

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Aspergillus niger* KATALAZİNİN ÜRETİMİ, ÜÇLÜ-FAZ
AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

EDA BAYKAL SARI

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aspergillus niger KATALAZİNİN ÜRETİMİ, ÜÇLÜ-FAZ
AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU

EDA BAYKAL SARI

Dr. Öğr. Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ
Danışman, Kocaeli Üniv.
Doç. Dr. Halim Aytekin ERGÜL
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.
Doç. Dr. Ayşe AVCI
Jüri Üyesi, Sakarya Üniv.





Tezin Savunulduğu Tarih: 10.07.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, *Aspergillus niger* katalazının üretimi, Üçlü-Faz Ayırma Sistemi (Three-Phase Partitioning, TPP) ile saflaştırılması ve karakterize edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, gelecekte de bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ'a, bu çalışmamda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Biyoloji Bölümündeki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, her zaman desteklerini hissettiğim çalışma arkadaşlarım Günce GÖÇ, Semih IŞIK, Ceren AĞGEZ ve Binnur YILDIRIM'a teşekkürü borç bilirim.

Son olarak, çalışmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili eşim Cihat SARI'ya ve canım annem Nurgül GELEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: 2017/90) birimine şükranlarımı sunarım.

Haziran – 2019

Eda BAYKAL SARI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLOLAR DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
GİRİŞ	1
1.GENEL BİLGİLER	4
1.1. Oksidatif Stres.....	4
1.2. Antioksidan Enzimler.....	4
1.3. Katalazlar	5
1.3.1. Monofonksiyonel Katalazlar.....	6
1.3.2. Katalaz Peroksidazlar.....	7
1.3.3. Mn katalazlar.....	8
1.4. Mikrobiyal Katalazlar	9
1.5. Katalazların Çift Aktivite Özelliği.....	10
1.6. Katalazların Endüstriyel Uygulamaları.....	12
1.7. Mikroorganizmalar.....	13
1.7.1. <i>Aspergillus</i>	13
1.7.2. <i>Aspergillus niger</i>	14
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	17
2.1. Malzemeler.....	17
2.1.1. Kimyasallar	17
2.1.2. Mikroorganizma.....	17
2.2. Yöntemler.....	17
2.2.1. Mikroorganizma ve kültür hazırlanması	17
2.2.2. Biyokütle tayini.....	18
2.2.3. Enzim aktivite tayinleri	18
2.2.3.1. Katalaz (CAT) aktivite ölçümü.....	18
2.2.3.2. Peroksidaz (POD) aktivite ölçümü.....	19
2.2.4. Protein miktar tayini.....	19
2.2.5. Enzim saflaştırma.....	19
2.2.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	20
2.2.7. Substrat spesifite analizi.....	20
2.2.8. Enzimin fizyolojik özellikleri	21
2.2.9. Enzim stabilite tayini.....	21
2.2.10. Kinetik analizler	22
3.BULGULAR VE TARTIŞMA	23
3.1. Zamana Bağlı Katalaz Üretimine Ölçülmesi	23
3.2. Optimum Katalaz Üretim Koşullarının Belirlenmesi	25
3.2.1. Sıcaklığın enzim üretimine etkisi.....	25
3.2.2. H ₂ O ₂ 'nin enzim üretimine etkisi	26

3.3. Katalaz Enziminin Safılaştırılması.....	27
3.3.1. Kromatografik yöntemle safılaştırma.....	27
3.3.2. Üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile safılaştırma.....	29
3.5. Katalaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu	34
3.5.1. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi	34
3.5.2. Optimum pH değerinin belirlenmesi.....	35
3.5.3. Termal kararlılığının belirlenmesi.....	36
3.5.4. pH kararlılığının belirlenmesi	37
3.5.5. Organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi	37
3.5.6. Farklı substratların enzim aktivitesine etkisi	38
3.5.7. Kinetik parametrelerin belirlenmesi.....	40
4.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	45
EKLER.....	52
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	57
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. 'Hem' grupları.....	7
Şekil 1.2. <i>A. niger</i> 'in mikroskopik görüntüsü.....	15
Şekil 3.1. <i>A. niger</i> 'a ait biyokütle (g/L) ve katalaz (U/L) aktivite grafiği.	23
Şekil 3.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) konsantrasyonunun katalaz üretim üzerine etkisi.	27
Şekil 3.3. Farklı amonyum sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄) konsantrasyonlarında hazırlanmış <i>A.niger</i> özütüne ait süpernatant ve pelet örneklerinin SDS-PAGE analizi.	28
Şekil 3.4. <i>A. niger</i> 'den TPP ile saflaştırılan katalazın SDS-PAGE jel görüntüsü.....	34
Şekil 3.5. <i>A. niger</i> katalazının farklı sıcaklık değerlerinde ölçülen bağlı aktivite grafiği	35
Şekil 3.6. <i>A. niger</i> 'in katalaz aktivitesine pH'nın etkisi	36
Şekil 3.7. <i>A. niger</i> katalazının termal kararlılığı	37
Şekil 3.8. <i>A. niger</i> katalazının pH kararlılığı	37
Şekil 3.9. H ₂ O ₂ konsantrasyonunun katalaz aktivitesine etkisini gösteren Michelis-Menten grafiği	40
Şekil 3.10. Katalaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramı.....	41

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3. 1. Mikroorganizmalar ve sekonder metabolitleri.....	24
Tablo 3. 2. Sıcaklığın katalaz üretimine etkisi	25
Tablo 3. 3. Farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonlarının katalaz üretimine etkisi.....	27
Tablo 3. 4. Farklı (NH ₄) ₂ SO ₄ doygunluklarında hazırlanmış örneklere ait pelet ve süpernatantlarda katalaz aktivite ve protein miktarlar değerlerinin karşılaştırılması	28
Tablo 3. 5. Katalaz enziminin saflaştırma basamakları	29
Tablo 3. 6. Amonyum sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄) konsantrasyonunun TPP sisteminde katalaz ayırımına etkisi	31
Tablo 3. 7. Ham ekstrakt/t-bütanol oranının TPP sisteminde katalaz ayırımına etkisi	32
Tablo 3. 8. TPP sistem pH'sının katalaz ayırımına etkisi	33
Tablo 3. 9. Organik çözücülerin <i>A.niger</i> katalaz aktivitesi üzerine etkisi	38
Tablo 3.10. <i>A.niger</i> katalazının farklı oksidatif/peroksidatif substratları varlığında aktivitesinin ölçümü ve değerlerin aynı substratlar varlığında ölçülen <i>T.versicolor</i> lakkazı ile turp peroksidazıyla karşılaştırılması	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
=	: Eşittir
μL	: Mikrolitre
cm	: Santimetre
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
U	: Unit-Enzim birimi
$\mu\text{mol/mL/dk}$: mikromol/mililitre/dakika
nmol/mL/dk	: nanomol/mililitre/dakika
U/g	: Unit/gram
g/L	: gram/litre
mg/mL	: miligram/mililitre

Kısaltmalar

APS	: Amonyum persülfat
dH_2O	: Deiyonize su
DMSO	: Dimethyl sulfoxide (Dimetil sülfoksit)
HCl	: Hidroklorik asit
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
kDa	: Kilodalton
K_2HPO_4	: Di potasyum fosfat
MgSO_4	: Magnezyum sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Amonyum sülfat
pH	: Power of hydrogen (Hidrojenin gücü)
Rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	: Tetrametiletildiamin
(v/v)	: Volume/Volume
(w/w)	: Weight/Weight

***Aspergillus niger* KATALAZININ ÜRETİMİ, ÜÇLÜ-FAZ AYIRMA SİSTEMİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

ÖZET

Katalazlar (EC 1.11.1.6) antioksidan metalloenzimler sınıfına dahil olup başlıca işlevleri hidrojen peroksidin su ve moleküler oksijene parçalanmasıdır. Katalazlarla yaklaşık yüzyıldır çalışılmasına rağmen, özellikleri ile ilgili yeni bulgular keşfedilmektedir. Bu çalışmada *Aspergillus niger* katalazının üretimi, saflaştırılması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Buna göre 1 litrelik YpSs sıvı büyüme ortamında 37°C ve 155 rpm çalkalama hızında büyütülen *A. niger*'den 7. günde ham enzim ekstraktı elde edilmiştir. Katalaz enzimi hem iyon değiştirme kromatografisi hem de üçlü-faz ayırma yöntemi ile saflaştırılmıştır. Kromatografik yöntemle yapılan saflaştırmada enzim aktivitesinde %42 oranında azalma gözlenmiştir. Diğer yandan, üçlü-faz ayırma yönteminde %80 (w/w) amonyum sülfat içeren ve ham ekstrakt:t-butanol oranı 1:1,5 olacak şekilde pH 7,0'da hazırlanan sistemden katalaz enzimi %263 geri kazanım ile 7,9 kat saflaştırılmıştır. Enzim örneğinin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiş olup jelde yaklaşık 87 kDa molekül ağırlığına denk gelen tek bir bant gözlenmiştir. Saf enzimin K_m değeri (21,4 mM), optimum reaksiyon sıcaklığı (50°C) ve optimum reaksiyon pH'sı (6,0) belirlenmiştir. Kararlılık testleri enzimin aktif olarak kalabildiği sıcaklık aralığının (30°C -40°C) nispeten dar, ancak pH aralığının (4.0-9.0) oldukça geniş olduğunu göstermiştir. Ayrıca, %7,5'lik (v/v) etanol varlığında aktivitenin yaklaşık %77'si korunmuştur. Bununla birlikte, esas fonksiyonunun yanında 4-metil katekol ve pyrokatekol gibi fenolik bileşikler peroksitten bağımsız olarak okside edebilmiştir. Sonuç olarak, *A. niger*'den katalaz enziminin geleneksel kromatografi yöntemi yerine zamandan tasarruf sağlayan, maliyeti ucuz ve kullanımı oldukça kolay olan üçlü faz sistemleri ile saflaştırılabildiği görülmektedir. Enzimin sahip olduğu biyokimyasal özellikleri, çeşitli endüstriyel uygulama alanlarında avantaj sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus niger*, Katalaz, Oksidaz, Üçlü-Faz Ayırma Sistemi.

PRODUCTION, PURIFICATION OF *Aspergillus niger* CATALASE BY THREE-PHASE PARTITIONING AND ITS BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION

ABSTRACT

Catalases (EC 1.11.1.6) belonging to metalloenzyme family catalyze the degradation of hydrogen peroxide to water and molecular oxygen. Although catalases have been studied by almost a century, some characteristics have been recently discovered. For that purpose, crude enzyme extract was obtained from *A. niger* on 7th day of cultivation of cells grown at 37°C and 155 rpm in 1 liter YpSs medium containing 1% glucose. Catalase enzyme was purified by both ion exchange chromatography and three-phase partitioning method. Chromatography-based purification has resulted in a 42% reduction in the enzyme activity. On the other hand, the three-phase partitioning method which was prepared by 80% (w/w) ammonium sulfate saturation at pH 7 with 1:1.5 (v/v) ratio of crude extract to t-butanol gave 7.9-fold purification with 263% activity recovery. The K_m value, optimum reaction temperature and optimum reaction pH of the catalase were determined. The stability tests have revealed that the enzyme remained stable in a narrow temperature whereas in a wide range of pH. In addition, about 77% of the activity has been maintained in the presence of ethanol up to a concentration of 7.5% (v/v). Besides its main function it could oxidase substrates such as 4-methyl catechol and pyrocatechol in the absence of peroxide. To conclude, the catalase enzyme from *A. niger* can be purified by a three phase partitioning system, which is time-effective, inexpensive and very easy to use, rather than a conventional chromatography method. The biochemical properties of the resulting catalase enzyme can provide advantages in various industrial applications.

Keywords: *Aspergillus niger*, Catalase, Oxidase, Three-Phase Partitioning System.

GİRİŞ

Katalazlar, doğada yaygın olarak bulunan ve üzerinde en çok çalışılan enzim gruplarından biridir. Başlıca görevleri, hücrelerdeki fazla hidrojen peroksidin (H_2O_2) moleküler oksijen ve suya parçalanmasını sağlayarak onun zararlı etkilerinden hücreyi korumaktır (Chelikani ve diğ., 2004; Kurakov ve diğ., 2001). Asıl fonksiyonunun yanında, ortamda uygun bir organik elektron verici bulunduğunda peroksidatif aktivite de gösterebildiği gözlenmiştir. Bu ikincil aktivite, genel olarak, peroksit yıkımı beraberinde gerçekleşen metanol, etanol, formik asit ya da fenol gibi organik bileşiklerin oksidasyonu şeklinde tanımlanmaktadır. Genelde H_2O_2 seviyesinin oldukça düşük olduğu durumda bu peroksidatif aktivite önem kazanmaktadır (Maté ve diğ., 1999).

Katalazlar genel olarak üç gruba ayrılabilir: Monofonksiyonel “hem” grubu içeren katalazlar, Katalaz-peroksidazlar ve Demir/hem içermeyip Mn içeren katalazlar (Switala ve Loewen, 2002). Bu üç grup arasında üzerinde en çok çalışılan ve oldukça yaygın olan grup aktif bölgelerinde “hem” grubu bulunduran monofonksiyonel katalazlardır (Chelikani ve diğ., 2004; Switala ve Loewen, 2002). Yakın geçmişte monofonksiyonel katalazlar için keşfedilen bulgular oldukça dikkat çekicidir. Örneğin, termofilik bir mantar olan *Scytalidium thermophilum* tarafından büyümeye paralel olarak üretilen ve monofonksiyonel katalaz ailesine dahil olduğu kristal yapısı belirlenerek bulunan enziminin hidrojen peroksit yokluğunda çeşitli *orto-* ve *para-*difenolik bileşikleri okside ettiği rapor edilmiştir (Koclar Avcı ve diğ., 2013; Yuzugullu ve diğ., 2013). *S. thermophilum* katalazında gözlenen bu fenol oksidaz aktivitesinin enzim üzerinde koruyucu bir rol üstlendiği önerilmektedir (Yuzugullu Karakus ve diğ., 2018). Monofonksiyonel katalazda gözlenen bu ikincil aktivitesinin varlığı memeli (Vetrano ve diğ., 2005), *Bacillus pumilus* (Loewen ve diğ., 2015; Sangar ve diğ., 2012), *Thermobifida fusca* (Loncar ve Fraaije, 2015) ve *Amaranthus cruentus* (Chen ve diğ., 2017; Teng ve diğ., 2016) katalazlarında da vurgulanmıştır. Ayrıca *Aspergillus niger* başta olmak üzere çeşitli kaynaklardan (*Corynebacterium*

glutamicum, insan eritrositleri) izole edilen ticari katalazlarda da benzer oksidaz aktivite gözlenmiştir (Yuzugullu ve diğ., 2013). Buradan, ikincil aktiviteye sahip katalaz türü enzimlerin çok daha yaygın olabileceği, hatta insanda da olabileceği anlaşılmaktadır.

Katalazlar; başlıca gıda, tekstil, farmasötik ve kağıt endüstrileri başta olmak üzere; immobilizasyon, detoksifikasyon sistemleri ve enzimatik polimerizasyon gibi çeşitli alanlarda da uygulama alanına sahiptir (Loncar ve Fraaije, 2015). Diğer yandan, yakın zamanda mikrobiyal ve bitkisel kaynaklı bazı katalazlarda gözlenen ikincil oksidatif/peroksidatif aktivite ile ilgili rapor edilen uygulamalar da dikkat çekicidir. Bunlar arasında penisilin oksidasyonu (Sangar ve diğ., 2012), polifenolikler (Loewen ve diğ., 2015) ile fenil ve sülfid gruplarını taşıyan bileşiklerin oksidasyonu (Loncar ve Fraaije, 2015) ve monofenollerin difenollere dönüştürülmesi (Teng ve diğ., 2016) örnek verilebilir. Buradan çift aktiviteye sahip katalazın canlılarda önemli bir antioksidan olma özelliğinin yanı sıra ikincil aktivite yeteneği ile çeşitli endüstriyel uygulamalarda iyi bir biyokatalizör olarak da kullanılabileceği anlaşılmaktadır.

Mezofilik mantarlar doğada en sık görülen ökaryotik mikroorganizmalardır. Optimum büyüme sıcaklıkları genellikle 37°C, en yüksek sıcaklık ise genellikle 45°C'dir. Aniden yüksek ısıya maruz kaldıklarında, ısı şok proteinleri (heat-shock protein, HSP) sentezinin artışı ile canlı kalmaları arasında bir ilişkili olduğu düşünülmüştür. Isı şok yöntemi kullanıldığı zaman, bazı mezofilik mantar türleri termofilik derecede üreyebilirler (Halil ve Kalkancı, 2008). Termotoleran özellik gösterenlere örnek olarak *A. fumigatus* ve *A. niger* türleri verilebilir. Bu tip mantarlar tarafından üretilen termostabil enzimler endüstriyel açıdan önemlidirler (Wyss ve diğ., 1998).

Aspergillus türlerinde farklı sayıda ve çeşitte katalaz enzimi üretilmektedir. Genel olarak miselyum ve konidyada bir veya daha fazla sayıda büyük ve küçük alt üniteli monofonksiyonel katalazların bulunduğu rapor edilirken, katalaz-peroksidazların ise sadece bir tane olduğu ve bunun miselyumda bulunduğu belirtilmiştir (Calera ve diğ., 2000; Hansberg ve diğ., 2012; Paris ve diğ., 2003). *A. niger* ticari katalaz enzim kaynaklarından biri olmakla birlikte bu küfte en az dört farklı katalaz enziminin üretildiği bulunmuştur. Bunlardan ikisinin glukoz oksidaz enziminin varlığına bağlı olarak üretildiği rapor edilirken diğer iki katalazın *Neurospora crassa* katalazı

(monofonksiyonel) ile benzerlik taşıdığı belirtilmiştir (Witteveen ve diğ.,1992). Ancak enzimin kinetik özellikleri henüz araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, *A. niger* katalazının üretimi, Üçlü-Faz Ayırma Sistemi (Three-Phase Partitioning, TPP) ile saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu hedeflenmiştir. Üçlü-Faz Ayırma Sistemi proteinlerin bozulmadan sıvı fazda kalması için uygun bir ortam sağlamasının yanı sıra işlem süresinin kısa olması, enzimin yüksek geri kazanımla ve düşük maliyette saflaştırılması gibi ayrıcalıklara sahiptir. Sistem, ham enzim ekstraktına amonyum sülfat (tuz) ve t-bütanol (organik çözücü) eklenmesinden oluşur. Sonuçta iki ayrı sıvı faz (üstte alkol içeren faz ve altta tuzlu sulu faz) meydana gelir. Amonyum sülfat, proteinlerin “salting-out” etkisiyle dereceli olarak çökmelerini sağlayan bir tuzdur. Bütanol ise istenmeyen bileşiklerin (düşük molekül ağırlığına sahip lipid ve fenolik maddeler) biyomoleküllerden seçici olarak uzaklaştırılmasını sağlar (Dennison ve Lovrien, 1997). Proteinleri denatüre etmediği için birçok enzimin (invertaz, pektinaz, β -galaktozidaz, ksilinaz, vb.) saflaştırılmasında tercih edilmiştir (Duman ve Kaya, 2014; Roy ve diğ., 2004).

