

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Anoxybacillus gonensis Z4 SUŞUNDAKİ KATALAZ
AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ ve TAM HÜCRE
İMMOBİLİZASYONU

Murat DURMAZ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

RİZE 2012

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Anoxybacillus gonensis Z4 SUŞUNDAKİ KATALAZ AKTİVİTESİNİN
İNCELENMESİ ve TAM HÜCRE İMMOBİLİZASYONU

MURAT DURMAZ

YÜKSEK LİSANS

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11/06/2012

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 21/06/2012

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Barbaros DİNÇER

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Hüseyin Avni UYDU

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Özlem FAİZ

Enstitü Müdürü: Doç.Dr. Fatih YILMAZ

RİZE, 2012



ÖNSÖZ

Bu çalışma, *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan elde edilen termofilik bakterideki katalaz aktivitesinin incelenmesini içermektedir. Çalışmadaki deneysel kısımlar, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca gerek konu seçiminde gerekse çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER'e gösterdiği sabır, anlayış ve iyi niyetinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Materyal temininde göstermiş olduğu destekten dolayı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Hocamız Sayın Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım süresince her türlü yardım ve manevi desteklerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ'e, Sayın Okutman Nimet BALTAŞ'a, Sayın Arş. Gör. A.Pınar EKİNCİ'ye ve diğer tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca beni bugünlere getiren, her konuda ilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen aileme şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	IV
SUMMARY	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
SEMBOLLER DİZİNİ	VIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Katalaz.....	3
1.2.1. Katalazın Yapısı.....	7
1.2.2. Katalaz Türleri.....	12
1.2.2.1. Tek İşlevli Katalazlar	12
1.2.2.2. Katalaz-Peroksidazlar.....	13
1.2.2.3. Mangan-Katalazlar (Pseudokatalaz).....	14
1.2.3. Katalazın Kullanım Alanları	16
1.2.3.1. H ₂ O ₂ 'nin Uzaklaştırılması Amacıyla Kullanımı.....	16
1.2.3.2. Katalazın Çeşitli Enzimler İle Birlikte Kullanımı.....	17
1.2.3.3. Katalazın Analitik Amaçlı Kullanımı.....	17
1.3. İmmobilizasyon.....	18
1.3.1. İmmobilizasyon İşleminde Kullanılan Matrisler	19
1.3.2. Enzim İmmobilizasyon Metodları	20
1.3.2.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri.....	21
1.3.2.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon.....	23
1.3.3. Tam Hücre İmmobilizasyonu.....	23
1.3.4. Katalaz İmmobilizasyonu İle İlgili Yapılan Önceki Çalışmalar.....	26
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	31
2.1. Materyal.....	31
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	31
2.1.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	33
2.1.3. Çalışmada Kullanılan <i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 Suşu	35

2.2.	Yöntemler	35
2.2.1.	Termofilik Bakterinin Katalaz Kapasitesinin Belirlenmesi (Petri Testi)...	35
2.2.2.	Termofilik Bakterinin Sıvı Besi Ortamında Büyütülmesi.....	35
2.2.3.	Protein Tayini	35
2.2.4.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	36
2.2.5.	Doğal Elektroforez	36
2.2.6.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 Suşu Katalazının Spektroskopik Özellikleri....	37
2.2.7.	pH ve Sıcaklığın Z4 Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	37
2.2.8.	Termofilik Z4 Suşundan Elde Edilen Katalazın Kinetiği	38
2.2.9.	Bazı Kimyasal, Deterjan, Anyon ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	38
2.2.10.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 Suşunun Tam Hücre İmmobilizasyonu	39
3.	BULGULAR.....	40
3.1.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 Suşunun Katalaz Kapasitesinin Belirlenmesi...	40
3.2.	Doğal Elektroforez.....	40
3.3.	Protein Miktarı ve Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	41
3.4.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 Suşu Katalazının Spektroskopik Özellikleri...	42
3.5.	pH ve Sıcaklığın Z4 Katalazı Aktivitesi Üzerine Etkisi	42
3.6.	Termofilik Z4 Suşundan Elde Edilen Katalazın Kinetiği.....	44
3.7.	Bazı İyon ve Deterjanların <i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	46
3.8.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 Suşunun Tam Hücre İmmobilizasyonu.....	50
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	52
5.	ÖNERİLER	56
6.	KAYNAKLAR	57
	ÖZGEÇMİŞ	65

ÖZET

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırmacıları tarafından yeni izole edilen *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun endüstriyel bir enzim olan katalazı üretebilme kapasitesi belirlenerek, bu enzimin bazı kinetik verileri ve spektroskopik özellikleri ortaya konmuştur. Ayrıca *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun agar ve agaroz ortamlarında tam hücre immobilizasyonu gerçekleştirilerek, katalaz aktivitesi karakterize edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan termofilik suşun katalaz ürettiği petri testi ve doğal elektroforezle ortaya konarak, bu suşun oldukça yüksek katalaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan elde edilen katalazın pH 7,0 ve 50 °C'de en yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Z4 termofilik suşundan elde edilen katalazın H₂O₂ substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda V_{maks} değeri 250.000±980 U/mg protein ve K_m değeri 17,5±2,2mM olarak belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmada kullanılan termofilik Z4 suşundan elde edilen katalazın NaN₃, KCN, HgCl₂ ve 3-amino-1,2,4-triazol gibi bilinen katalaz inhibitörleri ile inhibe olduğu görülmüştür.

Anoxybacillus gonensis Z4 suşu katalazının doğal hali yalnızca 410 nm'de hem grubunu gösteren Soret (γ) pikini verirken, KCN ile Soret pikini 415 nm'de, β-bandı pikini 520 nm'de, α-bandı pikini ise 550 nm'de verdiği gözlenmiştir.

Çalışmada tam hücre immobilizasyonunda doğal polimerlerden agar ve agaroz kullanılmıştır. İmmobilize hücrelerin katalaz aktivitesini gösterdiği ve V_{maks} değerinin 50.000±413 U/g jel ile K_m değerinin 200±28 mM olduğu tespit edilmiştir. Agar ortamında immobilize edilmiş hücrelerin, katalaz aktivitesini 2. kez kullanımında %53, agaroz ortamında ise 2. kez kullanımında %80 oranında koruduğu gözlenmiştir.

Kısaca çalışmada kullanılan *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun yüksek katalaz aktivitesine sahip olduğu ve hidrojen peroksidin kullanıldığı endüstri alanları için potansiyel katalaz kaynağı olarak kullanılabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Katalaz, hidrojen peroksit oksidoredüktaz, termofilik bakteri

SUMMARY

Investigation of Catalase Activities from *Anoxybacillus gonensis* Z4 strain and Whole Cell Immobilization

In this study, the capacity of *Anoxybacillus gonensis* Z4 strain that were isolated by a research group in the Department of Molecular Biology and Genetics of Faculty of Science of Atatürk University to produce catalase, an industrial enzyme, was investigated, and some kinetic parameters and spectroscopic properties of this catalase enzyme were determined. In addition, *Anoxybacillus gonensis* Z4 strain was performed immobilization of its whole cell in agar and agarose environments, and their catalase activities were characterized.

The catalase-producing ability of this thermophilic species was explored by petri test and native electrophoresis. The catalase from *Anoxybacillus gonensis* Z4 strain exhibited the highest activity at pH 7.0 and 50 °C. Catalase from the Z4 thermophilic strain in the presence H₂O₂ substrate was determined V_{max} value as 250,000±980 U / mg protein and the K_m value as 17.5±2.2 mM as a result of the kinetic study. In addition, catalase from thermophilic Z4 strain, using in this study, was inhibited by NaN₃, KCN, HgCl₂, and 3-amino-1,2,4-triazole known catalase inhibitors.

The catalase obtained from *Anoxybacillus gonensis* Z4 strain was observed to give Soret peak showing the heme group only 410 nm in natural state, and to give Soret peak 415 nm, α-band and β-band peaks around 520-550 nm with KCN.

Agar and agarose were used for whole cell immobilization of the study. Immobilized cells showed the activity of catalase and it has 50000±413 U / g gel as V_{max} value and 200±28 mM as K_m value. It was observed that catalase activity was maintained 80% by cells immobilized in agarose media and 53% by cells immobilized in agar media in the use of the second.

In conclusion, *Anoxybacillus gonensis* Z4 strain tested in this study was found, because of its high catalase activity, to be a potential source of catalase for the industries utilizing hydrogen peroxide.

Key words: Catalase, hydrogen peroxide oxidoreductase, thermophilic bacteria

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Ferriprotoporfirin IX yapısı	5
Şekil 2. Katalazın prostetik grubu olan <i>hem b</i> ve <i>hem d</i> 'nin yapısı	6
Şekil 3. Katalazda hem'in 3 boyutlu gösterilişi	7
Şekil 4. <i>E.coli</i> katalazının X-ışını kristalografisi ile aydınlatılmış 3 boyutlu yapısı..	7
Şekil 5. Katalazın aktif bölgesinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 6. Aktif bölgede bulunan kanalın yapısı	10
Şekil 7. Hamur mayasından elde edilen katalaz A'nın kanal yapısı.....	10
Şekil 8. Alt birim bölgelerinin şematik gösterimi.....	11
Şekil 9. Katalazın etki mekanizması.....	12
Şekil 10. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	20
Şekil 11. Atomik kuvvet mikroskopuyla görüntülenmiş gözenekli polimer membran içerisinde immobilize edilmiş <i>S. Cerevisiae</i> hücresi.....	26
Şekil 12. PANCA/MWCNTs boyunca H ₂ O ₂ 'den immobilize katalaza elektron taşınmasının şematik gösterimi	30
Şekil 13. Z4 suşunun katalaz kapasitesinin belirlenmesi için yapılan petri testi sonucu.....	40
Şekil 14. Z4 suşundan elde edilen özütteki katalaz aktivitesi için yapılan doğal elektroforez jeli.....	41
Şekil 15. Protein standart çalışma grafiği	41
Şekil 16. Z4 katalazının 350-700 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu	42
Şekil 17. Termofilik Z4 suşundan elde edilen katalazın aktivite-pH değişimi	43
Şekil 18. Termofilik Z4 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimi.....	43
Şekil 19. Z4 katalazının H ₂ O ₂ varlığındaki substrat-doyma grafiği	44
Şekil 20. Z4 katalazının H ₂ O ₂ varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği	45
Şekil 21. Z4 katalazının H ₂ O ₂ varlığında elde edilen Hill grafiği	45
Şekil 22. Agar ve agaroz ortamlarında immobilize edilmiş hücrelerin H ₂ O ₂ 'i bozma hızı.....	50
Şekil 23. İmmobilize Z4 hücrelerinin H ₂ O ₂ varlığındaki substrat-doyma eğrisi	51
Şekil 24. Z4 suşunun agar ve agaroz ortamlarındaki immobilize edilmiş halinin H ₂ O ₂ varlığındaki tekrar kullanılabilirliği grafiği.....	51

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Biyoteknolojinin alt grupları	1
Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan cihazlar.....	31
Tablo 3. Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar.....	32
Tablo 4. Z4 katalazına ait bazı kinetik veriler.....	44
Tablo 5. Bazı katyonların <i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 katalazı aktivitesi üzerine etkisi.....	47
Tablo 6. Bazı Anyonların <i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 katalazı aktivitesi üzerine etkisi	48
Tablo 7. Diğer bazı iyon ve deterjanların <i>Anoxybacillus gonensis</i> Z4 katalazı aktivitesi üzerine etkisi	49

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BLC	:	Sığır Karaciğer Katalazı
KAT, CAT	:	Katalaz
KP	:	Katalaz-peroksidaz
MK	:	Mangan-katalaz
U	:	Unite
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
BSA	:	Bovine (Sığır) Serum Albumin
GSH-Px	:	Glutasyon peroksidaz
IC ₅₀	:	% 50 İnhibisyon konsantrasyonu
3-ATA	:	3-Amino 1,2,4 triazol
Z4	:	<i>Anoxybacillus Gonensis</i> Z4 suşu
ATP	:	Adenozin Trifosfat
INH	:	İzoniazidin aktivasyonu
GOD	:	Glukoz Oksidaz
HRP	:	Yaban turpu peroksidazı
LPK	:	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LB	:	Lauria Bertani
PAGE	:	Poliakrilamid jel elektroforezi

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüzde biyoteknoloji bilim dalı biyoloji/canlı biliminin bir alt disiplini olmaktan çıkarak disiplinler arası bir yere gelmiş olsa da, temelde yaklaşık 10.000 yıl önce yapılmaya başlanan tarım ve yaklaşık 6.000 yıl önce üretilmeye başlanan fermantasyon ürünlerinin ilk biyoteknolojik uygulamalar olduğu görülmektedir (Strickland, 2007).

Biyoteknoloji en genel anlamı ile “herhangi bir teknolojik uygulamanın; biyolojik sistemleri, organizmayı veya organizma kaynaklı yapıları; bir ürünün üretiminde, değiştirilmesinde veya özel bir süreçte kullanması” olarak tanımlanır. 2000 yılında Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Konvansiyonu, Cartagena Protokolünde yeni nesil biyoteknoloji kavramını “Modern Biyoteknoloji” olarak tanımlamaktadır (Diversity, 2009). Artık günümüz biyoteknoloji kavramı araştırma ve uygulama alanlarına göre farklı sayılabilecek disiplinlerden birçok araştırmacı ve üreticinin içerisinde yer aldığı bir ara disiplin haline gelmiştir. Bu alanlara göre de çeşitli alt gruplara ayrılmıştır. Alt grupların oluşmasında üretilen ürünlerin kullanıldığı alanlar ile ürünün üretiminde kullanılan hammaddeler belirleyici olmaktadır. Biyoteknoloji günümüzde 10 farklı alt araştırma grubuna ayrılmaktadır. Alt gruplar Tablo 1. 'de verilmiştir (Dasilva, 2005).

Tablo 1. Biyoteknolojinin alt grupları: Tabloda biyoteknolojinin farklı disiplinlere ayrılmış çalışma alanları ve bu alanlara ait uygulama ve araştırma konuları verilmiştir (Dasilva, 2005).

BİYOTEKNOLOJİNİN ALT GRUPLARI	UYGULAMA VE ARAŞTIRMA ALANLARI
Kırmızı Biyoteknoloji	İnsan sağlığı, ilaç, tanı teknikleri
Beyaz Biyoteknoloji	Gen tabanlı biyoendüstriler
Mavi Biyoteknoloji	Akuakültür, kıyı ve deniz biyoteknolojileri
Gri Biyoteknoloji	Klasik fermantasyon ve biyosüreç biyoteknolojileri
Sarı Biyoteknoloji	Besin ve yiyecek biyoteknolojileri
Yeşil Biyoteknoloji	Tarım, çevre biyoteknolojisi, biyoyakıt, biyokirlilik
Kahverengi Biyoteknoloji	Kurak bölgeler ve çöl biyoteknolojisi
Siyah Biyoteknoloji	Biyoterörizm, biyosilah, biyosuç, anti-ekin silahlar
Mor Biyoteknoloji	Patent, yayın, buluş, fikri mülkiyet hakları
Altın Biyoteknoloji	Biyoinformatik, nanobiyoteknoloji

Endüstriyel süreçlerde kullanılan enzimlerden biri olan katalaz sahip olduğu yüksek substrat özgülüğü ve hızı ile önemli oranda peroksidaz aktivitesine sahip olmasından dolayı tercih edilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle katalaz, endüstriyel üretimde önemli bir kullanıma sahiptir.

Katalaz enzimi genel olarak insan, hayvan, bitki ve mikroorganizmada bol bulunur. Katalazın en önemli görevi toksik hidrojen peroksidi hücrelerden uzaklaştırmaktır. Katalazın eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği ve çeşitli dokularda da bolca bulunduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle, antioksidant enzimler hem hücrenin kararlılığını muhafazada hem de serbest radikalleri yok etmede çok önemlidir (Çilem ve ark., 2005; Kanter v ark., 2005; Kulusarı ve ark., 2008, 2009a, 2009b).

Katalaz, hidrojenperoksit'i (H_2O_2) parçalayan bir enzim olduğundan, H_2O_2 'in kullanıldığı ve aşırısının ortamdaki uzaklaştırılmasının gerekli olduğu tüm proseslerde kullanılabilir. Ancak enzimin bu proses koşullarında aktivite gösterebilmesi gereklidir (Seriner, R., 2010). Bir katalaz molekülü dakikada 6 milyon H_2O_2 molekülünü H_2O 'ya dönüştürebilir. Bazı tümörlerin detoksifikasyon yeteneğinin azalmış olması katalaz (CAT) seviyesinin düşüklüğüne bağlanmaktadır (Valko vd., 2006).

Katalaz enzimi H_2O_2 'i ayrıştırarak O_2 ve H_2O meydana getirmektedir. Taze bakteri kültürüne H_2O_2 ilave edildiğinde O_2 kabarcıklarının çıkması katalazın varlığını kanıtlamaktadır. Test edilecek bakteri kültürü Tryptone Agar besiyerine %3'lük H_2O_2 'den üç damla damlatıldığında kabarcık oluşumu pozitif bir reaksiyon olarak kabul edilmiştir (Gücin ve Dülger,1995).

Süt endüstrisinde H_2O_2 koruyucu madde olarak kullanılır. Sütte doğal olarak bulunan ve antibakteriyel enzim olan laktoperoksidaz, aktivite gösterebilmek için H_2O_2 'e ihtiyaç duymaktadır. Ancak işlenmeden önce sütte aşırı H_2O_2 'nin uzaklaştırılması gerekir. Bu da serbest veya immobilize katalaz kullanımı ile olur. H_2O_2 süte derişimi %0,002 olacak şekilde ilave edilir. 30 °C' de 20 dk. muamele edildikten sonra 1000 L süte 20 ünite olacak şekilde eklenir. Böylece H_2O_2 'in fazlası parçalanırken süt enzimleri ve yararlı bakteriler korunur (Seriner, 2010).

Oksidazların yer aldığı sistemlerde açığa çıkan H_2O_2 uzaklaştırılmak istendiğinde bu enzimler yanında katalaz enzimi de kullanılır. Gıdaların konserve yapımı ve paketlenmesinde, yumurta, şarap gibi bazı gıdaların desakkarifikasyonunda ve glukonik asit üretiminde kullanılan glukoz oksidaz (GOD) yanında ortamda katalaz da bulunmalıdır (Seriner, 2010).

H₂O₂, reçine ve plastik üretiminde oksidasyon ve köpükleştirme amacı ile kullanılır. Ayrıca sterilizasyon amaçlı olarak da kullanılabilir (Seriner, 2010).

Enzimler biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve protein yapısında olan özel biyokatalizörlerdir. Canlı organizmalarda gerçekleşen çok sayıda reaksiyon enzimlerle katalizlenir. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar katalizlenmemiş karıştlarına göre 10⁷-10¹⁶ kez daha hızlı gerçekleşir (Wiseman, 1987; Bohager, 2006).

Enzimlerin ilgili reaksiyonları ılımlı koşullarda, çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizlemeleri, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanı sağlar. Bu nedenle enzimler tıp alanında, kimya endüstrisinde, gıda proseslerinde, tarım ve ziraat alanlarında oldukça önemli bir yere sahiptirler. Enzimlerin birçok alanda çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanmasından dolayı, enzimleri daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmaları artmıştır. Bu nedenle serbest enzimlerden daha fazla yararlanabilmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir.

Enzim immobilizasyonunda kullanılan metotlar, enzim ve destek arasındaki moleküler etkileşimlere dayanan fiziksel yöntemler ve kovalent bağ oluşumuna dayanan kimyasal yöntemler olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. Son yıllarda, çeşitli polimerizasyon teknikleri kullanılarak farklı geometrilere sahip polimerik yapılar enzim immobilizasyon destek materyali olarak kullanılmak üzere sentezlenmektedir. Enzim tutuklaması için uygun olacak bir taşıyıcı destek malzemesi reaktif grup içeriğine sahip olmalı, yüksek mekanik ve kimyasal kararlılık sunmalı ve olumlu akış özellikleri sergilemesinin yanında geniş bir yüzey alanına sahip olmalıdır. (Arıca vd., 2000)

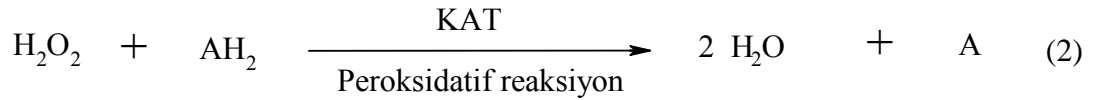
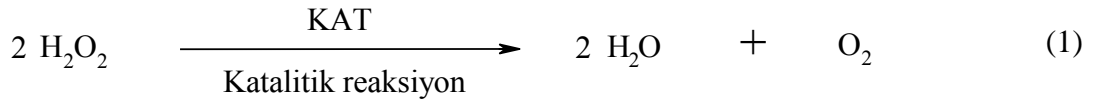
Bu çalışmada, çalışma materyali olarak kullanılan ve yeni bir termofilik bakteri olan Z4 Suşu Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırmacıları tarafından Erzurum ili Ilıca İlçe'si kaplıcalarından izole edilmiş ve birtakım özellikleri ortaya konulmuştur. Çalışma amacı olarak, "Yeni Termofilik Bir Bakteri Olan *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşunun Endüstriyel Öneme Sahip Katalaz Potansiyelinin Belirlenmesi ve Çeşitli Materyallerle Tam Hücre Immobilizasyonunun Gerçekleştirilmesi" hedeflenmiştir.

1.2. Katalaz

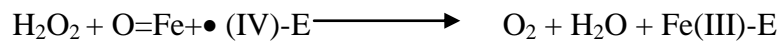
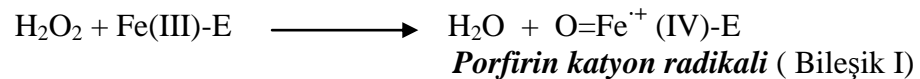
Katalaz (KAT) (Hidrojen Peroksit; Hidrojen Peroksit Oksidoredüktaz, E.C. 1.11.1.6), H₂O₂' in su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen, tetramerik demir porfirin

içeren, yüksek molekül ağırlıklı bir antioksidan enzimdir (Brown-Peterson ve Salin, 1995; Gonçalves vd., 1999; Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999). Katalaz hemen hemen tüm hayvan hücrelerinde, bitkilerde ve bakterilerde bulunur.

Katalaz yüksek konsantrasyonlarda H₂O₂'i indirgeyebildiği gibi (Reaksiyon 1) düşük H₂O₂ konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite de gösterebilir (Reaksiyon 2) (Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999; Ahmad, 2001).



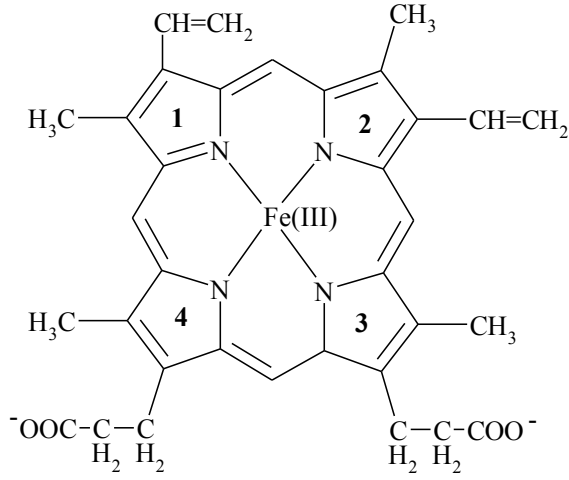
19. yüzyılın başlarından itibaren katalaz ile ilgili araştırmalar başlamıştır. Thenard 1811'de H₂O₂'i keşfetmiş ve canlıda kendi kendine parçalandığını belirtmiştir (Zamocky ve Koller, 1999). Schönbein ise 1863'de H₂O₂'i bir maya ürünü olarak tanımlamıştır. İlk olarak Loew 1901 yılında H₂O₂'in katalaz ile kendi kendine parçalandığını bulmuşsa da katalazın aktif merkezinde demir bulunduğu ve siyanür ile karakteristik olarak inhibisyona uğradığı ancak 22 yıl sonra Warburg tarafından ortaya çıkarılmıştır. Wieland 1927'de katalazın oksidasyon mekanizmasını ortaya çıkararak H₂O₂'in elektron vericisi olduğunu belirtmiştir. Stern 1936'da katalazın aktif bölgesinde protoporfirin IX aktif grubunun bulunduğunu gösterirken 1 yıl sonra Summer ve Dounca sığır karaciğeri katalazını (BLC) kristal olarak elde etmeyi başarmışlardır. 1947 yılında Chance katalaz ve hidrojen peroksit arasında oluşan birinci kompleksi (Bileşik I) keşfetmiştir (Dinçer, 2005).



