

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Bacillus pumilus* Y7 TARAFINDAN ÜRETİLEN KATALAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

SEMİH İŞİK

KOCAELİ 2018

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bacillus pumilus Y7 TARAFINDAN ÜRETİLEN KATALAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

SEMİH İŞİK

Dr.Öğr.Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ
Danışman, Kocaeli Üniv.

Dr.Öğr.Üyesi Gülsüm Ebru ÖZER UYAR
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Dr.Öğr.Üyesi Özlem CESUR GÜNAY
Jüri Üyesi, Karabük Üniv.


.....

.....

.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 04.06.2018

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışma *Bacillus pumilus* Y7 katalazının üretimi, yüksek geri kazanıma sahip sulu ikili faz sistemi (ATPS) ile saflaştırılması ve karakterize edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve tecrübelerini her daim benimle paylaşan, fikirlerime sınır koymayan ve ilerisi için ufkumu açan saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ'A, laboratuvarında çalışmama olanak tanıyan Kimya bölümünden Dr. Öğr. Üyesi Yonca AVCI DUMAN'a ve Biyoloji bölümünden tüm hocalarıma, her daim destekleriyle yanımda olan laboratuvar arkadaşlarım Günce GÖÇ, Arzu SERTEL, Bedirhan ÖZTÜRK, Halil İbrahim TOYGAR, Sinem BALCI ve Buket BOZKURT'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, hayattayken bana güç veren şimdiyse ilham kaynağım olan, aklımda ve kalbimde yeri hiç eksilmeyecek rahmetli sevgili babam Abdul Kadir IŞIK'a, karşılıksız sevginin anlamı olan varlığına her daim şükrettiğim canım annem Zarif IŞIK'a, can yoldaşlarım olan ağabeylerim Burak IŞIK, Samet IŞIK ve yengem Betül IŞIK'a, İzmit'teki herşeyim dosttan öte Çiğdem KARAHASAN'a, kıymetlerini anlatmaya kelimelerin yetmeyeceği Merve DEMİREL, Büşra NUR ELCİVAN ve Burak ELCİVAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: 2017/H08) birimine şükranlarımı sunarım.

Haziran – 2018

Semih IŞIK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLOLAR DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	4
1.1. Endüstride Kullanılan Enzimler	4
1.2. Katalazlar	7
1.2.1. Monofonksiyonel katalazlar	9
1.2.2. Katalaz peroksidazlar	10
1.2.3. Mn katalazlar	11
1.3. Katalazların Canlılardaki Çeşitliliği.....	12
1.4. Katalazların Çift Aktivite Özelliği	13
1.5. Katalazların Uygulama Alanları.....	14
1.6. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakteriler.....	14
1.7. <i>Bacillus pumilus</i> Katalazı	15
1.8. Sulu İkili Faz Sistemi.....	16
1.8.1. Faz diyagramları, binodiyal eğri, tie-line hatları.....	19
1.8.2. Dağılma katsayısı (K).....	23
1.8.3. Dağılma mekanizması	24
1.8.4. Protein dağılımını etkileyen parametreler	25
1.8.5. Sulu ikili faz sisteminin uygulama alanları	29
2. MALZEME VE YÖNTEMLER	31
2.1. Malzemeler.....	31
2.1.1. Kimyasallar	31
2.1.2. Mikroorganizma	31
2.2. Yöntemler	31
2.2.1. <i>Bacillus pumilus</i> Y7'nin büyütme koşullarının belirlenmesi ve muhafazası	31
2.2.2. <i>B. pumilus</i> Y7'nin büyüme eğrisi ve enzim üretimi.....	32
2.2.3. <i>B. pumilus</i> Y7'den katalaz enziminin Sulu İkili Faz sistemi (ATPS) ile izolasyonu ve saflaştırılması.....	33
2.2.3.1. Sulu İkili Faz sisteminin hazırlanması.....	33
2.2.3.2. Sistem parametrelerinin belirlenmesi	34
2.2.4. Enzim aktivite tayini	35
2.2.5. Protein miktar tayini.....	36
2.2.6. Elektroforez ve zimografi.....	36
2.2.7. <i>B. pumilus</i> Y7'den saflaştırılan katalaz enziminin karakterizasyonu.....	38

2.2.7.1. Katalaz enzimi için optimum sıcaklık değerinin ve termal kararlılığının belirlenmesi	38
2.2.7.2. Optimum pH değerinin ve kararlılığının belirlenmesi	38
2.2.7.3. Substrat konsantrasyonunun belirlenmesi	38
2.2.7.4. Eftörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi	39
2.2.7.5. Substrat özgünlüğünün belirlenmesi	39
2.2.7.6. Organik çözücülerin etkisi	39
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	40
3.1. <i>B. pumilus</i> Y7'nin Gelişme Gösterdiği Optimum Büyütme Ortamının Belirlenmesi	40
3.2. <i>B. pumilus</i> Y7'den Katalaz Enziminin Üretimi	41
3.3. Sulu İkili Faz Sistemi ile <i>Bacillus pumilus</i> Y7'den Katalaz Enziminin Saflaştırılması	43
3.3.1. Tuz türünün belirlenmesi	43
3.3.2. Polietilen glikol (PEG) molekül ağırlığının belirlenmesi	45
3.3.3. PEG4000 konsantrasyonunun belirlenmesi	46
3.3.4. Na ₂ SO ₄ konsantrasyonunun belirlenmesi	47
3.3.5. NaCl konsantrasyonunun belirlenmesi	48
3.3.6. Sistem pH'sının belirlenmesi	49
3.3.7. Sistem hacminin belirlenmesi	50
3.3.8. SDS-PAGE ve Zimogram analizi	51
3.4. <i>B. pumilus</i> Y7 Katalazının Biyokimyasal Karakterizasyonu	52
3.4.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi	52
3.4.2. Enzim aktivitesine pH'nın etkisi	53
3.4.3. Katalazın termal kararlılığı	54
3.4.4. Katalazın pH kararlılığı	55
3.4.5. Katalaz aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi	56
3.4.6. Eftörlerin katalaz aktivitesine etkisi	58
3.4.7. Farklı substratların katalaz aktivitesine etkisi	59
3.4.8. Organik çözücülerin katalaz aktivitesine etkisi	60
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	64
EKLER	74
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	82
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. ‘Hem’ grupları	9
Şekil 1.2. <i>Bacillus pumilus</i> bakterisi	16
Şekil 1.3. PEG-Tuz Sulu ikili faz sistemi	19
Şekil 1.4. Faz diyagramı.....	20
Şekil 1.5. Binodiyal eğri metodları	21
Şekil 1.6. Tie-line hatları.....	23
Şekil 1.7. PEG-Tuz sistemlerinde biyomoleküllerin dağılımı	26
Şekil 3.1. <i>B. pumilus</i> Y7 izolatının zamana karşı katalaz aktivite grafiği	42
Şekil 3.2. <i>B. pumilus</i> Y7 izolatından hücre içi katalaz üretimi için gerçekleştirilen sonikasyon süresinin optimizasyonu.....	43
Şekil 3.3. (a) ATPS ile saflaştırılan <i>B. pumilus</i> Y7 katalazının SDS-PAGE profili (b) Saflaştırılmış enzimin katalaz aktivite zimogramı (c) Saflaştırılmış enzimin peroksidaz zimogramı.....	52
Şekil 3.4. <i>B. pumilus</i> Y7 katalazının farklı sıcaklık değerlerindeki aktivite grafiği	53
Şekil 3.5. <i>B. pumilus</i> Y7 katalaz aktivitesine pH’nın etkisi.....	54
Şekil 3.6. Katalazın termal kararlılığı	55
Şekil 3.7. Katalazın pH kararlılığı.....	56
Şekil 3.8. H ₂ O ₂ konsantrasyonunun katalaz aktivitesine etkisini gösteren Michaelis Menten grafiği	57
Şekil A.1. Protein miktar tayini, Standart BSA eğrisi.....	77

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1. <i>B. pumilus</i> Y7'nin büyüme ortamının ve inkübasyon süresinin belirlenmesi	41
Tablo 3.2. Katalaz enzim dağılımına faz içeriğinin ve tuz türünün etkisi	44
Tablo 3.3. Katalaz enzim dağılımına PEG molekül ağırlığının etkisi	46
Tablo 3.4. Katalaz enzim dağılımına PEG4000 konsantrasyonunun etkisi	47
Tablo 3.5. Katalaz enzim dağılımına Na ₂ SO ₄ konsantrasyonunun etkisi	48
Tablo 3.6. Katalaz enzim dağılımına NaCl konsantrasyonunun etkisi	49
Tablo 3.7. Katalaz enzim dağılımına sistem pH'sının etkisi	50
Tablo 3.8. Farklı ağırlıklara sahip sistemlerin katalaz enzim dağılımına etkisi	51
Tablo 3.9. Farklı efektörlerin katalaz aktivite üzerine etkisi	59
Tablo 3.10. <i>B. pumilus</i> Y7 katalazının farklı oksidaz/peroksidaz substratlarına ilgisi	60
Tablo 3.11. Farklı organik çözücülerin <i>B. pumilus</i> Y7 katalaz aktivitesi üzerine etkisi	61
Tablo A.1. Deneylerde kullanılan cihazlar	76
Tablo B.1. <i>B. pumilus</i> Y7'nin fenotipik özellikleri.....	79

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

(a/a)	: Ağırlık/Ağırlık
APS	: Amonyum Persülfat
ATPS	: Aqueous Two Phase System (Sulu İkili Faz Sistemi)
dH ₂ O	: Deiyonize Su
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide (Dimetil Sülfoksit)
(h/h)	: Hacim/Hacim
HCl	: Hidroklorik Asit
kDa	: Kilodalton
KH ₂ PO ₄	: Mono Potasyum Fosfat
K ₂ HPO ₄	: Di Potasyum Fosfat
LB	: Luria Bertani
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NB	: Nutrient Broth
Na ₂ SO ₄	: Sodyum Sülfat
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	: Sodyum Sitrat
NaH ₂ PO ₄	: Monosodyum Fosfat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum Fosfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum Sülfat
OD	: Optical Density (Optik Yoğunluk)

PEG : Polietilen Glikol
pH : Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
Rpm : Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
TEMED : Tetrametiletilendiamin
(v/v) : Volume/Volume
(w/w) : Weight/Weight



***Bacillus pumilus* Y7 TARAFINDAN ÜRETİLEN KATALAZ ENZİMİNİN 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 ilgili günümüzde yeni bulgular elde edilmektedir. Bu bulgulardan en çarpıcı olanı farklı kaynaklardan izole edilen bazı katalazların temel fonksiyonlarının yanında düşük seviyede oksidaz ve(ya) peroksidaz aktivitesi göstermelerinin keşfedilmesidir. Bu çalışmada *Bacillus pumilus* Y7 katalazının İkili Faz Ayırma Sistemi (ATPS) ile düşük maliyette ve yüksek verimde saflaştırılması amaçlanmıştır. Buna göre Luria Broth besiyerinde 37°C, 18 saat ve 200 rpm çalkalama hızında büyütülen *B. pumilus* Y7 izolatından 7990 U (12 U/g) katalaz içeren ham enzim ekstraktı elde edilmiştir. %10 (a/a) Na₂SO₄, %15 (a/a) PEG4000 ve %3 (a/a) NaCl içeren pH 7,0'da hazırlanmış sistemden katalaz enzimi %123 verim ile 4,7 kat saflaştırılmıştır. Saflığın kontrolü SDS-PAGE ile gerçekleştirilmiş olup 59 kDa molekül ağırlığına sahip tek bir bant gözlenmiştir. Ayrıca saf enzimin K_{M-app} değeri (11 mM), optimal sıcaklığı (37°C) ve optimal pH'sı (7,0) belirlenmiştir. Enzimin 30 ila 50°C 'de ve pH 7,0 ila 9,0 arasında kararlı olduğu belirlenmiştir. Aktivite boyama sonucu enzimde ikincil peroksidaz aktivitesinin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca %2,5 (h/h) konsantrasyonunda organik çözücülerden etanol, metanol, aseton ve DMSO'ya karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak *B. pumilus* Y7 izolatının literatürde adı geçen diğer hücre içi katalaz üreticilerine göre yüksek miktarda enzim ürettiği bulunmuştur. Bu enzimin ATPS ile yüksek verimde alt fazda saflaştırıldığı tespit edilmiştir. Bu sayede oldukça pahalı ve enzim kaybına neden olan kromatografik yöntemler yerine zamandan tasarruf sağlayan, maliyeti ucuz ve kullanımı oldukça kolay olan ATPS sisteminin katalaz enzim saflaştırılmasında tercih edilebileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *B. pumilus*, Katalaz, Peroksidaz, Sulu İkili Faz.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CATALASE ENZYME PRODUCED BY *Bacillus pumilus* Y7

ABSTRACT

Catalases (EC 1.11.1.6) belonging to metalloenzyme family catalyze the degradation of hydrogen peroxide to water and molecular oxygen. In this study, it has been aimed to purify catalase from *Bacillus pumilus* Y7 by aqueous two phase partitioning (ATPS) which provides low cost and high enzyme recovery. A crude enzyme extract containing 7990 U (12 U/g) catalase was obtained from the *B. pumilus* Y7 isolate grown on Luria Broth medium at 37°C for 18 hours and 200 rpm. The catalase enzyme was purified 4.7 times with 123% yield from the system prepared at pH 7.0 containing 10% (w/w) Na₂SO₄, 15% (w/w) PEG4000 and 3% (w/w) NaCl. Its purity was confirmed by SDS-PAGE where a single band of 59 kDa was observed. In addition, K_{M-app} value (11 mM), optimal temperature (37°C) and optimal pH (7.0) of the pure enzyme were determined. The presence of secondary peroxidase activity was detected after activity staining. Additionally, it has been found stable in the presence of ethanol, methanol, acetone and DMSO at a concentration of 2.5% (v/v). In conclusion, *B. pumilus* Y7 isolate has been found to produce high amounts of enzyme compared to other intracellular catalase producers reported. It has been found that the enzyme has been purified at high yield in the bottom phase by ATPS. It has been shown that the ATPS system, which is cost effective and easy to use, can be preferred for catalase enzyme purification instead of the chromatographic methods which are very expensive and cause the enzyme loss.

Keywords: *B. pumilus*, Catalase, Peroxidase, Aqueous Two Phase.

GİRİŞ

Mikrobiyal enzimler yaygın olarak gıda, tarım, kimya, ilaç ve enerji sektörleri olmak üzere birçok alanda kullanılırlar. Enzim kullanımıyla gerçekleştirilen uygulamalar günümüzde ilgi çekici olmaktadır. Azalan işlem süresi, düşük enerji girdisi, maliyet, çevreye dost ve uyumlu olma özellikleri enzimleri tercih edilebilir hale getirmiştir (Li ve diğ., 2012; Choi ve diğ., 2015).

Katalaz enzimi, üzerinde en çok çalışılan enzim gruplarından birisidir ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) moleküler oksijen ve suya dönüşümünü gerçekleştirerek, hücrelerin hidrojen peroksidin zararlı etkilerinden korumasını sağlamaktadır (Chelikani ve diğ., 2004). Katalaz enzimi, bilinen özelliğinin yanında, düşük molekül ağırlığa sahip alkoller (metanol, etanol vb.), okside edebilmekte ve bu ikincil aktiviteye, “peroksidaz aktivite” adı verilmektedir. Buna ilaveten, hidrojen peroksidin var olmadığı durumlarda sergiledikleri keşfedilen “oksidaz aktivitesi”, bu enzimle yüz yıla yakın zamandır çalışılmış olmasına rağmen literatüre bakıldığında karşımıza yeni bir bulgu olarak çıkmaktadır (Vetrano ve diğ., 2005).

Katalazlar; başlıca gıda, tekstil, farmasötik ve kağıt endüstrileri başta olmak üzere; immobilizasyon, detoksifikasyon sistemleri ve enzimatik polimerizasyon gibi çok çeşitli alanlarda da uygulama alanına sahip olmaktadır (Loncar ve Fraaije, 2015).

B. pumilus katalazı monofonksiyonel katalaz ailesine üye olmuş olsa da, son zamanlarda yapılan çalışmalar ve sonuçları, *B. pumilus* katalazının asıl özelliğine ek olarak penisilin oksidaz (Sangar ve diğ., 2012) aktivitesini de gerçekleştirdiğine işaret etmektedir.

Proteinlerin ve enzimlerin üretiminde yeni ve daha az maliyetli teknolojilere duyulan ihtiyaç günümüz gerekliliklerinden bir tanesidir. Bundan dolayı geleneksel olarak kullanılan saflaştırma metodları yerine alternatif tekniklerin geliştirilmiş olması başlı başına bir çalışma alanı olarak karşımıza çıkmaktadır (Walsh, 2000).

Sıvı-sıvı ikili faz sistemleri iki polimer veya polimer / tuz bileşenleriyle hazırlanmaktadır. Bu sistemler ilk defa 1896 yılında Beijerinck tarafından agar ve nişasta veya jelatinin karıştırılmasıyla oluşturulan ikili fazın gözlemlenmesi ile tanımlanmıştır. Bu ikili sistemler, sulu ikili faz sistemi şeklinde adlandırılmış ve ilk olarak 1956 senesinde Albertsson adlı bilim insanı bu sistemi biyomoleküllerin geri kazanımı amacıyla kullanmıştır. Albertsson bu sistem üzerindeki çalışmaları ile mikroorganizmaların, hücre duvarlarının, kloroplast ve diğer biyolojik moleküllerin fazlar arasında seçimli bir şekilde ayrıldığını ortaya koymuştur. *Chlorella* ve *Aerobacter* türlerinin hücre duvarlarının ayrıştırılmasını bu sistemler sayesinde gerçekleştirmiştir (Balasubramaniam, 2003). PEG / Dekstran sistemleri daha çok küçük ölçekteki makromoleküllerin, membranların, hücre partiküllerinin veya hücrelerin ayrıştırılması için kullanılırken PEG / Tuz sistemleri genelde çok büyük ölçekteki saflaştırma işlemlerinin gerçekleştirilmesi için kullanılırlar. PEG / Tuz sistemleri, PEG / Dekstran sistemlerine kıyasla daha düşük viskoziteye ve maliyete sahip olmaları sebebi ile daha avantajlıdır ve daha çok tercih sebebi olmaktadır. Sistemlerin her ikisi de biyoyumlu özelliktedir ve % 70–90'a varan oranlarda su içermesinden ötürü biyomoleküller için zararsız ve uygun bir çevre oluşturmaktadır. Bir diğer özelliği ise polimerlerin protein ve enzim aktivitesi üzerine olan stabilize edici özellikte etkilerinin olmasıdır. Geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında bu sistemlerin düşük maliyete sahip olan kimyasallar içermesi, düşük viskozite ve hızlı faz ayırma imkanı sağlayıcı özelliği, ara yüzey geriliminin düşük olması sebebiyle biyomoleküllerin bozunmasının en alt düzeyde olması, az enerji ihtiyaçlarının olması tercih edilme sebeplerindedir. Bunlara ek olarak bu sistemlerde sistemin hacminin kolaylıkla artırılabilir olması diğer sistemlerle kıyaslandığında sahip olduğu bir diğer avantajdır (Aguilar, 2006; Negrete ve diğ., 2007; Yue ve diğ., 2007).

Bu çalışmada, *Bacillus pumilus* Y7 katalazının üretimi, saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonunun yapılarak ikincil aktivite özelliğinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Bu amaçla öncelikle *B. pumilus* Y7 için hücre büyümesinin ve katalaz enzim üretiminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar takip edilerek katalaz enzimi sulu ikili faz sistemi (ATPS) ile farklı dağılım parametreleri altında saflaştırılmıştır.

Saflaştırılarak elde edilen *B. pumilus* Y7 katalazının moleküler ağrılığını tayin etmek için SDS-PAGE, ikincil aktivite varlığının kontrol edilmesi içinse zimografi analizi yapılmıştır. Ardından saf olarak elde edilen enzimin biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enzimin sıcaklık değeri ve termal kararlılığına, pH değeri ve kararlılığına, substrat konsantrasyonuna, farklı efektörlerin aktivite üzerine etkisine, substrat özęünlüęüne ve son olarak organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisine bakılmıştır.

Çalışma *B. pumilus* Y7 katalazının ilk defa sulu ikili faz sistemi (ATPS) ile saflaştırılması bakımından özęün değer taşımaktadır. İkincil aktivite özelliğine sahip ve yüksek geri kazanımla elde edilen bu katalazın endsütride kullanımının birçok avantaj sağlayabileceği ve diğer çalışmalara ışık tutabileceği düşünölmektedir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Endüstride Kullanılan Enzimler

Mikrobiyal enzimler yaygın olarak gıda, tarım, kimya, ilaç ve enerji sektörlerinde kullanılırlar. Enzimler aracılığıyla gerçekleştirilen uygulamalar günümüzde ilgi çekmektedir. Azalan işlem süresi, düşük enerji girdisi, maliyet, çevreye dost ve uyumlu olma özellikleri enzimleri tercih edilebilir hale getirmiştir (Liet ve diğ., 2012; Choi ve diğ., 2015). Endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal enzimler tüketici talep ve maliyetlerin artması, çevre güvenliği ve doğal kaynakların tükenmesi gibi sebeplerden ötürü önemli bir yer tutar (Choi ve diğ., 2015). Endüstriyel enzimler için küresel pazarın 2014'te 4,2 milyar dolar iken, 2015'ten 2020'ye kadar yaklaşık yüzde 7'lik bir büyüme hızı ile yaklaşık 6,2 milyar dolar seviyesine ulaşması beklenmektedir (Singh ve diğ., 2016).

Enzimler, farmasötik endüstrisinde ve biyosensör uygulamalarında oldukça önemli olup hayati rollere sahiptirler. Bunlar, enzim eksikliği ve sindirim bozuklukları ile ilişkili sağlık konularında, ELISA ve diyabet test kitleri gibi diagnostik prosedürlerde terapötik ilaçlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Mane ve Tale, 2015). Önemli bir oksidaz enzimi olan tirozinaz (EC 1.14.18.1), melanogeneziste ve L-Dihidroksi fenilalanin (L-DOPA) üretiminde rol oynamaktadır. L-DOPA, dopamin üretimi için bir öncü bir madde olup Parkinson hastalığının tedavisinde ve miyokardiyum nörojenik hasarı kontrol etmek için kullanılan güçlü bir ilaçtır (Ikramul- Haq ve diğ., 2002; Zaidi ve diğ., 2014). Gıda endüstrisinde enzimlerin uygulamaya katılmasıyla kaliteli gıdaların elde edilmesinde rastlanan tedarik sorunu çözülmeye başlanmıştır. Enzimlerin gıda endüstrisindeki rolüne dair derin anlayış, daha güvenli ve daha kaliteli ürünlerle daha iyi pazarlar sağlamak için temel süreçlerin gelişmesini sağlamıştır. Gıdaların lezzet, aroma, renk, doku, görünüm ve besleyicilik gibi özelliklerini iyileştirmede kullanılmaktadırlar (Neidleman., 1984). Gıda ve içecek alanında endüstriyel enzim pazarının 2020 yılına kadar 2,3 milyar dolarlık bir değere ulaşması beklenmektedir (Singh ve diğ., 2016).

Gıda endüstrisinde enzim uygulamaları; pişirme, süt ve meyve suyu üretimi ve demleme gibi farklı sektörlere ayrılır. Dünya çapında, mikrobiyal enzimler hamurun stabilitesini, kırılabilirliğini, yapısını ve ürünlerin raf ömrünü geliştirmek için fırıncılıkta verimli bir şekilde kullanılmaktadır. Peynir işlemede mikrobiyal enzimlerin kullanımının artması, bir sonraki en büyük uygulama endüstrisi olan süt endüstrisinde enzimlerin kullanılmasında da büyük ölçüde etkili olmaktadır (Singh ve diğ., 2016). Enzimler un artırma, hamur stabilitesi, gıdada hacim, rengi iyileştirme ve ekmek tazeliğini uzatmak için kullanılmaktadır. Bu alanda lipazlar fırınlama ürünlerinin lezzet içeriğini geliştirmede ve esterleştirme yoluyla kısa zincirli yağ asitlerini açığa çıkararak ürünlerin raf ömrünü uzatmada kullanılır (Andreu ve diğ., 1999; Dauter ve diğ., 1999; Monfort ve diğ., 1999; Collar ve diğ., 2000; Kirk ve diğ., 2002; Fernandes, 2010; Li ve diğ., 2012; Adrio ve Demain, 2014).

Gıda enzim endüstrisinin önemli bir parçası olan süt enzimleri, aroma, lezzet, renk gibi özelliklerin yanı sıra daha yüksek süt ürünü için verimin geliştirilmesi amacı ile kullanılır. Süt piyasasında proteazlar, lipazlar, esterazlar, laktaz, aminopeptidaz, lizozim, laktoperoksidaz, transglutaminaz ve katalaz gibi enzimler kullanılmaktadır. Bu enzimler süt ürünlerinin raf ömrünü ve güvenliğini arttırmak için biyo-koruyucu enzimler olarak da kullanılmaktadır. Süt enzimleri peynir, yoğurt ve diğer süt ürünlerinin üretimi için de kullanılmaktadır (Pai, 2003; Qureshi ve diğ., 2015).

İçecek endüstrisi ise iki ana gruba ayrılır. Alkolsüz grup , çay ve kahve, şurup, paketlenmiş su ve meyve sularını içerir. Alkollü grup ise distile alkollü içecekler, şarap ve bira gibi ürünleri içermektedir. Meyve suyu işleme sırasında selüloz, amilaz ve pektinazların uygulanması sıvılaştırma ve arındırma amacıyla verimi ve maliyeti azaltmak için kullanılır. Üretilen meyve sularının kalitesi ve stabilitesi, enzimlerin eklenmesiyle artırılmaktadır (Kumar, 2015; Garg ve diğ., 2016).

Dünya genelinde sürekli artan et ve süt tüketim talebini karşılamak için kullanılan yem endüstrisinde enzim uygulamaları düzenli olarak yapılmaktadır. Hayvan yemlerinde enzimlerin kullanımına 1980'lerde başlanmış ve 1990'larda en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Yem enzimleri, besin maddelerinin sindirilebilirliğini artırabildikleri için önemlidirler (Choct, 2006). Bu alanda enzimler, zararlı olan veya herhangi bir besin değeri olmayan spesifik yem bileşenlerini parçalamak için ilave

edilir. Temel olarak kümes hayvanları için kullanılan enzimler, fitazlar, proteazlar, α -galaktosidazlar, glukanaazlar, ksilanazlar, α -amilazlar ve poligalakturonazlardır (Walsh ve diğ., 1993; Chesson, 1993; Bhat, 2000; Adrio ve Demain, 2014). Yem endüstrisindeki en büyük enzim segmenti olan fitaz, tahıl bazlı yemlerde fitik aside bağlı doğal fosforun alınımını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Bhat, 2000; Lei ve Stahl, 2000; Frias ve diğ., 2003).

Sürdürülebilirlik konularının bilinirliğinin artmasıyla birlikte, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde mikrobiyal enzimlerin kullanımı, ekosistem üzerindeki olumsuz etkiyi azaltmak için sürekli olarak artmıştır. Enzimlerin kullanımı, işlem süresini, enerji tüketimini ve işlenecek kimyasal miktarını azaltır. Enzimler, ayrıca, biyolojik oksijen ihtiyacı (BOD) ve kimyasal oksijen talebi (COD) (Srivastava ve Singh, 2015) artırmak için kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde ve atık arıtımında kullanılırlar.

Tekstil endüstrisi, kumaşların çözülmesinden kaynaklanan atıkların arıtılmasından sorumludur; endüstride kullanılan ağartma kimyasalları ve boyası çevre kirliliğini artırmaktadır (Ahuja ve diğ., 2004). Bu tür endüstrilerde, elyaf işleme alanında çevre dostu teknolojilerin geliştirilmesine ve nihai ürün kalitesinin iyileştirilmesine yönelik stratejilere izin vermek için enzimler kullanılmaktadır (Choi ve diğ., 2015). Pamuk ön işleme ve terbiye işlemlerinde rol oynayan enzimlerin ana sınıfları hidrolaz ve oksidoredüktazdır. Hidrolaz grubu, kumaşın biyo-parlatılması ve biyo-boyanmasında, yünün tahriş edilmesinde, pamuk yumuşatılmasında, yün terbiyesinde, sentetik liflerin modifikasyonunda yer alan amilaz, selülaz, kütinaz, proteaz, pektinaz ve lipaz / esterazı içerir (Chen ve diğ., 2013). Diğer enzim grubu olan oksidoredüktazlar, katalaz, lakkaz, peroksidaz ve ligninaz içerir ve bunlar biyo-ağartma, ağartma sonlandırma, boya renk giderimi, kumaş ve yün terbiyesi gibi süreçlerde kullanılırlar (Mojsov, 2011). Örneğin *Aspergillus sp.* katalazı ağartmada kullanılmaktadır (Singh ve diğ., 2016).

