

***Aeribacillus pallidus* (P26) BAKTERİSİNDEN  
PEROKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI  
VE KİNETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Parham TASLİMİ**

**Yüksek Lisans Tezi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL  
2013**

**Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Aeribacillus pallidus* (P26) BAKTERİSİNDEN PEROKSİDAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Parham TASLIMI

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

ERZURUM  
2013

Her Hakkı Saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

*Aeribacillus pallidus* (P26) Bakterisinden Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Kinetiğinin Araştırılması

Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Parham TASLİMİ tarafından hazırlanan bu çalışma 18/01/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği (3/3)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hayrunisa NADAROĞLU

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU

Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

*Aeribacillus pallidus* (P26) BAKTERİSİNDEN PEROKSİDAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Parham TASLİMİ

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7), akseptör olarak rol yapan hidrojen peroksitin ve hidrojen atomlarının donörü olarak görev alan, başka bir bileşiğin de bulunduğu bir reaksiyonu katalize eden bir oksidoredüktazdır. Bu çalışmada peroksidaz enzimi (POD), Erzurum-Pasinler kaplıcasından izole edilen termofilik *Aerobacillus pallidus*'dan (P26) (Gen bank no:EU935591) ekstraselüler olarak üretilmiş, amonyum sülfat çöktürmesi, CM-Sephadeks iyon değişim kromatografisi ve Sephakil S200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında 4-metil katekol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ABTS, pirogallol substrat çiftleri kullanılarak her bir substrat için ayrı ayrı optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7.0, 60°C belirlenmiştir. Bu çalışmada en iyi aktivite veren pirogallol substratı kullanılarak stabilize pH ve sıcaklık değerleri tespit edilmiştir. Ayrıca her bir substrat için Lineveawer-Burk grafiklerinden yararlanılarak K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bunun yanında çalışmalarımızda peroksidaz enzimi aktivitesi üzerine etki eden bazı metal iyonları incelenmiştir. Enzimin molekül kütlesi 31 kDa olarak bulunmuştur. Bu işlemde ilgili enziminin bazı tekstil boyalarının atık sularda giderilmesi işlemini nasıl etkilediği incelenmiştir. Elde edilen bulgulardan saflaştırılan ve karakterize edilen peroksidaz enziminin katalaz-peroksidaz sınıfına ait olduğu tespit edilmiştir.

**2013, 68 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Peroksidaz, *Aerobacillus pallidus*, katalaz-peroksidaz, saflaştırma, karakterizasyon, pirogallol

## **ABSTRACT**

Master Thesis

### **PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE FROM *Aeribacillus pallidus* (P26)**

Parham TASLİMİ

Ataturk University  
Graduate School of Natural and Applied Science  
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet ADIGUZEL

Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7), which role as acceptor of hydrogen peroxide and hydrogen atoms acts as a donor. which catalyzes a reaction of another compound, including is an oxidoreductase. In this study, enzyme of peroxidase was produced extracellular from thermophilic *Aerobacillus pallidus* (P26) and isolated from the Erzurum-pasinler spring (Gen Bank NO: EU935591) and purified of ammonium sulphate, sephacril S200 gel in filtration chromatography, CM-sephadex ion changing chromatography and precipitation. In characterization studies, 4-metil katekol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ABTS, pyrogallol, substrate pairs were used separate optimum PH and temperature values were determined 7 and 60°C respectively. For each substrate, K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> values were calculated from Lineweaver-Burk graphs. For each substrate, effects of some metal ions on peroxidase activity was examined. Molecular mass of the enzyme was found as 31 kDa by using gel filtration. In this process, how rationed enzyme effected the process of removal of textile stains in waste water is examined. In addition to this, peroxidase enzyme found belonged to the class of catalase-peroxidase.

**2013, 68 pages**

**Keywords:** *Aerobacillus pallidus*, enzyme characterization, enzyme purification, peroxidase, pyrogallol, catalase-peroxidase

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım esnasında her türlü desteği sağlayan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, çalışmalarımın değerlendirilmesinde büyük emeği geçen, hiçbir zaman yardım ve desteklerini esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye (Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi), Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a (Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi ve Bölüm Başkanı) ve Sayın Doç. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na (Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksekokulu Öğretim Üyesi) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoloji Bölümü ve Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarında (Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) çalışan bütün arkadaşlarıma, ayrıca eğitimimin her aşamasında maddi, manevi desteklerini esirgemeyen anneme ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Parham TASLIMI

Ocak 2013

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....</b>	<b>17</b>
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler.....	17
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar .....	17
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....	18
3.2. Yöntemler .....	23
3.2.1. Protein tayini .....	23
3.2.1.a. Coomassie blue yöntemiyle protein tayini .....	23
3.2.1.b. Peroksidaz aktivitesi tayini.....	24
3.2.1.c. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi.....	24
3.2.2. Termofilik bakteri suşun izole edilmesi .....	25
3.2.3. <i>A. pallidus</i> (P26)'nın sıvı besi yerinde yetiştirilmesi ve homojenatın hazırlanması .....	25
3.2.4. Enzim saflaştırma işlemleri .....	26
3.2.4.a. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri.....	26
3.2.4.b. Enzim CM-sefadex A50 iyon-değişim kromatografisi ile saflaştırılması.....	27
3.2.4.c. Enzimin Sefakril S200 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması .....	27
3.2.5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.....	28
3.2.6. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	29
3.2.7. Enzimin stabil pH'nın bulunması.....	29
3.2.8. Optimum sıcaklığın belirlenmesi .....	30

3.2.9. Enzim stabilitesinin üzerine sıcaklığın etkisi .....	30
3.2.10. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığının tayini.....	30
3.2.11. $V_{max}$ ve $K_m$ değerlerinin belirlenmesi.....	31
3.2.12. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan üretilip saflaştırılan peroksidaz enzimin aktivitesi üzerine metal iyonların etkisinin incelenmesi .....	32
3.2.13. Endüstride kullanılan bazı boyaların POD enzimi ile etkileşimi .....	32
3.2.13.a. Endüstriyel boya standartlarının hazırlanması .....	33
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>34</b>
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri.....	34
4.2. <i>A. pallidus</i> (P26)'un Peroksidaz Üretme Kapasitesi .....	34
4.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi Sonuçları .....	35
4.4. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan Üretilip Saflaştırılan Peroksidaz Enzimlerinin CM- Sephadex İyon Değişim Kromatografisi İle Saflaştırma Sonuçları .....	35
4.4.1. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin CM-sefadeks iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonuçları .....	36
4.4.2. <i>A. pallidus</i> (P26) peroksidaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılma sonuçları .....	36
4.5. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan Ekstraselüler Olarak Üretilip Saflaştırılan Peroksidaz Enziminin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroferez Sonucu .....	38
4.6. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan Üretilip Saflaştırılan Peroksidaz Enziminin Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Molekül Ağırlık Tayin Sonuçları .....	39
4.7. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan Üretilip Saflaştırılan Peroksidaz Enzimlerinin Optimum pH Sonuçları .....	40
4.8. Peroksidaz Enziminin Stabil pH Çalışması Bulguları.....	41
4.9. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan Üretilip Saflaştırılan Peroksidaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları .....	42
4.10. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan Üretilip Saflaştırılan Peroksidaz Enziminin Sıcaklık Stabilitesi Sonuçları .....	43
4.11. Ekstraselüler Olarak <i>A. pallidus</i> (P26)'dan Saflaştırılan Peroksidaz Enziminin $V_{max}$ ve $K_m$ Değerlerinin Sonuçları .....	44



4.12. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan Ekstraselüler Olarak Saflaştırılan Peroksidaz Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Zn^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Hg^{2+}$ , Sitrik Asit ve Askorbik Asit'in etkisi.....	48
4.13. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan Ekstraselüler Olarak Saflaştırılan Peroksidaz Enzimi Kullanılarak Bazı Tekstil Boyarlarının Giderimi İle İlgili Sonuçlar .....	55
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>60</b>
KAYNAKLAR .....	64
ÖZGEÇMİŞ .....	69

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

A	Absorbans
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)
Ag <sup>+</sup>	Gümüş
APS	Amonyum per sülfat
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Santigrat derecesi
Ca <sup>2+</sup>	Kalsiyum
CAT	Katalaz
Co <sup>2+</sup>	Kobalt
CP	Katalaz-peroksidaz
Cu <sup>2+</sup>	Bakır
DEAE	Diethylamino ethyl
Dk	Dakika
E.C.	Enzim komisyonu
E.Ü.	Enzim Ünitesi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
Fe <sup>2+</sup>	Demir
g	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
Hg <sup>2+</sup>	Civa
I <sub>50</sub>	%50 İnhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
K	Potasyum
kDa	Kilodalton
M	Molar
Mg <sup>2+</sup>	Magnezyum
ml	Mililitre
MnP	Manganaz peroksidaz
Na <sup>+</sup>	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür

Pb	Kurşun
POD	Peroksidaz
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
TCA	Triklorasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
TSA	Tripticase soy agar
TSB	Tripticase soy broth
$\mu\text{l}$	Mikrolitre ( $10^{-6}$ )
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\text{Zn}^{2+}$	Çinko

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Michaelis–Menten grafiği.....	6
Şekil 1.2. Lineweaver-Burk grafiği .....	7
Şekil 1.3. Peroksidaz enzimin reaksiyon mekanizması .....	11
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik .....	34
Şekil 4.2. CM-Sephadeks iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak <i>Aeribacillus pallidus</i> (P26)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin 0,01 M (pH:6.5) fosfat tamponu içinde 0-1 M NaCl ile gradient elüsyonu .....	36
Şekil 4.3. <i>A. pallidus</i> (P26)'den peroksidaz enziminin Sephakril S200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasından elde edilen elüsyon grafiği .	37
Şekil 4.4. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı .....	38
Şekil 4.5. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi metodu ile molekül kütesinin belirlemek amacıyla kullanılan standart proteinlerin Kav değerlerine karşılık çizilen Log MA grafiği. ....	39
Şekil 4.6. <i>A. pallidus</i> (P26)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi .....	40
Şekil 4.7. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin pirogallol substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları.....	41
Şekil 4.8. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi .....	43
Şekil 4.9. <i>A. pallidus</i> (P26)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin pirogallol substratı ile stabil sıcaklığın belirlenmesi için belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları.....	44

<b>Şekil 4.10.</b> <i>A. pallidus</i> (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enziminin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği. ....	45
<b>Şekil 4.11.</b> <i>A. pallidus</i> (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enziminin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı pirogallol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği. ....	46
<b>Şekil 4.12.</b> <i>A. pallidus</i> (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enziminin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı hidrokinon substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği. ....	46
<b>Şekil 4.13.</b> <i>A. pallidus</i> (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enziminin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4- metil katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen 1/V-1/[S] grafiği. ....	47
<b>Şekil 4.14.</b> HgCl <sub>2</sub> 'nin <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	48
<b>Şekil 4.15.</b> CuCl <sub>2</sub> 'nin <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	49
<b>Şekil 4.16.</b> NiCl <sub>2</sub> 'nin <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	49
<b>Şekil 4.17.</b> ZnCl <sub>2</sub> 'nin <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	50
<b>Şekil 4.18.</b> CoCl <sub>2</sub> 'nin <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	50
<b>Şekil 4.19.</b> CaCl <sub>2</sub> 'nin <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	51
<b>Şekil 4.20.</b> MnCl <sub>2</sub> 'nin <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	51
<b>Şekil 4.21.</b> FeCl <sub>2</sub> 'nin <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	52
<b>Şekil 4.22.</b> KCl'nin <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	52
<b>Şekil 4.23.</b> BaCl <sub>2</sub> 'nin <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	53

<b>Şekil 4.24.</b> Askorbik asit'in <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	53
<b>Şekil 4.25.</b> EDTA'nın <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	54
<b>Şekil 4.26.</b> Reaktif Siyah 5 tekstil boyası için hazırlanan standart grafik .....	55
<b>Şekil 4.27.</b> Fuksin tekstil boyası için hazırlanan standart grafik .....	56
<b>Şekil 4.28.</b> Alura Kırmızısı tekstil boyası için hazırlanan standart grafik .....	56
<b>Şekil 4.29.</b> Asit Kırmızısı 37 tekstil boyası için hazırlanan standart grafik .....	57
<b>Şekil 4.30.</b> <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enziminin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Acid Red 37 gibi bazı tekstil boya larının atık sulardan giderilmesi işle mine etkisi .....	58
<b>Şekil 4.31.</b> <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enziminin Allura Kırmızısı ve Fuksin gibi bazı tekstil boya larının atık sulardan giderilmesi işleminin fotoğra fi .....	58
<b>Şekil 4.32.</b> <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enziminin Reaktif Siyah 5 ve Asit Kırmızısı 37 gibi bazı tekstil boya larının atık sulardan giderilmesi işleminin fotoğra fi .....	59

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Coomassie Blue ile protein tayininde kullanılan madde miktarları.....	23
Çizelge 3.2. Peroksidaz enzimin aktivitesi üzerine metal iyonların etkisini incelemek için maddelerin miktarları.....	32
Çizelge 3.3. Endüstriyel boya standartlarının hazırlanması.....	33
Çizelge 3.4. Boyar maddelerin absorpsiyon değerleri .....	33
Çizelge 4.1. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan peroksidaz enziminin saflaştırma basamakları.....	37
Çizelge 4.2. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler üretilip saflaştırılan peroksidaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasından elde edilen sonuçlar .....	42
Çizelge 4.3. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler üretilip saflaştırılan peroksidaz enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışmasından elde edilen sonuçlar .....	44
Çizelge 4.4. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzimi için yapılan $K_m$ ve $V_{max}$ çalışmasından elde edilen sonuçlar .....	47
Çizelge 4.5. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enzimi bazı metal iyonları ve kimyasallar için $I_{50}$ (mM) değerleri .....	54
Çizelge 4.6. <i>A. pallidus</i> (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enziminin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Acid Red 37 gibi bazı tekstil boyalarının atık sulardan giderilmesi işlemine etkisi .....	59

## 1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar optimum büyüme sıcaklıkları dikkate alındığında psikrofiller (20°C altında), mezofiller (20-55°C) ve termofiller (55°C üzeri) olmak üzere üç ana gruba ayrılırken (Coşkun 2010), Kristjansson and Stetter (1992), termofil grubu daha da genişleterek ekstremofil (60-80°C) ve hipertermofil (80°C üzeri) terimlerini eklemiştir.