İlk prokaryotik katalaz Herbert ve Pinsent tarafından *Micrococcus luteus*'dan saflaştırılmıştır. 1976 yılında BLC Eventof ve ark. tarafından saflaştırılmış ve 1981 yılında Murthy ve ark. tarafından 2.5 Å çözünürlükte X ışını analizi yapılmıştır. Kirkman ve Gaetani 1984 yılında BLC'ye NADPH'in sıkıca bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Katalaz turnover sayısı oldukça yüksek olan bir enzimdir. Örneğin, *Pichia pastoris* kaynaklı

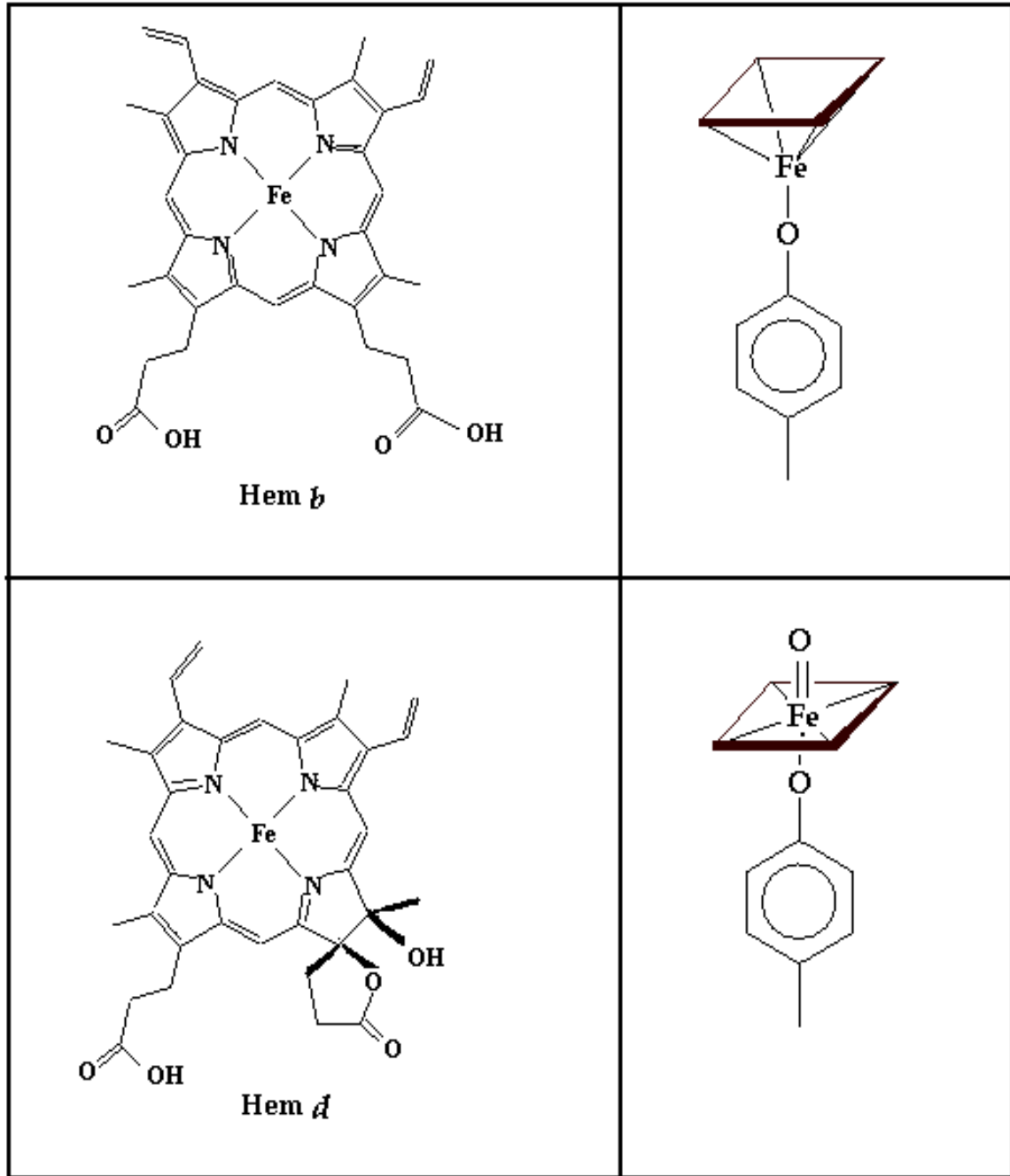
katalazın turnover sayısı $8,5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, *Escherichia coli* kaynaklı katalazın $1,63 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, keçi akciğeri kaynaklı katalazın $2,17 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Sığır karaciğer ve eritrosit katalazının turnover sayıları ise aynı olup $2.25 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ olarak bildirilmiştir (Potapovich ve ark., 2001; Claiborne ve Fridovich, 1979; Chatterjee ve Sanwal 1993; Ogura ve Yamazaki, 1983).

Katalazlar homotetramer bir yapıya sahiptir. Her bir alt birimi kovalent bağlı olmayan yüksek spinli Fe (III) içeren ve protoferrihem (protoporfirin IX) olarak bilinen hem prostetik grubu içerir (Şekil 1) (Chelikani, 2004).



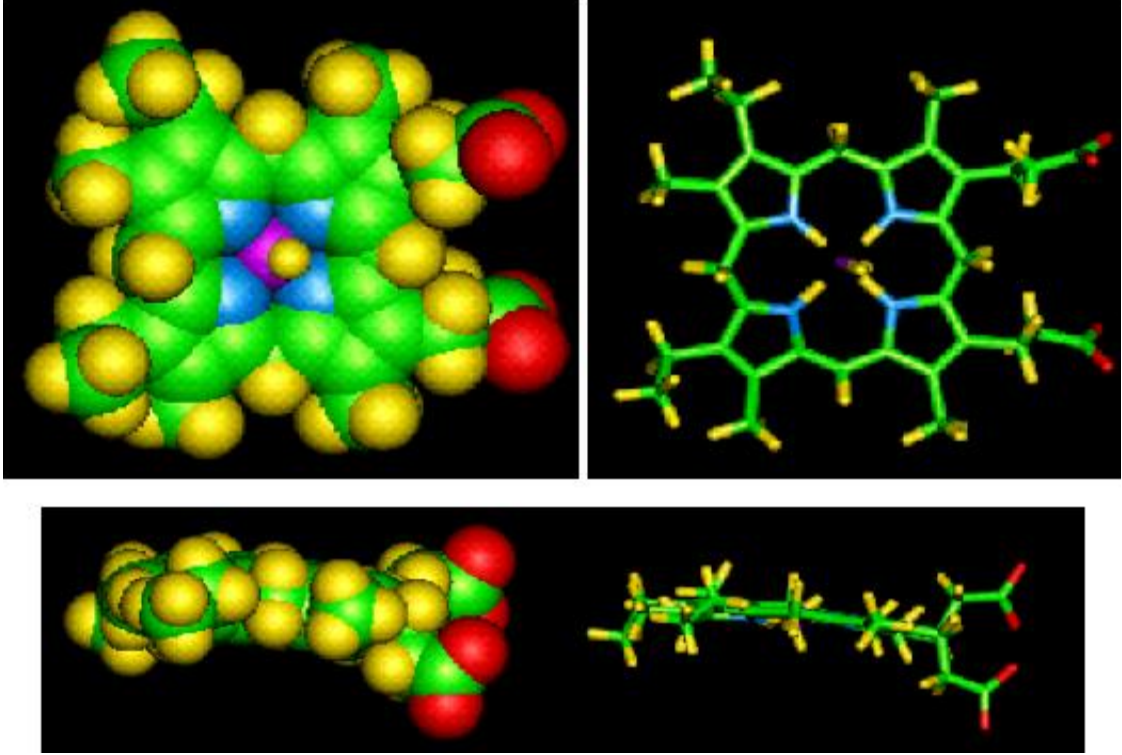
Şekil 1. Ferriprotoporfirin IX yapısı

Farklı kaynaklara ait katalaz moleküllerinin çoğu *hem b* prostetik grubunu içerirken, az sayıda mantar ve bakteriyel katalaz *hem d* grubunu içermektedir. Sığır karaciğer katalazının molekül kütlesi 240 kDa olup, dört tane alt ünitesi vardır. İzoelektrik noktası (pI) ise 5,4'tür (Vasudevan ve Weiland, 1994).

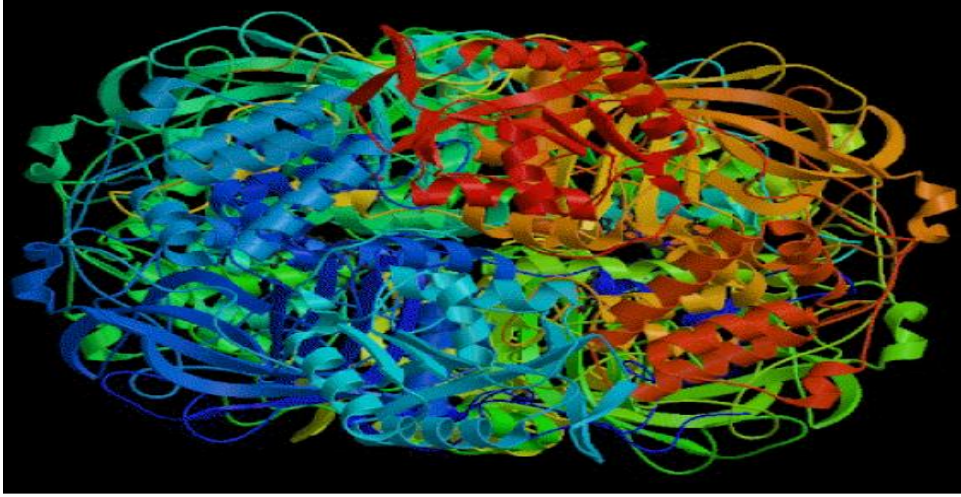


Şekil 2. Katalazın prostetik grubu olan *hem b* ve *hem d*'nin yapısı (Vasudevan ve Weiland, 1994).

Hem içeren katalazlar karakteristik olarak 420 nm'de Soret piki verirler. Ayrıca aktif bölgede hem grubunun merkezinde yer alan Fe^{+3} 520-550 nm arası pik vermezken, bu demir atomunun Fe^{+2} 'ye indirgenmesi sonucu bu bölgede absorbans gösterir (Dos Santos vd., 2000; Zou ve Schrepf, 2000; Ro vd., 2003; Baker vd., 2004). Katalazda hem'in 3 boyutlu yapısı ve *E.coli* katalazının 3 boyutlu yapısı Şekil 3 ve Şekil 4'de gösterilmektedir.



Şekil 3. Katalazda hem'in 3 boyutlu gösterilişi (URL-1, 2011)



Şekil 4. *E.coli* katalazının X-ışını kristalografisi ile aydınlatılmış 3 boyutlu yapısı (URL-1, 2011)

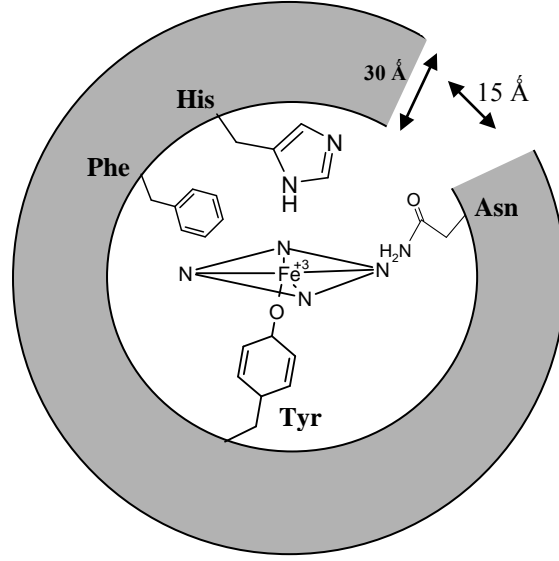
1.2.1. Katalazın Yapısı

Birçok farklı türde katalazın X-ray çalışmaları yapılmıştır. Katalazlar bazı farklılıklar göstermelerine rağmen genel bir yapıya sahiptirler. BLC'den elde edilen katalazın yapısı ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Unwin, 1975). Tek işlevli katalazlar tetramer yapıya sahiptirler. Her bir alt birim, ortasında gömülü bir hem ve yüzeylerinde uzanmış bir

NADPH içerir (Bravo vd., 1997). Yalnızca bitkisel katalazlarda NADPH bulunmamaktadır (Beaumont vd., 1990). NADPH'in katalitik aktivite için gerekli olmadığı, katalazı H_2O_2 substratının oksidasyonundan koruduğu belirtilmiştir (Chuan vd., 1988). Ayrıca, NADPH'in enzimin inaktif formunu indirgeyerek aktif duruma getirdiği tahmin edilmekte (Kirkman ve Gaetani, 1984; Green, 2001;), fakat mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Hillar vd., 1994; Olson ve Bruice, 1995). Bunun yanında katalazın bu grubundan dolayı ATP sentezinde kullanıldığı literatürlerde yer almaktadır (Villaume vd., 1988).

Hem, protoporfirin halkası ve bu halkanın merkezinde bir demir (Fe) atomu içeren yapıya sahiptir. Protoporfirin halkası, dört pirolinin metan köprüleri ile birbirine bağlanmasından oluşur. Bu demir atomu ferrous (Fe^{2+}) veya ferrik (Fe^{3+}) okside formlarında olabilir. Her bir alt birimi 30 Å uzunluğunda ve 15 Å genişliğinde huni şeklinde bir substrat giriş kanalına sahiptir (Şekil 5) (Murthy, 1981; Belal vd., 1989). Bu kanalın giriş kısmında hidrofilik aminoasit, hem merkezine doğru daralan kısmında ise hidrofobik aminoasit birimleri yer almaktadır. Bu dar kanal, H_2O_2 den daha büyük moleküllerin aktif bölgeye girişlerini önlemektedir (Belal, 1989). Heme yakın ve uzak olan bölgeler oldukça farklı çevrelere sahiptirler. Heme yakın olan bölge Val¹⁴⁵, His²¹⁷, Pro³³⁵, Arg³⁵³, Ala³⁵⁶ ve Tyr³⁵⁷ aminoasitleri ile çevrelenmiştir (Reid vd., 1981; Fita vd. 1985).

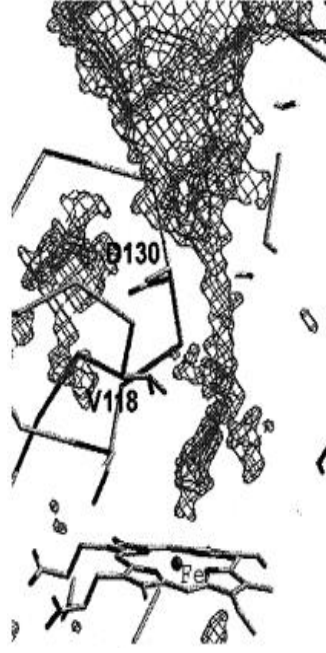
Protoporfirin'in dört azotu ile dörtlü koordinasyonunu oluşturan merkezdeki demir atomu 5. koordinasyonunu tirozinin (Tyr³⁵⁷) fenolik grubunun oksijeniyle gerçekleştirir. Tyr ile Fe arasındaki bağın uzunluğu 1.9 Å civarındadır. Fe tarafından elektronlar güçlü olarak çekileceği için, fenolik oksijen protonunu bırakır. Arg³⁵³, tirozin fenolunun pKa değerini düşürerek Tyr³⁵⁷ iyonlaşmasını kolaylaştırır (iki aminoasit uçları arasındaki mesafe 3.5 Å civarındadır).



Şekil 5. Katalazın aktif bölgesinin şematik gösterimi (Belal vd., 1989).

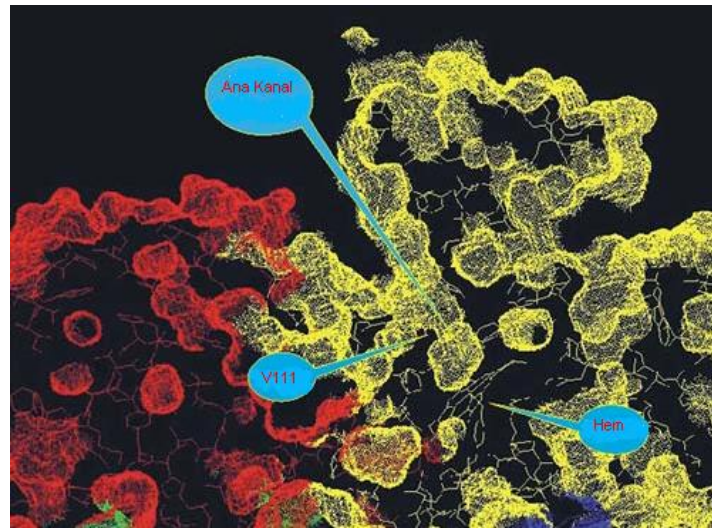
Heme yakın bölgenin çok sınırlandırılmış olmasına rağmen kanalın yüzey bölgeleri çok az sınırlandırılmıştır. Heme yakın bölgedeki aminoasitler β -silindir bir yapı oluştururlar. Bu bölge, hem pirol halkalardan bir tanesine paralel olarak yerleşmiş fenilalanin (Phe¹⁶⁰), Histidin (His⁷⁴) ve farklı bir pirol halkasıyla hidrofobik etkileşen Valin (Val¹⁷³) birimi içermektedir (Reid vd., 1981; Fita ve Rossmann, 1985). Bu yapılanma, Arg¹¹¹ ve Thr¹¹⁴ birbirleriyle etkileşmesiyle daha kararlı bir hal oluşturmakta ve bu da enzimatik aktivite ile direkt ilişkili olmaktadır (Fita ve Rossmann, 1985).

Son yıllarda, CatF (Carpena vd., 2003) ve HPII varyantlarından (Melik-Adamyanyan vd., 2001) elde edilen katalazlarda yapılan yapısal çalışmalar, katalazlardaki kanalların iç yüzlerinin mimarisinin önemini ortaya koymaktadır. Katalazlarda, hem içeren aktif bölge ile dış yüzey arasında bağlantıyı sağlayan üç kanal mevcuttur (Şekil 6). Ana kanal, H₂O₂'in ilk giriş yaptığı ve hem düzlemine dik olarak yaklaşan kanal olarak bilinmektedir (Amara vd., 2001; Kalko vd., 2001). İkinci kanal, hem düzlemine yakındır. Bu kanal tali veya yakın kanal olarak adlandırılmıştır. HPIII'de yakın kanalın rolünü ispatlayacak çok sayıda kanıt mevcuttur. Bu kanalın içinde yerleşmiş Glu-Arg iyonik çiftinden Arg²⁶⁰'in uzaklaştırılmasıyla büyüyen kanalın aktiviteyi 3 kat arttırdığı gözlenmiştir. Üçüncü kanalın, hem ile merkezi kavite arasındaki dengeyi muhafaza ettiği düşünülmektedir. Fakat üçüncü kanalın bu rolünü ispatlayan bir kanıt mevcut değildir (Melik-Adamyanyan vd., 2001).



Şekil 6. Aktif bölgede bulunan kanalın yapısı (Evans, 1993; Kleywegt vd., 1994).

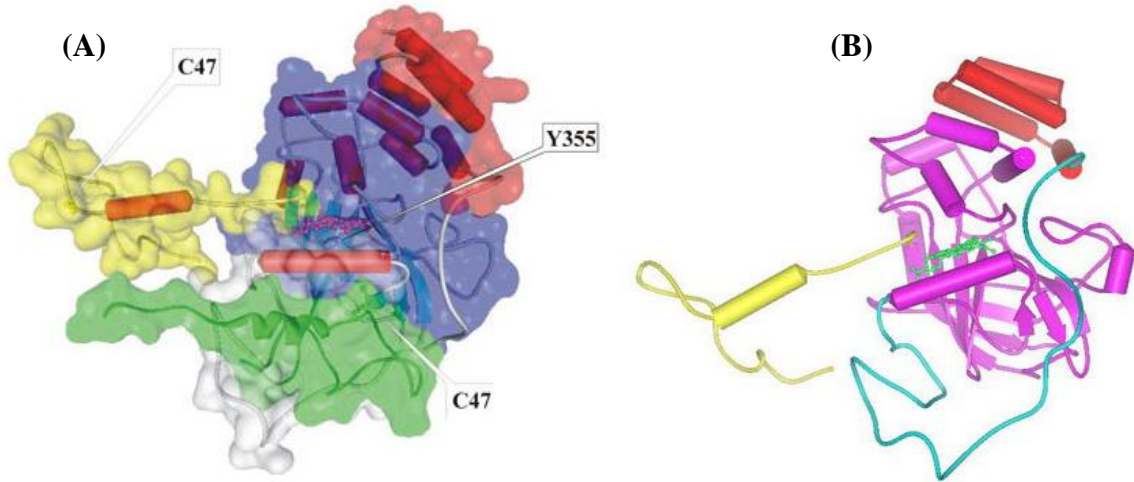
Hamur mayasından (SCC-A) elde edilen katalaz A'nın kanal boyunun yaklaşık 26 Å uzunluğunda, girişinin çapı 17 Å ve en dar kısmının çapı 4,5 Å civarında olduğu belirtilmiştir. Bu kanaldan taşınması gereken substratlar hem ve histidinle etkileşmeden Val¹¹¹ tarafından korunmaktadır (Şekil 7). Ayrıca, Val¹¹¹ tarafından biçimlenmiş bu kanalın girişi hem ile çözücü faz arasındaki etkileşimi kontrol etmektedir (Berthet vd., 1997; Zamocky vd., 1997; Zamocky ve Koller, 1999).



Şekil 7. Hamur mayasından elde edilen katalaz A'nın kanal yapısı (Koller, 2005).

Her bir alt birim dört bölge içermektedir. Bu bölgeler; N-terminal kolu, anti paralel yerleşmiş 8 tane β -silindir yapı, diğer iki bölgeyi saran sargılama bölgesi ve α -heliks bölgesi olarak adlandırılmaktadırlar (Şekil 8). Katalazlarda bu N-terminal bölgesi oldukça benzerlik göstermekte ve ilk katalitik histidinin de içinde bulunduğu 48-50 amino asit birimi içermektedir. Bu bölge bir α -heliks yapı ve hem ile etkileşimi sağlayan önemli aminoasit birimlerinden meydana gelmektedir. β -silindir bölgesi, dört β -birimi ile bunu izleyen üç α -heliks ve sonra tekrar dört tane β -biriminden oluşan bir yapıya sahiptir. İlk dört β -birimi hem cebinin uzak bölgesinin aminoasit birimlerini içermektedir. Diğer dört β -birimi, katalazların kofaktörü gibi olan NADPH'ın bağlandığı bölgeyi oluşturmaktadır.

