazırlanmış sığır kani ile hazırlanan besiyerleri hakkında, Mikrobiol Der, 3 : 215 (1950).
16. Okuhara A, Yokotsuka T : Analysis of soy sauce I Glycerol, Nippon Nögel Kagaku Kaishi 32 : 138 (1958); C A, 54 : 10231 h (1960).
17. Orthoefer F T : «Processing and Utilization» Ed : A G Norman p 219 Academic Press Inc U S A (1978).
18. Palavan H, Tunçman Z M : Soya fasulyesi (Glicina hispida) ve ondan yapılan vasatlar, Hıfzussahha ve Tec Biol Mec 4 : 9 (1944).
19. Panova S V : Trace element in fodder, Izvlesnik Sil'skogospodar Nauki Ukr Akad Sil'skogospodar Nauk No 12 43 (1959); C A, 54 : 25374 f (1960).
20. Park H, Lee J S, Lee C Y : Studies on the electrophoretic pattern and amino acids of wild soybean protein I Acrylamide gel electrophoretic pattern of seed proteins, Hanguk Nonghwa Hakhoe Chi 20 : 247 (1977); C A, 88 : 3211 x (1978).
21. Takahashi J : Some sources of vitamin B<sub>12</sub>, I, Eiyô to Shokuryô 8 : 49 (1955-56); C A, 54 : 18813 i (1960).
22. Tokunaga T, Tsuji O, Yasuda K : Extraction of phytosterols from soybean cake, Japan 8528 ('59) Sept 22; C A, 54 : 16379 c (1960).
23. Tomiyama T : Chemical studies of proteins of foodstuffs V The content of cystine and tryptofan, J Biochem (Japan) 22 : 341 (1935); C A, 30 : 123<sup>a</sup> (1936).
24. Unat E K, Çiçekdağ F : Balık hidroliziyle besiyeri hazırlanması, Yeni Tıp Alemi 18 : 131 (1969).
25. Unat E K : Barsağın Gram negatif bakterilerinin çabuk tanımı için balıklı besiyerleri, Yeni Tıp Alemi 18 : 150 (1969).
26. Voksresenski V M Dobruşina T H : Uses of soybeans in confectionery I Soybean milk, Proc. Inst Sci Research Food Ind (Leningrad) 2 : 23 (1935); C A, 30 : 5674 i (1936).

# Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Enstitüsü (KÜKENS) in kuruluşu

Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi'ne bağlı "Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Enstitüsü"nin kurulması hakkında Fakültenin Mikrobiyoloji Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsü Başkanı Prof Dr Enver Tali Çetin'in önerisini benimseyen Kürsü Kurulu aşağıda yazılı 330 nolu Kürsü Kurulu kararını 20.5.1976 tarih ve 410 sayılı yazı ile İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığına göndermiştir.

Kürsü Kurulu'nun 330 No'lu kararı :

"Dünyamızda insan, hayvan ve bitki gibi canlılarla mikroorganizmalar çevre ile ve birbiri ile ilişkili olarak yaşamaktadır. Mikroorganizmaların Tıp, Veterinerlik, Eczacılık, Diş Hekimliği, Tarım, Biyoloji, Ekoloji ve Endüstride çok önemli rolleri vardır. Mikroorganizmaların zararlarından korunmak ve metabolizma ürünlerinden yararlanmak için son yıllarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Mikroorganizmaların kültür kaynağı doğadır. Fakat çalışmalar için gerekli mikroorganizma suşlarının elde edilmesi, üretilmesi ve muhafazası fazla zaman ve gayrete ihtiyaç gösterdiği gibi çok da masraflı olmaktadır. Diğer taraf-

tan özellikle belirlenmiş mikroorganizmaların tabiattan istendiği zaman elde edilmesi, saflaştırılması ve deneye sokulması ekseriya çok zor, bazen imkânsızdır. Bundan dolayı dünyanın çeşitli ülkelerinde Kültür Koleksiyonları merkezleri kurulmakta ve koleksiyondaki mikroorganizmalar gerektiğinde çalışmalarda kullanılmaktadır. Kültür koleksiyonunun her kültürü hakkında etraflı bilgi olur ve yurttan yapılacak çalışmalar için kültürler kolayca temin edilebilirse, kıymeti fazladır. Dünyada çok sayıda kültür koleksiyonu vardır. 7-12 Ekim 1968 de Tokyo'da toplanan "International conference on Culture Collections", Kültür Koleksiyonları Dünya Federasyonu (WFCC) kurulmasını kararlaştırmıştır. Kürsümüzün Kültür Koleksiyonları bölümü federasyonun 101 nolu üyesidir. Federasyon henüz kuruluş halindedir ve (henüz) parasız kültür değişimi yapılamamaktadır.

Birleşmiş Milletler Çevre Programı - UNEP, Hücre Araştırması için Uluslararası Organizasyon - ICRO ve UNESCO işbirliği ile dünyanın çeşitli ülkelerinde Mikrobiyolojik Kaynak Merkezleri - MIRCENS ve Kültür Koleksiyonları ku-



rulması hakkında paneller yapılmakta, eğitici kurslar açılmakta ve para yardımı yapılmaktadır. 14-19-Mart-1976 tarihinde Bombay'da toplanan 3. Uluslararası Kültür Koleksiyonları Konferansı'nda yapılan panele katılarak yurdumuzun bu konularda çok ilgili olduğunu duyurup işbirliği istediğimde organize olmuş kuruluşlarla işbirliği yapılabileceği cevabı verilmiştir.

Kültür Koleksiyonlarındaki kültürlerin kullanılma yerleri çeşitlidir.

1 — Mikrobiyoloji laboratuvarında antijen, bağışık serum hazırlanması ve bunların serolojik ve immünolojik çalışmalarda kullanılmaları. Koruyucu olarak ve tedavi maksadı ile aşı ve bağışık serum hazırlanması.

2 — Araştırmalarda standart susların kullanılması.

3 — Endüstriyel Mikrobiyolojide ;

a - Antibiyotikler : Tıpta, hayvan üretiminde ve veteriner hekimlikte, ziraat üretimde,

b - Vitaminler : B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, C.

c - Polisakkaritler : Dekstran, ksantan,

d - Aminoasitler : Glutamik asit, lizin, treonin, tiozin, fenilalanin, valin, lösin, triptofan,

e - Enzimler : Amilaz, proteaz, lipaz, asparaginaz, glukosidaz, melibiaz,

f - Fermente besinler : Sirke, turşu, peynir, yoğurt, mayalar,

g - Fermente içkiler : Bira, şarap,

h - Organik asitler : Sitrik, laktik, fumarik, asetik,

i - Solvanlar : Etil alkol elde edilmesi.

4 — Tarımda toprağın veriminin artırılması : Tarımda yüksek verim için bitkiler, Rhizobium suşlarının köklerine yaptığı azot fiksasyonundan yararlanırlar. Bu bitkilerden daha fazla verim alınması ve toprağın muhafazası için Rhizobium kültürlerinden yararlanılacaktır. Yüksek derecede azot fikse edecek kapasitede olan Rhizobium suşlarından muhtelif tipler koleksiyonda bulunmalıdır. Bunun için bölgesel Rhizobium suşlarını incelemek ve icabında yüksek randımanlı Rhizobium suşlarını bölgelere dağıtmak gerekecektir.

5 — Sıvı ve katı artıklar :

a - Fabrika artıklarının fermentasyonda besiyerine ilave edilerek faydalı ürünlerin elde edilmesi. Bu suretle bölgede yaşayanların hayat düzeyi ve ekonomisinin geliştirilmesi,

b - Nişasta ve selüloz gibi katı artıklardan yararlanma,

c - Tarım artıklarından hayvan yemi yapılması,

d - Çöplerden gübre elde edilmesi,

e - Artıkların kullanılması ile çevre kirlenmesinin önlenmesi,

f - Pis suların temizlenmesi ve bunlardan faydalanma.