Literatürde katalazların farklı mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılmasına yönelik raporlar mevcuttur; ancak küflerden katalaz eldesi üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır (Sooch ve diğ., 2014). Bu çalışmalar incelendiğinde çoğunlukla kromatografik yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir (Yuzugullu ve diğ., 2013; Tian ve diğ., 2013). Dolayısıyla, katalazların küflerden üçlü-faz sistemi ile saflaştırılmasına yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Katalaz kaynağı olarak seçilen *A. niger*, hem ticari katalaz üretiminde yaygın olarak kullanılan mikroorganizma olması hem de ticari enzimle gerçekleştirilen ön çalışmalarda ikincil oksidaz aktivite varlığının tespit edilmesi nedeniyle uygun bir enzim kaynağıdır. TPP ile katalaz enziminin saflaştırma koşulları optimize edilmiş ve bu amaçla uygun amonyum sülfat konsantrasyonu, t-bütanol miktarı ve pH gibi parametrelerin etkisi incelenmiştir. Saf katalaz enziminin biyokimyasal özellikleri de ayrıca analiz edilmiştir.

1.GENEL BİLGİLER

1.1.Oksidatif Stres

Hücrel metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin artışı (ROS) ile bu reaktif oksijenleri detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sebebiyle oksidatif dengenin bozulması “Oksidatif stres” olarak adlandırılır. Oksijenli solunum sırasında hem ökaryotik hem de prokaryotik organizmalar moleküler oksijen (O₂) kullanmakta ve metabolizmalarının yan ürünü olarak reaktif oksijen bileşiklerini (ROS) oluşturmaktadırlar. ROS’lar bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, molekül ağırlığı düşük ve oldukça reaktif moleküllerdir. Hücre içinde fazla miktarda biriktiklerinde oksidatif strese sebep olmaktadır (Özcan ve diğ.,2015).

Oksidatif stresteki artışa bağlı olarak meydana çıkan reaktif oksijen türleri hücre içi lipit, protein ve DNA gibi makromoleküllere zarar vererek hücre hasarları veya hücre ölümlerine neden olurlar. (Aguirre ve diğ., 2005; Özcan ve diğ.,2015). Bu açıdan, oksidatif stresin, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi çok sayıda hastalığın temel nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir.

1.2. Antioksidan Enzimler

Düşük konsantrasyonlarda okside edilebilen ve başka bir substratın oksidasyonunu azaltarak ya da engelleyerek oksidasyona karşı mücadele eden maddeler “antioksidan” olarak adlandırılır. Tüm hayvansal ve bitkisel organizmalar serbest radikallerin zararlarını engellemek için antioksidan sistemlere sahiptirler. Bu sistemler enzimatik olan ve olmayan olarak iki kısma ayrılır. Alfa tokoferol (Vitamin E) ve Beta-karoten (Vitamin A) enzimatik olmayan antioksidanlara; süperoksit dismutaz ve katalaz ise enzimatik antioksidanlara örnek olarak verilebilir (Özcan ve diğ.,2005).

Antioksidanlar, oksidatif strese karşı etkilerini farklı şekillerde gösterirler. Örneğin glutasyon gibi antioksidan moleküller direk olarak ROS konsantrasyonunu azaltırken,

süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirirler (Baskin ve Salem,1997).

Oksijenli solunum yapan organizmalar serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunabilmek için başlıca dört enzimden yararlanmaktadır. Bunlar, *glutasyon peroksidaz*, *süperoksit dismutaz*, *glutasyon redüktaz* ve *katalaz* tipi enzimlerdir (Aguirre ve diğ., 2005; Angelova ve diğ., 2005). Bunlardan katalazlar substratının ucuz olması ve aktivite analizinin kolay olmasından dolayı moleküler biyologlar ve biyokimyacılar tarafından tercih edilmektedir. Ayrıca katalazın süperoksit dismutaz enziminin antioksidatif etkilerini ortadan kaldırmak için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Fox ve diğ., 1998; Stauffer, 1989; Yüzügüllü ve Ögel, 2013). Katalazlar normal koşullarda bazı hücreler için gerekli olmasa da, oksidatif stresin arttığı durumlarda önemli bir etkiye sahiptir. İlk olarak 1900 yılında isimlendirilen (Nicholls ve diğ., 2001) katalaz enziminin günümüzde prokaryot ve ökaryotlarda çok sayıda temsilcisi olduğu bilinmektedir. (Zámocký ve diğ., 1999).

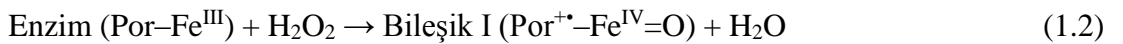
1.3. Katalazlar

Katalazlar, aktif kısmında hem-demir içeren, neredeyse tüm hayvansal ve bitkisel dokularda bulunan hemoprotein özelliğinde bir enzimdir. Oksido-redüksiyon olayları neticesinde oluşan hidrojen peroksitten hücreleri korumaktadır. Katalaz enzimi hidrojen peroksiti parçalayarak zararsız hale getirir ve parçalanma ürünü olarak oksijen serbest hale geçer (Mates ve diğ., 1999; Speranza ve diğ., 1993). Hidrojen peroksiti (H_2O_2) moleküler oksijen ve suya dönüştürerek, hücreleri hidrojen peroksidin olumsuz etkilerinden Denklem (1.1)'deki gibi;



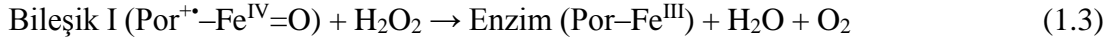
korumaktadır.

Katalazların gerçekleştirdiği katalitik reaksiyon 2 ayrı basamaktan oluşur (Chelikani ve diğ., 2004). Birinci basamakta bir hidrojen peroksit molekülü, ferrik enzimi (hem grubunu) oksiferril formuna (Bileşik I) çevirir ve ortaya Denklem (1.2)'deki gibi;



Su (H_2O) çıkar.

İkinci basamakta H₂O₂ molekülü, Bileşik I'ı, indirgeyerek enzimi tekrar orijinal formuna dönüştürür ve böylece Denklem (1.3)'deki gibi;



ikinci basamak tamamlanır.

Katalazlar genel olarak; alt ünite büyüklükleri, sekans grupları ve 'Hem' gruplarına göre üç gruba ayrılırlar. Bunlar,

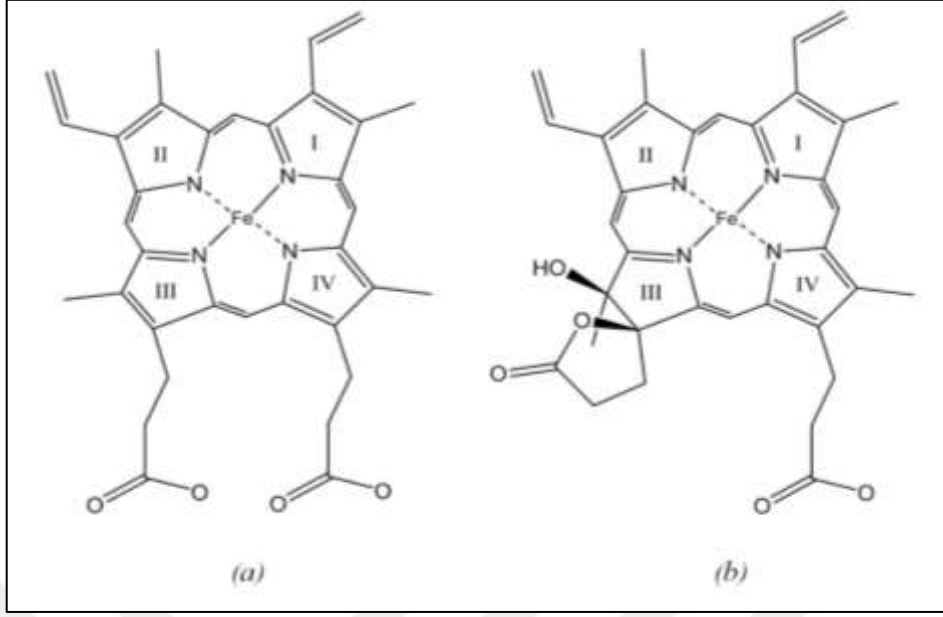
1. Monofonksiyonel Demir/Hem grubu içeren katalazlar,
2. Hem grubu içeren katalaz-peroksidazlar,
3. Demir/Hem içermeyip Mangan içeren katalazlardır (Loewen ve diğ., 2015).

1.3.1. Monofonksiyonel katalazlar

Oldukça yaygın olan bu grup aktif bölgelerinde “demir/hem” grubu bulundurulur (Chelikani ve diğ., 2004; Switala ve Loewen, 2002). Genellikle tetramerik yapıdadır; monomerleri 55-60 kDa (küçük alt üniteli) ve 75-80 kDa (büyük alt üniteli) olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Bu iki grup arasındaki en temel fark, aktif bölgelerinde bulunan prostetik grubun çeşididir.

Küçük alt üniteli katalazların çoğu 'b' tipi 'Hem' grubuna sahiptir ve bir NAD(P)H (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Chelikani ve diğ., 2004; Zamocky ve diğ., 2008). Bu bağlanma bölgesi, katalaz aktivitesinde rol oynamamasına karşın katalitik döngüde enzim formunun korunmasını sağlamaktadır (Cattani ve diğ., 1994; Kirkman ve diğ., 1984).

Büyük alt üniteli katalazlar ise 'd' tipi 'Hem' içerirler ve NAD(P)H bağlanma bölgesi bulundurmazlar (Cattani ve diğ., 1994). Bunun yerine bu tip katalazlarda C-terminal (karboksil uç) bölgesi daha uzun olup sıcaklık ve denatüre edici ajanlara karşı küçük alt üniteli katalazlara göre daha dayanıklıdır (Maté ve diğ., 2001).



Şekil 1.1. 'Hem' grupları. (a) *b* tipi hem grubunun yapısı (b) *d* tipi hem grubunun yapısı (Yuzugullu ve diğ., 2013)

1.3.2. Katalaz peroksidazlar

Katalaz-peroksidazlar, monofonksiyonel katalazlar gibi aktif bölgelerinde “demir/hem” grubu içerirler ve molekül ağırlıkları yaklaşık 120-340 kDa arasında farklılık gösteren homodimer yapılu enzimlerdir. Bu gruptaki katalazlar, katalitik aktiviteye ek olarak, substratı olan hidrojen peroksit seviyesinin düşük olduğu durumlarda peroksidatif aktivite de gösterirler. İki katalitik aktivitenin ismini verdiği ve *katG* geni tarafından kodlanan katalaz-peroksidaz enziminde etkin olan aktivite, hidrojen peroksitin moleküler oksijen ve suya dönüşümünü sağlayan katalaz aktivitesidir. Daha yavaş gerçekleşen peroksidatif tepkime için enzim birçok elektron verici kullanabilmektedir.

Katalaz aktivitesi yüksek olan katalaz-peroksidazlar ile monofonksiyonel katalazlar yapısal olarak ve gen dizilimi açısından karşılaştırıldığında bir benzerliğin olmadığı görülmektedir. Ek olarak katalaz-peroksidazın aktivite olarak katalaz ve peroksidaz ile sınırlı kalmadığı ve ayrıca, diiyonidin izonikotinic asit anhidridin uzaklaştırılması, NADH oksidasyonu ve izonikotinin-NAD oluşumu dahil olmak üzere çeşitli diğer tepkimeleri de katalizleyebildiği için çok yönlü olduğu düşünülmektedir (Fita ve diğ., 2015; Nicholls ve diğ., 2001).

katG geni tarafından klonlanan katalaz-peroksidaz enzimi öbakteriler, arkeler ve birçok ökaryotda bulunmaktadır. *katG* geninin, 'Hem' grubuna sahip

monofonksiyonel katalazlardan daha sonra evrimleştiği bilinmektedir. Bu genin ökaryotlar ve arkelerde bulunması yanıl (lateral) gen transferinin olduğunu göstermektedir.

Hidrojen peroksit, çoğu biyolojik sürecin sonunda yan ürün olarak ortaya çıkmaktadır. Örneğin nütrofiller, bakteriyal enfeksiyonlara karşı kendini korumak için hidrojen peroksit üretmektedir. Aşırı reaktif bir diğer oksidan olan süperoksit iyonu da birçok biyolojik süreçte üretilmekte ve bir antioksidan olan süperoksit dismutaz enzimi sayesinde H_2O_2 'ye dönüştürülmektedir. Hidrojen peroksit ve metal iyonları bir araya gelerek fenton tepkimesi gibi aşırı reaktif ve zararlı hidroksil radikalleri meydana getirmektedir. Bundan dolayı, katalaz ve peroksidazların birlikte H_2O_2 'nin suya (peroksidazlarda) veya su ile birlikte moleküler oksijene (katalazlarda) dönüşmesini sağlayarak evrimsel süreçte çok daha etkili bir antioksidan olarak oluştukları düşünülmektedir. Bu nedenle, *katG* geninin kodlamış olduğu antioksidan enzimlerinden olan katalaz-peroksidazın görevinin temel olarak H_2O_2 'yi çok daha zararlı bir radikale dönüşmeden metabolizmaya geri kazandırmak olduğu önerilmiştir.

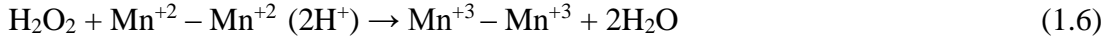
Katalaz-peroksidaz enzimi monomerlerinin her biri, içerdikleri metil ve vinil gruplarının uzaydaki konumlarıyla belirlenen ve daima aynı oryantasyonu gösteren 'b' tipi 'Hem' grubu içermektedir (Fita ve diğ., 2015).

1.3.3. Mn katalazlar

Aktif bölgesinde 'Hem' grubu yerine 'Mangan' içeren katalazlar (Mn-Katalazlar, Hem içermeyen katalazlar), katalitik olarak aktif olan enzimlerin üçüncü sınıfını oluşturmaktadırlar. Mn içeren katalazlar aynı zamanda "yalancı-katalazlar" olarak da adlandırılır. Bu katalaz tipi, demir içeren katalazlara nispeten daha az yaygındır ve yalnızca bakterilerde bulunur. Mangan katalazı bulunduran grubun iki farklı temsilcisi olan *Thermus thermophilus* ve *Lactobacillus plantarum* mikroorganizmalarının üç boyutlu yapıları, mangan katalazlarının, her biri 30 kDa'dan olan altı alt üniteli bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir (Zámocký ve Koller, 1999).

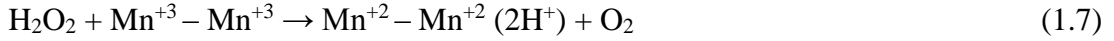
Mangan katalazlarının katalitik döngüsünde, tipik katalazlar ve katalaz-peroksidazlara göre belirgin farklılıklar olduğu görülmektedir. Mangan katalazlar, katalitik döngüsünde aktif bölge olan dimanganez çekirdeğinin hem indirgenmiş, hem de

oksidlenmiş halini ihtiva etmektedir. $Mn^{+2}-Mn^{+2}$ grubu, O-O bağı polarize ederek Denklem (1.6)'daki gibi;



suyun açığa çıkmasını sağlamaktadır.

Elektron transferi ile H_2O_2 oksidasyonu ve moleküler oksijenin serbest bırakılması, Denklem (1.7)'deki gibi;



gerçekleşmektedir.

Mangan katalazların ortaya çıkardıkları indirgenme ve yükseltgenme tepkimelerinde bir düzen bulunmamaktadır. Oksidasyondaki değişimin, oksijenlerin arasında bulunan bağı protonasyonuna ya da deprotonasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Protonasyon, Denklem (1.6)'de görüldüğü gibi indirgenmiş $Mn^{+2} - Mn^{+2}$ durumu için geçerlidir. Bu durum, iki Mn^{+2} iyonu arasında görülen net bir düşüş ile paralellik göstermektedir. Hem içeren katalazlardan farklı olarak, mangan katalazların katalitik döngüsünde hiç bir reaktif ara madde oluşmamakta ve oluşan iki su molekülü tek bir reaksiyonda açığa çıkmaktadır. Tipik 'Hem' grubu içeren katalazlara göre hidrojen peroksidi dönüşüme uğratma oranının daha düşük seviyede olması, doğada neden yaygın olarak bulunmadıklarının nedenini ortaya koymaktadır. (Zamocky ve diğ., 2008).

1.4. Mikrobiyal Katalazlar

Aerobik organizmaların birçoğu, tanımlanmış katalaz sınıflarından bir ya da daha fazlasına sahiptir. Fakat bu katalazların çeşidi ve sayısı canlılar arasında farklılıklar göstermektedir. Örneğin, *Mycobacterium* cinsi sadece katalaz-peroksidaz içerirken, *Escherichia coli* hem monofonksiyonel katalaz (HP II) hem de katalaz-peroksidaz (HPI) enzimi içermektedir. HPI ve HP II üretimi birbirinden ayrı gerçekleşir. HPI üretimi büyüme ortamına H_2O_2 ilavesi ile arttırılabilir fakat HP II üretimi H_2O_2 'ye bağlı değildir ve bakteri durgun faza girdiğinde uyarılır. HPI katalazı *katG* tarafından kodlanırken, HP II *katE* geni tarafından kodlanır. Bu genlerin kontrol mekanizmaları da farklı olarak gerçekleşir.

Örneğin *katG* geni oksidatif strese karşı cevap olarak oluşturup, *oxyR* regülatörü ile düzenlenirken, *katE* geninin ifadesi ise *katF* olarak isimlendirilen pozitif efektör ile düzenlenmektedir.

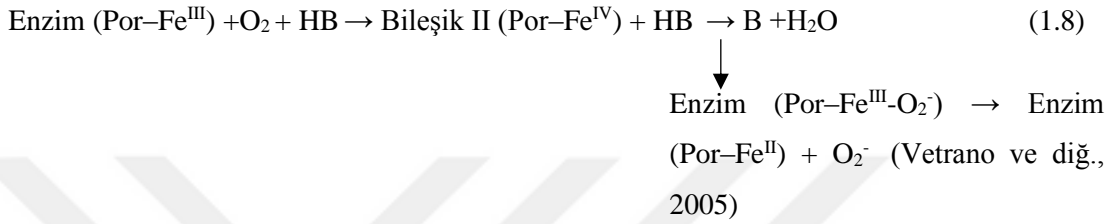
Diğer bir mikroorganizma örneği ise *Bacillus subtilis*'tir. Bu türde üç farklı monofonksiyonel enzim üretilmektedir. Bu enzimler, *katA*, *katX* ve *katE* genleri tarafından kodlanır. Aynı şekilde ökaryotik canlılarda da hem/demir içeren katalaz enzimlerinin miktarı değişiklik göstermektedir. Örneğin memelilerde bu sayı bir iken, bitkilerde ve mantarlarda sayı dörde kadar çıkabilmektedir (Loewen ve diğ., 2015).