Bu bölge yaklaşık 264 amino asitten oluşur ve katalazın alt birimleri için oldukça önemlidir. Sargılama bölgesi heliks ile β -silindir bölgelerine bağlanmış durumdadır. Bu bölge, heminin yakın çevresini oluşturan ve ikincil yapının oluşmasında rol oynayan aminoasitlerin de yer aldığı, α -heliks yapıya sahip 110 aminoasit biriminden meydana gelmektedir. α -heliks bölgesi ise β -silindir bölgesinde yer alan üç heliks birimiyle etkileşen dört α -heliks birimden oluşmaktadır. α -heliks bölgesi yaklaşık 60 aminoasit birimi içermektedir (Bravo vd., 1997).



Şekil 8. Alt birim bölgelerinin şematik gösterimi (Sarı, N-terminal ucu; mavi, β -silindir bölgesini; beyaz, sargılama bölgesini; pembe, hem birimini; kırmızı, ikinci alt birimin N-terminal ucunu göstermektedir) (Koller, 2005).

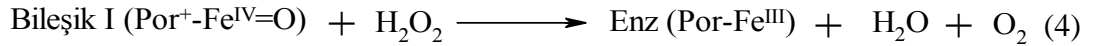
1.2.2. Katalaz Türleri

1.2.2.1. Tek İşlevli Katalazlar

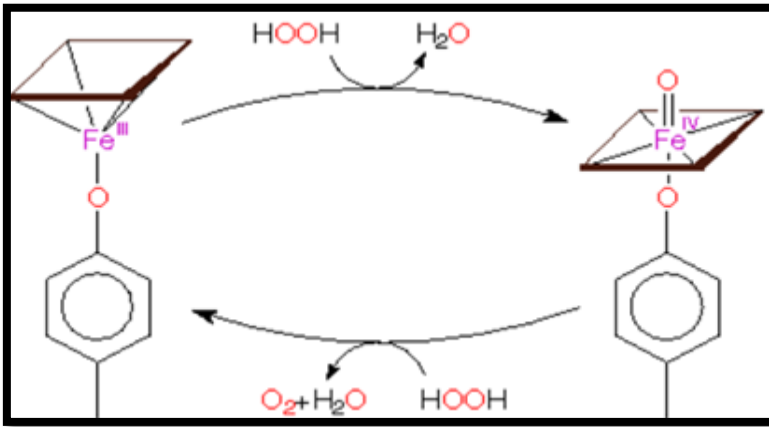
Tek işlevli katalazlar, doğada oldukça geniş bir yayılım gösterirler. Bu tür katalazlar, hem içeren 60-75 kDa arasında molekül ağırlıklarına sahip alt birimler içermektedirler. Tek işlevli katalazların, H₂O₂'yi bozmaları iki adımda gerçekleşen bir reaksiyon mekanizması içermektedir. Birinci adım; bir oksijen peroksit molekülü katalazın hem demiri ile etkileşerek, oksijence zengin demir peroksit (Porfirin katyon radikali; bileşik I) ve bir mol su oluşturmasıyla gerçekleşir (Dounce, 1983; Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999; Dinçer, 2000; Chelikani, 2004).



İkinci adım; başka bir H₂O₂ molekülünün bileşik I ile reaksiyona girerek su ve oksijene indirgenmesiyle son bulur (Dounce, 1983; Chaudiere vd., 1999; Dinçer, 2000; Chelikani, 2004).



Görüldüğü gibi reaksiyonda katalitik aktiviteyi Fe(III) göstermektedir. Anderson ve Dawson 1991 yılında katalaz enziminin reaksiyon mekanizmasının Şekil 9'daki gibi olduğunu öne sürmüşlerdir.

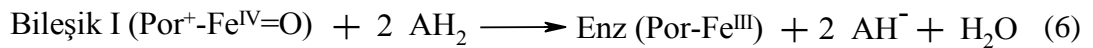


Şekil 9. Katalazın etki mekanizması (Anderson ve Dawson, 1991).

Katalazlar düşük substrat konsantrasyonları hariç Michaelis-Menten kinetiğine uymazlar ve yüksek H₂O₂ konsantrasyonlarında, farklı katalazlar farklı şekilde etkilenirler. Bazı küçük alt birimli katalazların, 300-500 mM H₂O₂ konsantrasyonunun üzerine çıktığında inhibe olduğu ve bu katalazlara ilişkin hazırlanan substrat doygunluk eğrisinin düşük substrat konsantrasyonlarında ekstrapolasyon olmasından dolayı Michaelis-Menten kinetiğindeki V_{maks} değerine ulaşamadığı görülmüştür. Büyük yapılı alt birimlere sahip katalazlar, 3 M H₂O₂ üzerinde inhibe olmaya başlamış ve V_{maks} değerine ulaşamamıştır. Bu nedenle, elde edilen V_{maks} ve K_m değerleri Michaelis-Menten kinetiğine uymadığı için yanıltıcıdır. Katalazların protein dizilerindeki farklılıklar, oldukça farklı reaksiyon eğilimlerinin ve substrat ilgilerinin olmasından kaynaklanmaktadır (Chelikani, 2004). Ayrıca, tek işlevli katalazlar ditiyonitli ortamda aktivite kaybına karşı direnç gösterirler ve kolay indirgenemezler (Terzenbach ve Blaut, 1998).

1.2.2.2. Katalaz-Peroksidazlar

Katalaz-Peroksidazlar (KP) çok az farklı protein dizisi, tersiyer ve kuarter yapı gösterdikleri için, tek işlevli katalazların göstermiş olduğu reaksiyon adımlarına benzer reaksiyonlar gösterirler. Bunun nedeni, her iki enzimin de hem grubu içermesi ve aktif bölgelerinin benzer işlevlere sahip olmasıdır. Peroksidatif aktivite, ikinci adımda hidrojen peroksit yerine organik bir donör kullanılmasıyla bileşik I' in iki elektron transfer etmesi sonucunda indirgenmesinden kaynaklanmaktadır (Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999; Halliwell, 1999; Carpena vd., 2003).



A; etanol, metanol, nitrit, kinol gibi herhangi bir hidrojen verici substrattır (Halliwell, 1999).

İlk olarak, katalaz-peroksidaz HPI *E. coli*' den 1979'da (Claiborne vd., 1979) izole ve karakterize edilmiştir. İlk katalaz-peroksidaz gen dizisi, 1988 yılında (Triggs-Raine vd., 1988) *katG* gen dizisiyle ortaya çıkmış ve filogenetik olarak, bitki peroksidazlarıyla bağlantılı olduğu görülmüştür (Chelikani, 2004). Anti-verem ilaçlarında yaygın olarak kullanılan izoniazidin aktivasyonunu (INH) *Mycobacterium tuberculosis*'deki KatG'nin

sağladığı ve katalaz-peroksidazları görünür hale getirdiği bulunmuştur (Zhang vd., 1992). Bu proteinin, ilaçla olan bu etkileşiminden dolayı dünyanın birçok yerinde, moleküler seviyede karakterize edilebilmesi için kristallendirme çalışmaları yapılmıştır. 1987’ de yapılan *E. coli*’ den HPI ve *M. tuberculosis* katalaz-peroksidaz kristallendirme çalışmaları başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Katalaz peroksidazların kristallendirilmesi ilk olarak, halofilik archaebacterium *Haloarcula marismortui*’nde elde edilen katalaz-peroksidazla (Yamada vd., 2001) gerçekleştirilmiş, bunu bir siyanobakteri olan *Synechococcus*’dan (Wada vd., 2002) ve gram negatif bakteri olan *Burkholderia pseudomallei* (BpKatG)’den (Carpena vd., 2002) izole edilen, katalaz-peroksidazların kristallendirilmesi takip etmiştir.

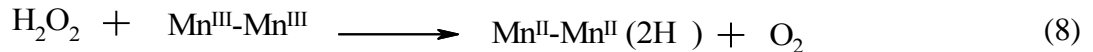
Katalaz-peroksidazların yapısı, iki dimerik alt birimin asimetrik yerleşmesinden oluşmaktadır. Katalaz-peroksidazların her alt biriminde, 20 α -heliks yapıya sahip birimlerin üç veya dört β -silindir yapısına sahip birimlerle birbirine bağlanmasıyla oluşan yapıları, tek işlevli katalazlardan oldukça farklılık göstermektedir (Carpena vd., 2002). Katalaz-peroksidazın yapısının en çok göze çarpan özelliği, aktif bölgesinde bulunan Trp’nun (BpKatG 111. aminoasit) indol halkasının ve Met’inin (BpKatG 264. aminoasit) kükürdünün, Tyr (BpKatG 238. aminoasit) halkasına orto-pozisyonundan kovalent olarak bağlanmasıdır. Bu yapı, elektron yoğunluk haritasıyla açık bir şekilde ortaya konulmuştur. Ama bu kovalent bağ beklenenden biraz daha uzun ve incedir. Tyr ile Trp arasındaki bu kovalent bağ düzlemsel olduğu için, tam bir sp^2 hibrit karakterine sahip değildir (Donald vd., 2003). Aktif bölgede bulunan Trp, katalitik aktivite için önemlidir. Trp’inin Phe ile yeri değiştirildiğinde, KP’in katalitik aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir (Regelsberger vd., 2000; Hillar vd., 2000; Regelsberger vd., 2001). Met²⁶⁴ ve Tyr²³⁸ için yapılan yer değiştirme çalışmalarında, katalaz aktivitesinin benzer şekilde etkilendiği, fakat peroksidaz aktivitesinin değişmediği belirtilmiştir. Bunun sonucunda da, bu üçlünün katalitik aktivite için gerekli olduğu, peroksidatik aktivite için gerekli olmadığı bulunmuştur (Donald vd., 2003; Jakopitsch vd., 2003).

1.2.2.3. Mangan-Katalazlar (Pseudokatalaz)

Mangan-katalazlar (MK) önceleri, hem grubu içermedikleri için pseudokatalazlar olarak anılmışlardır (Kono ve Fridovich, 1983). Sonraları, yapılarına daha uygun olduğu düşünülen Mn-içeren (Allgood ve Perry, 1986), hem içermeyen (Nicholls vd., 2001), dimanganez katalaz (Antonyuk vd., 2000) olarak adlandırılmışlardır. Hem içermeyen katalazlar, hem içeren katalazlar gibi geniş bir dağılım göstermemekte ve yalnız birkaç tür

bakteride bulunmaktadır. Bu tip enzimlerin doğada yaygın olarak bulunmamasının nedeninin, diğer katalazlara göre, daha az özgün aktiviteye sahip olmaları ve birçok bakteride karmaşık yapılarda bulunuyor olmalarından dolayı olduğu düşünülmektedir (Klotz ve Loewen, 2003).

Mangan-katalazların hem içeren katalazlar gibi reaksiyonları, iki adımda gerçekleşmekte ve benzer şekilde son bulmaktadır. Dimanganez grubunun okside olduğu aşamada, hem 2,2 (Mn^{II}-Mn^{II}) hem de 3,3 (Mn^{III}-Mn^{III}) hallerinin ikisi de eşit oranda bulunmaktadır. Bu durum, enzimin izole edildiğinde bu iki halde bulunmasından ortaya çıkarılmıştır. Bu indirgenme ve yükseltgenme işlemi, enzimin kararlı halde olmasına bağlı olarak geçici olmadığı belirtilmiştir. Şayet 2,2 hali H₂O₂ ile reaksiyona girerse yükseltgenme (Reaksiyon 7), 3,3 hali H₂O₂ ile reaksiyona girerse indirgenme (Reaksiyon 8) gerçekleşir.



Bu reaksiyonlar hem içeren katalazların reaksiyonlarına benzeseler bile, genel olarak farklılık göstermektedirler. Yükseltgenmenin aktif bölgedeki elektronların uzaklaştırılmasıyla gerçekleştirilmesine rağmen, reaktif olan bir ara ürün oluşmamaktadır. Sonuç olarak, ikinci adım reaktif bir ara ürünün indirgenmesini içermemekte, basit bir elektron transferi ile elektronların dimanganez merkezine iletilmesiyle oksijen oluşmaktadır. Hem içeren katalazlarda iki adımda iki mol su üretilirken, MK'larda ilk adımda iki mol su üretilmektedir.

Thermus thermophilus (TTK) (Antonyuk vd., 2000) ve *Lactobacillus plantarum* (LPK) (Barynin vd., 2001)'den elde edilen MK'nın kristallerinde yapılan iki çalışma, bu enzimlerin katalitik merkezlerinde bir dimanganez grup içerdiklerini göstermektedir. Bu enzimler, bir alt biriminin yaklaşık ağırlığı 30 kDa olan homo-hekzamerik bir yapıya sahiptirler. Ayrıca, bu iki enzim C-uçlarındaki farklılıktan dolayı kendilerine özgü dörtlü-heliks yapılarına sahiptirler. Bunların dimanganez merkezlerinin mikro çevreleri benzerlik göstermektedir. Her ikisindeki Mn atomu glutamat ve histidin ile direkt koordinasyon oluşturmuştur. Bu iki enzimin aktif bölgesindeki farklılık, LPK'daki glutamatın yerini TTK'da argininin almasından kaynaklanmaktadır (Chelikani, 2004).

1.2.3. Katalazın Kullanım Alanları

Katalazın, oksitleyici, ağartıcı veya sterilize edici olarak kullanılan H_2O_2 'nin fazlasının uzaklaştırılması için endüstride, glukoz veya H_2O_2 biosensörlerinin bileşeni olarak analitik uygulamalarda kullanımı mümkündür. Katalazın H_2O_2 'nin uzaklaştırılması, çeşitli bileşiklerin sentezinde farklı enzimlerle birlikte kullanımı ve analitik amaçlı kullanımı ile ilgili bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

1.2.3.1. H_2O_2 'nin Uzaklaştırılması Amacıyla Kullanımı

Özellikle sıcak bölgelerde sütün sağılmasından sonra işlenmesine kadar geçen sürede veya peynir altı suyunun işlenmek üzere taşınması sırasında mikrobiyal kirleticilerin çoğalmasının engellenmesi için özel soğutma ünitelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Soğutma zincirinin kurulamaması veya soğutma işleminin maliyetinin yüksek olması nedeniyle soğutmaya alternatif olarak Dünya Gıda ve Tarım Örgütü ve Birleşmiş Milletler Tarım Örgütü'nün izin verdiği miktarlardaki H_2O_2 (%0,05-%0,25) süte eklenmektedir. Ancak, sütün işlenmesinden hemen önce sütteki (veya peynir altı suyundaki) H_2O_2 'nin toksik etkisinin önlenmesi için katalaz kullanımı önerilmektedir (Tarhan 1995, Uhlig 1998).

Pamuklu kumaşın H_2O_2 ile ağartılmasından sonra boyama işleminden (özellikle O_2 'ye duyarlı boyaların kullanımı) hemen önce H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında yaygın olarak kullanılan yöntem su ile yıkamaktır. Bu amaçla 1 kg dokumanın işlenmesi sırasında yaklaşık 100 L su tüketilmektedir. Klasik yöntemde H_2O_2 'nin uzaklaştırılması amacıyla $Na_2S_2O_3$ ve $Na_2S_2O_4$ kullanılmakta, ancak bu bileşiklerin kullanımında suda istenmeyen yüksek tuz derişimine neden olmaktadır. Bu yöntemine alternatif olarak H_2O_2 içeren yıkama suyundaki H_2O_2 'nin parçalanması ve yıkama suyunun tekrar sisteme kazandırılması için katalaz aktivitesinden faydalanılabilir (Paar, 2001). Katalazın kullanımı ile enerji tüketiminde %48, kimyasal tüketiminde %83, su tüketiminde %50 ve işlem süresinde %33 azalma sağlanmaktadır (Eberhardth, 2004).

Pet şişelerin ve plastik kapların düşük sıcaklıklarda sterilizasyonu amacıyla kullanılan H_2O_2 'nin işlem sonrasında uzaklaştırılması amacıyla katalaz kullanılabilir (Lida ve ark., 2000).

Kâğıt sanayisinde kâğıdın ağartılmasından sonra kalan H_2O_2 'nin, reçine ve plastik üretiminde oksitleyici ve köpükleştirici olarak kullanılan H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında katalaz kullanılabilir (Wiseman,1986).

1.2.3.2. Katalazın Çeşitli Enzimler İle Birlikte Kullanımı

- Glikolat oksidaz enzimi ile birlikte glikolik asitten glioksilik asit üretiminde
- D-aminoasit oksidazlarla birlikte D-aminoasitlerin α -keto asitlere dönüştürülmesinde (Lafuente ve ark.,1998)
- L- α gliserofosfat oksidaz ile birlikte dihidroksi aseton fosfat sentezinde (Kramer ve ark.,1997; Streitenberger ve ark., 2002),
- Glukoz oksidaz (GOD) enzimi ile birlikte glukonik asit üretiminde ve glukoz veya oksijenin gıdalardan uzaklaştırılmasında (Godjevargova ve ark., 2004),
- Piranoz 2-oksidad ile birlikte 2-ketoaloz üretiminde (Sukyai ve ark., 2008) kullanılmaktadır. (Seip ve ark., 1994),

1.2.3.3. Katalazın Analitik Amaçlı Kullanımı

- H₂O₂'nin miktarının belirlenmesi amacıyla biyosensörlerde (Campanella ve ark., 1998; Ertaşve ark., 2000; Varma ve ark., 2005; Salimi ve ark., 2005; Jiang ve ark, 2008; O'Brien ve ark., 2008; Modrzejewska ve ark. 2007; Prakash ve ark., 2009),
- GOD ile birlikte kan, serum vb. çeşitli örneklerde glukozun belirlenmesi için biyosensörlerde (Santoni ve ark., 1997; Ramanathan ve ark., 2001; Gao ve ark., 2007),
- Yaban turpu peroksidazı (HRP) ile nitrit miktarının belirlenmesi için biyosensörlerde (Chen ve ark., 2008),
- Meyve suları gibi çeşitli örneklerde azid miktarının belirlenmesi için biyosensörlerde (Sezgintürk ve ark., 2005; Cui ve ark., 2006),
- L-glutamat oksidaz ile birlikte γ -aminobutirik asitin belirlenmesi için biyosensörlerde (Liang ve ark., 2000) kullanılmaktadır.

1.3. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon terimi bir reaktör veya analitik sistem içinde biyolojik olarak aktif katalizörün tutuklanmasını ifade eden bir terimdir. Biyokatalizör ister tek bir enzim olsun isterse enzim karışımı veya bir canlı hücre olsun, taşıyıcı materyal üzerinde veya içinde tutuklanmıştır. İmmobilize kompleks katı desteğin fiziksel karakteristiklerini gösterirken serbest katalizörün temel biyokimyasal aktivitesine de sahiptir. İmmobilizasyon, özel bir modül üzerinde çözünür olmayan bir kompleks oluşturarak akışkanın kolayca geçmesini sağlar. Bir başka deyişle immobilizasyon, heterojen kataliz prensiplerinin biyolojik sistemlere uygulanmasıdır. İmmobilizasyon teknolojisi kimya, biyokimya ve hücre biyolojisi disiplinleri ile biyokimyasal ve proses mühendisliklerini birleştirir (Aktaş, 2004).

İmmobilize enzim “enzimin kinetik aktivitesini kaybetmeden belli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi veya hapsedilmesi” olarak adlandırılır (Chibata, 1978). İmmobilizasyon terimi sadece enzimlere değil hücreler, mikrobiyal hücreler, bitki ve hayvan hücreleri gibi tüm biyokatalizör tiplerine de uygundur (Tanaka ve Kawamoto, 1999).

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. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. 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 (Özyılmaz, 2005).

Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümlenebilmek ve enzimleri endüstri alanında daha çekici hale getirmek için, enzim immobilizasyonu üzerinde yapılan çalışmalar hızlanmıştır. Enzimler suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren ve kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya mikrokapsüllerde tutuklamalarla immobilize edilirler (Özyılmaz, 2005).

İmmobilize enzimin serbest enzime üstünlükleri şunlardır (Telefoncu, 1997):

- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilir.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Bazı durumlarda serbest enzime göre daha yüksek aktivite gösterebilir.

Enzimlerin çözünmeyen destek görevi gören materyaller (matriksler) yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmeleri immobilizasyon olarak tanımlanabilir. Bu yolla, enzim moleküllerinin hareketinin sınırlandırıldığı, durağanlaştırıldığı ifade edilir. Immobilizasyon tekniğinin sunduğu avantajlar; katalitik gücünün önemli ölçüde stabilize edilerek korunmuş olması, tekrar kullanılabilirliğinin sağlanması, ürünlerin yüksek saflık derecesinde kolaylıkla elde edilebilmesi, sürekli ve büyük ölçekte üretime olanak tanınması, kısa işlem süresi ve düşük üretim maliyeti olarak sıralanabilir (Gouda, 2001).

İmmobilize enzimin verimini ve performansını belirleyen üç temel parametre; seçilen enzimin özelliği, taşıyıcı destek materyalinin özellikleri ve seçilen immobilizasyon yöntemidir. Bu faktörlere bağlı olarak enzim aktivitesinde kayıplar meydana gelebilir ve tutuklu enzimin aktif bölgesi ve reaksiyon ortamı ara yüzeyinde, substrat ya da ürünün taşınmasına difüzyonel dirençten dolayı difüzyonel etkilerin ortaya çıkması söz konusu olabilir. Bu nedenle, oluşabilecek bu sınırlamalar; destek materyalinin küre yapıda hazırlanması ve parçacık boyutunu küçülterek geniş yüzey alanı sağlanması, yüksek spesifik aktiviteye sahip olan enzimlerde enzim yükleme miktarını azaltmak ve enzimi destek materyalinin dış yüzeyine bağlanması yoluyla en minimum düzeyde tutulabilmektedir (Tischer, 1999).

1.3.1. İmmobilizasyon İşleminde Kullanılan Matriksler

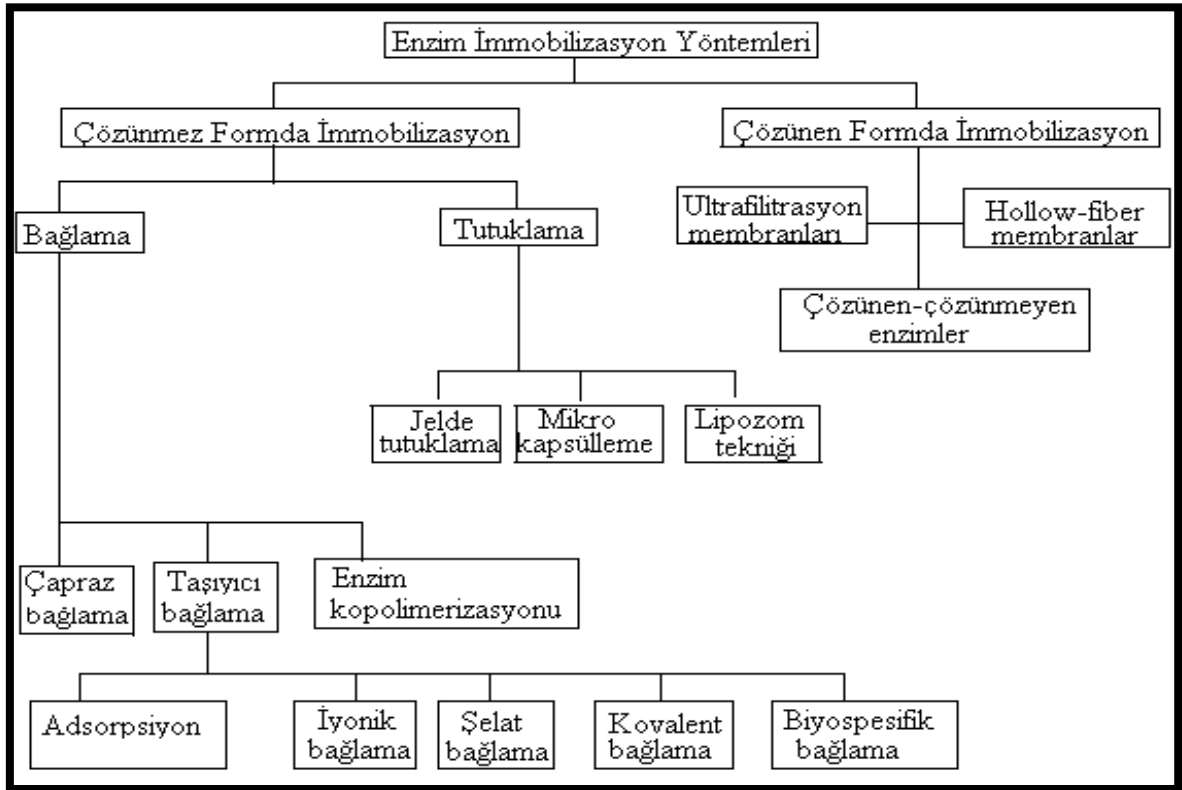
Enzim, protein gibi biyolojik moleküllerin immobilizasyonunda kullanılmak üzere çok sayıda destek materyali geliştirilmiştir. Bu doğrultuda, sürekli işletim koşulları altında uzun süre kararlılığını koruması amacı ile enzimlerin, farklı doğal veya sentetik katı destek materyallerine immobilizasyonu ve optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Alüminyum oksit, bentonit veya silikajel gibi anorganik kökenli materyaller, kitosan, kitin, nişasta, aljinat, selüloz gibi doğal kökenli polimerler ve/veya stiren veya türevleri, naylon, akrilamit veya akrilat kökenli polimerler, çeşitli iyon değiştiriciler enzim immobilizasyonu uygulamalarında başarı ile uygulanmıştır. Bu materyaller kontrol edilebilir boyut dağılımına ve gözenek çapına sahip olarak üretilebilmelidir (Akgöl, 2002).