Enstitünün faaliyetleri :

1 — Enstitünün kamu hizmeti : Mikrobiyoloji çalışması yapılan her yerde 3-5 suştan ibaret de olsa, bir kültür koleksiyonu bulundurma zarureti vardır. Ancak kültürlerin muhafazası için liyofilizasyon, kültürlerin yenilenmesi çalışmaları yapılmalıdır. Kürsümüzde de eskidenberi Kültür Koleksiyonları bulunmaktadır. 1952 yılında bir liyofilizasyon aletinin alınmasıyla, suşlar liyofilize edilerek muhafaza edilmeye başlanmış ve koleksiyondaki suşların sayısı gittikçe

artırılmıştır. Bugün koleksiyonumuzda 869 bakteri, 7 virus, 30 maya, 20 küf, 2 hücre kültürü bulunmaktadır. Ancak bu koleksiyon düşünülen hizmetler için yeterli olmaktan çok uzaktır. Kültür Koleksiyonları Enstitüsü, koleksiyonunda bulunan kültürleri yurt çapında hizmete hazır bulunduracaktır. Aynı hizmeti göreceğ başka merkezlerin de kurulması karşılıklı dayanışmayı sağlayacak ve hizmeti kolaylaştıracaktır. Kültür koleksiyonlarının göreceği hizmetin yurt ekonomisine büyük yararı olacaktır:

- A - Dünya standartlarına uygun bir Kültür Koleksiyonu geliştirmek ve bunları yurt ölçüsünde dağıtmak, uluslararası organlarla bağlantı kurmak.
- B - Herhangi bir çalışma için yurt dışından standart suş temini zamana muhtaçtır ve satın alınacak suşlar çok pahalıdır. Böyle suşlar koleksiyonda bulunmalıdır.
- C - Endüstride kullanılacak, yüksek randıman veren standart mutant suşlar gizlilikle muhafaza edilmekte ve yabancı ülkelere verilmemektedir. Koleksiyonda yüksek randımanlı mutant suşlar bulundurulacaktır.
- D - Her ülkenin kendine özgü koşulları içinde ulusal koleksiyonu bulunmalıdır. Çeşitli bölgelerde yapılacak çalışmalarda uygun suşlar kullanılmalıdır.
- E - Rhizobium kültürlerinin tanımı ve üretilerek dağıtımı yapılmalıdır. Rhizobium'ların azot fiksasyonuna etki yapabilecek toprak ve iklim faktörleri tespit edilmelidir.
- F - Kültür koleksiyonları kataloğu hazırlanmalıdır. Suşların tarihçesi, kaynağı, izolasyon tarihi, kullanma yerleri, özellikleri gibi bil-

gileri içeren bir indeks meydana getirilmelidir.

## 2 — Enstitü araştırmaları :

- 1 - Ulusal koleksiyonu geliştirmek için yeni suşlar araştırılmalıdır.
- 2 - Yüksek randımanlı mutant suşlar elde edilmelidir.
- 3 - Suşların üretilmesini kolaylaştırmak için yeni besiyerleri araştırılmalıdır.
- 4 - Suşların muhafazası için yeni yöntemler araştırılmalıdır.

3 — Enstitü eğitimi ve öğretimi : Kültür Koleksiyonları Enstitüsünün bakteri, riketsiya, virus, mantar, alg, hücre kültürlerinin elde edilmesi, tanımı, muhafazası gibi geniş kapsamlı çalışmaları olacaktır. Bu çalışmaları yapabilecek elemanların yetiştirilmesi için yurt çapında kurslar, seminerler düzenlenmesi gerekecektir. Eğitici kurslar için uluslararası örgütle işbirliği yapılmalıdır. Yukarıda adı geçen alanlarda bilhassa uygulamalı mikrobiyoloji ve endüstriyel mikrobiyoloji konularında çeşitli fakültelerin öğrencilerine ders anlatılacak, konferanslar verilecektir.

## T e k l i f :

Yukarıda bildirilen faaliyetleri yapabilecek bir Kültür Koleksiyonları Enstitüsünün Fakültemizin bünyesi içinde kurulması yurt yararları bakımından büyük önem taşımaktadır. Enstitü şimdilik Mikrobiyoloji, Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsünde ayrılan birkaç odada faaliyete geçebilecektir. Ancak Enstitü için ekli listede bildirilen kadrolara ihtiyaç vardır.

Durumun dekanlığa bildirilmesine oybirliği ile karar verilmiştir.”

## İmzalar

Prof Dr Enver Tali Çetin, Prof Dr Özdem Anđ, Prof Dr Kurtuluş Töreci, Prof Dr Ömer Kasımoğlu, Uz As Emel Bozkaya.

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji, Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsü'nün "Kültür Koleksiyonları Enstitüsü" kurulması teklifi, Sayın Dekan Prof Dr Güngör Ertem'den büyük destek görmüş, Fakültenin "Öğretim ve Eğitim Komisyonu"nda 11.6.1976 tarihinde görüşülerek olumlu karşılanmıştır.

"Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Enstitüsü" nün kurulması teklifi İstanbul Tıp Fakültesi Kurulunun 23.3.1977 tarihli toplantısında oybirliği ile kabul edilmiştir. Teklif Sayın Rektör Prof Dr Haluk Alp tarafından büyük ilgi ile karşılanmış, İstanbul Üniversitesi Senatosu'nun 5.5.1977 tarihli 127. toplantısında, başka Fakültelerin değerli senatörlerinin konuşmaları ile de desteklenerek, oy birliği ile kabul edilmiştir. Kürsünün hazırladığı teklif gerekçe olarak sunulmuş ve Enstitünün Yönetmeliği 13.4.1977 tarihinde Fakülte Kurulunda, 9.2.1978 tarihinde İstanbul Üniversitesi Senatosu'nun 23. toplantısında onaylanmıştır. Resmî Gazete'nin 5 Nisan 1978 tarihli 16250. sayısının sekizinci sayfasında yayınlanan yönetmelik aşağıda yazılıdır.

### I — Genel Hükümler :

Madde 1 — Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Enstitüsü, Üniversiteler Kanununun 2 nci maddesi uyarınca kurulmuş, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesine bağlı, tüzel kişiliği olan bir araştırma, uygulama ve eğitim kurumudur.

Madde 2 — Enstitünün amaçları ve faaliyet alanları şunlardır :

a) Mikroorganizma kültür koleksiyonları ve uygulama alanları ile ilgili konularda her çeşit araştırma ve inceleme yapmak ve yaptırmak,

b) Mikroorganizma kültür koleksiyonları ve uygulamalı mikrobiyoloji konularında kamu kuruluşlarında ve özel kuruluşlarda çalışmakta ve çalışacak olan per-

sonelin yetişmesine yardım etmek, bu amaçla kurs, seminer, konferans ve her türlü eğitim programları düzenleyip uygulamak,

c) Mikroorganizma kültür koleksiyonları ve uygulamalı mikrobiyoloji alanlarında çalışan yerli, yabancı ve uluslararası kurumların çalışmalarını izlemek, araştırma ve eğitim amacıyla bu kurumlarla ilişki kurmak, işbirliği yapmak, ulusal ve uluslararası kongre ve toplantılar düzenlemek, bu tür toplantılara katılmak,

d) Türkiye'de mikroorganizma kültür koleksiyonları merkezlerinin kurulmasına yardımcı olmak, ulusal ve yabancı bu tür merkezlerle kültür değişimleri yapmak, ulusal kültür koleksiyonlarını zenginleştirmek,

e) Kamu kuruluşlarının ve özel kuruluşların uygulama ile ilgili kültür isteklerini karşılamaya çalışmak, yurt yararına yapılacak çalışma ve araştırmalarda bu kuruluşlara yardımcı olmak.

f) Bu amaçlar doğrultusunda yayın yapmak.

### II — Enstitünün Organları :

Madde 3 — Enstitünün organları şunlardır :

- a) Genel Kurul
- b) Danışma Kurulu
- c) Yönetim Kurulu
- d) Enstitü Müdürü
- e) Denetçiler

Madde 4 — Genel Kurul şu üyelere oluşur :

- a) Müdür ve Yönetim Kurulu üyeleri,
- b) Fakültenin Mikrobiyoloji, Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsü öğretim üyeleri; Toplum Sağlığı ve Koruyucu Hekimlik; Tıbbi Ekoloji ve Hidroklimatoloji; Histoloji ve Embriyoloji; Fizyoloji, Biyokimya, Klinik Farmakoloji ve Farmakoloji, Patolojik Anatomi, İç Hastalıkları, Cerrahi Hastalıklar, Kadın Hastalıkları ve Doğum, Çocuk Sağlığı ve Hastalıklar

ları ve Deri Hastalıkları Kürsülerinden birer temsilci,

c) Fakültede Biyoloji dersi veren öğretim üyelerinden Fakülte Kurulunca seçilecek biri,

d) İstanbul Üniversitesinin Cerrahpaşa Tıp, Edirne Tıp, Eczacılık, Dış Hekimliği, Fen, Kimya, Veteriner, Orman Fakültelerinin konu ile ilgili birer temsilcisi.

Madde 5 — a) Genel Kurul her yıl kış yarıyılı başında Enstitü Müdürünün çağrısı üzerine üye sayısının yarısından fazlası ile olağan toplantısını yapar. Enstitü Müdürü toplantıyı açar ve Genel Kurulu yönetmek üzere bir başkan ve iki sekreter seçilir, toplantıda oy çokluğu ile karar verilir. Birinci toplantıda çoğunluk olmazsa bir hafta sonra ikinci toplantı yapılır. İkinci toplantı en az 1/3 çoğunlukla yapılabilir.

b) Genel Kurul, Enstitü Müdürünü, Yönetim Kurulu Üyelerini ve iki Denetçiyi seçer. Enstitü çalışmalarını, Danışma Kurulunun düşünce ve önerilerini içeren raporunu ve Denetçilerin raporlarını inceler. Enstitü bütçe önerisini görüşür ve onaylar.

c) Genel Kurul, üyelerinin 1/3 ünün veya Yönetim Kurulunun isteği üzerine Enstitü Müdürü tarafından olağanüstü toplantıya çağrılır.