Ekstremofil mikroorganizmalar arasında yer alan termofilik bakteriler, özellikle ısıya dayanıklı pek çok enzim ve metabolit içermelerinden dolayı günümüz için oldukça iyi potansiyel bir kaynaktır (Başbülül ve Bıyık 2010). Bu enzimler karakteristik olarak 40 °C'nin üstünde etkin bir aktivite gösterdiklerinden, biyoteknolojik açıdan büyük öneme sahiptirler (Rothschild and Mancinelli 2001; Gomes and Steiner 2004). Ayrıca bu termofilik mikroorganizmalar; yüksek sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu ve yüksek basınçlı ortamlara uyum sağladıklarından dolayı endüstriyel alanda sıkça kullanılırlar. Bu alanda en çok çalışılan mikroorganizmalar ise *Bacillus* cinsine aittir (Adıgüzel 2006). Termofilik basil proteinleri, sıcaklığa dirençli olmaları nedeni ile pek çok çalışmada model olarak kullanılmıştır. *B. subtilis* ve zorunlu termofil olan bir *Bacillus* sp. bakterisinden izole edilen enzimlerin, yüksek sıcaklık değerlerinde uzun süre aktivitesini kaybetmeden muhafaza ettiği belirlenmiştir. Bir başka çalışmada da *B. stearothermophilus* ve *B. cereus*'dan izole edilen 11 farklı enzim karşılaştırılmış, enzimlerin 9 tanesinin *B. cereus*'a ait enzimlerden daha stabil olduğu, buna rağmen piruvat kinaz, glutamat, oxaloasetat transaminaz'ın ise, mezofiller ile benzer sonuçlar gösterdiği tespit edilmiştir (Rüdiger vd 1995; Leuschner and Antranikian 1995; Vieille and Zeikus 1996; Friedrich and Antranikian 1996; Jorgensen *et al.* 1997).

Termofilik bakteriler, sahip oldukları enzim yapılarının özel katlanmalar içermesinden dolayı yüksek sıcaklık stabilitesine sahiptir. Ayrıca bu proteinler bazı kritik aminoasitlerce de zengindir. Yapılan çalışmalarda, termal kararlılığı artıran en az 13 tane farklı fiziksel ve kimyasal faktörün varlığı belirlenmiştir. Bu faktörlerden en önemlileri; tuz köprüleri, hidrojen bağları, protein dizisinde yer alan prolin miktarı fazlalığı ve gilisinin miktarının azlığıdır (Tsou 1988; Jaenicke 1991).



Enzimler, canlı organizmadaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve protein yapısında olan biyokatalizörlerdir (Lehninger *et al.* 2005; Altıkatoğlu vd 2009; Voet and Voet 2010). Bir canlıdaki parçalanma ve sentez reaksiyonlarının tümü enzimlerin katalitik aktiviteleri ve yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir. Ayrıca enzimler canlılığın oluşumu ve devamı için gerekli protein yapısındaki maddelerdir. Canlı dışında, *in vitro* olarak da aktivite göstermeleri enzimlerin önemini bir kat daha artırmaktadır. Enzim üretimi genlerin kontrolü altında gerçekleştirilmekte ve her enzimin kendine özgü sıcaklık, iyon tepkimesi, pH ve basınç koşulları bulunmaktadır (Karlson and Telefoncu 1998).

Enzimatik reaksiyonların hızlarını; sıcaklık, pH, zaman, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu ve inhibitör gibi faktörler etkilemektedir (Daniel *et al.* 2010).

Sıcaklık enzimatik reaksiyonları hızlandıran faktörlerden birisi olup, normal şartlar altında enzimlerin çoğu 50-60°C gibi sıcaklıklarda denatüre olmaktadır. Doğal sıcak su kaynaklarında çoğalmak üzere adapte olan mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, suyun kaynama noktasına yakın aktivitelerini kaybetmeyip, optimal sıcaklık gösterirler. Sıcaklık artışı belirli bir yere kadar aktiviteyi artırır, daha sonra aktivitede düşüş başlar. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilir (Daniel *et al.* 2010).

Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri değişmektedir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'ya, o enzimin optimum pH'sı adı verilir. Enzimatik çalışmalarda pH'yı optimumda sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu konsantrasyonunu elverişli durumda muhafaza etmek için tamponlar kullanır. Optimum pH'nın her iki yanındaki pH değerlerinde aktivite kaybı söz konusudur. Bunun nedenleri, pH değişimine bağlı olarak enzimin ya da substratın taşıdığı yüklü grupların tabiatının değişimi ve enzim denatürasyonu'dur (Altunkaya ve Gökmen 2011).

Bir enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyon sürerken, reaksiyonun hızı giderek düşer.

Bunun nedenleri;

- Ürünlerin birleşerek aksi yöndeki reaksiyonu işletmeleri
- Substratın tükenmesi
- Enzimin zamanla inaktive olması
- Reaksiyonu önleyen maddelerin oluşumu olabilir

Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık %10'unun sarf edildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir (Khatun *et al.* 2012).

Ayrıca, enzim substratına karşı doygunluğa ulaştığında reaksiyon hızı değişmeden devam eder. Bu durumda enzim maksimum hız ile çalışıyor demektir. Maksimum hız  $V_{max}$  ile gösterilir. Enzim maksimum hız ile çalışırken enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat konsantrasyonuna Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) denilmektedir. Ayrıca substrat ilave edildikçe hız giderek daha az artar ve belirli bir  $V_{max}$  düzeyinde sabit kalır (Thongsook and Barrett 2005).

Enzimatik çalışmalarda, enzim miktarı arttıkça reaksiyon hızı o ölçüde artar. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterince substrat bulunmadığı için reaksiyon o derece yüksek düzeyde meydana gelmez. Substratın bol olduğu koşullarda enzim konsantrasyonu reaksiyon hızı ile doğru orantılıdır (Al-Senaidy and Ismael 2011).

İnhibitörler, enzimatik tepkimelerin hızını azaltan maddelerdir. Bunlar; substratın enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önlerler (Turgut 2009).

Biyokimyasal katalizör olarak bilinen enzimler, reaksiyon hızını  $10^{20}$ 'ye kadar artırırken, diğer katalizörler  $10^2$ - $10^3$  kadar arttırabilmektedir. Enzimler sadece canlı hücreler tarafından sentezlenir. Bu enzimlerin bir kısmı hücre içinde kalır ve burada fonksiyon gösterir. Bu tip enzimlere “*intraselüler*” (hücre içi) enzimler denir. Bazı enzimler ise hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınır ve burada fonksiyon gösterir. Bunlara ise “*ekstraselüler*” (hücre dışı) enzimler denir (Lehninger *et al.* 2005; Voet and Voet 2010).

Enzimler;

- Bazı enzimler, yalnızca proteinden yani amino asitlerden oluşmuştur.
- Bazı enzimlerin yapısında proteinin yanısıra organik veya inorganik maddeler yer almaktadır. Protein yapısında olmayan bu maddelere kofaktör adı verilmektedir.
- Kofaktörü ile birleşmiş ve aktif halde bulunan enzimlere “*haloenzim*” adı verilmektedir.

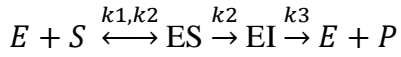
Enzim tarafından değişikliğe uğratılan maddelere “*substrat*” denir. Substratlar enzimde “aktif merkez” denilen özel bir cep şeklindeki bölgeye bağlanırlar. Polipeptit zincirinin belirli kısımlarının özel katlanmaları sonucu oluşan aktif merkez, katalitik aktiviteden sorumludur (Karlson and Telefoncu 1998).

Enzimlerde aktif merkezin bazı özellikleri;

- Aktif merkez, Enzimin protein kısmında yer alır.
- Aktif merkez, Enzimin toplam hacminin çok küçük bir bölümünü oluşturur.
- Bazı enzimler, birden fazla sayıda aktif merkez içerir.
- Substrat aktif merkeze H-bağları, Van-der Waals ve elektrostatik güçlerle çok zayıf olarak bağlanır.
- Aktif merkez, belirli çeşit sayı ve dizilişte aminoasitlerden oluşur.

Enzimler tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyonların bilimine “Enzim kinetiği” denir. Enzim kinetiğinde reaksiyon hızı ölçülür ve reaksiyon şartlarını değiştirmenin etkisi araştırılır. Bir enzimin kinetiğinin bu şekilde çalışılması enzimin katalitik mekanizmasını, metabolizmadaki rolünü, aktivitesinin inhibitör veya aktivatörler tarafından nasıl kontrol edebileceğini ortaya koyabilir (Lehninger 2005; Voet and Voet 2010).

Enzim kinetiği mekanizması şu şekilde gösterilir;

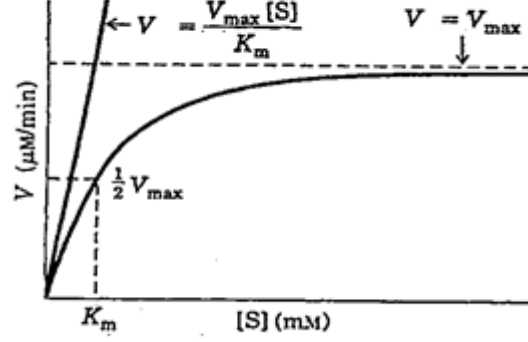


Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağıllığı incelenir.

Michaelis-Menten Bağıntısı şu şekilde tanımlanır;

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \text{ (Michaelis–Menten denklemi)}$$

Burada  $V_{max}$ ; hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına ( $V_{max}/2$ ) karşılık gelen substrat derişimi  $K_m$  (Michaelis–Menten sabiti) olarak belirtilir.  $V_{max}$  ve  $K_m$ , bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir (Menten and Michaelis 1913).

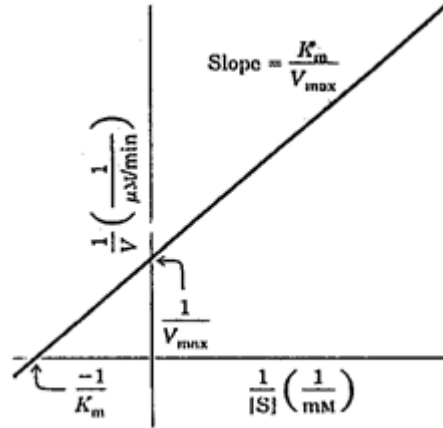


**Şekil 1.1.** Michaelis–Menten grafiği

Michaelis–Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ( $[S] \ll K_m$ ) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede  $[S] \gg K_m$ 'dir.  $V = V_{max}$  olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denkleme dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılan eşitlik, aşağıda formülize edilen Lineweaver-Burk denklemdir (Lineweaver and Burk 1934).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Michaelis-Menten denklemi; bir hiperbolik eğrinin denklemi olmasından ve hiperbolik eğrinin karakteristik noktalarını belirlemek zor olduğundan, bir enzime ait  $V_{max}$  ve  $K_m$ 'yi deneysel olarak incelemeyi kolaylaştırmak için grafiği doğrusal olan başka denklemler de önerilmiştir. Bunlardan Michaelis-Menten denklemini tersine çevirip çarpanlarına ayırmakla elde edilen *Lineweaver-Burk* denklemi, en sık kullanılanıdır (Lineweaver and Burk 1934).



**Şekil 1.2.** Lineweaver-Burk grafiği

İlk olarak geleneksel yöntemle enzimler substratlarının adına veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime / sözcük grubuna “az” son eki eklenerek adlandırılırlar. Ancak yeni sınıflamada enzimlere, Enzim Kod (E.C.) numarası olarak 4 haneli bir numara verilmektedir. İlk numara enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu, ikinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı veya fonksiyonel grubu, üçüncü numara akseptörü, dördüncü numara ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasına aittir.

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler, altı büyük sınıfa ayrılırlar, her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır (Turgut 2009);

1. Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme-indirgenme (elektron transferi) reaksiyonlarını katalize ederler.
2. Transferazlar: Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferini katalize ederler.
3. Hidrolazlar: Su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize ederler.
4. Liyazlar: C-C, C-O ve belli C-N bağlarının yıkımını katalize ederler.
5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri (izomerik şekil oluşumu reaksiyonları) katalize ederler.

6. Ligazlar: Yüksek enerjili fosfatların hidrolizi ile birlikte yürüyen karbon ve O, S, N arası bağ oluşumunu katalizlerler.