1.3.2. Enzim İmmobilizasyon Metodları

İmmobilize edilecek enzimin özelliklerini bilmek ve bu özelliklere uygun destek materyal tipi ve immobilizasyon yöntemi belirlemek başarılı bir immobilizasyon için gerekli şartlardan birisidir. Kullanılacak enzimin izoelektrik noktası, sıcaklık, iyonik şiddet ve pH gibi çevre koşullarına karşı toleransı ve üç boyutlu yapısı gibi özellikler immobilizasyon işlemi sonrasında da enzim aktivitesinin korunabilmesi için enzim hakkında bilinmesi gereken önemli verilerdir (Bayramoğlu vd, 2005).

Enzimlerin katı desteklere tutuklanması işleminde kovalent bağlanmadan adsorpsiyona ya da fiziksel tutuklamaya kadar birçok immobilizasyon yöntemi kullanılmaktadır (Şekil 10) (Telefoncu, 1997).



Şekil 10. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Telefoncu, 1997).

İmmobilizasyon yöntemleri; çözünmez formda immobilizasyon ve çözünür formda immobilizasyon olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Alptekin, 2009).

1.3.2.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon Yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri, bağlama ve tutuklama olmak üzere ikiye ayrılır (Alptekin, 2009).

➤ Bağlama yöntemi; çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu, taşıyıcıya bağlama olmak üzere üç gruba ayrılır.

Çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminde küçük molekülü bi- veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşturmaktadır (Govardhan, 1999; Schoevaart ve ark., 2004; Sheldon ve ark., 2005; Shah ve ark., 2006).

Enzim kopolimerizasyonu ile enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır.

Taşıyıcıya bağlama ile bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler şunlardır (Alptekin, 2009):

- Hidrofilik karakter,
- Suda çözünmeme,
- Gözenekli yapı,
- Mekanik kararlılık,
- Uygun tanecik şekli,
- Kimyasal ve termal kararlılık,
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımali,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik,
- Rejenere olabilme.

Taşıyıcıya bağlama yöntemleri; iyonik bağlama, biyospesifik bağlama, adsorpsiyon, şelat bağlama ve kovalent bağlama olmak üzere beş gruba ayrılır (Solas ve ark.):

Adsorpsiyon; yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, gözenekli cam, kül, silikajel, CaCO₃, nişasta, gluten gibi) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Nelson ve Griffen, 1916).

İyonik bağlama; iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanmaktadır (Wang, 1993).

Şelat bağlama; bu yöntemde, bazı geçiş metallere (Titan(III), Titan(IV), Zirkonyum (IV)) şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması sağlanmaktadır (Kennedy ve ark., 1983).

Biyospesifik bağlama; bu yöntemde, enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimlerden yararlanarak enzimler immobilize edilmektedirler (Telefoncu, 1997).

Kovalent bağlama; enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanması enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir (Zaborsky, 1973).

➤ Tutuklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir mekânda durmaya zorlanmaktadır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamamaktadır. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilmektedir (Alptekin, 2009).

Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olmak üzere üçe ayrılmaktadır:

Polimer matrikste tutuklama yöntemi; yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanmaktadır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir (Sperinde ve ark., 1997).

Mikrokapsülleme yöntemi; enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanır. Yarıgeçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır (Chang, 1976).

Lipozom tekniği; sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır (Regen ve ark., 1984). Yöntemin en önemli üstünlüğü; süresiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel oluşudur. Aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlar ve oldukça büyük bir temas yüzeyine sahiptir (Luisi ve Magid, 1986).

1.3.2.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin herhangi bir destekle fiziksel veya kimyasal etkileşime girmesinden çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir tekniktir (Weethall, 1976). Bu immobilizasyon yöntemi hiçbir kimyasal bileşiğin veya tekniğin kullanılmasının gerekmediği son derece kolay bir yöntemdir (Wichmann ve ark., 1981).

Substrat molekülü ne kadar küçükse membrandan geçişi o denli kolay olacağından enzimin etkinliği de o oranda artacaktır. Bu nedenle küçük moleküllü substrata sahip olan enzimlerin bu yöntemle immobilize edilmesi tercih edilebilir (Wichmann ve ark., 1981).

Kullanılan immobilizasyon tekniği ne olursa olsun immobilize edilen enzimden beklenen özellikler şunlardır (Alptekin, 2009):

- Yüksek kararlılık,
- Tekrar kullanılabilirlik,
- Sürekli üretime olanak vermesi,
- Reaksiyon kontrolüne olanak vermesi,
- Yüksek saflık,
- Yüksek ürün yüzdesi,
- Ekonomik olması.

1.3.3. Tam Hücre İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon işlemlerinde biyokatalizör olarak sadece enzimler değil hücreler, organeller, mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal hücreler de kullanılabilir. Bu şekilde dizayn edilen, enerji ve kaynak tasarrufu sağlayan ve düşük kirlilik üreten işlemler, çok az yan ürün çıkışı, düşük sıcaklık ve çevresel basınç koşulları ile avantaj sağlamaktadır. Buna karşılık, biyokatalizörler genel olarak katalitik reaksiyonlar için koşullar uygun olsa bile yüksek sıcaklık, düşük veya yüksek pH ve organik çözücülerin varlığında kolaylıkla inaktive olabilirler. Biyokatalizör serbest halde kullanılıyor ise atık reaksiyon karışımından biyokatalizörün geri kazanımı da bir başka problemdir. İmmobilizasyon bu problemlerin üstesinden gelebilecek tek yoldur. Genel olarak immobilize biyokatalizörler kararludur ve kesikli tip reaksiyonlarda tekrarlı olarak ya da akışkan sistemlerde sürekli olarak kullanılabilir (Tanaka ve Kawamoto, 1999)

Son yıllarda enzim immobilizasyonunun yanında mikroorganizma immobilizasyonu da önem kazanmıştır. Substrat, mikroorganizmanın içerdiği enzimlerden

biri için özgül ise saf bir enzim immobilizasyonu yerine bunu içeren mikroorganizmanın immobilizasyonu ve saflaştırılmasına gerek kalmayacağından ekonomik açıdan büyük yarar sağlamaktadır. Özellikle son ürün elde edebilmek için birden fazla enzimden yararlanılıyor ve problem oluşturmuyor ise enzim yerine mikroorganizma immobilizasyonu çok ekonomiktir (Tanaka ve Kawamoto, 1999).

Biyoişlemede kullanılacak olan biyokatalizör göz önüne alındığında, enzimlerin ve hücrelerin immobilizasyonu pratiktir. İmmobilize biyokatalizörlerin biyoişlemlerde kullanımları şu şekildedir (Tanaka ve Kawamoto, 1999):

- Stereospesifik ve/veya bölge spesifik reaksiyonlar ile yararlı bileşiklerin üretimi,
- Biyolojik işlemler ile enerji üretimi,
- Çevresel problemlerin çözümünde kirliliklerin seçimli arıtılması,
- Çeşitli bileşiklerin yüksek duyarlılıkta ve spesifiklikte analizi,
- Yeni ilaçların veya yapay organların üretimi

Tüm bu işlemler sadece tek bir enzimin değil daha kompleks reaksiyonların meydana geldiği multi enzim komplekslerinin de immobilizasyonunu gerektirir. Hücre ve hücreyel organeller karmaşık reaksiyonların meydana geldiği metabolik sistemlere sahiptir. Bu sebeple immobilize hücre veya organeller birleşmiş multi enzim kompleksleri olarak iş görür. Üstelik hücrelerin immobilizasyonu durumunda, hücrelerden enzim ekstraksiyonu basamağı elimine edilmiş olur. Bu durum, enzimin zamanla gelişebilecek inaktivasyonunu ve pahalı saflaştırma basamaklarını engeller ve enzimin daha kararlı koşullarda kullanımını olanaklı kılar (Tanaka ve Kawamoto, 1999)

- Bunun yanında İmmobilize hücrelerin pratik uygulamalarda göz önünde bulundurulması gereken bazı dezavantajları vardır (Tanaka ve Kawamoto, 1999):
- Hücre, istenmeyen reaksiyonları katalizleyen enzimleri de içerebileceği için istenmeyen yan ürünler sentezlenebilir. Tür seçimi, mutasyon, hücre tipine göre özel muamele veya hücrelerin genetik olarak değiştirilmesi ile bu problemlerin üstesinden gelinebilir.
- Sağlam hücrelerin hücre duvarları ve membranları genellikle substrat, ürün ve diğer reaksiyon bileşenlerinin hücre içine veya dışına geçişini engeller. Bu gibi durumlarda bariyer, immobilizasyondan önce ve sonra uygun muameleler ile yıkılmalıdır.

İmmobilize hücreler uygun besin maddelerinin devamlı sağlanması ile büyüme evresinde tutulabilir. İmmobilize büyüyen hücre tekniği, hücreler kendiliğinden

çoğaldıklarından ve kendiliğinden yenilendiklerinden dolayı avantajlıdır. Bununla birlikte, immobilize büyüyen hücreler aşağıdaki dezavantajlara sahiptir (Tanaka ve Kawamoto, 1999):

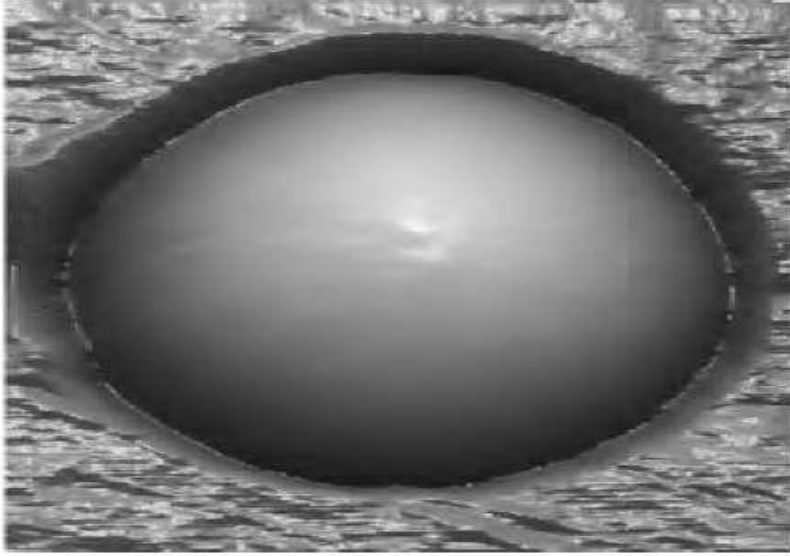
- İmmobilize büyüyen hücreler, yaşam ve büyüme durumlarını devam ettirmek için besin maddesi ve enerji kaynağına ihtiyaç duyar. Besin maddesi veya enerji kaynağı arttığında artan substrat tüketiminden dolayı ürün verimi azalabilir.
- Ürün, taşıyıcıdan kopan hücreler ile kontamine olabilir.

İmmobilize biyokatalizörlerin uygulanabilmesi için, biyokatalizörün istenilen aktiviteye ve karakteristiğe sahip olduğunu bilmek çok önemlidir. Ek olarak, uygun taşıyıcının ve immobilizasyon tekniğinin seçimi de önemlidir. Taşıyıcı ve immobilizasyon tekniği immobilize edilecek biyokatalizöre uygun olmalıdır. Bu nedenle, tüm biyokatalizör tiplerine uygun bir immobilizasyon metodu yoktur (Tanaka ve Kawamoto, 1999).

İdeal bir taşıyıcı biyokatalizör, immobilizasyon için yeterli fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Taşıyıcı ayrıca mekanik güce, fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılığa ve düşük toksisiteye sahip olmalıdır. Ek olarak, çeşitli tipteki reaktörlere immobilize biyokatalizörlerin uygulanabilmesi için taşıyıcıya farklı şekiller verilebilmesi gerekebilir. Son olarak, ekonomik uygunluğu göz önünde tutulmalıdır (Tanaka ve Kawamoto, 1999).

Yaygın olarak kullanılan en önemli taşıyıcılardan birisi agarozdur. Yüksek gözenekli yapısına ilaveten, proteinler için yüksek kapasite sağlarlar. Matriks olarak agarozu kullanmanın bazı diğer avantajları; hidrofilik karakterde olması, türevlerine dönüştürmenin kolay olması, yüklü grupların olmaması (substrat ve ürünlerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu engellemek için) ve ticari geçerliliğidir. Ancak diğer gözenekli yapılarda ve agarozun kullanımında yüksek maliyet önemli derecede sınırlanmaya neden olur. Bu problem, matriks rejenerasyonu ve tekrar kullanımına izin veren dönüşümlü metodların geliştirilmesiyle ancak çözülebilir (Chernukhin ve Klenova, 2000).

Şekil 11'de tam hücre immobilizasyonuna örnek olarak gözenekli polimer membran içerisinde immobilize edilmiş *S. Cerevisiae* hücresi görülmektedir.



Şekil 11. Atomik kuvvet mikroskopuyla görüntülenmiş gözenekli polimer membran içerisinde immobilize edilmiş *S. Cerevisiae* hücresi (URL-2).

1.3.4. Katalaz İmmobilizasyonu İle İlgili Yapılan Önceki Çalışmalar

Chaterjee ve ark., (1990), keçi karaciğer katalazını alüminyumoksit (P1), jelatin (P2), poliakriamid (P3) ve tavuk yumurtasının kabuğuna (P4) immobilize etmişlerdir. P1, P2, P3 ve P4'e immobilize edilen katalaz örnekleri için immobilizasyon sonunda sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %29,2, %65,7, %56,7 ve %17,2'sini koruduğunu, bu katalaz örnekleri için K_m değerlerinin sırasıyla 110, 200, 140 ve 200 mM olduğunu bildirmişlerdir. Katalaz örnekleri 4-6°C'de saklandığında serbest katalazın 15 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %80'ini kaybettiği, P1, P2, P3 ve P4 örneklerinin ise sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %55, %80, %27 ve %55'ini kaybettiklerini bildirmişlerdir. 5 U aktiviteye sahip P1, P2, P3 ve P4 örneklerini 5 mL'lik cam şırıngalara doldurarak 10 mL 34 mM H_2O_2 çözeltisini sırasıyla 10, 20, 24 ve 3 mL/saat akış hızlarında kolona göndermişlerdir. P1 ve P2'ye immobilize edilen katalaz örneklerinin 15 gün boyunca, P3'e ve P4'e immobilize edilen katalaz örneklerinin ise 21 gün boyunca H_2O_2 'nin tamamını parçaladığını bildirmişlerdir.

Solas ve ark., (1994), sığır karaciğer katalazını iyonik adsorpsiyon ile bioskin adı verilen *Acetobacterxylium* tarafından üretilen doğal bir polimer üzerine immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz için K_m değerlerini sırasıyla 13 mM, 7 mM ve 0,53 mM, aktivasyon enerjisini 17,68 kcal/mol K ve 4,06 kcal/mol K, optimum pH'yı 7,5 ve 7,0, optimum sıcaklığı 40°C ve 25°C olarak bildirmişlerdir. Serbest katalazın oda

sıcaklığında 3 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybettiğini, immobilize katalazın ise 16 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %70'ini koruduğunu bildirmişlerdir.

Akertek ve Tarhan, (1995), *Aspergillus niger* kaynaklı katalazı 3-APTES ve glutaraldehit ile modifiye edilmiş gözenekli SiO₂'ye kovalent olarak, alginat ve γ -karragenan jele hapsetme yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Farklı miktarlarda katalaz (0,2-1,5 mg) kullanarak 20 mg modifiye edilmiş SiO₂ için en uygun katalaz miktarını 0,55 mg olarak belirlemişlerdir. Modifiye SiO₂'ye immobilize edilmiş katalaz (P1) ve alginata immobilize edilmiş katalaz (P2) örneklerinin desteğe bağlanma miktarlarını sırasıyla 3,50 ve 16,82 mg/ g destek olarak, aktivitelerini ise sırasıyla 2086 ve 765 μ mol/dk. g olarak bildirmişlerdir. P1 ve P2 için immobilizasyon işleminden sonra kalan aktiviteleri sırasıyla %20,17 ve %1,54 olarak bildirmişlerdir. Kesikli tip reaktörde 10,5 mM ve 52,5 mM H₂O₂ derişiminde P1 için yarı ömür sırasıyla 13,4 saat ve 5,6 saat olarak; P2 için 10,5 mM H₂O₂ derişiminde yarı ömür 4,2 saat olarak bildirmişlerdir.

Lida ve ark., (2000), *Micrococcus lyzodeikticus* kaynaklı katalazı fotonla çapraz bağlanmış reçine kullanarak immobilize etmişler ve düşük derişimlerde (100ppm) H₂O₂ içeren atık sularda çalışmalar yapmışlardır. Fotonla çapraz bağlanmış reçine jelin uzun süreli hidrojen peroksit varlığında bile kararlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bazı prepolimerler (ENT-2000 polietilen glikol molekül ağırlığı 2000, ENTG-3800 polietilenglikol molekül ağırlığı 3800 ve polipropilenglikol (PPG) molekül ağırlığı 4000, ENTP-4000 PPG molekül ağırlığı 4000, ENTV-500 polivinil alkol molekül ağırlığı 20000) ve fonksiyonel monomerler (vinilpirolidonakrilolmorfolin, methakriloloksietilisosiyanik glukozid MOI-glukoz) ile taşıyıcı jelin modifiye edilmesi veya modifikasyon yapmadan stabilizör (Tween80, polioksietilen, sorbitan monooleat, Triton X-100, polioksietilen, oktilfenileter) maddelerin eklenmesiyle immobilize edilmiş katalazın kararlılığını incelemişlerdir. Enzim hidrofilik fotonla çapraz bağlanmış reçineye immobilize edilirken, Tween 80, polioksietilen ve sorbitan monooleatın katalaza eklenmesiyle önceki aktivitesinin %80'ini göstermiştir. Serbest katalazın K_m 'si 19 mM, V_{max} 'ı 52 mM $mg^{-1}.dk^{-1}$, ENTG-800 immobilize edilmiş katalazın K_m 'si 17 mM, V_{max} 'ı 4,6 mM $mg^{-1}.dk^{-1}$, ENTG-3800/ENTV-50 immobilize edilen katalaz için aktivite gözlenmemiş, ENTG 3800/ Tween 80 immobilize edilen katalaz için K_m 25 mM V_{max} 5,2 mM $mg^{-1}.dk^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. ENTG-3800'e immobilize edilmiş katalaz için Tween 80 varlığında yarışmasız inhibisyon gözlemlenmiştir.

Shioji ve ark., (2003), gözenek büyüklüğü 12 nm olan silica jel 60'a sığır karaciğer katalazını immobilize etmişlerdir. Öncelikle desteği etanolamin ile muamele ederek yüzeyindeki -OH gruplarını modifiye etmişler ve yüzeyde serbest -NH₂ grupları oluşturmuşlardır. Daha sonra bu desteği glioksal (CHOCHO) ile muamele ederek destek yüzeyinde aldehit grupları oluşturmuşlardır. Termogravimetri (TG) cihazını kullanarak yapılan ölçümlerde etanolamin ile muameleden sonra yüzeydeki -OH gruplarının %30'unun modifiye olduğunu ve yüzeydeki -NH₂ grubunu sayısını 1,21 nm⁻² olduğunu, desteğin glioksal ile muamelesinden sonra -NH₂ gruplarının yarısının aldehit grubuna dönüştüğünü bildirmişlerdir. Serbest katalaz için *K_m* ve *V_{max}* değerlerini sırasıyla 55 mM ve 7000U/mg, immobilize katalaz için ise 171 mM ve 350 U/mg olarak bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz örneklerini 5°C'de sakladıklarında yarı ömürlerini sırasıyla 110 saat ve 140 saat olarak bildirmişlerdir.

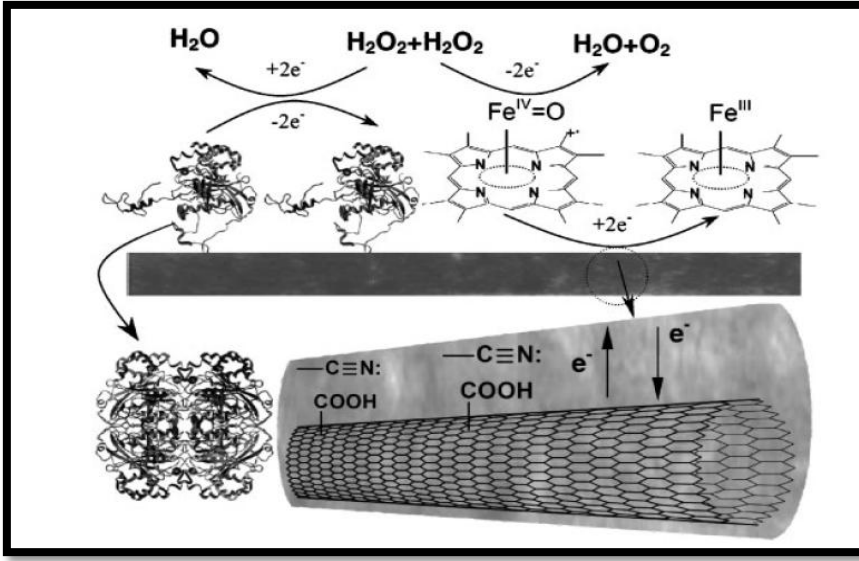
Choi ve Yiu, (2004), bu çalışmada düşük maliyetli H₂O₂ biosensor tasarımı için sığır karaciğer katalazını yumurta kabuğunun zarına kovalent immobilize etmişlerdir. Katalaz immobilize edilmiş zar ile oksijen elektrodun yüzeyini kaplayarak oksijen seviyesindeki artışı H₂O₂ derişimi ile ilişkilendirmişlerdir. Sığır karaciğer ekstraktı 11 kat seyreltildiğinde ve immobilizasyon süresi 5 dk. olduğunda en uygun sonuçları elde etmişlerdir. Biosensörün pH 5-10 aralığında güvenilir sonuçlar ve 0-500 µM tampon derişimi aralığında sabit sonuç verdiği bildirilmişlerdir. Biosensörün en uygun çalışma sıcaklığını 25°C olarak rapor etmişlerdir. İmmobilize katalazın raf ömrünü incelediklerinde 4°C'de 3 ay bekletilen biosensörün başlangıç aktivitesinin %95'ini gösterirken 7 ay bekletilenin %85'ini gösterdiğini, 23 °C'de bekletilen biosensörün 3 ay sonunda başlangıç aktivitesinin %80'ini, 7 ay sonunda %70'ini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kubal ve D'Souza, (2004), maya hücrelerini yumurta akına glutaraldehit kullanarak immobilize etmişlerdir. 4 °C ve 27 °C'de yapılan immobilizasyon çalışmalarında 4 °C'deki katalaz aktivitesinin daha yüksek olduğunu ve en uygun immobilizasyon süresinin 2 saat olduğunu belirlemişlerdir. 300 mL süte 500 ppm H₂O₂ katıldığında 8 g immobilize katalaz varlığında H₂O₂ 'nin 45 dakikada tükendiğini ve immobilize katalazın 5 günde 10 kez kullanıldığında aktivite kaybetmediğini bildirmişlerdir.