Madde 6 — Danışma Kurulu şu üyelerden oluşur :

a) Fakültenin tüm öğretim üyeleri,

b) İstanbul Üniversitesinin konu ile ilgili kürsüleri bulunan fakültelerinin ilgili kürsülerinden birer temsilci,

c) İstanbul Üniversitesi İşletme ve İktisat Fakültelerinden birer temsilci,

d) Diğer üniversitelerin konu ile ilgili kürsüleri bulunan fakültelerinden birer temsilci,

e) Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumundan konu ile ilgili bir temsilci,

f) Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsünden bir temsilci,

g) İstanbul Hıfzısıhha Enstitüsünden bir temsilci,

h) Enstitüye önemli bilimsel ve maddi yardımları dokunan kişiler veya kuruluşlardan birer temsilci,

i) Enstitünün amaç ve çalışmalarına ilgi gösteren veya uzmanlığından yararlanılması gerekenler arasında üyelerce yapılacak öneri üzerine Yönetim Kurulunca seçilen kişiler.

Madde 7 — Danışma Kurulu her yıl Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenecek bir gündemle ve Enstitü Müdürü tarafından belirlenecek bir tarihte toplanır. Toplantı başkanı ve iki sekreter seçilir. Danışma Kurulu, Enstitünün bir yıllık çalışmalarını inceler, yapılacak işler hakkında düşünce ve önerilerini bildirir. Danışma Kurulu toplantılarında çoğunluk aranmaz. Danışma Kurulunun kararları toplantıya katılanların çoğunluğu ile alınır. Danışma Kurulunun, Genel Kurula da giren üyelerinden birisi "Danışma Kurulunun Genel Kurul Temsilcisi" olarak seçilebilir.

Madde 8 — Enstitü Yönetim Kurulu, Enstitü Müdürü ile Genel Kurulca Genel Kurulun en az birisi Mikrobiyoloji, Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsü öğretim üyelerinden olmak üzere Fakültenin öğretim üyeleri arasından üç yıl için seçilen dört üyeden oluşur.

Madde 9 — Yönetim Kurulu, bu yönetmeliğin ve Enstitü Genel Kurulunun verdiği görevleri yapar, çalışma programını düzenler ve uygular, Enstitünün bütçesini ve kesin hesaplarını hazırlar.

Madde 10 — Yönetim Kurulu, ders yılı süresince en az ayda bir kez toplanır. Enstitü Müdürü gerekli görürse Yönetim Kurulunu olağanüstü toplantıya çağırabilir. Yönetim Kurulu, üye tam sayısının salt çoğunluğu ile toplanır ve toplantıya katılanların çoğunluğu ile karar verir.

**Madde 11 —** Enstitü Müdürü, Fakültenin Mikrobiyoloji, Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsü profesörleri arasından Genel Kurulca üç yıl için seçilir. Müdür Yönetim Kurulunun başkanı olup Enstitüyü Üniversite içinde ve dışında temsil eder. Enstitü işlerini yürütür ve bütçeyi uygular. Müdür, Yönetim Kurulu üyeleri arasından birisini Müdür Yardımcısı olarak seçer. Müdür Yardımcısı, Müdürün vereceği işleri yapar ve Müdürün bulunmadığı zamanlarda ona vekâlet eder.

**Madde 12 —** Enstitü Genel Kurulu tarafından üç yıl için seçilen iki Denetçi denetleme sonuçlarına ait yıllık raporlarını Enstitü Genel Kuruluna sunar.

### **III — Maî Hükümler :**

**Madde 13 —** Enstitünün mali kaynakları Fakülte bütçesinden ayrılan ödeneklerden ve yerli, yabancı ve uluslararası resmi ve özel kuruluşlar, gerçek ve tüzel kişiler tarafından yapılacak yardım, bağış ve vasiyetlerle bunların gelirlerinden oluşur.

**Madde 14 —** Enstitü bütçesinin tahakkuk memuru Enstitü Müdürü, itâ Amiri Fakülte Dekanıdır.

**Madde 15 —** Enstitü çalışmaları için gerekli teknik eleman, memur ve hizmetlilerin atanması Yönetim Kurulunun önerisi üzerine genel hükümlere göre yapılır.

**Madde 16 —** Bu Yönetmelik, Resmî Gazete'de yayımlandığı tarihte yürürlüğe girer.

**Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Enstitüsü Genel Kurul Üyeleri**  
aşağıda yazılmıştır.

*Istanbul Tıp Fakültesi*

*Mikrobiyoloji, Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsü*

*Tüm Öğretim Üyeleri*

Biokimya Kürsüsü

Doç Dr Pernur Öner

Cerrahi Kürsüsü

Prof Dr Ünal Değerli

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kürsüsü

Doç Dr Işık Yalçın

Deri Hastalıkları ve Frengi Kürsüsü

Prof Dr Türkân Saylan

Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji  
Kürsüsü

Doç Dr Lütfiye Eroğlu

Genel Patoloji ve Patolojik

Doç Dr Misten Demiryont

Anatomi Kürsüsü

Prof Dr Abidin Kayserilioğlu

Fizyoloji Kürsüsü

Prof Dr Türkan Erbenği

Histoloji ve Embriyoloji Kürsüsü

Prof Dr Nüvit Tekül

İç Hastalıkları Kürsüsü

Prof Dr Yılmaz Deniz

Kadın Hastalıkları ve Doğum Kürsüsü

Tıbbi Ekoloji ve Hidroklimatoloji

Doç Dr Ali Uyar

Kürsüsü

Toplum Sağlığı Kürsüsü

Prof Dr Sıtkı Velicangil

*Istanbul Üniversitesinin ilgili Fakülteleri*

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Doç Dr Ayhan Yücel

Dişhekimliği Fakültesi

Prof Dr Gündüz Bayırlı

Eczacılık Fakültesi

Prof Dr Turhan Baytop

Edirne Tıp Fakültesi

Prof Dr Rükneddin Öğütman

Fen Fakültesi

Prof Dr Atıf Şengün

Kimya Fakültesi

Prof Dr Süheyla Özeriş

Orman Fakültesi

Prof Dr Muzaffer Selik

Veteriner Fakültesi

Prof Dr Muzaffer Beşe

Istanbul Tıp Fakültesi Dekanlığının yazısı üzerine Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Enstitüsü Genel Kurulu 16 Nisan 1979 günü Fakültenin Temel Bilimler Binasında Mikrobiyoloji Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsü Seminer odasında toplanmıştır. Toplantıya 19 kişi katılmıştır. Toplantı tutanağı aşağıda yazılmıştır.

Madde 1 : Salt çoğunluk bulunduğu dan Dekan Yardımcısı Prof

Dr Sevim Büyükdevrim toplantıyı bir konuşma ile açmış ve gündem maddelerine geçilmiştir.

Madde 2 : Genel Kurul Başkanlığı'na Prof Dr Atıf Şengün ve sekreterliklere Doç Dr Misten Demiryont ve Doç Dr Şükriye Zaloğlu seçilmişlerdir.

Madde 3 : Enstitü müdürlüğüne oybirliği ile Prof Dr Enver Tali Çetin seçilmiştir.

**Madde 4 :** Yönetim Kurulu üyeliklerine Prof Dr Kurtuluş Töreci, Prof Dr Ömer Kasımoğlu, Prof Dr Türkan Erbenği, Doç Dr Lütfiye Eroğlu seçilmişlerdir.

**Madde 5 :** Denetleme Kurulu üyeliklerine Prof Dr Nüvit Tekül, Doç Dr Ali Uyar seçilmişlerdir.

**Madde 6 :** Gündemin Enstitü çalışmaları ve dilekler bölümüne geçildiğinde;

a) Prof Dr Sevim Büyükevrim Enstitü çalışmalarının içerisinde sanayiye yönelik çalışmaların yer almasını,

b) Prof Dr Atif Şengün biyolojik harp ile ilgili konunun da yer almasını,

c) Prof Dr Nüvit Tekül Pastör Enstitüsü koleksiyonlarının temin edilebileceğini söylemiş ve teklif etmişlerdir.

Başka söz isteyen bulunmadığından başkan toplantıyı kapatmıştır.

**Toplantı Başkanı**

**Prof Dr Atif Şengün**

**Sekreter**

**Doç Dr Misten Demiryont**

**Sekreter**

**Doç Dr Şükriye Zaloğlu**

Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Enstitüsü Yönetim Kurulu ilk toplantısını 9.5.1979 günü İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsü'nde yapmış ve aşağıda özeti bildirilen kararları alarak İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığına arz etmiştir.

1 — Enstitünün kısaltılmış adı olarak "KÖKENS" in kullanılması,

2 — 1980-1984 yıllarını kapsayan 5 yıllık dönem için Enstitüye 40 kişilik kadro istenmesi,

3 — Enstitüye muvakkat olarak 400 m<sup>2</sup>, ideal olarak 7000 m<sup>2</sup> bina sağlanması,

4 — Enstitünün 1980 yılı bütçesinin kabulü.

İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığının 16 Mayıs 1979 tarihli yazısından Enstitünün adının kısaltılmış şekilde (KÖKENS) olmasının ve 2 Haziran 1979 tarihli yazısından 400 m<sup>2</sup> lik yer isteğinin olumlu karşılandığı öğrenilmiştir.

KÖKENS'in kurulmasının ve çalışmalarının Fakültemize, Üniversitemize ve yurdumuza umduğumuz şekilde büyük fayda sağlaması dileğimizeyiz.

*Enver Tali Çetin*

## GENETİK SÖZLÜĞÜ

Molekül sel genetiğ in son yıllarda kaydettiğ i ilerlemeler — özellikle bakteri sistemlerinde — pek çok kalıtsal mekanizmanın molekül düzeyinde aydınlanmasını sağlamıştır. Güçlü biyokimyasal, biyofiziksel ve mikrobiyolojik yöntemlerin birleştirilerek uygulandığı bu alanda kısa aralıklarla birbirini izleyen buluşlar yalnız kalıtımla ilgili bilgi-mize katkıda bulunmakla kalmamış, gen mühendisliği olarak gösterilen, çok kısa bir süre öncesine kadar ancak kurgubilimsel açıdan ilgi çekebilen düşüncelerin bugün teknik düzeyde uygulama bulmasını mümkün kılan bir bilim dalının da doğmasına yol açmıştır. Gen mühendisliğinde uygulanan ileri teknikler sayesinde yapay olarak aktarılan yabancı genlerle mikroorganizmaların özelliklerini değiştirmek, onlara yeni biyosentetik yetenekler kazandırmak, örneğ in bir bakteri hücresinde insana özgü proteinlerin, enzimlerin sentezini gerçekleştirmek hayal olmaktan çıkmıştır. Getirdiğ i yararlar (ve muhtemel tehlikeler) açısından insanlık için büyük önem taşıyan bu alandaki gelişmeleri izlemek klâsik ve özellikle molekül sel genetiğ in ana kavramlarını tanımayı gerektirmektedir. Genetik sözlüğü böyle bir gereksinimi karşılamak düşüncesinden kaynaklanmıştır. Kükem dergisinin diğer sayılarında da devam edecek olan "Genetik Sözlüğü" nün Kükem okuyucusuna yararlı olmasını dileriz.

*Engin Bermek*

**Gen** — Bir özelliğ i belirleyen kalıtsal bilgi birimi. Molekül düzeyde işlevsel bir ürünü (bu bir RNA ve dolayısıyla bir polipeptid zinciri olabilir) şifreleyen DNA bölümü.

**Genom** — Bir organizmanın özelliklerini belirleyen genlerin tümü.

**Mutasyon** — Kalıtsal bilgide fiziksel ya da kimyasal etkenlerin sonucu, çok seyrek olarak da ( $10^{-5}$  —  $10^{-6}$  hücre) kendiliğ inden ortaya çıkabilen değ iş iklik. Mutasyonların molekül sel nedenini DNA molekül ünün baz dizisindeki değ iş iklikler oluşturur.

**Makromolekül** — Ağırlıkları  $10^4$  ile  $10^9$  dalton arasında değ iş en, hücre içinde küçük molekül niteliğindeki yapı taşlarının düz dizilimiyle oluşan, hücreye özgü, DNA, RNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi büyük moleküller.

**DNA (deoksiribonükleik asit)** — Deoksitimidin (dT), deoksisitidin (dC), deoksiganosin (dG) ve deoksiadenosin (dA) olarak adlandırılan dört (deoksiribonükleotid) tipinin özel bir sıra ile dizilmesiyle oluşan ve kalıtsal bilgiyi taşıyan makromolekül. Kalıtsal bilgi DNA'yı oluşturan bu dört nükleotidin diziliş iyle şifrelenmiştir. Doğada karşılaşılan DNA molekül ü hidrojen bağlarıyla birlikte tutulan (bak komplementarite) iki deoksiribonükleotid zincirinden oluşur ve çift sarmal biçiminde bir ikincil (sekonder) yapı gösterir.

**RNA (ribonükleik asit)** — Tek iplikli, DNA'ya benzer bir nükleik asit tipi olup, deoksiriboz yerine riboz grubu taşıyan uridin (U), sitidin (C), guanin (G) ve adenosin (A) nükleotidlerinden oluşur. Kalıtsal bilginin hücre içinde iletilmesi (haberci RNA-mRNA), şifrelenmiş bilginin okunması (transfer RNA-tRNA) ya da ribozomların yapı taşı (ribozomal RNA-rRNA) görevini üstlenmiş üç ana RNA molekül tipi bilinmektedir.

*Demir Tiryaki ve Engin Bermek*



## LEJYONERLER HASTALIĞI

Halük ERAKSOY

Lejyonerler hastalığı, yakınlarda tanınan ve *Legionella pneumophila* adı verilen bir mikroorganizmanın oluşturduğu akut lobar bir pnömonidir. 1976 da Philadelphia'da baş gösteren salgında, daha çok Pennsylvania Eyaleti Amerikan Lejyon Konvansiyonuna katılan delegeler arasında görüldüğü için, hastalığa bu ad verilmiştir.

Yakalananların % 16'sının öldüğü Philadelphia salgını için bakteriyel, viral, riketsiyal, klamidiyal, fungal ve toksik bir etken aranmış ve ilk olarak 1977 başlarında bazıları 20 mikronu bulan fakat genellikle 1-3 mikron uzunluğundaki Gram negatif bakteriler, ölen dört hastanın akciğer dokusundan, akciğer ekstrelerinin inoküle edildiği kobaylardan ve kobayların iç organ ekstrelerinin pasaj yapıldığı embriyonlu tavuk yumurtasının sarı kesesinden izole edilmiştir.

Bu buluşun en dikkate değer yanı, izole edilen mikroorganizmanın daha önce hiç tanınmamış olmasıdır. Bu mikroorganizma bilinen hiçbir bakteri türüne benzememektedir. Lejyonerler hastalığı bakterisinin özellikleri ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. 1978 Kasımında Atlanta'daki Hastalık Denetim Merkezinde yapılan Uluslararası Lejyonerler Hastalığı simpozyumunda etken mikroorganizma için *Legionella pneumophila* terimi önerilmiştir. *Legionella pneumophila* 1-4 mikron boyunda, kokobasil, çomak ve iplik biçiminde olabilen pleomorf bir mikroorganizmadır. Muhtemelen bir spor şekli vardır. Guanin-sitozin kap-

samı ve birtakım özellikleri *Legionella*'yı taksonomik olarak yavaş hareketli bakterilere yaklaştırmaktadır; ancak bir *Flexibacterium* olmadığı da açıktır. *Legionella* için en uygun besiyeri hemoglobinin ve diğer bazı maddeler ile zenginleştirilmiş Mueller-Hinton jelozudur. Ayrıca Feeley ve Gorman, *Legionella* için bir tecrit besiyeri tanımlamıştır. Pine ve arkadaşlarının kimyasal yapısı belli bir sıvı besiyeri üzerindeki çalışmaları da bakterinin sınıflandırılmasına ve ileride seçtirici bir besiyeri hazırlamaya yarayacak ipuçları vermiştir. Bakteri 25°C de ince çomakçıklar halinde ürer. 30°C ve 37°C de daha uzun filamanlar biçimindedir. *Legionella*'nın gaz-sıvı kromatografisiyle, başka Gram negatif çomaklardakine benzemeyen dallanmış zincirli yağ asitlerini bol miktarda içerdiği saptanmıştır.

*Legionella pneumophila* Gram yöntemiyle iyi boyanmaz, fakat Gram negatif olmaya eğilimlidir. Giemsa yöntemiyle kırmızı boyanır, aside dirençli değildir. Bakterileri akciğer dokusunda post-mortem olarak direkt fluoressan antikor yöntemiyle göstermek mümkündür.

Hastalarda akut ve hastalık sonrası dönemler arasındaki antikor artışı (serokonversiyon), infekte sarı kesesi zarı süspansiyonları kullanılarak indirekt fluoressan antikor yöntemiyle gösterilmiştir. Son alınan serum örneğinde etkene karşı antikor düzeyinin ilkinden dört kat yüksek olması, ya da tek bir ölçümle 1/128 den yüksek titrasyon saptanması hastalığa tanı koydurur. Fakat hasta-

lığın ilk haftasında antikorlar genellikle saptanamaz. *Legionella*'ya karşı antikor düzeyini göstermek üzere mikroaglutinasyon ve mikro-ELISA gibi daha basit testler de denenmiştir. Bununla birlikte tedaviyi düzenleyebilmek için tanıyı yeterince erken koyduracak yöntemlerin ivedilikle bulunması gerekmektedir. Bugüne değin mikroorganizmanın baleam gibi solunum yolu salgılarında indirekt fluoresan antikor yöntemiyle gösterilmesinde ancak sınırlı bir başarı kazanılmıştır. Oysa birçok infeksiyon hastalığının erken tanısında olduğu gibi burada da kontrimmünelektroforez, radyoimmünessey veya ELISA gibi duyarlı ve özgül antijen belirleme deneyleriyle serum, idrar, balgam gibi vücut salgı ve sıvıları incelenebilir. Bu konuda ELISA deneyiyle alınan başarılı sonuçlar bildirilmektedir.