Biyoteknolojik uygulamalarda enzimlerin yüksek sıcaklıklarda hızlı inaktivasyonu büyük bir problem oluşturmaktadır. Enzimlerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için çalışma koşullarında uzun süre stabil olmaları gerekmektedir. Enzimler protein mühendisliği, immobilizasyon teknikleri, stabilize edici katkı maddeleri ya da kimyasal modifikasyon yöntemleri ile uygulama koşullarında daha dirençli bir yapıya getirilmektedir (Altıkatoğlu vd 2009).

Endüstriyel alanda, özellikle enzimatik ve biyokimyasal reaksiyonlarda kullanılan termofilik enzimler şu özelliklere sahiptir (Adıgüzel 2006);

1. Termofilik organizmalardan elde edilen enzimlerin termostabil özelliklerine bağlı olarak raf ömürleri uzundur.
2. Denatüre edici ajanlara karşı daha dirençlidirler. Bu özelliği organik çözücülere yüksek ve düşük pH'ya karşı gösterdikleri direnç mekanizmasıyla sağlarlar.
3. Uygun olmayan şartlarda çoğalabildiklerinden, genel bir direnç mekanizmasına sahiptirler.
4. Viskoziteyi ve çözünürlüğü artırırlar.
5. Mezofilik şartlarda gelişen patojen mikroorganizmalar yüksek sıcaklık değerlerinde aktivitelerini kaybettiklerinden, mikrobiyal kontaminasyon engellenmiş olur.
6. Kararsız bileşikler tarafından reaksiyonların engellenmesini önlerler.

Modern enzim teknolojisi; gıda sanayinde, yiyeceklerin korunması, ham materyallerin daha etkili kullanılmasında, yiyeceklerin görüntü ve tat gibi özelliklerinin değiştirilerek kalitesinin artırılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca, termofilik enzimler ilaç, yem, dericilik, kağıt, kozmetik sanayide ve ksenobiyotiklerin giderilmesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bunun yanı sıra enzimler çevre kirliliği alanında da etkilidirler. Özellikle işlem maliyetini düşürmek ve çevreye zararlı maddelerin gideriminde kullanılmaktadır (Rao *et al.* 1998; Wolfgang 2004).

Peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7), hidrojen atomlarını vermek eğiliminde olan bileşikler ile bu atomları alıcı durumunda olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bileşiği arasındaki reaksiyonu katalizleyen bir oksidoredüktazdır (Fodil *et al.* 2012).

POD, hidrojen peroksiti kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizlerken, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonid aminler gibi fenolik ve fenolik olmayan çok sayıda bileşiğin dehidrogenasyonunu da katalizler. Bu moleküller arasında 2-kresol, 2-toluidin, guaiakol, pirogallol, lökomalaşit yeşili, 4,4'-diaminodifenilen amin, propiyonil promozin, benzidin, o-tolidin, di-o-anisidin ve bazı azo-boya türevleri sayılabilir (Fortea *et al.* 2011; Fodil *et al.* 2012).

Peroksidazlar (lignin peroksidazları, mangan peroksidazları, myeloperoksidaz, bromoperoksidaz, katalaz-peroksidaz, askorbat peroksidaz ve mangan-bağımsız peroksidazları içerisine alır), lakkaz ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşturan oksidazlar, lignin biyoyıkımını gerçekleştiren enzim sistemlerinin bileşenleridirler. Peroksidazların ekstraselüler lokasyonları ve endüstriyel uygulamalardaki potansiyeli (bu potansiyelin çoğu, *Phanerochaete chrysosporium* gibi *Basidiomycota* grubu funguslara ait peroksidazların lignin üzerine etkisini kapsamaktadır) yakın geçmişte fungal peroksidazlar üzerine yapılan çalışmalar sayısını arttırmıştır. *P. chrysosporium* türü kullanılarak üzerinde en fazla çalışma yapılan peroksidaz çeşidi; lignin ve mangan-bağımlı peroksidazdır (Jassey *et al.* 2012).

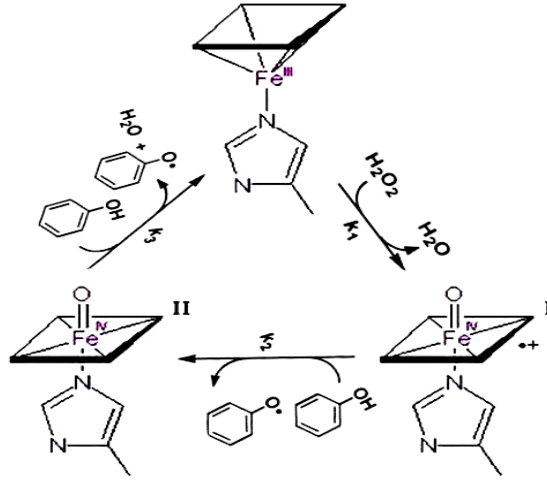
Birinci sınıf içerisinde yer alan enzimler intraselüler peroksidazlardır. Bu grup: mitokondriyal elektron transfer zincirinde bulunan ve muhtemelen toksik peroksidazlara karşı koruma sağlayan, çözünebilir bir protein olan maya sitokrom c peroksidazını; gelişmiş bitkilerdeki kloroplastlar ve sitozoldeki hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasından sorumlu ana enzim olan askorbat peroksidazları, hem peroksidaz hem de katalaz aktivitesi sergileyen bakteriyel peroksidazları içerisine alır (Mittler and Zilinskas 1994; Shigeoka *et al.* 2002; Shi *et al.* 2008).



İkinci sınıfta ise, lignin peroksidazlar ve mangan-peroksidazlar gibi salınan fungal peroksidazları içerisine alır. Bunlar ligninin yıkımında rol alan monomerik glikoproteinlerdir. Mangan peroksidaz söz konusu olduğunda  $Mn^{2+}$  indirgeyici substrat olarak görev yapar (Fodil *et al.* 2012). Lignin peroksidazların izo-formları, lignin ve ilişkili bileşiklerin depolimerizasyonunun başlangıcında merkezi bir rol oynarlar ve azo-boyalar ile diğer aromatik kirleticiler üzerinde de etki gösterebilirler. Lignin peroksidazların, veratril alkolü veratraldehite okside ettikleri de bilinmektedir (Kirk and Farrell 1987; Thakker *et al.* 1992). Mangan-peroksidazlar, aynı zamanda lignin ve bir grup fenolik lignin model bileşiklerinin oksidasyonu ve depolimerizasyonunu da hidrojen peroksit aracılığı ile katalizlemektedir (Heinfling 1998; Janusz *et al.* 2013).

Üçüncü sınıf üyelerini ise, salınan bitkisel peroksidazlar oluşturur. Üçüncü sınıf peroksidazlar da, monomerik glikoprotein yapısındadır. Bu sınıf hurma yaprakları, brokoli, lahana, arpa, bezelye, pamuk, çilek gibi birçok bitki peroksidazını içeren geniş bir bitki profilini kapsamaktadır (McLellan and Robinson 1987; Halpin *et al.* 1989; Lee and Klein 1990; Triplett and Mellon 1992; Civello *et al.* 1995; Kristensen 1999; Deepa and Arumughan 2002; Thongsook and Barrett 2005; Nadaroğlu 2009).

Peroksidaz; bir oksidoredüktaz olup  $H_2O_2$  ile çeşitli elektron donörlerinin oksidasyonunu katalize eder ve prostetik grup olarak 'b'-tip heme taşır. Bu mekanizmada enzim, Fe içeren bir porfirin katyon radikalı olan bileşik biri oluşturmak için peroksitin bir ekivalenti ile reaksiyon verir. Bu iki elektronlu bir yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonu olup bu reaksiyondaki hidrojen peroksit suya indirgenirken enzimde yükseltgenmektedir. Bir oksitleme ekivalenti ortadaki oksiferrili vererek demir üzerine yerleşir. Bileşik II sonra I substrat radikalı vermek için organik substratı yükseltger. I, II ürününü vererek ikinci bir reaksiyona maruz kalır. Bileşik II normal bir porfirin ligand için düzenlenmiş oksiferril bir merkez içerir. Sonuç olarak bileşik II diğer substratla etkileşerek doğal haline geri indirgenir (Battistuzzi *et al.* 2012).



**Şekil 1.3.** Peroksidaz enzimin reaksiyon mekanizması (Turgut 2009)

Peroksidazlar ayrıca, geniş endüstriyel uygulamalara sahip olan bir enzimdir. Peroksidazlar pH, DNA, çinko, bakır ve diğer metallerin belirlenmesinde, gıda prosesi süresince şekillenen reaktif oksijen türleri için de indikatör, fenollü reçine sentezleri için ise katalizör, olarak kullanılmaktadır. Ayrıca peroksidaz enziminin, endüstriyel atık sularının işlenmesinde, yapıştırıcılarda, bilgisayar çipleri, araba parçaları ile konserve kutuları ve davul astarları gibi çoğu üretim proseslerinde kullanımı hakkında birçok araştırma bulunmaktadır (Khatun *et al.* 2012).

POD enzimi sağlık alanında, bağışıklık analiz kitlerinde ve laboratuvar deneylerinin klinik teşhisi için belirteçlerin önemli bir bileşeni olarak geniş bir şekilde kullanılmaktadır. POD atık sularda oluşan toksik fenollerin bozulmasında, sentetik boyaların renk giderilmesinde, organik çözücülerde fenollerin polimerizasyonunu katalize edebilir. Son zamanlarda POD enzimi, deterjan formülasyonunun katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Peroksidazlar aynı zamanda çeşitli polimerleri sentezlemek, organik moleküllerin stereospesifik biyotransformasyonunu ilerletmek ve biyotedavi dolayısıyla serbest radikallere yol açan gittikçe artan çekici katalizörlerdir (Humaira and Qayyum 2010).

Pamuk elyafının bünyesinde pigment halinde bulunan renkli maddeler, ham pamuğun sarı/kahve renk/renklerinin oluşumundan sorumludur. Pişirme ve müteakip yıkamalar

ile temiz elde edilse de, az miktarda pigment hala malzeme üzerinde kalmaktadır. Bu nedenle boyanacak ürünlerin önemli bir miktarı için ağartma işlemi gerekmektedir. Baskı yapılacak veya beyaz olarak kullanılacak malzemeler için ağartma şarttır. Pamuk üzerinden pigment boyar maddesini uzaklaştırmanın en iyi yolu oksidasyondur. Oksidan madde olarak sodyum hipoklorit ( $\text{NaClO}$ ), sodyum klorit ( $\text{NaClO}_2$ ) veya hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kullanılır. Günümüzde en yaygın kullanılan ağartıcı kimyasal hidrojen peroksittir. Endüstride iplikler üzerine fazla miktarda hidrojen peroksit uygulanır ve ağartma işlemleri bittikten sonra bile ortamda hidrojen peroksit bulunur. Bu nedenle, ön terbiye işlemi bitirilmeden önce ortamdaki hidrojen peroksitin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için çok defa yıkama yapmanın yeterli olacağı düşünülse de, çevreye verilecek hidrojen peroksitin ekolojik zararları nedeniyle günümüzde, hidrojen peroksitin peroksidaz enzimi yardımı ile parçalanması yoluna gidilmiştir. Böylece boyama işlemi öncesi kullanılan hidrojen peroksit, durulamaya gerek kalmadan enzimatik tepkime ile su ve oksijene dönüştürülür ve böylece çevreye verebileceği muhtemel zararın önüne geçilmiş olur (O'Neill *et al.* 2000).

Günümüzde 100.000'in üzerinde sentetik boya ticari olarak kullanılmakta ve yılda 700.000 ton boya üretimi yapılmaktadır. Bu boyaların %10-15'i boyama prosesleri sonucunda atık su ile çevreye verilmektedir (Wong *et al.* 1999). Ortama verilen bu tekstil boyar maddelerinin tüm canlılar üzerinde olumsuz etkileri bilinmektedir (Soares *et al.* 2001; Friedrich *et al.* 2005).

Farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemler ve ya bunların kombinasyonları kullanılmasına rağmen bütün bu yöntemler tekstil atık suyunun arıtılmasında çöketkili olamamaktadır. Son dönemlerde uygun mantarlar ya da bakteriler kullanılan mikrobiyal arıtım yöntemleri üzerinde çalışmalar sürmektedir. Oksijensiz ortamlarda, atıksuyun renginin giderilmesi işlemlerinde çoğunlukla çeşitli bakteri suşlarının birleşimi kullanılmaktadır (Gottlieb *et al.* 2003). Ancak böylesi boyaların parçalanması ile zehirli aminlerin meydana çıkması ile sonuçlanır. Bu nedenle, bu bileşiklerin oksijenli ortamda oksidatif olarak parçalanması önerilir (O'Neill *et al.* 2000).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yüksek sıcaklıklarda yaşamın keşfi ve Yellowstone Ulusal parkından *Thermus aquaticus*'un izolasyonu ve karakterizasyonu biyoteknoloji alanında büyük bir çığır açmıştır. Bunu mütakiben özellikle *T. aquaticus*'un ticari alanda sağlamış olduğu başarı bilim insanlarını, henüz tespit edilmemiş veya belirlenmiş olan jeotermal alanlardaki termofilik mikroorganizmaların izolasyon, tanılama ve bunlardan endüstriyel önemi olan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarına yönlendirmiştir (Gudelj *et al.* 2001; Lindstrom *et al.* 2002; Younes *et al.* 2011).

Endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan enzimlerin büyük bir bölümü mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Bunun temel nedeni; mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvan kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, daha stabil, ucuz olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajlara sahip olmalarıdır (Güven 2011).

Katalaz peroksidaz enzimi; hem grubu içeren, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in uzaklaştırılmasında rol oynayan, aktif bölgesinde genellikle 2 hem grubu ihtiva eden bir enzim olup, reaksiyon mekanizmasını aktif bölgelerde yer alan tirozin ve histidin rezüdüleri üzerinden gerçekleştirmektedir (Vidossich *et al.* 2012). Endüstriyel alanda yaygın şekilde kullanılan peroksidaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve endüstriyel kullanım alanlarının araştırılmasına yönelik çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir:

Loprasert *et al.* (1988) tarafından yapılan çalışmada; termostable peroksidaz enzimi, *Bacillus stearothermophilus* organizmasından amonyum sülfat çöktürmesi ve jel kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. İlgili enzimin optimum pH'sı 6.0, optimum sıcaklığı ise 70°C olduğu, ayrıca bir ay boyunca 30°C'de stabilitesini koruduğu belirlenmiştir. İlgili enzim 2,4-diklorofenol - 4-aminoantipirin karışımına karşı aktivite gösterdiği, ayrıca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrat olarak kullanıldığında ise K<sub>m</sub> değerinin 1,3 mM olduğu tespit edilmiştir.

*Bacillus* suşundan elde edilen katalaz-peroksidaz (CP) enzimi ise amonyum sülfat, jel filtrasyon-kromatografi teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan CP'nin molekül ağırlığının 165 kDa olduğu ve 2 alt birimden oluştuğu belirlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratı için enzimin K<sub>m</sub> değerinin 2.6 mM ve K<sub>cat</sub> değeri ise 11.475 s<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca CP enzimini azid ve siyanid maddelerinin inhibe ettiği belirlenmiştir (Gudelj *et al.* 2001).

Aptiz and Vanpee (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, termostable intrasellüler olarak peroksidaz (POD) enzimi, *B. sphaericus* organizmasından elde edilmiş ve ilgili enzimin aktivitesi guaiakol ve 2,4-diklorofenol substratlarıyla belirlenmiştir. Bu enzimin molekül ağırlığının 13 kDa (dimer) ve 26 kDa (tetramer), enzimin optimum pH'sının ise 8,5 olduğu bulunmuştur. Ayrıca, enzimin 90°C sıcaklığa ve pH 11'e kadar stabilitesini koruduğu tespit edilmiştir.

Kanayama *et al.* (2002) tarafından yapılan çalışmada, alkalın manganaz peroksidaz (MnP) enzimini *Aspergillus terreus*'tan extrasellüler olarak izole edilmiştir. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE sonucunda yaklaşık 43 kDa büyüklüğünde tek bant verdiği tespit edilmiştir. MnP enziminin, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin ise sırasıyla pH: 12.5 ve 37°C olduğu, ayrıca Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> gibi bazı metal iyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir.

Oliveira *et al.* (2009) yaptıkları bir çalışma ile, MnP enzimini *B. pumilus* ve *Paenibacillus* suşundan izole edilmiş ve indulin AT, guaiacol, veratril alkol, lignosülfonik asit substratları kullanılarak aktivite ölçümü yapılmıştır. Saf MnP enziminin aktivitesi üzerine pH (5-10 arası) ve sıcaklığın (30-60°C arası) etkisi araştırılmıştır. Sonuçta, MnP'nin 25-40 kDa ağırlığında ve enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH - sıcaklık değerlerinin ise sırasıyla 8.0 ve 25°C olduğu belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada, reaktif kırmızı 198, reaktif mavi 214, reaktif mavi 21 boyar maddelerinin atık sulardan gideriminde *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 kullanılmıştır. Test izolatının direkt olarak kullanıldığı bu çalışma sonucunda; üç boyar

maddenin renginin, yüksek katalaz peroksidaz aktivitesi sonucunda etkin bir şekilde giderildiği görülmüştür (Bergsten *et al.* 2009).

Si and Cui (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, *Perenniporia subacida*'dan peroksidaz enzimi; amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişimi ve sefaroze GL-6B kromatografi yöntemlerini kullanarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu enzimin, molekül ağırlığı 43 kDa, optimum pH'sı 5.5 olarak belirlenmiştir. n-Propanol substrat olarak kullanıldığında, L-sistein, dithiothreitol, EDTA ve sodyum azid maddelerinin POD enzimini inhibe ettiği,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $K^+$  metal iyonlarının ise aktive ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca tekstilde kullanılan boyar bir madde olan nötral kırmızı ile enzimin muamelesi sonucunda %75,31 oranında renksizleşme belirlenmiştir.

Al-senaidy and Ismael (2011), peroksidaz (POD) enzimini, DEAE-sefaroze ve sefadeks 200 kromatografisi ile saflaştırmışlar. Sonuçta bu enzimin molekül ağırlığını 55 kDa ve optimum pH'sını 5-6 arası bulmuşlar.  $V_m$  ve  $K_m$  parametreleri guaiakol ve  $H_2O_2$  için sırasıyla 0,77 ve 0,045 mM olarak tespit etmişlerdir (Al-Senaidy *et al.* 2011).

Literatür taraması sonucunda, dünya üzerindeki çeşitli jeotermal kaynaklardan termofilik mikroorganizmaların izolasyonu, endüstriyel önemli olan peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonuna yönelik çok az sayıda çalışma yapıldığı anlaşılmıştır. Özellikle geniş termal alanlara sahip olan ülkemizde, termofilik mikroorganizmaların izolasyonu, tanısı ve sanayi açısından önemli olan katalaz peroksidaz enzimin karakterizasyonuna yönelik çalışma bulunmadığı, ayrıca bu alanda yeni araştırmalara ihtiyaç duyulduğu gözlemlenmiştir. Bu hedef doğrultusunda, Erzurum-Pasinler kaplıcasından izole edilen *A. pallidus* (P26) izolatının peroksidaz enzim üretme potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, peroksidaz enzimin (POD);  $(NH_4)_2SO_4$  çöktürmesi, CM-sefadeks iyon değişim ve sefakril S200 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak üç basamakta saflaştırılması, saf enzimin karakterizasyonu için optimum pH'sı, optimum sıcaklığı, molekül ağırlığı,  $V_{max}$  ve  $K_m$  başta olmak üzere karakteristik özelliklerinin belirlenmesi, son basamakta ise; karakterize edilen saf peroksidaz enziminin kullanılarak tekstil sanayisinde kullanılan,

büyük çevre problemlerine neden olan bazı boyalar maddelerin atık sulardan giderilmesi çalışmalarının yapılması planlanmıştır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Çalışmada kullanılan serum albumin, diyaliz torbası, metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), glisin, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), N,N-metilen-bisakrilamid, ditioeritritol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ), asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), akrilamid, Tris (trihidroksimetilaminometan), amonyum persülfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), commassie brillant blue G-250, etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), fosforik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), sodyum bisfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), hidroklorik asit ( $\text{HCl}$ ), sodyum hidroksid ( $\text{NaOH}$ ), amonyum sülfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), Sefadeks G-100, Sefakril S-200, commassie brillant blue R-250,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 4-metil katekol, ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), guaiakol, pirogallol, hidrokinon, Reaktif siyah 5 ( $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_{12}\text{S}_4$ ), fuksin ( $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3 \text{HCl}$ ), allura kırmızısı ( $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8\text{S}_2$ ), Asit kırmızı 37 diamonyum tuzu ( $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 2\text{H}_3\text{N}$ ),  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ , Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), sodyum asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ). Askorbik asit ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ).

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Otomatik pipetler (Biohit. Socorex ve Oxford Pipettes)

UV-Visible Spektrofotometre (Shimadzu. UV-1208)

İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)

Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)

Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)

Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)

Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)

pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)



Derin Dondurucu (Nuair -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)

Hassas Terazi (Mettler Toledo AL204, CHINA)

Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)

Su Banyosu (Mettmert WNB14, GERMANY)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)

Santrifüj (Hettich EBA 21, GERMANY)

Kolon (kromatografi kolonu, 1,5 cm x 30 cm, bed: 53 ml )

Peristaltik pompa (Labor-Schlauchpumpe PLP 33)

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltiler, hazırlanış biçimleri ve kullanıldıkları yerler aşağıda belirtilmiştir.

**1. Trypticase soy broth (TSB):** 30 g tripticase soy agar karışımı (Oxoid), 1 L saf su içerisine ilave edilerek, otoklavlandı (Bal 2012)

**2. Trypticase soy agar (TSA):** 40 g tripticase soy agar karışımı (Oxoid), 1 L saf su içerisine ilave edilerek, sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı (Bal 2012).

**3. Diyaliz tamponun hazırlanması;** (0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH: 7.0) 14,2 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 800 mL saf suda çözülerek pH'sı 7.0'ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

**4. Yıkama tampon 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH: 7.0 (Enzimin saflaştırılması esnasında kullanılan tampon çözelti):** 1,56 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 800 mL saf suda çözüldü ve pH'sı 7.0'ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

**5. Elüsyon çözeltisi (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH: 7.0):** 35,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 800 mL saf suda çözüldü ve pH'sı 7.0'ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

**6. Dengeleme tamponu 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH: 7.0 (Enzimin saflaştırılması esnasında kullanılan tampon çözelti):** 15,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 800 mL saf suda çözüldü ve pH'sı 7.0'ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

**7. Gradient oluşturma çözeltisi (1M NaCl):** 14,6 g NaCl alınarak saf suyla 1000'e tamamlandı.

**8. Aktivite ölçüm çözeltisi (0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH: 7.0):** 8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 800 mL saf suda çözüldü ve PH'sı 7.0'ye ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**9. Guaiakol substratının hazırlanması:** Bu substratı hazırlamak için 0,179 g guaiakol hassas terazi ile tartıldı. 0,115 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipetle alındı ve 50 ml sodyum fosfat tamponu içerisinde çözüldü.

**10. 4-Metil katekol substratının hazırlanması:** Bu substratı hazırlamak için 0,031 g 4-Metil katekol hassas terazi ile tartıldı. 0,115 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipetle alındı ve 50 mL son hacim olacak şekilde sodyum fosfat tamponu içerisinde çözüldü.

**11. ABTS (2,2'-Azino-di-(3-etilbenzthiazolin-6-sulfonik asit) substratının hazırlanması:** 0,137 gr ABTS ve 0,115 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alınıp, son hacim 50 mL olacak şekilde sodyum fosfat tamponu içerisinde çözüldü.

**12. Pirogallol substratının hazırlanması:** Bu substratı hazırlamak için 0,031 gr pirogallol hassas terazi ile tartıldı. 0,115 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alındı ve 50 mL sodium fosfat tamponu içerisinde çözüldü.

**13. Hidrokinon substratının hazırlanması:** Bu substratı hazırlamak için 0,031 gr hidrokinon hassas terazi ile tartıldı. 0,115  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  alındı ve 50 ml sodyum fosfat tamponu içerisinde çözüldü.

**14. Metal iyonların hazırlanması:**

$\text{CuCl}_2$  (mA: 134,45 g/mol); m=0,0336 g tartıldı, saf suda çözüldü, son hacimi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

$\text{BaCl}_2$  (mA: 244,28 g/mol); m=0,061 g tartıldı, saf suda çözüldü, son hacimi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

$\text{MnCl}_2$  (mA: 126,93 g/mol); m=0,0324 g tartıldı, saf suda çözüldü, son hacimi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

$\text{NiCl}_2$  (mA: 129,69 g/mol); m=0,0324 g tartıldı, saf suda çözüldü son hacim 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

$\text{CoCl}_2$  (mA: 129,93 g/mol); m=0,3059 g tartıldı, saf suda çözüldü, son hacimi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

$\text{ZnCl}_2$  (mA: 236,3 g/mol); m=0,059 g tartıldı, saf suda çözüldü, son hacimi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

$\text{FeCl}_2$  (mA: 198,83 g/mol); m=0,0497 g tartıldı, saf suda çözüldü, son hacimi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

EDTA (mA: 372 g/mol); m=0,093 g tartıldı, saf suda çözüldü, son hacimi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

Askorbik asit (mA: 176,13 g/mol); m=0,044 g tartıldı, saf suda çözüldü, son hacimi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

$\text{CaCl}_2$  (mA: 111,1 g/mol); m=0,02777 g tartıldı, saf suda çözüldü, son hacimi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

$\text{HgCl}_2$  (mA: 472,09 g/mol); m=0,118 g tartıldı, saf suda çözüldü, son hacimi 50 mL'ye saf su ile tamamlandı.

**15. Coomassie Brilliant Blue G250 reaktifinin hazırlanması (Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti):** 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 50

ml %95'lik etanolda çözümlenerek 100 mL %89'luk fosforik asit ilave edildi. Daha sonra çözeltilerin hacmi saf su ile 1 litre'ye tamamlandı.

**16. Bovin Serum Albuminin hazırlanması:** 1 mL steril distile su içerisinde 1 mg Bovine Serum Albumin (BSA) olacak şekilde hazırlandı.

**17. Endüstriyel boyaların hazırlanması:** Bu boyalar 50 mg/L konsantrasyonda hazırlandı. Önce 0,005 g boya tartıldı ve 100 mL saf su içerisinde çözüldü. İşlem bütün boyalar için tekrarlandı.