Enzimlerin kozmetikte uygulamaları sürekli olarak artmaktadır. Enzimler, güneş koruyucu krem, diş macunu, ağız gargaraları ve saç boyamasında serbest radikal süpürücü olarak kullanılırlar (Li ve diğ., 2012). Süperoksit dismutaz ve peroksidazlar, güneş koruyucu kremlerde serbest radikal toplayıcıları olarak kullanılırlar (Babizhayev, 2006). Diş macununda ve ağız gargaralarında yaygın

olarak kullanılan enzimler, dişleri beyazlatmak, plakları çıkarmak ve diş ve diş eti dokusundaki kokuya neden olan tortuları gidermek için kullanılan endoglikozidaz ve papain'dir (Buckingham, 1985). Oksidazlar, peroksidazlar ve polifenol oksidazlar, saç bakım alanında da kullanılmaktadır (Lang ve Cotteret, 2004).

Deterjanlar bulaşık yıkama, çamaşır yıkama, evsel, endüstriyel ve kurumsal temizlik gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (Schafer ve diğ., 2002). Deterjan ürünlerindeki enzimler, protein, nişasta, yağ ve yağ bazlı lekeleri gidermek ve deterjanların etkinliğini arttırmak için kullanılır (Kirk ve diğ., 2002; Hasan ve diğ., 2010). Çamaşır deterjanlarındaki enzimler etkilidirler ve hasar görmüş pamuk liflerini parçalara ayırarak beyazlığı, rengi ve kumaş bakımını iyileştirirler. Esas olarak deterjan ürünlerinde kullanılan enzimler hidrolaz grubudur ve günümüzde bu alanda en çok kullanılan enzimler amilaz ve proteazdır.

Atık yönetimi için enzim kullanımı yaygındır. Endüstriyel atıkların yanı sıra evsel atıklar, canlı ekosistem için tehlikeli veya zehirli olan birçok kimyasal ürün içerir. Mikrobiyal enzimler, tek başına veya kombinasyon halinde, toksik kimyasal bileşiklerin zararsız ürünlere bozunmasında veya fenoller, aromatik aminler, nitriller gibi endüstriyel atıkların arıtılmasında kullanılmaktadır (Klibanov ve diğ., 1982; Raj ve diğ., 2006), Toksik organik bileşiklerin oksidatif bağlanma yoluyla detoksifikasyonuna oksidoredüktazlar aracılık etmektedir (Karigar ve Rao 2011). Bu enzimlerden lakkaz, mangan peroksidaz, lignin peroksidaz ve tirozinaz endüstriyel atıklar olan klorlu fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması görevini üstlenirler (Gianfreda ve diğ. 1999; Mai ve diğ. 2000; Have ve Teunissen, 2001; Piontek ve diğ., 2001; Le Roes-Hill ve Prins, 2016).

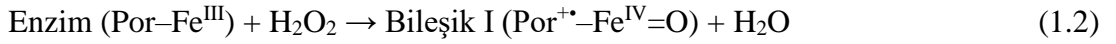
1.2. Katalazlar

Katalazlar (EC 1.11.1.6), üzerinde en çok çalışılan enzim gruplarından birisidir ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) moleküler oksijen ve suya dönüşmesini sağlayarak, hücrelerin hidrojen peroksidin zararlı etkilerinden korumasını Denklem (1.1)'deki gibi;



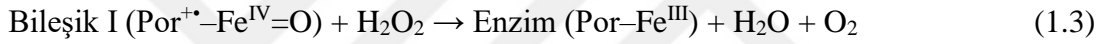
sağlamaktadır.

Katalazlar tarafından gerçekleştirilen katalitik reaksiyon iki basamaktan meydana gelir (Chelikani ve diğ., 2004). İlk basamakta bir hidrojen peroksit molekülünün ferrik enzimi (hem grubunu) oksiferril formuna (Cpd I, Bileşik I) çevirmesiyle ortaya Denklem (1.2)'deki gibi;



su (H₂O) çıkar.

İkinci basamakta ise başka bir H₂O₂ molekülünün Bileşik I'i indirgemesiyle enzim, Denklem (1.3)'deki gibi;



tekrar ilk haline dönüşür.

Alternatif olarak, düşük hidrojen peroksit koşulları altında, Bileşik I düşük molekül ağırlıklı alkolleri okside ederek Denklem (1.4)'deki gibi;



bileşik II (Cpd II)'ye dönüşebilir.

Bileşik II ise başka bir H₂O₂ ile reaksiyona girerek Denklem (1.5)'deki gibi;



enzimin inaktif formu olan Bileşik III (Cpd III) oluşumuna sebep olabilir.

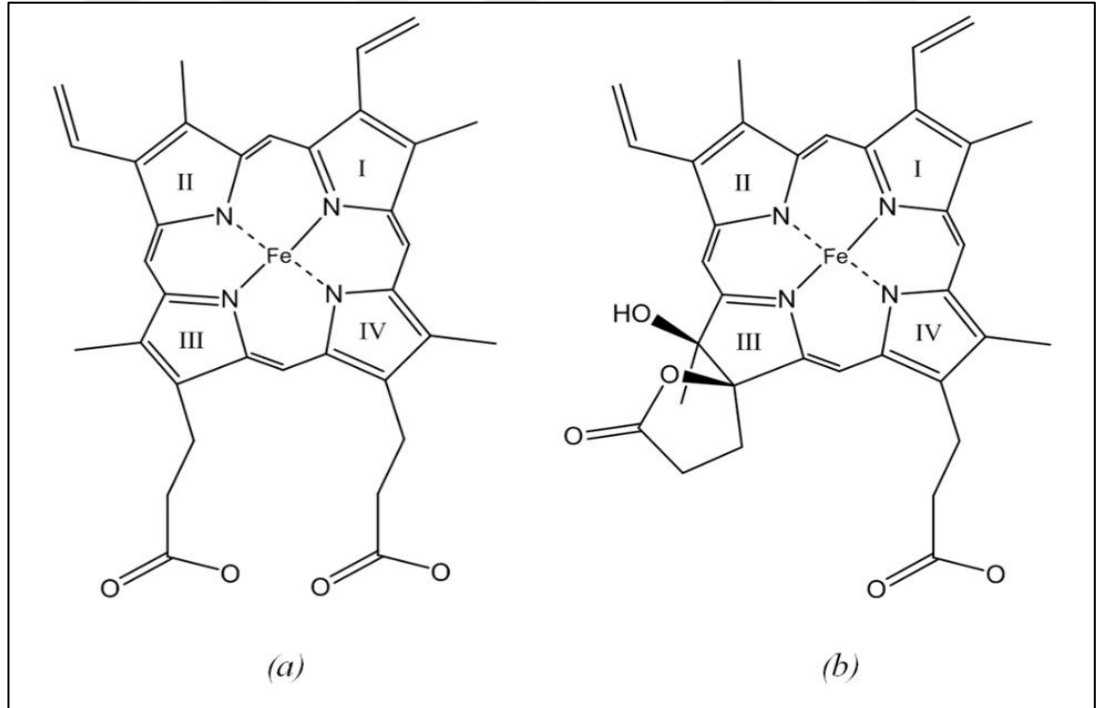
NAD(P)H (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) bağlayıcı katalazlarda kofaktörün enzimi Bileşik II veya III oluşumuna engel olarak koruduğu öne sürülmüştür (Sevinc ve diğ., 1999; Putnam ve diğ., 2000; Nicholls, 2012).

Genel olarak katalazlar; alt ünite büyüklüklerine, sekans gruplarının ve 'Hem' gruplarının çeşitliliğine göre üç gruba ayrılırlar (Loewen ve diğ., 2015):

- (a) Monofonksiyonel Demir/Hem grubu içeren katalazlar
- (b) Hem grubu içeren katalaz-peroksidazlar
- (c) Demir/Hem içermeyip Mangane içeren katalazlar

1.2.1. Monofonksiyonel katalazlar

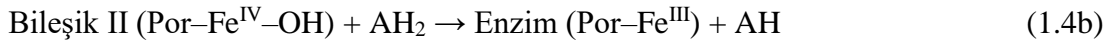
Katalazların en yaygın grubunda, aktif bölgelerinde ‘Hem’ grubu içeren monofonksiyonel katalazlar yer alır. Tetramerik bir yapıya sahip olan monofonksiyonel katalazlar, monomerleri 75-80 kDa ve 55-60 kDa büyüklüğünde olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. Bu monomerler arasındaki temel fark aktif bölgelerinde bulunan ‘Hem’ grubunun çeşidinden kaynaklıdır. Küçük alt üniteli katalazların birçoğu ‘b’ tipi ‘Hem’ grubuna sahip olup katalitik döngüde enzim biçimin korunmasını sağlamaya yarayan bir NAD(P)H bağlanma bölgesi içermektedir. Büyük alt üniteli katalazların ise ‘d’ tipi ‘Hem’ içerdikleri bilinmekle birlikte bu enzimlerde enzimi sıcaklık ve proteoliz gibi etmenlere karşı koruduğu düşünülen uzun bir C-terminal (karboksil uç) bölgesinin bulunduğu rapor edilmiştir (Chelikani ve diğ., 2004; Zamocky ve diğ., 2008).



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

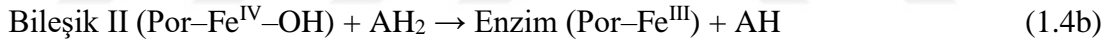
1.2.2. Katalaz peroksidazlar

Monofonksiyonel katalazlarda olduğu gibi, katalaz-peroksidazlar da aktif bölgelerinde ‘Hem’ grubu içermektedir. Molekül ağırlığı 120-340 kDa arasında değişebilen homodimer yapıya sahiptirler. Bu grupta bulunan katalazlar, katalitik aktivite özelliklerinin yanı sıra, substratı olan hidrojen peroksitin az bulunduğu ortamlarda Denklem (1.4a) ve Denklem (1.4b)’deki gibi;



peroksidatif aktivite özelliği de göstermektedir.

İki katalitik aktivitenin adını verdiği ve katG geni tarafından kodlanan katalaz-peroksidaz enziminde etkin olan aktivite, daha önce de verilen Denklem (1.1) ve Denklem (1.4b)’deki gibi;



hidrojen peroksitin moleküler oksijen ve suya dönüşümünü sağlayan katalaz aktivitesidir. Daha yavaş gerçekleşen peroksidatif tepkime ise, hidrojen peroksiti azaltmak için in vivo olarak henüz karakterize edilememiş olan birçok elektron verici kullanabilmektedir.

Katalaz aktivitesinin baskın olduğu katalaz-peroksidazlar ile monofonksiyonel katalazlar arasında yapısal ve gen dizilimi bakımından herhangi bir benzerliğin olmadığı rapor edilmiştir. Bunun yanında, katalaz-peroksidazın aktivite olarak sadece katalaz ve peroksidaz ile sınırlı olmadığı, diiyonidin izonikotinic asit anhidridin uzaklaştırılması, NADH oksidasyonu ve izonikotinic-NAD oluşumu da dahil olmak üzere farklı diğer tepkimeleri de katalizleyebildiğinden çok yönlü olduğu düşünülmektedir (Nicholls ve diğ., 2001; Fita ve diğ., 2015).

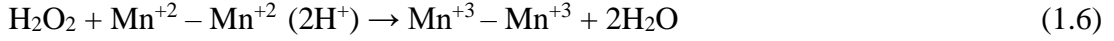
Öbakteriler, arkealar ve birçok ökaryotlarda katG geninin klonlanmış olduğu katalaz-peroksidaz enzimi bulunmaktadır. katG geninin, ‘Hem’ grubuna sahip

monofonksiyonel katalazlara göre daha sonra evrimleştiği bilinmektedir. Bu genin arkea ve ökaryotlarda da var olmuş olması yanıl (lateral) gen transferinin olduğunu göstermektedir. Hidrojen peroksit, birçok biyolojik sürecin sonunda yan ürün olarak oluşmaktadır. Örneğin nötrofiller, bakteriyal enfeksiyonlara karşı kendini koruma amacıyla 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 oluşturmaktadır. Bu sebeple, 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 ortaya çıktıkları bilinmektedir. Bundan dolayı, katG geninin kodlamış olduğu antioksidan enzimlerinden biri olan katalaz-peroksidazın asıl görevi H_2O_2 'yi çok daha zararlı bir radikale dönüşmeden metabolizmaya geri kazandırmak olmuştur. Katalaz-peroksidaz enzimi monomerlerinin her biri, ihtiva ettikleri metil ve vinil gruplarının uzaydaki konumlarıyla belirlenen ve her daim aynı oryantasyonu gösteren 'b' tipi 'Hem' grubu içermektedir (Fita ve diğ., 2015).

1.2.3. Mn katalazlar

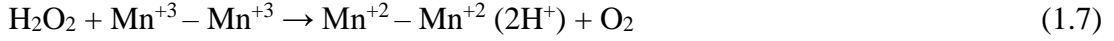
Aktif bölgesinde 'Hem' grubu yerine 'Mangan' içeren katalazlar (Mn-Katalazlar, Hem içermeyen katalazlar), katalitik olarak aktif olan enzimlerin üçüncü sınıfını oluşturmaktadırlar. İlk başlarda "Yalancı Katalazlar" olarak tanımlanan mangan katalazlar yalnızca bakterilerde bulunmaktadır. Mangan katalazı 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-peroksidazlarla karşılaştırıldığında belirgin farklılıklar görülmektedir. Mangan katalazlar, katalitik döngüsünde aktif bölge olan dimanganez çekirdeğinin hem indirgenmiş, hem de oksitlenmiş halini içermektedir. Mn^{+2} - Mn^{+2} grubu, O-O bağıını 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 tepkime süreçlerinde bir düzen bulunmamaktadır. Oksidasyondaki değişimin, oksijenlerin arasında bulunan bağın protonasyonundan ya da deprotonasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Protonasyon, Denklem (1.6)'de görüldüğü gibi indirgenmiş $\text{Mn}^{+2} - \text{Mn}^{+2}$ durumu için geçerlidir. Bu durum, iki Mn^{+2} iyonu arasında görülen net bir düşüş ile paralellik göstermektedir. Hem içeren katalazlara nazaran, mangan katalazların katalitik döngüsünde herhangi bir reaktif ara madde oluşmamakta ve açığa çıkan iki su molekülü, bir reaksiyonda meydana gelmektedir. Tipik katalaz ve katalaz-peroksidazlara göre hidrojen peroksidi dönüşüme uğratma oranının daha düşük seviyede olması, doğada neden yaygın olarak bulunmadıklarını kanıtlar niteliktedir (Zamocky ve diğ., 2008).

1.3. Katalazların Canlılardaki Çeşitliliği

Birçok aerobik organizma, tanımlanmış katalaz sınıflarından bir ya da daha fazlasına sahiptir. Ancak bu katalazların çeşidi ve sayısı katalazı içeren canlılar arasında değişiklik göstermektedir. Örneğin, *Mycobacterium* cinsi yalnızca katalaz-peroksidaz bulundururken, *Escherichia coli* hem monofonksiyonel katalaz (HPII) hem de katalaz-peroksidaz (HPI) enzimini üretmektedir. HPI ve HPII üretimi birbirinden ayrı gerçekleşir. HPI üretimi büyüme ortamına H_2O_2 ilavesi ile arttırılabilirken, HPII üretimi H_2O_2 'ye bağlı olmayıp bakteri durgun faza girdiğinde uyarılır. HPI katalazı katG, HPII ise katE geni tarafından kodlanmaktadır. Bu genlerin kontrol mekanizmaları da birbirinden farklıdır. Örneğin katG geni oksidatif strese karşı cevap niteliğinde oluşturulmakta ve OxyR regülatörü ile düzenlenmektedir. katE geninin ifadesi ise katF olarak isimlendirilen pozitif efektör ile düzenlenmektedir. Bir

başka mikroorganizma örneği olarak *Bacillus subtilis*'te üç farklı monofonksiyonel enzim üretilmektedir. Bu enzimler, katA, katX ve katE genleri tarafından kodlanmaktadır. Yine aynı şekilde ökaryotik canlılarda da hem/demir ihtiva eden katalaz enzimlerinin miktarı farklılık göstermektedir. Örneğin memelilerde bu sayı bir olurken, bitkilerde ve mantarlarda dörde kadar çıkabilmektedir (Loewen ve diğ., 2015).

1.4. Katalazların Çift Aktivite Özelliği

Katalaz enziminin öncelikli görevi, Bölüm 1.1.2'de anlatıldığı gibi canlı organizmayı hidrojen peroksidin zarar verici etkilerine karşı korumak ve hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene ayrıştırmaktır. Katalaz enzimi, bilinen özelliğinin yanında, düşük molekül ağırlığa sahip alkoller (metanol, etanol vb.), katalitik döngüde oluşan Bileşik I ara ürünüyle birlikte okside edebilmekte ve bu ikincil aktiviteye, "Peroksidatif Aktivite" adı verilmektedir. Bunun yanında, hidrojen peroksidin olmadığı durumlarda gösterdikleri keşfedilen "oksidaz aktivitesi", bu enzimle yüz yıla yakın zamandır çalışılmış olmasına rağmen literatürde karşımıza yeni bir bulgu olarak çıkmaktadır. Bu oksidaz aktivitesinin reaksiyon esnasında Bileşik II'nin oluşmasına olanak sağladığı gözlenirken porfirin halkasından alınan bir elektron ile enzimin dinlenme biçime geri dönüştüğü düşünülmektedir (Vetrano ve diğ., 2005).

Son zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda ikincil oksidaz aktivitesine sahip olduğu rapor edilen katalaz enzim üreticilerine memeli hücresi (Vetrano ve diğ., 2005), *Scytalidium thermophilum* (Sutay Kocabas ve diğ., 2008; Yuzugullu ve diğ., 2013), *Thermobifida fusca* (Loncar ve Fraaije, 2015) ve *Amaranthus cruentus* (Chen ve diğ., 2017; Teng ve diğ., 2016) örnek verilebilir. Memeli (chinese hamster) hücrelerinde var olan ve monofonksiyonel katalaz ailesine dahil edilen katalaz enziminin memeli katalazında ikincil aktivite olarak H₂O₂'nin olmadığı durumlarda yada H₂O₂ seviyesinin az olduğu durumlarda oksidaz aktivitesi sergilediği gözlemlenmiştir (Vetrano ve diğ., 2005). *S. thermophilum*'da üretilen hücre dışı katalaz enziminin ise katekol, kafeik asit, katekin ve klorojenik asit gibi *ortho* pozisyonunda iki hidroksil grubu bulunduran fenolik maddeler üzerinde oksidatif etki gösterdiği rapor edilmiştir (Koclar Avcı ve diğ., 2013). *Thermobifida fusca* katalazının ise bir peroksidaz olarak davranma kabiliyetine sahip olduğu ve bilindik

peroksidazların aksine nispeten yüksek pH'larda aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Colpa ve diğ., 2014; Loncar ve Fraaije., 2015). *A. cruentus* katalazında gözlenen fenol oksidaz aktivitesinin bitkideki betalain pigmentinin biyosentezinde rol aldığı ileri sürülmüştür (Teng ve diğ., 2016; Chen ve diğ., 2017). Mikrobiyal ve bitkisel kaynaklı katalazlarda gözlenen bu ikincil aktivite ile ilgili rapor edilen 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 biyokatalitik özellikler dikkat çekicidir. Buradan çift aktiviteye sahip katalaz enzimlerin çok daha yaygın olabileceği ve katalazın canlılarda önemli bir antioksidan olma özelliğinin yanı sıra ikincil aktivite yeteneği ile çeşitli endüstriyel uygulamalarda iyi bir biyokatalizör olarak da kullanılabileceği anlaşılmaktadır.

1.5. Katalazların Uygulama Alanları

Katalaz enzimi; başlıca gıda, tekstil, farmasötik ve kağıt endüstrileri başta olmak üzere; immobilizasyon, detoksifikasyon sistemleri ve enzimatik polimerizasyon gibi farklı alanlarda da kullanılmaktadır (Loncar ve Fraaije, 2015). Örneğin; hidrojen peroksit, sütün uzun zaman boyunca bozulmadan taze kalmasında önemli bir etkiye sahiptir. Laktoperoksidaz olarak isimlendirilen, sütte doğal olarak bulunan antibakteriyal enzimin aktivite özelliğini gösterebilmesi için hidrojen peroksit ihtiyacı vardır. Ancak işlemden önce sütün içinde bulunan fazla miktardaki hidrojen peroksitin ayrılması gerekmektedir. Yine benzer şekilde tekstil endüstrisinde ağartma işlemini takiben ortamda bulunan hidrojen peroksit çevreye de zararlı olacağından katalaz enziminin kullanımıyla uzaklaştırılabilmektedir. Katalaz enzimi, özellikle *Aspergillus niger* ve *Micrococcus lysodeikticus* organizmalarından yararlanılarak birçok firma tarafından ticari olarak elde edilmektedir (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

1.6. Bacillus Cinsi Bakteriler

Bakteriler biyoteknolojide ve endüstriyel alanlarda düşük maliyet, çabuk üreme, çoğalmalarının hızlı olması ve genetik özelliklerine iyi hakim olunması sebebiyle tercih edilmektedirler. Örnek olarak gıda endüstrisinde *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus* cinsi laktik asit bakterileri peynir, yoğurt ve kefir üretimi için

kullanılmaktayken; ilaç endüstrisi alanında polimiksin ve basitrasın antibiyotiklerinin elde edilmesi için *Bacillus* cinsi bakterilerden faydalanılmaktadır (URL-1).

Endospor oluşturma yetenekleri ve sıcaklığa karşı dayanıklı olmaları nedeniyle diğer bakterilerden ayrılan *Bacillaceae* familyası, *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterilerden oluşmaktadır. *Bacillus*, genel olarak çubuk şekilli, aerobik/fakültatif anaerobik, kendini zararlı ortam koşullarından koruyabilmek için endospor oluşturabilen ve gram pozitif (bazı türleri değişken) bakterilerden meydana gelmektedir (Ayhan, 2000). Organik asit, şeker, alkolü karbon kaynağı, amonyumu da azot kaynağı olarak kullanan *Bacillus* cinsi bakterilerin, optimum büyüme sıcaklık değerleri 25°C ila 37°C arasında farklılık göstermektedir. Bu cinsin termofilik ve psikrofilik türleri ise 75°C'den daha fazla ve 3°C'den daha az sıcaklık değerlerinde büyüebilme yeteneğine sahiptir (Sneath, 1986). Yüksek oranlarda (20-25 g/L) hücre dışı enzim üretme ve salgılayabilme yetenekleri sayesinde *Bacillus* cinsi bakteriler, endüstride fazlaca tercih sebebi olmaktadır. *Bacillus* cinsi bakterilerin biyokimyası, fizyolojisi ve genetik özelliklerinin iyi bilinmesi ve öğrenilmesi, bu canlıların endüstriyel süreçlerde tercih sebebi olmasına ve kullanım alanlarının da oldukça geniş olmasına olanak tanımaktadır (Schallmey ve diğ., 2004).

1.7. *Bacillus pumilus* Katalazı

Mezofilik bir bakteri olan *B. pumilus*; kuraklığa, basınca, besin kıtlığına, hidrojen peroksit varlığına ve kimyasal dezenfektanlar gibi etmenlere karşı oldukça dayanıklıdır (Nicholson ve diğ., 2000). Gerçekleştirilen bir çalışma sonucu *B. pumilus* bakterisinin bitki büyümesini ve gelişimini destekleyici özelliğe sahip bir rizobakter olduğu literatürde rapor edilmiştir (Gutiérrez-Mañero ve diğ., 2001). Bir başka çalışmada ise, bu mikroorganizmanın uzay araçlarının yüzeyinde en fazla bulunan ikinci *Bacillus* cinsi olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.2) (La Duc ve diğ., 2004).

B. pumilus, katalaz enzim üretiminin gerçekleşmesini sağlayan katX1 ve katX2 olarak isimlendirilen iki gen içermektedir. katX1 geninin, *B. subtilis*'in de sahip olduğu katX genine yaklaşık %83 oranında bir homoloji gösterdiği ve *B. pumilus*'un sporlarında bulunan 'Hem' grubu ihtiva eden katalazı kodladığı bilinmektedir. katX2 ise *B. subtilis*'in sahip olduğu katX gen dizisine yaklaşık %50 oranında bir homoloji sergilemekte ve *B. pumilus*'un vejetatif hücrelerinde bulunan 'Hem' grubu içeren

katalazı kodladığı bilinmektedir (Kunst ve diğ., 1997; Gioia ve diğ., 2007; Handtke ve diğ., 2017). Gerçekleştirilen çalışmalarda, katX1 geninden rekombinant olarak protein ifadesinin gerçekleştirilemediği gözlemlenmiş, bu durumun katX2 geninin *B. pumilus*'taki katalaz sentezinde baskın olma özelliği sebebiyle olabileceği rapor edilmiştir (Loewen ve diğ., 2015; Handtke ve diğ., 2017). *B. pumilus*'un ürettiği ve katX2 geni ile kodlanan katalaz enzimi ise homotetramerik yapısal özellikte olup, b tipi 'Hem' içermektedir (Loewen ve diğ., 2015). *B. pumilus* katalazı monofonksiyonel katalaz ailesine üye olmuş olsa da, son zamanlarda yapılan çalışmalar ve sonuçları, *B. pumilus* katalazının asıl özelliğinin yanında penisilin oksidaz (Sangar ve diğ., 2012) aktivitesini de gerçekleştirdiğine işaret etmektedir.



Şekil 1.2. *Bacillus pumilus* bakterisi (URL-2)

1.8. Sulu İkili Faz Sistemi

Proteinler ve enzimler için daha az maliyete ve yeniliğe sahip sistemlere duyulan ihtiyaç bugünün gerekliliklerinden biri haline gelmiştir. Bu yüzden geleneksel olan kromatografik yöntemler yerine farklı alternatif arayışları başka bir çalışma disiplini olarak ortaya çıkarmaktadır. Bununla birlikte rekombinant proteinlerin ve enzimlerin üretilmesi ilaç, biyoteknoloji, gıda ve birçok farklı uygulama alanlarında artan bir

ivme sergilemektedir (Walsh, 2000). Son altmış yılda, sıvı- sıvı ekstraksiyon yöntemleri araştırmacılar için proteinlerin geri kazanılması ve saflaştırılması amacıyla ilgi çeken sistemler haline gelmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemleri organik çözügenlerin de dahil olduğu bir süreç olmaktadır. Bunun yanında organik çözügenlerin dahil olduğu sistemlerde proteinlerin denatürasyonu ve sistemdeki organik çözügenler içerisinde çözünmemesi gibi durumlar ortaya çıkabilmektedir. Sıvı-sıvı haldeki ikili faz sistemleri iki polimerin veya polimer / tuz bileşenlerinin olduğu sistemler halinde de oluşturulabilmektedir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemleri 1896 yılında, agar-nişasta veya jelatin karışımı şeklinde mevcut hale getirilen sistemde farklı iki faz oluşununun görölmesi ile Beijerinck tarafından ortaya konmuştur. Sulu ikili faz sistemi olarak isimlendirilen bu sistem 1956 senesinde Albertsson tarafından biyolojik moleküllerin geri kazanılması maksadıyla kullanılmıştır. Bu sulu ikili faz çalışmaları sayesinde Albertsson mikroorganizmaların, hücre duvarları ve kloroplastın dahil olduğu organellerin ve başkaca biyolojik moleküllerin sistemdeki ikili fazların arasında seçimli bir dağılım gösterecek halde ayırıştığını göstermiştir. Sulu ikili faz sistemlerini kullanarak *Chlorella* ve *Aerobacter* türlerinin hücre duvarlarının ayırıştırılmasını sağlamıştır. (Balasubramaniam, 2003).