*Legionella pneumophila*'nın dört ayrı serotipi tanımlanmıştır. Philadelphia'daki salgından sorumlu olan Knoxville suyundan sonra, ölen iki hastanın akciğerlerinden izole edilen Togus ve Los Angeles suşları ve bir akarsudan izole edilen Bloomington suşu bildirilmiştir.

İnfeksiyon kaynağının ne olduğu, bakteri hava düzenleyicilerin (air condition) suyundan ve depolardaki durgun sudan izole edilinceye değin bilinmiyordu. Bugün hava düzenleyicilerden aerosol halinde saçılan mikroorganizmaların duyarlı insanları etkilediği sanılmaktadır. Solunum yoluyla alınan bakteriler kana karışır; akciğerlerin yanı sıra karaciğer, dalak, böbrek ve barsaklar gibi organlarda ve merkez sinir sisteminde bakteriler saptanabilir. Hastalık, 2-10 günlük kuluçka döneminden sonra git-tikçe yükselen ateş, soluk darlığı, yan ağrısı, öksürük, renal durum bozukluğu gibi pnömoni belirtileriyle ortaya çıkar. Ayrıca, sürgün, ansefalopati, karaciğer ve böbrek işlev bozukluğu, miyoglobulinüri ile nitelenen rabdomiyoliz gibi özgül olmayan akciğer dışı çeşitli

belirtiler bulunabilir. Ağır hastalara solunum yardımı yapmak gerekebilir. Ölüm nedeni şoktur. Buna yardımcı olarak yaş, önceden geçirilmiş akciğer hastalığı, steroidler gibi maddeler ile bağışıklığın durdurulması, tütün ve alkol kullanımı gibi çeşitli risk faktörlerinin etkisi vardır. Radyolojik olarak akciğerlerde yer yer görülen interstisyel infiltrasyon kısa zamanda tam lobar konsolidasyona değişmekte ve bazen her iki akciğer de etkilenmektedir. İyileşme çoğunlukla hastalığın ikinci haftasında başlar. Bununla birlikte radyolojik akciğer bulgularının birkaç ayda düzeldiği de görülmüştür.

Hastalığın tedavisinde en etkili ilaç eritromisindir. Etkenin *Legionella* olup olmadığı bilinmiyorsa eritromisin ve gentamisin birlikte verilmeildir.

Ölümcül vakalarda en önemli patolojik değişikliklerin yer aldığı akciğerlerde mikroskobik olarak hiyalin zar oluşumu ve interstisyel yuvarlak hücre infiltrasyonu birlikte yaygın alveol yıkımı saptanır. Dieterle'nin gümüş impregnasyon yöntemiyle boyanan parafine yatırılmış akciğer kesitlerinde pleomorflı çomakçıklar görülmüştür. Akciğer kesitleri elektron mikroskobuyla incelendiğinde sivri uçlu, düzgün yüzeyli ve kenarları koşut olmayan ve bazılarında çevşek bir dışzar bulunan kokobasiller saptanmıştır.

Lejyonerler hastalığının insandan insana bulaşması çok nadirdir. Fakat bir yoğun bakım ünitesinde, solunum yardımı yapılan entübe hastalardan aerosol halinde saçılan solunum salgılarıyla karşılaşan personeldeki antikor düzeyi yüksek bulunmuştur. Bu ve başka bulgular belirtisiz infeksiyonların yaygın olduğunu düşündürmektedir.

Philadelphia salgınından sorumlu özgül bir etken izole edildikten sonra etyolojisi açıklanamamış solunum hastalığı salgınları gözden geçirilmiş ve daha önceki birçok salgında *Legionella*

*pneumophila*'nın etken olduğu kanısına varılmıştır. Özetle, *Legionella pneumophila*'nın influenza gibi hafif bir hastalıktan çabucak öldüren multilober bir pnömoniye değin değişen geniş bir hastalık spektrumu vardır. Pnömoni belirtilerinin yanında başka sistemlerle ilgili belirtiler bulunduğu, lejyonerler hastalığından kuşkulanan mak yerinde olacaktır.

### KAYNAKLAR

- 1 — Barclay WR: Pulmonary medicine: Legionnaires disease, *JAMA* 241: 1387 (1979).
- 2 — Bartlett CLR, Reid D: A note on the epidemiology of legionnaires disease. *What's new* (Public health laboratory service, Colindale) No: 6 p. 10 June (1978).
- 3 — Berdal BP, Farshy CE, Feeley JC: Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. *J Clin Microbiol* 9: 575 (1979).
- 4 — Chandler FW, Hicklin MD, Blackmon JA: Demonstration of the agent of legionnaires disease in tissue. *N Eng J Med* 297: 1218 (1977).
- 5 — Cherry WB, Pittman B, Harris PP, Herbert GA, Thomason BM, Thacker L, Weaver RE: Detection of legionnaires disease bacteria by direct immunofluorescent staining. *J Clin Microbiol* 8: 329 (1978).
- 6 — Edelstein PH, Meyer RD, Finegold SM: Isolation of a new serotype of legionnaires disease bacterium. *Lancet* 2: 1172 (1978).
- 7 — Farshy CE, Klein GC, Feeley JC: Detection of antibodies to legionnaires disease organism by microagglutination and microenzyme-linked immunosorbent assay tests. *J Clin Microbiol* 7: 327 (1978).
- 8 — Feeley JC, Gorman GW, Weaver RE, Mackel DC, Smith HW: Primary isolation media for legionnaires disease bacterium. *J Clin Microbiol* 8: 320 (1978).
- 9 — Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GE, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS and the Field Investigation Team: Legionnaires disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Eng J Med* 297: 1189 (1977).
- 10 — Grist NR: Legionnaires disease. *CDS* 78/46.
- 11 — Grist NR, Reid D, Najera R: Legionnaires disease and travellers. *Ann Intern Med* 90: 563 (1979).
- 12 — Macrae AD: Legionnaires disease. *What's new* (Public health laboratory service Colindale) No: 6 p. 1 June (1978).
- 13 — McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR and the Laboratory Investigation Team: Legionnaires disease. Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Eng J Med* 297: 1197 (1977).
- 14 — McKinney RM, Thomason BM, Harris PP, Thacker L, Lewallen KR, Wilkinson HW, Hebert GA, Moss CW: Recognition of a new serogroup of legionnaires disease bacterium. *J Clin Microbiol* 9: 103 (1979).
- 15 — Moss CW, Dees SB: Further studies of the cellular fatty acid composition of legionnaires disease bacteria. *J Clin Microbiol* 9: 648 (1979).
- 16 — Moss CW, Weaver RE, Dees SB, Cherry WB: Cellular fatty acid composition of isolates from legionnaires disease. *J Clin Microbiol* 6: 140 (1977).
- 17 — Pine L, George JR, Reeves MW, Harrell WK: Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 9: 615 (1979).

# Özetler

**Lactobacillus plantarum'dan asetilkolin izolasyonu, ekstraksiyonu ve ölçümü**

Stanaszek P M, Snell J F, O'Neill J J: Isolation, Extraction, and Measurement of Acetylcholine from *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 34: 237 (1977).

*Lactobacillus plantarum* ATTC 10241'den asetilkolin izolasyonu, ekstraksiyonu ve spektrofotometrik olarak ölçümü tanımlanmıştır. Asetilkolin, sodyum tetrafenilboron-butiletiketone asetonitril karışımı ile ekstrakte edilmiş ve enzimatik olarak 340 nm de ölçülmüştür.

Doç Dr Emel Tümbay

**Yoğurt yapımında kullanılan liyofilizasyon ile sağlanan kuruluğa dirençli bakteri suşlarının seçimi ve kompozisyonu**

Nikolov NbM, Vitanov TH: Selection of Strains and Composition of Yogurt starting Cultures Resistant to Drying by Lyophilization. *Proceedings of the IV. Congress on Microbiology, Sofia, November 22-24, Vol 1 p. 31-34 (1977)*. (Institute for Food Technology - Plovdiv; Institute for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia).

Çeşitli *Str. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarının liyofilizasyon ile sağlanan kuruluğa karşı dirençleri incelenmiştir. *Str. thermophilus*'un çeşitli suşlarının liyofilizasyon kuruluşuna dirençli oldukları ve bu koşul için ön seleksiyon ve adaptasyona gereksinim göstermedikleri saptanmıştır. *L. bulgaricus*'un ise liyofilizasyona duyarlı olduğu ve liyofilizasyona dirençli suşlarının seçimi-

ni gerektirdiği ortaya konulmuştur. *L. bulgaricus*'un suşları ilk liyofilizasyondan sonra canlılık bakımından fark göstermemişler, fakat 3-5 kez arka arkaya liyofilizasyondan sonra suşlar arasında canlılık bakımından belirgin farklar izlenmiştir.

*Str. thermophilus* suş 26 T ve *L. bulgaricus* suş Fe kombinasyonunun liyofilizasyon koşullarına dirençli olduğu saptanmıştır.