**18.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + NaCl tamponunun hazırlanması (Moleküler ağırlığın belirlemek esasında kullanılan çözelti):** 2,99 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ve 29 g NaCl tartıldı, daha sonra bu maddeler 800 mL saf suda çözüldü ve pH'sı 6.5'a ayarladıktan sonra, saf su ile son hacim 1 litreye tamamlandı.

**19.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + Dithioeritrol tamponunun hazırlanması (Moleküler ağırlığın belirlemek esasında kullanılan çözelti):** 5,999 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,154 gr dithioeritrol tartıldı, daha sonra 800 mL saf suda çözülen çözeltilerin pH'sı 6.5'a ayarlandıktan sonra, saf su ile son hacim 1 litreye tamamlandı.

**20. 1 M 100 ml'lik Tris-HCl çözeltisi (pH:6.8):** 12,11 g Tris tartıldı, 80 mL saf suda çözüldü ve pH'sı 6.8'e ayarlandı, son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

**21. 1,5 M 100 ml'lik Tris-HCl çözeltisi (pH:8.8):** 18,17 gr Tris tartıldı ve 80 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8.8'e ayarlandı, son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

**22. %30 Akrilamid ve Bisakrilamid (%30-%0.8) çözeltisi:** 30 g Akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid tartıldı ve 128 mL distile su içerisinde çözüldü, 37°C'de karıştırıldı, 0,45 µm filtre kağıdı ile filtre edilip, pH'sı 7.0'ye ayarlandı.

**23. Sabitleştirme çözeltisi:** Bir beher içerisinde, %50 izopropanol (50 g) + %10 TCA (10 g) + %40 saf su (40 ml) birleştirildi ve 20 dk süreyle karıştırıldı.

**24. Elektroforezde kullanılan boyama çözeltisi:** 50 mL metanol + 10 mL asetik asit + 40 mL saf su karışımı içerisinde, 0,1 g Commassie Brilliant Blue reaktifi çözüldü ve son hacimi 100 mL'ye tamamlandı.

**25. Elektroforezde kullanılan yıkama çözeltisi:** 50 mL metanol+10 mL asetik asit+40 ml saf su karışımı bir beher içerisinde iyice karıştırıldı.

**26. %10 SDS çözeltisi:** 10 g SDS tartıldı ve 50 mL saf su içerisinde ısıtarak çözüldü ve son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

**27. %10 APS (Amonyum Persülfat) (2ml) çözeltisi:** 0,2 g APS, 1,8 mL distile su içerisinde çözüldü.

**28. Ayırma jelin hazırlanması:** 15 mL 1M Tris-HCl (PH: 8,8), 10,7 mL %30'luk akrilamid, %0,8'lik bisakrilamid, 0,61 mL %0,1 SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin), 11,9 mL saf su ile karıştırıldı, bu karışımın üzerine 0,8 mL %1,5'lik amonyum persülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ilave edildi.

**29. Renksizleştirme çözeltisi ise:** %7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5'luk sudan ibarettir.

**30. 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM ditiotritol, pH 7,0 (Molekül ağırlığını tespit etmek için kullanıldı):** 0,1542 g ditioeritritol ve 7,075 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 950 mL deiyonize suda çözüldü ve 1 N HCl ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra, toplam hacmi deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı.

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Protein tayini

#### 3.2.1.a. Coomassie blue yöntemiyle protein tayini

Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak değişik renk şiddetinde mavi renkli kompleksler meydana gelmiştir. Kompleksin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi önemlidir. Boyanın özellikle arjinin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Yöntemde oluşan kompleksin renk şiddeti 595 nm dalga boyunda maksimum absorbanı vermektir (Bradford 1976).

Protein miktarları kantitatif olarak Bradford metoduna göre belirlendi. Bu yöntem diğer protein tayin yöntemlerinden avantajlı tarafı kısa sürede uygulanabilirliği fazla bozucu faktörlerin bulunmaması ve protein-boya kompleksinin çözelti ortamında uzun süre kalabilmesidir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-60 µg arasındadır.

**Çizelge 3.1.** Coomassie Blue ile protein tayininde kullanılan madde miktarları

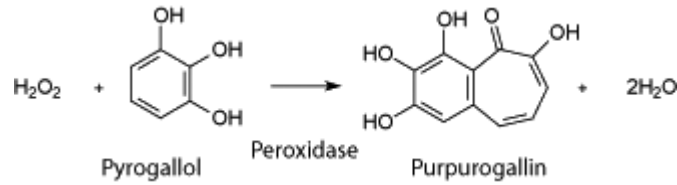
Serum albumin (BSA) miktarı (µl)	Saf su miktarı (µL)	Coomassie Blue miktarı (ml)
5	95	5
10	90	5
20	80	5
30	70	5
50	50	5
70	30	5

Tabloda verilen Bovine Serum Albumin (BSA), Saf su ve Coomassie Blue maddelerini birleştirip, 10 dk oda sıcaklığında beklettikten sonra 595 nm'de absorbanı değeri ölçülerek, standart grafik çizildi.

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ve diyaliz işlemleri sonucu elde edilen numuneler 595 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek, standart protein grafiği ile protein miktarı tayin edilmiştir (Bradford 1976; Köksal 2007).

### 3.2.1.b. Peroksidaz aktivitesi tayini

Çalışmada POD enzim aktivitelerinin saptanmasında kullanılan bu yöntem, 430 nm dalga boyu ve 55°C sıcaklıkta ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında, pirogallolun peroksidaz katalizörlüğünde purpurogallin oluşturması esasına dayanır.



POD aktivitesi; önceden hazırladığımız pirogallol substrat çözeltisinden, 2.5 mL alınır ve 500 µL enzim ilave edilerek, 5 dk süre ile 430 nm'deki absorbans artış oranı belirlenir. Aynı miktarlarda K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerlerini bulmak için, ABTS, hidrokinon ve 4-metil katekol substrat olarak, dalga boyları sırasıyla 734 nm, 340 nm, 412 nm'de ölçüm yapılarak aktivite tayini yapılmıştır. Enzim çözeltisi yerine enzimin içinde bulunduğu tampon ilave edilerek hazırlanan kör numune olarak kullanılmıştır (Topçular 2006).

### 3.2.1.c. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz aktivitesi Havir and Mchale'e (1987) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemin esası; CAT aktivite ölçüm ortamındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü kısaca şu şekilde yapılmıştır: 103 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponundan 1,475 mL ve 40 mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrat çözeltisinden 1,5 mL konulduktan sonra, 25 µL enzim ilave edilmiş ve 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika

aralıklarla köre karşı absorbansı okunmuştur. Ölçümlerde absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. 25°C’de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 µmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve enzim ünitesi (EU/mL) olarak sunulmuştur.

### **3.2.2. Termofilik bakteri suşun izole edilmesi**

Çalışmada kullanılan termofilik *Aerobacillus pallidus* (P26) (Gen bank no: EU935591) suşu, Sayın Hocam Doç. Dr. Ahmet Adıgüzel ve çalışma arkadaşları tarafından Erzurum’un Pasinler ilçe kaplıcasından izole edilerek tanımlanmış, bu çalışmada kullanılmıştır (Adıgüzel 2009).

### **3.2.3. *A. pallidus*(P26)’nın sıvı besi yerinde yetiştirilmesi ve homojenatın hazırlanması**

Litresinde 40 gr Trypticase soy agar ihtiva eden besi yeri otoklavlanıp soğutuldu ve petrilere döküldü. Daha sonra derin dondurucuda -86 °C’de muhafaza edilen *A. pallidus* (P26) bakterisi petri plaklarına steril koşullar altında çizgi ekim yöntemiyle aktarıldı. Petriler 55°C’ye ayarlanmış inkübatörde 1 gece inkübasyona bırakıldı. Herhangi bir kontaminant içermeyen bu kültür ortamından bir öze dolusu alınarak, 121°C’de 15 dak. otoklavlanıp soğutulan ve litresinde 30 gr Trypticase soy broth içeren sıvı besiyerine steril kabin ortamında aktarıldı. Sıcaklığı 55°C’ye ayarlanmış çalkalayıcıda 1 gece inkübasyona bırakılarak bakterilerin üremesi sağlandı (Çiftçi vd 2004)

#### **3.2.3.a. İndükleme işlemleri**

Erlen içirişindeki *A. pallidus* (P26) bakteri kültüründeki peroksidaz enziminin üretimini arttırmak üzere indükleyici ajan olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve pirogallol ilave edilmiş ve sonuçta sentez miktarında artış gözlemlenmiştir. Çalkalayıcıda 2 gün süre ile inkübasyona bırakılan kültür peroksidaz enziminin saflaştırılmasında kullanılmıştır (Cunha *et al.* 2010).



### 3.2.4. Enzim saflaştırma işlemleri

#### 3.2.4.a. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri

Ham enzim ekstraktı süzöldükten sonra santrifüjde 5.000 rpm'de 15 dak süresince santrifüjlenmiş ve enzim homojenatı sırasıyla %0-20 %20-40 %40-60 %60-80 %80-100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır (Nadaroğlu 2009). Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyom sülfat miktarı aşğıdaki formülle göre hesaplanmıştır:

$$g[(NH_4)_2SO_4] = 1,77xVx(S2 - S1) / 3,54 - S2$$

V = Süpernatant

S1 = 1' in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S2 = 1' in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında, ham ekstrakta katı  $(NH_4)_2SO_4$  az miktarlarda ilave edilmiştir. Her ilave sırasında daha önce katılan  $(NH_4)_2SO_4$ 'ların çözünmüş olmasına dikkat edilmiştir. Bu işlem yarım saatle-bir buçuk saat arasında sürdürölmüştür. Katı amonyum sülfat katılmasından sonra belirtilen doygunluğa getirilen süspansiyon hızlı bir şekilde süzölerek 5.000 rpm'de 15 dak boyunca santrifüj edilmiştir (Nadaroğlu 2009).

Her santifirüj işleminden sonra, enzim varlığına aktivite ve protein tayini yapılarak bakılmıştır. Tüm bu işlemler  $+4^\circ C$ 'de gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirilmiştir. Diyaliz torbası, içinde pH: 7,0 fosfat tamponuna karşı 6 saat süreyle diyaliz edilmiştir. Bu işlem sırasında tampon çözelti en az 2 defa değiştirilmiş ve bu işlemler magnetik karıştırıcı üzerinde  $+4^\circ C$ 'de gerçekleştirilmiştir. Yapılan aktivite ölçümlerinden %60-80 amonyum sülfat doygunluğunda enzimin çöktüğu belirlenmiştir (Nadaroğlu 2009).

### **3.2.4.b. Enzim CM-sefadex A50 iyon-değişim kromatografisi ile saflaştırılması**

Bu çalışmada CM-sefadex A50 iyon değişim kromatografisi kullanıldı. Çalışmada kullanılan katyon değiştirici CM-sefadex A50 iyon değişim materyalinden, 100-120 ml yatak hacmi elde edebilmek için 4 g jel 100 mL distile suya aktarılarak 1 gece bekletildi. Sonra bu jel kolona aktarıldıktan sonra 100 mM fosfat tampon ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15 mL/saate ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek diyalizden elde edilen ekstraselüler homojenat çözeltisi, kolona tatbik edildi. Daha sonra 10 mM fosfat tampon ile yıkama işlemi yapıldı ve yıkama işlemine, üstten ilave edilen yıkama tamponu ile alttan alınan elüatların pH'sı ve 280 nm deki absorbans değerleri eşitleninceye kadar devam edildi. Yıkama tamamlandıktan sonra, elüsyon için gradient mikserin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine, 250 mL 100 mM fosfat tamponu ve bu hazneye açılan diğer hazneye ise 100 mM fosfat tampon ile hazırlanmış 250 mL ve 1 M NaCl dolduruldu ve artan iyonik şiddetle lineer gradient elüsyonu başlatıldı. Sonra 3 ml'lik hacimler halinde tüplere alındı ve her bir elüantın 280 nm'de absorbansına ve 430 nm'de pirogallol substratı kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi ve Fraksiyon sayısı-Aktivite/Absorbans grafiği çizildi. Enzimin sıcağdan dolayı aktivite kaybına uğramaması için hem alınan elüantların hem de gradient mikserin içindeki elüsyon tamponunun etrafı buz ile kapatılarak ortamın soğuk olması sağlandı. Birleştirilen elüantlar ve kolona tatbik edilen numunede Bradford metoduna göre kantitatif protein tayini ve enzim aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi. (Nadaroğlu 2009).

### **3.2.4.c. Enzimin Sefakril S200 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması**

Bir önceki basamakta elde edilen enzimin derişikleştirilmesi amacıyla %100 amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve az miktar fosfat tamponu içerisinde çözüldükten sonra aynı tampona karşı diyalizlenmiştir. Ardından, önceden dengelenmiş olan Sefakril S200 jel filtrasyon kolonuna tatbik edilmiş ve aynı tampon ile kolondan elüatlar, 3'er mL'lik hacimler halinde alınmıştır.

280 nm'de her bir elüatın absorbans değerleri belirlenmiş, kör olarak fosfat tamponu kullanılmıştır. Yüksek absorbans veren tüplerde pirogallol substrat ile aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek aktivite veren tüpler birleştirilerek enzim havuzu oluşturulmuş, enzimin karakterizasyonu ve atık sulardan tekstil boyar maddelerinin giderilmesinde kullanılmak üzere saklanmıştır (Whitaker 1963).