Tek adımda saflaştırma işleminin sağlanması, sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemleri ile yeni ve farklı bir saflaştırma işlemi olarak mevcut hale gelmiştir. Farklı özelliklere sahip olan hidrofobik özellikteki polimerlerin (polietilen glikol (PEG) ve dekstran) veya bir polimer ile inorganik tuzun (sülfat, fosfat, sitrat vb.) farklı iki faz oluşumu sağladığı polimer-polimer veya polimer-tuz sistemleridir. Farklı iki faz oluşumu, kullanılan bileşenlerin kritik konsantrasyonlarının üzerindeki değerlerde oluşum göstermektedir. Polimer-polimer olarak oluşturulan sistemlerde mevcut fazlar kendi içeriğini meydana getiren polimerce zengin yapıdadır. Polimer-tuz şeklinde hazırlanan sistemlerde ise fazların biri sistemi meydana getiren polimerce diğer sistemi oluşturan diğer komponent olan tuzca zengin özellikte olmaktadır (Asenjo ve Andrews, 2011).

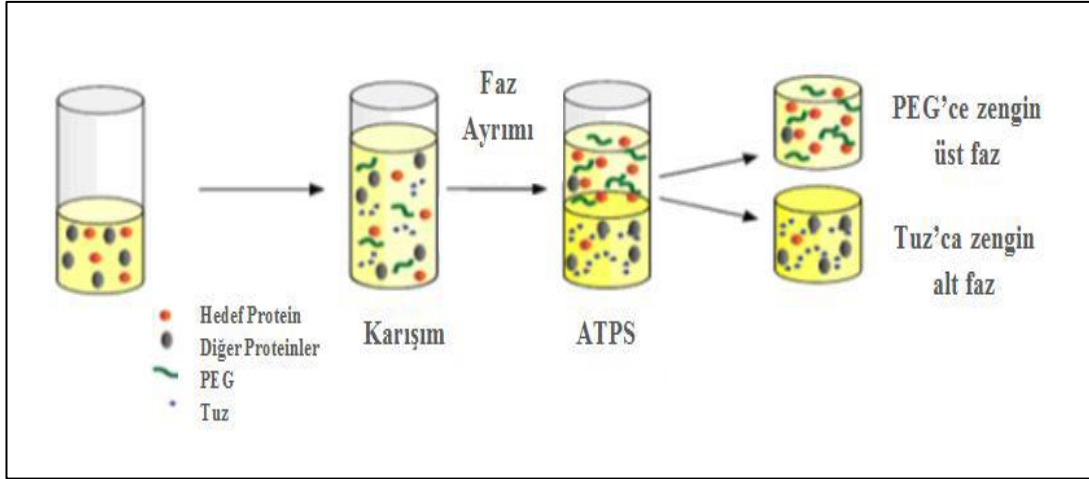
Küçük ölçekli makromolekül, hücre partikülü veya hücrelerin ayırıştırılmasında PEG / Dekstran sistemleri tercih sebebi olurken çok daha büyük saflaştırma işlemleri için PEG / Tuz sistemleri tercih edilmektedir. PEG / Tuz şeklinde oluşturulan sistemler,

PEG / Dekstran şeklinde oluşturulan sistemlere oranla daha çok tercih sebebi olmaktadır. Bunun nedeni ise daha az viskoziteye ve daha az maliyete sahip sistemler olmalarıdır. Biyouyumlu özelliğe sahip ve % 70–90’a oranlarda su ihtiva eden her iki sistem de saflaştırılmak istenen biyomoleküllere uygun bir ortam sağlamaktadır. Polimerlerin proteinler ve enzimlerin aktivitelerini koruyucu özellik sergilemesi de bir başka olumlu özellik olmaktadır. Kimyasalların ucuzluğu, viskozitenin düşük düzeyde olması, ara yüzey gerilimin ve enerji ihtiyacının azlığı ve faz ayrımının hızlı bir şekilde gerçekleşmesi geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında tercih sebebi olmalarının nedenini açıkça ortaya koymaktadır.

Kullanılan polimerlerin teknik özelliklerinin yanında kurulan sistemlerin hacim oranlarının istenildiğinde artırılabilmesi de bir diğer olumlu özelliğidir. (Aguilar, 2006; Negrete ve diğ., 2007; Yue ve diğ., 2007).

Biyomoleküller sahip oldukları yapısal özellikler ve sistemde buldukları ortam ile olan etkileşimlerine göre farklı iki faz arasında seçimli bir dağılım gösterirler. Bu iki faz arasında biyomoleküllerin dağılımının neye göre olacağı değişkenlik gösterdiğinden tam anlamıyla sistem için bir modelleme oluşturulamamıştır. Daha küçük moleküller bu sistemlerde tarafsız bir dağılım özelliği sergilemektedir. Sistem oluşumu için belirli bir teori yahut kuram bulunmadığından birçok bilim insanı biyomoleküllerin dağılım mekanizmalarının aydınlatılması için farklı modellemeler yapmış olsalar da net bir sonuca erişememişlerdir (Goja ve diğ., 2013).

Sulu ikili faz sistemleri, ilk basamağı sistemin dengeye ulaşması diğer basamağı ise fazların net bir şekilde ayrışması olan farklı iki aşamadan oluşmaktadır. Sisteme ilave edilen bileşenlerin (polimer, tuz, protein ekstraktı) birbiri içerisinde karıştırılması ve farklı iki fazın dengeye ulaşması için dağılımın oluşması ilk basamağı oluşturmaktadır. Bu basamak yavaş bir biçimde karıştırma ve kısa bir süre bekleme ile az zamanda gerçekleşebilmektedir. Santrifüj kullanılan ve iki fazın gözle görünür biçimde ayrıldığı aşama ise ikinci basamağı oluşturmaktadır (Şekil 1.3). Yapılan çalışmaya göre santrifüj süresi ve hızı değişkenlik gösterebilmektedir (Karkaş, 2009).

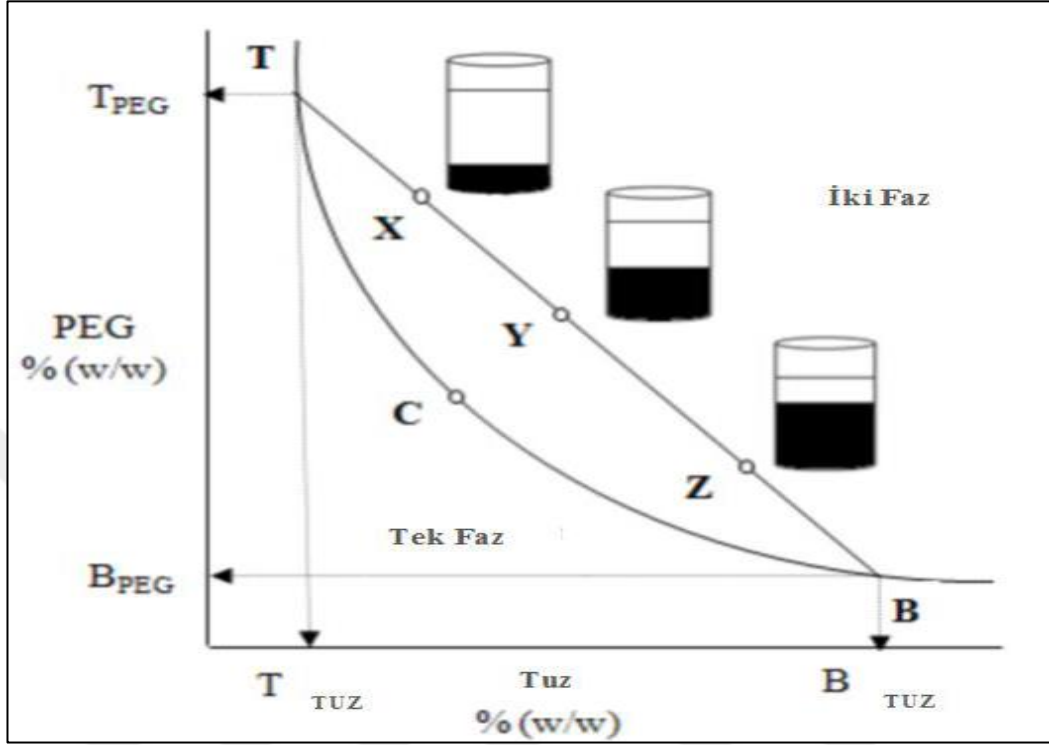


Şekil 1.3. PEG-Tuz Sulu ikili faz sistemi (ATPS) (Ratanapongleka, 2010)

1.8.1. Faz diyagramları, binodiyal eğri, tie-line hatları

Bu sistemlerde faz diyagramları çalışma alanlarını tanımlamaktadır. Sulu ikili faz sistemlerinin oluşturulması için bazı belirleyici faktörler etkili olmaktadır. Bunlar; sistemin sıcaklığı, pH'sı, kullanılan polimerin ve tuzun konsantrasyon değerleri şeklinde ifade edilebilir. Faz diyagramları tanımı, oluşturulan sistemde farklı iki fazın meydana gelebilmesi için gerek olan faz oluşturucu bileşenleri ifade etmektedir. Bunlar polimer-tuz ya da polimer-polimer konsantrasyonu ve faz hacim oranlarıdır (Şekil 1.4). Faz diyagramı, tie-line ve binodiyal eğri biçiminde ifade edilen ilişkili hatlara sahiptir. Binodiyal eğri faz diyagram bölgesini iki ayrı kısma ayırmaktadır. Şekil 1.4'de görüldüğü gibi binodiyal eğri TCB (binodial eğri) eğrisinin altında kalan kısımda ve eğrinin üzerinde olan kısımda tek bir faz oluşumu gözlenirken, eğrinin üzerinde olan kısımdaki konsantrasyonlarda ise birbirlerinden ayrı hale gelen iki farklı sıvı faz oluşumu meydana gelmektedir. Binodiyal eğri birbirinden ayrılmış olan ve karışmayan iki farklı faz arasındaki ayrımı göstermektedir. Binodiyal eğrinin üzerinde birbirleriyle bağlantılı olan iki farklı noktanın arasında çizilen ve tie-line biçiminde ifade edilen hatlar üzerinde, mevcut hale gelebilecek sulu ikili faz sistemleri yer almaktadır. Alt ve üst fazı oluşturan bileşenlerin sahip olabilecekleri en son konsantrasyon değerleri tie-line hatları şeklinde (T ve B) gösterilmektedir. Şekil 1.4'de X,Y,Z olarak adlandırılan sistemler aynı tie-line koordinatlarının üzerinde bulunmaktadır. Sahip olunan son konsantrasyon değerleri alt ve üst faz için değişiklik göstermezken her üç sistemde de başlangıç kompozisyonları ve hacim oranları değişiklik gösterebilmektedir.

Fazların hacim ve kompozisyonlarının eşit biçimde kaldığı ve kritik nokta şeklinde ifade edilen kısım ise C noktasıdır (Hatti-Kaul, 2000; Raja ve diğ.,2011).

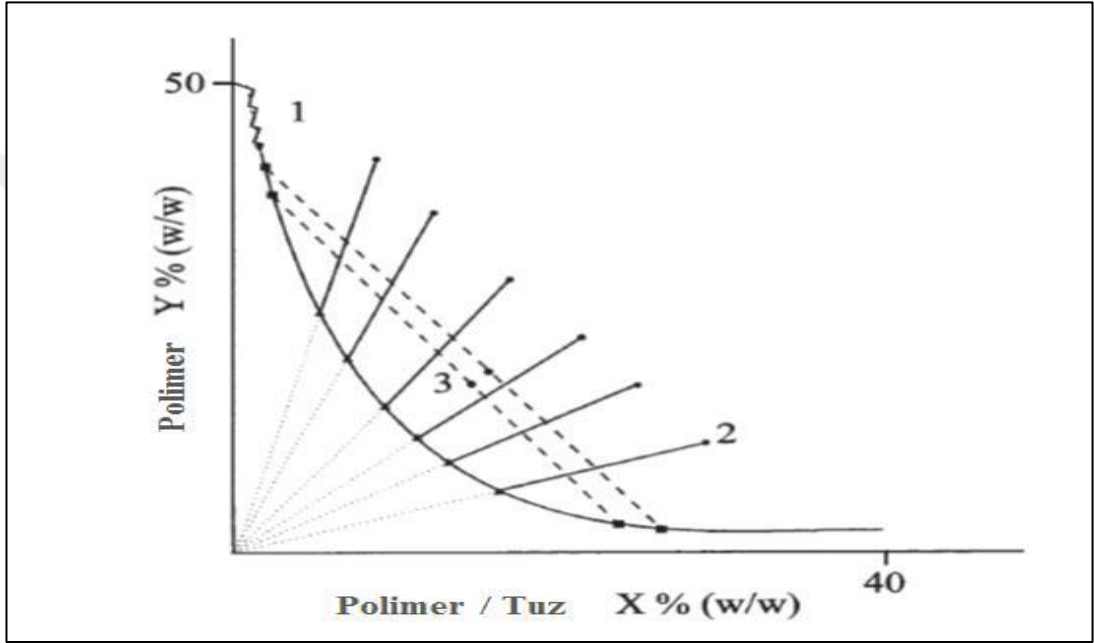


Şekil 1.4. Faz diyagramı; TCB = Binodial eğri, C = Kritik nokta, TB = Tie line, T = Üst faz kompozisyonu, B = Alt faz kompozisyonu, ve X, Y and Z = Sulu ikili faz sisteminde toplam kompozisyon (Raja ve diğ., 2011).

Üç ayrı yöntemle binodiyal eğri oluşturulabilmektedir. Bunlar, turbidometrik titrasyon metodu (1), cloud-point metodu (2) ve node determination metodu (3)' dur (Şekil 1.5).

Turbidometrik titrasyon metodu bunlar arasından en fazla tercih edilen ve çabuk olanıdır. Kütle değeri belirli olan toplam kompozisyondaki faz içeriklerinin birbirlerinin içerisinde karışması sağlanarak sistem serileri hazırlanır ve bu karışım yalnız başına ve gözle görülür açık renkli bir fazın oluşması gerçekleşinceye kadar su ya da farklı çözümler yardımı ile seyreltilir. Bulanık vaziyetten şeffaf renkli duruma geldiği andaki noktada faz bileşiminin hesaplanması işlemi gerçekleştirilir ve eğrinin üzerinde işaretlenir. Cloud-point metodun (2)' de da kural turbidometrik titrasyon metoduna benzerlik göstermektedir. Daha önceden konsantrasyon değeri bilinen polimer çözeltisi (PEG) deney tüpünün içine konulur ve bunun üzerine yine konsantrasyon değeri daha önceden bilinen farklı bir polimer çözeltisi (Dekstran)

veya tuz çözeltisi (inorganik tuzlar) az miktarda olacak şekilde eklenerek karışması sağlanır. İlk başta berrak görünüme sahip olan sistem ikinci çözeltinin eklenmesiyle ve belli bir değerin üzerine çıkılmasıyla kritik nokta oluşturduğu için sistemde bulanıklaşma meydana gelir. Farklı iki fazın oluşumuyla karışım kütlesi hesaplanarak meydana gelen ikili fazın kompozisyonu hesaplanır ve ardından eğri üzerinde işaretleme yapılır. Bu prosedür karışımın yeniden şeffaf bir hal aldığı noktaya kadar tekrar edilerek birkez daha gerçekleştirilir. (Hatti-Kaul, 2000).



Şekil 1.5. Binodial eğri metodları (Hatti-Kaul, 2000).

Tie-line hatlarındaki uzunluk birimleri bileşenlerin konsantrasyonlarındaki gibi % a/a şeklinde belirtilir. Tie-line hatlarının sahip oldukları uzunluk değeri ve faz kütleleri Denklem (1.8)'deki gibidir;

$$V_{\text{üst}} \rho_{\text{üst}} / V_{\text{alt}} \rho_{\text{alt}} = DF / ED \quad (1.8)$$

“V” ve “ρ” harfleri ile üst ve alt fazların hacim ve yoğunlukları ifade edilirken, DF ve ED şeklinde ifade edilen kısım ise tie-line hatlarının sahip olmuş oldukları uzunluk değerlerini ifade etmek amacıyla kullanılır (Şekil 1.6). Tie-line hatları genellikle paralel olmaktadır ve bu nedenle tie-line hatlarının sahip oldukları eğim değerlerini çizmede kullanılır. Faz kompozisyon analizini yapabilmek için her fazdaki polimer ve tuz konsantrasyon değerlerini belirleyebilmek maksadı ile optik rotasyon, boyut dışlamalı kromatografi yöntemi, gravimetrik analiz, refraktif indeks

ölçümü ve iletkenlik ölçümleri gerçekleştirilmektedir. Başarılı bir saflaştırma işlemi için en uygun sistem parametrelerinin belirlenmesinde faz diyagramları kullanılmaktadır. Saf elde edilmek istenen proteinin selektivite değerinin diğer proteinlerinkine kıyasla yüksek bir değerde olması hedef proteinin saflaştırılması için optimum sulu ikili faz sisteminin seçilmesinde önemli yer tutar. Selektivite (α) Denklem (1.9)'daki gibi;

$$\alpha = K_P / K_C \quad (1.9)$$

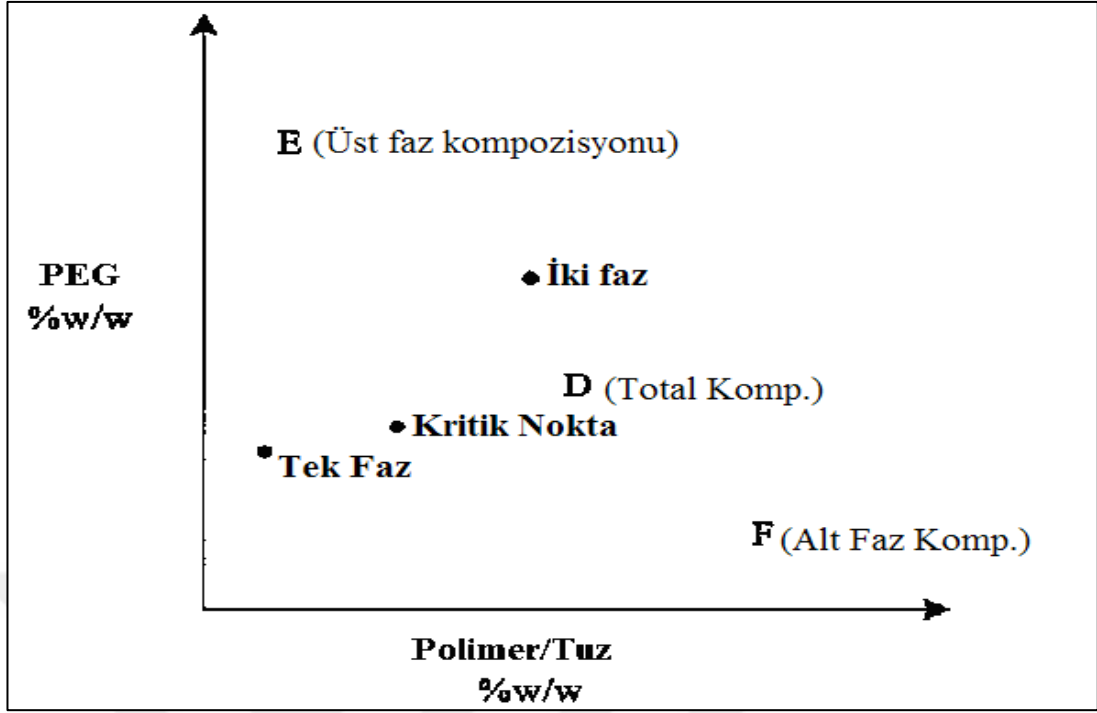
formülize edilmektedir. K_P hedeflenen proteinin dağılım katsayısını, K_C ise diğer proteinlerin dağılım katsayısını ifade etmektedir.

Seçilimliliğin sabit olması önemlidir. Bunun sebebi ise, faz oranları farklılaştırılarak hedef biyomolekülün saflaştırma faktörü için Denklem (1.10)'daki gibi;

$$\text{Faz Oranı} = \text{Üst Faz Kütlesi} / \text{Alt Faz Kütlesi} = DF / ED \quad (1.10)$$

optimum koşulun sağlanmak istenmesidir.

şeklinde formülize edilir. Yüksek saflaştırma değeri düşük değerdeki faz oranı ile mümkün olmaktadır. ED uzunluk değerinin yükselmesi ile faz oranı düşüşe geçer. Bunun yanında faz oranının azalması saflaştırılmak istenen proteinin verim değerinde düşüşe sebep olur. Bundan kaynaklı, verim değeriyle saflaştırma faktörü arasında dengeyi oluşturabilecek en optimum faz oranını belirlemek önemlidir (Hatti-Kaul, 2000; Balasubramaniam, 2003).



Şekil 1.6. Tie-line hatları

1.8.2. Dağılma katsayısı (K)

Moleküllerin fazlar içerisindeki dağılımını tanımlamaktadır (K). Üst fazdaki proteinlerin konsantrasyon değerinin ($C_{üst}$), alt fazda bulunan proteinlerin konsantrasyon değerine (C_{alt}) oranı Denklem (1.11)'deki gibi;

$$K = C_{üst} / C_{alt} \quad (1.11)$$

formulize edilmektedir

Dağılma katsayısı fazların, kullanılan materyallerin ve sıcaklık gibi özelliklerin fonksiyonu olmaktadır ve fazların hacim oranlarıyla, çözünen konsantrasyonlarından bağımsız bir şekilde meydana gelmektedir. Proteinlerin dağılma katsayısı belirli bir tie-line hattında sabit değerde olmakta ve dağılım birden fazla değişkenden etkilenebilmektedir. Dağılma katsayısının tekrarlanarak en uygun hale getirilmesi gerekmektedir. Dağılma katsayısı ve dağılma katsayısını etkileyen değişkenler, Denklem (1.12)'deki gibi;

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{elec} + \ln K_{hfob} + \ln K_{biosp} + \ln K_{büy} + \ln K_{konf} + \dots \quad (1.12)$$

logaritmik olarak ifade edilmelidir, (Hatti-Kaul, 2000).

K_{elec} : proteinin net yükü, pH, iyon dağılımıyla polimerin sahip olduğu yüklerle belirlenen elektrostatik etkileri; K_{hfob} : hidrofobisiteyi; K_{biosp} : sistem içerisindeki ligant kaynaklı afiniteye bağlı etkileşimleri; $K_{büy}$: proteinin ve polimerin büyüklüğünü; K_{konf} : konformasyonel etkileri; K^0 : hesaba katılmamış olan başka faktörler şeklinde tanımlanmaktadır.

1.8.3. Dağılıma mekanizması

Dağılıma üzerinde etkili olan mekanizma çoğunlukla bilinmemektedir. Sistemdeki fazlarda bulunan partikül etrafını çevrelemiş olan moleküller ile hidrojen bağı, hidrofobik, elektrostatik etkileşimler ve Van der Waals gibi zayıf kuvvetler oluşturmak vasıtasıyla etkileşim halinde bulunur. Bu etkileşimlerin sisteme kattığı olumlu yönleri tahmin edebilmek kolay olmasa da, olası net etkisi her bir faz için farklı olmaktadır. Dengedeki bir sistemde, partikülün bir fazdan öteki faza hareket edebilmesi amacıyla gereksindiği enerji (ΔE) ile dağılıma katsayısı arasında olan ilişki Denklem (1.13)'deki gibi;

$$C_1 / C_2 = e^{\Delta E/kT} \quad (1.13)$$

şeklinde formülize edilir. C_1 ve C_2 sırayla faz 1 ve faz 2 de mevcut olan partiküllerin konsantrasyon değerlerini, “k” Boltzman sabitini ve “T” ise mutlak sıcaklığı ifade etmektedir.

ΔE dağılan partikülün büyüklük değeri ile ilişkilidir. Büyüklüğü ne kadar fazla olursa kendisini çevrelemiş olan fazda o kadar çok atomla ilişki içerisinde olacaktır. Brønsted dağılımayla ilgili aşağıdaki eşitliği Denklem (1.14)'deki gibi;

$$C_1 / C_2 = e^{\lambda M/kT} \quad (1.14)$$

tavsiye etmektedir. M moleküler ağırlığı ve λ ise moleküler ağırlığın dışındaki özelliklere bağlı olan faktörü tanımlar. Küresel biçimli olan bir partikül için ise eşitlik içerisinde M yerine partikülün yüzeysel alanının (A) tanımı olan eşitlik Denklem, (1.15)'deki gibi;

$$C_1 / C_2 = e^{\lambda A/kT} \quad (1.15)$$

dikkate alınması koşulunu belirtmektedir. Böyle bir durumda λ yüzeysel alan dışında bulunan niceliklere bağlı olan değişkeni tanımlamaktadır. Yüzeyin özelliği ve yüzeyin sahip olduğu gerilim, birim alanda mevcut olan yüzey serbest enerjisiyle tanımlanmalıdır. Bu sebeple büyüklük ve yüzey alanının özellikleri dağılmanın belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Ayrıca partikülün sahip olduğu net yük de (Z) dağılma üzerinde etkilidir. Fazların arasında U_1-U_2 biçiminde bir elektriksel potansiyel fark var ise eşitlik içerisinde Denklem (1.16)'deki gibi;

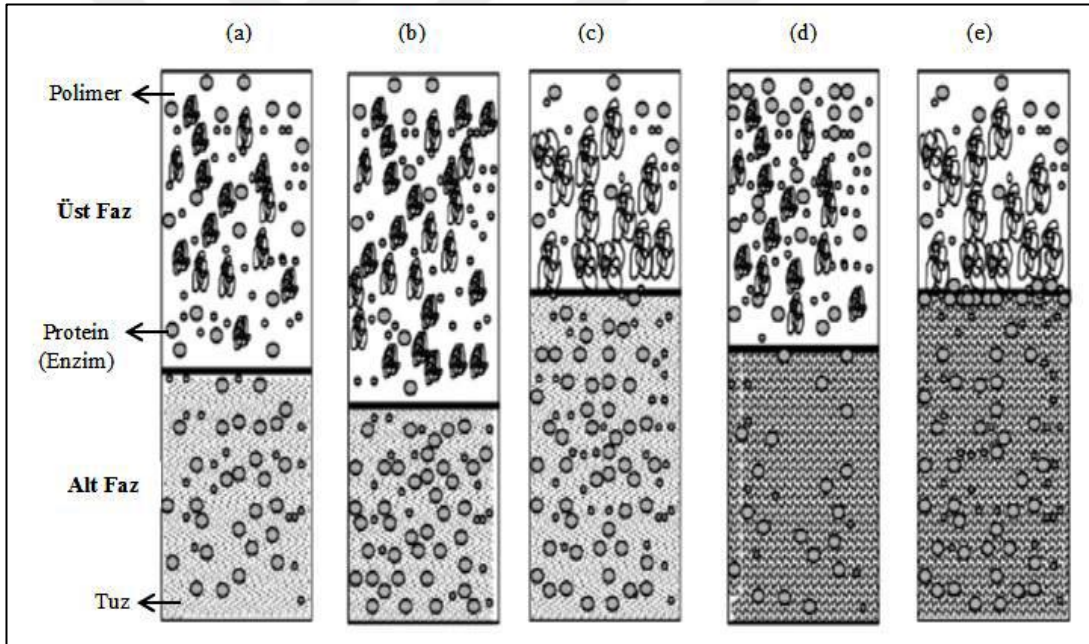
$$C_1 / C_2 = \exp ((\lambda A + Z (U_1-U_2)) / kT) \quad (1.16)$$

$Z (U_1-U_2)$ enerji teriminin yer alması gerekir. Eşitlikte λ büyüklüğü ve net yükün dışında bulunan faktörleri ifade etmektedir. Bu sebeple, dağılma üzerinde etkili olan etkenler büyüklük, hidrofobisite, yüzeyin sahip olduğu yük ve partikül veya makromolekül konformasyonu gibi etkenlere ayrılmaktadır (Albertsson, 1986).