Alkan ve ark., (2005), sığır karaciğer katalazını bentonite adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Serbest katalaz için optimum pH 7,0 iken immobilize katalaz için optimum pH'yı 8,0 olarak bulmuşlardır. Serbest ve immobilize katalazın her ikisinde 250 mM fosfat tamponunda en fazla aktivite gösterdiğini bununla birlikte immobilize katalazın

aktivitesinin tampon derişiminden daha fazla etkilendiğini bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize katalazın her ikisinin de maksimum aktivitesini 30 °C’de gösterdiğini bildirmişlerdir. Serbest katalaz için *K_m* değerini 13,90 mM, *V_{max}* değerini 65,78 µM/dk., immobilize katalaz için ise *K_m* değerini 13,22 mM ve *V_{max}* değerini 55,86µM/dk. olarak bildirmişlerdir.

Wang ve ark., (2007), Sığır karaciğer katalazını poli(akrilonitril-ko-akrilik asit) (PANCAA) ile kaplanmış iletken özellikteki nanofibere ve çok katmanlı karbon nanotüp (MWCNTs) içeren PANCAA nano fibere kovalent olarak immobilize etmişlerdir. PANCA/MWCNTs boyunca H₂O₂’den immobilize katalaza elektron aktarımının şematik gösterimi şekil 12 ’de verilmiştir. Farklı immobilizasyon sürelerinde (0-8 saat) yaptıkları immobilizasyon çalışmalarında desteğe bağlanan miktar ve immobilize katalazın aktivitesini dikkate aldıklarında 3 saatin en uygun süre olduğuna karar vermişlerdir. Desteğe bağlanan katalaz miktarı 2 saatten sonra çok fazla artmazken en yüksek aktiviteyi 3 saat immobilize edilen katalaz örneklerinde bulmuşlardır. Serbest katalaz için *K_m* 34,07 mM, *V_{max}* 12124,68 U mg prot.⁻¹, PANCAA’ya immobilize edilmiş katalaz için *K_m* 77,9 mM, *V_{max}* 9243,00 U mg prot.⁻¹ ve PANCAA/MWCNTs’ye immobilize katalaz için *K_m* 58,14 mM, *V_{max}* değeri 10179,21 U mg prot.⁻¹ olarak rapor edilmiştir. Serbest ve immobilize katalaz örneklerinin optimum pH’larını 7,5, serbest katalazın optimum sıcaklığını 25°C, immobilize katalaz örneklerinin her ikisi içinde 35°C olarak bildirmişlerdir. Serbest katalaz 50 °C’de 2 saat bekletildiğinde başlangıç aktivitesinin yaklaşık %55’ini, immobilize katalaz örneklerinin ise başlangıç aktivitesinin %40’nı kaybettiğini bildirmişlerdir. Kesikli tip reaktörde immobilize katalaz örnekleri 9 kullanım sonunda başlangıç aktivitelerinin yaklaşık %60’ını kaybettiğini bildirmişlerdir. PANCAA/MWCNTs desteğe immobilize edilen katalazın aktivitesinin PANCAA nano fibere immobilize edilen katalaza göre daha yüksek olmasının nedenini karbon nano tüpün π sistemi ve yük-transfer kompleksi aracılığıyla elektron transferini geliştirmek veya karbon nano tüpün modifikasyonu ile biyo-uyumun sağlanması olabileceğini rapor etmişlerdir.



Şekil 12. PANCA/MWCNTs boyunca H_2O_2 'den immobilize katalaza elektron taşınmasının şematik gösterimi (Wang, 2007).

Çetinus ve ark., (2009), sığır karaciğer katalazını glutaraldehit ile modifiye edilmiş kitosana (Ch) ve Cu^{2+} iyonunun adsorbe edildiği kitosana (Ch-Cu) immobilize etmişlerdir. Ch ve Ch-Cu desteklere immobilize edilen katalazın miktarını sırasıyla 0,074 mg/g destek (%51,7) ve 0,115 mg/g destek (%79,3) olarak bildirmişlerdir. Serbest katalaz, Ch-katalaz ve Ch-Cu-katalaz örnekleri için V_{max} değerlerini sırasıyla 32000 U/mg prot. 4800 U/mg prot. ve 18450 U/mg prot. olarak, K_m değerlerini sırasıyla 35 mM, 18 mM ve 53 mM olarak bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize katalaz örnekleri en yüksek aktivitelerini 35 °C'de göstermişler ve Ch-Cu-katalaz örneğinin 25-35 °C'de termal kararlılığının diğer örneklerden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize katalaz örneklerinin kesikli tip reaktörde tekrar kullanımlarını incelediklerinde Ch-katalaz örneğinin yaklaşık 7 kullanımdan sonra Ch-Cu-katalaz örneğinin ise yaklaşık 13 kullanımdan sonra başlangıçtaki aktivitelerinin %50'sini koruduğunu rapor etmişlerdir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Denemelerde kullanılan madde ve malzemeler Rize Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarından temin edildi. Kullanılan cihazlar, kimyasallar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 2 ve 3’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Kullanılan Malzeme / Cihaz	Firma	Model
Santrifüj	Thermo Fisher Scientific	Heraeus Multifuge 3 SR+ Centrifuge
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1601 UV-Visible Spectrophotometer
Elektroforez	Bio-RAD	Mini Protean Tetra Cell
pH metre	Thermo Scientific	Orion 3 Star pH Benchtop
Vorteks	Velp Scientifica	Vortex Mixer
Hassas Terazi	Precisa	XB 220A
Etüv	Memmert	UNB 400
Kuru Hava Banyolu İnkübatör	JEIO TECH	SI-600
Su Banyolu Çalkalayıcı	Memmert	WNB 7-45
Isıtıcı Ependorf Çalkalayıcı	BIOSAN	TS-100
Güç Kaynağı	Thermo Scientific	EC 300 XL
Saf Su Cihazı	Sartorius Stedim Biotech	Arium 61316 ProUV
Buzdolabı	Vestel	BZP-L3303 WCP
Otomatik Pipet	Ratiolab	Accupetta
Derin Dondurucu	Vestel	FT-290
Protein Elektroforezi	Bio-RAD	Mini Protean Tetra Cell
Otoklav	Tomy	SS-325
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/ Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
Steril Kabin	Tezsan	—

Tablo 3. Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar

Kullanılan Kimyasallar	Satın Alındıkları Firmalar	Kullanılan Kimyasallar	Satın Alındıkları Firmalar
Tripton	Conda Pronadisa	NiCl ₂	Merck
Yeast Extract	Himedia	HgCl ₂	Merck
Trizma-base	Sigma	ZnCl ₂	Merck
Agar-Agar	Himedia	CoCl ₂	Merck
Etanol	Merck	NaCl	Merck
Folin- Reaktifi	Sigma	FeCl ₂	Merck
HCl	Merck	CuCl ₂	Merck
Na ₂ CO ₃	Merck	NaOH	Merck
NaOH	Sigma	NaClO ₄	Merck
H ₂ O ₂	Merck	Na ₃ PO ₄	Merck
BSA	Ambresco	NaCN	Merck
Na ₂ EDTA	Merck	Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Merck	Na ₂ B ₄ O ₇	Merck
Na-K Tartarat	Merck	Na ₂ CO ₄	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck	NaNO ₃	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck	NaHCO ₃	Merck
NaN ₃	Merck	Na ₂ SO ₄	Merck
CH ₃ COOH	Sigma	Na ₂ SO ₃	Merck
Glisin	Sigma	NaHSO ₄	Merck
PMSF	Merck	Bromofenol mavisi	Merck
CH ₃ COONa	Merck	SDS	Merck
NaHSO ₃	Merck	KI	Merck
Akrilamid	Merck	MgCl ₂	Merck
Mg ₂ SO ₄	Merck	BaCl ₂	Merck
CuSO ₄ .5H ₂ O	Merck	CaCl ₂	Merck
TEMED	Merck	MnCl ₂	Merck

2.1.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- Lauria Bertani (LB) Besi Ortamı: 10 g tripton, 5 g yeast extract (maya özütü) ve 5 g NaCl 900 mL saf suda çözüldükten sonra pH'ı 7'ye ayarlandı. Hacmi saf su ile 1 litreye tamamlanan çözelti 121 °C'de 1,1 kg/cm² basınç altında 20 dakika otoklav edildi.
- Lauria Bertani (LB) – agar besi ortamı: 10 g tripton, 5 g yeast extract (maya özütü), 5 NaCl ile 15 g agar agar 900 mL saf suda çözüldükten sonra pH'ı 7'ye ayarlandı. Hacmi saf su ile 1 litreye tamamlanan çözelti 121 °C'de 1,1 kg/cm² basınç altında 20 dakika otoklav edildi.
- Lowry A Çözeltisi (0,1N NaOH içinde %2 (w/v) Na₂CO₃): 0,4 g NaOH ve 2,0 g Na₂CO₃ saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
- Lowry B Çözeltisi (%1 CuSO₄.5H₂O çözeltisi): 1,0 g CuSO₄.5H₂O saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
- Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K Tartarat Çözeltisi):2,0 g Na-K tartarat saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
- Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve Lowry C karıştırılarak hazırlandı.
- Lowry E Çözeltisi:0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
- Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1mg/mL): 5,0 mg BSA saf suda çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
- 0,1 N NaOH içinde %0,1 (w/v) SDS Çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 0,1g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 5,4225 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH'sı 8,8'e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.
- Yığma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 0,2850 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH'sı 6,8'e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C'de saklandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti -20 °C'de saklandı.
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.

- Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,20 g akrilamid ve 0,80 g N,N'-metilenbisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
- Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Bromofenol Mavisi (0,1):10 mg bromofenol mavisinin saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20 °C'de saklandı.
- Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7,20 g Tris ve 1,50 g glisin yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3'e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Asetat tamponu (pH 4,0): 0,0623 g CH₃COONa'a 0,2 M'lık asetik asit çözeltisinden 21,2 mL ilave edilerek hacmi 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- 50 mM Asetat tamponu (pH 5,0): 0,2625 g CH₃COONa'ta 0,2 M'lık asetik asit çözeltisinden 9,0 mL ilave edilerek hacmi 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
- 50 mM Fosfat tamponu (pH 6,0): 0,6407 g KH₂PO₄'ün 25 mL'deki çözeltisi ile 0,0506 g K₂HPO₄'ün 25 mL'deki çözeltileri karıştırılarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0): 0,4216 g KH₂PO₄'ın 25 mL'deki çözeltisi ile 0,3310 g K₂HPO₄'ın 25 mL'deki çözeltileri karıştırılarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 50 mM Tris tamponu (pH 8,0): 0,6055 g Trizma bazı 80 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH'ı 8 ve 9 olacak şekilde ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 30 mM H₂O₂ çözeltisi: 0,306 mL %30'luk H₂O₂'nin hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Doğal jel boyama çözeltisi [%2 FeCl₃ - %2 K₃Fe(CN)₆]: 4 g FeCl₃'ün 25 mL'deki çözeltisi ile 4 g K₃Fe(CN)₆'ın 25 mL'deki çözeltileri karıştırılarak hazırlandı. Bu çözelti karışımı taze hazırlanmalıdır.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşu

Bu çalışmada, çalışma materyali olarak kullanılan ve yeni bir termofilik bakteri olan *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşu Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırmacıları tarafından Erzurum Ilıca İlçesi kaplıcalarından izole edilmiş ve birtakım özellikleri ortaya konulmuştur.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Termofilik Bakterinin Katalaz Kapasitesinin Belirlenmesi (Petri Testi)

Anoxybacillus gonensis Z4 suşu'ndan elde edilen termofilik bakteri, Lauria Bertani (LB)-agar ortamında hazırlanmış (pH 7,0) besi ortamının bulunduğu petrilere 55 °C'de 18 saat boyunca büyütülmüştür. Petrilere büyüyen bakteriler üzerine 2' şer mL %3'lük H₂O₂ çözeltisi ilave edilmiştir. 30 dakika sonra petrilere üzerinde hava kabarcıklarının oluşup oluşmadığı gözlenmiştir. Kontrol olarak, bakteri ekilmemiş, aynı şartlarda bekletilmiş LB-agar besi ortamı kullanılmıştır.

2.2.2. Termofilik Bakterinin Sıvı Besi Ortamında Büyütülmesi

Anoxybacillus gonensis Z4 suşu'ndan elde edilen termofilik bakteri, LB sıvı besi ortamında (pH 7,0, 500 mL) 55 °C' de 12 saat boyunca büyütülmüştür. Büyütülen kültür 10 °C ve 8.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan çökelek (yaklaşık yaş ağırlığı 1 g) 5'er mL özütleme çözeltisinde (pH 7,0'de, 50 mM potasyum fosfat tamponunda) süspansiyon edilmiştir. Daha sonra çözelti, 3 dakika sonifikasyona tabi tutulmuştur. Oluşan karışım 9.000 rpm' de 20 dakika santrifüjlenmiş ve elde edilen berrak süpernatant, hücre içi katalaz kaynağı olarak -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.3. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre yapılmıştır (Lowry vd., 1951) ve protein standardı olarak Sığır Serum Albümini (BSA) kullanılmıştır.

Kalibrasyon grafiği çizilebilmek amacıyla hazırlanan BSA çözeltisinden (1,0 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL konulmuştur. Standart içeren tüplerin dışında ham enzim kaynağından, bir deney tüpüne 10 µL ilave edilmiştir. Standartların ve örneğin son hacimlerini 500 µL'ye tamamlayacak şekilde 0,1N NaOH içindeki %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslenmiştir. Daha sonra her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi (%2 sodyum-potasyum tartarat, %1 CuSO₄.5H₂O ve 0,1N

NaOH içerisinde %2 Na₂CO₃) ilave edilip vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.

Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktifi'nden 100 µL ilave edilmiş ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildikten sonra 650 nm'de absorbansları okunmuştur. Kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerdeki protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

2.2.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. 1 mL'lik kuartz küvet içinde 25 °C'de 600 µl 30 mM H₂O₂ çözeltisi, 300 µl 50 mM fosfat (pH 7,0) tamponu ve 100 µl enzim çözeltisi karışımının 240 nm'de ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Hildebrandt ve Roots, 1975) absorbansındaki azalma $\pm 0,001$ hassasiyetle kaydedilmiştir (Hatchikian vd., 1972; Hazell vd., 1991; Thompson vd., 2003).

Bir ünite enzim, 1 dakikada 1 mL'de 1 µmol H₂O₂' in bozunması için gerekli olan enzim miktarı olarak belirlenmiştir. Özgün aktivite, mg protein başına aktivite olarak belirlenmiştir (Aebi, 1984; Claiborne vd., 1979).

Tüm aktivite çalışmaları üçer tekrarlı olarak yapılmış ve ortalamaları üzerinden hesaplamaları gerçekleştirilmiştir.

2.2.5. Doğal Elektroforez

Katalaz aktivitesinin belirlenmesi için %10'luk poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanılmıştır. *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşu'ndan elde edilen termofilik bakteriden elde edilen protein özütünden uygun miktarda (35 µg protein içerecek şekilde) alınmıştır. Bu özüte eşit hacimde 1 x muamele tamponu (50 mM Tris-HCl pH 6,8, %0,1 bromofenol blue, %10 gliserol) ilave edilmiş ve Laemmli (1970) tarafından tanımlanan 0,75 mm kalınlığındaki poliakrilamid jeline yüklenmiştir.

Proteinlerin jelde yürütüldüğü süre boyunca, kuyucuk başına 2 mA akım uygulanmış ve jelin ısınmasını engellemek için buz banyosunda yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jel 3 kez 10'ar dakika saf suda bekletildikten sonra H₂O₂ çözeltisinde (10 µL %30'luk H₂O₂ 100 mL'ye saf su ile seyreltilmiş) 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolar dolmaz jelden H₂O₂ saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır.

Doğal boyama için taze hazırlanmış %2'lik FeCl₃ ve %2' lik K₃Fe(CN)₆ çözeltilerinin karışımı kullanılmıştır. Jelde yeşil rengin görüldüğü an, jel saf su ile yıkanmıştır. Jelde boyanmayan yerler katalaz aktivitesi olarak belirlenmiştir (Woodbury vd., 1971; Wayne ve Diaz, 1986).

2.2.6. *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşu Katalazının Spektroskopik Özellikleri

Anoxybacillus gonensis Z4 suşu'ndan elde edilen termofilik katalazın spektroskopik özelliklerinin belirlenmesi için (ortalama 0,5 mg protein), 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal halinin ve 10 mM KCN çözeltilisindeki halinin spektroskopik karakteri 350-700 nm arası taranarak belirlenmiştir.

2.2.7. pH ve Sıcaklığın Z4 Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Anoxybacillus gonensis Z4 suşu'ndan elde edilen katalaz aktivitesi üzerine pH ve sıcaklığın etkisine bakılmıştır.

Katalaz aktivitesine pH'nın etkisini belirlemek için, pH 4,0-9,0 arasında çalışılmıştır. pH 4,0-5,0 arası için 50 mM asetat, pH 6,0-7,0 arası için 50 mM fosfat ve pH 8,0-9,0 arası için 50 mM Tris-HCl tamponları kullanılmıştır. Katalazın 30 mM H₂O₂ substratı varlığında ve oda sıcaklığında değişik tamponlardaki aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Değişik pH'lardaki aktiviteler, en yüksek aktiviteyi gösteren pH'daki aktiviteye oranlanarak, bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{Bağıl Aktivite} = \frac{\text{hesaplanan aktivite}}{\text{en yüksek aktivite}} \times 100$$

Sıcaklığın katalaz aktivitesi üzerindeki etkisi, en yüksek aktivitenin belirlendiği pH'da, sıcaklık 10-90 °C arasında değiştirilerek belirlenmiştir. İstenilen sıcaklık ±0,1 °C hassasiyetle termostatlı su banyosu ile ayarlanmıştır. Kuartz küvet içindeki tampon-substrat karışımı istenilen sıcaklığa gelinceye kadar su banyosunda bekletildikten sonra, aktivite ölçümü spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Muhtemel sıcaklık kaybını önlemek için mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde, enzim çözeltisi substratı içeren karışıma pipetlenerek aktivite ölçümü yapılmıştır. Değişik sıcaklıklardaki aktiviteler, en yüksek aktiviteyi gösteren sıcaklıktaki aktiviteye oranlanarak bağıl aktivite hesaplanmıştır.

2.2.8. Termofilik Z4 Suşundan Elde Edilen Katalazın Kinetiği

Çalışmada kullanılan *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşundan elde edilen katalazın, H₂O₂ substratına karşı davranışını ve ilgisini ortaya koyabilmek için optimize edilmiş şartlarda, H₂O₂ substratının konsantrasyonu 1–100 mM arasında değiştirilerek, katalaz aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Michaelis-Menten eşitliği esas alınarak değişen substrat konsantrasyonu değerlerine karşı hiperbolik substrat doyma grafiği (Michaelis-Menten), bu değerlerin terslerinin alınmasıyla elde edilen lineer grafik (Lineweaver-Burk grafiği) çizilmiştir.

Ayrıca termofilik Z4 suşundan elde edilen katalazın değişen substrat konsantrasyonlarına karşılık okunan hız (V) ve buna karşılık gelen V_{maks} değerleri kullanılarak, elde edilen V/(V_{maks}-V) oranları Hill eşitliği gereğince grafiğe geçirilerek, bu katalaz üzerindeki substrat-bağlanma bölgelerinin sayısı ve kooperativitenin olup olmadığı tespit edilmiştir.

2.2.9. Bazı Kimyasal, Deterjan, Anyon ve Katyonların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Anoxybacillus gonensis Z4 katalazının aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisini incelemek amacıyla, Ba²⁺, Mg²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ ve Cu²⁺ iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltilerden reaksiyon karışımına ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapılmış ve IC₅₀ değerleri bulunmuştur.

Anoxybacillus gonensis Z4 katalazının aktivitesi üzerine bazı anyonların etkisini incelemek amacıyla OH⁻, NO₂⁻, PO₄⁻³, N₃⁻, CN⁻, Cl⁻, HPO₄⁻², B₄O₇⁻², CO₃⁻², CH₃COO⁻, C₂O₄⁻², NO₃⁻, HCO₃⁻, SO₄⁻², SO₃⁻ ve C₈H₁₁N₂O₃⁻, anyonlarının sodyum tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltilerden reaksiyon karışımına ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapılmış ve IC₅₀ değerleri bulunmuştur. Ayrıca β-merkaptetanol, EDTA ve 3-ATA'nın da aynı şekilde enzim aktivitesine bakılmış ve IC₅₀ değerleri bulunmuştur.

Anoxybacillus gonensis Z4 katalazının aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisini incelemek amacıyla Triton X-114, Triton X-100, Tween-80 ve SDS kullanılmıştır. Bu deterjanların %10' luk stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden reaksiyon karışımına ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapılmıştır.

2.2.10. *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşunun Tam Hücre İmmobilizasyonu

Anoxybacillus gonensis Z4 suşu LB sıvı besiyeri ortamında 12 saat büyütüldükten sonra santrifüj edilerek 5 mL tampon içinde tekrar süspansiyon edilmiştir. Elde edilen kültür çözeltisi, 25 mL %2'lik hazırlanan agar ve agaroz çözeltileri ile jel kıvamı oluşumuna kadar karıştırılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan agar ve agaroz çözeltileri kaynatılarak çözülmüştür ve kültür çözeltisi ilave edilmeden önce kültürün bozunmaması için biraz soğumaya bırakılmıştır. Aynı şekilde agar ve agaroz jellerinin kültür olmadan kökleri hazırlanmıştır. Agar ve agaroz jellerinin kökleri ile immobilizasyon gerçekleştirilen jeller aynı miktarda saf suyla yıkanarak 600 nm absorban miktarları ölçülmüştür. Tam hücre immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra iki farklı matriksten 0,1 g alınarak 5mL 30 mM H₂O₂ çözeltisi içinde 10-100 °C arasında sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyondan sonra 240 nm'de katalaz aktivitelerinin absorban azalışları her bir sıcaklığın körüne karşı ölçülmüştür.