### **3.2.5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü**

Elde edilen enzim örneğinin alt birim sayısının belirlenmesi amacı ile bu işlem kullanıldı. Bunun için elektroforez plakaları, su ve alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mıkalara ince bir tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbirini üstüne konuldu ve kıskaçlarla tutularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle sıkıldı. Bu işlemler yapılırken hava almaması sağlandı. Jel yüzeyinin pürüzsüz olması için %10'luk SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar hemen hemen yarım saat beklendi. Katılaştıktan sonra üzerindeki %10'luk SDS ayrıldı. Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice koyduktan sonra tarağın da üzerine nemli süzgeç kağıdı yerleştirilerek bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi (Köksal 2007; Laemmli 1970).

Oluşan boşluklar işaretlendi ve jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu yerleştirildi. Örnekler, her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında örnek tamponuna eklendi. Üç dakika süre ile kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulularak, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla yerleştirildi. Tank kapağı kapatılarak, (+) kablo (Anot) ve (-) kablo (katot) bağlandı. İlk olarak yarım saat boyunca sisteme 80 voltluk akım verildi. Daha sonra akım 150 volta ayrıldı, 4-5 saat oda sıcaklığında bekletildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice ayrıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı ve sabitleştirme çözeltilisinde 15 dakika süre ile bırakıldı. Daha sonra fikse çözeltilisinden çıkarılan jel, özel kabına konularak boyama çözeltilisi üstünü örtünceye

kadar eklendi. 45 dakika kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra boyama çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Bundan sonra jeller %30'luk etil alkol içine alındı ve fotoğrafları çekildi (Köksal 2007; Laemmli 1970).

**Ayrırma jeli şöyle hazırlandı;** 15 mL Tris-HCl (pH 8,8), 13,2 mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin) ve 9,4 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'lik amonyum persülfat [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>] ilave edildi.

**Yığıma jelinin hazırlanması ise şöyle yapıldı;** 1 M'lik Tris-HCl'den 1,24 mL, %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %0,1'lik SDS'den 0,1 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve sudan 7,8 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış, %1,5'lik PER'den 0,2 mL ilave edildi.

### 3.2.6. Optimum pH'nın belirlenmesi

Optimum pH için pH 2.0'den 11'e kadar on farklı pH ortamında çalışılmıştır. pH 2.0'den 5.0'e kadar asetat, pH 5.0'ten 8.0'e kadar fosfat ve pH 8.0'den 9.0'a kadar da Tris / HCl ve pH 10.0'dan 11'e kadar ise karbonat tamponları kullanılmıştır. Bu tampon çözelti aralıklarında enzimin aktivitesi 4-metil katekol, ABTS ve pirogallol olmak üzere 3 farklı substrat ile bakıldı ve spektrofotometrik olarak aktivite ölçülüp, bulgular grafik halinde verildi (Nadaroğlu 2009; Dawkar *et al.* 2009).

### 3.2.7. Enzimin stabil pH'nın bulunması

Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerin 2500 µL'sine, 500 µL enzim çözeltisi ilave edilerek 4°C'de muhafaza edildi. Başlangıçta aktiviteler ölçüldükten sonra 240 saat boyunca her 48 saatte bir aktivite ölçümü yapılarak, enzimin stabil olduğu pH belirlendi

ve daha sonra aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi (Nadaroğlu 2009; Dawkar *et al.* 2009).

### **3.2.8. Optimum sıcaklığın belirlenmesi**

POD enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C’lerde çalışıldı. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalar, her substrat için optimum pH değerlerinde yapıldı. İstenilen sıcaklıklar, sirklatrl su banyosu kullanılarak ayarlandı. Mümkün olduğu kadar hızlı bir Şekilde enzim çözeltisi aktarılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir substrat için optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Bu işlemde 500 L enzim, ependorflara konulup termal blokta 5 dak süreyle bekletildi. Daha sonra üzerine 2.5 mL substrat içine ilave edildi ve aktivite ölçümü yapıldı. Bulgular grafik halinde verildi. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık derecesi enzimin en iyi çalıştığı (optimum aktivite gösterdiği) değer olarak değerlendirildi (Dawkar *et al.* 2009).

### **3.2.9. Enzim stabilitesinin üzerine sıcaklığın etkisi**

Enzimin stabil sıcaklığı belirlemek için enzimin optimum pH’sında 15, 30, 45, 60 dak süre ile enzimi belirtilen sıcaklıklarda bekletip sonra substrat ilave edilerek aktivite ölçümleri alındı (Nadaroğlu 2009; Dawkar *et al.* 2009).

### **3.2.10. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığının tayini**

Enzim saflaştırıldıktan sonra jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak molekül ağırlığı tayin edildi.

Bunun için önce, Sefadeks G-100 distile su içerisinde 90°C’de 5 saat süreyle Őiřirildi. Hazırlanan jel bir huni vasıtasıyla (1,3x30 cm) kolona paketlendi. Kolon 24 saat süreyle 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM ditioeritritol, pH 7:0 tamponu ile dengelendi. Dengelenme

işlemine, kolonun altından alınan çözelti 280 nm'de absorbanı vermeyinceye kadar devam edildi. Dengelenmiş olan kolona önce konsantrasyonu 0,2 mg/mL olacak şekilde moleköl ağırlıkları bilinen standart protein yüklendi ve 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM ditiotritol, pH 7.0 tamponu ile elüe edildi. Elüatlar 3 mL olarak alındı. Peristatik pompa vasıtasıyla akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde ayarlandı (Whitaker 1963). Elüatların 280 nm'de absorbanı değerleri belirlendi. Alınan sonuçlar grafik halinde verildi. Aynı şartlarda, dengelenmiş kolona saf enzim yüklendi ve elüsyon alındı. Elüatların 280 nm'de absorbanı değerleri belirlendi ve sonuçlar standart grafikten belirlendi.

### 3.2.11. V<sub>max</sub> ve K<sub>m</sub> değerlerinin belirlenmesi

*A. pallidus* (P26)'dan kültüre edilen ve saflaştırılan peroksidaz enziminin maksimum hızları (V<sub>max</sub>) ve Michaelis-Menten sabiti (K<sub>m</sub>), ABTS, 4-metil katekol, pirogallol, hidrokinon ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olmak üzere beş farklı substrat konsantrasyonuna karşı aktivitesi bulunarak hesaplandı.

Aktivite ölçümlerinde ana substrat çözeltisinden 500, 1000, 1500, 2000 ve 3000 µL alındı ve her birinin toplam hacmi tampon çözelti (0,05 M fosfat, pH: 8) ile 2500 µL'ye tamamlandı. Daha sonra 500'şer µL saf enzim ilave edilerek, 5 dakika süre ile 55°C'de inkübe ettikten sonra spektrofotometrik olarak absorbanı değişikliği belirlendi. Lineveawer-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri hesaplandı.

### 3.2.12. *A. pallidus* (P26)'dan üretilip saflaştırılan peroksidaz enzimin aktivitesi üzerine metal iyonların etkisinin incelenmesi

**Çizelge 3.2.** Peroksidaz enzimin aktivitesi üzerine metal iyonların etkisini incelemek için maddelerin miktarları

Metal iyonun miktarı ( $\mu\text{l}$ )	Tampon miktarı ( $\mu\text{l}$ )	Substrat miktarı ( $\mu\text{l}$ )	Enzim miktarı ( $\mu\text{l}$ )
100	900	1500	500
300	700	1500	500
500	500	1500	500
700	300	1500	500
1000	-	1500	500

Ağır metallerin etkisinin incelenmesi amacıyla sabit substrat ve enzim konsantrasyonlarında;  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , EDTA ve askorbik asit çözeltilerinden enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Substrat olarak pirogallol kullanılmıştır (Dawkar *et al.* 2009). Hazırlanan metal iyonları ve kimyasalların çözeltilerinden 100, 300, 500, 700 ve 1000  $\mu\text{L}$  alındı ve her birinin toplam hacmi tampon ile 1000  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır. Daha sonra üzerlerine 1000 ml tampon ve 500'er  $\mu\text{L}$  enzim çözeltisi ilave edilmiştir. Sonuçlar %Aktivite-Konsantrasyon şeklinde grafik edilmiştir.

### 3.2.13. Endüstride kullanılan bazı boya­ların POD enzimi ile etkileşimi

Tekstil sektöründe yüksek miktarda kimyasal ve su harcayan boyama işlemi sonucunda oluşan atık sular­daki boya­ların, doğaya bırakılmadan önce parçalanması gerekmektedir. Bu çalışmada, saflaştırılan POD enziminin endüstride kullanılan bazı boya­lar üzerine etki edip etmediği araştırılmıştır. Bu amaçla, Reaktif siyah 5, Fuksin, Allura kırmızı­1, Asit kırmızı 37 diamonyum tuzu olmak üzere 4 farklı boya kullanılmıştır.

### 3.2.13.a. Endüstriyel boya standartlarının hazırlanması

Standart grafiği çizmek için aşağıdaki tabloda verilen 5 mM konsantrasyondaki stok boya çözeltisi saf su ile seyreltilmiştir. Her boya için ayrı ayrı belirtilen dalga boylarında absorban ölçümü yapılmış ve Absorbans-mg boya olarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kör olarak saf su kullanılmıştır.

**Çizelge 3.3.** Endüstriyel boya standartlarının hazırlanması

Boya miktarı (µl)	Saf su miktarı (µl)
100	900
300	700
500	500
700	300
900	100
1000	-

**Çizelge 3.4.** Boyar maddelerin absorban değerleri

Boya adı	Absorbans değeri (nm)
Reaktif siyah 5	597
Fuksin	547
Asit kırmızı 37 diyamonyom tozu	513
Allura kırmızısı	504

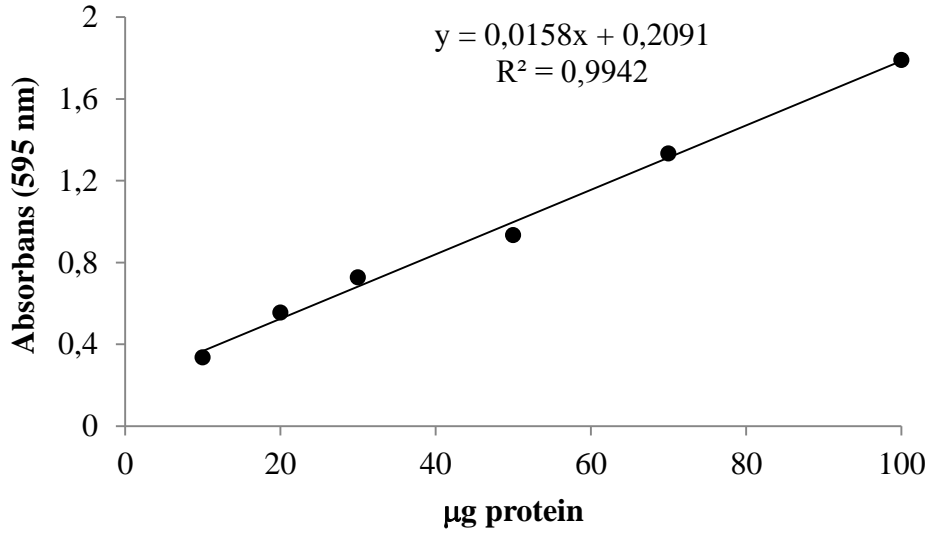
Oluşturulan reaksiyon ortamını 55°C'ye ayarlanıp 15, 30, 60, 90, 120, 150 ve 180. dak'larda ortamdan numune alınıp, belirtilen dalga boylarında absorban ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Absorbans-mg boya olarak grafik halinde verilmiştir (Gudelj *et al.* 2001).



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayini Bradford metoduna göre yapılmıştır (1976). Bu yöntem için önce standart bir eğri hazırlanmıştır. *Aeribacillus pallidus* (P26) kültür ortamından alınan homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve saflaştırma işlemlerinden sonra elde edilen numenelerde bulunan protein miktarı, bu standart grafikten faydalanılarak hesaplanmıştır. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik

### 4.2. *A. pallidus* (P26)'un Peroksidaz Üretme Kapasitesi

Test izolatları sıvı ortam fermentasyonu ile geliştirilerek peroksidaz enzimi üretilmiştir. Ekstraselüler olarak üretilebilmesi için ortama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve pirogallol substratı eklenerek indükleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Erzurum-Pasinler kaplıcasından izole edilen *A. pallidus* (P26) TSA besiyerinde bir gece 55°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Besiyeri 10.000xg'de (4°C, 20 dak) santrifüjlenerek süpernatant ve çökelek (mikroorganizma) kısmı ayrılmış, süpernatantta pirogallol substratı kullanılarak peroksidaz aktivitesine bakılmıştır.

#### **4.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi Sonuçları**

Bölüm 3.2.4.a'de anlatıldığı gibi %60-80 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır (Nadaroglu 2009). Elde edilen çökelek fosfat tamponunda (0,1 M fosfat tamponu, pH: 6.5) çözülerek bir sonraki işleme hazır hale getirilmiştir.