1.8.4. Protein dağılımını etkileyen parametreler

Proteinler; hücrenin içine ya da dışına madde taşıma, sinyal iletimi ya da enzimatik rol oynama özelliklerine sahip yapısal bileşenler olan biyomoleküller olarak tanımlanabilir. Proteinlerin fizikokimyası iyi bilinmektedir. Ayrıca hücrenin diğer bileşenleri olan lipid, polisakkarit ve nükleik asit gibi yapılarla kıyaslandığından çok daha kolay izolasyonu yapılarak, karakterize edilebilmeleri mümkün olmaktadır. Moleküllerin kendilerine has özellikleri ve buldukları ortam ile olan ilişkileri farklı iki faz arasında seçilimsel olarak dağılmasına olanak tanır. Proteinlerin dağılmasını etkileyen sisteme has etkenler; komponentlerin sahip olduğu özellikler, pH, konsantrasyon, polimerin molekül ağırlığı ve oranı, kullanılan tuzun türü ve oranıdır. Proteinlerin fazlar arasında dağılımında hidrofobik ve hidrofilik karakteristiği, yükü, ve yüzeyi üzerinde mevcut olan aminoasit kalıntıları etkili olmaktadır. Proteinin sahip olduğu bu özellikleri ile kurulan bir başka sistemde ne şekilde bir dağılım göstereceği ise tam olarak bilinmemektedir (Berggren ve diğ., 2000). Sulu ikili faz sistemlerindeki biyomoleküllerin seçilimsel dağılım mekanizması Şekil 1.7'deki gibi olmaktadır. PEG ve tuz bileşenleriyle oluşturulan sistemlerde PEG üst fazı, tuz ise alt fazı meydana getiren bileşenlerdir (Şekil 1.7a). Biyomoleküller üst fazı meydana getiren polimerin "hacimsel dışlama etkisi" ve alt fazı meydana getiren tuz çözeltisinin "salting-out" etkisine bağlı olarak seçilimsel bir dağılım özelliği

göstermektedir. Üst fazda bulunan polimerin mevcut sistemdeki konsantrasyon değeri arttıkça ortamın içerisinde işgal ettiği alanda artmaktadır (Şekil 1.7b). Lakin polimerin molekül kütlesi ve polimer zincir uzunluğunda oluşan artış değeri, üst fazda biyomolekülün gereksindiği yeterli ortamın oluşmasına engel olarak biyomoleküllerin alt faza göç etmesine sebep olur. Buna "hacimsel dışlama etkisi" denmektedir (Şekil 1.7c). Biyomoleküllerin çözünürlüğünün azalmasına neden olan tuz konsantrasyon değerinin artışı sistemdeki biyomoleküllerin üstte bulunan faza doğru göç etmesine sebep olmakta ve bu olay "salting-out" olarak isimlendirilmektedir (Şekil 1.7d). Biyomoleküllerin fazların ara bölümünde birikerek dağılımının olmaması ise yüksek oranda polimer molekül kütlesi, yüksek polimer konsantrasyonu ve yüksek tuz konsantrasyonunun olduğu durumlarda meydana gelir (Şekil 1.7e) (Babu ve diğ., 2008).



Şekil 1.7. PEG-Tuz sistemlerinde biyomoleküllerin dağılımı. a) PEG ve tuz bileşenlerinden oluşan sistem. b) PEG-Tuz sisteminde polimer konsantrasyonu artışının etkisi. c) PEG-Tuz sisteminde hacimsel dışlama etkisi. d) PEG-Tuz sisteminde salting-out etkisi. e) Dağılımsız sulu ikili faz sistemi (Babu ve diğ., 2008).

Polimer-polimer, polimer-tuz sulu ikili faz sistemleri içerisinde genellikle kullanılan polimerler; PEG, dekstran, nişasta, polivinilalkol, UCON (termo ayırıcı polimer ailesi) olurken en fazla tercih edilenleri PEG ve dekstrandır. PEG ve dekstran zararlı etkilerinin olmaması sebebiyle gıda ve ilaç sektörlerindeki uygulamalarda kullanılmaktadır. Maliyeti yüksek olmasından dolayı dekstran pek fazla tercih

edilmezken daha çok PEG/Tuz şeklindeki sistemler tercih edilir (Snyder ve diğ., 1992). Polimer konsantrasyonunda meydana gelen artış protein dağılımını tek taraflı bir hale getirmekte ve bundan ötürü dağılıma katsayısının değeri 1'in üzerine çıkmaktadır. Polimer konsantrasyonunda meydana gelen artış miktarı ile refraktif indeks, yoğunluk ve fazlar arasında bulunan vizkozite artma eğilimi gösterecektir (Albertson, 1986). PEG'in molekül kütlesinin artması sahip olduğu hidrofobik karakterden ötürü sistemin hidrofobitesini de artırmaktadır (Vaidya ve diğ., 2006). Proteinlerin dağılmasına PEG'in molekül kütlesinin etkisi "Flory Huggins Teorisi" yardımıyla açıklanır. PEG ve protein arasında olan bu ilişki, PEG'in molekül kütlesinde oluşan artış miktarının belli bir noktadan itibaren proteinlerin tuzlu faza göç etmesini sağlayarak dışlama etkisini oluşturur. Bundan dolayı bu sistemle saflaştırılmak istenen proteinlerin yüksek molekül kütlesine sahip olan PEG'ler kullanılarak saflaştırılması uygun olmamakta ve tercih edilmemektedir (Klomklo ve diğ., 2005). Polimer-Tuz sulu ikili faz sistemleri genellikle sülfat tuzları (Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4), fosfat tuzları (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4), sitrat tuzları ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) kullanılarak oluşturulmaktadır. Sulu ikili faz sisteminde tuzlar, fazlar arasında bulunan hidrofobisiteyi arttırarak proteinle PEG arasında bulunan hidrofobisiteyi arttırır ve bunun neticesinde sağlıklı bir ayırışma oluşmasını sağlar (Su ve Chiang, 2006). Tuzların dağılıma etkisi ise alt ve üst fazlar arasında mevcut olan elektrik akımının farklılaşması şeklinde oluşmaktadır. Alt faz negatif yüklü, üst faz ise pozitif yüklü olduğundan negatif yüke sahip olan proteinler üst faza elektrostatik itme kuvvetinin etkisi sayesinde yol alırlar (Han ve Lee, 1997). Tuzların sahip olduğu hidrofobik karakterleri dağılım üzerinde önemli bir ayırıcı etkiye sahiptir. Protein dağılımında tuz iyonlarının etkisi çoğunlukla Hofmeister serisinde bulunan pozisyonları ile alakalı olup katyonlar için; $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Mg}^{+2}$ iken anyonlar için ise; $\text{SO}_4^{-2} > \text{HPO}_4^{-2} > \text{CH}_3\text{COO}^-$ biçiminde olmaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonları olduğunda Hofmeister serilerinin sol başında bulunan iyonların "salting-out" etkisi protein çözünürlük değerini düşürmekte ve hidrofobik etkileşim olayının artmasına sebep olarak proteinlerin PEG'ce zengin olan üst faza doğru göç etmesini sağlamaktadır (Silva ve Franco, 2000). Sulu ikili faz sisteminde protein konsantrasyon değerinin belirli doygunluk sınır değerine ulaşması ve bu sınırın üzerindeki değere çıkması proteinlerin sistem içinde çökmesine ve geri kazanım değerinin düşmesine neden olur. Bundan dolayı, protein konsantrasyonlarının

sistemde doyunluk sınırlarının altında bir değerde olması gerekmektedir. Faz ayrımlarının oluşması sistemden sisteme farklılık gösterir. Bunun sebebi farklı yoğunluğa ve viskozite özelliğine sahip olmalarından ötürüdür. En çabuk faz oluşumu PEG-Dekstran ve PEG-Tuz sistemlerinde gerçekleşir (Albertsson, 1986).

Sistemin pH'sı ikili sulu faz sisteminde önemli bir diğer parametredir. Proteinlerin dağılımları sistem pH'sına bağlı olarak değişmektedir. İkili sulu faz sistemdeki biyomoleküllerin dağılım katsayısındaki değişmeler ve pH aralık değeri iyonik kompozisyon ile etkilenebilmektedir. pH'da meydana gelen değişimlerle proteinlerin sahip oldukları net yük düşük pH değerlerinde pozitif yüklü, yüksek pH değerlerinde ise negatif yüklü olmaktadır. Bu sistemde pH, proteinlerin iyonize olabilmek özelliğine sahip gruplarını ve yüzey üzerindeki yükleri etkilemektedir. İzoelektrik noktasındaki pH değerinde net sıfır yüke sahip olan proteinler, bu durumda pH değerine bağlı olmaksızın hareket ederler. Proteinlerin üzerinde bu durumda tuz ve PEG'in hidrofobik etkileşimleri kuvvetli olmaktadır. İzoelektrik noktasının altında olan pH değerinde ise iyonik etkileşimlerin yönelimi hidrofilik özellikteki kısma olacak ve pozitif yüke sahip proteinler sistemin negatif yüke sahip olan alt fazına yöneliş göstereceklerdir. İzoelektrik noktanın üstünde olan pH değerinde ise diğerinin tam tersi olarak iyonik etkileşimlerin yönelimi hidrofobik özellikteki kısma olacak ve negatif yüke sahip proteinler sistemin pozitif yüke sahip olan üst fazına doğru yöneliş göstereceklerdir (Johansson, 1985; Vaidya ve diğ., 2006; Babu ve diğ., 2007).

Sıcaklık, faz kompozisyonuna etki ederek proteinlerin dağılımını etkiler. Sıcaklık polimerlerin ve tuzların suda çözünürlüğünü önemli oranda etkilemektedir. Sistem sıcaklığı polimer ve tuzların kritik sıcaklık değerinin üzerinde olmalıdır. Bu faz oluşumu için önemli bir etkendir. Bu sebepten sistem sıcaklık değeri olabildiğince optimum değerde sabit tutulmalıdır. Polimer ve tuz kullanılarak oluşturulan sistemler endotermik (ısı alan) kurallara göre etkileşim özelliği göstermektedirler. Bu yüzden sıcaklık değerinde meydana gelecek olan artış reaksiyonun gerçekleşme durumunu daha istekli ve kararlı hale getirmektedir (Carvalho ve diğ., 2007). Sistemi oluşturan polimerlerin varlığı proteinleri denatüre olmaya karşı koruyucu özelliğe sahip olduğundan yüksek sıcaklık değerlerinde dahi protein dağılımı mümkün olabilmektedir (Bamberger ve diğ., 1985).

Düşük molekül kütlesine sahip maddeler sulu ikili faz sistemlerinde önemli biri yere sahiptir. İyonik özellikte olmayan polimerlerin oluşturduğu sistemlerde 0,1–1 M arasında NaCl, KCl, Na₂CO₃, NaClO₄ gibi tuz ilaveleri etkili olmaktadır. Bu maddelerin ilavesi ile faz diyagramının ve kritik noktanın çok fazla etkilenmediği, tuz konsantrasyonunun 1 M'ın üstüne çıktığında faz diyagramının etkilendiği görülmüştür (Albertsson, 1986). Sisteme fazları oluşturan asıl tuza ilave olarak bu tip bir tuz eklemek hedef proteinin dağılım katsayısında değişiklik ortaya çıkarır (Yue ve diğ., 2007).

Sistemde kullanılan proteinlerin konsantrasyonları doygunluk sınırına yaklaşırsa, sistemde doygunluk durumu oluşur. Proteinlerin konsantrasyon değerinin doygunluk sınırının üzerine çıkması durumunda proteinler çökecek sebep ve sonuç olarak da geri kazanımda düşüş meydana gelecektir. Bundan dolayı, sistemde kullanılan protein konsantrasyonları doygunluk sınırından daha aşağı bir değerde olmalıdır. Genel olarak 1 gram ikili faz sistemi için 1 mg protein konsantrasyonu tercih edilir.

1.8.5. Sulu ikili faz sisteminin uygulama alanları

Biyolojik moleküllerin (proteinler, enzimler, nükleik asitler vb.) saflaştırılması için geleneksel yöntemlerin kullanıldığı durumlarda santrifüj, filtrasyon ve yoğunlaştırma gibi çeşitli süreçlerin olması, işlem esnasında miktar kaybının oluşmasına sebebiyet verir. Bunun yanında birden fazla basamak içermesinden dolayı zaman kaybına da neden olur (Balasubramaniam, 2003). Sulu ikili faz sisteminin kullanımında ise; geleneksel yöntemlerin sahip olduğu dezavantajlardan kurtulup, derişim, berraklaştırma ve saflaştırma süreçleri tek bir seferde yapılabildiği için, zaman ve maddi gider açısından kar sağlanır. Optimum faz bileşenleri belirlenerek veya daha fazla adıma sahip sulu ikili faz sistemlerinin kullanımı sağlanarak biyomoleküllerin saflaştırılma işlemi gerçekleştirilebilir.

Sulu ikili faz sistemleri ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilen bir çok enzim çalışması mevcuttur. Örneğin; *Rhodotorula glutinis* fenilamonyak liyaz (PAL, EC 4.1.3.5) enziminin geleneksel tuz çöktürme metodu ile 1,32 - 2,5 kat değerinde saflaştırılması sağlanırken, bu metod da verim %52,8 - 80,0 aralığında olabilmektedir. Aynı enzimin sulu ikili faz sisteminin kullanımı ile ilk basamakta %11 (a/a) PEG-1000 / %14 (a/a) Na₂SO₄ sonraki basamakta %11 (a/a) PEG-1000 / %14 (a/a) Na₂SO₄ /

%5,3 (a/a) Na₂CO₃ olacak şekilde hazırlanan sistem sayesinde 9,3 kat %80,6 verim ile saflaştırılmıştır (Yue ve diğ., 2007). *B. pumilus* alkali ksilanaz (EC 3.2.1.32) enzimi %22 (a/a) PEG-6000 / %10 (a/a) K₂HPO₄ / %12 (a/a) NaCl sulu ikili faz metodu sayesinde 33,1 kat ve %98 verim ile saflaştırılarak elde edilmiştir (Bim ve Franco, 2000). *Thunnus albacores* dalak proteinaz enzimi ise %15 (a/a) PEG-1000 / %20 (a/a) MgSO₄ sistemiyle 6,61 kat ve %69 (a/a) verim elde edilerek saflaştırılmıştır (Klomklao ve diğ., 2005). Tavuk yumurtasından lizozim enziminin %16 (a/a) PEG-6000 / %12 (a/a) Na₂SO₄ sulu ikili faz metodunun kullanımı ile 7,6 kat saflaştırma katsayısı ve %70 verim ile eldesi gerçekleştirilmiştir (Su ve Chiang, 2006). *Aspergillus oryzae*'den α-galaktosidaz enzimi yine %12 (a/a) PEG-4000 / %11 (a/a) fosfat sulu ikili faz sistemiyle 3,6 kat saflaştırma katsayısı ve %87,71 verim ile saflaştırılmıştır (Naganagouda ve Mulimani, 2008). *Solanum tuberosum* patates yumrusu invertazı, %12,5 (a/a) PEG-4000, %15 (a/a) Na₂SO₄ ve %3 (a/a) MnSO₄ sistemi ile 5,11 kat ve %197 geri kazanımla elde edilmiştir (Yuzugullu ve Avcı, 2015). *Phanerochaete chrysosporium* katalazı %18 (a/a) PEG-1000 ve %12 (a/a) K₂HPO₄ sulu ikili faz sistemi ile 5,72 kat %91,95 verimle elde edilmiştir (Kavakcioglu, 2012). Ticari maya invertazı da yine %15 (a/a) PEG-3000 ve %23 (a/a) MgSO₄ , %5 (a/a) MnCl₂ sulu ikili faz sistemi ile 6,2 kat ve %217,7 geri kazanımla elde edilmiştir (Karkaş, 2011). Yine marketten alınan domatesten invertaz enzimi %15 (a/a) PEG-3000, %12 (a/a) Na₂SO₄, %5 (a/a) KCl sulu ikili faz yöntemi ile 5,5 kat %90 geri kazanımla elde edilmiştir (Yücekan, 2010). *Amsonia orientalis* katalazı da %10 (a/a) PEG-4000, %15 (a/a) Na₂SO₄ sulu ikili faz sistemi ile 8,67 kat ve %156 geri kazanımla saflaştırılmıştır (Duman ve diğ., 2016).

2.MALZEME VE YÖNTEMLER

2.1. Malzemeler

2.1.1. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), Bio-Rad (Amerika), Tekkim (Türkiye) firmalarından temin edildi. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların listesi EK-A'da yer almaktadır.

2.1.2. Mikroorganizma

B. pumilus Y7 izolatu katalaz enziminin üretimi, saflaştırma ve biyokimyasal karakterizasyonunun yapılması için enzim kaynağı olarak, Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyofizik ve Genetik laboratuvarında, biyokimyasal ve moleküler analizi yapılarak *B. pumilus* olduğu %100 belirlenen suş kullanılmıştır (Sertel, 2016). Dizi analizi ve biyokimyasal test sonuçları EK-B'de verilmiştir. 16sr RNA dizi analizi NCBI'a yüklenerek genbank numarası alınmıştır.

Genbank Numarası: KX592605

Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar Ek-A'da verilmektedir.

2.2. Yöntemler

2.2.1. *Bacillus pumilus* Y7'nin büyütme koşullarının belirlenmesi ve muhafazası

Katalaz enzim üretimi için topraktan izole edilmiş *B. pumilus* Y7 suşunun aktifleştirilmesi ve stok olarak saklanması için Nutrient Agara ekim yapıldı ve 37°C'de 18 saat süreyle inkübasyona bırakılarak üretildi ve -80°C'de muhafaza edildi. *B. pumilus* Y7 izolatından en yüksek sayıda hücre elde edilmesi amacıyla 3 farklı besiyerinde 48 saat boyunca inkübasyon yapıldı. Deneysel çalışma Besiyeri 1 (Luria Bertani) (Ek-A), Besiyeri 2 (Sangar ve diğ., 2011) (Ek-A) ve Besiyeri 3 (Nutrient Broth) (Ek-A) kullanılarak gerçekleştirildi.

Öncelikle -80°C stoğundan alınarak 5 mL'lik NB (Nutrient Broth) besiyerine inokülasyonu gerçekleştirilen mikroorganizma kültürü 18 saat 200 rpm 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında oluşan kültürden alınan mikroorganizma örneği 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} sıralı dilüsyonları yapılarak seyreltildi. Ardından sıralı dilüsyonlardan 50 µL olacak şekilde kültür alınarak NA (Nutrient Agar) besiyerine yayma ekimi yapıldı. 18 saat 37°C'de inkübasyon yapılarak tek koloni elde edildi ve +4°C'de deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere stoklandı. Farklı besiyerlerinin mikroorganizmanın büyümesi üzerine etkisi gözlemlenmek ve optimum değeri elde etmek için üç farklı besiyerinde iki ayrı biçimde büyütme yapıldı.

Birinci büyütme şekli üç besiyeri içinde şu şekildedir; 12,5 mL'lik erlenmayere 2,5 mL steril besiyeri konuldu. Tek koloni eldesi yapılan mikroorganizma steril öze yardımıyla inoküle edildikten sonra 8 saat 37°C 200 rpm'de ön kültür oluşumu için inkübasyona bırakıldı. Ardından 8. saatin sonunda bu kültürden 1 mL alındı ve 250 mL'lik erlenmayerdeki 50 mL'lik steril besiyerine aktarıldı. Son olarak 37°C ve 200 rpm'de 48 saat boyunca inkübasyon yapıldı ve belirlenen saatlerde örnek alınarak spektrofotometrede OD600 absorbans değeri ölçüldü (Sangar ve diğ., 2012).

İkinci büyütme şeklinde ise; 12,5 mL falkona 2,5 mL steril besiyeri konuldu. Tek koloni eldesi yapılan mikroorganizma steril öze yardımıyla inoküle edildikten sonra 18 saat 37°C ve 200 rpm'de inkübasyona bırakıldı. 18. saatin sonunda bu kültürden 2,5 mL alındı ve 250 mL'lik erlenmayerdeki 125 mL'lik steril besiyerine transfer edildi. Daha sonrasında ise 37°C ve 200 rpm'de 48 saat boyunca inkübasyon yapıldı ve belirlenen saatlerde örnek alınarak spektrofotometrede OD600 absorbans değeri ölçüldü (Cao ve diğ., 2014).

2.2.2. *B. pumilus* Y7'nin büyüme eğrisi ve enzim üretimi

B. pumilus Y7 üretimi için 2000 mL'lik erlene 400 mL LB (Luria Bertani) besiyeri eklendi. Daha sonra ortama tek koloniden çoğaltılan ön-kültür inoküle edildi. *B. pumilus* Y7'nin büyüme eğrisini saptamak için fermentasyon ortamı 37°C'de 72 saat inkübe edildi. 2 saatlik periyotlarda örnek alınarak OD600 absorbans değeri ölçüldü. Enzim üretimi için optimum zamanı tayin etmede iki saatte bir alınan örnekler santrifüj edildi (6000 rpm, 15 dk). Santrifüj sonrası süpernatant da hücre dışı, pelette ise hücre içi katalaz aktivite tayini gerçekleştirildi. Pelet örneğinin çözündürülmesi için

50 mM sodyum fosfat tamponu (Ek-A; pH 7,0) kullanıldı. Bunun için öncelikle 1 gram pelet 3 mL tampon çözeltisi içinde homojenize edildi. Daha sonra sonikasyon cihazıyla 30 sn ses dalgasına maruz bırakma ve beraberinde 10 sn bekleme düzeni olmak üzere toplamda 5 dk boyunca ultrasonik parçalanma gerçekleştirildi. (Amplitüt değeri, %40). Sonikasyon boyunca homojenat buz içerisinde tutularak aktivite kaybı minimumda tutulmaya çalışıldı. Sonikasyon sonrasında hücre artıklarını uzaklaştırmak ve ham enzim ekstraktını elde edebilmek için 4°C’de 30 dk 10000 rpm’de santrifüj gerçekleştirildi (Sangar ve diğ., 2011). Hücre içi enzim üretiminde ayrıca optimum sonikasyon zamanını belirlemek üzere 5, 10, 15, 20 ve 30 dk’lık süreler test edildi.

2.2.3. *B. pumilus* Y7’den katalaz enziminin Sulu İkili Faz sistemi (ATPS) ile izolasyonu ve saflaştırılması

2.2.3.1. Sulu İkili Faz sisteminin hazırlanması

Stok PEG (%50, a/a), amonyum sülfat (%50, a/a), magnezyum sülfat (%50, a/a), sodyum sülfat (%30, a/a), sodyum sitrat (%30, a/a) ve sodyum klorür (%30, a/a) çözeltileri distile su ile hazırlandı. Sulu ikili faz sistemi uygun PEG ve tuz miktarları ile 0,5 mL ham ekstraktın ilave edilmesiyle 15 mL’lik santrifüj tüplerinde hazırlandı. PEG molekül ağırlıklarının (PEG 1000, 3000, 4000, 6000, 8000) ve tuzların [(NH₄)₂SO₄, MgSO₄, Na₂SO₄, Na₃C₆H₈O₇] katalaz enziminin dağılmasına olan etkisinin incelenmesi için farklı polimer-tuz sistemleri kurularak sulu ikili faz sistemleri hazırlandı. Kurulan sistemlerin faz kompozisyon içerikleri konu ile ilgili yayınlarda (Klompkloa ve diğ., 2005; Salabat ve diğ. 2006; Su ve Chiang, 2006; Yue ve diğ. 2007; Yucekan ve diğ., 2010; Karkas ve diğ., 2011; Kavakoglu ve diğ., 2012; Yuzugullu ve diğ., 2014) var olan faz diyagramları baz alınarak hazırlandı. 5 gr olan son sistem ağırlığının ayarlanması için distile su kullanıldı. Sistemin pH’sı NaOH veya HCl kullanılarak ayarlandı. Sistem 2–3 dk hafifçe vorteks ile karıştırıldı ve ardından 15 dk manyetik karıştırıcı yardımıyla homojen bir karışımın oluşması sağlandı. Faz ayrımının oluşması için oda sıcaklığında 20 dk bekletilip daha sonra 3000 rpm’de 10 dk santrifüjlendi. Pasteur pipeti yardımı ile alt ve üst faz içerikleri dikkatlice birbirinden ayrılıp fazların hacimleri not edildi. Her iki faz için de enzim aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı. Sulu ikili faz sisteminde parametrelerin

belirlenmesi için tüm denemeler oda sıcaklığında ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de) ve çift çalışma yapılarak gerçekleştirildi. Sulu ikili faz sisteminin optimizasyonu için oluşturulan koşullar Bulgular ve Tartışma bölümünde ayrıntılı bir şekilde açıklandı.

2.2.3.2. Sistem parametrelerinin belirlenmesi

Hedef biyomolekülün etkili bir ayırımının yapılabilmesi için fazlar arasındaki dağılım davranışları aşağıdaki parametrelerin değerlendirilmesi ile mümkündür:

Proteinlerin dağılım katsayısı (K_p); sırasıyla alt ve üst fazdaki protein miktarlarının oranı şeklinde tanımlanmaktadır:

$P_{\text{üst}}$; üst fazdaki protein konsantrasyonunu, P_{alt} ; alt fazdaki protein konsantrasyonunu Denklem (2.1)'deki gibi;

$$K_p = P_{\text{alt}} / P_{\text{üst}} \quad (2.1)$$

ifade etmektedir.

Katalaz enziminin dağılım katsayısı (K_c); sırasıyla alt ve üst fazdaki katalaz enziminin aktivitelerinin oranı şeklinde Denklem (2.2)'deki gibi;

$$K_a = A_{\text{alt}} / A_{\text{üst}} \quad (2.2)$$

belirtilmektedir. $A_{\text{üst}}$; üst fazdaki katalaz aktivitesini, A_{alt} ; alt fazdaki katalaz aktivitesini ifade etmektedir.

Spesifik aktivite (SA); her bir fazdaki enzimatik aktivitenin (U/mL) yine her fazdaki protein konsantrasyonuna (mg/mL) oranı olarak ifade edilir ve U/mg protein olarak Denklem (2.3)'deki gibi;

$$SA = \text{Bir fazdaki enzimatik aktivite} / \text{O fazdaki protein konsantrasyonu} \quad (2.3)$$

gösterilir.

Saflaştırma katsayısı (PF); alt fazdaki spesifik aktivitenin (SA) santrifüjatin spesifik aktivitesine oranı ile hesaplanmaktadır ve Denklem (2.4)'deki gibi;

$$PF = SA_{alt} / SA_{ham\ ekstrakt} \quad (2.4)$$

olarak belirtilmektedir.

Katalaz enziminin geri kazanımı (%R); alt fazdaki katalazın enzimatik aktivitesinin sisteme ilave edilen katalazın başlangıç aktivitesine oranıdır ve Denklem (2.5)'deki gibi;

$$(\%)R = \text{Alt fazdaki enzim aktivitesi} / \text{Sisteme ilave edilen toplam aktivite} \quad (2.5)$$

şeklinde gösterilir.

Sulu ikili faz sisteminde alt fazın verimi (%Y); aşağıdaki formül ile Denklem (2.6)'deki gibi;

$$(\%)Y = (100 \times V_{alt} \times K_e) / (V_{alt} \times K_e + V_e) \quad (2.6)$$

hesaplanır.

2.2.4. Enzim aktivite tayini

Ham enzim ekstraktı ile sulu ikili faz yöntemiyle elde edilen üst ve alt faz örneklerinin enzim aktivite tayinleri spektrofotometre cihazı (Cary 60, Agilent) ile ölçülerek yapıldı. Katalaz aktivitesi (CAT) için reaksiyon karışımı 26 mM H₂O₂, 50 mM (pH 7,0) sodyum fosfat tamponu ve toplam hacim 1 mL olacak şekilde süpernatant ve peletten elde edilen örnekler kullanılarak oluşturuldu. Öncelikle 37°C'ye ayarlanan sıcak su banyosunda, substrat solüsyonunun (tampon çözeltisinde hazırlanan H₂O₂) 1 dk inkübasyonu yapıldı. İnkübasyon sonrası solüsyon alınarak plastik UV küvete (Brand, Almanya) aktarıldı ve örneğin ilavesi yapıldı. Ardından cihazın absorbans değeri 240 nm'ye ayarlandı ve ölçüm yapıldı. Enzim aktivitesi başlangıç reaksiyon hızı ve hidrojen peroksitin yok olma katsayı değeri (39,4 M⁻¹ cm⁻¹) kullanılarak belirlendi (Merle ve diğ., 2007). Bir enzim ünitesi, dakikada 1 µmol H₂O₂'in ayrışmasını katalize eden enzim miktarı olarak tanımlanarak Denklem (2.7)'deki gibi;

$$\text{CAT aktivitesi } (\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ dak}^{-1}) = \frac{(\Delta OD_{240} / \Delta t \times (1/\epsilon) \times \text{Reaksiyon hacmi (mL)} \times (10^3))}{\text{Enzim hacmi (mL)}} \times \text{Seyreltme faktörü} \quad (2.7)$$

hesaplandı.