Doç Dr Emel Tümbay

**Mikroorganizmalar aracılığıyla ham maddelerin geri kazanılması**

Bosecker K, Kürsten M: Recovery of Metallic Raw Materials by Microbial Leaching. *Proc Biochem* 13: 2 (1978).

*Thiobacillus* cinsindeki bakteriler suda çözünmeyen metal bileşiklerini bir biyokimyasal ve geokimyasal reaksiyonlar serisiyle suda çözünebilir bileşiklere dönüştürmektedirler. Bu reaksiyonlar düşük kaliteli maden filizlerinden metallerin elde edilmesi için kullanılabilir. Koşulların uygun olduğu durumlarda halen bakteriyel işlem geniş ölçüde kullanılmaktadır. İşlenecek filiz kadar kullanılan özel mikroorganizmaların sayısının artırılması olasılıkları ekonomik yönden çok ilginçtir.

Ecz Nihal Özdemir

**Nişasta ve tarımsal artıklardan biyoplastikler ve SCP elde edilmesi**

Shipman R H, Fan L T: Bio-Plastics and SCP from Starch and Agricultural

Wastes, *Proc Biochem* 13: 19 (1978).

Petrokimyasal olmayan başlangıç maddelerinden mantarlarla SCP den başka biyolojik esaslı polimerler (plastikler, reçineler ve lifler) elde edilebilir. Yenilenebilen kaynaklar nişasta, artık nişastalar ve çöpler, odun, mısır koçanı, tarımsal yan ürünler ve diğer selülozlu artıklardan enzimatik veya asidik hidroliz sonucu elde edilen ham şekerlerin kaynaklarının fermentasyonuna dayalı işlemlerde mayalanma maddesi olarak kullanılırlar.

*Ecz Nihal Özdemir*

**Klinik örneklerden ureaplasma urealyticum izolasyonu ve idantifikasyonu için uygun tekniklerin ve besiyerlerinin önemi**

Kundsın R B, Parreno A, Poulin S: Significance of Appropriate Techniques and Media for Isolation and Identification of *Ureaplasma urealyticum* from Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 8: 445 (1978).

Gonokoklarla olmayan uretritte etken olduğu belirtilen *Ureaplasma urealyticum*, genital organ infeksiyonlarına, düşüklere, erken doğuma ve kısırlığa yol açtığından, özgül yöntemlerin uygulanmasına neden olmuştur. *Ureaplasma urealyticum* izolasyonu için, buyyona ve Shepard'ın farklı özellik gösteren ve manganez sülfat içeren, (A7) adıyla anılan jeloz besiyerine eşzamanlı olarak, materyelden ekim yapılır. *Ureaplasma urealyticum* izolasyonu, idrar sedimentlerinde, servikal ve üretral sürüntülere oranla, daha başarılı olmaktadır. İzolasyon sırasında kullanılan buyyon, jeloz besiyeri, inkübasyon yöntemi, materyel tipi ve ekim öncesi materyel korunumu, *Ureaplasma urealyticum* izolasyonunu etkileyen faktörlerdendir. *Ureaplasma* ve *mycoplasma* idantifikasyonu için, temel kriterler, jelozdaki karakterist

istik büyümeleri, *mycoplasma*ların Dienes boyası ile boyanması ve *Ureaplasma*da üreaz enzim varlığının gösterilmesidir.

*Bio Mine Elevken*

**Eriyebilir hücre ekstralarının jel elektroforezi aracılığıyla laktik streptokokların gruplandırılması**

Jarvis A W, Wolf J M: Grouping of Lactic Streptococci by Gel Electrophoresis of Soluble Cell Extracts. *Appl Environ Microbiol* 37: 391 (1979).

35 laktik streptokok suşundan elde edilen eriyebilir hücre proteinleri jel elektroforeziyle incelenmiştir. Jellerin yoğunlukölçer taramalarının matematiksel analizi, suşların bütün benzerliklerine göre gruplanmalarını sağlamıştır. Aynı suşun varyantları olduğu bilinen suşlar yine aynı gruba girerek yöntemin güvenilirliğini desteklemiştir. Standart koşullardaki jel elektroforez örneğinde benzerlik gösteren suşların fenotiplerinin tümüyle aynı olduğu ve bunun genotip bakımından da bir benzerliği gösterdiği düşünülmüştür. Peynir yapımı için laktik streptokok suşlarının seçimiyle bunun ilgisi irdelenmiştir.

*Dr Halûk Eraksoy*

**Kompleks besiyerlerinde pseudomonas fluorescens'e ısı baskısı**

McCoy D R, Ordal Z J: Thermal Stress of *Pseudomonas fluorescens* in Complex Media. *Appl Environ Microbiol* 37: 443 (1979).

*Pseudomonas fluorescens* (P7) hücreleri 43°C de iki saat tutulduklarında baskıya uğramıştır. Sıcaklık 25°C ye döndükten sonra üremede dokuz saat süren bir yavaşlama olmuştur. Seçtirici inhibitörlerin kullanılmasıyla elde edilen veriler, hücrelerin kendine gelmesi

için DNA sentezinin gerekli olmadığını, fakat RNA ve protein sentezinin gerekli olduğunu düşündürmektedir. Baskı sonucunda hücrelerin urasil ve lösün ile işaretlenmiş materyeli yitirmesi RNA ve protein yıkımının olduğunu düşündürmüştür. Yavaşlama döneminin sonuna doğru sodyum dodesil sülfata karşı duyarlılığın olması zarı yıkımını göstermiştir. Zar yıkımı, işaretli materyelin hücreye girmemesiyle de doğrulanmıştır.

*Dr Halûk Eraksoy*

**Benzalkonyum klorürle korunan bir tuz çözeltisinde ondört yıl canlı kalan pseudomonas cepacia**

Geftic S G, Heymann H, Adair F W : Fourteen-Year Survival of *Pseudomonas cepacia* in a Salts Solution Preserved with Benzalkonium Chloride. *Appl Environ Microbiol* 37 : 505 (1979).

Koruyucu bir antimikrobik olarak % 0,05 benzalkonyum klorür içeren inorganik tuz çözeltisinde 1963 ten 1977 ye dek 14 yıl canlı kalan bir *Pseudomonas cepacia* suşu klinikten daha önce izole edilen başka bir *P. cepacia* suşuyla karşılaştırılmıştır. Derişik antimikrobik stok çözeltisinde karbon ve azot kaynağı olarak amonyum asetat vardır. Konsantrasyon % 16 ya doğru yükseldikçe suşun saf benzalkonyum klorüre direnci de artmıştır. Tuz çözeltisinin mililitresinde  $4 \times 10^8$  koloni oluşturan ünite gösterilmiştir. Bu suşla daha önce klinikten izole edilen *P. cepacia* suşu arasında üreme hızı, fındıkfaresinde virulans, antibiyotiklere direnç spektrumları ve çeşitli gereksinimleri bakımından bir ayırım görülmemiştir. Sonuçlar, antimikrobik koruyucu olarak benzalkonyum klorür içeren farmasötik çözeltilerin tehlikeli olduğunu ortaya koymuştur.

*Dr Halûk Eraksoy*

**Kırsal bölge içme suyunda kirlenme belirtisi organizmaların önemi**

Sandhu S S, Warren W J, Nelson P : Magnitude of Pollution Indicator Organisms in Rural Potable Water, *Appl Environ Microbiol* 37 : 744 (1979).

Güney Carolina'nın üç bölgesindeki kırsal toplumların su tesislerinden alınmış toplam 460 su örneği incelenmiştir. Belediye sınırları dışındaki nüfusun % 10 kadarı araştırma kapsamına girmektedir. Örneklerde tüm koliformlar, *Escherichia coli* ve fekal streptokoklar aranmıştır. Bütün su örneklerinde önemli miktarda kirlenme belirtisi organizmalar bulunmuştur. Koliformlar çok yaygın olup su tesislerinin sadece % 7,5 u temiz bulunmuştur. Yakın ve tehlikeli kirlenme belirtisi olarak kabul edilen *E. coli* su tesislerinin % 43 ünde saptanmıştır. İstatistiki analizler bakteri topluluklarının özellikle *E. coli*'nin su tesisinin derinliği ve kanalizasyon uzaklığı ile ilgili olduğunu göstermiştir. Toplam koliform sayılarının suyun pH sına da bağlı oldukları görülmüştür.

*Ecz Nihal Özdemir*

**Çeşitli organik fosforlu insektisitlerin, mikroorganizmalarla parçalanması**

Rosenberg A, Alexander M : Microbial Cleavage of Various Organophosphorus Insecticides, *Appl Environ Microbiol* 37: 886 (1979).