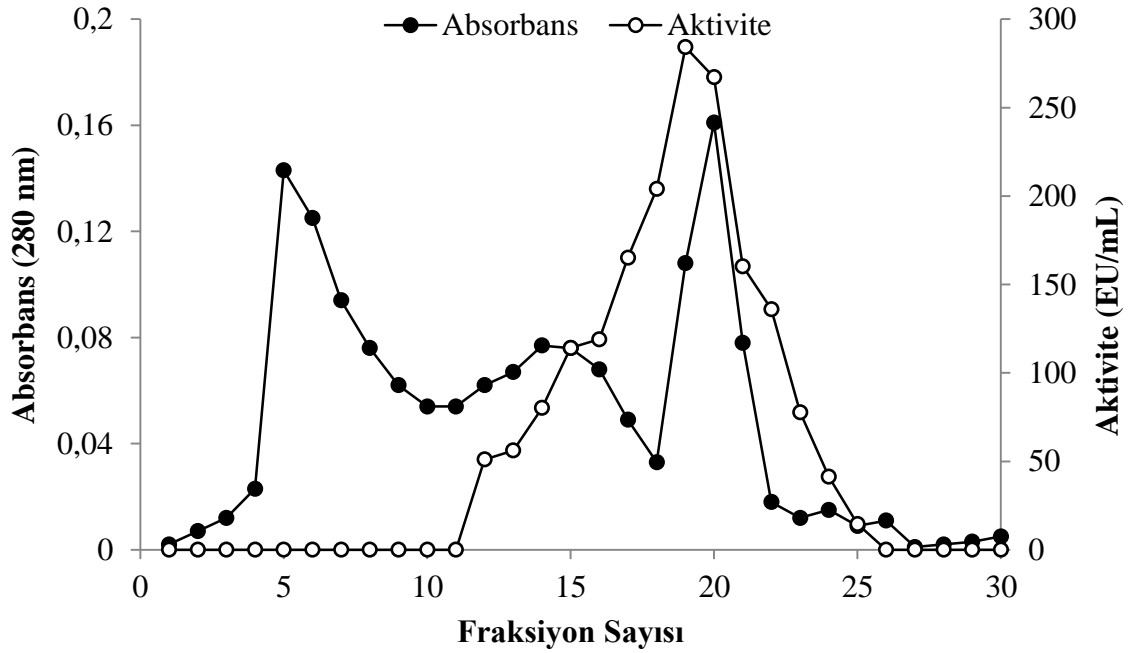
#### **4.4. *A. pallidus* (P26)'dan Üretilip Saflaştırılan Peroksidaz Enzimlerinin CM-Sephadex İyon Değişim Kromatografisi İle Saflaştırma Sonuçları**

Kinetik çalışmalarda ve çevre kirliliğine sebep olan bazı tekstil boyaalarının giderilmesi işlemlerinde kullanılmak üzere *A. pallidus* (P26)'dan üretilen peroksidaz enzimi iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır.

CM-sefadeks iyon değişim jeli hazırlanmış, kolona paketlenmiş ve *A. pallidus* (P26)'un kültür ortamlarından alınan, amonyum sülfat çöktürmesi yapılan ve diyaliz edilen homojenat kolona yüklenmiştir. Daha sonra 0,01 M fosfat tamponu (pH: 6.5) içinde 0'dan 1 M NaCl ile bir konsantrasyon gradienti oluşturularak, enzimler 3'er mililitrelik fraksiyonlar halinde iyon değişim kolonundan elüe edilmiştir. Her tüpteki numune için 280 nm'de kantitatif protein tayini yapılmıştır. Absorpsiyon gösteren fraksiyonlarda; pirogallol substratı kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmış, aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek bir sonraki saflaştırma basamağında kullanılmak üzere 4°C'de bekletilmiştir.

#### 4.4.1. *A. pallidus* (P26)'dan üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin CM-sefadeks iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

*A. pallidus* (P26)'dan üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin CM-sefadeks iyon değişim kromatografisi kolon sonucu Şekil 4.2'de verilmiştir.

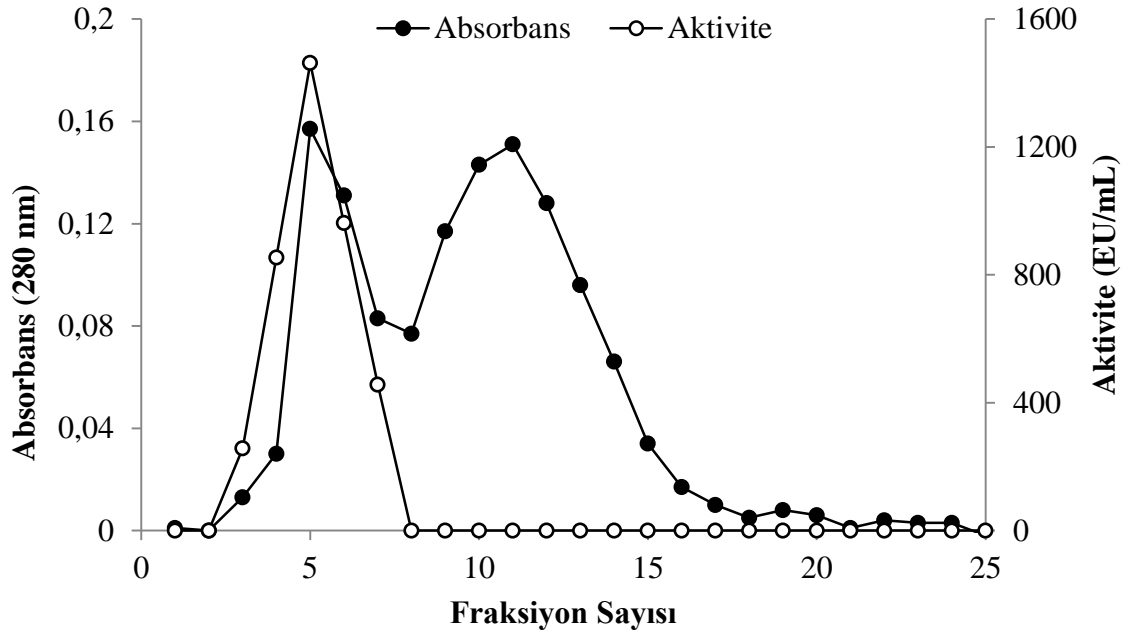


**Şekil 4.2.** CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi kolonu kullanılarak *Aeribacillus pallidus* (P26)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin 0,01 M (pH:6.5) fosfat tamponu içinde 0-1 M NaCl ile gradient elüsyonu.

(—○—): 280 nm'de absorbansı, (—●—): aktivite, kolon 3x30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml

#### 4.4.2. *A. pallidus* (P26) peroksidaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılma sonuçları

CM-sefadeks iyon değişim kolonundan elde edilen elüsyonun ardından aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilmiştir. %100 amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra Sefakril S 200 jel filtrasyon kolonuna uygulanmıştır. Elde edilen elüsyonla ilgili absorbans ve aktivite değerlerini gösteren grafik Şekil 4.3'de verilmiştir.



**Şekil 4.3.** *A. pallidus* (P26)'den peroksidaz enziminin Sephakril S200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasından elde edilen elüsyon grafiği (—○—): 280 nm'de absorbansı, (—●—): aktivite, kolon 3x30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml

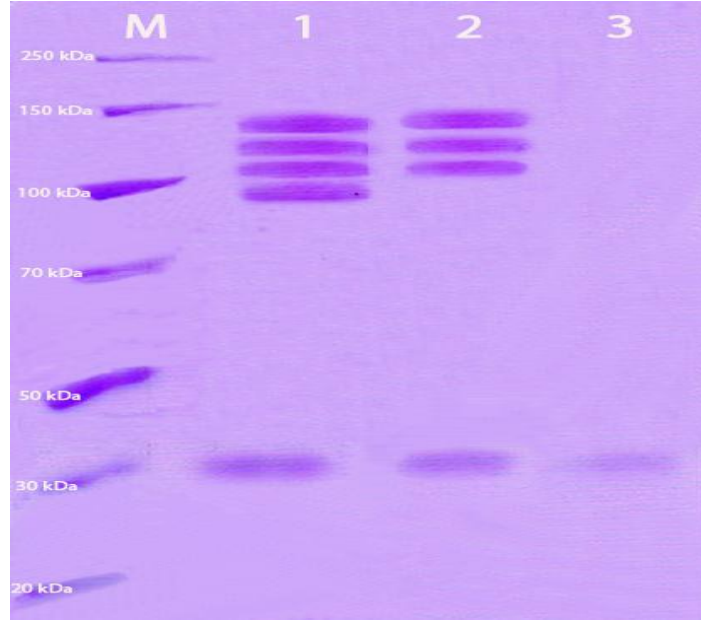
*A. pallidus* (P26)'dan peroksidaz enziminin saflaştırılması aşamalarında uygulanan her bir yöntem basamağında, protein miktarı ve aktivite tayini yapılarak saflaştırma tablosu oluşturulmuştur (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** *A. pallidus* (P26)'dan peroksidaz enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamakları	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam Aktivite EU	%	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Saflaştırma Katı
Ham Ekstrakt	50	275	11000	100	3,81	72,2	-
Amonyum sülfat Çöktürmesi (%60-80)	20	254	5080	46,2	0,71	357,75	4,95
CM-Sefadeks	20	215	4300	39,1	0,22	977,3	13,54
Sefakril S200	20	196	3920	35,6	0,032	6125	84,8

#### 4.5. *A. pallidus* (P26)'dan Ekstraselüler Olarak Üretilip Saflaştırılan Peroksidaz Enziminin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez Sonucu

*A. pallidus* (P26)'dan üretilip CM-sephadeks iyon değişim kromatografisi ve sefakril S 200 jel filtrasyon kolunu kullanılarak saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin alt birim sayısını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrofrez yapılmıştır. Bunun için 3.2.5'de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektrofrezine numuneler tatbik edilmiştir. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektrofrez fotoğrafı

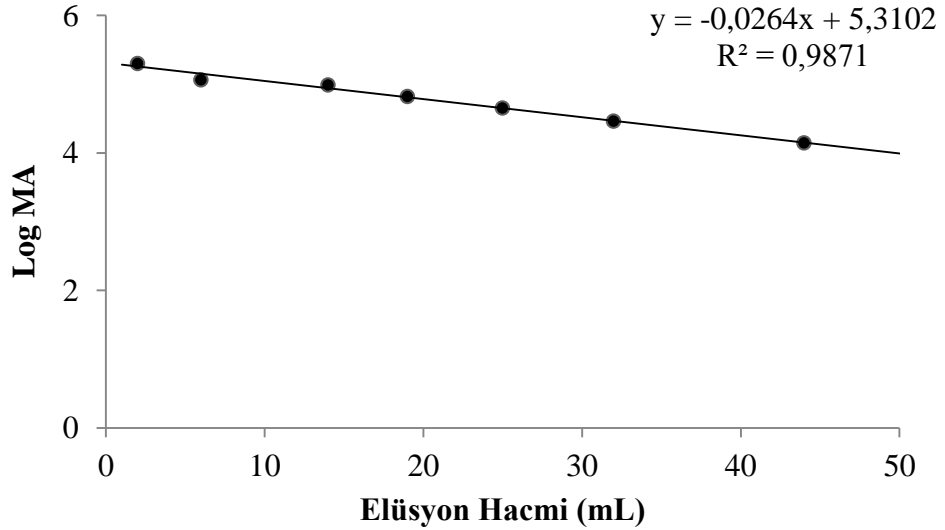
\*M: Protein markırı, 1: Homojenat, 2: CM-sefadedksiyon değişim kolonundan saflaştırılan POD, 3: Sefakril S200 jel filtrasyon kolonundan saflaştırılan POD

*A. pallidus* 'un, doğal PAGE çalışmasında tek bir bant bölgesinde toplanan ekstraselüler peroksidaz aktivitesinin gerçekte birden fazla izoform tarafından sergilenip sergilenmediğini tespit etmek için yapılan bu elektrofretik çalışma sonucunda da mikroorganizmanın ekstraselüler peroksidaz aktivitesinin yine tek bir bant altında toplandığı gözlemlenmiştir. Yukardaki görüntüde M (Markır) olarak belirlenmiş, Gradient SDS-PAGE sonucunda elde edilen tek bant bölgesi için Sigma MWSDS- 200

moleküler kütle markırı ile karşılaştırmalı olarak yapılan analiz sonucunda söz konusu bant bölgesi için moleküler kütle büyüklüğünün yaklaşık olarak 31 kDa olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.6. *A. pallidus* (P26)'dan Üretilip Safılaştırılan Peroksidaz Enziminin Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Molekül Ağırlık Tayin Sonuçları

*A. pallidus* (P26)'dan üretilen ve saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin molekül ağırlıklarını bulmak amacıyla Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kullanılmıştır. Jel filtrasyon kolonundan önce standart proteinler geçirilmiş ve log MA- $K_{av}$  grafiğı çizilmiştir (Şekil 4.5). Daha sonra saflaştırılan peroksidaz enzim çözeltisi kolondan geçirilmiştir. Bu işlemler sırasında standart proteinlere ait elüatların 280 nm'deki absorbansları ve peroksidaz enzimine ait fraksiyonlarda aktivite tayini yapılmıştır. Standart grafiğıe (Şekil 4.5) göre enzimin doğal halinin molekül kütlesi 126473 Da olduğu ve 31618 Da'dan oluşan dört alt birimden oluştuğı belirlenmiştir.