Peroksidaz aktivitesi (POD), 2,4 mL 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,0) içeren bir reaksiyon karışımında pirogallol oksidasyon yöntemi kullanılarak belirlendi. 300 µL %5,3 (a/h) pirogallol, 100 µL uygun şekilde seyreltilmiş enzim 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 tanımlanmaktadır (Valetti ve Pico, 2013) Bir birim aktivite 20 s başına 1 mg purpurogallin oluşumuna karşılık gelmektedir.

Fenol oksidaz (PO) aktivitesi, 100 mM katekol, 50 mM (pH 7,0) sodyum fosfat ve toplam hacmi 1 mL olacak şekilde enzim seyreltilerek ölçüldü. Sıcak su banyosu 60°C'ye ayarlanarak, 2 mL 50 mM (pH 7,0) sodyum fosfat tamponu 2 dk inkübe edildi. İnkübasyonu yapılan solüsyona katekol (100 mM) eklenerek substrat çözüldü. Katekol oksidasyon ürününün enzim eklendikten sonraki 420 nm'de soğurma (absorbans) değişimi ölçüldü. Enzim aktivitesi başlangıç reaksiyon hızı ve katekolün oksidasyon katsayısı olan 3450 M⁻¹ cm⁻¹ değerinin kullanılmasıyla hesaplandı (Ögel ve diğ., 2006). 1 ünite aktivite, 1 nanomol katekolü 1 dakikada okside edebilen enzime karşılık gelmektedir.

2.2.5. Protein miktar tayini

Ham enzim ekstraktının ve saflaştırılmış örneklerin protein miktar tayinleri Bradford metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntemde, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının vermiş olduğu absorbans değerine (595 nm) bakılmaktadır. Standart protein olarak BSA (Sığır Serum Albumin) kullanılır. 1500 µL Bradford boyasına 100 µL BSA solüsyonu eklenerek (0,1 mg/mL – 1,5 mg/mL) sıralı dilüsyonlar yapıldı. 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılarak 595 nm'de absorbansı ölçüldü. Ardından absorbans değerleri ile standart protein grafiği oluşturuldu ve protein örneklerinin miktar tayinleri bu grafik üzerinden hesaplanarak elde edildi. (EK A).

2.2.6. Elektroforez ve zimografi

ATPS sonrası elde edilen enzim preparatının saflığının kontrolü Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS–PAGE) yöntemi ile yapıldı. SDS–PAGE

Elektroforez jeli için; %5 (h/h) yükleme jeli (125 mM Tris-HCl [pH 6,8], %0,1 a/h SDS, %5 h/h Akrilamid ve TEMED) ve %15 (h/h) ayırma jeli (375 mM Tris-HCl [pH 8,8], %0,1 a/h SDS, %15 h/h Akrilamid ve TEMED) hazırlandı (Laemmli, 1970). Protein örnekleri, β -merkaptoetanol (indirgeme ajanı) ile 100°C su banyosunda 10 dk süreyle bekletilip denatüre edildi. Proteinlerin molekül ağırlıklarını belirlemek için BioRad Low Range, 14,4 – 97,4 kDa (161-0304) markörü kullanıldı. Örnekler Bio-Rad Mini Protean (Amerika) sistemine yüklenip, 200 V'da örnekler jelden ayrılıncaya kadar yürütüldü. Ardından jel sistem içinden alınarak, Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyası ile boyandı. Örnekler yeterince boyandıktan sonra, boyayı uzaklaştırmak için Destain solüsyonu (Ek-A) kullanıldı.

Katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin jel üzerinde denatüre olmayan koşullarda görüntülenmesi için NATIVE-PAGE jel elektroforezi gerçekleştirildi. Bunun için %5 (h/h) yükleme jeli (125 mM Tris-HCl [pH 6,8], %5 h/h Akrilamid ve TEMED) ve %15 (h/h) ayırma jeli (375 mM Tris-HCl [pH 8,8], %15 h/h Akrilamid ve TEMED) hazırlandı. (Laemmli, 1970). SDS PAGE elektroforezinden farklı olarak burada kullanılan Tris-HCl çözeltilerinin içerisinde SDS bulunmamaktadır. Protein örnekleri 4°C'de herhangi bir denatürasyona uğratılmadan direkt olarak jele yüklendi ve jelden ayrılıncaya kadar 20 mA'de yürütüldü. Katalaz aktivitesini gözlemlemek için jel 5 dk boyunca %0,6 (h/h) H₂O₂ çözeltisi içinde inkübe edildi. Çözelti dökülerek jel, 1:1 oranında %2 (a/h) potasyum ferrisiyanit ve %2 (a/h) demir klorür karışımıyla muamele edildi (Sangar ve diğ., 2012). Jel üzerinde bantların görünmesinin ardından solüsyon döküldü. Peroksidaz aktivitesinin gözlemlenmesi içinse 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0), %0,53 (a/h) pirogallol ve %0,04 (a/a) H₂O₂ çözeltisi karıştırılarak jel üzerine döküldü (Yuzugullu Karakus ve diğ., 2017). Jel üzerinde peroksidaz aktivitesinin gerçekleşmesi ile bantların oluşmasının ardından solüsyon dökülerek işlem tamamlandı.

2.2.7. *B. pumilus* Y-7'den saflaştırılan katalaz enziminin karakterizasyonu

2.2.7.1. Katalaz enzimi için optimum sıcaklık değerinin ve termal kararlılığının belirlenmesi

Sıcaklığın enzim üzerine etkisini incelemeye 30°C – 60°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, aynı miktarda protein ihtiva eden enzim örnekleri 15 ve 30 dk boyunca farklı sıcaklıklarda (30, 37, 45, 50, 55 ve 60°C) inkübe edilip ardından standart aktivite ölçüm değerinde (37°C'de) aktivite tayinleri yapıldı.

2.2.7.2. Optimum pH değerinin ve kararlılığının belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini tayin etmede reaksiyon ortamının pH'sı 4,0 ila 11,0 arasındaki değerlerde denenerek aktivite ölçümleri yapıldı. Farklı pH değerleri için farklı pH derecelerinde tampon çözeltileri olan 0,2 M asetat tamponu (pH 4,0 – 5,5), 0,2 M sodyum fosfat tamponu (pH 6,0 – 8,0) ve 0,1 M sodyum karbonat – sodyum bikarbonat tamponu (pH 8,0 – 11,0) seçildi (Hazırlanan tampon çözeltiler Ek-A'da verilmiştir). Enzim aktivitesi (% Bağıl Aktivite) ve pH arasında oluşturulan grafik ile enzimin sahip olduğu optimum pH değeri belirlendi.

Ortam pH'sının enzimin kararlılığına olan etkisini incelemek amacıyla enzim, 0,2 M asetat, 0,2 M sodyum fosfat ve 0,1 M sodyum karbonat-bikarbonat tamponlarında farklı pH değerlerinde (pH 4,0 – 11,0) 1 saat boyunca inkübe edildi. Ardından standart koşullarda (pH 7,0) aktiviteleri ölçüldü.

2.2.7.3. Substrat konsantrasyonunun belirlenmesi

K_M ile V_{Max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla, 0,2 M sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0, 37°C) 0,1 mM – 60 mM H_2O_2 substrat konsantrasyonları denenerek enzim aktivite ölçümleri yapıldı. $1/S$ ile $1/V$ arasında çizilen Lineweaver-Burk diyagramından K_M ve V_{Max} değerleri hesaplandı.

2.2.7.4. Efektörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim aktivitesi sadece fiziksel etkenlerden değil kimyasal etkenlerden de etkilenebilmektedir. Bu etmenlerin etkileri aktivite üzerinde artırıcı (aktivasyon) ya da düşürücü (inhibisyon) etkiye sahip olabilir. Efektör olarak AgNO₃, NiSO₄, MnCl₂, Na₂CO₃, NaCl, KCl, MgSO₄'un farklı konsantrasyonları (0,1, 1,0 ve 2,5 mM) reaksiyon ortamına eklenip standart aktivite koşullarında enzim aktivite tayinleri yapıldı.

Farklı konsantrasyon değerlerindeki efektörler 0,2 M sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) çözülerek örnek tüplerine konuldu. Ardından sırayla 26 mM H₂O₂ substratı ve 0,1 mL enzim eklenip 37°C'de katalaz aktivite tayini yapıldı.

2.2.7.5. Substrat özgünlüğünün belirlenmesi

B. pumilus Y7 izolatından üretilen ve saflaştırılan katalaz enziminin ikincil aktiviteye sahip olup olmadığının testi için çeşitli peroksidaz (pirogallol ve guakol) ve oksidaz (katekol ve hidrokinon) substratları kullanılarak peroksidaz ve fenol oksidaz aktivite ölçümleri yapıldı. Bağlı aktivite değerleri hesaplandı.

2.2.7.6. Organik çözücülerin etkisi

Fiziksel etmenlerden biri olan organik çözücülerin aktivite üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla etanol, metanol, aseton, kloroform ve dimetil sülfoksid (DMSO) kullanılarak deneysel çalışma yapıldı. Etanol, methanol, DMSO ve aseton için %2,5-12,5 (h/h) konsantrasyonları denendi. Belirtilen konsantrasyonlardaki organik çözücüler reaksiyon ortamına eklenerek standart aktivite ölçümü gerçekleştirildi ve bağlı aktivite değerleri hesaplandı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. *Bacillus pumilus* Y7'nin Gelişme Gösterdiği Optimum Büyütme Ortamının Belirlenmesi

Katalaz üretiminde kullanılacak *B. pumilus* Y7 izolatı için öncelikle büyüme koşullarının optimize edilmesi üzerine denemeler gerçekleştirildi. Buna göre literatürden elde edilen bilgiler ışığında izolatın üç farklı besiyerinde iki farklı şekilde büyütmesi yapıldı (Bölüm 2.2.1'e bakınız). Hücre büyümesinin kantitatif ölçütü olarak 600 nm'de ölçülen *B. pumilus*'un absorbans değerleri karşılaştırıldığında test edilen besiyerlerinden LB'de 18 saat inkübe edildiğinde en yüksek hücre sayısına erişildiği gözlemlendi. Enzim kaynağı olarak *B. pumilus* Y7'nin hücre miktarının fazla olması elde edilecek olan enzim miktarının da yüksek olması anlamına geldiğinden bu önemli bir parametre olarak değerlendirilebilir. Hücrelerin her iki büyütme şekline göre düzenlenmiş üç farklı besiyerindeki inkübasyon zamanları ve 600 nm'de ölçülen absorbans değerleri Tablo 3.1'de verilmektedir. Birinci büyütme şeklinde besiyerlerinde ölçülen absorbans değerlerine bakıldığında, ikinci büyütme şekline göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun sebebi iki yöntem arasındaki ön kültür sürelerinin farklı olmasıdır. Birinci büyütme şeklinde 8 saat olan ön kültür süresi içinde hücreler hazırlık evresini tamamladıklarından bu hücreler ana kültüre alındığında "lag" fazı kısa sürmekte, "log" fazında kalma süreleri ise daha uzun olmaktadır. Oysaki ikinci büyütme şeklinde ön kültür inkübasyon süresinin 18 saat olmasından dolayı hücreler "log" fazı geçirmiş olduklarından bu hücreler ana kültüre alındığında bu fazda kalma süreleri kısalmakta ve durağan faza geçişleri başlamaktadır (Klug ve diğ., 2010). İnkübasyon zamanının hücre miktarındaki değişime olan etkisine bakıldığında ise 18. saatin her iki büyütme şeklinde ve tüm besiyeri tiplerinde optimum süre olduğu ve bu süreden sonra hücre miktarında düşüş meydana geldiği görülmektedir.

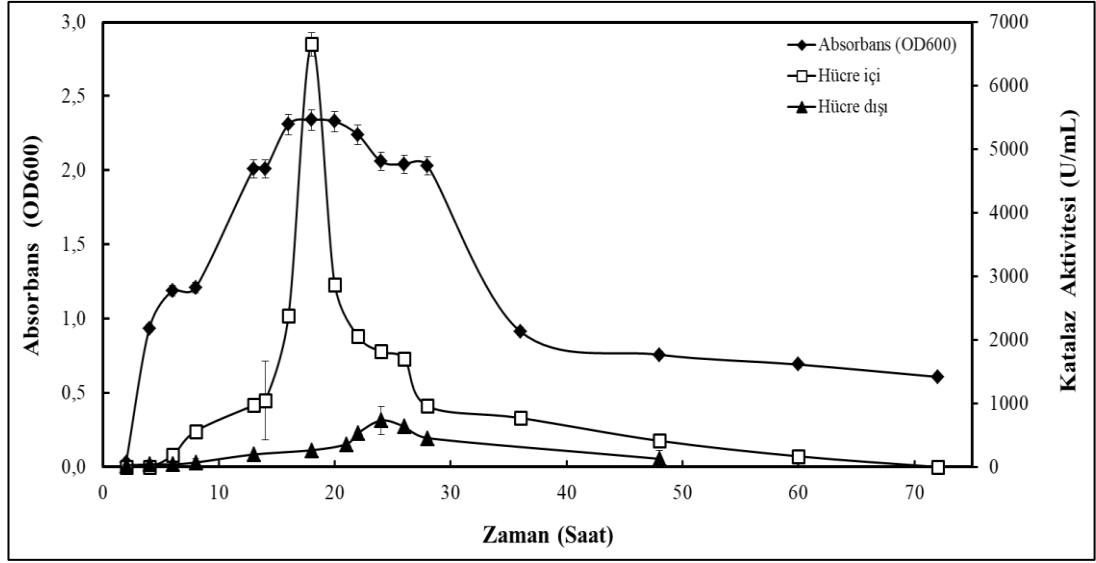
Tablo 3.1. *B. pumilus* Y7'nin büyüme ortamının ve inkübasyon süresinin belirlenmesi

Besiyeri	Büyütme yöntemi	18 saat		24 saat		48 saat	
		OD600	S.SH	OD600	S.SH	OD600	S.SH
1	1	2,32	0,02	2,21	0,03	0,78	0,04
	2	1,98	0,25	1,88	0,19	1,37	0,01
2	1	2,10	0,00	1,76	0,06	0,83	0,03
	2	1,85	0,10	1,76	0,04	0,59	0,07
3	1	2,10	0,00	2,06	0,01	0,97	0,02
	2	1,90	0,22	1,73	0,12	1,15	0,15

S.SH. (Standart sapma hata); Besiyeri 1, LB (Luria Bertani); Besiyeri 2, Referans besiyeri (Sangar ve diğ., 2012); Besiyeri 3, NB (Nutrient Broth); Büyütme yöntemi 1&2, Bölüm 2.2.1'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

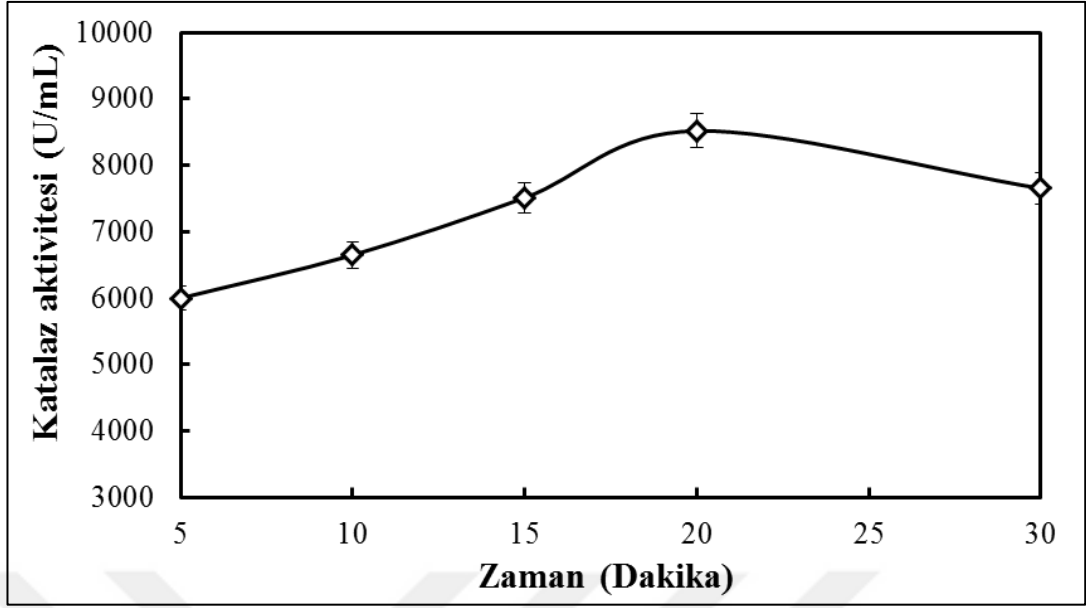
3.2. *Bacillus pumilus* Y7'den Katalaz Enziminin Üretimi

B. pumilus Y7 izolatı için optimum büyüme koşullarının belirlenmesinin ardından yüksek miktarda katalaz enzim üretimi için hücre içi ve hücre dışında ölçülen katalaz aktiviteleri zamana karşı karşılaştırıldı (Şekil 3.1). Buna göre en yüksek katalaz aktivitesi hücre içerisinde 18. saatte elde edildi. Sonikasyon süresi bu deneyler boyunca 10 dk olarak tutuldu. Hücrelerin zamana karşı büyüme grafiğinde olduğu gibi aktivite bazında gerçekleştirilen optimizasyonda da zamanın aynı olması, logaritmik fazda hücre sayısının fazla olmasıyla hücre içi katalaz aktivitesinin fazla oluşunun paralel olduğunu göstermektedir. Nitekim hücre miktarının azalmasıyla katalaz aktivitesi de düşmektedir.



Şekil 3.1. *B. pumilus* Y7 izolatının zamana karşı katalaz aktivite grafiği

B. pumilus Y7’de katalaz aktivitesinin hücre içinde daha yüksek olduğunun tespit edilmesi üzerine enzim eldesinde kullanılan sonikasyon yönteminin optimizasyonu için ham ekstras farklı sürelerde sonikasyona maruz bırakıldı ve enzim aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Buna göre, sonikasyon için gerekli optimum süre 20 dk olarak bulundu. Bu durum 20 dk’dan daha kısa sürede gerçekleşen sonikasyon sonrası hücrelerin tam anlamıyla parçalanmadığı ve katalaz enziminin yeterince elde edilemediğine işaret etmektedir. 20 dk’dan sonra aktivitenin düşmesi ise sonikasyon sırasında ortamın ısısının artmasına bağlı olarak enzimin denature olmaya başlamasıyla açıklanabilir (Nguyen ve Le., 2013).



Şekil 3.2. *B. pumilus* Y7 izolatından hücre içi katalaz üretimi için gerçekleştirilen sonikasyon süresinin optimizasyonu

3.3. Sulu İkili Faz Sistemi ile *Bacillus pumilus* Y7'den Katalaz Enziminin Saflaştırılması

3.3.1. Tuz türünün belirlenmesi

Tuz türünün belirlenmesi için PEG3000 ile birlikte çeşitli sülfat tuzları (Na_2SO_4 , MgSO_4 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ve sodyum sitrattan ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$) hazırlanan ATPS sistemlerinde *B. pumilus* Y7 katalazının dağılım sonuçları Tablo 3.2'de yer almaktadır. Bu tuzlar ATPS sistemlerinde en yaygın kullanılan tuzlardır. Sülfat tuzları proteinler arasındaki hidrofobik etkileşimleri tetiklemeleri sebebiyle tercih edilirler. Sitratt tuzları ise hedef proteinin bulunduğu ortamdan seçici olarak ekstraksiyonunu sağlamaları ve çevreye karşı kirletici özelliğinin düşük olması nedeniyle ikili faz ayırma sistemlerinde sıklıkla kullanılırlar (Arakawa ve Narhi, 1991). Test edilen tüm sistemlerde faz ayrımı gözlenmiştir. PEG'ce ve tuzca zengin fazlarda hesaplanan spesifik aktivite (SA) değerleri karşılaştırıldığında enzimin tuzca zengin alt faza doğru dağılmış olduğu görülmektedir. PEG'ce zengin üst fazın hidrofobisitesi alt fazından daha yüksektir (Wu ve diğ., 2000); bu durum alt fazda toplanan katalaz enziminin hidrofilik özellikte olduğuna işaret eder. Genel olarak negatif yüke sahip olan proteinler PEG-Tuz sistemlerinde üstteki faza doğru, pozitif yüke sahip olan proteinler ise alt faza doğru dağılım göstermektedir (Gündüz, 2000;

Isable ve Otero, 2003). Bu sebeple alt faza doğru dağılım gösteren katalaz enziminin pozitif yüke sahip olması beklenebilir.

Tablo 3.2 incelendiğinde en yüksek saflaştırma katsayısı (SK) ve geri kazanım (GK) değerlerinin Na₂SO₄ tuzu ile hazırlanan sistemlerden elde edildiği görülmektedir. MgSO₄, (NH₄)₂SO₄ ve C₆H₅O₇Na₃ tuzlarının kullanıldığı sistemlerde ise SK ve GK değerleri daha düşüktür. Bu durum MgSO₄, (NH₄)₂SO₄ ve C₆H₅O₇Na₃ tuzlarının *B. pumilus* Y7 katalazı için uygun bir dağılım ortamını gerçekleştirmediğini gösterir. MgSO₄ tuzunun olduğu sistemlerde hesaplanan K_e, K_p ve SK değerleri karşılaştırıldığında K_p değerinin K_e değerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiş olup bu durum kontaminant proteinlerin hedef proteinle birlikte alt faza geçerek saflaştırma katsayısının düşmesine sebep olmuştur. (NH₄)₂SO₄ ve C₆H₅O₇Na₃ tuzlarını içeren sistemlerde ise toplam aktivitede gözlenen düşüş GK değerinde azalma ile sonuçlanmıştır.

%20 (a/a) PEG3000 - %10 (a/a) Na₂SO₄ sistemi ile katalaz için en yüksek SK (1,6 kat) ve GK (%32) değerleri hesaplandı. Bu nedenle bu sistem diğer analizler için seçildi.

Tablo 3.2. Katalaz enzim dağılımına faz içeriğinin ve tuz türünün etkisi

Faz İçeriği (a/a)*	Alt Faz SA (U/mg)	Üst Faz SA (U/mg)	SK	GK (%)	K _e	K _p
%17,5 PEG3000-%10 Na ₂ SO ₄	959	349	1,2	35	6,99	2,54
%20 PEG3000-%10 Na ₂ SO ₄	1195	553	1,6	32	3,02	1,31
%17,5 PEG3000-%10 MgSO ₄	564	260	0,7	21	9,06	4,17
%20 PEG3000-%10 MgSO ₄	564	847	0,7	17	2,98	4,48
%17,5 PEG3000-%10 (NH ₄) ₂ SO ₄	671	111	0,9	25	8,30	1,37
%20 PEG3000-%10 (NH ₄) ₂ SO ₄	926	114	1,2	28	10,88	1,33
%17,5 PEG3000-%10 C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃	664	47	0,9	23	16,56	1,17
%20 PEG3000-%10 C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃	908	108	1,2	26	10,53	1,25

*0,5 mL *B. pumilus* Y7 izolatı ham ekstraktının spesifik aktivitesi 939,17 U/mg ve toplam protein miktarı 1,28 mg'dır. Sistem pH'sı 6,0, sıcaklığı ise 25°C'dir. SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Geri kazanım; K_e: Katalaz enziminin dağılım katsayısı; K_p: Proteinlerin dağılım katsayısı.

3.3.2. Polietilen glikol (PEG) molekül ağırlığı belirlenmesi

PEG'in molekül ağırlığı proteinlerin dağılımı için önemli bir parametredir. Faz bileşenlerini veya polimer ile protein arasındaki etkileşimi değiştirerek hedef proteinin fazlardaki dağılımına etki eder (Antov ve diğ., 2006; Su ve Chiang, 2006; Tubio ve diğ., 2009). Katalaz enziminin fazlardaki dağılım verimini arttırmak üzere farklı molekül ağırlıklı PEG ile hazırlanan ATPS sistemlerinde (%20 (a/a) PEG / %10 (a/a) Na₂SO₄) hesaplanan enzimin dağılım katsayısı (K_e), proteinlerin dağılım katsayısı (K_p), saflaştırma katsayısı ve enzim geri kazanım değerleri Tablo 3.3'de verildi.

PEG molekül ağırlığının etkisi sahip olduğu zincirler ve protein ile PEG arasındaki hidrofobik ilişkiye dayanır (Mohamadi ve diğ., 2007). PEG molekül ağırlığının artması PEG4000'den itibaren Tablo 3.3'de de görüldüğü üzere sistem geri kazanımının azalmasına sebep olmuştur. PEG molekül ağırlığının yüksek olduğu sistemlerde kendi zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimler PEG-Hedef protein arasındaki etkileşimlerden fazla olması yüzünden proteinin üst faza dağılımı engellenir. Sonuç olarak K_e değeri düşer (Mohamadi ve diğ., 2007). Yüksek molekül ağırlığına sahip polimerle hazırlanan sistemlerde ayrıca protein agregasyonu gözlemlenir. Düşük molekül ağırlığına sahip PEG içeren sistemlerde ise tam tersi hedef protein yanında istenmeyen diğer proteinler de polimer ile hidrofobik etkileşim kurar ve üst faza geçerek başarılı bir ayırım gerçekleşmesini imkansız hale getirir (Cascone ve diğ., 1991; Su ve Chiang, 2006). Bu nedenle PEG moleküler ağırlığının katalaz dağılımına etkisini araştırmak üzere ne çok yüksek ne de çok düşük moleküler ağırlığa sahip olan PEG4000 tercih edildi. Buna ek olarak PEG4000'den itibaren ortamın viskozitesinin artması da, PEG moleküler ağırlığının belirlenmesinde etkili bir faktör olmuştur.

Tablo 3.3. Katalaz enzim dağılımına PEG molekül ağırlığının etkisi

PEG Molekül Ağırlığı	Alt Faz SA (U/mg)	Üst Faz SA (U/mg)	SK	GK (%)	K _e	K _p
PEG1000	1157	435	1,7	17	0,71	0,27
PEG3000	1192	73	1,6	32	3,02	1,31
PEG4000	1100	129	1,7	32	8,29	0,97
PEG6000	956	132	1,4	25	9,38	1,30
PEG8000	815	118	1,2	21	6,67	0,96

*0,5 mL *B. pumilus* Y7 izolatu ham ekstraktının spesifik aktivitesi 939,17 U/mg ve toplam protein miktarı 1,28 mg'dır. %20 (a/a) PEG / %10 (a/a) Na₂SO₄ sisteminin pH'sı 6,0, sıcaklığı ise 25°C'dir. SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Geri kazanım; K_e: Katalaz enziminin dağılım katsayısı; K_p: Proteinlerin dağılım katsayısı.

3.3.3. PEG4000 konsantrasyonunun belirlenmesi

B. pumilus Y7 katalaz enziminin PEG4000 - %10 (a/a) Na₂SO₄ sistemindeki dağılımını gözlemek için PEG4000'in farklı konsantrasyonlarına (%7,5 - 22,5) ait denemelerin sonuçları Tablo 3.4'de verilmiştir. Polimer konsantrasyonundaki artışın önce fazlar arasındaki hidrofobik farkın artmasına, sonrasında polimer ile protein arasındaki etkileşimleri artırarak istenmeyen proteinlerin de üst faza geçmesine sebep olduğu bilinmektedir (Vaidya ve diğ., 2006; Malpicci ve diğ., 2009).

Tablo 3.4 incelendiğinde %7,5, %10 ve %12,5 (a/a) PEG konsantrasyonlarında hazırlanan sistemlerde saflaştırma katsayısının sırasıyla arttığı ancak geri kazanımın düştüğü görülmektedir. Bunun sebebi olarak düşük konsantrasyonda hazırlanan sistemlerdeki üst fazların düşük hidrofobisiteye sahip olmasından dolayı proteinlerin birçoğunun alt fazda kaldığı dolayısıyla verimli bir ayırım gerçekleşmediği söylenebilir (Goja ve diğ., 2013). PEG4000'in %15 (a/a) konsantrasyonunda hazırlanan sistemde katalaz enziminin dağılımı en iyi seviyede olup saflaştırma katsayısı 3,6 olarak hesaplanmıştır. %15'in (a/a) üzerindeki konsantrasyonlarda hazırlanan sistemlerde ise üst fazda polimer derişiminin artmasına bağlı olarak kaplanan hacmin de artması sonucu birçok biyomolekül üst fazda yer bulamadığı için alt faza yönelir ve sonuç olarak saflaştırma katsayısı azalır (Madhusuthan ve Raghavarao, 2011).