Aspergillus türlerinde farklı sayıda ve çeşitte katalaz enzimi sentezlenmektedir. Genel olarak büyük ve küçük alt üniteli monofonksiyonel katalazların miselyum ve konidyada bir veya daha fazla sayıda bulunduğu belirtilirken, katalaz-peroksidazların ise miselyumda bulunduğu ve sadece bir tane olduğu rapor edilmiştir (Calera ve diğ., 2000; Hansberg ve diğ., 2012; Paris ve diğ., 2003). Aspergillosis etkenlerinden biri olan *A. fumigatus*'un, en önemli patojen mantarlardan olduğu ve yapılan çalışmalarda üç farklı katalaz enzimi (Cat1p, Cat2p, CatA) ürettiği rapor edilmiştir (Paris ve diğ., 2003; Shibuya ve diğ., 2006). Bunlardan CatA'nın "monofonksiyonel katalazlara" dahil olup konidyalarda üretildiği ancak hiflerde bulunmadığı, Cat2p'nin "katalaz-peroksidaz" grubu enzimler sınıfına dahil olduğu ve sadece hiflerde (miselyumda) bulunduğu belirtilirken Cat1p'in ise yine hiflerde bulunduğu ve monofonksiyonel katalazlar sınıfına dahil olduğu bildirilmiştir (Calera ve diğ., 1997; Paris ve diğ., 2003). *A. niger* ticari katalaz enzim kaynaklarından biri olmakla birlikte bu küfte en az dört farklı katalaz enziminin üretildiği bulunmuştur. Bunlardan ikisinin glukoz oksidaz enziminin varlığına bağlı olarak üretildiği rapor edilirken diğer iki katalazın *Neurospora crassa* katalazı (monofonksiyonel) ile benzerlik taşıdığı belirtilmiştir (Witteveen ve diğ., 1992).

1.5. Katalazların Çift Aktivite Özelliği

Katalaz enziminin temel işlevi, Bölüm 1.3'de anlatıldığı gibi canlıyı hidrojen peroksidin zararlı etkilerinden korumak üzere hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene indirgemektir. Katalaz enzimi, bahsedilen temel fonksiyonunun yanında, düşük molekül ağırlıklı alkoller (metanol, etanol vb.), katalitik döngüde ortaya çıkan Bileşik I ara ürününü kullanarak okside edebilmekte ve bu ikincil aktiviteye,

“Peroksidatif Aktivite” denilmektedir. İlaveten, ortamda hidrojen peroksit olmaması durumunda oksidaz aktivitesi sergilediği görülmüştür; bu bulgu literatürde yakın zamanda rapor edilmiş olup yeni bir bulgu olarak ele alınmaktadır. Katalaz enziminde varlığı tespit edilen oksidaz aktivitesinin reaksiyon anında Bileşik II’nin meydana gelmesine yardımcı olduğu gözlenirken porfirin halkasından aldığı bir elektron ile enzimin dinlenme evresine geri döndüğü düşünülmektedir (Denklem 1.8) (Vetrano ve diğ., 2005).



Memeli katalazında ilk kez gözlenen ikincil aktivitenin varlığı daha sonra başka katalazlarda da rapor edilmiştir. Örneğin, *S. thermophilum* katalazı farklı özelliklere sahip *orto*- ve *para*-difenolik bileşikleri okside edebilmektedir (Koclar Avcı ve diğ., 2013; Yuzugullu ve diğ., 2013). Enzimin çeşitli mutantlarının kinetik ve yapısal analizleri bu fenolik bileşiklerin direk katalitik aktivitede rol almadan ziyade enzim üzerinde koruyucu bir rol üstlendiğine işaret ettiğini göstermiştir (Yuzugullu Karakus ve diğ., 2018). Diğer yandan *B. pumilus* bakterisinden izole edilen (monofonksiyonel) katalazda düşük düzeyde peroksidatif aktivitenin varlığı hem kristaklografik hem de spektrofotometrik yöntemlerle tespit edilmiştir (Loewen ve diğ., 2015). Buradan ikincil aktivitenin katalazın izole edildiği türe özgü olarak oksidaz veya peroksidaz şeklinde ortaya çıktığı görülmektedir. Benzer şekilde *T. fusca* bakterisi (Loncar ve Fraaije, 2015) ve süs bitkisi olan *A. cruentus* (Chen ve diğ., 2017; Teng ve diğ., 2016) katalazlarında da ikincil aktivite rapor edilmiştir. Buradan, monofonksiyonel olarak tanımlanmış ancak oksidaz veya peroksidaz özelliğe de sahip olan katalaz enzimlerinin farklı tipte prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda bulunmasının bu tip çift aktiviteli enzimlerin canlılarda çok daha yaygın olabileceğine işaret etmektedir.

Mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal kaynaklı katalazlarda gözlenen bu ikincil aktivitenin karakteristik yetenekleri üzerine literatürde rapor edilen çalışmalar da mevcuttur. Bunlardan, penisilin oksidasyonu (Sangar ve diğ., 2012), polifenolikler (Loewen ve diğ., 2015) ile fenil ve sülfid gruplarını taşıyan bileşiklerin oksidasyonu (Loncar ve

Fraaije, 2015) ve monofenollerin difenollere dönüştürülmesi (Teng ve diğ., 2016) gibi katalazlarda gözlenen bu tip biyokatalitik özellikler dikkat çekicidir. Buradan katalazın canlılarda önemli bir antioksidan olma özelliğinin yanı sıra ikincil aktivite yeteneği ile çeşitli endüstriyel uygulamalarda iyi bir biyokatalizör olarak da kullanılabilceği anlaşılmaktadır.

1.6. Katalazların Endüstriyel Uygulamaları

Mikrobiyal enzimler, gıda, tarım, kimyasallar, ilaç ve enerji sektörü gibi çeşitli sanayi sektörlerinde yaygın olarak kullanıldıklarından dolayı küresel olarak tanınmıştır. Enzim kaynaklı işlemler, düşük işlem süresi, düşük enerji girdisi, maliyet, toksik olmayan ve çevre dostu özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir (Choi ve diğ., 2015; Li ve diğ., 2012). Mikrobiyal enzimlerin biyoteknolojik işlemlerle üretiminin daha ekonomik olması ve suda çözünmeyen matrikslerle sabitlenerek daha uzun süre kullanılabilmesi, bu enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanılmasındaki artış nedenleri olarak gösterilebilir (Gümüsel, 2002).

Gıda endüstrisinde çoğunlukla soğuk sterilizasyon ajanı olarak kullanılan hidrojen peroksidin, sütün işlenmesi sırasında ortamdan uzaklaştırması gerekir. Bu işlem için “katalaz” enzimine ihtiyaç duyulur. Normal şartlarda süte herhangi bir katkı maddesi eklenmesi istenen bir durum değildir, fakat hidrojen peroksit sütün uzun süre bozulmadan kalmasında önemli bir role sahiptir. Sütte doğal olarak bulunan laktoperoksidaz antibakteriyal enziminin aktivite sergileyebilmesi için hidrojen peroksit ihtiyacı vardır. Ancak işlem görmeden önce sütün içindeki fazla hidrojen peroksit uzaklaştırılmalıdır. Bu işlem de ancak katalaz enzimi kullanılarak mümkün olmaktadır (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

Katalaz ayrıca glukoz oksidaz ile birlikte bir enzim kombinasyonu oluşturularak fruktoz içermeyen invert şeker, glukoz içermeyen diyetetik içecekler ve maltoz üretimi gibi alanlarda kullanılır. Fırıncılıkta da bu enzim kombinasyonu düşük miktarda hidrojen peroksit ilavesi ile kullanılarak gıdalarda kararmaya sebep olan glukozun okside edilerek uzaklaştırılmasını sağlar. Bu enzim kombinasyonu ayrıca kutu içecekler ve cam şişelerin ağız kısmındaki oksijenin uzaklaştırılması ve mayonezdaki meydana gelen kararmayı önlemek için de kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra paketlenmiş gıdalarda katalaz ve glukoz oksidaz enzimi kullanılarak gıdalardan

oksijen uzaklaştırılmakta ve bu sayede paketli gıdaların raf ömrü uzatılmaktadır (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

Katalaz enziminin bir başka kullanım alanı ise biyo-ağartma, ağartma sonlandırma, boya renk giderimi, kumaş ve yün terbiyesi gibi süreçlerdir (Mojsov, 2011). Örneğin *Aspergillus sp.* katalazı ağartmada kullanılmaktadır (Singh ve diğ., 2016). Tekstil endüstrisinde ağartma işlemi sonrası ortamda kalan hidrojen peroksit çevreye zararlı olacağından katalaz enzimi kullanılarak uzaklaştırılmaktadır. Son zamanlarda hidrojen peroksitin endüstride kullanımının artması, H₂O₂'nin su ve oksijene dönüştürülmesini sağlayan ekonomik ve kararlı katalaz enziminin üretilmeye çalışılmasını gerekli kılmıştır (Wang ve diğ., 1998).

Katalaz enzimi, özellikle *A. niger* ve *Micrococcus lysodeikticus* organizmalarından yararlanılarak birçok firma tarafından ticari olarak elde edilmektedir (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

1.7. Mikroorganizmalar

1.7.1. *Aspergillus*

Küfler doğada hava, toprak, su ve organik maddeler üzerinde yaygın olarak bulunan çok hücreli ökaryotik mikroorganizmalardır. Bunlardan *Aspergillus*, nem içeren hemen her ortamda kolaylıkla gelişebilen ve yaklaşık iki yüz mantar türünden oluşmuş bir cinstir. Doğadaki esas işlevleri karbon ve nitrojen çevrimiyle ilgilidir, biyodegradasyonda da rol alırlar.

Aspergillus, hif olarak adlandırılan hücre zincirlerinden oluşan ipliksi mantar türlerini kapsamaktadır. Yüksek hızda ürerler. Atmosfere dağılan sporlar havada asılı durabilir veya toz ve diğer parçacıklarla her yere taşınabilir. Bunlar havada yüksek oranda bulunan mantarlardandır. (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003). *Aspergillus* türleri aerobiktir ve bol oksijenli hemen her ortamda rastlanırlar.

Aspergillus'lar genellikle mezofilik karakterli olmalarına rağmen 50 ila 60°C'ye kadar sıcaklık toleransı olanları da bulunmaktadır. Aniden yüksek ısıyla karşılaştıklarında, ısı şok proteinleri (heat-shock protein, HSP) sentezindeki artış ile canlı kalmaları arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Isı şok yöntemi kullanıldığında, bazı

mezofilik mantar türleri termofilik derecede üreyebilmektedir (Halil ve Kalkancı, 2008). Termotolerant özellik gösteren *A. niger* termostabil enzimlerin üretimi yönünden endüstriyel önem taşımaktadır (Wyss ve diğ., 1998).

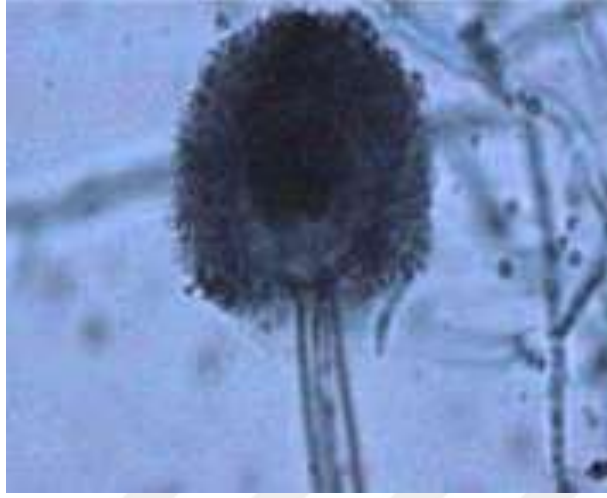
Aspergillus'lar ürettikleri enzimler yardımıyla organik maddeleri ayrıştırarak saprofit olarak yaşarlar ve kendileri için elverişli ortam koşulları oluştuğunda bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçerek "Aspergillosis" denilen solunum sistemi hastalığına yol açabilirler (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003; Shibuya ve diğ., 2006). Bu hastalık özellikle bağışıklık sistemi düşük canlılarda ortaya çıkmaktadır. İnsanların gün içerisinde solunum yoluyla en az birkaç yüz konidyum aldıkları belirlenmiştir. Bağışıklık sistemi güçlü olan insanlarda bu konidyumların zararsız hale getirildiği bilinmektedir (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003). Bağışıklık sisteminde sorunu olan hastalarda *Aspergillus* kan damarlarını invaze ederek enfarkt, nekroz ve hematojen yayılım oluşturma eğilimindedir (Ayberkin ve Çiftçi, 2009). İnvaziv aspergillosis (IA), immün sistemi baskılanmış hastaları hedef alan *Aspergillus* ile bağlantılı hastalıkların en tehlikelidir (Dagenais ve Keller, 2009). Bu hastalıkların tedavileri enfeksiyonun yaygınlığına, tedaviye yanıtı ve altta yatan hastalığa bağlı olarak antifungal ilaçlar kullanılarak veya cerrahi uygulamalar ile yapılabilmektedir. Cerrahi tedavi çoğunlukla invaziv aspergillozlu hastalara uygulanmaktadır (Ayberkin ve Çiftçi, 2009).

Aspergillus ekonomik, ekolojik ve tıbbi yönden önemli bir cinstir (Asan, 2004). Çeşitli türlerinden elde edilen katalaz, proteaz, lipaz, selüloz, laktaz, pektinaz ve lipaz gibi pek çok enzim bulunmaktadır ve bunlar gıda sanayisinde farklı amaçlarla kullanılmaktadırlar (Temiz, 1989). Bunlardan katalaz enzimi gıda bozulmasının önlenmesi, süt ve süt ürünlerinin soğuk sterilizasyonu, radyoterapide kullanılan antioksidan ilaçların üretimi ve hidrojen peroksit ile etanol varlığının tespit etmede yararlanılan biyosensörlerin üretimi gibi pek çok farklı alanda kullanıma sahiptir (Loncar ve Fraaije, 2015).

1.7.2. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger aerobik koşullarda organik maddeler üzerinde yaygın olarak bulunan filamentli bir mantardır. Doğada toprak, çöp ve çürüyen bitkiler üzerinde gelişir.

Üreme sıcaklığı geniş bir aralıktır (6-47°C); optimum sıcaklığı 35-37°C arasında değişkenlik gösterir. Ayrıca geniş bir pH aralığında (1.4-9.8) gelişebilir.



Şekil 1.2. *A. niger*'in mikroskopik görüntüsü (Sharma ve Tripathi, 2008)

A. niger sahip olduğu bu özellikler ve hava ile dağılan konidyosporların verimli üretimi sayesinde özellikle sıcak ve nemli bölgelerde geniş bir yayılım gösterebilmektedir. Filamentli mantar olan *A. niger* fenotipinde büyük çeşitlilik gösterir. Hem denizel hem de karasal türler olarak küresel olarak bulunur, hem organik asitleri hem de hidrolitik enzimleri yüksek miktarlarda üretir (Schuster, 2002).

A. niger, onlarca yıldır araştırma ve endüstriyel kullanımın konusu olmuştur. Biyoteknolojide kullanılan en önemli mikroorganizmalardan biridir. Bu tür ilk olarak 1919'da sitrik asit fermantasyon yoluyla üretildiğinde endüstriyel olarak kullanılan bir organizma haline gelmiştir. Sitrik asit, yiyecek ve içecek endüstrilerindeki birincil asittir. Bu asit alkolsüz içecekler, meyve suları, reçeller, şekerler ve şarap gibi yiyeceklerde kullanılır. Sitrik asit hemen hemen sadece *A. niger* ve *A. wentii*'nin fermantasyonu ile üretilir, çünkü bu organizmaların kullanımı endüstriyel uygulamalarda ekonomiktir ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumu minimumdur. Glukonik ve fumarik asitler, daha az ekonomik öneme sahip olmalarına rağmen, *A. niger* ile üretilmiştir. Bununla birlikte, 1960'lardan bu yana, *A. niger* fırıncılık, meyve suyu, nişasta ve gıda endüstrisinde kullanılan çeşitli enzimler için kaynak olarak kullanılmaktadır. (Schuster, 2002).

Siyah *Aspergilli*'nin bir üyesi olan *A. niger*, biyoteknolojide gıda bileşenleri, ilaç ve endüstriyel enzimlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal ortamlarında *A. niger* suşları, besin maddelerinin biyopolimerlerden salınması için gereken çok çeşitli enzimler salgırlar. Bu yüksek salgılama kapasitesi, hem katı halde hem de daldırma fermentasyonda endüstriyel olarak kullanılmaktadır (Schuster, 2002). *A. niger*, endüstriyel biyoteknolojideki en büyük işgücü kaynaklarından biri haline gelmiştir ve sitrik asidin yanı sıra zengin bir enzim kaynağıdır. *A. niger* hücre dışı (besin) enzimleri üretmek için yıllardır kullanılmaktadır. Pektinaz, proteaz ve amiloglikozidaz, ilk üretilen enzimlerdendir (Frost and Moss 1987). Ayrıca, *A. niger*, biyotransformasyonlar ve atık arıtma için kullanılır. Son yirmi yılda, *A. niger* gıda enzimlerini aşırı eksprese etmek için önemli bir konakçı olarak geliştirilmiştir. Üretim süreçlerini iyileştirmek ve *A.niger*'ı yabancı proteinler için bir ekspresyon sistemi olarak kullanmak için gen teknolojisi başarıyla uygulanmıştır (Schuster, 2002).

A. niger genellikle güvenli bir organizma olarak kabul edilir. Kişilerin yoğun toza maruz kaldığı nadir durumlarda, aşırı duyarlılık reaksiyonları gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, diğer filamentli mantarlarla karşılaştırıldığında, alerji veya mikopatoloji ile ilgili bir problem olarak görülmemektedir. Patojenik olarak bilinen *A. fumigatus*'un aksine *A. niger*, inhalasyon çalışmalarında hayvanlar üzerinde patojenik bir etki göstermemiştir (Schuster, 2002). Patojen olmayan bir mantar olarak kabul edilen *A. niger*'in immün sistemi ciddi şekilde baskılanmış hastalarda birkaç tıbbi vaka (örn. akciğer enfeksiyonları) gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca tropikal bölgelerde, dış kulak kanalının *A. niger* istilasına bağlı olarak kulak enfeksiyonları (otomicosis) meydana geldiği rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *A. niger*'in yoğun toza maruz kalınan ortamlarda yutulduktan bir gün sonra, sindirim kanalında artık görülmediği tespit edilmiştir. Fakat bunun aksine yutulmuş *A. nidulans* suşu hayvanların bağırsaklarından izole edilmiştir. Bu türlerin hiçbir zaman insandaki herhangi bir hastalığın ana nedeni olduğu tespit edilmemiştir. Bu nedenle, *A. niger*'in iyi üretim uygulama kurallarına uyulması kaydıyla endüstriyel kullanım için güvenli bir üretim organizması olduğu sonucuna varılmıştır (Schuster, 2002).

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1.Malzemeler

2.1.1.Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), Bio-Rad (Amerika) ve Tekkim (Türkiye) firmalarından temin edildi.

2.1.2. Mikroorganizma

Aspergillus niger katalazının üretimi, saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonunun yapılması için enzim kaynağı olarak kullanılan *A. niger*, Dr. Murat Özdal (Atatürk Üniversitesi) tarafından Laboratuvarımı'za hediye edilmiştir.

Genbank Numarası: KF939141

Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar Ek-A'da verilmektedir.

2.2. Yöntemler

2.2.1.Mikroorganizma ve kültür hazırlanması

Küfe ait spor süspansiyonlarını hazırlamak amacıyla örnek PDA'da (Patates Dekstroz Agar, Potato Dextrose Agar) 30°C sıcaklıkta 7 gün süreyle büyütüldü. Agar üzerinde gelişen sporlar 30 ml'lik steril %0,01 (v/v) Tween 80 içeren çözelti içine alınarak spor sayımı Petroff - Hausser Lamı kullanılarak gerçekleştirildi. (Garay-Flores ve diğ., 2014). Daha sonra spor süspansiyonları steril Tween 80 içeren çözelti ile ml'sinde 1 milyon spor içerecek şekilde seyreltildi ve %80 (v/v) gliserol eklenerek -80°C'de muhafaza edildi.