Aspon, Azodrin, Dasanit, diazinon, malation, Orthene, paration, Trithion, dimetoat, Dylox, metil paration ve Vapona'yı tek fosfor kaynağı olarak kullanan bakteriler toprak ve kanalizasyondan elde edilmiştir. Tek bir bakteri, bu insektisitlerden 3 ile 10 unu fosfor kaynağı olarak kullanabilir. Diazinon ve malation içeren besiyerlerinde, iki *Pseudomonas* suşunun üremesi incelenmiştir. Üremenin, bu insektisitlerin mikta-

rına, çoğalmanın ise kimyasal maddenin ortamdan kaybolmasına bağlı olduğu saptanmıştır. Diazinon veya malationlu ortamda üreyen, ortofosfatlı ortamda üremeyen *Pseudomonas*'ların istirahat hücreleri, kloramfenikol varlığı ve yokluğunda, bu iki organik fosfatın yapısını bozarlar. Organik fosfatlı ortamda üreyen iki bakteri suşu ekstresi, Aspon, Azodrin, Dasanit, diazinon, malation, Orthene, paration ve Trithion'un ortamdaki kaybolmasını katalize ederler. Bu ekstreler dimetoat, Dylox, metil paration ve Vapona üzerine bu şekilde etki edemez. Gaz kromatografisi analiz sonuçlarına göre, ekstreler azodrininden dimetilfosfat, malationdan dimetil fosforoditioat, Trithion'dan dietil fosforoditioat, Dasanit, diazinon ve paration'dan ise dietil fosforotioat açığa çıkarmaktadır. Dimetil fosfat, dimetil fosforotioat, dimetil fosforoditioat, dietil fosfat ve dietil fosforotioat *Pseudomonas*'lar tarafından fosfor kaynağı olarak kullanılmazlar.

Bio Gülşen Aktan

#### Endonezya'da yapılan Tape Ketan fermentasyonunda, yüksek alkol eldesi

Cronk T C, Mattick L R, Steinkraus K H, Hackler L R : Production of Higher Alcohols During Indonesian Tapé Ketan Fermentation, *Appl Environ Microbiol* 37 : 892 (1979).

Endonezya Tapé Ketan (pirinç kullanılarak hazırlanan, fermentasyonla elde edilen Endonezya'ya ait geleneksel bir besin maddesi) fermentasyonunda, yüksek alkollerin (karışık alkol) eldesi ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, *Amylomyces rouxii*, tek başına veya Tapé Ketan fermentasyonunda kullanılan maya cinsleri (*Endomycopsis*, *Candida* ve *Hansenula*) ile birlikte kullanılmıştır. Total karışık alkol miktarı, fermentasyon boyunca artmıştır. Elde edilen alkol distile edildiğinde, izobuta-

nol izoamil ve aktif amil alkol içerdiği saptanmıştır. Bu karışımda n-propanol elde edilememiştir. İzobutanol ve izoamil alkoller en yüksek miktarda bulunmuştur. *A. rouxii* tek başına kullanıldığında, mayalarla birlikte kullanıldığı ile yaklaşık aynı miktarda karışık alkol elde edilmiştir. (Total elde, 192. saatte 275 mg/litre). *Endomycopsis butonii* ile birlikte kullanıldığında da buna yakın bir sonuç alınmıştır (Total elde; 192. saatte 292 mg/litre). *A. rouxii* ve *Endomycopsis fibuliger* bir arada 32 saatte 72 mg/litre oluştururken, *A. rouxii*, *Candida*'larla birlikte kullanıldığında elde edilen alkol miktarı 192. saatte 590-618 mg/litre dir. *A. rouxii*, *Hansenula cinsi* ile kullanıldığında en düşük miktarda karışık alkol elde edilmiştir (192. saatte 143-280 mg/litre). Fermentasyonun ilk 36. saatinde, karışık alkol yapımı 30°C ve 35°C de, 25°C ye kıyasla daha fazla, 48. saatte ise 30°C deki alkol yapımı 35°C ye kıyasla fazla bulunmuştur. 48. saat sonrasında, alkol yapımının 25°C de en yüksek olduğu saptanmıştır. *A. rouxii*, *Hansenula anomala* ve *Hansenula subpelliculosa* kombinasyonu denendiğinde, 36. saatte 145-199 mg/litre, 192. saatte ise 354-369 mg/litre etil asetat elde edilmiştir.

Bio Gülşen Aktan

#### Doğal sularda proteoliz ölçümü

Little J E, Sjorgen R E, Carson G R : Measurement of Proteolysis in Natural Waters, *Appl Environ Microbiol* 37 : 900 (1979).

Champlain gölü suyundaki mikrobiyolojik proteoliz; çözünür olmayan bir azur boyasından, çözünebilen rengin açığa çıkma oranının, in situ ve in vitro şartlarda Spektrofotometrik olarak ölçümü ile hesaplanmıştır. Mikrofiltrasyon ile steril edilmiş sularda proteolitik özellik görülmemiştir. In situ proteolizin, suyun derecesine bağlı olduğu saptanmıştır (1-23°C). 4°C nin altında, ölçülebilir

aktivite görülmemiştir. 20°C'deki in vitro proteoliz, 15°C'deki proteolize oranla 2,3 katı, 10°C'deki proteolize oranla ise 6 katı fazla bulunmuştur. Buz kaplı bir gölün içinden, bir kış boyu belirli sürelerle alınan su, 20°C'deki bir laboratuvarında incelenmiş ve kış boyunca proteolitik potansiyelin arttığı saptanmıştır. Bahar başında, buzların çözülme zaman en yüksek aktivite elde edilmiştir. Burlington limanından alınan suyun mikrobiyolojik proteolizi merkez gölünden alınan suyunkinden 4 kat fazla bulunmuştur. Deneylerin çoğunda, proteoliz 2 µg/ml Cu<sup>2+</sup> ile tamamen,

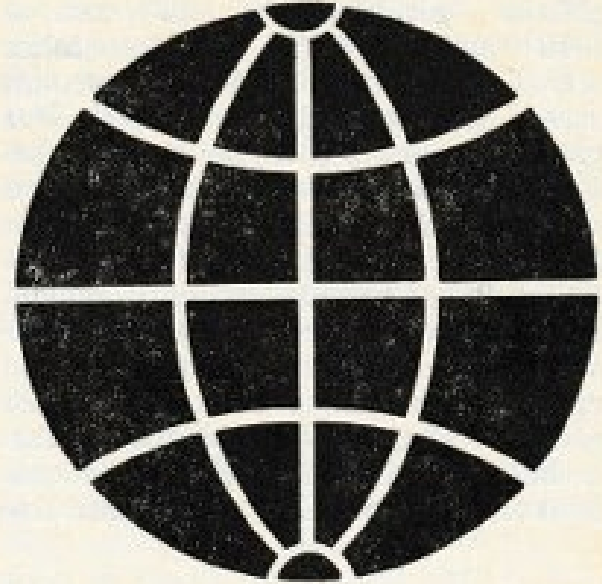
0,75 µg/ml Cu<sup>2+</sup> ile % 67 oranında inhibe edilmiştir. Mililitre başına 20-40 µg Casitone veya Casamino asitleri ilâvesi, proteolizi belirli şekilde artırmaktadır. Proteoliz şişelerinde en fazla *Pseudomonas* ve *Flavobacterium* türleri üremiştir. Azur proteolizinde *Pseudomonas* saf kültürleri için, çok az miktarda Casitone, Casamino asitleri veya maya ekstresi gerekmektedir. Buna karşın, *Flavobacterium* saf kültürleri için bu maddelere gerek yoktur. Bu gereksinim, 21 amino asit ve 8 vitamin varlığında ortadan kalkacaktır.

Bio Gülşen Aktan



# Haberler

BİLİMSEL TOPLANTILAR VE  
KONGRELER  
(1979 - 1980)



- 1 — "7 th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology" 11-16 Mart 1979 da Jerusalem, İsrail'de yapılmıştır.
- 2 — "World Soybean Research Conference-II" 26-29 Mart 1979 da Raleigh, North Carolina, USA da toplanmıştır.
- 3 — "Anaerobic Bacteria Symposium : Pathogenicity, Patient Immune Response, and Serology" 1-4 Nisan 1979 da Johnson City, Tennessee, USA da toplanmıştır.
- 4 — "Genetik Simpozyumu" 10-12 Mayıs 1979 da Ankara'da yapılmıştır.
- 5 — "1. Ulusal Parazitoloji Kongresi" 22-24 Mayıs 1979 da İstanbul'da toplanmıştır.
- 6 — "Legionnaires Disease Seminar" 31 Mayıs 1979 da New Hyde Park, New York, USA da yapılmıştır.
- 7 — "4 th International Symposium on Antibiotic Resistance" 4-8 Temmuz 1979 da Smolenice, SSCB'de yapılmıştır.
- 8 — "2 nd International Symposium on Clinical Genetics" 6-8 Temmuz 1979 da Atina, Yunanistan'da toplanmıştır.
- 9 — "XI th International Congress of Biochemistry" 8-14 Temmuz 1979 da Toronto, Kanada'da toplanmıştır.
- 10 — "10 th International Symposium on Chromatography and Electrophoresis and 6 th International Symposium on Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine" 19-12 Temmuz 1979 da Milano, İtalya'da yapılmıştır.
- 11 — "Society for Industrial Microbiology'nin 30. toplantısı" 12-17 Ağustos 1979 da Arlington, Virginia, USA da yapılmıştır.
- 12 — "6 th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins" 19-24 Ağustos 1979 da Uppsala, İsveç'te yapılmıştır.
- 13 — "4 th International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins" 30 Ağustos - 1 Eylül 1979 da Lozan, İsviçre'de yapılmıştır.