Çalışmanın bu aşamasında 3,6 kat saflaştırma ve %70 geri kazanım elde edilen %15 (a/a) PEG4000 - % 10 (a/a) Na₂SO₄ sistemi seçilmiş olup bir sonraki aşamaya bu sistemle devam edildi.

Tablo 3.4. Katalaz enzim dağılımına PEG4000 konsantrasyonunun etkisi

PEG4000 Konsantrasyonu (%, a/a)*	Alt Faz SA (U/mg)	Üst Faz SA (U/mg)	SK	GK (%)	K _e	K _p
7,5	829	118	1,2	98	27,10	16,17
10	1214	70	1,7	84	25,12	5,00
12,5	1466	258	2,1	76	20,78	5,20
15	2658	317	3,6	70	15,60	1,70
17,5	1774	205	2,5	57	15,81	2,82
20	1100	155	1,7	32	8,29	0,97
22,5	471	475	0,7	6	0,87	0,88

*0,5 mL *B. pumilus* Y7 izolatu ham ekstraktının spesifik aktivitesi 939,17 U/mg ve toplam protein miktarı 1,28 mg'dır. PEG4000 / %10 (a/a) Na₂SO₄ sisteminin pH'sı 6,0, sıcaklığı ise 25°C'dir. SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Geri kazanım; K_e: Katalaz enziminin dağılım katsayısı; K_p: Proteinlerin dağılım katsayısı.

3.3.4. Na₂SO₄ konsantrasyonunun belirlenmesi

B. pumilus Y7 katalaz enziminin PEG / Na₂SO₄ sistemindeki dağılımının incelenmesi için farklı tuz derişimleri (%7,5-22,5 a/a) kullanarak hazırlanmış sistemlere ait değerlere Tablo 3.5'de yer verilmiştir. Tuz konsantrasyonu proteinlerin dağılımını etkileyen bir diğer önemli parametredir. Tuz miktarındaki artışa bağlı olarak ortamın hidrofobisitesi artmakta ve proteinler polimerce zengin faza doğru yönelme göstermektedirler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında ise proteinler tuzun "salting-out" etkisiyle iki faz arasında çökme eğiliminde bulunur; bu da ayırımın elverişli olmasını engeller (Klomklo ve diğ., 2005; Spelzini ve diğ., 2005; Antov ve diğ., 2006; Vaidya ve diğ., 2006; Yue ve diğ., 2007). Tablo 3.5'de yer alan verilere bakıldığında; %7,5 (a/a) Na₂SO₄ - %15 (a/a) PEG4000 sisteminde iki ayrı fazın oluşmadığı görüldü. %10 (a/a) tuz konsantrasyonundan itibaren %22,5 (a/a) tuz konsantrasyonu da dahil olmak üzere hem saflaştırma katsayısı hem de geri kazanımın sürekli olarak azaldığı (%12,5 (a/a) Na₂SO₄ hariç) belirlendi. %12,5 (a/a) Na₂SO₄ kullanılan sistemde enzimin geri kazanım değeri %10'a (a/a) göre daha

yüksek olmasına rağmen saflaştırma katsayısı yarı yarıya düştüğünden bu konsantrasyon tercih edilmedi. Sonuç olarak, bir sonraki sisteme %10 (a/a) Na₂SO₄ - %15 (a/a) PEG4000 çözeltilerini içeren sistemle devam edilmesi uygun görüldü.

Tablo 3.5. Katalaz enzim dağılımına Na₂SO₄ konsantrasyonunun etkisi

Na ₂ SO ₄ Konsantrasyonu (%, a/a)	Alt Faz SA (U/mg)	Üst Faz SA (U/mg)	SK	GK (%)	K _e	K _p
7,5	-	-	-	-	-	-
10	2658	246	3,6	70	15,60	1,70
12,5	1077	269	1,4	87	19,00	4,74
15	818	264	1,0	48	10,10	3,26
17,5	1077	585	1,4	57	0,73	2,03
20	818	78	1,0	48	4,57	2,33
22,5	944	75	1,3	49	3,03	1,24

*0,5 mL *B. pumilus* Y7 izolatu ham ekstraktının spesifik aktivitesi 939,17 U/mg ve toplam protein miktarı 1,28 mg'dır. %15 (a/a) PEG4000 / Na₂SO₄ sisteminin pH'sı 6,0, sıcaklığı ise 25°C'dir. SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Geri kazanım; K_e: Katalaz enziminin dağılım katsayısı; K_p: Proteinlerin dağılım katsayısı.

3.3.5. NaCl konsantrasyonunun belirlenmesi

Proteinlerin ATPS sistemlerinde dağılım verimini arttırmada izlenen bir yol da ortama kaotropik etki gösteren nötral tuzların eklenmesidir. Bu tip tuzlar iki faz arasındaki elektriksel potansiyel farkının oluşmasına yol açarak proteinlerin hidrofobik özellikteki faza doğru yönelmelerine yardımcı olur (Persson ve diğ., 1999b). Ancak tuzların sisteme yüksek miktarda eklenmesi protein denatürasyonu ile sonuçlanabilir. Bu nedenle sisteme eklenen nötral tuz konsantrasyonunun optimize edilmesi gereklidir. Kosolüt tuz olarak en çok tercih edilen NaCl'dir. Bundan dolayı çalışmada nötral tuz olarak NaCl tercih edilmiştir. Literatürde NaCl konsantrasyonunun %7'nin (a/a) üzerinde protein denatürasyonuna sebep olmasının rapor edilmesi (Goja ve diğ., 2013) üzerine ifade edilen konsantrasyon üzerine çıkılmadı. Tablo 3.6'da %1 ila 7 (a/a) arasında sisteme eklenen NaCl'nin etkilerine dair sonuçlar verilmiştir. Buna göre, %3 (a/a) NaCl varlığında hem saflaştırma katsayısında (4,0) hem de enzimin sistemden geri kazanımında (%101) kayde değer bir artış gözlemlendi. Diğer yandan %1 ve %2 (a/a) NaCl varlığında protein geri

kazanımında da artış gözlenmiş olmasına rağmen saflaştırma katsayıları 3,6'nın altında ölçüldü. %3'ün (a/a) üzerinde ise enzim aktivitesinin düşmesine paralel olarak saflaştırma katsayısının da dikkate değer bir şekilde azalması bu konsantrasyonun üzerinde proteinin denatüre olduğuna işaret etmektedir. Tüm bu sonuçlar neticesinde katalazın saflaştırılmasında %15 (a/a) PEG4000, %10 (a/a) Na₂SO₄ ve %3 (a/a) NaCl'den oluşan sistem tercih edilmiştir.

Tablo 3.6. Katalaz enzim dağılımına NaCl konsantrasyonunun etkisi

NaCl konsantrasyonu (a/a)*	Alt Faz SA (U/mg)	Üst Faz SA (U/mg)	SK	GK (%)	K _e	K _p
0	2658	246	3,6	70	15,60	1,70
1	947	53	2,5	108	14,67	1,13
2	1185	70	3,2	122	30,05	1,46
3	2691	42	4,0	101	27,63	2,73
5	921	42	1,5	36	8,15	2,30
7	995	26	1,6	37	8,78	1,07

*0,5 mL *B. pumilus* Y7 izolatu ham ekstraktının spesifik aktivitesi 939,17 U/mg ve toplam protein miktarı 1,28 mg'dır. %15 (a/a) PEG4000 / %10 (a/a) Na₂SO₄ sisteminin pH'sı 6,0, sıcaklığı ise 25°C'dir. SA: Spesifik aktivite; SK: Saflaştırma katsayısı; GK: Geri kazanım; K_e: Katalaz enziminin dağılım katsayısı; K_p: Proteinlerin dağılım katsayısı.

3.3.6. Sistem pH'sının belirlenmesi

ATPS sisteminde protein dağılımını etkileyen diğer önemli faktör sistem pH'sıdır. Sistem içerisinde bulunan iyonların türü ve konsantrasyonları ile proteinlerin dağılımı şekillenmektedir. pH'nın etkisi, hedef protein ile kontaminantların yüzey karakteristiklerini değiştirerek iki faz arasında protein dağılımının değişmesi şeklindedir (Gautam ve Simon, 2006; Mohamedi ve diğ., 2007). PEG ve tuz ile kurulan sistemlerde genel olarak asidik izoelektrik noktaya (pI) sahip olan negatif yüklü proteinler üstteki faza, pozitif yüke sahip olanlar ise alttaki faza yönelmektedir. pH yükseldikçe proteinlerin daha da fazla negatif yüklü hale gelmesi ile proteinler üst faza yönelerek bu faz ile olan ilişkileri daha da fazla olur (Rito-Polomores, 2004). Protein dağılımına pH'nın etkisi Tablo 3.7'de verilmiştir. Sistem pH'sı 4,0 ila 11,0 arasında test edilmiş olup en yüksek saflaştırma katsayısı (4,6) ve geri kazanım değeri (%123) pH 5,0'da elde edildi. pH'nın 5,0'ın altına düşmesi ile saflaştırma katsayısı ve geri kazanım ciddi oranda düştü. pH değerinin artmasıyla ise saflaştırma

katsayısı düşse, geri kazanım düzensiz bir biçimde inişli-çıkışlı bir gidişat sergiledi. Başlangıç pH'sı 6,0 olan sisteme göre pH 5,0'da olan bu olumlu etkinin hedef proteinin bir birim düşük pH'da pozitif yüklü olmasından ötürü tuzca zengin alt faza doğru yönelmesinden kaynaklı olduğu düşünülebilir (He ve diğ., 2005). Sonuç olarak PEG4000 / Na₂SO₄ sistemi ile katalaz saflaştırılmasında en uygun pH 5,0 olarak belirlendi.

Tablo 3.7. Katalaz enzim dağılımına sistem pH'sının etkisi

pH*	Alt Faz SA (U/mg)	Üst Faz SA (U/mg)	SK	GK (%)	K _e	K _p
4,0	1187	61	1,6	49	15,12	4,74
5,0	3421	132	4,6	123	63,68	2,40
6,0	2691	42	4,0	101	27,63	2,73
7,0	2443	103	3,3	125	67,87	4,16
8,0	2250	123	3,0	88	27,90	2,25
9,0	1407	186	1,9	110	41,12	3,24
10,0	937	61	1,3	75	28,14	4,02
11,0	1330	148	1,8	91	31,24	3,49

*0,5 mL *B.pumilus* Y-7 izolatu ham ekstraktının spesifik aktivitesi 939.17 U/mg ve total protein miktarı 1.28 mg 'dır. % 15 (a/a) PEG4000 / % 10 (a/a) Na₂SO₄ / % 3 (a/a) NaCl sisteminin sıcaklığı 25 °C'dir. SA: Spesifik aktivite; S.K : Saflaştırma katsayısı; G.K: Geri kazanım; K_e: Katalaz enziminin dağılım katsayısı; K_p: Proteinlerin dağılım katsayısı.

3.3.7. Sistem hacminin belirlenmesi

Sulu ikili faz sistemlerinden sistem hacminin büyütülmesi endüstriyel uygulamalar için önemli bir yer tutar (Marcos ve diğ., 1999). Bu nedenle sistem hacminin büyütülmesinin enzim saflaştırılmasına olan etkisini araştırmak üzere optimum koşullar altında toplam sistem hacmi 5, 10, 25 ve 50 gram olacak şekilde dört farklı ortam hazırlandı. Farklı sistem büyüklüklerinin etkisi Tablo 3.8'de verilmiştir. Tabloda görüldüğü üzere sistem hacminin büyümesi ile katalaz enziminin saflaştırılması arasında negatif bir etki gözlemlendi. Diğer bir deyişle sistem hacmi arttıkça saflaştırma verimi hızlı bir şekilde azaldı. Bu durum, sistem hacminin artmasına bağlı olarak sisteme konulan protein konsantrasyonunun düşmesi yani doygunluk sınırının oldukça altına düşerek sistemin kararsız hale gelmesiyle açıklanabilir (Engel ve diğ., 2000). Sonuçta optimum şartlar altında toplam hacim 5

gram olacak şekilde pH 5,0'da hazırlanan %15 (a/a) PEG4000, %10 (a/a) Na₂SO₄ ve %3 (a/a) NaCl'den oluşan sulu ikili faz sisteminden katalaz enzimi yaklaşık olarak 5 kat ve %123 verimle saflaştırıldı.

Tablo 3.8. Farklı ağırlıklara sahip sistemlerin katalaz enzim dağılımına etkisi

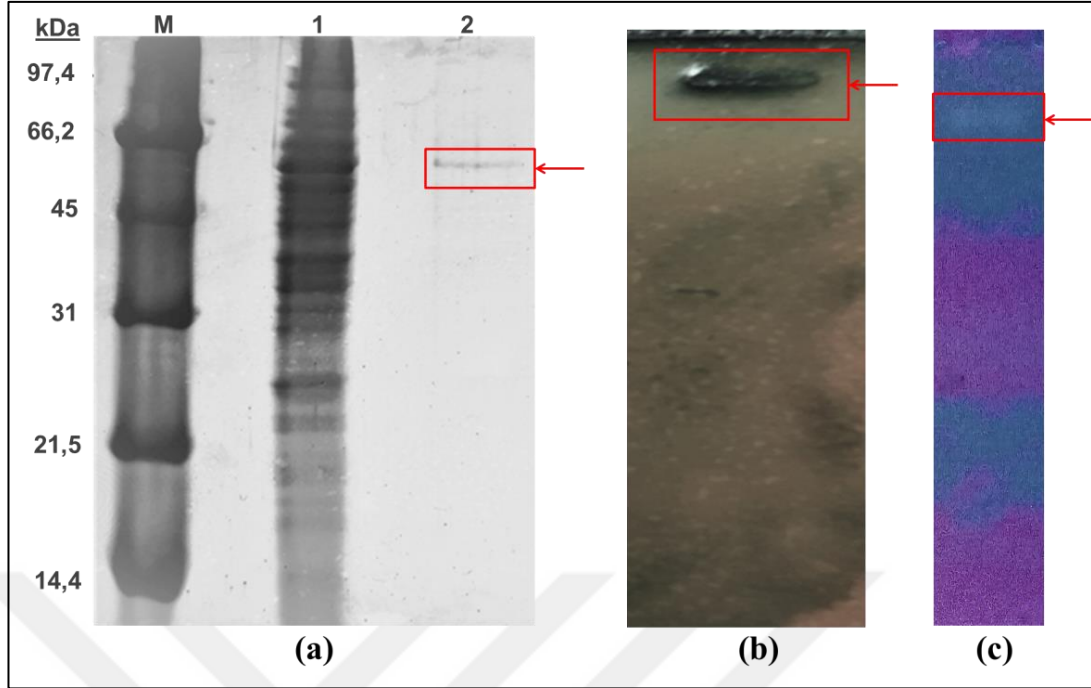
Sistem toplam hacmi (gram)*	Alt Faz SA (U/mg)	Üst Faz SA (U/mg)	SK	GK (%)	K _e	K _p
5	3421	132	4,6	123	63,68	2,40
10	1662	753	2,1	106	12,98	5,88
25	1593	61	2,0	46	17,39	0,67
50	115	73	0,1	4	0,47	0,30

*0,5 mL *B.pumilus* Y-7 izolatu ham ekstraktının spesifik aktivitesi 939.17 U/mg ve total protein miktarı 1.28 mg 'dır. %15 (a/a) PEG4000 / %10 (a/a) Na₂SO₄ / %3 (a/a) NaCl sisteminin sıcaklığı 25 °C'dir. SA: Spesifik aktivite; S.K : Saflaştırma katsayısı; G.K: Geri kazanım; K_e: Katalaz enziminin dağılım katsayısı; K_p: Proteinlerin dağılım katsayısı.

3.3.8. SDS-PAGE ve Zimogram analizi

Katalaz enzim saflığının kontrolü ve molekül kütesinin tayini için yapılan poliakrilamid jel elektroforezi sonrası elde edilen protein bantlarına ait görsel Şekil 3.3'de gösterildi. Yapılan SDS-PAGE analizi sonrası 58,9 kDa (Şekil 3.3a) civarında tek bir bant gözlenmiş olup enzimin başarılı bir şekilde saflaştırıldığı kanıtlanmıştır. Bulunan değer (58,9 kDa) monofonksiyonel katalazlar için rapor edilen molekül ağırlığı aralığında (alt ünite molekül kütesi; 55 ila 60 kDa) olması (Chelikani ve diğ., 2004) ve *B. pumilus* katalaz enzimini kodladığı bilinen katX2 geni (Loewen ve diğ., 2015) kullanılarak URL-3 ve URL-4 web sayfalarında teorik olarak hesaplanan değerle (Ek-B) birebir örtüşmesi saflaştırılan enzimin istenilen *B. pumilus* katalazına ait olduğunu göstermektedir.

SDS kullanmadan gerçekleştirilen poliakrilamid jelde katalaz aktivite boyaması gerçekleştirildi ve jel üzerinde katalaz aktivitesinin varlığı görüldü (Şekil 3.3b). Ayrıca saflaştırılan enzimde ikincil oksidaz/peroksidaz aktivitenin varlığını analiz etme amacıyla gerçekleştirilen aktivite boyama sonrası enzimin peroksidaz aktivite gösterdiği bulundu (Şekil 3.3c). Bu durum *B. pumilus* Y7 katalazının monofonksiyonel katalaz ailesine dahil olup esas fonksiyonun yanında peroksidaz benzeri aktiviteye de sahip olduğunu gösterdi.

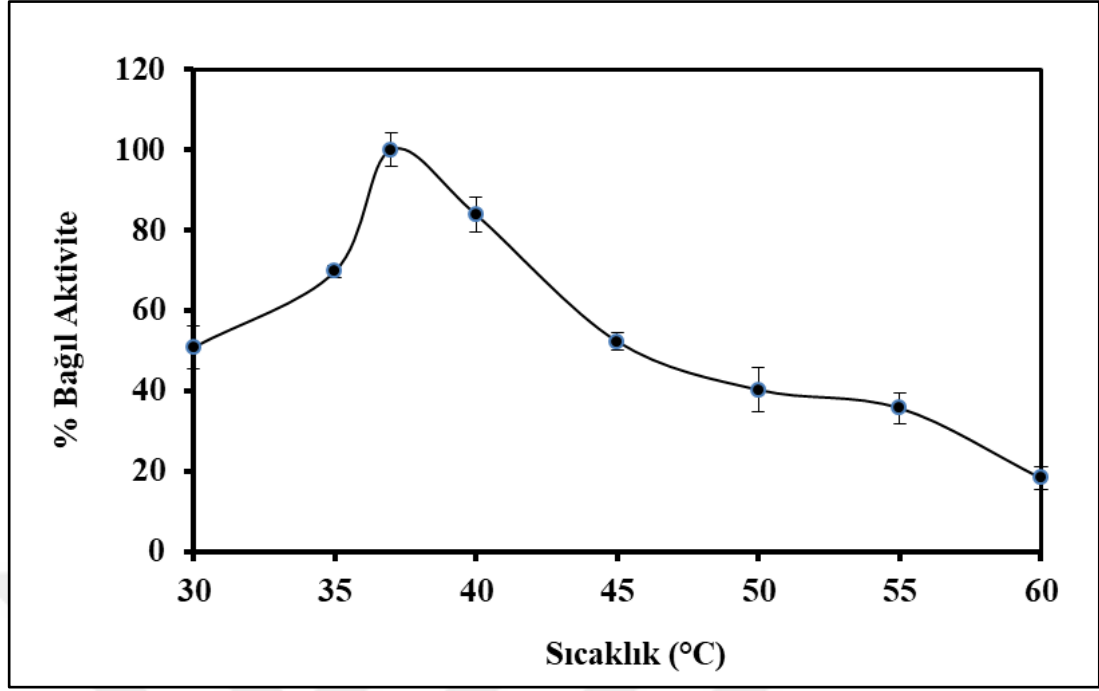


Şekil 3.3. (a) ATPS ile saflaştırılan *B. pumilus* Y7 katalazının SDS-PAGE profili. M: Markör (Low range protein marker, BioRad; 14,4–97,4 kDa); 1: Ham ekstrakt; 2: ATPS (% 15 (a/a) PEG4000, % 10 (a/a) Na₂SO₄, % 3 (a/a) NaCl, pH 5,0) sonrası enzim preparatı (b) Saflaştırılmış enzimin katalaz aktivite zimogramı (c) Saflaştırılmış enzimin peroksidaz zimogramı

3.4. *Bacillus pumilus* Y7 Katalazının Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.4.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

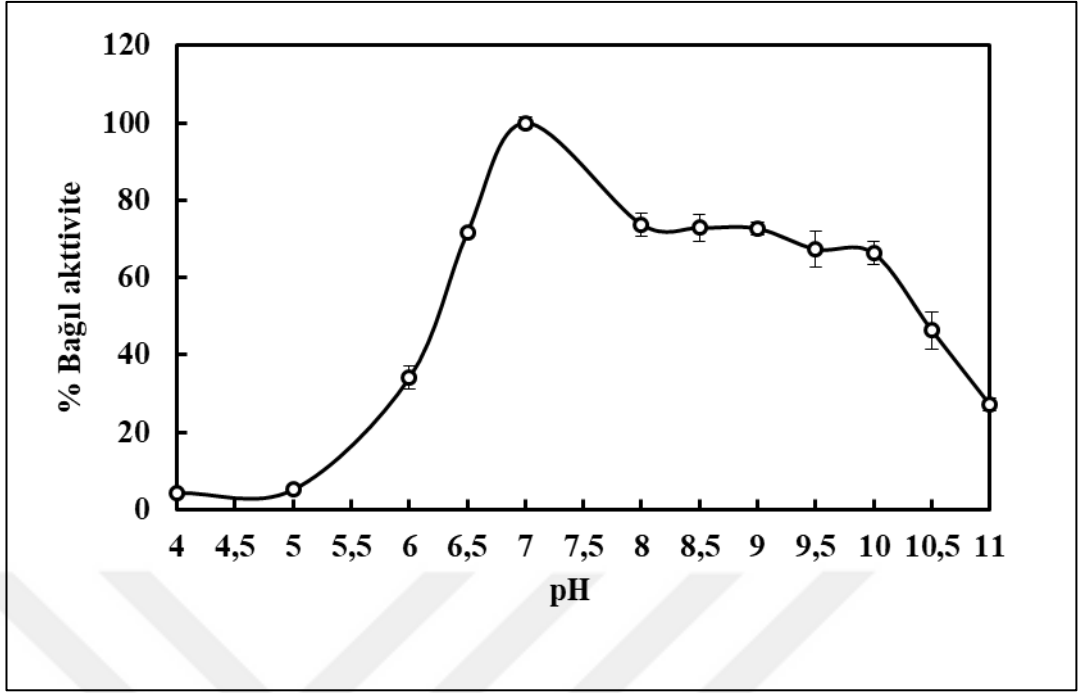
Reaksiyon sıcaklığının katalaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 30–60°C arası sıcaklıklarda gerçekleştirilen aktivite ölçümleri Şekil 3.4’de verilmiştir. Oluşturulan grafikte *B. pumilus* Y7 katalazı için optimum reaksiyon sıcaklığı 37°C olarak bulundu. Bu sıcaklık değerinde katalaz aktivitesinin dereceli olarak azaldığı gözlemlendi. 30°C ve 45°C sıcaklık değerlerinde aktivitesini 37°C’deki aktiviteye göre %50 koruduğu gözlemlendi. Farklı kaynaklardan elde edilen katalazlar için optimum reaksiyon sıcaklık değeri benzer şekilde 37°C olarak literatürde belirtilmiştir (Sooch ve diğ., 2014; Dong ve diğ., 2015; Li ve diğ., 2015).



Şekil 3.4. *B. pumilus* Y7 katalazının farklı sıcaklık değerlerindeki aktivite grafiği

3.4.2. Enzim aktivitesine pH'nın etkisi

Farklı pH değerlerinin katalaz aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği grafik Şekil 3.5'te verilmiştir. pH 4,0 ila 11,0 aralıklarında yapılan aktivite tayinlerinde optimum reaksiyon pH değeri 7,0 olarak belirlendi. Diğer yandan pH 6,5 ila 10,0 değerleri arası pH 7,0'da ölçülen aktiviteye göre yaklaşık %70'inin korunduğu gözlenirken 6,0'ın altındaki pH değerlerinde aktivitede hızlı bir düşüş gözlemlendi. Özellikle pH 4,0 ve 5,0'da aktivitenin %95'inin kaybolduğu belirlendi. Yüksek pH değerlerinde ise aktivitede gözlenen azalma yaklaşık %50 ila %70 arasında olduğu bulundu. Asidik koşullarda enzim aktivitesindeki kaybın yüksek pH değerlerinde gözlenen değerden daha fazla olması enzimin alkali ortamları tercih ettiğini göstermektedir. Endüstriyel uygulamalarda bu gibi yüksek pH değerlerinde aktivite özelliği olan bir katalaz enziminin önemli olabileceği düşünülmektedir. Optimum reaksiyon pH'sı *Scytalidium thermophilum*, *Beauveria bassiana*, *Rhodospirillum rubrum* S1 ve *Hyalomma dromedarii*'den izole edilen katalazlarla benzerlik göstermektedir (Kang ve diğ., 2006; Pedrini ve diğ., 2006; Kocabas ve diğ., 2008; Mahmoud ve diğ., 2015).

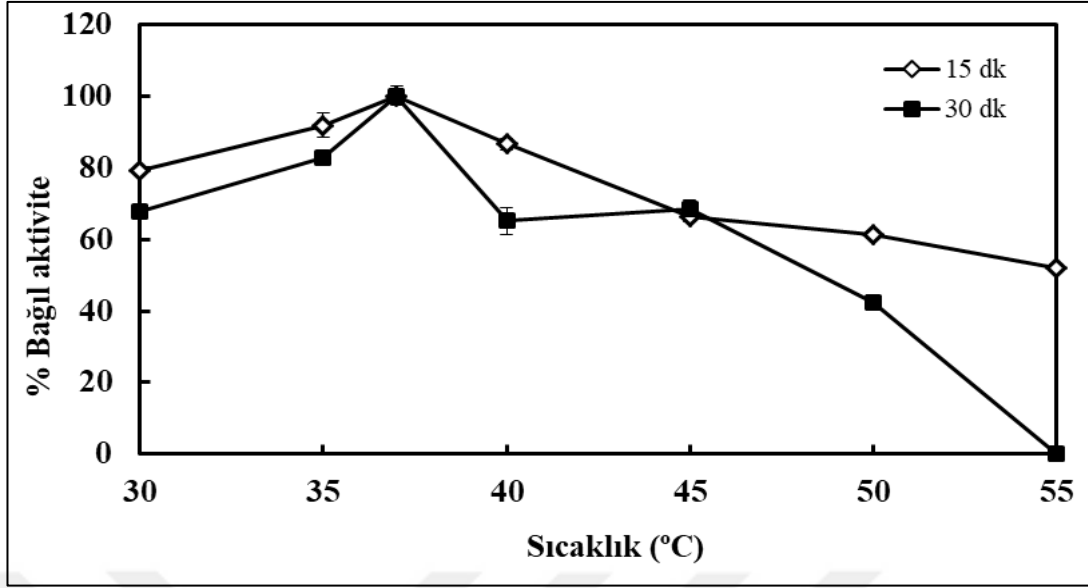


Şekil 3.5. *B. pumilus* Y7 katalaz aktivitesine pH'nın etkisi

3.4.3. Katalazın termal kararlılığı

Sıcaklığın enzimin kararlılığına etkisinin belirlenmesi için 30 ila 60°C arası sıcaklıklarda enzim 15 ve 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra standart koşullarda aktivite ölçümleri yapıldı. Şekil 3.6'da görüldüğü üzere enzimin kararlı kaldığı optimum sıcaklık değeri 37°C olarak belirlendi. 15 dk'lık inkübasyon süresinden sonra enzim aktivitesinin 30 ve 40°C arasında %80'e kadar korunduğu gözlemlendi. 55°C'de aktivitenin sadece %40'ının kaybolduğu belirlendi. 30 dk inkübasyon süresi sonucunda 30 ila 40°C arasındaki sıcaklık değerlerinde aktivitedeki kaybın %30'a çıktığı, 50°C'de ise %50'ye yükseldiği gözlemlendi. 55°C'de 30 dk inkübe edilen enzimde ise neredeyse hiç aktivite gözlenmedi.