Küfün büyütülmesi için örneğe ait 100 µL'lik spor süspansiyonu (10⁶ spor/mL) 20 mL'lik öncü büyüme ortamında canlandırıldıktan sonra 2000 mL'lik erlenler içerisinde 1000 mL hazırlanan besiyerine (10 g/L glukoz, 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O, 1 g/L K₂HPO₄ ve 4 g/L maya ekstraktı) aktarıldı ve 10 gün boyunca 155 rpm'de inkübasyona bırakıldı (Söyler, 2012).

Katalaz üretiminin optimizasyonu için ısı şoku ile oksidatif stres uygulamaları gerçekleştirildi. Isı şoku yaratmak amacıyla kültürler 37, 42, 45, 50 ve 55°C sıcaklık derecelerinde büyütüldü (Chang ve diğ., 2004). Oksidatif stres uygulaması ise iki farklı şekilde yapıldı. İlk uygulamada ön kültürün aktarıldığı ana büyüme ortamına H₂O₂, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarında katalaz aktivitesinin optimum üretildiği günde (7. gün) her 30 dakikada bir eklenerek 2 ila 6 saat (2, 3, 4, 5 ve 6 saat) inkübe edildi (Kawasaki ve Aguirre, 2001). İkinci uygulamada, H₂O₂ yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda ön kültürün aktarıldığı ana büyüme ortamına ilk gün eklendi ve 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak ml'sinde bir milyon spor içerecek şekilde hazırlanan H₂O₂ içermeyen besi ortamında 37°C'de büyütülen kültür kullanıldı.

2.2.2. Biyokütle tayini

Biyokütle tayini için 2 X 1000 mL'lik büyüme ortamları hazırlandıktan sonra spor süspansiyonu (10⁶ spor/mL) inoküle edilerek bir gece boyunca inkübe edildi. 37°C'de ve 155 rpm'de gerçekleşen büyüme periyodu sırasında 24 saatte bir 50'şer mL örnek kültür ortamından toplanarak hücreler Whatman filtre kağıdından (No:1) filtrasyon yolu ile uzaklaştırıldı. Süzölmüş ortam sıvısı (süpernatant), enzim aktivite ve protein miktar tayininde kullanıldı. Filtre kağıdında bulunan hücreler ise distile su ile yıkandıktan sonra kuru ağırlığının belirlenmesi üzerine 100°C'de sabit bir ağırlığa ulaşmaya kadar bekletildi ve biyokütle tayininde kullanıldı (Ögel ve diğ., 2006). Biyokütleden ayrılan ortam sıvısı enzim aktivite tayininde ve saflaştırma işleminde kullanıldı.

2.2.3. Enzim aktivite tayinleri

Enzim aktivite analizlerinde "kontrol" olarak reaksiyon ortamına enzim yerine tampon çözelti eklenerek aktivite ölçümleri yapıldı.

2.2.3.1. Katalaz (CAT) aktivite ölçümü

Katalaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. 3 mL'lik reaksiyon sıvısı 10 mM H₂O₂ solüsyonundan 2,9 mL ve enzim solüsyonundan 0.1 mL (pH 7.0) konularak hazırlandı. Reaksiyon sıcaklığı 25°C'ye ayarlandıktan sonra hidrojen peroksitinkaybolma hızı 240 nm'de ölçülerek hesaplandı.

1 Ünite aktivite, 1 µmol H₂O₂'i 1 dakikada parçalayabilen enzime karşılık gelmektedir (Yuzugullu ve diğ., 2013).

2.2.3.2.Peroksidaz (POD) aktivite ölçümü

Peroksidaz (EC 1.11.1.7) aktivitesi 2,4 ml 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içeren bir reaksiyon karışımında pirogallol oksidasyon yöntemi kullanılarak belirlendi. 300 µL %5.3 (w/v) pirogallol, 100 µL uygun şekilde seyreltilmiş enzim/süpernatın ve 200 µL %0.6 (w/w) H₂O₂ içeren karışım aktivite analizlerinde kullanıldı. Absorbanstaki artış 90 saniye içinde 420 nm'de kaydedildi. Enzim aktivitesi pirogallol birimleri cinsinden tanımlandı (Valetti ve Pico, 2013). Bir birim aktivite 20 saniye başına 1 mg purpurogallin oluşumuna karşılık gelmektedir.

2.2.4. Protein miktar tayini

Protein konsantrasyonu Bradford Metoduna göre belirlendi; standart grafiğin çizilmesinde protein olarak sığır serum albümini kullanıldı (Bradford, 1976). Standart grafik Ek-B'de verildi.

2.2.5. Enzim saflaştırma

A. niger'den katalaz üretimi için optimum koşullarda toplanan süpernatın (ortam sıvısı), saflaştırma çalışmalarında kullanıldı. Enzim saflaştırılmasında hem geleneksel kromatografi yöntemi hem de üçlü faz ayırma yöntemi uygulandı.

Kromatografik ayırmada AktaPrime FPLC (GE Healthcare, Amerika) sistemi kullanıldı. Buna göre süpernatın 20 mL'lik HiPrep 16/10 Q XL kolonuna (anyon değiştirici, GE Healthcare) yüklendi. Tampon çözelti olarak 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0) kullanıldı ve akış hızı olarak 2 mL/dk seçildi. 3 mL'lik fraksiyonlar 0 ila 1 M NaCl içeren aynı tampon çözeltisi içinde toplandı ve katalaz aktiviteleri açısından incelendi.

Üçlü-Faz Ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırmada 2 mL süpernatın, farklı amonyum sülfat doymuluklarına (%40, %50, %60, %70, %80 ve %90, w/w) getirildi ve farklı süpernatın/t-bütanol oranları (1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,0:2,0) sağlanacak şekilde t-bütanol eklendi. Sistem pH'sı farklı pH'larda (3,0-9,0) hazırlandı. Karışım oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 4500 rpm' de 10 dk santrifüjlenerek faz

ayrımları gözlemlendi (Alici ve Arabaci, 2016; Duman ve Kaya, 2014). Proteinin bulunmasının beklenmediği üst faz dikkatlice pipetlenerek ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra orta ve alt faz toplanarak 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisine (pH 7,0) karşı bir gece diyaliz edildi. Diyaliz sonrası orta ve alt fazlarında aktivite ve protein değerleri yukarıda anlatılan şekilde spektrofotometrik yöntemle tespit edildi. Kontrol olarak aynı koşullarda hazırlanan ancak süpernatant içermeyen sistem kullanıldı.

Katalaz enziminin her iki yöntemle ayrımının analizi aşağıda verilen parametrelerin değerlendirilmesi ile mümkündür:

Spesifik aktivite (SA), 1 mg protein başına düşen enzim ünitesidir. Her bir basamaktaki enzim aktivitesinin (U/mL) yine her basamaktaki protein konsantrasyonuna (mg/mL) bölünmesiyle hesaplanır. Saflaştırma katsayısı (PF), herhangi bir fazda ölçülen enzime ait spesifik aktivitenin süpernatanda ölçülen enzim aktivitesine oranıdır. Protein geri kazanım değeri (%R) ise herhangi bir fazdaki enzim aktivite değerinin sisteme eklenen enzimin başlangıçtaki aktivitesine oranıdır.

2.2.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Katalaz enziminin saflığının kontrolü SDS-PAGE analizi ile yapıldı. Buna göre elektrofrez, Bio-Rad Mini-Protean sistemi kullanılarak; %5 v/v yükleme jeli (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), %0,1 w/v SDS, %5 v/v Akrlamid/Bisakrlamid ve TEMED) ve %15 v/v ayırma jeli (375 mM Tris-HCl (pH 8,8), %0,1 w/v SDS, %15 v/v Akrlamid/Bisakrlamid ve TEMED) hazırlanarak gerçekleştirildi (Laemmli, 1970). Örnekler indirgeme ajanı içeren yükleme tampon ile 90°C'de 10 dk kaynatılarak denatüre edildi. Protein markör'ü olarak BioRad Low Range (14-97 kDa) kullanıldı. Elektrofrez 200 V'da yaklaşık 50 dk yürütülerek gerçekleştirildi ve yürütülen jeller elde edilen protein konsantrasyonuna göre gümüş boyama (Blum ve diğ., 1987) ile boyandı.

2.2.7. Substrat spesifite analizi

Katalaz enziminin olası ikincil oksidatif/peroksidatif aktivite özelliği spektrofotometrik yöntemle test edildi. Buna göre (saf) enzim aktivitesi farklı oksidaz/peroksidaz substratları varlığında analiz edildi. Kullanılan substratlar arasında pirogallol (430 nm), hidrokinon (440 nm), ABTS (2,2'-azino-bis(3-

ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, 420 nm), guaiakol (465 nm) ve L-tirozin (475 nm) yer almaktadır (Ögel ve diğ., 2006; Vetrano ve diğ., 2005). Enzim aktivite analizleri yukarıda fenol oksidaz ve peroksidaz aktiviteleri için açıklanan şekilde sadece substrat değiştirilerek gerçekleştirildi. Negatif kontrol olarak reaksiyon ortamına enzim örneği yerine tampon çözelti eklenerek aktivite ölçümleri yapıldı.

2.2.8.Enzimin fizyolojik özellikleri

Sıcaklığın enzim üzerine etkisini incelemede 30°C – 70°C sıcaklık aralığında aktivite ölçümü yapıldı. Enzim aktivitesi (% Bağıl Aktivite) ve reaksiyon sıcaklık değerleri arasında çizilen grafik ile enzimin optimum reaksiyon sıcaklık değeri belirlendi. Termal kararlılık tayini için ise aynı miktarda protein ihtiva eden enzim örnekleri 60 dk boyunca farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50, 60 ve 70°C) inkübe edilip ardından standart aktivite ölçüm değerinde (25°C’de) aktivite tayinleri yapıldı.

Farklı pH değerlerinin katalitik aktivite üzerindeki etkilerini belirlemek için 4,0 ila 9,0 arasında değişen farklı pH’larda (4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0) standart koşullar altında spektrofotometrede (Cary60, Agilent) enzim aktivite ölçümü alındı. pH 4,0 – 5,0 arasındaki reaksiyonlar için 100 mM sitrat tampon çözeltisi, pH 6,0 ila 7,0 için 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi, pH 8,0 için 100 mM tris tampon çözeltisi ve pH 9,0 için 100 mM glisin sodyum hidroksit tampon çözeltileri kullanıldı. pH’nın enzim dayanıklılığı üzerine etkisini test etmek için ise aynı pH aralığı arasında hazırlanmış tampon çözeltilerde enzim örnekleri 1 saat inkübe edildikten sonra katalaz aktivite ölçümleri yapıldı (Kocabas ve diğ., 2008).

2.2.9.Enzim stabilite tayini

Organik çözümlere karşı saf katalaz enziminin dayanıklılık derecesini incelemek amacıyla, aseton, etanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve metanol son konsantrasyonları % 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 ve 25 (v/v) olacak şekilde reaksiyon karışımına direkt eklendi (Ögel ve diğ., 2006) ve katalaz aktivite tayini yukarıda açıklanan şekilde gerçekleştirildi.

2.2.10.Kinetik analizler

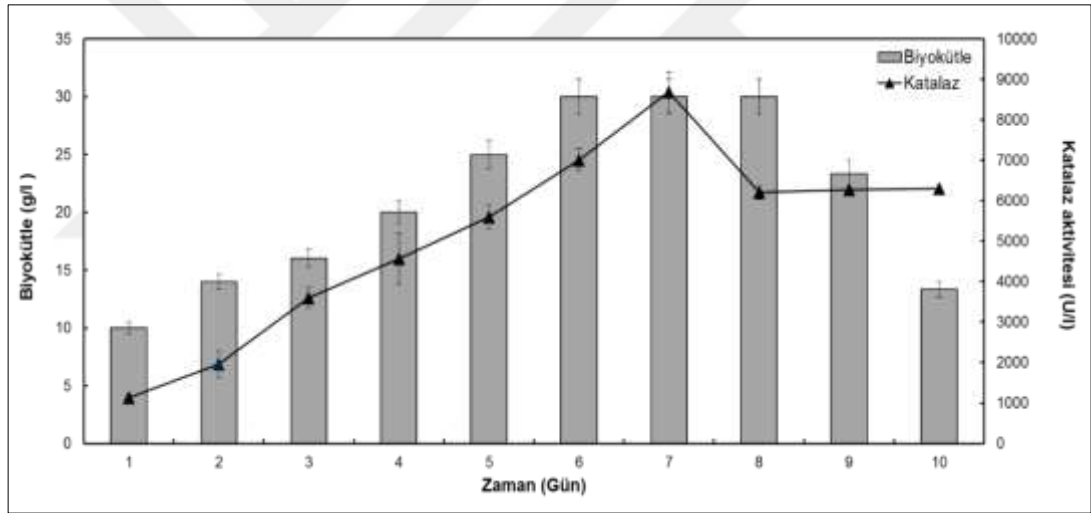
A. niger'dan saflaştırılan katalaz örneği 0-300 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit substrat olarak kullanılarak aktiviteleri ölçüldü (Sutay, 2007) ve K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver–Burk Plot ile hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934).



3.BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1.Zamana Bağlı Katalaz Üretiminin Ölçülmesi

%1 (w/v) glukoz içeren besi ortamında 10 gün boyunca büyütülen *A. niger*'de ölçülen hücre dışı katalaz üretimi ve biyokütle tayin sonuçları Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Buna göre, küfün büyümesi sırasında gözlenen Logaritmik faz altıncı güne kadar sürmüştür. Diğer yandan küf 6. günde durgun faza girmiş ve 8. güne kadar bu fazda kalmıştır. Katalaz üretimi ise küf durgun fazda (7. gün) iken en yüksek değerine ulaşmıştır. Bu durum enzim üretiminin sekonder metabolizma sonucu olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 3.1. *A. niger*'a ait biyokütle (g/L) ve katalaz (U/L) aktivite grafiği. *A. niger*, karbon kaynağı olarak sadece %1 (w/v) glukoz içeren 1 litrelik YpSs (Emerson's yeast powder-soluble starch) büyüme ortamında büyütüldü.

A.niger'in büyüme eğrisine bakıldığında literatürde *Aspergillus*'lar için rapor edilen bulgular ile benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Örneğin, *A. flavus*'un üreme eğrisinde suşun 1. günde lag fazında olup biyokütlenin en düşük seviyede olduğu, 2. ve 4. günler arasında büyümenin logaritmik fazda olup biyokütlenin artmaya devam ettiği, 5. ve 7. günler arasında ise durgunluk fazına girerek büyümenin durduğu görülmüştür (Arat, 2007). Bu çalışmada, aktifleştirilmiş ön kültür kullanıldığı için lag

fazı görülmemiş olup örnek çalışmaya benzer şekilde 6. ve 8. günler arasında küfün durgun fazda bulunduğu görülmektedir.

A. niger gibi birçok mikroorganizmanın sekonder metabozilma sonucu meydana getirdiği ürünler aktif üreme fazında değil de duraklama fazında oluşur. Bu ürünler “sekonder metabolit” olarak adlandırılır ve ekonomik açıdan değerlidirler. Mikrobiyal sekonder metabolitler, çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir ve hormon, antibiyotik, toksin, anti-migren ajanı, anti-kanser ajanı olarak veya insektisit olarak işlev görmektedirler (Demain, 1998). Günümüzde daha çok tarımda endüstride ve sağlık alanında kullanılmaktadır (Robinson ve diğ., 2001). Endüstride, sekonder metabolitler daha kararlı ürün oluşturduğu ve daha az enerji gerektirdiği için tercih edilmektedir (Küçük ve diğ., 2003). Küflerden de elde edilen sekonder metabolitler, antibiyotiklerin üretiminde en büyük paya sahiptir. Şu ana kadar keşfedilen antibiyotiklerin çoğunluğu *Streptomyces* cinsi üyeleri tarafından üretilmektedir (Oskay ve Tamer, 2009).

Ayrıca yapılan çalışmalarda Beyaz Çürükçül Mantarların (örneğin *Agaricus bisporus*, *Trametes versicolor*) lakkaz enzimini sekonder metabolit olarak ürettiği rapor edilmiştir. (Ozan ve diğ., 2014). Tablo 3.1.’de bazı mikroorganizmaların ürettiği sekonder metabolitler verilmiştir.

Tablo 3. 1. Mikroorganizmalar ve sekonder metabolitleri (Küçük ve diğ., 2003)

Mikroorganizma	Sekonder Metabolit
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Gliotoksin
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoksin B ₁
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fumonisin B ₁
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Aktinorhodin
<i>Streptococcus viridifaciens</i>	Tetracyclin

Literatürde farklı *Aspergillus* suşlarından katalaz enzim üretimine ait örnekler mevcuttur. Bunlarda genelde büyüme periyodunun 3. veya 4. günlerinde enzim üretiminin gerçekleştiği görülmektedir (Buckova ve diğ., 2005; Fiedurek ve Gromada, 2000; Kacem-Chaouche ve diğ., 2005). Bu çalışmada ise 7 gün boyunca büyütülen

küfte en yüksek katalaz aktivite değeri ölçülmüştür. İnkübasyon sürelerindeki bu farkın küfün büyütüldüğü büyüme ortam içeriğindeki farklılıktan kaynaklandığını söyleyebiliriz. Kullanılan besiyortamlarında göze çarpan farklılık metal iyon içeriklerinin yüksek olmasıdır. Rapor edilen aktivite değerine (13 U/mL) bakıldığında bu çalışmada ölçülen katalaz aktivite değeri (9-10 U/mL) ile çok farklı olmadığı görülmektedir.

Maliyet açısından değerlendirildiğinde benzer sonuç alınan bir ürün için daha az kimyasalın kullanıldığı büyüme ortamı daha uygundur. Bu nedenle, bu çalışma ile katalaz üretiminin daha düşük maliyette gerçekleştirilme olasılığı muhtemel görülmektedir.

3.2. Optimum Katalaz Üretim Koşullarının Belirlenmesi

Katalaz enzim üretiminin *Aspergillus*'larda oksidatif stres veya ısı şokuna bağlı olarak hücrede artan H₂O₂'ye karşı savunma amacıyla arttığı rapor edilmiştir (Calera ve diğ., 2000; Kawasaki ve diğ., 1997; Kawasaki ve Aguirre, 2001; Noventa-Jordao ve diğ., 1999). Bu nedenle, eşit miktarda spordan canlandırma yapılarak büyütülen *A. niger*'de sıcaklığın ve H₂O₂'nin katalaz üretimine olumlu/olumsuz etkileri araştırıldı.

3.2.1. Sıcaklığın enzim üretimine etkisi

Aspergillus'lar optimum olarak 28-30°C'de büyüme potansiyeline sahip olup (Buckova ve diğ., 2005; Fiedurek ve Gromada 2000; Kacem-Chaouche ve diğ., 2005) bazılarının (Örneğin, *A. fumigatus*'un) 55°C'ye kadar büyüebildiği rapor edilmiştir (Chang ve diğ., 2004). Bu sebeple, bu çalışmada *A. niger* 30°C, 37°C, 42°C, 45°C, 50°C ve 55°C sıcaklık derecelerinde (Chang ve diğ., 2004; Kawasaki ve Aguirre, 2001) büyütüldü ve katalaz aktivitesinin optimum ölçüldüğü yedinci günde süpernatant alınıp enzim aktivite tayini gerçekleştirildi. Ancak beklenenin aksine 45°C'nin üzerinde enzim üretiminin tamamen inhibe olduğu gözlemlendi (Tablo 3.2).