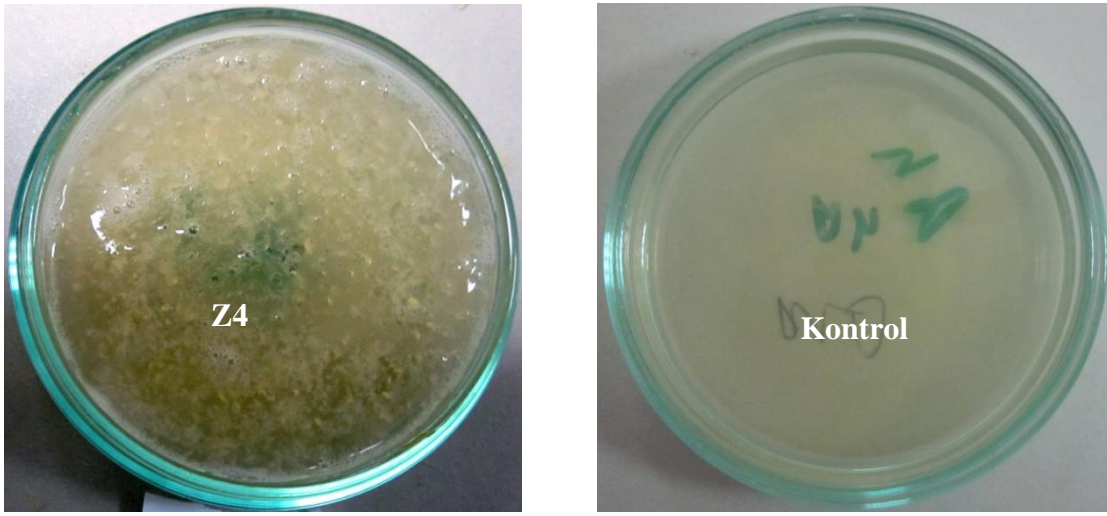
Kinetik çalışmalar için hazırlanmış olan agar ve agaroz ortamlarından 0,1 g alınmıştır. 10-60 mM arasında hazırlanmış olan H₂O₂ çözeltilerinin 5'er mL'leriyle 30 dakika muamele edilerek 240 nm'de absorban azalışları her bir konsantrasyonun körüne karşı ölçülmüştür.

Z4 suşunun tam hücre immobilizasyonunun yapılmış olduğu agar ve agaroz ortamlarında katalaz kaynağı olarak tekrar kullanımını belirlemek için matrikslerden 0,1'er g alınmış ve pH 7,0'de 5 mL 30 mM H₂O₂ çözeltisinde oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 30 dakika inkübasyondan sonra çözeltilerden alınıp 240 nm'deki absorban değeri ölçülmüştür. Ortamdaki H₂O₂ çözeltisi uzaklaştırılıp, yeniden 5 mL H₂O₂ çözeltisi alınarak aynı matriks ile tekrardan 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır ve 240 nm'deki absorban değeri ölçülmüştür. Bu işlem aktive çok düşünceye kadar tekrar edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşunun Katalaz Kapasitesinin Belirlenmesi

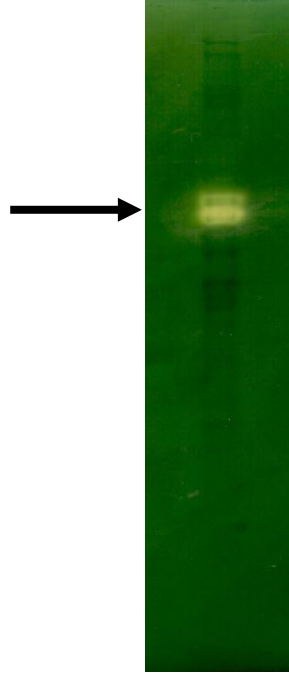
Anoxybacillus gonensis Z4 suşunun (Z4) katalaz kapasitesinin belirlenmesi için, petri içerisindeki LB-agar ortamında (pH 7,0) 55 °C’de büyütülen termofilik Z4 suşu üzerine %3’lük H₂O₂ çözeltisi ilave edilmiştir. Z4 suşunun bulunduğu petri içerisinde 30 dakika sonra hava kabarcıklarının oluştuğu gözlenirken, kontrolde hiç hava kabarcığı gözlenmemiştir (Şekil 13).



Şekil 13. Z4 suşunun katalaz kapasitesinin belirlenmesi için yapılan petri testi sonucu

3.2. Doğal Elektroferez

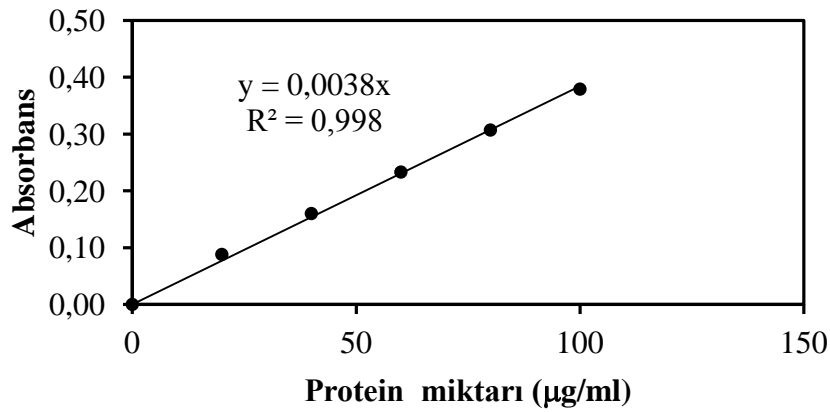
Anoxybacillus gonensis Z4 suşundan elde edilen özütü yapılan %10’luk PAGE jeli doğal boyamaya tabi tutulmuştur. Jel H₂O₂ muamelesi sonrası yeşile boyanırken, katalaz aktivitesini gösteren alanlarda boyanma gözlenmemiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Z4 suşundan elde edilen özütteki katalaz aktivitesi için yapılan doğal elektroforez jeli

3.3. Protein Miktarı ve Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

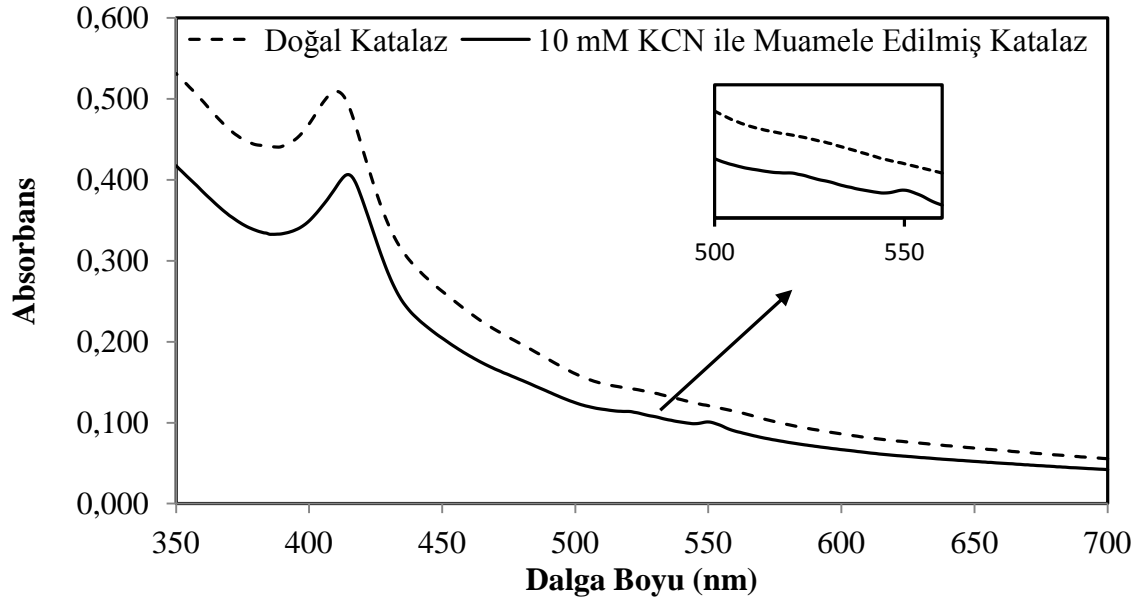
Anoxybacillus gonensis Z4 suşundan elde edilen özütteki suda çözünür protein miktarı, standart çalışma grafiğinden 0,131 mg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 15). Bu özütte katalaz aktivitesi 30 mM H₂O₂ (pH 7,0) varlığında 2293,5 µmol/dak/mL olarak tespit edilmiştir.



Şekil 15. Protein standart çalışma grafiği

3.4. *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşu Katalazının Spektroskopik Özellikleri

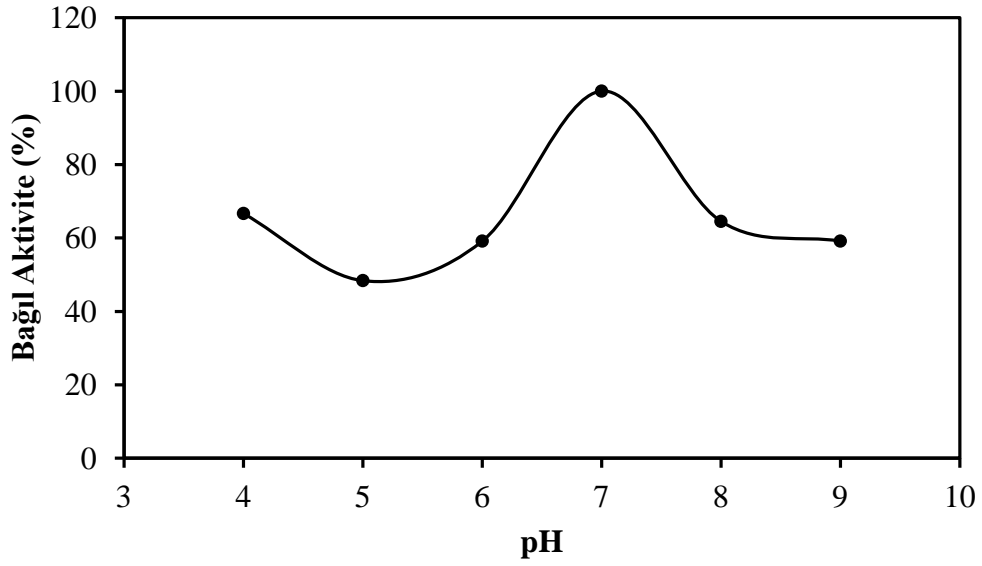
Termofilik bir bakteri olan *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşu özütünde mevcut olan katalazın doğal ve KCN ile muamele edilmiş hallerinin absorpsiyonları 350-700 nm arasında taranmıştır. Bu tarama sonucunda, katalazın doğal hali yalnızca 410 nm’de hem grubunu gösteren Soret (γ) pikini verirken, KCN ile Soret pikini 415 nm’de, β -bandı pikini 520 nm’de, α -bandı pikini ise 550 nm’de verdiği gözlenmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. Z4 katalazının 350-700 nm arasındaki absorpsiyon spektrumu (.....50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) içindeki doğal katalaz, ___10 mM KCN ile muamele edilmiş katalaz)

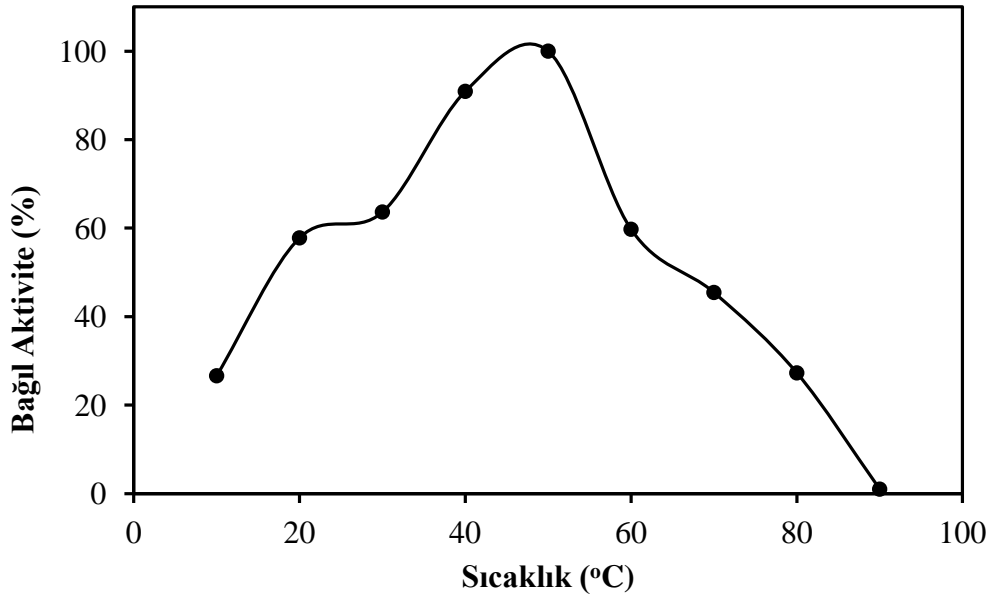
3.5. pH ve Sıcaklığın Z4 Katalazı Aktivitesi Üzerine Etkisi

Z4 suşundan elde edilen katalazın pH 7,0 ’de en yüksek aktiviteyi (%100) gösterdiği ve pH 4’de %67, pH 5’de %48, pH 6’da %59, pH 8,0’de %65 ve pH 9,0’da %59 oranında ilk aktiviteyi koruduğu gözlenmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. Termofilik Z4 suşundan elde edilen katalazın aktivite-pH değişimi

Termofilik Z4 suşundan elde edilen özütteki katalaz aktivitesi en yüksek aktivitenin belirlendiği pH'da, 10–90 °C arasındaki sıcaklıklarda ölçülmüştür. Termofilik Z4 suşundan elde edilen katalazın 50 °C'de en yüksek aktiviteyi gösterdiği, 10 °C'de %27, 20 °C'de %58, 30 °C'de %64, 40 °C'de %91, 60 °C'de %60, 70 °C'de %45 ve 80 °C'de %27 oranında aktiviteyi koruduğu, ancak 90 °C'de aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Termofilik Z4 suşundan elde edilen katalaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimi.

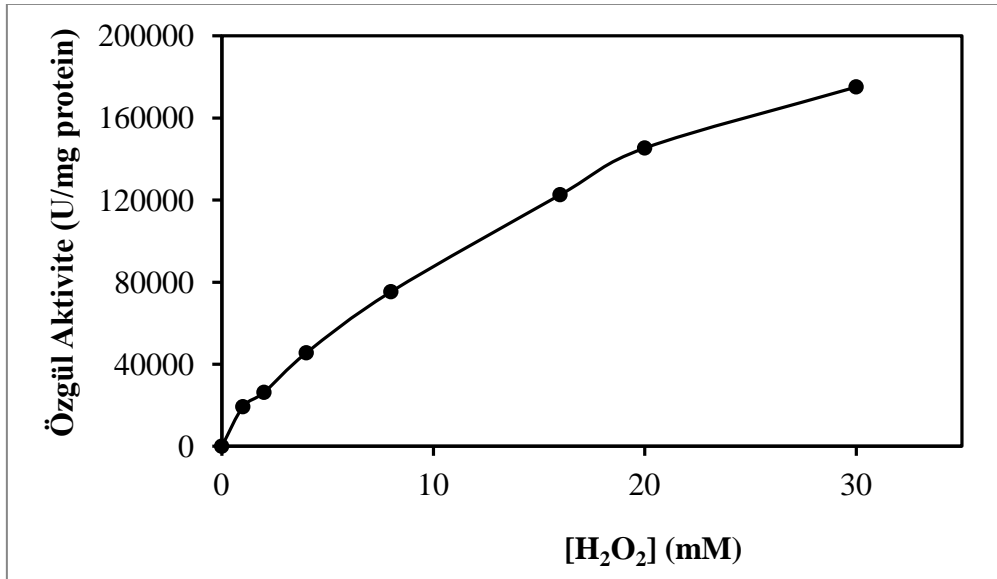
3.6. Termofilik Z4 Suşundan Elde Edilen Katalazın Kinetiği

Enzim kinetiği çalışmasında, termofilik Z4 suşundan elde edilen katalazın oda sıcaklığında pH 7'de ulaşabileceği maksimum hız (V_{maks}) değeri ve H_2O_2 substratına ilgisini gösteren Michaelis sabiti (K_m) değeri (Tablo 4), Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek tespit edilmiştir (Şekil 19 ve Şekil 20).

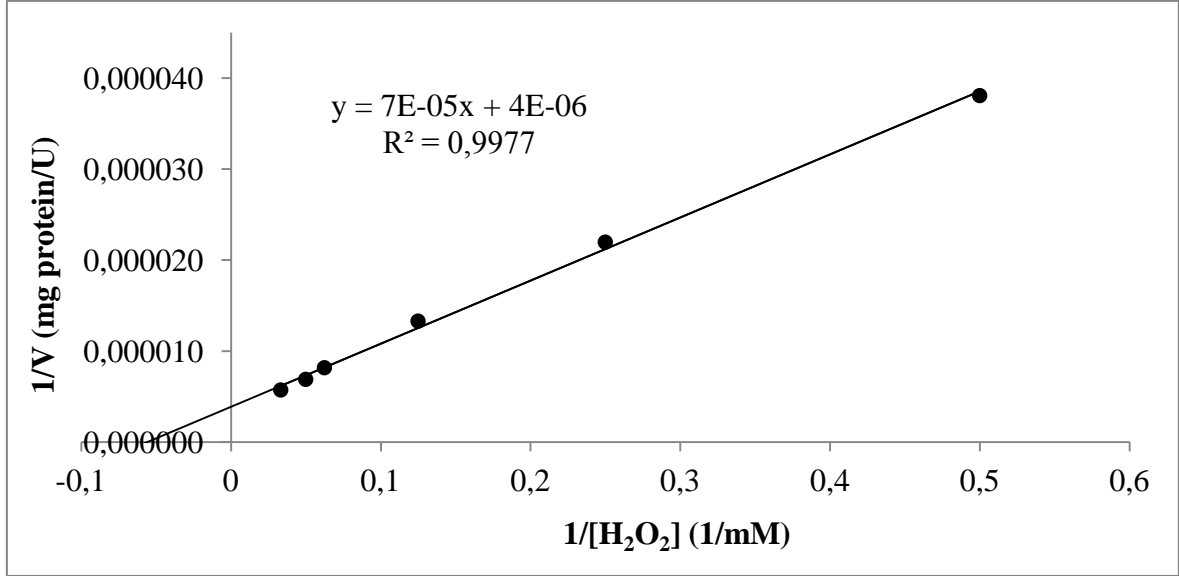
Tablo 4. Z4 katalazına ait bazı kinetik veriler

	V_{maks} (U/mg protein)	K_m (mM)	V_{maks}/K_m (dk ⁻¹ mg protein ⁻¹)
Z4	250.000±980	17,5±2,2	14,28

Z4 suşundan elde edilen katalazın H_2O_2 substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda V_{maks} değeri 250.000±980 U/mg protein ve K_m değeri 17,5±2,2 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 19).

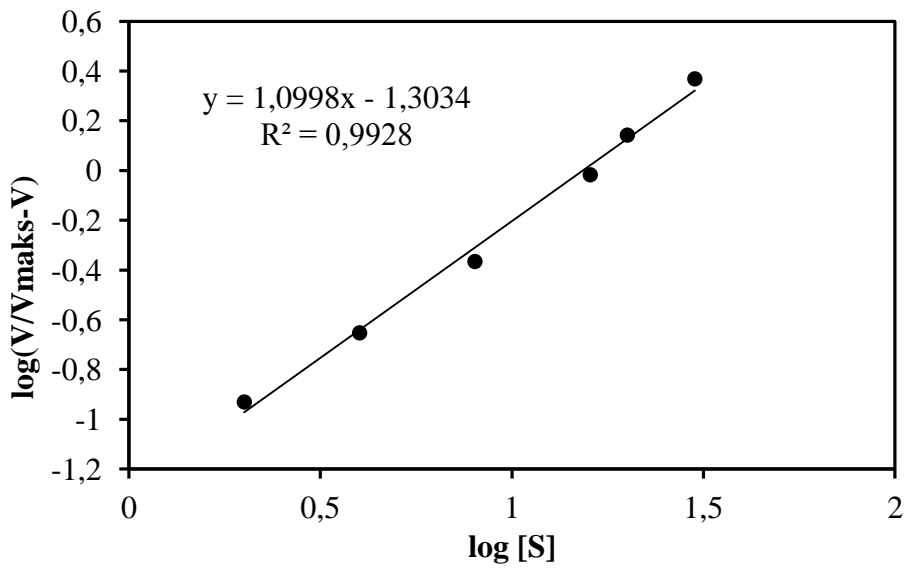


Şekil 19. Z4 katalazının H_2O_2 varlığındaki substrat-doyma grafiği



Şekil 20. Z4 katalazının H₂O₂ varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği

Ayrıca değişen substrat konsantrasyonlarına karşılık okunan hız (V) ve buna karşılık gelen V_{maks} değerleri kullanılarak elde edilen V/(V_{maks}-V) oranları Hill eşitliği gereğince grafiğe geçirilerek, substratının katalaz üzerindeki substrat-bağlanma bölgelerinin sayısı ve kooperativitenin olup olmadığı da belirlenmiştir. Hill eğrisinden elde edilen Hill sabitinin (h) değerinin 1'e yakın çıkması, Z4 katalazının birden fazla substrat bağlanma bölgesinin olduğunu, fakat enzimin kooperatif davranmadığını göstermektedir (Şekil 21).



Şekil 21. Z4 katalazının H₂O₂ varlığında elde edilen Hill grafiği

3.7. Bazı İyon ve Deterjanların *Anoxybacillus gonensis* Z4 Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bazı katyonların *Anoxybacillus gonensis* Z4 katalaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda metallerin klorür tuzları kullanılmıştır (Tablo 5). Z4 katalazını Ba^{+2} ve Mg^{+2} katyonlarının 0,5-2 mM arası konsantrasyonlarda inhibe ettikleri belirlenmiş ve IC_{50} değerleri sırasıyla 1,6 ile 2,6 mM olarak tespit edilmiştir. Cu^{+2} ile Hg^{+2} katyonlarının 2-5 μM arası konsantrasyonlarda Z4 katalazının inhibisyonuna sebep oldukları ve sırasıyla 3,8 ile 3,0 μM IC_{50} değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir. Z4 katalazı aktivitesine Ni^{+2} katyonunun inhibisyon etkisinin belirlenmesi için 5-50 μM konsantrasyonlarında çalışılmış ve IC_{50} değeri 26 μM olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Zn^{+2} katyonu için 10-30 μM , Fe^{+2} için 3-10 μM inhibitör konsantrasyonları denenmiş ve IC_{50} değerleri sırasıyla 24 ile 2,4 μM olarak bulunmuştur.