Katalaz enziminin geniş sayılabilecek bir sıcaklık aralığında (30–50°C) kararlı olarak kalması endüstriyel açıdan bir avantaj sağlamaktadır. 15 dk inkübasyon süresinde sahip olduğu optimum sıcaklık değeri (37°C) literatürde rapor edilmiş farklı kaynaktan elde edilen katalazlar ile benzerlik göstermektedir (Jia ve diğ., 2017).

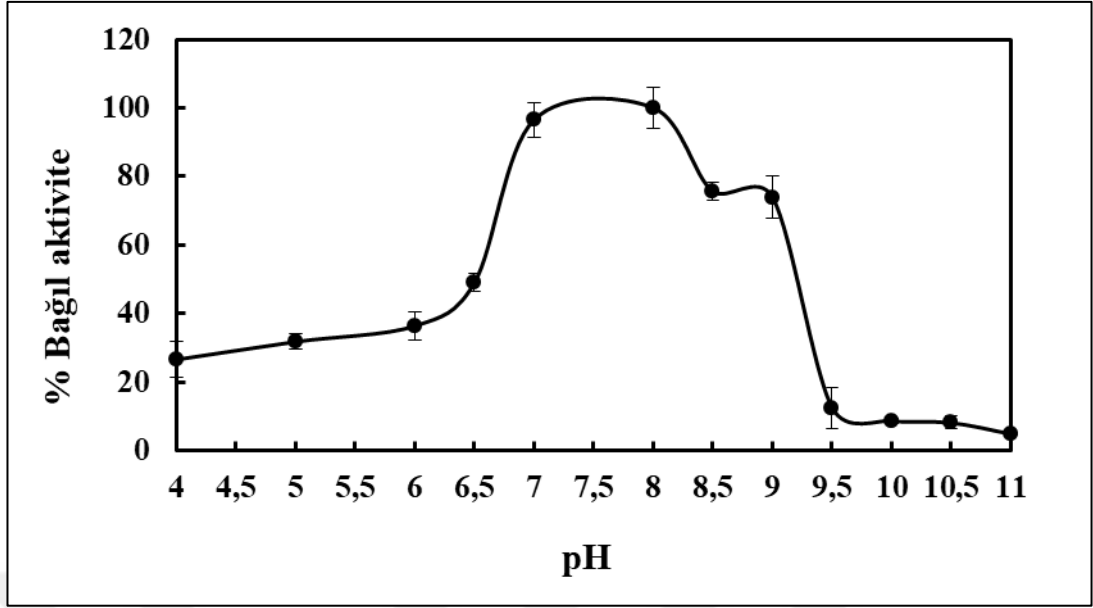


Şekil 3.6. Katalazın termal kararlılığı

3.4.4. Katalazın pH kararlılığı

Farklı pH değerlerinde (pH 4,0-11) enzimin kararlılığının gösterilmesi için yapılan deneylerin sonuçları Şekil 3.7’de verildi. Enzimin kararlı kaldığı optimum pH değeri 8,0 olarak ölçüldü. Optimum pH değerinin üzerinde enzim aktivitesinin %97’sinin korunduğu 7,0’ın altında ise aktivitede giderek azalan bir grafik gözlemlendi.

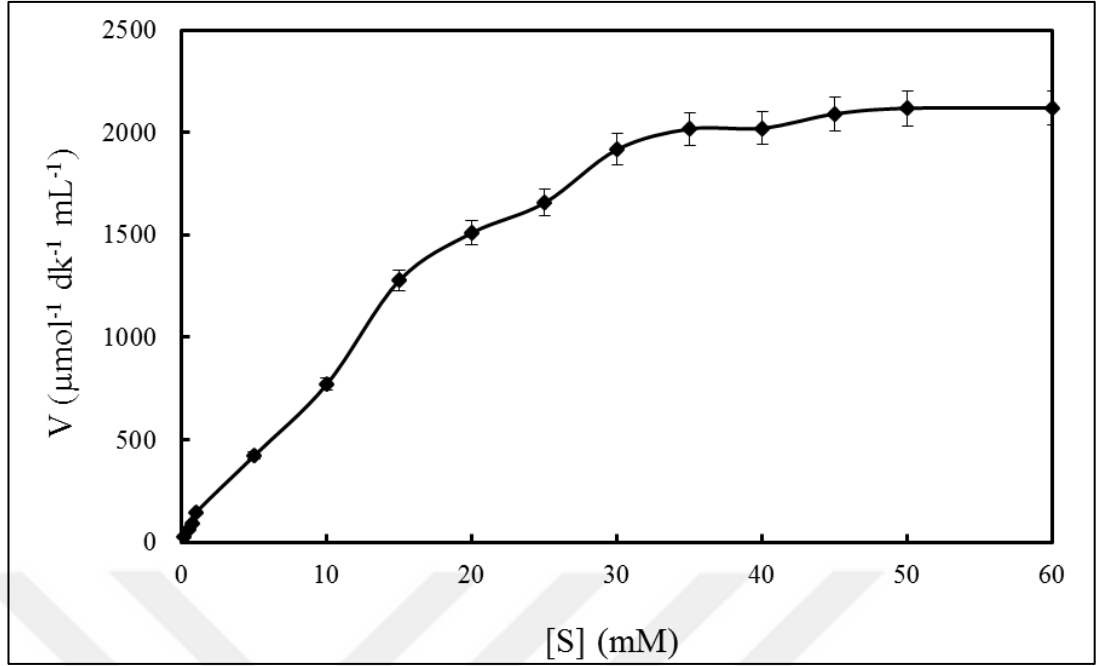
Reaksiyon pH’sında olduğu gibi kararlı olma özelliğinde de kaydedilen yüksek pH değerleri (pH 9,0’da aktivitenin %70’i korunmuştur) dikkat çekmektedir. Enzimin farklı pH’larda kararlı özellik göstermesi yine endüstriyel uygulamalar açısından önemlidir. Süreçlerin uzamasından kaynaklı olarak ortam pH’sına uzun süre maruz kalabilecek bir enzim için bu parametre önem arz etmektedir (Calandrelli ve diğ., 2008). *B. pumilus* Y7 katalazı ile pH kararlılığı bakımından benzer özellik gösteren katalaz kaynağı olarak *Ureibacillus thermosphaericus* örnek verilebilir (Jia ve diğ., 2017).



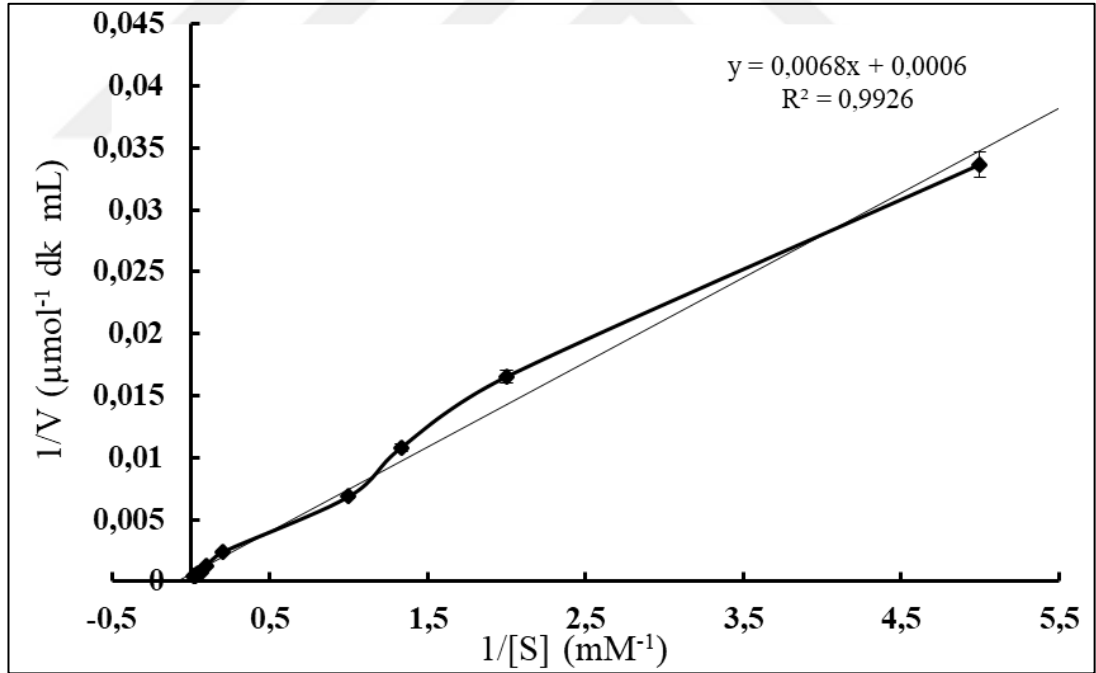
Şekil 3.7. Katalazın pH kararlılığı

3.4.5. Katalaz aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi

B. pumilus Y7 katalazına ait K_M ve V_{Max} değerlerinin hesaplanması için oluşturulan Michaelis Menten grafiği ve Lineweaver-Burk diyagramı Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da verilmiştir. Enzimin hızını ve substratına olan afinitesini belirten bu değerlerin hesaplanması amacıyla katalaz enzimi substratı olan H_2O_2 'nin 0,1 – 60 mM aralığındaki konsantrasyonlarında katalaz aktivite tayini yapıldı. Lineweaver-Burk diyagramından ($1/S$ 'ye karşı $1/V$) K_M ve V_{Max} değerleri sırasıyla 11,3 mM ve 1667 $\mu\text{mol}^{-1} \text{dk}^{-1} \text{mL}^{-1}$ olarak belirlendi.



Şekil 3.8. H₂O₂ konsantrasyonunun katalaz aktivitesine etkisini gösteren Michaelis Menten grafiği (Substrat [S]: Hidrojen peroksit)



Şekil 3.9. Katalaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramı (Substrat [S]: Hidrojen peroksit)

Enzimin substratına afinitesini ifade eden ve literatürde bulunan farklı kaynaklardan izole edilmiş katalaz türlerinin K_M değerlerine bakıldığında 0,048 – 589 mM arasında değiştiği görülmektedir (Loewen ve Switala, 1987; Mliki ve Zimmermann, 1992; Wang ve diğ., 1998; Hayashi ve diğ., 2013; Weiliang Dong ve diğ., 2015; Xianbo Jia

ve diğ., 2017). *B. pumilus* Y7 katalazının K_M değeri 16,2 mM olan *Vigna mundo* katalazı ve K_M değeri 12 mM olan *Hyalomma dromedarii* (Kandukuri ve diğ., 2012; Ibrahim ve diğ., 2015) katalazları ile yakın değerde olduğu görüldü. Diğer yandan K_M değerleri 68 mM (*Serratia marcescens* FZSF01 katalazı) ve 39 mM (*B. subtilis* 168) olan örnekler de mevcuttur (Xianbo Jia ve diğ., 2017; Li ve diğ., 2013). Literatürde rapor edilen K_M değerleri *B. pumilus* Y7 katalazınınki ile karşılaştırıldığında bu çalışmada saflaştırılan katalazın substratına olan afinitesinin daha yüksek olduğu görüldü. Artan substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen katalaz aktivite ölçümlerinde, 0,1 – 1,0 mM aralığında aktivite gözlenemezken ve 60 mM'ın üzerinde enzim doygunluk noktasına ulaşmış olduğu belirlendi.

3.4.6. Efektörlerin katalaz aktivitesine etkisi

Farklı efektörlerin *B. pumilus* Y7 katalazı aktivitesine olan etkileri Tablo 3.9'da gösterildi. Buna göre, aktivite üzerinde en çarpıcı etki $AgNO_3$ varlığında gözlemlendi. 1 mM ve üzerinde gümüş nitratın aktiviteyi tamamen inhibe ettiği görüldü. 0,1 mM konsantrasyonunda $MnCl_2$ hariç tüm metaller aktivite üzerinde önemli bir etki göstermedi. 1 ve 2,5 mM derişimlerinde metallerin eklenmesi sonucu aktivitede gözlenen düşüşlerin birbirine benzer olduğu bulundu.

$NiSO_4$, $MnCl_2$ ve $MgSO_4$ yüksek konsantrasyonlarda aktivitede yaklaşık %50 oranında kayıp sağlarken, Na_2CO_3 , $NaCl$ ve KCl 'nin reaksiyon ortamına eklenmesi sonucu aktivitenin %70'in üzerinde korunduğu gözlenmiştir. Literatürde metallerin inhibe edici etkisinin gösterildiği örnekler mevcuttur. Örneğin, *Pigmentiphaga sp.* DL-8 katalazının 1 mM konsantrasyondaki $ZnCl_2$ ve $MnCl_2$ 'de kısmen inhibisyona uğrayarak bağıl aktivite değerinin sırasıyla %60 ve %50 oranında azaldığı bulunmuş, yine 1 mM konsantrasyondaki $CuCl_2$ ve $CrCl_2$ 'de tamamen inhibe olduğu ve bağıl aktivite değerlerinin sırasıyla %93 ve %97 oranında düştüğü rapor edilmiştir (Dong ve diğ., 2015).

Tablo 3.9. Farklı efektörlerin katalaz aktivite üzerine etkisi

Efektör	Bağıl Aktivite (%)		
	0,1 mM	1 mM	2,5 mM
Control	100	100	100
AgNO ₃	95	-	-
NiSO ₄	96	54	50
MnCl ₂	68	60	56
Na ₂ CO ₃	88	79	75
NaCl	79	75	73
KCl	85	79	74
MgSO ₄	83	59	58

3.4.7. Farklı substratların katalaz aktivitesine etkisi

B. pumilus Y7 katalazının esas fonksiyonun yanında peroksitten bağımsız ikincil bir aktivitenin varlığını araştırmak üzere farklı peroksidaz ve oksidaz substratlarına karşı yapılan aktivite tayinine ait sonuçlar Tablo 3.10'da gösterilmiştir. Elde edilen bulgular *B. pumilus* Y7 katalazının peroksidaz substratlarına olan ilgisinin daha fazla olduğunu ve en yüksek aktivitenin pirogallol varlığında gözlendiğini göstermektedir.

B. pumilus Y7 katalazında gözlenen ikincil aktivite özelliğinin endüstriyel uygulamalar için önemli rol oynayacağı muhtemeldir. Literatürde katalaz enziminde gözlenen bu ikincil aktivite (oksidaz/peroksidaz) olgusu günümüzde hızla yaygınlaşmakta olup *S. thermophilum* (Sutay Kocabas ve diğ., 2008; Yuzugullu ve diğ., 2013), *Thermobifida fusca* (Loncar ve Fraaije, 2015) ve *Amaranthus cruentus*'dan (Chen ve diğ., 2017; Teng ve diğ., 2016) izole edilen katalazlarda da tanımlanmıştır.

Tablo 3.10. *B. pumilus* Y7 katalazının farklı oksidaz/peroksidaz substratlarına ilgisi

Substrat	Oksidaz/Peroksidaz aktivite (nmol dk ⁻¹ mL ⁻¹)
Katekol (100 mM)*	95
Pirogallol (400 mM)*	1370
Guakol (400 mM)*	340
Hidrokinon (100 mM)*	-

Parantez içinde belirtilen konsantrasyonlar literatürde belirtilen raporlardan alınmıştır. *(Ögel ve diğ., 2006; Karakuş ve diğ., 2017)

3.4.8. Organik çözücülerin katalaz aktivitesine etkisi

Organik solventlerin katalaz aktivitesi üzerine etkisi Tablo 3.11’de 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 (Mohd. ve Hina, 2006).

Organik solvent olarak kloroform bulunan ortamda aktivite gözlenmedi (veri gösterilmemiştir). Test edilen tüm solventlerde (kloroform hariç) konsantrasyon artışına bağlı olarak aktivite azalma görüldü. %2,5 (h/h) oranında eklenen tüm organik çözücülerde aktivitenin en az %70’inin korunduğu gözlemlendi. *B. pumilus* Y7 katalazının organik çözücülere olan dayanıklılığı Metanol>Etanol>DMSO>Aseton şeklindedir. Düşük konsantrasyonlarda enzimin çözücülere karşı dayanıklı olması endüstriyel uygulamalarda kullanılması açısından önemli bir özelliktir.

Tablo 3.11. Farklı organik çözücülerin *B. pumilus* Y7 katalaz aktivitesi üzerine etkisi

Or.Ç	% h/h	B.K. A (%)	Or.Ç	% h/h	B.K. A (%)	Or.Ç	% h/h	B.K. A (%)	Or.Ç	% h/h	B.K. A (%)
Kont.		100	Kont.		100	Kont.		100	Kont.		100
	2,5	78		2,5	79		2,5	70		2,5	94
	5	66		5	73		5	54		5	57
Etanol	7,5	53	Metanol	7,5	65	Aseton	7,5	-	DMSO	7,5	40
	12,5	45		12,5	64		12,5	-		12,5	33
	17,5	42		17,5	-		17,5	-		17,5	-

*Or.Ç: Organik çözücü; B.K.A: Bağlı katalaz aktivitesi; Kont.: Kontrol

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında öncelikle enzim kaynağı olarak kullanılan *Bacillus pumilus* Y7'nin hücre büyüme optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla üç farklı besiyerinde iki farklı büyüme yapıldı ve sonuçta Luria Bertani broth besiyerinde 37°C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında 18 saat süreyle inkübe edilen hücrelerde optimum büyüme gözlemlendi. Katalaz üretiminin yüksek düzeyde üretimini araştırmak için Luria Bertani broth besiyerinde 72 saat inkübasyon gerçekleştirildi ve belirlenen saatlerde hücre içi ve hücre dışı aktivite ölçümleri yapıldı. Katalaz üretiminin hücre içinde daha fazla olduğu bulundu. Daha sonra hücre içi katalaz üretiminde kullanılan sonikasyon zamanının optimizasyonu gerçekleştirildi ve 20 dakikalık sonikasyonun optimum olduğu belirlendi.

Katalaz enziminin *B. pumilus* Y7'den saflaştırılmasında Sulu İkili Faz Sistemi (ATPS) tercih edildi. Sistem parametrelerinin belirlenmesinde saflaştırma katsayısı, gerikazanım ve spesifik aktivite değerleri dikkate alındı. Buna göre, % 15 (a/a) PEG4000, % 10 (a/a) Na₂SO₄ ve % 3 (a/a) NaCl'den oluşan sistemden (pH 5,0, 25°C ve 5 gr) *B. pumilus* Y7 katalazı 4,6 kat saflaştırılarak %123 gerikazanımla elde edildi. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile 59 kDa olarak hesaplandı. Enzimin biyokimyasal karakterizasyonu için yapılan denemeler sonucu optimum sıcaklık ve pH sırayla 37°C, 7,0 olarak belirlendi. Ayrıca enzimin 30 ila 50°C arasında 15 dakika, pH 7,0 ila 9,0 arasında yaklaşık 1 saat kararlılığını koruduğu tespit edildi. Lineweaver-Burk diyagramından (1/S'a karşı 1/V) K_M değeri 11,3 mM, V_{Max} değeri ise 1667 µmol⁻¹ dk⁻¹ mL⁻¹ olarak belirlendi. Zimogram analizi ile *B. pumilus* Y7 katalazının esas aktivitesinin yanında ikincil bir peroksidatif aktivite sergilediği görüldü. Bu ikincil aktivite ayrıca spektrofotometrik analizle doğrulandı. Son olarak enzimin organik çözücülerdeki dayanıklılığı Metanol>Etanol>DMSO>Aseton olarak belirlendi.

B. pumilus Y7 bakterisi fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için farklı tuz konsantrasyonları, farklı pH ve sıcaklık değerlerinde büyütüldü ve artan değerlerin

hücre için bir stres ortamı yarattığı gözlemlendi. Optimum büyütme şeklinde ise birinci büyütme şeklinin hücrenin daha uzun süre log fazında kalmasına ve erlen içerisindeki hava miktarının fazla olmasından kaynaklı hücrelerin daha çok miktarda büyümesine imkan verdiği görüldü. Enzimlerin geleneksel olmayan bir saflaştırma yöntemi olan ve biyouyumluluk, düşük maliyet, yüksek gerikazanım gibi özelliklere sahip Sulu İkili Faz Sistemi (ATPS) ile saflaştırılması endüstriyel uygulamalar açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Saflaştırma işlemi için avantajlı olan bu sistemde artan PEG moleküler ağırlığı ve konsantrasyonu ve artan nötral tuz konsantrasyonu fazlar arasında enzimin çökmesine yol açarak saflaştırma katsayısı ve geri kazanım değeri üzerinde olumsuz bir etki sergiledi. Bu yüzden sistem parametreleri dikkatle seçilerek en optimum koşullar elde edildi. Karakterize edilen enzimin farklı sıcaklık ve pH aralıklarında, geniş sayılabilecek değerlerde reaksiyon ve stabilite özelliğine sahip olması endüstriyel uygulamalarda sürenin uzamasından kaynaklı olarak ortaya çıkabilecek olumsuzluklara karşı avantaj sağlayabilecek özelliktedir. Yine farklı organik çözücülere karşı gösterdiği dayanıklılıkta önem taşıyan bir diğer husustur. Çift aktivite özelliğine sahip olduğu düşünülen ve yüksek gerikazanımla elde edilen *B. pumilus* Y7 katalazının endüstriyel uygulamalara katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. İlerleyen çalışmalarda farklı metodlarla daha saf halde elde edilerek, MS (Kütle Spektrofotometresi) yöntemi ile protein dizilemesi gerçekleştirilebilir ve proteinler arası ilişkiler aydınlatılabilir. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) ve X-ışını kristalografisi yöntemleriyle ile enzimin 3 boyutlu yapıları oluşturularak moleküler düzeyde analiz yapılabilir ve böylece enzimin karakteristik özellikleri daha detaylı açığa çıkarılarak farklı efektörlerin ve substratların enzimde yapısal ne gibi değişikliklere yol açtığı belirlenebilir.

KAYNAKLAR

Adrio J. L., Demain A. L., Microbial enzymes: tools for biotechnological processes, *Biomolecules*, 2014, **4**(1), 117–139.

Ahuja S. K., Ferreira G. M., Moreira A. R., Utilization of enzymes for environmental applications, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2004, **24**, 125–154.

Andreu P., Collar C., Martinez-Anaya M. A., Thermal properties of doughs formulated with enzymes and starters, *Eur. Food Res. Technol.*, 1999, **209**, 286–293.

Arakawa T., Narhi L. O., Solvent modulation in hydrophobic interaction chromatography, *Biotechnology and Applied. Biochemistry*, 1991, **13**(2), 151-172.

Asenjo J. A., Andrews B. A., Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective, *Journal of Chromatography A.*, 2011, **1218**(49), 8826– 8835.

Ayhan K., *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, 2. basım, Sim Matbaası, Ankara, 2000.

Babizhayev M. A., Biological activities of the natural imidazolecontaining peptidomimetics n-acetylcarnosine, carbinine and Lcarnosine in ophthalmic and skin care products, *Life Sci.*, 2006, **78**(20), 2343–2357.

Babu B. R., Rastogi N. K., Raghavarao K. S. M. S., Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system, *Chemical Engineering and Processing*, 2008, **47**, 83–89.

Balasubramaniam D., Lysozyme separation from tobacco extract by aqueous two-phase extraction, Master of Science, Virginia Polytechnic Institute and State University, Science Institute, Virginia, 2003, 02192003-164258.

Bamberger S., Seaman G. V. F., Brown J. A., Brooks D. E., The partition of sodium phosphate and sodium chloride in aqueous dextran poly(ethylene glycol) two-phase systems, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1984, **99**, 187-193.

Berggren K., Nilsson A., Johansson G., Bandmann N., Nygren P. et al., Partitioning of peptides and recombinant protein–peptide fusions in thermoseparating aqueous two-phase systems: effect of peptide primary structure, *Journal of Chromatography B.*, 2000, **743**, 295–306.

Bhat M. K., Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnol. Adv.*, 2000, **18**, 355–383.

Bim M. A., Franco T. T., Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching, *Journal of Chromatography B*, 2000, **743**, 349-356.

Blum H., Beier H., Gross H.J., Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, 1987, **8**, 93-99.

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**, 248-254.

Buckingham K. W. C., Methods for the treatment and prophylaxis of diaper rash and diaper dermatitis, 1985, Patent No US4556560A, The Procter & Gamble Company.

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 J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **24**, 2269-2275.

Cao W., Kang Z., Liu S., Liu L., Du G., Chen J., Improved catalytic efficiency of catalase from *Bacillus subtilis* by rational mutation of Lys114, *Process Biochemistry*, 2014, **49**, 1497-1502.

Carvalho C. P., Coimbra J. S. R., Costa I. A. F., Minim L. A., Silva L. H. M. et al., Influence of the temperature and type of salt on the phase equilibrium of PEG1500/potassium phosphate and PEG1500/sodium citrate aqueous two-phase systems, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2007, **52**, 351.

Cascone O., Andrews B. A., Asenjo J. A., Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems, 1991, *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 629- 635.

Chelikani P., Fita I., Loewen P. C., Diversity of structures and properties among catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, **61**, 192-208.

Chen S., Su L., Chen J., Wu J., Cutinase: characteristics, preparation, and application, *Biotechnol Adv.*, 2013, **31**(8), 1754-1767.

Chesson A., Feed enzymes, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1993, **45**, 65-79.

Choct M., Enzymes for the feed industry: past, present and future, *Worlds Poult. Sci. J.*, 2006, **62**, 5-15.

Collar C., Martinez J. C., Andreu P., Effect of enzyme associations on bread dough performance: a response surface study, *Food Sci. Technol. Int.*, 2000, **6**, 217-226.

Dauter Z., Dauter M., Brzozowski A. M., X-ray structure of Novamyl, the five-domain 'maltogenic' α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution, *Biochemistry*, 1999, **38**, 8385-8392.

Diamond A. D., Hsu J. T., Aqueous two-phase systems for biomolecular separation, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 1992, **47**, 89-135.

Dong W., Hou Y., Li S., Wang F., Zhou J. et al., Purification, cloning, expression, and biochemical characterization of a monofunctional catalase, KatP from *Pigmentiphaga sp.* DL-8, 2015, **108**, 54-61.

Duman A. Y., Acemi A., Yuzugullu Y., Özen F., Separation of catalase from *Amsonia orientalis* with single step by aqueous two-phase partitioning system (ATPS), *Separation Science and Technology*, 2016, **52**(4), 691-699.

Fernandes P., Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysis, *Enzym Res.*, DOI:10.4061/2010/862537.

Fita A., Rodríguez-Burruezo A., Boscaiu M. et al., Breeding and Domesticating Crops Adapted to Drought and Salinity: A New Paradigm for Increasing Food Production, *Front Plant Sci.*, 2015, **6**, 978.

Frias J., Doblado R., Antezana J. R., Inositol phosphate degradation by the action of phytase enzyme in legume seeds, *Food Chem*, 2003, **81**(2), 233-239.

Garg G., Singh A., Kaur A., Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries, *3 Biotech*, 2016, **6**(1), 47-59.

Gautam S., Simon L., Partitioning of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature, *Biochemical Engineering Journal*, 2006, **30**(1), 104-108.

Gianfreda L., Xu F., Bollag J. M., Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes, *Biorem. J.*, 1999, **3**(1), 1-25.

Gioia J., Yerrapragada S., Qin X., Jiang H. et al., Paradoxical DNA Repair and Peroxide Resistance Gene Conservation in *Bacillus pumilus* SAFR-032, *PLoS ONE*, 2007, **9**, 1-4.

Goja M. A., Yang H., Cui M., Li C., Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation, *Bioprocessing & Biotechniques*, 2013, DOI: 10.4172/2155-9821.1000140.

Grossmann C., Tintinger R., Zhu J. D., Maurer G., Partitioning of some amino acids and low molecular peptides in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dipotassium hydrogen phosphate, *Fluid Phase Equilib.*, 1997, **137**, 209-228.

Gu Z., Glatz C. E., Aqueous Two-Phase Extraction for Protein Recovery from Corn Extracts., *J Chromatogr B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007, **845**(1), 38-50.

Hachem F., Andrews B. A., Asenjo J. A., Hydrophobic Partitioning of Proteins in Aqueous Two-Phase Systems., *Enzyme Microb. Tech.*, 1996, **19**(7), 507-517.

Han J. H., Lee C. H., Effects of salts and poly(ethylene glycol)-palmitate on the partitioning of proteins and *Bacillus subtilis* neutral protease in aqueous two-phase systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1997, **9**(1-2), 109-116.

Handtke S., Albrecht D., Zühlke D., Otto A. et al., *Bacillus pumilus katX2* confers enhanced hydrogen peroxide resistance to a *Bacillus subtilis katA*: *katX2* mutant strain, *Microb Cell Fact.*, 2017, DOI 10.1186/s12934-017-0684-y.