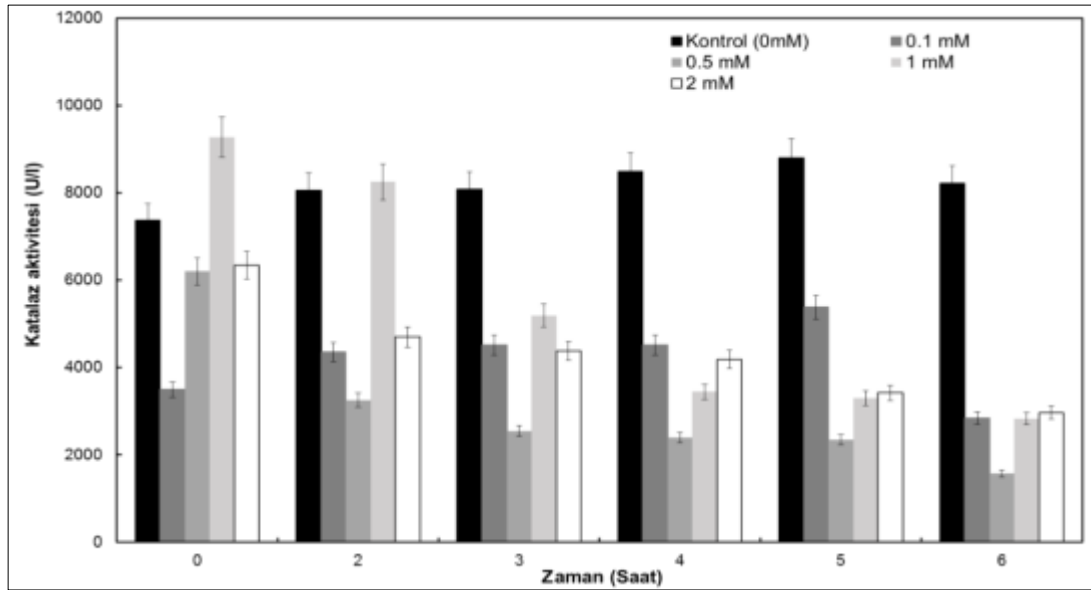
En yüksek aktivite ise 37°C'de ölçüldü. Literatürde rapor edilen *A. niger* suşları ile karşılaştırıldığında (Buckova ve diğ., 2005; Fiedurek ve Gromada, 2000), bu çalışmada daha yüksek sıcaklıklarda (37-45°C) üretim yapılabildiği görülmektedir.

Tablo 3.2. Sıcaklığın katalaz üretimine etkisi

Sıcaklık (°C)	Katalaz aktivite (U/l)
30°C	8688±480
37°C	9128±148
45°C	6269±937
47°C	-
50°C	-
55°C	-

3.2.2. H₂O₂'nin enzim üretimine etkisi

Oksidatif stres yaratmak amacıyla izlenen basamaklar Bölüm 2.2.1.'de detaylı olarak verilmiştir. Buna göre uygulanan ilk yöntemde besi ortamına eklenen hemen hemen tüm H₂O₂ konsantrasyonlarında negatif kontrole göre daha düşük katalaz üretimi gerçekleşmiştir (Şekil 3.2). Sadece 1 mM H₂O₂'nin eklendiği an (t=0) katalaz üretiminde negatif kontrole göre %105'lik bir artış gözlemlendi. Ancak bu artış inkübasyonun ilerleyen zamanlarında kademeli olarak kayboldu. Buna göre, katalaz aktivitesinin en yüksek ölçüldüğü koşul olarak H₂O₂'nin eklenmediği ve inkübasyon süresinin yedinci günü beşinci saate denk gelen zaman dilimi tanımlanabilir.



Şekil 3.2. Hidrojen peroksit (H₂O₂) konsantrasyonunun katalaz üretim üzerine etkisi.

Diğer H₂O₂ uygulamasında (büyüme ortamına H₂O₂'nin başlangıçta eklenip yedi gün boyunca küfle inkübe edilmesi) da katalaz üretiminde bir artış gözlenmedi (Tablo 3.3.). 1 mM derişimde diğer konsantrasyonlara göre aktivite daha yüksek ölçülmesine rağmen gözlenen bu artış negatif kontrolden daha düşük seviyede kalmıştır.

Tablo 3.3. Farklı H₂O₂ konsantrasyonlarının katalaz üretimine etkisi

H ₂ O ₂ (mM)	Katalaz aktivite (U/L)
0	8220±200
0,1	4163±209
0,5	4350±210
1	4458±220
2	3262±163

Bu çalışmada oksidatif stres yaratarak katalaz üretiminde artış beklenmesi hedeflenmişti. Çünkü büyüme ortamına H₂O₂ eklenerek üretimin arttırıldığına dair raporlar bulunmaktadır (Fiedurek ve Gromada, 2000; Sooch ve diğ., 2014). Ayrıca *A. nidulans* suşunun sahip olduğu *catA* ve *catB* geninin oksidatif stres durumunda H₂O₂'ye karşı koruyucu rol oynadığı bilinmektedir. Aynı zamanda bu genler ısı şokuna karşı da direnç gösterir. *A. niger*'in bulundurduğu *catR* geni ise *catA* ve *catB* genine %61 oranında benzerlik göstermektedir (Kawasaki ve diğ., 1997). Bu nedenlerle ısı şoku ve stres uygulamaları tercih edildi. Ancak beklenilenin aksine her iki uygulama da *A. niger*'de olumsuz etki ile sonuçlandığından üretim için bunlardan vazgeçildi.

3.3.Katalaz Enziminin Saflaştırılması

3.3.1. Kromatografik yöntemle saflaştırma

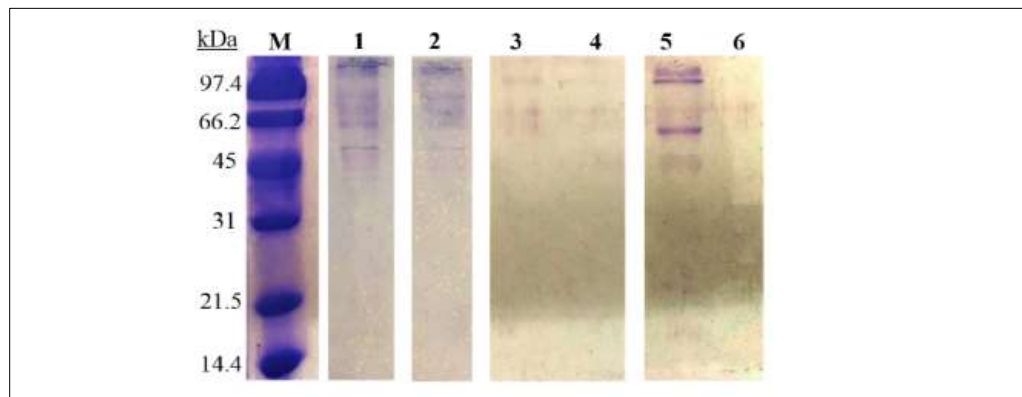
Katalaz enzimini kromatografik yöntemle saflaştırma amacıyla öncelikle ham ekstrakt olarak kullanılacak süpernatana amonyum sülfat çöktürme denemesine maruz bırakıldı. Buna göre süpernatana %40, %60 ve %80 (w/w) doyunluklarda hazırlamak amacıyla amonyum sülfat eklendi. Her bir doyunlukta hazırlanan çözeltilerden elde edilen örneklere ait pelet ve süpernatana çözeltilerinde aktivite ve protein miktar tayinleri

yapıldı (Tablo 3.4). Ayrıca örneklere elektroforez (SDS-PAGE) işlemi uygulandı (Şekil 3.3).

Tablo 3.4. Farklı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doygunluklarında hazırlanmış örneklere ait pelet ve süpernatantlarda katalaz aktivite ve protein miktarlar değerlerinin karşılaştırılması

Amonyum sülfat konsantrasyonu (% w/w)		Katalaz aktivite (U/mg)	Protein miktarı (mg/mL)
0	Süpernatant	7868	1
40	Süpernatant	8512	1
	Pelet	-	-
60	Süpernatant	10076	0,33
	Pelet	7361	0,67
80	Süpernatant	-	0,88
	Pelet	14512	0,12

Tablo 3.4.'de görüldüğü üzere %40 (w/w) doygunluğunda hazırlanmış çözeltide pelet oluşumu gözlenmedi. En yüksek katalaz aktivitesi ise %80 (w/w) doygunlukta hazırlanmış çözeltilere ait pelet örneğinde ölçüldü. Ayrıca, %80 (w/w) örneğinde katalaz enziminin tamamen konsantre halde çöktüğü görüldü. Benzer şekilde jel üzerinde de aynı konsantrasyonda belirgin bantlar görülmektedir (Şekil 3.3). Buna göre, aktivite ve jel analizleri birlikte incelendiğinde katalaz enziminin çöktürülmesinde %80 (w/w) amonyum sülfat konsantrasyonunun kullanılmasının uygun olduğu söylenebilir.



Şekil 3.3. Farklı amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonlarında hazırlanmış *A.niger* özütüne ait süpernatant ve pelet örneklerinin SDS-PAGE analizi.

%80 (w/w) amonyum sülfat kullanılarak çöktürülen örnek daha sonra anyon değiştirici kolona yüklendi ve elde edilen fraksiyonlar katalaz aktiviteleri açısından incelendi. Tüm saflaştırma işlemlerine ait bulgular Tablo 3.5’te verilmiştir. Buna göre, katalaz enzimi iki basamakla ham ekstraktan %58 geri kazanımla 11 kat saflaştırılmıştır. Literatürde rapor edilen çalışmalar arasında *A. phoenicis* K30’dan katalaz enziminin DEAE-Sefaroz iyon değiştirici ile tek basamakta %89,3 verimle 305,8 kat saflaştırıldığı görülmektedir (Kacem-Chaouche ve diğ., 2013). Kocabas ve ekibi, başka bir küf olan *S. thermophilum*’dan iki basamakta (anyon değiştirici ve ardından jel filtrasyon kromatografisi) %45 verimle 10 kat saflaştırmayı başarmışlardır (Kocabas ve diğ., 2008). Bu çalışmada elde edilen bulgular, Kacem-Chaouche ve ekibinin başka bir *Aspergillus* suşundan saflaştırdıkları katalaz enzimine göre kolon kromatografisinin daha düşük verimle çalıştığını göstermektedir. Diğer yandan, bu çalışmadaki saflaştırma katsayı ve verim değerleri, Kocabas ve ekibinin bulduğu değerlerden daha yüksektir.

Tablo 3.5. Katalaz enziminin saflaştırılma basamakları

	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma katsayısı	Enzim geri kazanımı (%)
Ham ekstrakt	200	15730	78,65	1	%100
%80 (w/w) Amonyum sülfat ile çöktürme	76	11955	157,3	2	%76
İyon değiştirme kromatografisi	10,5	9123	865,1	11	%58

3.3.2. Üçlü-faz ayırma (TPP) sistemi ile saflaştırma

A. niger’den elde edilen süpernatandan (1 mg protein; 79 U/mg) katalaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan üçlü faz sistemi Bölüm 2.2.5.’te açıklandığı şekilde uygulandı. Bu amaçla, farklı derişimlerde hazırlanan amonyum sülfat ve *t*-bütanol kullanıldı. Amonyum sülfat, proteinlerin “salting-out” etkisiyle dereceli olarak

çökmelerini sağlayan bir tuzdur. Protein saflaştırma çalışmalarında denatüre edici bi kimyasal olmadığından sıklıkla tercih edilir. Bütanol ise istenmeyen bileşiklerin (düşük molekül ağırlığına sahip lipid ve fenolik maddeler) biyomoleküllerden seçici olarak uzaklaştırılmasını sağlar. Proteinleri denatüre etmediği için üçlü faz sistemlerinde tercih edilir (Dennison ve Lovrein, 1997).

TPP’de faz oluşturan bileşenlerin konsantrasyonları en önemli noktalardan birisidir. Bu sistemlerde moleküllerin fazlar arasındaki dağılım davranışları, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, yük, sterik etkiler ve biyomoleküllerin özellikleri gibi çeşitli faktörlerden dolayı oldukça kompleks bir olaydır. Bir başka ifadeyle, uygun sistemlerin seçimi ve dizaynına yol gösterecek kapsamlı ve mekanistik bir teori mevcut değildir. Bu yüzden, bu metodun uygulamalarında biyomoleküllerin optimum dağılımını sağlayan en uygun ve iyi bir sistemin hazırlanabilmesi için deneysel optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulur.

Bu çalışmada, tercih edilen sulu üçlü faz sistemleri yüksek seçimlilik, düşük maliyet ve düşük vizkoziteden dolayı birçok sisteme kıyasla daha avantajlıdır (Dennison ve Lovrein, 1997). Katalaz enzimini iyi bir verimle yüksek oranda saflaştırmak için sistemi etkileyen parametreler ((NH₄)₂SO₄ konsantrasyonu, süpernatant/t-bütanol oranı ve pH) incelendi.

Öncelikle, farklı amonyum sülfat konsantrasyonları ile hazırlanan sulu üçlü faz sistemlerinde (süpernatant/t-bütanol oranı 1:1), *A. niger* katalazının dağılımı gerçekleştirildi; sonuçlar Tablo 3.6’da verilmiştir. Buna göre *A. niger* katalazı hazırlanan faz kompozisyonlarının çoğunda dağılıma göstermiştir.

Faz ayrımından sonra üç faz oluşur; t-bütanolce zengin üst faz, tuzca zengin alt faz ve proteinlerin çökelti oluşturduğu ara faz. Çalışmada, katalaz enziminin çoğunlukla seçici bir şekilde ara fazda dağıldığı görülmüştür. TPP sisteminde katalaz enziminin hangi fazda dağılacığı enzimin içerdiği amino asitlerin karakteristik özelliklerine ve izoelektrik noktalarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Bu nedenle aynı enzimin farklı kaynaklardan elde edilen ekstraktlarında fazlar arası dağılımları farklılık gösterebilmektedir (Keskin ve Kat, 2013). En yüksek saflaştırma katsayısı (7,0) ve aktivite geri kazanım değerleri (%206), %80 (w/w) amonyum sülfat ile hazırlanan

sistemde ölçüldü. Bu nedenle bir sonraki aşamada amonyum sülfatı konsantrasyonu olarak %80 (w/w) içeren sistem tercih edildi.

Tablo 3.6. Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) konsantrasyonunun TPP sisteminde katalaz ayırımına etkisi

		Spesifik aktivite (U/mg)	Toplam aktivite (U)	Toplam protein miktarı (mg)	Saflaştırma katsayısı	Enzim aktivite geri kazanımı
Ham ekstrakt		79	79	1,0	1,0	%100
%40 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	-
	Ara faz	-	-	0,1	-	-
	Alt faz	316	151	0,5	4,0	%191
%50 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	-
	Ara faz	24	13,4	0,6	0,3	%17
	Alt faz	71	40	0,6	0,9	%51
%60 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	-
	Ara faz	103	104	0,9	1,3	%132
	Alt faz	270	27	0,1	3,4	%34
%70 (w/w) AS	Üst faz	97	67	0,7	1,2	%85
	Ara faz	75	13	0,2	0,95	%16
	Alt faz*	-	-	-	-	-
%80 (w/w) AS	Üst faz	-	-	0,3	-	-
	Ara faz	540	162	0,3	7,0	%206
	Alt faz	79	32	0,4	1,0	%40
%90 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	-
	Ara faz	383	115	0,3	5,0	%146
	Alt faz*	-	-	-	-	-

*Bu fazlarda enzim aktivite ve protein miktar tayinleri negatif sonuç vermiştir.

Sistem pH'sı 6,0, sıcaklığı ise 25°C'dir.

Ganoderma sp.'den lakkaz enziminin saflaştırılmasında ara fazda çöken enzim miktarının ve enzim saflığının artan tuz konsantrasyonu ile birlikte arttığı görülmüştür. Buna bağlı olarak %80 amonyum sülfat konsantrasyonunda 4,9 kat saflaştırma işlemi %65 verimle sonuçlanmıştır. Genel olarak daha yüksek tuz konsantrasyonunun proteinlerin çökmesine neden olan hidrofobik etkileşimleri arttırdığı bilinmektedir. Fakat aynı çalışmada kirletici proteinlerin çoğunun başlangıçta çökeldiğini, böylece tek aşamalı TPP sisteminin enzim saflaştırmasını sınırladığı da gözlemlenmiştir (Rajeeva ve Lele, 2011).

Katalaz enziminin TPP’de saflaştırılmasının ikinci basamağında %80 (w/w) (NH₄)₂SO₄ içeren farklı süpernatant/t-bütanol oranlarında hazırlanmış sistemlerde spektrofotometrik analizler gerçekleştirildi. Bir önceki basamakta enzimin seçici olarak ara fazda toplandığı belirlendiğinden sadece ara faz sonuçları değerlendirilmiştir.

Tablo 3.7. Ham ekstrakt/t-bütanol oranının TPP sisteminde katalaz ayırımına etkisi

	Spesifik aktivite (U/mg)	Toplam aktivite (U)	Toplam protein miktarı (mg)	Saflaştırma katsayısı	Enzim aktivite geri kazanımı
Ham ekstrakt	79	79	1,0	1,0	%100
Ham ekstrakt: t-bütanol 1,0:0,5	158	96	0,6	2,0	%121
Ham ekstrakt: t-bütanol 1,0:1,0	540	162	0,3	7,0	%206
Ham ekstrakt: t-butanol 1,0:1,5	611	168	0,3	7,7	%212
Ham ekstrakt: t-bütanol 1,0:2,0	466	161	0,3	5,9	%204

Sistem pH’sı 6,0, sıcaklığı ise 25°C’dir.

Tablo 3.7’de belirtildiği üzere enzimin saflık derecesi 1:1, 1:1,5 ve 1:2 hazırlanmış sistemlerde 1:0,5’e göre daha iyi çıkmıştır. Buna göre düşük t-bütanol konsantrasyonlarının amonyum sülfat ile etkileşime geçerek enzimin seçici ayırımını sağlamada yetersiz kaldığı söylenebilir. Daha fazla t-bütanol miktarı, sulu fazda daha fazla su kaybına neden olarak tuz konsantrasyonunun artmasına neden olur ve bu da enzimin ara fazda toplanmasını sağlar. Ayrıca çözücü miktarı (t-bütanol) arttıkça iki faz arasındaki konsantrasyon farkı azalır, bu da enzimin daha düşük oranda saflığına ve geri kazanımına neden olabilir (Vetal ve Rathod, 2014). Benzer sonuçlar Özer ve arkadaşlarının TPP ile domates bitkisinden invertazı saflaştırma çalışmalarında da ortaya çıkmıştır (Özer ve diğ., 2010). 1:1,5 oranında hazırlanan sistemde maksimum saflaştırma katsayısı (7.7) ve aktivite geri kazanımı (%212) elde edilmiştir. Bu sebeple, ileriki denemeler ham ekstrakt:t-butanol oranının 1:1,5 olduğu sistemlerde yapılmıştır.