Tablo 5. Bazı katyonların *Anoxybacillus gonensis* Z4 katalazı aktivitesi üzerine etkisi

Katyon Cinsi	Konsantrasyonlar (μM)	% Kalan Aktivite	IC ₅₀ Değerleri
Ba ⁺²	0	100	1600 μM
	500	74	
	1000	63	
	2000	45	
Cu ⁺²	0	100	3,8 μM
	3	73	
	4	46	
	5	33	
Hg ⁺²	0	100	3 μM
	2	60	
	3	50	
	5	45	
Mg ⁺²	0	100	2600 μM
	500	84	
	1000	71	
	2000	57	
Ni ⁺²	0	100	26 μM
	5	75	
	10	66	
	20	55	
	50	32	
Zn ⁺²	0	100	24 μM
	10	69	
	20	57	
	30	45	
Fe ⁺²	0	100	2,4 μM
	3	46	
	5	41	
	10	35	

Bazı anyonların *Anoxybacillus gonensis* Z4 katalaz aktivitesine etkisinin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda sodyum tuzları kullanılmıştır (Tablo 6). OH⁻, NO₂⁻, PO₄⁻³, N₃⁻, CN⁻ anyonları ve β -merkaptolanolün 0-7,5 mM arası konsantrasyonlarda Z4 katalaz aktivitesini inhibe ettikleri belirlenmiş ve sırasıyla 3,3 mM, 2,5 mM, 3,2 mM, 0,1 mM, 0,5 mM ve 2,5 mM IC₅₀ konsantrasyonlarına sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca N₃⁻ ve CN⁻ anyonlarının yüksek konsantrasyonlarda Z4 katalazını tamamen inhibe ettikleri gözlenmiştir (Tablo 6). HPO₄⁻², B₄O₇⁻², CO₃⁻², C₂O₄⁻² ve NO₃⁻² anyonlarının 5-50 mM arası konsantrasyonlarda Z4 katalazını inhibe ettikleri ve sırasıyla IC₅₀ değerlerinin 19, 8, 5,5, 20, 35, 2,5 mM olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Bazı Anyonların *Anoxybacillus gonensis* Z4 katalazı aktivitesi üzerine etkisi

Anyon Cinsi	Konsantrasyonlar (mM)	% Kalan Aktivite	IC ₅₀ Değerleri
OH ⁻	0	100	3,3 mM
	3	56	
	4	37	
	5	34	
NO ₂ ⁻	0	100	2,5 mM
	0,25	100	
	1	86	
	2	63	
PO ₄ ⁻³	0	100	3,2 mM
	5	24	
	6	21	
	7,5	13	
N ₃ ⁻	0	100	0,1 mM
	0,2	12	
	0,5	9	
	1	8	
CN ⁻	0	100	0,5 mM
	0,5	50	
	1	7	
	2,5	3	
HPO ₄ ⁻²	0	100	19 mM
	10	95	
	20	45	
	30	19	
B ₄ O ₇ ⁻²	0	100	8 mM
	10	42	
	20	34	
	30	25	
CO ₃ ⁻²	0	100	5,5 mM
	5	54	
	10	31	
	20	26	
C ₂ O ₄ ⁻²	0	100	20 mM
	5	87	
	10	75	
	20	50	
NO ₃ ⁻²	0	100	35 mM
	5	97	
	10	88	
	50	20	
β-merkaptolanol	0	100	2,5 mM
	1	90	
	2	57	
	3	48	

Diğer bazı iyon ve deterjanların *Anoxybacillus gonensis* Z4 katalaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve Tween-80 deterjanı ile 3-ATA hariç diğerlerinin katalaz aktivitesini arttırdıkları tespit edilmiştir (Tablo 7). Z4 katalazını, Tween-80 deterjanının %0,01 konsantrasyonunda yaklaşık %15 ve 0,5 mM 3-ATA'nın yaklaşık %13 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir.

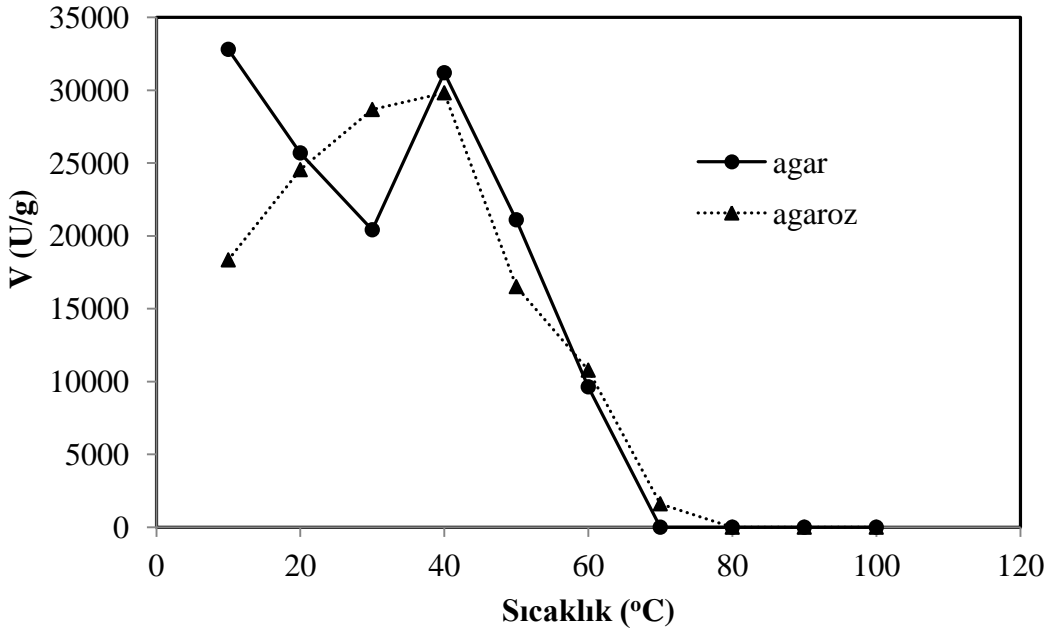
Tablo 7. Diğer bazı iyon ve deterjanların *Anoxybacillus gonensis* Z4 katalazı aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon	Bileşik	%Kalan Aktivite
0 mM	-	100
20 mM	NaCl	106
30 mM	NaCl	120
20 mM	NaCH ₃ COO	120
30 mM	NaCH ₃ COO	139
10 mM	NaHCO ₃	108
20 mM	NaHCO ₃	111
20 mM	Na ₂ SO ₄	110
30 mM	Na ₂ SO ₄	114
20 mM	NaSO ₃	116
30 mM	NaSO ₃	119
0,15 mM	C ₈ H ₁₁ N ₂ O ₃ Na	112
0,20 mM	C ₈ H ₁₁ N ₂ O ₃ Na	120
10 mM	EDTA	127
20 mM	EDTA	115
0,1 mM	3-ATA	94
0,5 mM	3-ATA	87
%0,01	Tween-80	85
%0,01	Triton X-100	105
%0,01	Triton X-114	137
%1	SDS	105

3.8. *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşunun Tam Hücre İmmobilizasyonu

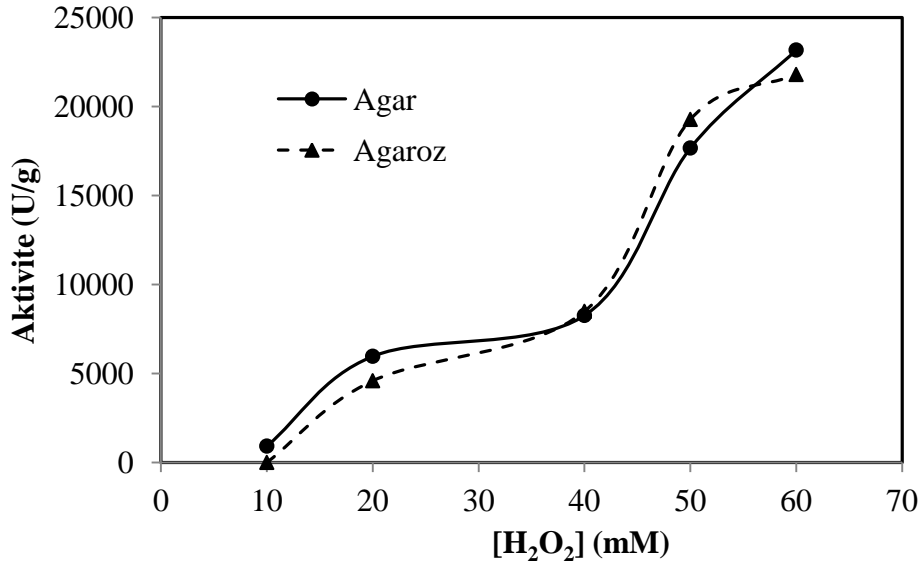
Anoxybacillus gonensis Z4 suşu LB ortamında 12 saat büyütüldükten sonra santrifüj edilerek 5 mL tampon içinde tekrar süspansiyon edilmiştir. Elde edilen kültür çözeltisi 25 mL %2'lik agar ve agaroz çözeltileri ile jel kıvamı oluşumuna kadar karıştırılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Agar ve agaroz jellerinin körleri ile immobilizasyon gerçekleştirilen jeller aynı miktarda saf suyla yıkanarak 600 nm'de absorbans miktarları ölçülmüştür. İki karışım arasındaki absorbans farkının 0,009 olduğu tespit edilmiş ve serbest kalan hücrelerin çok az olduğu bulunmuştur.

Tam hücre immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra iki farklı matriksten 0,1'er g alınarak 5 mL, 30 mM H₂O₂ çözeltisi içinde 10-100 °C arasındaki sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyondan sonra 240 nm'de absorbans azalışları her bir sıcaklığın körüne karşı ölçülmüştür. Agar ve agaroz ortamlarında immobilize edilmiş hücrelerin H₂O₂'i bozma hızının en yüksek 40 °C'de olduğu belirlenmiştir (Şekil 22).



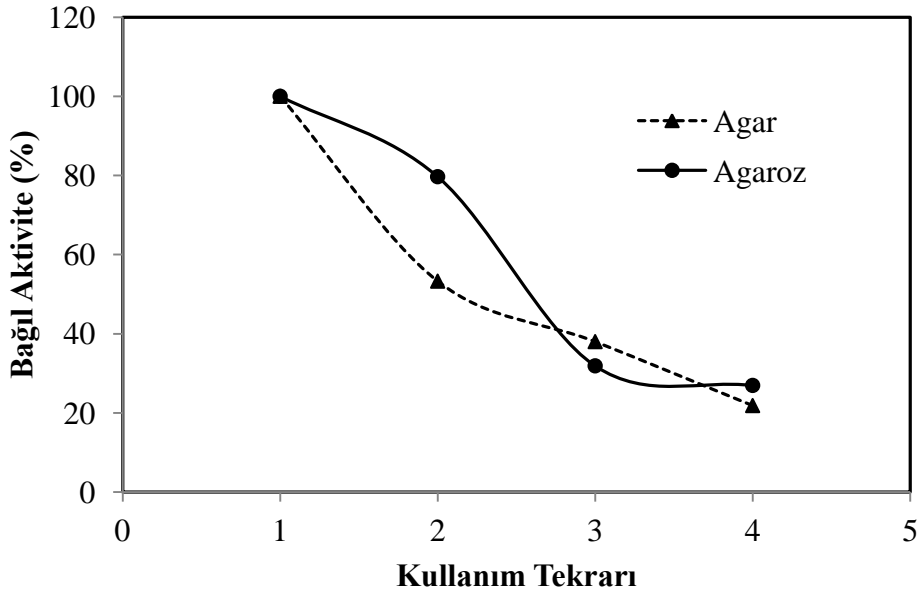
Şekil 22. Agar ve agaroz ortamlarında immobilize edilmiş hücrelerin değişik sıcaklıklarda H₂O₂'i bozma hızı

10-60 mM arası H₂O₂ konsantrasyonlarında yapılan kinetik çalışma sonucunda Agar ve agaroz ortamlarında immobilize edilen Z4 suşu hücrelerinin sigmoidal davranış gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 23). Her iki ortamdaki hücrelerdeki katalazın substratı ile olan etkileşiminin zayıfladığı ve buna bağlı olarak Km değerinin 200±28 mM, Vmaks değerinin 50.000±413 U/g olarak belirlenmiştir.



Şekil 23. İmmobilize Z4 hücrelerinin H₂O₂ varlığındaki substrat-doyma eğrisi

Her iki ortamda immobilize edilen hücrelerdeki katalazın katalitik aktivitesinin tekrar kullanılabilirliğine oranı belirlenmiş ve agar ortamı için 2. kullanımda ilk aktivitenin %53, 3. kullanımda %38, 4. kullanımda %22 oranında, agaroz ortamı için ise 2. kullanımda %80, 3.kullanımda %32, 4. kullanımda ise %27 oranında ilk aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. Z4 suşunun agar ve agaroz ortamlarındaki immobilize edilmiş halinin H₂O₂ varlığındaki tekrar kullanılabilirliği grafiği

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Günümüzde birçok endüstri alanında, klasik kimyasal yöntemlerin yerini enzimlerin kullanıldığı biyolojik sistemler almaktadır. Biyoteknolojinin de katkısıyla bu işlemler hem daha ılıman şartlarda gerçekleştirilmekte, hem de oluşan yan ürünlerin çevreye verdikleri zararlar en aza indirgenmektedir. Bir endüstriyel enzim olan katalaz da gıda, süt, tekstil, medikal, kâğıt gibi ağartma ve sterilizasyon işlemlerinin yapıldığı endüstri alanlarında ve hidrojen peroksidin ortamdan uzaklaştırılması gibi işlemlerde kullanılmaktadır (Dhaese, 1996).

Ayrıca bilinen termofilik türler arasında yer alan termofilik *Bacillus sp.* ve *Clostridium sp* türleri, spor oluşturabilmeleri, yüksek sıcaklıkta yaşayabilmeleri ve ısıya dayanıklı enzimler üretebilmelerinden dolayı ilgi çekmektedirler (Sonnleither, 1983; Sharp vd., 1991; Cangenella ve Wiegel, 1993). Bu çalışmada kullanılan katalazın termofilik *Bacillus* cinsi bakteriden elde edilmiş olması termofilik davranabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte bu çalışmada kullanılan *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşunun yeni izole edilmiş ve bu suşta katalazın çalışılmamış olması, bu termofilik bakterinin alternatif katalaz kaynağı olup olmayacağı hususunda önem arz etmektedir.

Anoxybacillus gonensis Z4 suşunun LB ortamında büyütülmesi ile yapılan petri testinde H₂O₂ varlığında gaz kabarcıklarının oluşması pozitif sonuç göstergesidir.

Anoxybacillus gonensis Z4 suşundan elde edilen özütte yapılan doğal elektroforez sonucunda katalaz aktivitesi tespit edilmiştir. Literatürlerde bir çok farklı termofilik kültürlerin özütlerinde yapılan doğal elektroforezlerde de benzer özellikler gözlenmiştir (Dinçer, 2005; Monti vd., 2003; Thompson vd., 2003; Wang vd., 1998; Brown-Peterson ve Salin, 1995).

Anoxybacillus gonensis Z4 suşundan elde edilen özütteki katalazın 410 nm'de Soret piki vermesi hem grubu içerdiğini belirtmektedir. Ayrıca bu katalazın KCN ile muamele edilmesiyle Soret pikinin görünür bölgeye doğru kaydığı (414 nm) ve 520 ile 550 nm civarında α ve β bantlarına ait pikleri verdiği gözlenmiştir. Bazı termofilik bakterilerin özütlerindeki katalazlar için yapılan spektrofotometrik çalışmalarda, 408-417 nm arasında Soret piki verdikleri, bu katalazların indirgenmesiyle Soret piklerinin görünür bölgeye doğru kaydıkları ve 520 ile 550 nm civarında pik verdikleri belirtilmektedir. Bununla birlikte, KCN ile α ve β bantlarına ait piklerin genişlediği ifade edilmektedir (Dinçer, 2005). *Halobacterium halobium*'dan saflaştırılan katalazın 406 nm'de Soret piki verdiği ve

KCN ile elde edilen piklerin genişleyip 12 nm kadar kırmızı bölgeye kaydığı ifade edilmektedir (Brown-Peterson ve Salin, 1995). Yumoto ve arkadaşları (2000) yapmış oldukları bir karşılaştırmada ökaryotik katalazların Soret pikini 405 nm’de, *V.rumoiensis* S-1^T katalazının 406 nm’de ve *R.capsularas* katalaz-peroksidazının ise Soret pikini 403 nm’de gösterdiklerini belirtmektedirler. *Desulfovibrio gigas*’dan saflaştırılan katalazın doğal halinin 405 nm Soret piki gösterdiği, alkali-piridin-ditanyonit karışımında indirgenmiş halinin ise 522 ve 565.5 nm’lerde yüksek spinli ferrik pikleriyle 418 nm’de Soret piki gösterdiği ifade edilmektedir (Dos Santos vd., 2000).

Anoxybacillus gonensis Z4 suşundan elde edilen özütteki katalazın pH 7,0’de ve 50 °C’de en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Dinçer (2005)’in *Anoxybacillus*’un farklı kültürlerinde yapmış olduğu katalaz çalışmasında katalazın en yüksek aktivitesini pH 7,0 ve 40-60 °C sıcaklıkları arasında gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca konuyla ilgili birçok literatürde de katalazların optimum pH değerlerinin 7,0 olduğu ve 4,0-10,0 geniş bir pH aralığında da aktivite gösterdikleri ifade edilmektedir (Brown-Peterson ve Salin, 1993; Brown-Peterson ve Salin, 1995; Terzenbach ve Blaut, 1998; Wang vd., 1998; Zou ve Schrempf, 2000; Akgöl vd., 2001; Hidalgo vd., 2004). *Thermoascus aurantiacus*’un UV radyasyonundaki mutantından (M-3) elde edilen termofilik katalazın 70 °C’de en yüksek aktivite gösterdiği (Wang vd., 1998) ve halofilik bir bakteri olan *Halobacterium halobium*’den elde edilen mezofilik katalazın en yüksek aktiviteyi 40 °C’de gösterdiği (Brown-Peterson ve Salin, 1995) belirtilmiştir. Z4 katalazının literatür bilgileri ile kıyaslandığında mezofilik katalazlara göre daha yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterebildiği, fakat termofilik katalazlara göre de daha düşük sıcaklıklarda aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Z4 suşundan elde edilen katalazın H₂O₂ substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda V_{maks} değeri 250.000 U/mg protein ve K_m değeri 17,5 mM olarak belirlenmiştir. Agar ve agaroz ile yapılan tam hücre immobilizasyonu sonucunda V_{maks} değerinin 50.000 U/g jel ve K_m değerinin 200 mM olduğu tespit edilmiştir. Immobilizasyon işlemi sonucunda, substrat ile enzimin etkileşiminin azaldığı ve sigmoidal bir davranış gösterdiği gözlenmiştir. BLC’den elde edilen saf katalazla yapılan immobilizasyon çalışmasında, serbest enzim için V_{maks} değeri 236000 U/mg protein, K_m değeri 16,5 mM ve immobilize edilmiş enzim için V_{maks} değeri 118000 U/mg protein ve K_m değeri 25,8 mM olarak bulunmuştur (Akgöl vd., 2001). Bir fototrofik bakteri olan *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1’den saflaştırılan katalazın K_m değerinin 40 mM ve

V_{maks} değerinin 285000 U/mg protein olduğu hesaplanmıştır (Terzenbach ve Blaut, 1998). *Thermus brockianus*'dan saflaştırılan katalazın H_2O_2 substratı varlığında V_{maks} değerinin 20,3 U/mg protein olduğu ve K_m değerinin 35,5 mM olduğu belirtilmiştir (Thompson vd., 2003). *Thermoascus aurantiacus*'dan izole edilen termal-kararlı katalazın 48 mM K_m değerine ve $1.07 \times 10^5 s^{-1} k_{kat}$ değerine sahip olduğu belirtilmektedir (Wang vd., 1998). Bir mutant olan *Mycobacterium sp.* JCI DSM 3803'den saflaştırılan katalaz-perokidazın katalaz aktivitesi için yapılan kinetik çalışma sonucunda V_{maks} değerinin 15,9 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein ve K_m değerinin de 1,47 mM olarak bulunduğu belirtilmektedir (Ro vd., 2003). Ayrıca katalazın H_2O_2 substratına ilgisini gösteren K_m değeri Çetin (2000) tarafından tavuk karaciğeri katalazı için 100 mM, Chatterge ve arkadaşları (1989) tarafından keçi karaciğeri katalazı için 110 mM olarak rapor edilmiştir. Roka (*Eruca sativa*) bitkisinden saflaştırılan katalaz için K_m değerinin 62.5 mM olarak bulunduğu belirtilmiştir (Dinçer, 2000). Bu çalışmada kullanılan katalazın saflaştırılmış olmamasına rağmen V_{maks} ve K_m değerlerinin literatürlerdeki V_{maks} ve K_m değerlerine yakın çıktıkları görülmektedir. Ayrıca literatürlerde yer alan birçok katalazdan daha düşük bir K_m değerine sahip olduğu ve H_2O_2 substratına oldukça ilgi duyduğu görülmektedir.

Hill grafiklerinden elde edilen eğim (h), enzimlerin üzerindeki substrat-bağlanma bölgelerinin sayısı ve kooperativitenin olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. Hill sabitinin $h=1$ olması durumunda enzim için birden fazla bağlanma bölgesi olduğunu, fakat bu birimler arasında kooperativitenin olmadığını göstermektedir (Stenesch, 1984; Noble ve Oberdick, 1988). Bu çalışmada kullanılan katalazın H_2O_2 substratı varlığında elde edilen kinetik veriler ile çizilen Hill grafiğinin eğimi 1'e yakın çıktığı, bu enzimin üzerinde birden fazla substrat bağlanma bölgesinin olduğu ve bu altbirimler arasında kooperativitenin olmadığı gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan termofilik Z4 suşundan elde edilen katalazın NaN_3 , KCN, $HgCl_2$ ve 3-amino-1,2,4-triazol gibi bilinen katalaz inhibitörleri ile inhibe olduğu görülmüştür. Z4 suşundaki katalaz aktivitesinin NaN_3 , KCN ile inhibe olması, bu suştaki katalazın hem grubu içerdiğini ve diğer hemokatalazlar ile uyum içinde olduğunu göstermektedir (Wang vd., 1998). *Thermoascus aurantiacus*'dan izole edilen katalazın 0,1 mM siyanür ve azid ile yaklaşık %90 oranında, 1 mM Ca^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} metallerinin varlığında ise yalnızca Hg^{+2} ile %70 oranında inhibe olduğu belirtilmektedir (Wang vd., 1998). *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1'den saflaştırılan katalazın inhibisyon çalışması sonucunda CN^- , N_3^- , 2-merkaptolanol ve sodyum ditiyonit ile inhibe

olduğunu ve bu verilerin bu katalazın tek işlevli katalaz olduğunu kanıtladığı belirtilmektedir (Terzenbach ve Blaut, 1998).

Çalışmada tam hücre immobilizasyonunda doğal polimerlerden agar ve agarozun %2'lik çözeltileri kullanılmıştır. Agar ortamında immobilize edilmiş hücrelerin, katalaz aktivitesini 2. kez kullanımında %53, 3. kez kullanımında %38, 4. kez kullanımında %22 oranında, agaroz ortamında ise 2. kez kullanımında %80, 3. kez kullanımında %32, 4. kez kullanımında %27 oranında koruduğu gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda enzim saflaştırılmadan da tam hücrenin bir katalaz kaynağı olarak kullanılabilceği ve H₂O₂'in ortamdaki uzaklaştırılması için aynı immobilize kaynağın tekrar tekrar kullanılabilceği ön görülmektedir. Kesikli reaktörde kolona yüklenen 10, 20 ve 40 mg immobilize sığır katalaz örnekleri ilk kullanımda H₂O₂'nin sırasıyla %5, %9 ve %14'ünü parçalamışlar ve 16, 22 ve 15 kullanımları sonunda başlangıç aktivitelerinin %50'sini korumuşlardır (Alptekin, 2009). Serbest katalazlar bir kez kullanılabilir ve ortamda safsızlık oluştururlar. Endüstriyel açıdan bu durum uygun olmadığından immobilizasyon yöntemi tercih edilmiştir. Immobilize enzim, enzimin kinetik aktivitesini kaybetmeden belli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi veya hapsedilmesi olarak adlandırılır. Sadece enzimleri değil hücresel organelleri, mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal hücreleri de içeren biyokatalizörler kullanılarak dizayn edilen, enerji ve kaynak tasarrufu sağlayan ve düşük kirlilik üreten işlemler ile immobilizasyon yöntemi tercih edilmektedir (Chibata, 1978). Ayrıca küçük yapıları substratları katalizleyen enzimlerin saflaştırılması yerine tüm hücrenin immobilizasyonu hem maliyet açısından hem de zaman açısından daha avantajlı olacaktır (Kourkoutas, 2004).