Hasan F., Shah A. A., Javed S., Hameed A., Enzymes used in detergents: Lipases, *Afr J Biotechnol*, 2010, **9**(31), 4836–4844.

Hatti-Kaul R., *Aqueous Two-Phase Systems-Methods and Protocols*, 11rd ed, Humana Press, New Jersey, 2000.

Have R. T., Teunissen P. J. M., Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi, *Chem Rev.*, 2001, **101**(11), 3397–3413.

He G., Zhang X., Tang X., Chen Q. et al., Partitioning and purification of extracellular β -1,3-1,4-glucanase in aqueous two-phase systems, *Journal of Zhejiang Universty Science*, 2005, **6**(8), 825–831.

Hemavathi A. B., Raghavarao K. S. M. S., Differential partitioning of β -galactosidase and β -glucosidase using aqueous two phase extraction, *Process Biochemistry*, 2011, **46**(3), 649-655.

Hochman A., Goldberg I., Purification and characterization of a catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*, *Biochim Biophys Acta.*, 1991, **1077**(3), 299-307.

Ibrahim M. A., Ghazy A. M., Masoud H. M. M., Catalase from larvae of the camel tick *Hyalomma dromedarii*, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2015, **4**, 411–416.

Ikram-ul-Haq, Ali S., Qadeer M. A., Biosynthesis of l-DOPA by *Aspergillus oryzae*, *Bioresour Technol.*, 2002, **85**(1), 25–29.

Isabel M., Otero C., Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose, *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **33**(1), 118-126.

Jia X., Lin X., Lin C., Lin L. et al., Enhanced alkaline catalase production by *Serratia marcescens* FZSF01: Enzyme purification, characterization, and recombinant expression, *Electronic Journal of Biotechnology*, 2017, **30**, 110-117.

Jia X., Lin X., Tian Y. et al., High production, purification, biochemical characterization and gene analysis of a novel catalase from the thermophilic bacterium *Ureibacillus thermosphaericus* FZSF03, *Int J Biol Macromol*, 2017, **103**, 89-98.

- Kandukuri S. S., Noor A., Ranjini S. S., Vijayalakshmi M. A., Purification and characterization of catalase from sprouted black gram (*Vigna mungo*) seeds, *Journal of Chromatography B*, 2012, **889**, 50–54.
- Kang Y. S., Lee D. H., Yoon B. J., Oh D. C., Purification and characterization of a catalase from photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1 grown under anaerobic conditions, *J. Microbiol.*, 2006, **44**(2), 185–91.
- Karigar C. S., Rao S. S., Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review, *Enzym Res*, DOI:10.4061/2011/805187.
- Karkaş T., İnvertaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için sulu ikili-faz afinite sistemlerinin geliştirilmesi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2009, 252648.
- Karkaş T., Onal S., Characteristics of invertase partitioned in polyethylene glycol / magnesium sulfate aqueous two-phase system, *Biochem. Eng. J.*, 2012, **60**, 142–150.
- Kavakcıoğlu B., Tarhan L., Initial purification of catalase from *Phanerochaete chrysosporium* by partitioning in poly(ethylene glycol)/salt aqueous two phase systems, *Separation and Purification Technology*, 2013, **105**, 8–14.
- Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C., Industrial enzyme applications, *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**, 345–351.
- Klibanov A. M., Tu T. M., Scott K. P., Enzymatic removal of hazardous pollutants from industrial aqueous effluents, *Enzym. Eng.*, 1982, **6**, 319–323.
- Klomklao S., Benjakul S., Viseesanguan W. et al., Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems, *Process Biochem.*, 2005, **40**, 3061–3067.
- Kocabas D. S., Bakir U., Phillips S. E., McPherson M. J. et al., Purification, characterization and identification of a novel bifunctional catalase–phenol oxidase from *Scytalidium thermophilum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **79**(3), 407–15.
- Kumar S., Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement, *Adv Appl Sci Res.*, 2015, **6**(6), 114–124.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I. et al., The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nature*, 1997, **390**, 249–256.
- La Duc M. T., Kern R., Venkateswaran K. Microbial monitoring of spacecraft and associated environments, *Microb Ecol*, 2004, **47**, 150–158.
- Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, 1970, *Nature*, **227**, 680–685.

Lang G., Cotteret J., Composition for the oxidation dyeing of keratinous fibres containing a laccase and dyeing method using, 2004, US2004255401 A, This composition.

Lee S. Y., Khoiroh I., Ling T. C., Show P. L., Aqueous Two-Phase Flotation for the Recovery of Biomolecules, *Separation & Purification Reviews*, 2016, **45**(1), 81-92.

Lei X. G., Stahl C. H., Nutritional benefits of phytase and dietary determinants of its efficacy., *J Appl. Anim. Res.*, 2000, **17**, 97–112.

Li J., Zhanga Y., Chena H., Liua Y. et al., Purification and characterization of recombinant *Bacillus subtilis* 168 catalase using a basic polypeptide from ribosomal protein L2, *Biochemical Engineering Journal*, 2013, **72**, 83-89.

Li S., Yang X., Yang S., Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering, *Comput. Struct. Biotechnol J.*, 2012, **2**, 1–11.

Loewen P. C., Switala J., Purification and characterization of spore-specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*, *Biochemistry and Cell Biology*, 1987, **66**(7), 707-14.

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**, 853-866.

Loncar N., Fraaije M., Not so monofunctional-a case of thermostable *Thermofibida fusca* catalase with peroxidase activity, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, **99**, 2225-2232.

Madhusudhan M.C., Raghavarao K. S. M. S., Aqueous two phase extraction of invertase from baker's yeast: Effect of process parameters on partitioning, *Process Biochemistry*, 2011, **46**, 2014–2020.

Mai C., Schormann W., Milstein O., Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2000, **54**(4), 510–514.

Manchenko G. P., Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels, vol 2., CRC Press, Florida, 2003. Merle P. L., Sabourault C., Richier S., Allemand D., Furla P., Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic sea anemone, *Free Radic Biol Med*, 2007, **42**(2), 236-46.

Mane P., Tale V., Overview of microbial therapeutic enzymes, *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2015, **4**(4), 17–26.

Merle P. L., Sabourault C., Richier S., Allemand D. et al., Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic anemone, *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, **42**, 236-246.

Mliki A., Zimmermann W., Purification and characterization of an intracellular peroxidase from *Streptomyces cyaneus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**(3), 916-9.

Mohamadi S. H., Omidinia E., Dinarvand R., Evaluation of recombinant phenylalanine dehydrogenase behavior in aqueous two-phase partitioning, *Process Biochemistry*, 2007, **42**(9), 1296–1301.

Monfort A., Blasco A., Sanz P., Expression of LIP1 and LIP2 genes from *Geotrichum* species in baker's yeast strains and their application to the bread-making process, *J Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 803–808.

Nalinanon S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H., Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems, *Process Biochem.*, 2009, **44**, 471–476.

Negrete A., Ling T. C., Lyddiatt A., Aqueous two-phase recovery of bio-nanoparticles: a miniaturization study for the recovery of bacteriophage T4, *Journal of Chromatography B.*, 2007, **854**, 13-19.

Neidleman S. L., Applications of biocatalysis to biotechnology, *Biotechnol Gen. Eng. Rev.*, 1984, **1**, 1–38.

Nguyen T. T. T., Le V. V. M., Effects of ultrasound on cellulolytic activity of cellulase complex, *International Food Research Journal*, 2013, **20**(2), 557-563.

Nicholls P., Classical catalase: Ancient and modern, *Arc. Biochem. Biophys.*, 2012, **525**(2), 95–101.

Ögel Z. B., Yüzügüllü Y., Mete S., Bakir U. et al., Production, properties and application to biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **71**(6), 853–862.

Pai J. S., Application of microorganisms in food biotechnology, *Ind. J. Biotech.*, 2003, **2**, 382–386.

Palomares M. R., Practical application of aqueous two phase partition to process development for the recovery of biological products, *J. Chromatogr. B*, 2004, **807**, 3–11.

Pedrini N, Juarez M. P., Crespo R., Alaniz M. J., Clues on the role of *Beauveria bassiana* catalases in alkane degradation events, *Mycologia*, 2006, **98**(4), 528–34.

Persson J., Somes N. L. G., Wong T. H. F., Hydraulics efficiency of constructed wetlands and ponds, *Water Science and Technology*, 1999, **40**(3), 291-300.

Phucharoen K., Hoshino K., Takenaka Y., Shinozawa T., Purification, characterization, and gene sequencing of a catalase from an alkali-and halo-tolerant bacterium, *Halomonas* sp. SK1, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, **66**(5), 955-962.

Piontek K., Smith A. T., Blodig W., Lignin peroxidase structure and function, *Biochem. Soc. Trans.*, 2001, **29**(2), 111–116.

Putnam C. D., Arvai A. S., Bourne Y., Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism., *J. Mol. Biol.*, 2000, **296**, 295–309.

Qureshi M. A., Khare A. K., Pervez A., Enzymes used in dairy industries., *Int. J. Appl. Res.*, 2015, **1**(10), 523–527.

Raj J., Prasad S., Bhalla T. C., *Rhodococcus rhodochrous* PA-34: a potential biocatalyst for acrylamide synthesis, *Process Biochem*, 2006, **41**, 1359–1363.

Raja S., Murty V. R., Thivaharan V. et al., Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules—A Review, *Science and Tech.*, 2010, **1**, 7-16.

Rehan M., Younus H., Effect of organic solvents on the conformation and interaction of catalase and anticatalase antibodies, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, **38**(3-5), 289–295.

Rito P. M., Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, **807**(1), 3-11.

Salabat A., Prediction of liquid-liquid phase diagrams of aqueous salt + PEG systems using a thermodynamic model, *Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry*, 2006, **30**, 296-300.

Sangar S., Pal M., Moon L. S., Jolly R. S., A catalase-peroxidase for oxidation of β -lactams to their (R)-sulfoxides, *Bioresour. Technol.*, 2012, **115**, 102-110.

Saravanan S., Rao J. R., Nair B. U., Ramasami T., Aqueous Two-Phase Poly(Ethylene Glycol)–Poly (Acrylic Acid) System for Protein Partitioning: Influence of Molecular Weight, Ph and Temperature, *Process Biochem*, 2008, **43**, 905-911.

Schallmeyer M., Singh A., Ward O. P., Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Can J Microbiol.*, 2004, **50**, 1-17.

Sertel A., İzmit ve Çevresindeki Topraklardan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2016, 455539.

Sevinc M. S., Mate M. J., Switala J., Fita I., Loewen P. C., Role of the lateral channel in catalase HPII of *Escherichia coli.*, *Protein. Sci.*, 1999, **8**, 490–498.

Silva M. E., Franco T. T., Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing - a review paper, *Braz. J. Chem. Eng.*, 2000, **17**, 1-30.

Singh R., Kumar M., Mittal A., Mehta K. P., Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, *Biotech.*, 2016, **6**, 174.

Sneath P. H. A., Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci, Editors: Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1104-1139, 1986.

Snyder S. M., Cole K. D., Szaig D. C., Phase compositions, viscosities and densities for aqueous two phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25° C, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 1992, **37**, 268–274.

Sooch B. S., Kauldhar B. S., Puri M., Recent insights into microbial catalases: Isolation, production and purification, *Biotechnology Advances*, 2014, **32**(8), 1429–1447.

Spelzini D., Farruggia B., Picó G., Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate: chymosin and pepsin, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2005, **821**(1), 60-6.

Srivastava N., Singh P., Degradation of toxic pollutants from pulp & paper mill effluent. *Discovery*, 2015, **40**(183), 221–227.

Su C. K., Chiang B. H., Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system, *Process Biochem*, 2006, **41**, 257–263.

Sutay Kocabas D., Bakir U., Phillips S. E. et al., Purification, characterization, and identification of a novel bifunctional catalase-phenol oxidase from *Scytalidium thermophilum*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **79**(3), 407-15.

Teng X., Chen N., Xiao X., Identification of a Catalase-Phenol Oxidase in Betalain Biosynthesis in Red Amaranth (*Amaranthus cruentus*), *Front. Plant Sci.*, 2016, **6**, 1228-1304.

Tubio G., Pico A. G., Nerli B. B., Extraction of trypsin from bovine pancreas by applying polyethyleneglycol/sodium citrate aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography B.*, 2009, **877**(3), 115-120.

URL-1: http://textbookofbacteriology.net/bacteriology_6.html, (Ziyaret tarihi: 24 Mart 2019).

URL-2: <https://www.hgsc.bcm.edu/bacillus-pumilus-safr-032>, (Ziyaret tarihi: 25 Mart 2018).

URL-3: https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa, (Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2018).

URL-4: https://web.expasy.org/compute_pi/, (Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2018).

Vaidya K. B., Suthan K. H., Kasture S., Nene S., Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two phase system, *Biochemical Engineering Journal*, 2006, **28**(2), 161-166.

- Valetti N. W., Picó G., A friendly method for *Raphanus sativus* L peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation. *Separation and Purification Technology*, 2013, **119**, 1–6.
- Vetrano A. M., Heck D. E., Mariano T. M. et al., Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase, *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(42), 35372-81.
- Walsh G. A., Power R. F., Headon D. R., Enzymes in the animal feed industry, *Trends Biotechnol*, 1993, **11**(10), 424–430.
- Walter H., Brooks D. E., Fisher D., *Partitioning in aqueous two-phase systems*, Academic Press, New York, 1985.
- Yao D., Liu L., Li J., Hua Z. et al., Overproduction of catalase by oxidative stress on *Bacillus subtilis* WSHDZ-01, *Chinese J Biotechnol.*, 2009, **25**(5), 786-792.
- Yucekan I., Onal S., Partitioning of invertase from tomato in poly(ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems, *Process Biochemistry*, 2011, **46**, 226–232.
- Yue H., Yuan Q., Wang W., Purification of phenylalanine ammonia-lyase in PEG1000/Na₂SO₄ aqueous two-phase system by a two-step extraction, *Biochemical Engineering Journal*, 2007, **37**, 231–237.
- Yuzugullu Karakus Y., Acemi A., Işık S., Duman Y., Purification of peroxidase from *Amsonia orientalis* by three-phase partitioning and its biochemical characterization, *Separation Science and Technology*, 2018, **53**(5), 756-766.
- Yuzugullu Y., Avcı D. Y., Aqueous Two Phase (PEG4000/Na₂SO₄) Extraction and Characterization of an Acid Invertase from Potato Tuber (*Solanum Tuberosum*), *Prep Biochem Biotechnol.*, 2015, **45**(7), 696-711.
- Yüzügüllü Y., Ögel Z. B., Çift aktiviteli katalaz- fenol oksidazın ve diğer katalazların gıda sanayisindeki önemi, *Gıda*, 2013, **38**, 111-118.
- Zaidi K. U., Ali A. S., Ali S. A., Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry, *Biochem Res Int*, DOI:10.1155/2014/854687.
- Zamocky M., Furtmüller P. G, Obinger C., Evolution of Catalases from Bacteria to Humans, *Antioxid Redox Signal*, 2008, **10**(9), 1527-1548.
- Zamocky M., Koller F., Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 1999, **72**, 19-66.



EK-A

Büyüme Ortamı Hazırlanması

Besiyeri 1 (Luria-Bertani Broth)

10 g Tripton

5g Yeast Ekstrakt

10 g NaCl

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

Besiyeri 2 (Sangar ve diğ., 2011)

0,5% Pepton

0,2% Beef Extract

0,1% Yeast Extract

0,5% NaCl

Oranlarında tartım yapılarak distile su ile tamamlanır ve otoklavlama işlemi gerçekleştirilir.

Besiyeri 3 (Nutrient Broth)

Ticari olarak satın alınan besiyeri belirtilen oranda ve gerekli miktarda tartılır. Son konsantrasyon uygun miktarda distile su ile tamamlanarak otoklavlama işlemi gerçekleştirilir. Ürün üzerindeki oran 1 litreye 8 gram toz besiyeri şeklindedir.

Nutrient Agar Besiyeri

Ticari olarak satın alınan besiyerinden uygun oranda tartım yapılır ve distile su ile son konsantrasyon tamamlanır. Ardından otoklavlama işlemi gerçekleştirilir. Ürün üzerindeki oran 1 litreye 20 gram toz besiyeri şeklindedir.

Solüsyonların Hazırlanışı

0,2 M Asetat Tamponu, pH 5,0 (pH 4,0 – 5,5)

54,43 g Sodyum asetat trihidrat

12 mL Glasial asetik asit

Belirtilen miktarlarda tartım yapıldıktan sonra üzerine 1988 mL distile su ilave edilir ve karıştırılır. Ardında pH metre ile kontrol edilerek son pH NaOH ve HCl kullanılarak ayarlanır.

0,2 M Sodyum Fosfat Tamponu, pH 7,4 (pH 6,0 – 8,0)

Monobazik 5,93 g

Dibazik 23,0 g

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ilave edilir ve pH 7,4'e ayarlanır.

0,1 M Sodyum Karbonat – Sodyum Bikarbonat Tamponu, pH 10,4 (pH 8,0 – 11,0)

1,05 g Sodyum bikarbonat

9,275 g Sodyum karbonat

EK-A (Devam)

Öncelikle sodyum bikarbonat üzerine 800 mL distile su ilave edilir ve çözündürülür. Sonra sodyum karbonat ilave edilir ve 1 litreye tamamlanarak tekrar karıştırılır.

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.

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.

NaOH (1M 100 ml): 4 g NaOH tartılır, 80 ml distile su içerisinde çözündürülür. Üzerine 100 ml’ye tamamlayacak şekilde distile su eklenir ve oda sıcaklığında saklanır.

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.

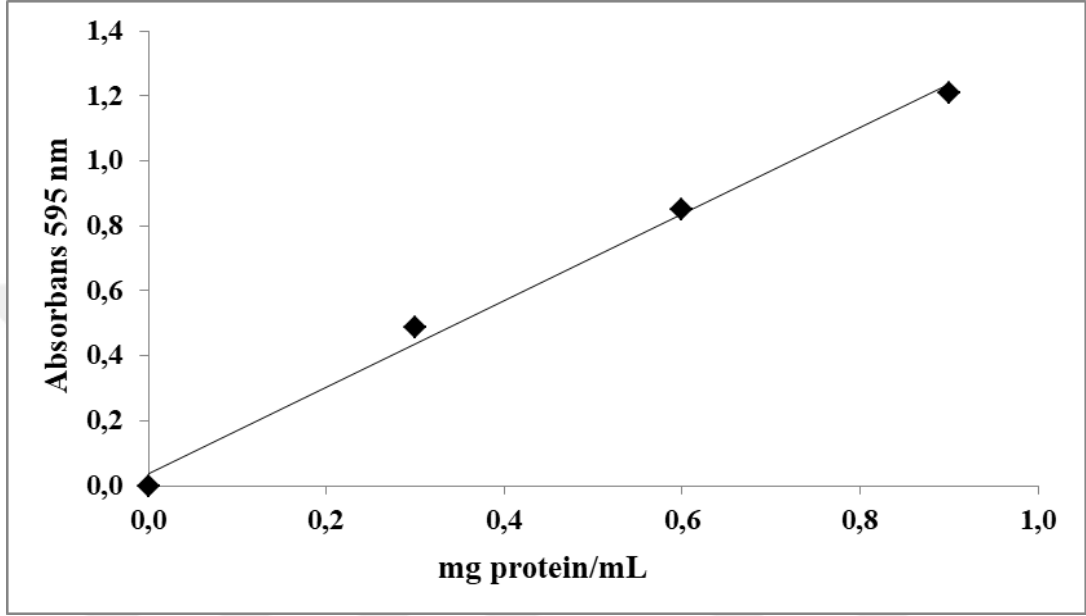
%10 v/v APS (Amonyumpersülfat): 10 g APS tartılır, 10 ml distile su içerisinde çözündürülür. 1 ml olacak şekilde ependorf tüplere aktarılır ve -80°C’de muhafaza edilir.

Tablo A.1. Deneyleerde kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka ve model
-80°C Ultra Derin Dondurucu	WiseCryo
Buzdolabı	Arçelik,5243 Biolab No-Frost
Saf Su Cihazı	Milipore,Direct-Q UV
Hassas Terazı	Scaltec SPB31
Vorteks	IKA, GENIUS3
Otoklav	HMC Hiclave HG-80
Dikey Elektroforez	Biorad
Elektroforez Güç Kaynağı	Biorad
Sonikatör	Qsonica/Q125/125W
UV Visible Spektrofotometre	Agilent Cary-60
Ultra Santrifüj	Sigma 4-17K
Mini Santrifüj	Eppendorf 5418
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, MR-HeiStandart
Sıvı azot tankı	MVE
Çalkalamalı İnkübatör	New Brunswick Scientific Excella E24
pH metre	Inolab WTW cond 3401
Etiv	Nüve FN500
Buz Makinası	Scotsman AF80

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 A.1. Protein miktar tayini, Standart BSA eğrisi

EK-B

Bacillus pumilus Y7 16srRNA Dizi Analizi Sonucu

İleri+Geri 1243bp

```
GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAAT
ACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGG
CTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAT
GGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
TGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGA
GAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAAACTTGAGTG
CAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCGC
TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGT
GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT
GACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGG
TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAA
GGTACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA
TCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAA
AGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGT
TCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT
CGCGGATC
```

Bacillus pumilus Y7 Biyokimyasal Karakterizasyonu

Tablo B.1. *B. pumilus* Y7'nin fenotipik özellikleri

BİYOKİMYASAL TEST	GÖZLEM
Koloni morfolojisi	Yuvarlak Düz-dalgalı Kabartı şeklinde Sarımsı Yağsı Opak 0.4cm
Gram boyama	Gram +
Endospor oluşumu	+ (merkezi)
Katalaz testi	+
Oksidaz testi	-
Ureaz testi	+
Glukoz	+
Laktoz	+
Sukroz	+
H ₂ S üretimi	-
Nişasta hidrolizi	+
Jelatin hidrolizi	+
Sitrat kullanımı	-
Indol formasyonu	+
Metil Kırmızısı	+
Voges-Proskauer	-
Büyüme ortamı	OD600 (nm)
30 °C	+ (0.356)
37 °C	+ (0.533)
45 °C	+ (0.525)
50 °C	+ (0.402)
55 °C	- (0.013)
60 °C	- (0.012)
pH 5,0	+ (1.994)
pH 5,5	+ (1.974)
pH 6,0	+ (1.996)
pH 6,5	+ (2.035)
pH 7,0	+ (2.064)
pH 7,5	+ (2.095)
pH 8,0	+ (1.958)
pH 9,0	+ (1.881)
pH 10,0	- (0.097)
pH 11,0	- (0.045)
pH 12,0	- (0.042)
1 % NaCl	+(2,198)
2 % NaCl	+(2,019)
3 % NaCl	+(1,874)
4 % NaCl	+(1,785)
5 % NaCl	+(1,571)
6 % NaCl	+(0,693)
7 % NaCl	-(0,368)
8 % NaCl	-(0,023)
9 % NaCl	-(0,020)
10 % NaCl	-(0,014)

katX2 Gen Dizisi Dizilimi

ATGACAAATTCAAATCATAAAAATTTGACAACGAACCAAGGCGTACCTG
TTGGCGATAATCAAAACTCAAGAACAGCTGGTCACCGCGGTCCTACATTT
CTTGATGATTACCATTTGATTGAAAAACTTGCACACTTCGATCGTGAACG
CATTCCAGAGCGTGTGTTTCATGCAAGAGGGCGCCGGCGCTTATGGTGTGT
TTGAAGTTGAAAATAGCATGGAGAAACATACAAAAGCTGCCTTCTTAAG
TGAAGATGGAAAACAGACAGATGTTTTTGTTCGCTTCTCTACCGTTATTC
ATCCTAAAGGTTACCTGAAACATTGCGTGATCCGCGCGGGCTTTGCTGTC
AAATTTTATACAGAAGAAGGCAACTATGATCTAGTTGGTAATAACTTGCC
GATCTTCTTTATACGTGATGCATTGAAATTCCTGATATGGTTCACTCTCT
CAAACCAGATCCTGTAACGAATATCCAAGATCCTGACCGTTATTGGGATT
TTATGACCTTAACACCTGAATCCACTCATATGCTCACATGGCTCTTCTCTG
ATGAAGGAATTCCTGCGAACTACGCTGAAATGCGCGGTTCTGGTGTGCAT
ACATTTAGATGGGTCAACAAATATGGAGAAACAAAATATGTGAAATATC
ACTGGAGACCTTCAGAAGGCATTCGTAATTTATCAATGGAAGAAGCAGC
AGAAATCCAAGCGAATGATTTCCAGCATGCGACAAGAGACTTATATGAC
CGCATTGAAAACGGCAACTATCCAGCCTGGGACTTATATGTCCAGTTGAT
GCCGCTGAGCGATTATGATGATCTTGATTATGATCCATGTGATCCAACAA
AGACATGGAGTGAAGAAGATTACCCGCTTCAAAAAGTAGGACGCATGAC
ACTGAACCGCAATCCTGAGAACTTCTTTGCTGAAACAGAGCAATCTGCTT
TCACACCAAGTGCACCTGTTCCAGGAATTGAAGCATCTGAAGATAAACTG
CTTCAAGGTCGTCTGTTCTCATATCCAGATACGCAGCGTCATCGTCTTGGT
GCCAACTATATGCGCATTCCGGTGAAGTGTCTTATGCACCTGTACACAA
TAATCAGCAGGATGGCTTTATGACAACGACTCGTCCAAGCGGTCATATTA
ACTATGAACCAAACCGTTACGATGATCAGCCAAAAGAAAACCCTCACTA
CAAGGAAAGTGAACAAGTCCTTACGATGATCGTATGGTGAGACAAAAA
ATTGAAAACCAAACGATTTCAAACAAGCTGGGGAAAAATATCGAAGCT
ACTCAGAAGAAGAGAAACAAGCATTGATCAAAAACCTAACAGCTGATCT
GAAAGACGTAAATGATAAAACAAAATTACTTGCGATCTGCAACTTCTATC
GTGCAGATGAAGATTACGGACAACGATTAGCCGATTCACTTGGCGTAGA
TATCCGCTCATAACCTTCAAGGAAACATGAAATAA

katX2 Amino Asit Dizisi Dizilimi

METTNSNHKNLTTNQGVPVGDNQNSRTAGHRGPTFLDDYHLIEKLAHFDRE
RIPERVHARGAGAYGVFEVENSMEKHTKAAFLSEDGKQTDVFRFSTVI
HPKGPETLRDPRGFAVKFYTEEGNYDLVGNNLPIFFIRDALKFPDMETVHSL
KPDVPTNIQDPDRYWDFMETTLTPESTHMETLTWLFSDGIPANYAEMETRG
SGVHTFRWVVKYGETKYVKYHWRPSEGIRNLSMETEEAAEIQANDFQHATR
DLYDRIENGNYPAWDLYVQLMETPLSDYDDLDDYDPCDPTKTWSEEDYPLQ
KVGRMETTLNRNPENFFAETEQAFTPSALVPGIEASEDKLLQGRLFSYPDTQ
RHRLGANYMETRIPVNCPYAPVHNNQQDGFMETTTTRPSGHINYEPNRYDD
QPKENPHYKESEQVLHDDRMETVRQKIEKPNDFKQAGEKYRSYSEEEKQAL
IKNLTADLKDVNDKTKLLAICNFYRADEDYGQRLADSLGVDIRSYLQGNME
TK

Teorik pI/MA: 4,95 / 59820,99 Da (www.expasy.org sitesinden hesaplanmıştır)



KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Işık S., Yuzugullu Y., Duman Y., *Bacillus pumilus* Y7 İzolatından Katalaz-Peroksidaz Enziminin Üretimi, 23. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Gaziantep, Türkiye, 5-9 Eylül 2016.

Yuzugullu Karakus Y., Acemi A., **Işık S.**, Duman Y., Purification of peroxidase from *Amsonia orientalis* by three-phase partitioning and its biochemical characterization, *Separation Science and Technology*, 2018, **53**(5), 756-766.

Işık S., Yüzügüllü Karakuş Y., *Bacillus pumilus* Y-7 izolatu katalazının sulu ikili faz yöntemi ile saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu, 19. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Eskişehir, Türkiye, 30 Kasım - 2 Aralık 2017.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2010 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2015 yılında mezun oldu. 2015 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.