Sistem pH'sı proteinlerdeki asidik veya bazik amino asitlerin iyonizasyonunu etkileyeceğinden oldukça önemlidir. pH'daki herhangi bir değişim ilgilenilen proteinin net yükünün değişimine ve dolayısıyla proteinin fazlar arasındaki dağılımını etkiler (Vetal ve Rathod, 2014). Örneğin, eğer sistem pH'sı proteinin pI değerinin üzerinde hazırlanırsa enzim negatif yüklü hale gelecek ve alt fazda toplanacaktır. Diğer yandan eğer sistem pH'sı protein pI değerinin altında hazırlanırsa protein presipitasyona uğrayıp sulu ve organik faz arasındaki ara fazda toplanacaktır (Dennison ve Lovrein, 1997). Buna göre, ham ekstrakt %80 (w/w) amonyum sülfatla doyurulduktan sonra sistem pH'sı ayarlanmıştır. Tablo 3.8, farklı pH'larda hazırlanan sistemlerde ölçülen enzim aktivite ve miktar bulgularını göstermektedir. Tabloda görüldüğü üzere saflaştırma etkinliği pH 6,0'ın altında ve 7,0'ın üstünde oldukça düşüktür. Bunun nedeni olarak sistemde biriken yüksek miktarlardaki H⁺ ve OH⁻ iyonlarının solvent molekülleriyle etkileşerek ilgilenilen enzimin aynı moleküllerle etkileşimini kısıtlaması ve sonuçta fazlardaki dağılımını olumsuz yönde etkilemesi söylenebilir (Singh ve Singh, 2003). En yüksek saflaştırma katsayısı (7,9) ve aktivite geri kazanım değerleri (%263), pH'sı 7,0 olan sistemde ölçülmüştür.

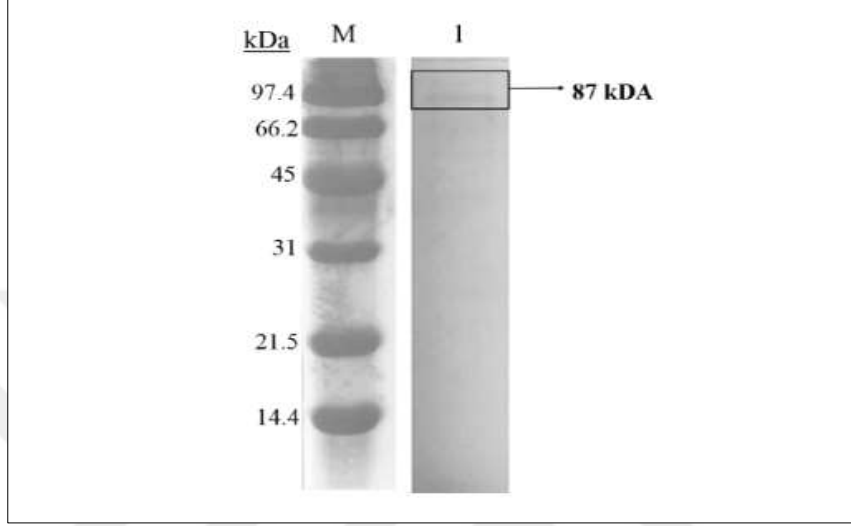
Tablo 3.8. TPP sistem pH'sının katalaz ayırımına etkisi

	Spesifik aktivite (U/mg)	Toplam aktivite (U)	Toplam protein miktarı (mg)	Saflaştırma katsayısı	Enzim aktivite geri kazanımı (%)
Ham ekstrakt	79	79	1,0	1,0	%100
pH 3.0	142	16	0,1	1,8	%20
pH 4.0	158	28	0,2	2,0	%35
pH 5.0	198	36	0,2	2,5	%45
pH 6.0	611	168	0,3	7,7	%212
pH 7.0	624	208	0,3	7,9	%263
pH 8.0	174	28	0,2	2,2	%36
pH 9.0	150	19	0,1	1,9	%24

3.4. Katalaz Enziminin SDS-PAGE Analizi

TPP sistemi ile saflaştırılan katalaz enziminin saflığının kontrolü %10'luk (w/v) SDS-PAGE ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası jel, gümüş boyama metodu ile boyanmıştır. Şekil 3.4'de görüldüğü üzere örneğe ait yaklaşık 87 kDa civarında tek bir

bant gözlenmiştir. Bu bulgu, çalışılan enzimin tipik bir monofonksiyonel katalaz olduğunu doğrular niteliktedir. Çünkü bu büyüklük değeri (87 kDa), büyük alt üniteli monofonksiyonel katalazlar için rapor edilen değer (>75 kDa) aralığında yer alır (Chelikani ve diğ.,2004).



Şekil 3.4. *A. niger*'den TPP ile saflaştırılan katalazın SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (marker) (Bio-Rad Unstained SDS-PAGE Standards, Amerika); 1, %80 (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunda, 1:1,5 süpernatant/t-bütanol oranında ve pH 7,0'da hazırlanmış sistemden izole edilen katalaz örneği.

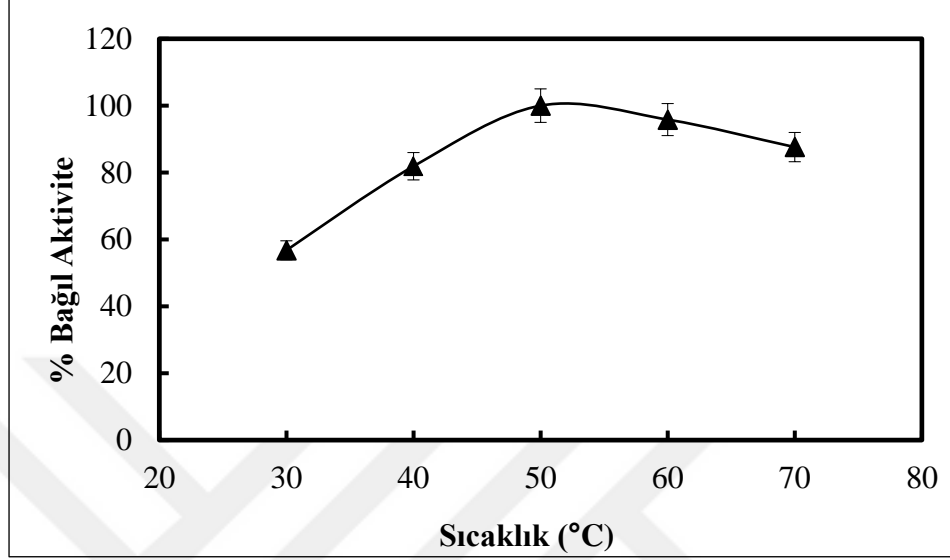
3.5. Katalaz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Reaksiyon sıcaklığının katalaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 30-70°C arası sıcaklıklarda gerçekleştirilen aktivite ölçümleri Şekil 3.5.'de verilmiştir. Oluşturulan grafikte *A. niger* katalazı için optimum reaksiyon sıcaklığı 50°C olarak bulundu.

Bu sıcaklık değerinin üzerinde katalaz aktivitesinin dereceli olarak azaldığı gözlemlendi. 60°C ve 70°C sıcaklık değerlerinde aktivitesini 50°C'deki aktiviteye göre sırasıyla %95 ve %87 oranında koruduğu gözlemlendi.

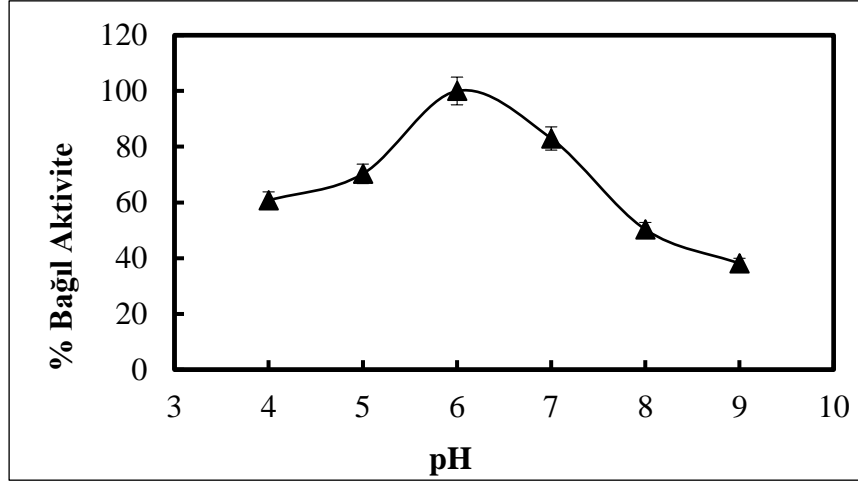
Farklı maya ve küflerden izole edilen katalazlar için optimum reaksiyon sıcaklık aralığı 30°C ila 85°C olarak rapor edilmiştir (Sooch ve diğ., 2014). Bu çalışmada bulunan optimum sıcaklık değeri belirtilen aralığın içine düşmektedir.



Şekil 3.5. *A. niger* katalazının farklı sıcaklık değerlerinde ölçülen bağıl aktivite grafiği

3.5.2. Optimum pH değerinin belirlenmesi

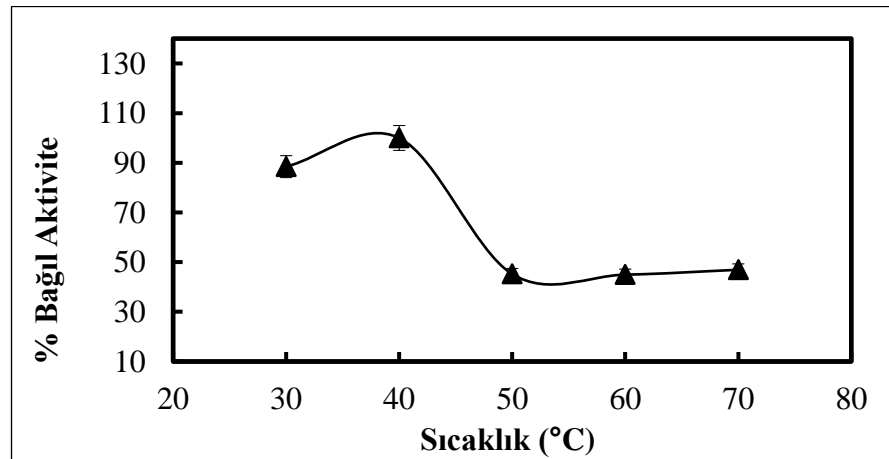
Farklı pH değerlerinin katalaz aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği grafik Şekil 3.6.'da verilmiştir. pH 3,0 ila 9,0 aralıklarında yapılan aktivite tayinlerinde optimum reaksiyon pH değeri 6,0 olarak belirlendi. Diğer yandan pH 7,0'da, pH 6,0'da ölçülen aktiviteye göre yaklaşık %82'sinin korunduğu, pH 5,0'da ise %70'inin korunduğu gözlenirken 8,0 ve üzerindeki pH değerlerinde aktivitede hızlı bir düşüş gözlemlendi. Bazı koşullarda enzim aktivitesinde gözlenen kaybın yüksek pH değerlerinde gözlenen değerden daha fazla olması, enzimin asidik ortamları tercih ettiğini göstermektedir. Optimum reaksiyon pH'sı bakterilerden *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonad EF*'den, mantarlardan ise *Septoria tritici*'den izole edilen katalazlarla benzerlik göstermektedir (Sooch ve diğ., 2014).



Şekil 3.6. *A. niger*'in katalaz aktivitesine pH'nın etkisi

3.5.3. Termal kararlılığının belirlenmesi

Sıcaklığın enzimin kararlılığına etkisinin belirlenmesi için 30°C ila 70°C arası sıcaklıklarda enzim 60 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra standart koşullarda aktivite ölçümleri yapıldı. Şekil 3.7'de görüldüğü üzere enzimin kararlı kaldığı optimum sıcaklık değeri 40°C olarak belirlendi. Bu sıcaklık değerinde katalaz aktivitesinin azaldığı gözlemlendi. 30°C sıcaklık değerinde ise aktivitesinin 40°C'deki (optimal sıcaklık değeri) aktiviteye göre %88 oranında korunduğu gözlemlendi. Buradan enzimin dar bir sıcaklık aralığında (30°C -40°C) kararlı kaldığını söyleyebiliriz. *A. niger* katalazı ile termal kararlılık bakımından benzer özellik gösteren katalaz kaynağı olarak *Vibrio rumoiensis* örnek verilebilir (Yumoto ve diğ., 2000).



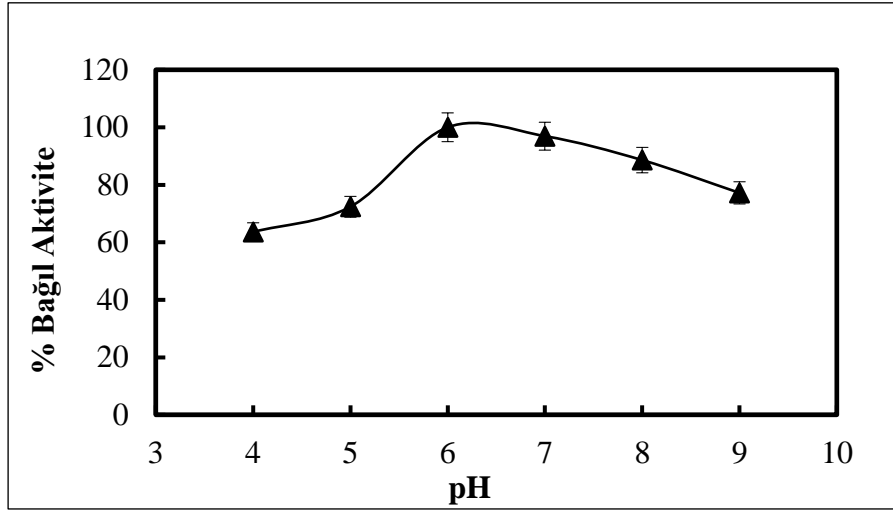
Şekil 3.7. *A. niger* katalazının termal kararlılığı

3.5.4. pH kararlılığının belirlenmesi

Farklı pH değerlerinde (pH 3,0-9,0) enzimin kararlılığının gösterilmesi için yapılan denemelerin sonuçları Şekil 3.8’de verilmiştir. Enzimin kararlı kaldığı optimum pH değeri 6,0 olarak ölçüldü. Optimum pH değerinin üzerinde enzim aktivitesinin sırasıyla %97, %88 ve %77’sinin korunduğu; pH 6,0’ın altında ise aktivitede giderek azalan bir grafik gözlemlendi.

Enzim stabilite deneyinde kaydedilen yüksek pH değerleri (pH 9,0’da aktivitenin %77’si korunmuştur) dikkat çekmektedir. Enzimin farklı pH’larda kararlı özellik göstermesi endüstriyel uygulamalar açısından önemlidir. Süreçlerin uzamasından kaynaklı olarak ortam pH’sına uzun süre maruz kalabilecek bir enzim için bu parametre önem arz eder (Calandrelli ve diğ., 2008).

Geniş pH kararlılık aralığı (5 ila 10) katalazların ortak bir özelliğidir (Kulys ve diğ., 2003). Örneğin, *T. aurantiacus* katalazı pH 5,0-13,0 aralığında kararlılık gösterir (Wang ve diğ. 1998). *S. thermophilum* katalazı ise pH 5,0 ila 9,0 arasında stabildir (Sutay Kocabas ve diğ., 2008).



Şekil 3.8. *A. niger* katalazının pH kararlılığı

3.5.5. Organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi

Organik çözücülerin katalaz aktivitesi üzerine etkisi Tablo 3.9’da gösterilmiştir. Organik çözücüler, proteinlerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirme yeteneğine

sahip bileşiklerdir. Genelde proteindeki kovalent olmayan bağlar, iyonik gruplar ve dipoller, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi özellikleri değiştirirler.

Tablo 3.8’de görüldüğü gibi organik çözücülerin eklendiği reaksiyon ortamlarında genel olarak çözgen konsantrasyonunun artışına bağlı olarak aktivitede kademeli olarak azalma gözlemlendi. Sadece asetonun enzim üzerindeki etkisi diğer çözücülere göre daha kuvvetli olup %2,5 (v/v) üzerinde aktivite tamamıyla inhibe olmuştur. %2,5 (v/v) konsantrasyonda ise aktivitede kontrole (çözgen eklenmemiş ortam) göre %41 oranında azalma gözlemlenmiştir. Test edilen çözücüler içinde katalaz enzimini olumsuz yönde en az etkileyen “etanol” olup %2,5’luk (v/v) konsantrasyonda enzim aktivitesinin hemen hemen hepsi korunmuştur. Diğer çözücüler ise aynı konsantrasyonda aktivitede yaklaşık %50 kayba sebep olarak etkilerini göstermişlerdir. *A. niger* katalazının organik çözücülere olan dayanıklılığı Etanol>DMSO>Metanol>Aseton şeklindedir. Enzimin etanole olan dayanıklılığının bu çözgenin kullanıldığı endüstriyel uygulamalarda kullanılmasına olanak vereceği önerilebilir.

Tablo 3. 9. Organik çözücülerin *A. niger* katalaz aktivitesi üzerine etkisi

Organik çözücü	% v/v	Bağlı katalaz aktivitesi (%)	Organik çözücü	% v/v	Bağlı katalaz aktivitesi (%)
Kontrol		100	Kontrol		100
	2,5	98		2,5	59
Etanol	5	87	Aseton	5	-
	7,5	81		7,5	-
	10	44		10	-
	2,5	45		2,5	49
Metanol	5	25	DMSO	5	45
	7,5	29		7,5	33
	10	-		10	31

3.5.6.Farklı substratların enzim aktivitesine etkisi

A. niger katalazında diğer katalazlarda olduğu gibi peroksitten bağımsız ikincil aktivitenin (Chen ve diğ., 2017; Loncar ve Fraaije, 2015; Sangar ve diğ., 2012; Sutay Kocabas ve diğ., 2008; Teng ve diğ., 2016; Vetrano ve diğ., 2005; Yuzugullu ve diğ., 2013) varlığını araştırmak üzere farklı peroksidaz ve oksidaz substratlarına karşı aktivite analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular Tablo 3.9’da gösterilmiştir.

Spektrofotometri denemelerinde *A. niger* katalazının hidrojen peroksit yokluğunda 4-metil katekol ve pyrokatekolü okside edebildiği görüldü. Diğer yandan guaiakol, hidrokinon, pirogallol, ABTS ve L-tirozin üzerinde herhangi bir etki gözlenmedi. Bu durum, *A. niger* katalazının özellikle *orto*-difenolik bileşikler üzerinde etkili olduğuna işaret etmektedir (Yuzugullu ve diğ., 2013). Buna göre *A. niger*'dan izole edilen katalazın polifenol oksidaz (substrat ilgisi: 4-metil katekol>pyrokatekol) aktivitesi gösterdiği söylenebilir.

A. niger de görülen bu ikincil aktivite özelliğinin gelecekte gıda ve biyoteknoloji alanlarında büyük önem teşkil edeceği düşünülmektedir (Koçlar Avcı ve diğ., 2013).

Yapılan çalışmalar sonucu katalaz enziminde gözlenen bu ikincil aktivite olgusu günümüzde hızla yaygınlaşmaktadır. Memeli katalazlarında ilk kez tanımlanan bu olgu Vetrano ve diğ., 2005), daha sonra *S. thermophilum* (Sutay Kocabas ve diğ., 2008; Yuzugullu ve diğ., 2013), *A. cruentus*'dan (Chen vd., 2017; Teng vd., 2016) ve *T. Fusca*'dan (Loncar ve Fraaije, 2015) izole edilen katalazlarda da tanımlanmıştır.