- 14 — "European Association against Virus Diseases" 5-7 Eylül 1979 da Münih, Batı Almanya'da toplanmıştır.
- 15 — "International Symposium on Animal and Human Influenza" 13-14 Eylül 1979 da Cedex, Fransa'da yapılmıştır.
- 16 — "International Microbiology and Food Industry Congress" 7-12 Ekim 1979 da Paris, Fransa'da yapılacaktır.
- 17 — "Recent Advances in Medical Microbiology" 9-12 Ekim 1979 da New York, USA da toplanacaktır.
- 18 — "10th International Congress of Allergology" 4-11 Kasım 1979 da Jerusalem, İsrail'de yapılacaktır.
- 19 — "5. Ulusal Viroloji Kongresi" Mayıs 1980 de, Bursa'da yapılacaktır.
- 20 — "6th International Fermentation Symposium and the 5th International Symposium on Yeasts" 20-25 Temmuz 1980 de Ottawa, Kanada'da yapılacaktır.
- 21 — UNEP/UNESCO/ICRO/WFCC tarafından Temmuz 1980 de Brisbane-Avustralya'da bir "Training Course" düzenlenmektedir.
- 22 — "Kültür Koleksiyonları ve Endüstriyel Mikrobiyoloji (KÜKEM) Derneği 2. Kongresi» Eylül 1981 de İstanbul'da yapılacaktır.
- 23 — "11th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology" 6-10 Ekim 1980 de Viyana, Avusturya'da toplanacaktır.
- 24 — "7th Latin American Congress of Allergy and Immunology" Ekim 1980 de Venezüella'da toplanacaktır.
- 25 — "6. Ulusal Viroloji Kongresi" 1981 sonbaharında İstanbul'da İstanbul Tıp Fakültesi Kongresi içinde düzenlenecektir.

DSÖ'nden Dr MR Radovanovic emekliye ayrıldı.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Avrupa Bölgesi Bulaşıcı Hastalıklar sorumlusu Dr MR Radovanovic, ülkemizin sağlık sorumlusu Dr MR Radovanovic, ülkemizin sağlık sorunları ile uzun yıllar ilgilenmiş ve çözümleri için olumlu önerilerde bulunmuştur.

Son dört yıldır Kürsümüzde kurmakta ve geliştirmekte olduğumuz Klinik Viroloji Tanı laboratuvarının birçok biyolojik maddesinin DSÖ'nce sağlanmasına yardımcı olduğu gibi, ilgili uzmanlarla ilişkilerimizin ve işbirliğimizin kurulmasını da sağlamıştır. Kendisinden aşağıda aynen sunduğumuz, 20 Temmuz 1979 tarihli mektubu almış ve emekliye ayrılacağını öğrenmiş bulunuyoruz.

"Sevgili Prof Çetin,

Size bildirmek isterim ki, DSÖ'nde 23 yıldan fazla hizmetten sonra, bazı ailevi nedenlerle 1 Eylül'den itibaren emekli olmaktayım. Bu hizmetin 7 yılı Güney Doğu Asyada, 16 yılı ise Kopenhagta - Avrupa Bölge Bürosunda geçmiştir.

Bu vesile ile, bulaşıcı hastalıklar konusu olan vazifemde, geçmiş yıllarda bana yardımcı olmanızdan, işbirliğiniz ve anlayışınız için sizlere teşekkür etmek isterim. Benden sonra aynı vazifeye Dr B Velimirovic gelecektir. Kendisinin akademik bir geçmişi, geniş uluslararası tecrübeleri ve DSÖ ile çalışmaları vardır. Ümit ederim ki kendisi ile olumlu ve başarılı bir işbirliği kurabileceksiniz.

Ev adresim aşağıdadır :

Milovana Merinkovica 33  
11.000 Belgrede, Yugoslavya  
Radovanovic".

Dr MR Radovanovic'e emeklilik yıllarında sağlık ve mutluluk dileriz. Beraberce kararlaştırdığımız çalışmalarımızın başarı ile sonuçlanacağını ve özellikle önerdiği SSYB ile de olumlu işbirliğinin gerçekleşeceğini ümit ederiz.

*Dr Neriman Gemicioğlu*

# Dergi yazı kuralları

Kükem Dergisi, Kültür Koleksiyonları ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Derneğinin yayın organıdır. Dergi, mikroorganizma kültür koleksiyonları ve endüstriyel mikrobiyoloji alanlarındaki çalışmaları, özel ve aktüel konularda derlemeleri, yayın tanıtımlarını, çeşitli haberleri, derneğin düzenlediği konferansları simpozyumları yayınlar. Dergi yılda 1-4 sayı çıkararak cildini tamamlar.

Bir çalışmanın yayınlanabilmesi için «Yazı İnceleme Kurulu» tarafından gerek yazı, düzeni, gerek kapsam bakımından uygun görülmesi ve daha önce başka bir dergide yayınlanmamış olması gerekir.

## 1 — Yazıların düzeni :

a) Yazılar Türkçe basılır. Teknik terimler Türkçe, Lâtince veya Türk tıp terminolojisine girerek yerleşmiş yabancı terimlerle yazılmalı, dilimize yerleşmiş terimler imlâ kurallarımıza göre hazırlanmalı ve Türk Dil Kurumu'nun yayınladığı «Yeni İmlâ Kılavuzu» ve «Türkçe Sözlük» esas alınmalıdır. Metin içindeki yabancı terimlerin altı italik basılmalarını sağlamak amacı ile kurşun kalemle çizilmelidir. Yabancı yazarların yazıları ve özellik gösteren yazılar İngilizce ya da Fransızca basılabilir.

b) Yazılar tablo ve şekilleri ile birlikte 10 sayfayı, özel konularda derlemeler 15 sayfayı geçmemelidir. İki nüsha hazırlanması gereken metin daktilo ile iki aralıklı olarak yazılmalı, her sayfanın iki yanında 3 cm boşluk bırakılmalıdır.

c) Yazıların bölümleri aşağıdaki sıraya uygun olmalıdır :

Başlık

Yazarın adı, soyadı

Türkçe özet

Başlığı ile birlikte İngilizce özet isteyen Fransızca özet de koyabilir

Giriş

Gereç ve Yöntem

Bulgular

Tartışma

Kaynaklar

d) Çalışmanın yapıldığı yerin adı ve adresi ilk sayfanın altında not olarak belirtilmelidir.

e) Türkçe ve İngilizce özetler 200 kelimeyi geçmemelidir.

f) Şekil, resim ve grafiklerin, klişe dışında kalacak bir yerine sırası, yazarların adları ve yazının başlığı kaydedilmelidir. Şekil ve resim alt yazıları ayrı bir sayfada yazılarak metne eklenmelidir. Mikroskop resimlerinde büyütme oranı ve kullanılan boya açık olarak belirtilmelidir. Klişesi yapılacak grafik, şema ve kimyasal formül gibi şekillerin çin mürekkebi ile Eidanger kâğıdına çizilmiş, fotoğrafların ise parlak kâğıda ve kontrastlı olarak basılmış olması gerekir.

g) Kaynaklar yazarların soyadına göre alfabetik olarak sıralanıp numaralandırılmalıdır. Metinde geçen literatür parantez içinde bu numara sırası ile işaretlenmelidir. Adı geçen dergi isimleri Index Medicus'a göre kısaltılmış olmalı, dergi ad ve cilt numaralarının italik basılmaları için altları çizilmelidir.

h) Yukarıda sıralanan koşulları yerine getirmemiş çalışmalar eksikliklerin tamamlanması için yazarına iade edilir.

2 — «Yazı İnceleme Kurulu» tarafından kabul edilen yazılar son teslim tarihine göre sıralanarak yayınlanır. Baskı tashihleri yazarlar tarafından yapılır. Tashihlerin sayfa kenarlarına çekilen oklarla işaretlenip, okunaklı bir şekilde ve kurşun kalemle dikkatli bir şekilde yapılması gerekir. Tashihler en geç yedi gün içinde »Yayın Kurulu«na teslim edilmelidir. Yedi gün içinde geri verilmeyen tashihlerde «Yayın Kurulu»nun düzeltmeleri esas alınır. Yazar isterse tashihler «Yayın Kurulu» tarafından yapılır.

3 — Yazarlar yazılarının başına ayrı baskı isteyip istemediklerini belirtmelidirler. 30 ayrı baskıdan daha fazla isteyen yazarların basımevi ile anlaşmaları gerekir.

4 — Yazılar ve tashihler Kükem Dergisi Yazı İşleri Müdürü Prof. Dr. Ömer Kasımoğlu İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji, Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsü Çapa - İstanbul adresine gönderilmelidir.

Handwritten marks at the top of the page, possibly initials or a signature.