Sonuç olarak, *Anoxybacillus gonensis* Z4 katalazı sıcaklık, pH, inhibisyon ve kinetik veriler bakımından literatürlere uyumluluk göstermektedir. Bununla birlikte agar ve agaroz ortamlarında tam hücre immobilizasyonunun gerçekleştirilmesiyle enzimi saflaştırmaya gerek kalmadan bir katalaz kaynağı olarak kullanılabilceği belirlenmiştir. Ayrıca bu matrisler içerisinde tam hücre immobilizasyonu gerçekleştirilen *Anoxybacillus gonensis* Z4 suşu'nun tekrar kullanılabilirliğine bakılarak birçok kez tekrar kullanılabilceği tespit edilmiştir.

5. ÖNERİLER

Bu çalışmada, termofilik Z4 bakterisinin endüstriyel bir enzim olan katalazı üretebilme kapasitesi belirlenmiş ve bu katalazın bazı kinetik verileri ortaya konmuştur. Ayrıca elde edilen Z4 bakterisinin tam hücre immobilizasyonu ile katalaz aktivitesi ölçülmüş ve bazı kinetik verileri ortaya konulmuştur. Bu veriler, bu termofilik kültürdeki katalaz veya izoenziminin genel davranışlarını göstermektedir. Bu katalazın 3-boyutlu yapısı hakkındaki detaylı bilgilere ancak saf enzimle çalışıldığı takdirde ulaşılabilecektir.

Endüstri alanlarında enzimlerin çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanmasından dolayı, enzimleri daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmaları artmıştır. Bu nedenle serbest enzimlerden daha fazla yararlanabilmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Endüstri alanlarında daha çok saf enzim veya immobilize edilmiş enzimler uygulama imkânı bulabilmektedir. Ancak enzimlerin saflaştırılması pahalı ve zahmetli bir yöntem olmasından dolayı alternatif kaynakların bulunması oldukça önem arz etmektedir. Saf olarak elde edilen enzim ile immobilize hücredeki enzimin kinetik parametreleri bulunarak birbirleriyle kıyas edilebilir ve böylece endüstriyel üretime daha fazla katkı sağlayabileceği düşünülen immobilizasyon yöntemi tercih edilebilir.

Z4 suşundan elde edilen özütteki katalazın ve immobilize katalazın kinetik parametreleri bulunmuştur. Ayrıca pH kararlılık ve termal kararlılıklarına bakılabilir ve termodinamik değerleri de bulunabilir. Yine bu çalışmada tam hücre immobilizasyonuna uğramış kültürün kinetik parametreleri bulunmuştur. Aynı şekilde pH kararlılık ve termal kararlılıklarına bakılabilir ve termodinamik parametreleri de bulunabilir. Z4 suşunun oldukça yüksek aktiviteye sahip katalaz üretebilmesi önemli bir katalaz kaynağı olarak görev yapabileceğini göstermektedir.

İleriki çalışmalarda, bu veriler ışığında, elde edilen Z4 katalazı için farklı saflaştırma ve immobilizasyon tekniklerinin belirlenmesi faydalı olacaktır. Bu saflaştırma işlemlerinden sonra bulunacak kinetik veriler, Z4 katalazı hakkında daha detaylı bilginin elde edilmesini sağlayacaktır. Ayrıca bu katalazın saflaştırılmasıyla, muhtemel olarak belirlenen enzim ve izoenzim molekül ağırlıkları daha detaylı olarak incelenebilecektir. Bununla birlikte, saf katalazlar ile elde edilecek spektroskopik veriler, aktif bölge hakkında daha çok bilgi verecektir. Immobilizasyon tekniğinde daha uygun matriksler kullanılarak enzimin tekrar kullanım sayısı artırılabilir. Ayrıca bu kültürdeki katalaz genlerinin belirlenip bir vektöre aktarılması sayesinde katalaz üretiminin artırılması sağlanabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmad, S., Anwar, A., Saleemuddin, M., Immobilization and stabilization of invertase on Cajanas cajan lectin support, *Biores. Technol.*, 79, 121- 127(2001).
- Aikens, J., Dix, T. Perhydroxyl Radical Initiated Lipid Peroxidation. The Role Of Fatty Acid Hydroperoxides. *J. Biol. Chem.*, (1991); 266(23): 15091 -8.
- Akertek, E., Tarhan, L., 1995. Characterization of Immobilized Catalases and Their Application in Pasteurization of Milk with H₂O₂ , *Applied Biochemistry and Biotechnology* 50:291-303.
- Akgöl, S., Yalcinkaya, Y., Bayramoglu, G., Denizli, A., Arica, M.Y., Reversible immobilisation of urease onto Procion Brown MX-5BR-Ni(II) attached polyamide hollow fibre membranes, *Process Biochem.*,8:675-83(2002).
- Aktaş, D., 2004. Sığır Karbonik Anhidraz Enziminin Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Alkan, S., Ceylan, H., Arslan, O., 2005. Bentonite-support Catalase. *Journal of Serbian Chemical Society*, 70(5):721-726.
- Alptekin, Ö., 2009. Katalazın Eupergit, Florisil ve Cam Desteklere Kovalent Olarak İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana.
- Allgood, G. S. ve Perry, J. J., 1986. Characterization of a Manganese-containing Catalase from the Obligate Thermophile *Thermoleophilum album*, *J. Bacteriol.*, 168, 563-567.
- Amara, P., Andreoletti, P., Jouve, H. M. ve Field, M. J., 2001. Ligand Diffusion in the Catalase from *Proteus mirabilis*: a Molecular Dynamics Study, *Protein Sci.*, 10, 1927–1935.
- Antonyuk, S. V., Melik-Adamyanyan, V. R., Popov, A. N., Lamzin, V. S., Hampstead, P. D., Harrison, P. M., vd., 2000. Crystal Structure of Manganese Catalase from *Lactobacillus plantarum*, *Structure*, 9, 725-738.
- Arıca M.Y., Immobilization of polyphenoloxidase on carboxymethylcellulose hydrogel beads: preparation and characterisation. *Polym. Int.*,49,775-81(2000)
- Baker, R. D., Cook, C. O. ve Goodwin, D. C., 2004. Properties of Catalase-Peroxidase Lacking Its C-terminal Domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 833-839.
- Barynin, V. V., Whittaker, M. M., Antonyuk, S. V., Lamzin, V. S., Harrison, P. M., Artymiuk, P. J. ve Whittaker, J. W., 2001. Crystal Structure of Manganese Catalase from *Lactobacillus plantarum*, *Structure (Camb)*, 9, 725-738.
- Başağa, H.S. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell Biol.*, (1990) 68: 989- 998.

- Bayramoğlu, G., E. Yalcin, M.Y.Arica, Immobilisation of urease via adsorption onto L-histidine –Ni(II) complexed poly(HEMA-MAH) microspheres: Preparation and characterization, *Process Biochem.*, 40,3505(2005).
- Beaumont, F., Jouvec, H. M., Gagnon, J., Gaillard, J. ve Pelmont, J., 1990. Purification and Properties of Catalase from Potato Tubers (*Solanum tuberosum*), *Plant Sci.*, 72, 1, 19-26.
- Belal, R., Momenteau, M., Meunier, B., 1989. Why an Oxygen and Not a Nitrogen Atom as Proximal Ligand in Catalase? Hydrogen Peroxide Dismutation catalyzed by Synthetic Iron and Manganese Porphyrins, *New J. Chem.*, 13, 853-862.
- Berthet, S., Nykyri, L. M., Bravo, J., Mate, M. J., Berthet-Colominas, C. Alzari, P. M., vd., 1997. Crystallization and Preliminary Structural Analysis of Catalase A from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Sci.*, 6, 481–483.
- Bicker, G. Nitric oxide: An unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroïd insect. *Arch. Insect Biochem.*, (2007) 48:100-110.
- Bravo, J., Fita, I., Gouet, P., Jouve, H. M., Melik-Adamyanyan, W. ve Murshudov, G. N., 1997. Structure of catalases. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* (Scandalios, J. G., ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., 407–445.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Snyder, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. *Nature*, (1990) 347:768-770.
- Cao, L., 2005. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*, p:174.
- Carpena, X., Loprasert, S., Mongkolsuk, S., Switala, J., Loewen, P. C. ve Fita, I., 2003. Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7 Å Resolution, *J. Mol. Biol.*, 327, 475-487.
- Chaudiere, J. ve Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants from Chemical to Biochemical Mechanism, *Food Chem. Toxicol.*, 37, 949-962.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs, *Physiol. Rev.*, 59, 3, 527-625.
- Chang, T.M.S., 1976. Microencapsulation of Enzymes and Biologicals *Methods in Enzymology*. pp:201–218. Academic Press, New York.
- Chatterjee, U., Kumar, A., Sanwal, G.G., 1990. Goat Liver Catalase Immobilization on Various Solid Supports. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70:429-430.
- Chelikani, P. V. G. B. K., 2004. Probing the Structure of *Escherichia coli* Catalase HPII, *Doktora Tezi, Manitoba Üniversitesi, Manitoba*.

- Chernukhin, I.V. and Klenova, E.M., "A method of immobilisation on the solid support of complex and simple enzymes retaining their activity" Anal. Biochem. (2000) 280, 178–181
- Choi, M.M.F., Yiu, T.P., 2004. Immobilization of Beef Liver Catalase on Eggshell Membrane for Fabrication of Hydrogen Peroxide Biosensor, Enzyme and Microbial Technology. 34(1): 41-47.
- Çetinus, Ş.A., Şahin, E., Saraydın, D., 2009. Preparation of Cu(II) Adsorbed Chitosan Beads for Catalase Immobilization, Food Chemistry, 114:962-969.
- Dasilva, E.J., The Colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind. Electronic Journal of Biotechnology, 2005. 7(3).
- Dhaese, P., 1996. Catalase: An enzyme with growing industrial potential, Chim. Oggi., 14, (1-2), 19-21.
- Dinçer, A., 2000. Roka (*Eruca sativa*) Bitkisinden Katalaz Enziminin Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Dinçer, B., 2005. Bazı Termofilik Bakterilerdeki Katalaz Aktivitesinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Diversity, S.o.t.C.o.B., *Catagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: text and annexes*. 2000, Convention on Biological Diversity, Montreal.
- Donald, L. J., Krokhin, O. V., Duckworth, H. W., Wiseman, B., Deemagarn, T., Singh, R., Switala, J., Carpena, X., Fita, I. ve Loewen, P. C., 2003. Characterization of the Catalase-peroxidase KatG from *Burkholderia pseudomallei* by Mass Spectrometry, J. Biol. Chem., 278, 35687-35692.
- Dounce, A. L., 1983. A Proposed Mechanism for the catalytic action of Catalase, J. Theor. Biol., 105, 553-567.
- Dos Santos, W. G., Pacheco, I., Liu, M.-Y., Teixeira, M., Xavier, A. V. ve Legal, J., 2000. Purification and Characterization of an Iron Superoxide Dismutase and a Catalase from the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio gigas*, J. Bacteriol., 182, 3, 796-804.
- Eberhardt, A. M., Pedroni V., Volpe, M., Ferreira, M. L., 2004. Immobilization of Catalase from *Aspergillus niger* on İnorganic and biopolymeric Supports for H₂O₂ Decomposition, Appl. Catalysis B: Environ., 47, 153-163.
- Evans, S., 1993. SETOR: hardware lighted three-dimensional solid model representations of macromolecules, J. Mol. Graphics, 11, 134-138.
- Fita, I., Rossmann, M. G., 1985. The Active Center of Catalase, J. Mol. Biol., 185, 1, 21-37.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D. Biology Of Disease: Free Radicals And Tissue Injury. Lab. Invest., (1982) 47: 412-426.

- Fridovich, I., 1986. Biological Effects of Superoxide Radical, Arch. Biochem. Biophys., 247, 1-11.
- Gouda, D., Thakur, M.S., Karanth, N. G., Optimization of the multienzyme system for sucrose biosensor by response surface methodology, Electroanal., 17,18-849(2001).
- Green, M. T., 2001. The Structure and Spin Coupling of Catalase Compound I: A Study of Noncovalent Effects, J. Am. Chem. Soc., 123, 9218-9219.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. ve Cross, E. C., 1992. Free Radical, Antioxidants, and Human Disease: Where are we now?, J. Lab. Clin. Med., 119, 6, 598-620.
- Halliwell, B. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. Med. Bio., (1984) 62:71-77.
- Hillar, A., Nicholls, P., Switala, J. ve Loewen, P. C., 1994. NADPH Binding and Control of Catalase Compound II Formation: Comparison of Bovine, Yeast, and *Escherichia coli* Enzymes, Biochem. J., 300, 531-539.
- Hillar, A., Peters, B., Pauls, R., Loboda, A., Zhang, H., Mauk, A. G. ve Loewen, P. C., 2000. Modulation of the Activities of Catalase-peroxidase HPI of *Escherichia coli* by Site-directed mutagenesis, Biochemistry, 39, 5868-5875.
- Jakopitsch, C., Auer, M., Ivancich, A., Rujer, F., Furtmuller, P. G. ve Obinger, C., 2003. Total Conversion of Bifunctional Catalase-peroxidase (KatG) to Monofunctional Peroxidase by Exchange of a Conserved Distal Side Tyrosine, J. Biol. Chem., 278, 20185-20191.
- Kalko, S. G., Gelpi, J. L., Fita, I. ve Orozco, M., 2001. Theoretical Study of the Mechanisms of Substrate Recognition by Catalase, J. Am. Chem. Soc., 123, 9665-9672.
- Kılınc K, Kılınc A. Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Med. J., (2002); 33(2): 110-118.
- Kirkman H. N., Gaetani G. F., 1984. Catalase: a Tetrameric Enzyme with Four Tightly Bound Molecules of NADPH, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 4343-4347.
- Kleywegt, G.J. ve Jones, T.A., 1994. In: From First Map to Final Model (S. Bailey, R. Hubbard, ve D.A. Waller, Eds.), SERC Daresbury Laboratory, Warrington, U.K., 59-66.
- Klotz, M. G. ve Loewen, P. C., 2003. The Molecular Evolution of Catalatic Hydroperoxidases: Evidence for Multiple lateral Transfer of Genes Between Prokaryota and from Bacteria into Eukaryota, Mol. Biol. Evol., 20, 1098-1012.
- Koller, F., 2005. Protein-engineering of Hydroperoxidases, Biyokimya Bölümü, Vienna Üniversitesi, (2005).
- Kono, Y. ve Fridovich, I., 1983. Isolation and Characterization of the Pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*, J. Biol. Chem., 258, 6015-6019.

- Kubal, B.S., D'Souza, D., 2004. Immobilization of Catalase by Entrapment of Permeabilized Yeast Cells in Hen Egg White Using Glutaraldehyde. *Journal of Biochemistry Biophysic Methods*, 59:61-64.
- Lafuente, R.F., Rodriguez, V., Guisan, J.M., 1998. The Coimmobilization Of D-Amino Acid Oxidase And Catalase Enables the Quantitative Transformation of D-Amino Acids (D-Phenylalaline) into α -Keto Acids (Phenylpyruvic Acid). *Enzyme and Microbial Technology*, 23:28-33.
- Lida, T., Maruyama, D., Fukunaga, K., 2000. Stabilization of Entrapped Catalase Using Photo Crosslinked Resin Gel for Use in Wastewater Containing Hydrogen Peroxide. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 75:1026-1030.
- Liochev, S., Fridovich, I. The Haber-Weiss Cycle 70 Years Later: An Alternative View. *Redox Rep.*, (2002); 7(1): 55-7; Author Reply 59-60.
- Loewen, P.C., 1997. Bacterial catalases, in: J.G. Scandalios (Ed.), *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 273–308.
- Luisi, P.L. and Magid, L.J., 1986. . Solubilization of Enzymes and Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar Solutions. *Critical Reviews in Biochemistry* 20 (4): 409–474.
- Melik-Adamyany, W., Bravo, J., Carpena, X., Switala, J., Mate, M. J., Fita, I. ve Loewen, P. C., 2001. Substrate Flow in Catalases Deduced from the Crystal Structures of Active Site Variants of HPII from *Escherichia coli*, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 44, 270–281.
- Murthy, M. R., Reid, T. J. 3d, Sicignano, A., Tanaka, N., Rossmann, M. G., 1981. Structure of Beef Liver Catalase, *J. Mol. Biol.*, 152, 2, 465-499.
- Nicholls, P., Fita, I. ve Loewen, P. C., 2001. Enzymology and Structure of Catalases, *Adv. Inorg. Chem.*, 51, 51-106.
- Olson, L. P. ve Bruice, T. C., 1995. Electron Tunneling and Ab Initio Calculations Related to One-Electron Oxidation of NAD(P)H Bound to Catalase, *Biochemistry*, 34, 7335–7347.
- Öztürk, N., Tabak, A., Akgöl, S., Denizli, A., 2008. Reversible immobilization of catalase by using a novel bentonite-cystein (bent-cys) microcomposite affinity sorbents. *Colloids and surfaces a: physicochemical and engineering aspects*, 322:148-154.
- Paar, A., Costa, S., Tzanov T., Gudelj, M., Robra, K., H., Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G. M., 2001. Thermo-alkali-stable Catalases from Newly Isolated *Bacillus* sp. For The Treatment and Recycling of Textile Bleaching Effluents, *J. Biotechnol.*, 89, 147-153.
- Potapovich, M.V., Eryomin A.N., Artzukevich, I.M., Chernikevich, I.P., Metelitz, D.I., 2001. Isolation, Purification, and Characterization of Catalase from the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry (Mosc)*, 66(6):646-57.

- Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Furthmuller, P. G., Rueker, F., Switala, J., Loewen, P. C. ve Obinger, C., 2001. The Role of Distal Tryptophan in the Bifunctional Activity of Catalase-peroxidase, *Biochem. Soc. Trans.*, 29, 99-105.
- Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Rueker, F., Krois, D., Peschek, G. A. ve Obinger, C., 2000. Effect of Distal Cavity Mutations on the Formation of Compound I in Catalase-Peroxidases, *J Biol. Chem.*, 275, 22854-22861.
- Reid, T. J. 3d, Murthy, M. R., Sicignano, A., Tanaka, N., Musick, W. D., Rossmann, M. G., 1981. Structure and Heme Environment of Beef Liver Catalase at 2.5 Å Resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 8, 4767–4771.
- Ro, Y. T., Lee, H. I., Kim, E. J., Koo, J. H., Kim, E., Kim, Y. M., 2003. Purification, Characterization, and Physiological Response of Catalase-Peroxidase in *Mycobacterium* sp. Strain JCI DSM 3803 Grown on Methanol, *FEMS Microbiol. Lett.*, 226, 397-403.
- Schmid, R.D., *Pocket Guide to Biotechnology and Genetic Engineering*. 1. 2003, Darmstadt, Wiley-VCH. 2-3.
- Schulz, B., Riedel, A., Abel, P.U., Influence of polymerization parameters and entrapment in poly (hydroxyethyl methacrylate) on activity and stability of GOD, *Jour. of Molec. Catal. B: Enzymatic*, 7, 85-91(1999).
- Seriner, R. ,2010, katalaz enziminin hıyardan (*cucimus sativus*) saflaştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Yüksek lisans tezi.
- Shioji, S., Hanada, M., Hayashi, Y., Tokami, K., Yamamoto, H., 2003. Continuous Surface Modification of Silica Particles for Enzyme Immobilization. *Advanced Powder Technology*, 14(2):231– 245.
- Solas M.T., vd., 1994. Ionic Adsorption of Catalase on Bioskin: Kinetic and Ultrastructural Studies, *Journal of Biotechnology* 33 63-70.
- Sonnleither, A., 1983. Biotechnology of Thermophilic Bacteria, Growth Products and Application, *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, 28, 69-138.
- Sperinde J.J. ve ark., 1997. Synthesis and Characterization of Enzymatically-crosslinked Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *Macromolecules*, 30:5255–5264
- Stahl, W., Sies, H. Introduction: Reactive oxygen species. *Res. Monogr.*, (2002) 1-2.
- Strickland, D., *Guide to Biotechnology*. 2007, Biotechnology Industry Organization. 136.
- Tanaka A. and Kawamoto T., 1999. Cell and Enzyme Immobilization. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed. Demain A.L. and Davies J.E., American Society for Microbiology. ISBN 1-55581-128-0. Washington.
- Tarhan, L., 1995. Use of Immobilised Catalase to Remove H₂O₂ Used in the Sterilisation of Milk, *Process Biochemistry*, 30(7):623-628.

- Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji. Yüksek Lisans Yazokulu. 21–27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye. 446 sayfa.
- Terzenbach D. P., Blaut, M., 1998. Purification and Characterization of a Catalase from the Nonsulfur Phototrophic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1 and Its Role in the Oxidative Stres Response, Arch. Microbiol., 169, 503-508.
- Thomas, J.A. Including glutathione, a peptide for cellular defense against oxidative stres. Toxicology, (1999) 53(2-3):269-76.
- Tischer, W., Kasche, V., "Immobilized Enzymes: Crystals or Carriers, TIBTECH, 17(1999).
- Triggs-Raine, B. L., Doble, B. W., Mulvey, M. R., Sorby, P. A. ve Loewen, P. C., 1988. Nucleotide Sequence of KatG, Encoding Catalase HPI of *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 170, 4415-4419.
- Uhlig, H., 1998. Industrial Enzymes and Their Applications. Wiley, New York.
- Unwin, P. N. T. (1975). Beef Liver Catalase Structure: Interpretation of Electron Micrographs, J. Mol. Biol., 98, 235-242.
- URL-1, <http://www.catalase.com/cataext.htm>, (10 Aralık 2011, 16:30).
- URL-2, <http://what-when-how.com/nanoscience-and-nanotechnology/atomic-force-microscopy-imaging-and-force-spectroscopy-of-microbial-cell-surfaces-part-1-nanotechnology/> (03 Haziran 2012, 11:00).
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact. 2006;160:1-40.
- Vasudevan, P.T., Weiland, R.H., 1994. Studies on the Morphology of Immobilized Catalase. The Chemical Engineering Journal, 55:B41-B45.
- Wada, K., Tada, T., Nakamura, Y., Kinoshita, T., Tamoi, M., Shigeoka, S. ve Nishimura, K., 2002. Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Studies of Catalase-peroxidase from *Synechococcus* PCC 7942, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., 58, 157-159.
- Wang, Z.G., Ke B.B., Xu Z.K., 2007. Covalent Immobilization of Redox Enzyme on Electrospun Nonwoven Poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) Nanofiber Mesh Filled with Carbon Nanotubes : A Comprehensive Study. Biotechnology and Bioengineering, 97(4): 708-720.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Buchmann, A.F. and Kula, M.R., 1981. Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme Membrane Reactor with Simultaneous NADH Regeneration. Biotechnology and Bioengineering, 23: 2789–2802.
- Wiseman, A. 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England.

- Yamada, Y., Saijo, S., Sato, T., Igarashi, N., Usui, H., Fujiwara, T. ve Tanaka, N., 2001. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Catalase-peroxidase from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 57, 1157-1158.
- Zaborsky O.R., 1973. *Immobilized Enzymes*. CRC Press, Cleveland, Ohio. p. 175.
- Zamocky, M. ve Koller, F., 1999. Understanding the Structure and Function of Catalases: Clues from Molecular Evolution and *in vitro* Mutagenesis, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 72, 19-66.
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D. ve Cole, S., 1992. The Catalase-peroxidase Gene and Isoniazid Resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nature*, 358, 591-593.
- Zou, P. ve Schrempf, H., 2000. The Heme-Independent Manganese-Peroxidase Activity Depends on the Presence of the C-Terminal Domain Within the *Streptomyces reticuli* Catalase-Peroxidase CpeB, *Eur. J. Biochem.*, 267, 2840-2849.

ÖZGEÇMİŞ

01.11.1988 yılında Erzurum'un Çat ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Erzurum Şair Nef-i İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Orta öğrenimini İstanbul Sultanbeyli Gediktaş Lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandı. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü bitirdi. 2008 yılında Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans programına başladı.