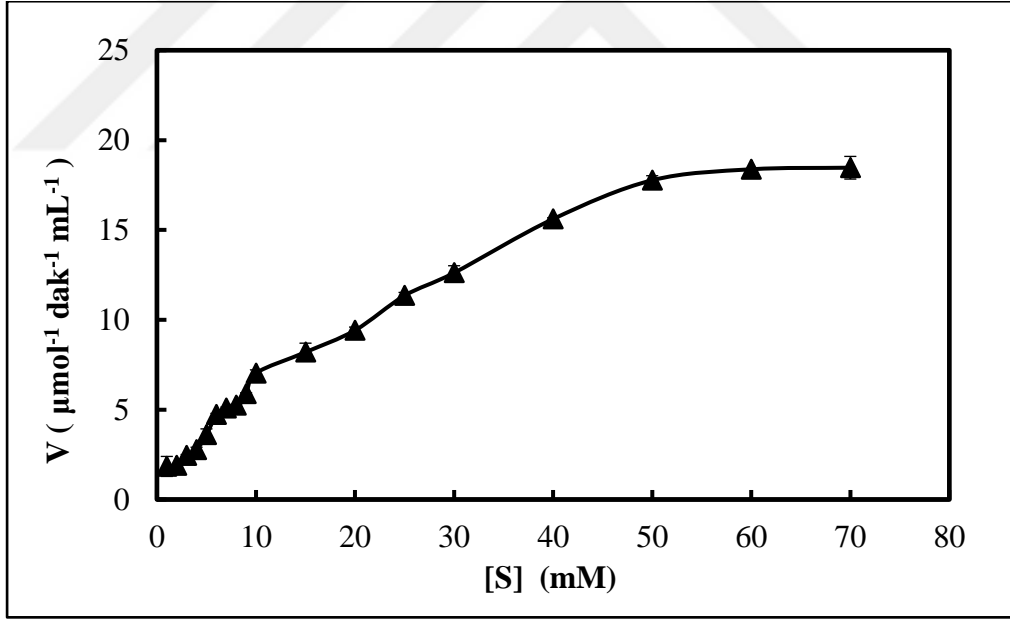
Tablo 3. 10. *A. niger* katalazının farklı oksidatif/peroksidatif substratları varlığında aktivitesinin ölçümü ve değerlerin aynı substratlar varlığında ölçülen *T. versicolor* lakkazı ile turp peroksidazıyla karşılaştırılması

Substrat (mM*)	Oksidatif/Peroksidatif aktivite (nmol/mL/dak)		
	<i>A. niger</i> katalazı	<i>T. versicolor</i> lakkazı	Turp peroksidazı
4-Metil Katekol (100 mM)	100	3,4	-
Pyrokatekol (100 mM)	0,8	0,02	-
Pirogallol (285 mM)	-		100
Guaicol (2 mM)	-	28,4	-
Guaicol (5 mM)	-	41,5	-
ABTS (5 mM)	-	100	-
Hidrokinon(100 mM)	-	-	-
L-Tirozin (5 mM)	-	-	-

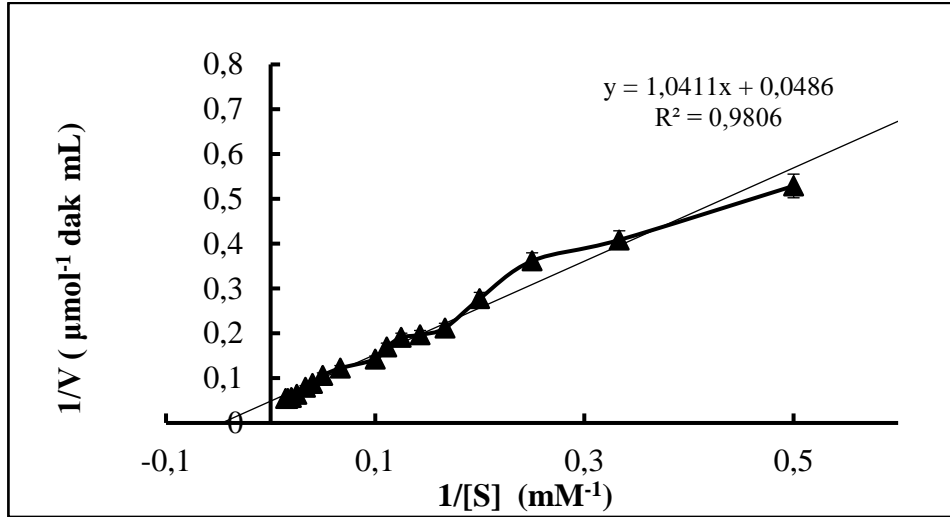
*Substratlar için kullanılan konsantrasyon değerleri literatürden (Ögel ve diğ., 2006; Tauber, 1953) seçilmiştir.

3.5.7.Kinetik parametrelerin belirlenmesi

A. niger katalazına ait K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması için oluşturulan Michaelis Menten grafiği ve Lineweaver-Burk diyagramı Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da verilmiştir. Enzimin hızını ve substratına olan afinitesini belirten bu değerlerin hesaplanması amacıyla katalaz enzimi substratı olan H_2O_2 'nin 0,1–70 mM aralığındaki konsantrasyonlarında aktivite tayini yapıldı. Lineweaver-Burk diyagramından ($1/S$ 'ye karşı $1/V$) K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 21,4 mM ve 20000 $\mu\text{mol}^{-1} \text{dak}^{-1} \text{l}^{-1}$ olarak belirlendi. Benzer K_m değeri *Neurospora crassa*'dan (maya, 21,7 mM) izole edilen katalazda da ölçülmüştür (Diaz ve diğ., 2001). Ayrıca bakterilerden *Methanosarcina barkeri* ve *Oceanobacillus oncorhynchi* katalazlarında K_m değerleri sırasıyla 25 ve 24 mM olarak bulunmuştur (Calandrelli ve diğ., 2008; Shima ve diğ., 1999).



Şekil 3.9. H_2O_2 konsantrasyonunun katalaz aktivitesine etkisini gösteren Michaelis-Menten grafiği (Substrat [S]: Hidrojen peroksit)



Şekil 3.10. Katalaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramı (Substrat [S]: Hidrojen peroksit)

4.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, öncelikle enzim kaynağı olarak kullanılan *A. niger*'in büyüme optimizasyonu gerçekleştirildi. Zamana bağlı biyokütle miktarı ve katalaz aktivite bulguları karşılaştırıldığında, *A. niger*'in durgun faza geçtiğinde enzim üretiminin en yüksek değerine ulaştığını gösterdi. Bu durum enzim üretiminin sekonder metabolizma sonucu olduğuna işaret etmektedir. Enzim üretimini artırmak için ısı şoku ve oksidatif stres denemeleri gerçekleştirildi. Bulgular, en yüksek katalitik aktivitenin küfün 37°C'de büyütülmesi sırasında ölçüldüğünü 45°C'nin üzerinde ise enzim üretiminin azaldığını gösterdi. Bununla birlikte, 30°C ve 37°C sıcaklıklarda büyütülen *A. niger*'lerin katalaz aktiviteleri karşılaştırıldığında 37°C'de enzim aktivitesinin %5 oranında daha yüksek olduğu; ancak aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi. Oksidatif stres yaratmak için büyüme ortamına eklenen H₂O₂'nin enzim aktivitesi üzerine etkisi göz önüne alındığında test edilen hemen tüm H₂O₂ derişimlerinde negatif kontrole göre daha düşük katalaz üretiminin gerçekleştiği gözlemlendi.

Katalaz enziminin saflaştırılması, düşük maliyette ve yüksek verimle çalışan bir izolasyon yöntemi olarak tanımlanan ve *A. niger*'dan katalaz enziminin saflaştırmasında ilk kez kullanılan üçlü-faz ayırma sistemi ile gerçekleştirildi. Hazırlanan sistemlerin hemen hepsinde enzimin seçici bir şekilde ara fazda dağıldığı görüldü. Saflaştırma sırasında amonyum sülfat konsantrasyonu, ham ekstrakt:t-bütanol oranı ve sistem pH'sı gibi parametreler test edildi. Sonuç olarak, %80 (w/w) (NH₄)₂SO₄ içeren ve ham ekstrakt:t-bütanol oranı 1:1,5 olan sistemden (pH 7,0), enzimin yaklaşık %263 aktivite geri kazanımı ile 7,9 kat saflaştırılması sağlandı.

Saflaştırılan katalaz enzim örneği SDS-PAGE ile analiz edildiğinde jel üzerinde tek bir bant gözlemlendi. Bu bantın yaklaşık 87 kDa'ya denk geldiği görüldü. Bu bulgu, çalışılan enzimin tipik bir monofonksiyonel katalaz olduğunu doğrular niteliktedir.

Katalaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığı 50°C olarak ölçüldü. Enzimin termal kararlılığı incelendiğinde ise katalazın stabil kaldığı optimum sıcaklık değeri 40°C olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık değerinin üzerinde katalaz aktivitesi hızla azalmıştır. 30°C sıcaklık değerinde ise aktivitenin 40°C'deki (optimal sıcaklık değeri) aktiviteye göre %88 oranında korunduğu gözlemlendi.

Katalaz enzimi için optimum reaksiyon pH değeri 6,0 olarak belirlendi. Bu pH değerinin üzerinde dereceli olarak düşüş gözlemlendi. Enzimin kararlı kaldığı optimum pH değeri de 6,0 olarak ölçüldü. Enzimin farklı pH'larda kararlı özellik göstermesinin endüstriyel uygulamalar açısından önemli olduğu vurgulanabilir.

Organik çözücüler proteinlerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirme yeteneğine sahip bileşiklerdir. Bu nedenle, organik çözücülerin olası etkileri test edildi. *A. niger* katalazının organik çözücülere olan dayanıklılığı Etanol>DMSO>Metanol>Aseton şeklinde belirlendi. Etanolun, %7,5'lük (v/v) derişime kadar reaksiyon ortamına konulabildiği gözlenirken diğer çözücülerin aktivitede daha büyük kayıplara sebep olduğu bulundu.

Enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 21,4 mM ve 20000 $\mu\text{mol/dak/l}$ olarak hesaplandı. Katalaz enziminin çeşitli oksidaz/peroksidaz substratlarına olan ilgisini araştırmak amacıyla gerçekleştirilen spektrofotometri denemelerinde hidrojen peroksit yokluğunda 4-metil katekol ve pyrokatekolü okside edebildiği görüldü. Diğer yandan guaiakol, hidrokinon, pirogallol, ABTS ve L-tirozin üzerinde herhangi bir etki gözlenmedi. Bu durum *A. niger* katalazının özellikle *orto*-difenolik bileşikler üzerinde etkili olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak, katalaz enzimi *A. niger*'den tek basamakta başarılı bir şekilde saflaştırıldı. Kullanılan saflaştırma yöntemi *A. niger* katalazı için ilk defa bu çalışmada rapor edilmektedir. Literatürde *A. niger*'den enzim saflaştırılmasında kromatografik yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir. Fakat bu yöntemlerin çoğu, çöktürme, ion-exchange kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi gibi çok adımlı aşamaları içermektedir. Bu aşamadaki basamak sayılarının artması, ürün verimini olumsuz etkilemektedir. Daha da önemlisi bu basamakların çoğu, uygulaması zor ve pahalı yöntemler içermektedir. Bu çalışmada, tercih edilen sulu üçlü faz sistemleri yüksek seçicilik, düşük maliyet ve düşük vizkoziteden dolayı birçok sisteme kıyasla daha

avantajlıdır (Dennison ve Lovrein, 1997). Sistemden elde edilen katalaz enziminin geniş pH aralığında kararlı olması, etanole karşı göstermiş olduğu dayanıklılık ve ikincil oksidaz aktivite gösterme yetenekleri endüstriyel uygulamalarda iyi bir biyokatalizör olarak işlev görebileceği sinyali vermektedir.

Bu çalışma, üretim için bulunan optimum koşullar kullanılarak enzimin büyük ölçekte üretilmesine gidilmesi ile genişletilebilir. Bu şekilde, sahip olduğu biyokatalitik özellikler ile ticari enzim kaynağına alternatif bir ürün olarak gösterilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, farklı özellikte fenolik bileşikler okside edebilme yeteneklerinden yola çıkarak enzimin farmasötik ilaç hammadde sentezinde kullanılabilirliği araştırılabilir. Son olarak, enzim kristalizasyonu çalışarak protein data bankasında şu anda yer almayan *A. niger* katalazının üç boyutlu bilgi girişimi sağlanmış olacaktır. Bu şekilde diğer katalazlarla da yapılarının karşılaştırılması mümkün olacak ve ikincil aktivite özellikleri yapısal açıdan değerlendirilmiş olacaktır.

KAYNAKLAR

Angelova M. B., Pashova S. B., Spasova B. K., Vassilev S. V., Slokoska L. S., Oxidative Stress Response of Filamentous Fungi Induced by Hydrogen Peroxide and Paraquat, *Mycological Research*, 2005, **109**, 150–8.

Aguirre J., Rios-Momberg M., Hewitt D., Hansberg W., Reactive Oxygen Species and Development in Microbial Eukaryotes, *Trends in Microbiology*, 2005, **13**, 111–8.

Alici E. H., Arabaci G., Purification of Polyphenol Oxidase from Borage (*Trachystemon orientalis* L.) by Using Three-Phase Partitioning and Investigation of Kinetic Properties, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, **93**,1051–6.

Arat Ö., *Aspergillus flavus* HBF34'ün Glukoamilaz Üretimi, Saflaştırılması ve Kitenik Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın,2007,41100.

Asan A., *Aspergillus*, *Penicillium* and Related Species Reported from Turkey, *Mycotaxon*, 2004, **89**, 155–7.

Ayberkin E., Çiftçi E., Çocuklarda *Aspergillus* Enfeksiyonları, *Çocuk Enfeksiyonları Dergisi*, 2009, **3**, 118-25.

Baskin S.I., Salem H., Oxidants, Antioxidants and Free Radicals, *Washington DC: Taylor and Francis*, 1997, 79–120.

Bradford M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye-Binding, *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**, 248–54.

Blum H., Beier H., Gross H. J., Improved Silver Staining of Plant Proteins, Rna and Dna in Polyacrylamide Gel, *Electrophoresis*, 1987, **8**, 93–9.

Buckova M, Godocikova J, Zamocky M, Polek B., Isolates of *Comamonas* Spp. Exhibiting Catalase and Peroxidase Activities and Diversity of Their Responses to Oxidative Stress, *Ecotoxicol Environ Saf*, 2010, **73**,1511–6.

Calandrelli V., Gambacorta R. I., Carratore V., Lama L., A Novel Thermo-Alkali Stable Catalase–Peroxidase From *Oceanobacillus oncorhynchi* Subsp. *Incaldaniensis*: Purification and Characterization, *World Journal Microbiol Biotechnology*, 2008, **24**, 2269–75.

Calera J. A., Paris S., Monod M., Hamilton A. J., Debeaupuis J. P., Diaquin M., Loópez-Medrano R., Leal F., Latgeè J. P., Cloning and Disruption of the AntigenicCatalase Gene of *Aspergillus Fumigatus*, *Infection and Immunity*, 1997,**65**, 4718–24.

Calera J. A., Sánchez-Weatherby J., López-Medrano R., Leal F., Distinctive Properties of the Catalase B of *Aspergillus nidulans*, *FEBS Letters*, 2000, **475**,117–20.

Cattani L., Ferri A., The Function of NADPH Bound to Catalase, *Bollettino Della Societa Italiana Di Biologia Sperimentale*, 1994, **70**, 75–82.

Chang Y. C., Tsai H. F., Karos M., Kwon-Chung K. J., THTA, A Thermotolerance Gene of *Aspergillus fumigatus*, *Fungal Genetics and Biology*, 2004,**41**, 888–96.

Chelikani P., Fita I., Loewen P.C., Diversity of Structures and Properties Among Catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences*,2004, **61**, 192–208.

Chen N., Teng X. L., Xiao X. G., Subcellular Localization of a Plant Catalase-Phenol Oxidase, Accatpo, From *Amaranthus* and Identification of a Non-Canonical Peroxisome Targeting Signal, *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**, 1–11.

Choi J.M., Han S. S., Kim H-S., Industrial Applications of Enzyme Biocatalysis: Current Status and Future Aspects, *Biotechnology Advances*, 2015,**33**,1443–54.

Dagenais Taylor R.T., and Nancy P. Keller, Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis, *Clinical Microbiology Reviews*, 2009, **22**(3), 447–65.

Demain A.L., Microbial Natural Products, *Nat Biotechnology*, 1998,**16**, 3-4.

Dennison C., Lovrien R., Three Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins, *Protein Expression and Profication*, 1997, **11**, 149–61.

Diaz A., Rangel P., Oca Y. M., Lledias F., Hansberg W., Molecular and Kinetic Study of Catalase-1, a Durable Large Catalase of *Neurospora crassa*, *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, **31**, 1323–33.

Duman Y., Kaya E., Prufication and Recovery of Invertase from Potato Tubers (*Solanum Tuberosum*) By Three Phase Partitioning and Determination of Kinetic Properties of Prified Enzyme, *Turkish Journal of Biochemistry*, 2014, **39**, 443–8.

Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P.L.H., Mahony J.A.O., *Dairy Chemistry and Biochemistry*, 1998.

Fiedurek J, Gromada A., Production of Catalase and Glucose Oxidase by *Aspergillus niger* Using Unconventional Oxygenation of Culture, *Journal of Applied Microbiology*,2000,**89**, 85–9.

Frost G. M., Moss D. A., *Biotechnology*, 1987, **7**,65–211.

Garay-Flores R. V., Segura-Ceniceros E. P., De Leon-Gamez R., Balvantin-Garcia C., Martinez-Hernandez J. L., Betancourt-Galindo R., Ramirez A. R. P., Aguilar C. N., Ilyina A., Production of Glucose Oxidase and Catalase By *Aspergillus niger* Free and Immobilized in Alginate-Polyvinyl Alcohol Beads, *The Journal of General and Applied Microbiology*,2014,**60**, 262–9.

Gumusel F., Biyoteknoloji, Genetik ve Sağlık Sektörü, *Kocaeli Sanayi İçin Teknolojik Öngörü Raporu*, Kocaeli, 2002, 73–135.

Halil E., Kalkancı A., Termofilik Mantarlar, *İnfeksiyon Dergisi*, 2008, **22**, 117–222.

Hansberg W., Salas-Lizana R., Domínguez L., Fungal Catalases: Function, Phylogenetic Origin and Structure, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, **525**, 170–80.

Kacem-Chaouche N., Destain J., Meraihi Z., Dehimat L., Haddoum T., Wathélet J., et al., Optimization of Extracellular Catalase Production from *Aspergillus phoenicis* K30 by a Linear Regression Method Using Date Flour as Single Carbon Source and Purification of the Enzym, *African Journal of Biotechnology*, 2013, **12**, 2646–53.

Kantarcıoğlu A. S., Yücel A., *Aspergillus* Cinsi Mantarlar ve İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Antifungallere Direnç ve Duyarlılık Deneyleleri, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 2003, **34**, 140–57.

Kawasaki L., Aguirre J., Multiple Catalase Genes Are Differentially Regulated in *Aspergillus nidulans*, *Journal of Bacteriology*, 2001, **183**, 1434–40.

Kawasaki L., Wysong D., Diamond R., Aguirre J., Two Divergent Catalase Genes Are Differentially Regulated During *Aspergillus nidulans* Development and Oxidative Stress, *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**, 3284–92.

Keskin S , Kat B ., İnvertz Enziminin Üçlü Faz Sistemi ile Saflaştırılması ve Termal Kararlılığının İncelenmesi, *Sakarya University Journal of Science*, 2013, **17**, 291–94.

Kirkman H. N., Gaetani G. F., Catalase: A Tetrameric Enzyme with Four Tightly Bound Molecules of NADPH, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, **81**, 4343–7.

Kocabas D.S., Bakir U., Phillips S. E. V., McPherson M. J., Ogel Z. B., Purification, Characterization, and Identification of A Novel Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase From *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **79**, 407–15.

Koclar Avcı G., Coruh N., Bolukbasi U., Ogel Z. B., Oxidation of Phenolic Compounds by the Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase (CATPO) From *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, **97**, 661–72.

Kucuk C., Kıvanc M., Kınacı E., Kınacı G., Antifungal Peptidler, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2003, **10**, 1–8.

Kulys J., Kriauciunas K., Vidziunaite R., Biphasic Character of Fungal Catalases Inhibition With Hyrdroxylamine in Presence of Hydrogen Peroxide, *Journal Mol Catal B: Enzym*, 2003, **26**, 79–85.

Kurakov A. V., Kupletskaya M. B., Skrynnikova E. V., Somova N. G., Search for Micromycetes Producing Extracellular Catalase and Study of Conditions of Catalase Synthesis, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2001, **37**, 67-72.

Li S., Yang X., Yang S., Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing And Engineering, *Comput Structural Biotechnology Journal*, 2012, **2**, 1–11.

Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of The Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 1970, **227**, 680–5.

Lineweaver H., Burk D., The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *Journal of American Chemical Society*, 1934, **56**, 658–66.

Loewen P. C., Villanueva J., Switala J., Donald L., Unprecedented Access of Phenolic Substrates to the Heme Active Site of A Catalase: Substrate Binding and Peroxidase-Like Reactivity of *Bacillus pumilus* Catalase Monitored By X-Ray Crystallography and EPR Spectroscopy, *Proteins*, 2015, **83**, 853–66.

Loncar N., Fraaije M.W., Not So Monofunctional-A Case of the Thermostable *Thermobifida fusca* Catalase with Peroxidase Activity, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, **99**, 2225–32.

Magnuson J. K., Lasure L. L., Organic Acid Production By Filamentous Fungi, *Advances in Fungal Bio/Technology For Industry, Agriculture and Medicine, In Press*, 2004, **70**, 2474–85.

Maté M.J., Melik-Adamyan W., Bravo J., Carpena X., Switala J., Fita I., Loewen P. C., Substrate Flow in Catalases Deduced From the Crystal Structures of Active Site Variants Of HP11 From *Escherichia coli*, *Proteins*, 2001, **44**, 270–81.

Mates J.M., Perez-Gomez C., De Castro I.N., Antioxidant Enzymes and Human Diseases, *Clinical Biochemistry*, 1999, **32**, 595-603.

Mojsov K., Application of Enzymes in the Textile Industry: A Review., *II International Congress "Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry"*, 2011, 230–39.

Nicholls P., Fita I., Loewen P. C., Enzymology and Structure of Catalases, *Advances in Inorganic Chemistry*, 2001, **51**, 51–106.

Noventa-Jordão M. A., Couto R. M., Goldman M. H. S., Aguirre J., Iyer S., Caplan A., Terenzi H. F., Goldman G. H., Catalase Activity is Necessary for Heat-Shock Recovery in *Aspergillus nidulans* germlings, *Microbiology*, 1999, **145**, 3229–34.

Oskay M., Tamer A.U., *Streptomyces* Kökenli Antibiyotiklerin Dünü, Bugünü ve Yarını, *e-Journal of New World Sciences Academy*, 2009, **4**, 7308–58.

Ozan V.A., Atacı N., Arısan İ., Studies on Production of Laccase Enzyme By White Rot Fungi, *Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 2014, **32**, 61-70.

Ögel Z. B., Yüzügüllü Y., Mete S., Bakir U., Kaptan Y., Sutay D., Demir A. S., Production, Properties and Application to Biocatalysis of A Novel Extracellular Alkaline Phenol Oxidase From the Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, **71**, 853–62.

Özcan O., Erdal H., Çakırca G., Yönden Z., Oksidatif Stres ve Hücre İçi Lipit, Protein ve DNA Yapıları Üzerine Etkileri, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2015, **6** (3), 331–36.

Özer B., Akardere E., Celem E.B., Önal S., Three-phase Partitioning As A Rapid and Efficient Method for Purification of Invertase From Tomato, *Biochemical Engineering Journal*, 2010, **50**, 110–15.

Paris S., Wysong D., Debeaupuis J-P., Shibuya K., Philippe B., Diamond R. D., Latge J-P., Catalases of *Aspergillus fumigatus*, *Infection and Immunity*, 2003, **71**, 3551–62.

Rajeeva S., Lele S.S., Three-Phase Partitioning for Concentration and Purification of Laccase Produced by Submerged Cultures of *Ganoderma sp. WR-1*, *Biochemical Engineering Journal*, 2011, **54**, 103–110.

Robinson T., Singh D., Nigam P., Solid-state Fermentation: A Promising Microbial Technology for Secondary Metabolite Production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, **55**, 284–9.

Roy I., Sharma A., Gupta M. N., Three-phase Partitioning for Simultaneous Renaturation and Partial Purification of *Aspergillus niger* xylanase, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2004, **1698**, 107–10.

Sangar S., Pal M., Moon L. S., Jolly R. S., A Catalase-Peroxidase for Oxidation of β -Lactams to Their (R)-Sulfoxides, *Bioresource Technology*, 2012, **115**, 102–10.

Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J., Van Dijck P., On the Safety of *Aspergillus niger* - a Review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, **59**, 426–35.

Sharma N., Tripathi A., Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Epicarp Essential Oil on Growth and Morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem, *Microbiological Research*, 2008, **163**, 337-344.

Shibuya K., Paris S., Ando T., Nakayama H., Hatori T., Latge J-P., Catalases of *Aspergillus fumigatus* and Inflammation in Aspergillosis, *Japanese Journal of Medical Mycology*, 2006, **47**, 249–55.

Shima S., Netrusov A., Sordel M., Wicke M., Hartmann G.C., Thauer R. K., Purification, Characterization and Primary Structure of A Monofunctional Catalase From *Methanosarcina barkeri*, *Archives of Microbiology*, 1999, **171**, 317–23.

Singh N., Singh J.A., Method for Large Scale Purification of Turnip Peroxidase and Its Characterization, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2003, **33**, 125–35.

Singh R., Kumar M., Mittal A., Mehta K. P., Microbial Enzymes: Industrial Progress In 21st Century, *Biotechnology*, 2016, **6**, 174.

Sooch B. S., Kauldhar B. S., Puri M., Recent Insights Into Microbial Catalases: Isolation, Production and Purification, *Biotechnology Advances*, 2014, **32**, 1429–47.

Söyler B., Characterization and Analysis of the Antioxidant Capacity of Functional Phenolics Oxidized By *Scytalidium thermophilum* Catalase Phenol Oxidase (CATPO), Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Ankara, 2012, 41100.

Speranza M.J., Bagley A.C., Lynch R.E., Cells Enriched For Catalase Are Sensitized To The Toxicities of Bleomycin, Adriamycin and Paraquod, *Journal of Biological Chemistry*, 1993, **268**, 19038-19043.

Stauffer C.E., Enzyme Assays for Food Scientists, 1989.

Sutay D., Purification, Characterization, Crystallization and Preliminary X-Ray Structure Determination of *Scytalidium thermophilum* Bifunctional Catalase and Identification of Its Catechol Oxidase Activity, Doktora Tezi, ODTÜ, Ankara, 2007.

Sutay D.S., Bakır U., Phillips E.V.S., McPherson M.J., Ogel Z.B., Purification, Characterization and Identification of a Novel Bifunctional Catalase-Phenol Oxidase From *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **79**, 407-415.

Switala J., Loewen P. C., Diversity of Properties Among Catalases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, **401**, 145–54.

Temiz A., *Aspergillus* Cinsi Küflerin Tanımlanması, Gıda Dergisi, 1989, **14**, 51–6.

Teng X.-L., Chen N., Xiao X.-G., Identification of A Catalase-Phenol Oxidase in Betalain Biosynthesis in Red Amaranth (*Amaranthus cruentus*), *Frontiers in Plant Science*, 2016, **6**, 1228.

Tian Y. S., Xu H., Peng R. H., Yao Q. H., Heterologous Expression and Initial Characterization of the Peroxisomal Catalase From the Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha* in *Pichia pastoris*, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2013, **49**, 507–13.

Valetti N. W., Picó G., A Friendly Method for *Raphanus Sativus* L (Wild Radish) Peroxidase Purification by Polyelectrolyte Precipitation, *Separation and Purification Technology*, 2013, **119**, 1–6.

Vetal M.D., Rathod V.K., Three Phase Partitioning A Novel Technique for Purification of Peroxidase From Orange Peels (*Citrus sinenses*), *Food and Bioproducts Processing*, 2015, **94**, 284-289.

Vetrano A. M., Heck D. E., Mariano T. M., Mishin V., Laskin D. L., Laskin J. D., Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase, *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**, 35372–81.

Wang H., Tokusige Y., Shinoyama H., Fujii T. And Urakami T., Purification and Characterization of a Thermostable Catalase From Culture Broth of *Thermoascus auratiacus*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, **85**, 169–73.

Witteveen C. F. B., Veenhuis M., Visser J., Localization of Glucose Oxidase and Catalase Activities in *Aspergillus niger*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**, 1190–94.

Wyss M., Pasamontes L. Roland R., Kohler J., Kuszniir E., Gadiant M., Müller F., Van Loon A. P. G. M., Comparison of the Thermostability Properties of Three Acid Phosphatases From Molds: *Aspergillus fumigatus* Phytase, *A. niger* Phytase, and *A. niger* pH 2.5 Acid Phosphatase, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**, 4446–51.

Yumoto I, Ichihashi D, Iwata H, Istokovics A, Ichise N., Purification and Characterization of a Catalase From The Facultatively Psychrophilic Bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1(T) Exhibiting High Catalase Activity, *Journal Bacteriol*, 2000, **182**(7),1903–9.

Yuzugullu Y., Trinh, C. H., Smith M. A., Pearson R., Phillips S. E. V., Sutay Kocabas D., Bakir U., Ogel Z. B., McPherson M. J., Structure, Recombinant Expression and Mutagenesis Studies of the Catalase With Oxidase Activity From *Scytalidium thermophilum*, *Acta Crystallographica D*, 2013, **69**, 398–408.

Yüzügüllü Y., Ögel Z. B., Çift Aktiviteli Katalaz- Fenol Oksidazın ve Diğer Katalazların Gıda Sanayisindeki Önemi, *Gıda*, 2013, **38**, 111–8.

Zámocký M., Furtmüller P. G, Obinger C., Evolution of Catalases From Bacteria to Human, *Antioxidants and Redox Signaling*, 2008, **10**, 1527–48.

Zámocký M., Koller F., Understanding the Structure and Function of Catalases: Clues From Molecular Evolution and in Vitro Mutagenesis, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1999, **72**, 19–66.



EKLER

EK-A

Büyüme Ortamı Hazırlanması

Besiyeri (YpSs büyüme ortamı)

4g Yeast Ekstrakt

1g K₂HPO₄

0.5g MgSO₄x7H₂O

10g Glikoz

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanır ve sterilizasyon için otoklavlanır.

Patates Dekstroz Agar (PDA) Besiyeri

Ticari olarak satın alınan PDA (Patates Dekstroz Agar) 'dan uygun oranda tartım yapılır ve distile su ile son konsantrasyon tamamlanır. Ardından otoklavlama işlemi gerçekleştirilir. Ürün üzerindeki oran 1 litreye 42 gram toz besiyeri şeklindedir.

Solüsyonların Hazırlanışı

0.1 M Sodyum Fosfat Tamponu, pH 7.0

Monobazik 6.08 g

Dibazik 22.44 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 7.0'a ayalanır.

50 mM Sodyum Fosfat Tamponu, pH 7,0

3.04 g Monobazik

10.92 g Dibazik

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 7.0 ayarlanıp 4°C'de saklanır.

SDS-PAGE Jel Elektroforezi

SDS-PAGE Elektroferez jeli için;

%15 (v/v) ayırma jeli

%30 Akrilamid – 2.5 mL

1.5 Tris-HCl [pH 8.8] – 1.25 mLddH₂O – 1.18 mL

%20 SDS – 0.025 mL

%10 APS – 0,050 mL

TEMED – 0,005 mL

%5 (v/v) yükleme jeli

%30 Akrilamid – 830 µL

1 M Tris-HCl [pH 6,8] – 630 µL

ddH₂O – 3.4 mL

%20 SDS – 0.025 mL

%10 APS – 0.050 mL

TEMED – 0.005 mL

1,5 M Tris HCl Tampon, 100 mL (pH 8.8): 18.5 g Tris Base; 0.4 g SDS 80 ml distile su içerisinde çözündürülür. 1 M HCl ile pH 8.7'ye ayarlanır. Steril filtreden geçirilir ve +4°C'de saklanır.

%10 v/v APS (Amonyumpersülfat): 10 g APS tartılır, 10 mL distile su içerisinde çözündürülür. 1 mL olacak şekilde ependorf tüplere aktarılır ve -80°C'de muhafaza edilir.

Jel Yükleme Tamponu

%20 SDS – 2 mL

1 M Tris-HCl – 1 mL

Gliserol – 1 mL

Mercaptoethanol – 1 mL

Bromophenol

Mercaptoethanol hariç tüm kimyasallar karıştırılır ve oda sıcaklığında saklanır. Jel yükleme tamponu kullanılacağı zaman 200 µL sample buffer için 50 µL mercaptoethanol olacak şekilde Mercaptoethanol bu karışıma eklenir.

10x Running Buffer

30 g Tris, 144 g Glycine, 10 g SDS son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su içerisinde çözündürülür. pH 8.3'e ayarlanıp 4°C'de saklanır. Jeli yürütme esnasında bu solüsyondan 100 mL alınır ve üzerine 900 mL distile su ilave edilerek karıştırılır. Sonrasında elektroforez tankına aktarılarak jel yürütülür.

Coomassie Blue Stain Solüsyonu (1 litre): 2,5 g Coomessie Blue, 450 mL metanol içerisinde 1 gece boyunca çözündürülür. 70 mL Asetik asit ve 480 mL distile su eklenerek 1 litreye tamamlanır. Koyu renkli şişede 4°C'de saklanır.

Destain Solüsyonu (1 litre): 250 mL Metanol, 150 mL Asetik Asit, 675 mL

dH₂O, koyu renkli şişede karıştırıldıktan sonra 4°C'ye saklanılmak üzere kaldırılır.

SDS-PAGE Jel Elektrofrez Uygulanışı:

Ayırma jeli ince bir pipet ile cam plakalar arasına pipetlenir ve bunun üzerine jelin üstünün pürüzsüz olması için hemen izopropil alkol den bir miktar dökülür. Ayırma jeli polimerize oluncaya kadar beklenir ve sonra izopropil alkol dökülür. Jel distile su ile yıkanır. Yükleme jeli ayırma jelinin üzerine dökülür ve tarak yerleştirilir. Jel polimerize oluncaya kadar beklenir. Sonrasında jel elektroforez tankına yerleştirilir. Protein örnekleri, mercaptoethanol(indirgeme ajanı) içeren jel yükleme tamponu ile 100°C su banyosunda 10 dk süreyle bekletilerek denatüre edilir. Örnekler tankın içindeki jel kuyucuklarına yüklenip, örnekler jelden ayrılncaya kadar 200 V'da yürütülür. Sonrasında jel sistem içinden alınarak, Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyası ile boyanır. 5 dk süren boyama işleminden sonra, boyayı uzaklaştırmak için Destain solüsyonu jel üzerine dökülür.

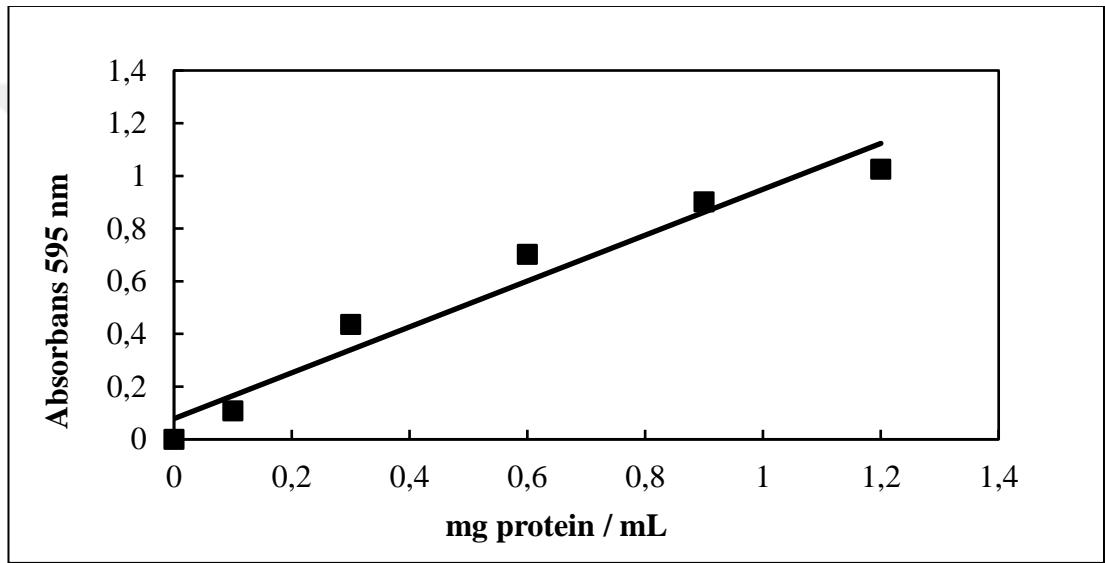
Tablo A.1. Deneylerde kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka ve model
-80°C Ultra Derin Dondurucu	Hettich HS 4486
Buzdolabı	Uğur Soğutucu
Saf Su Cihazı	MP Minipure
Hassas Terazı	Shimadzu ATX224
Vorteks	WiseMix VM-10
Otoklav	HMC Hiclave HG-80
Dikey Elektroforez	Biorad
Elektroforez Güç Kaynağı	Biorad
UV Visible Spektrofotometre	Agilent Cary-60
Santrifüj	Eppendorf 5804
Mini Santrifüj	WITEG CF-10
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	WiseStir MSH-20D
Çalkalamalı İnkübatör	N-BIOTEK NB-205
pH metre	HANNA edge
Etüv	Nüve FN500
Buz Makinası	

EK-B

Bradford Metodu ile Protein Miktarının Hesaplanması

Protein miktarının belirlenmesi için standart protein olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı. Stok BSA çözeltisi (2 mg/mL) aynı tampon ile uygun oranlarda seyreltilerek 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde standart protein çözeltiler, hazırlandı. Numarlandırılmış olan 2 mL'lik ependorflara, farklı BSA konsantrasyonlarından 100 µL ve 1.5 mL Bradford reaktifi eklendi. 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı ve ardından spektrofotometrede 595 nm'de ölçüm gerçekleştirilerek standart eğri oluşturuldu (Şekil-A1).



Şekil B.1. Protein miktar tayini, Standart BSA eğrisi

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Yüzügüllü Karkuş Y., Baykal Sarı E., ‘‘*Aspergillus niger* Katalazının Üretimi ve Saflaştırılması’’, 24. *Ulusal Biyoloji Kongresi (2018) Bildiri Kitabı, s90.*



ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Bolu'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Bolu'da tamamladı. 2012 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2016 yılında Bölüm Birincisi olarak mezun oldu. 2016 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