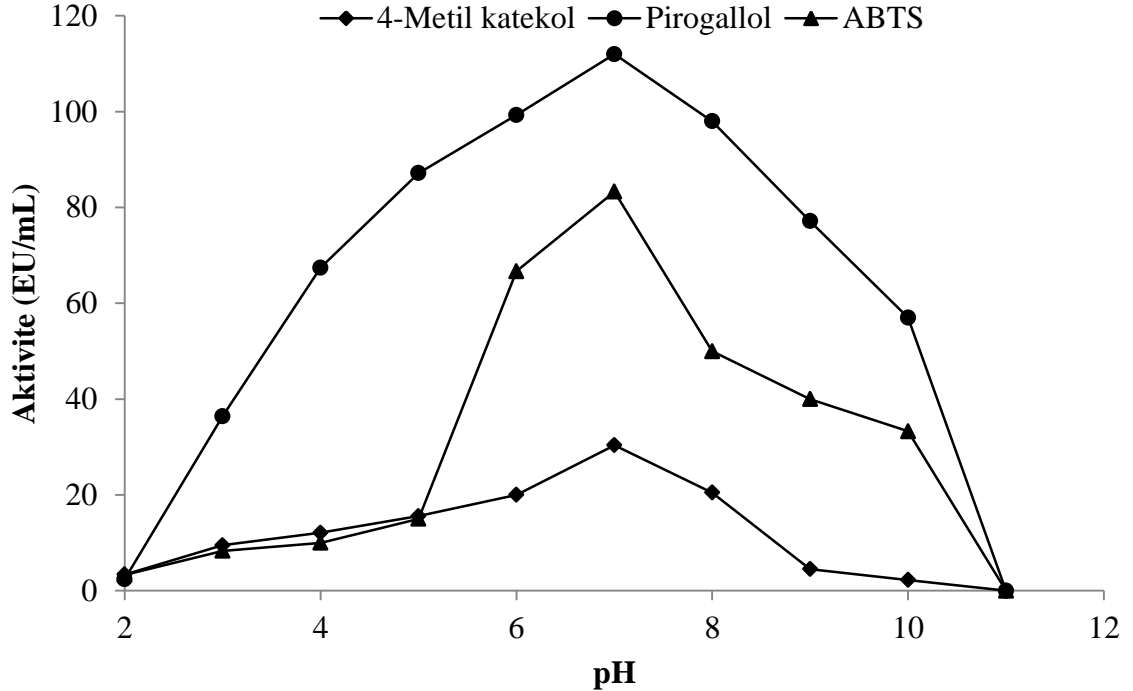


**Şekil 4.5.** *A. pallidus* (P26)'dan üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi metodu ile molekül kütlesinin belirlemek amacıyla kullanılan standart proteinlerin  $K_{av}$  değerlerine karşılık çizilen Log MA grafiğı.

\*(Sephadex G-100, 0,05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM ditioeritritol, pH: 7.0)

#### 4.7. *A. pallidus* (P26)'dan Üretilip Saflaştırılan Peroksidaz Enzimlerinin Optimum pH Sonuçları

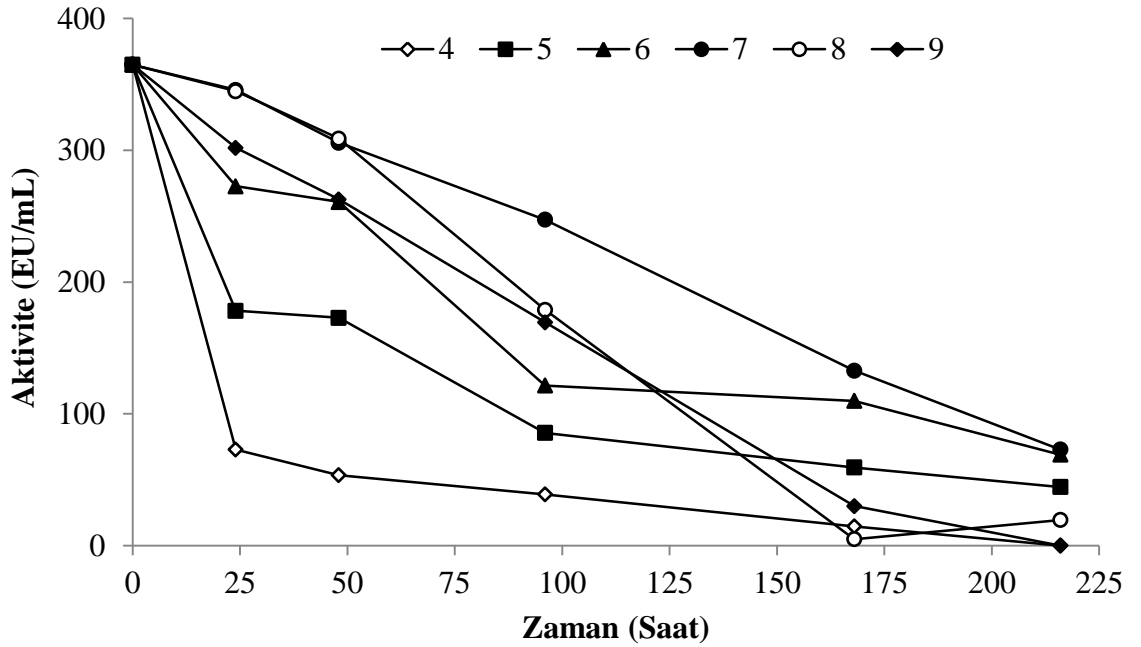
*A. pallidus* (P26)'dan üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için 3.2.6.'de anlatıldığı gibi ölçümler yapılmıştır. Optimum pH için pH 2'ten 11'a kadar on farklı pH ortamında çalışılmıştır. pH 2'den 5'e kadar asetat, pH 5'ten 8'e kadar fosfat ve pH 8'den 9'a kadar da Tris / HCl ve pH 10'dan 11'e kadar karbonat tamponları kullanılmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratı her ölçümde kullanılmakla beraber ikinci substrat olarak 4-metil katekol, pirogallol ve ABTS substratları ayrı ayrı kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılarak aktivite hesaplanmış, Aktivite-pH grafikleri çizilmiş ve sonuçları Şekil 4.6'de verilmiştir. *A. pallidus* (P26)'dan üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminde optimum pH değeri; 4-metil katekol, pirogallol ve ABTS substratları için 7.0 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6. *A. pallidus* (P26)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

#### 4.8. Peroksidaz Enziminin Stabil pH Çalışması Bulguları

Peroksidaz enzimi pH 2'den 5'e kadar asetat, pH 5'ten 8'e kadar fosfat ve pH 8'den 9'a kadar da Tris / HCl ve pH 10'dan 11'e kadar karbonat tamponları kullanılarak dokuz gün boyunca 4°C'de inkübe edilmiş, periyodik aralıklarla aktivite ölçümleri yapılmış ve bulgular Şekil 4.7'da verilmiştir. Grafiklerden de görülebileceği gibi peroksidaz enziminin stabil pH'sı pirogallol için 7.0 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar toplu halde Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.7. *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin pirogallol substratı ile stabil pH'sının belirlenmesi için belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları

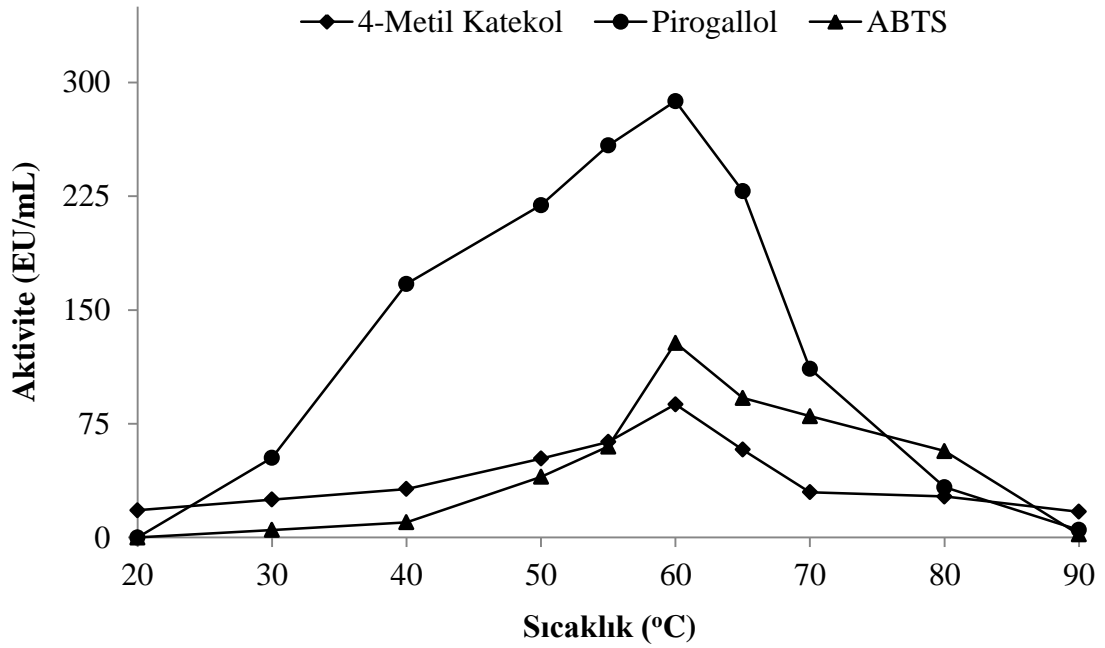


**Çizelge 4.2.** *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler üretilip saflaştırılan peroksidaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasından elde edilen sonuçlar

SUBSTRATLAR	OPTIMUM pH	AKTIVITE GÖSTERDİKLERİ pH ARALIĞI
ABTS	7.0	3-10
Pirogallol	7.0	3-10
4-Metil katekol	7.0	3-10

#### **4.9. *A. pallidus* (P26)'dan Üretilip Saflaştırılan Peroksidaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları**

*A. pallidus* (P26)'dan üretilip saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin optimum sıcaklıklarını belirlemek için 3.2.8'de anlatıldığı gibi ölçümler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplanmış ve Aktivite-°C grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.8). Bu bulgulara göre peroksidaz enzimi optimum sıcaklık değeri tüm substratlar (4-metil katekol, pirogallol ve ABTS) için 60°C olarak belirlenmiştir.

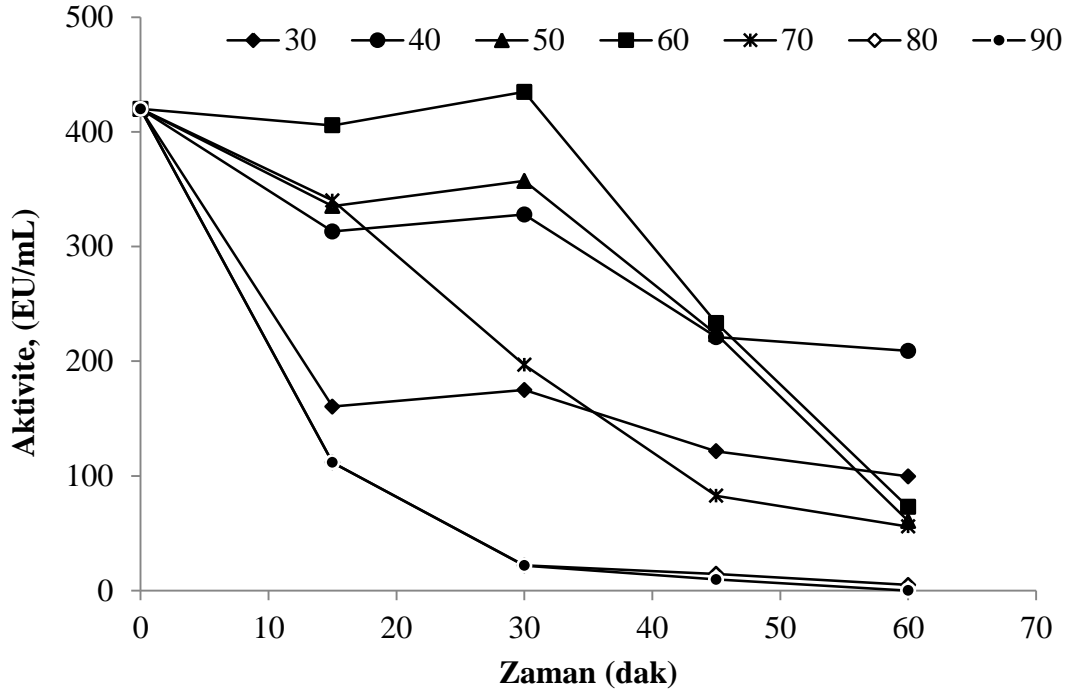


**Şekil 4.8.** *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

#### 4.10. *A. pallidus* (P26)'dan Üretilip Saflaştırılan Peroksidaz Enziminin Sıcaklık Stabilitesi Sonuçları

*A. pallidus* (P26)'dan üretilip saflaştırılan peroksidaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerini belirlemek için 3.2.9'da anlatıldığı gibi ölçümler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarla aktivitesi hesaplanmış ve Aktivite-°C grafikleri çizilmiştir.

İlgili enzim aktivitesi, pirogallol substratı ile pH 7.0'de (optimum pH), 30-90°C'yi kapsayan yedi farklı sıcaklık değerinde 1 saat boyunca belli periyotlarda yapılmıştır. Bulgular grafik olarak Şekil 4.9'de verilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen bulgular toplu olarak Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. *A. pallidus* (P26)'den ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin pirogallol substratı ile stabil sıcaklığın belirlenmesi için belirli bir süre inkübasyondan sonra elde edilen aktivite ölçüm bulguları

Çizelge 4.3. *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler üretilip saflaştırılan peroksidaz enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışmasından elde edilen sonuçlar

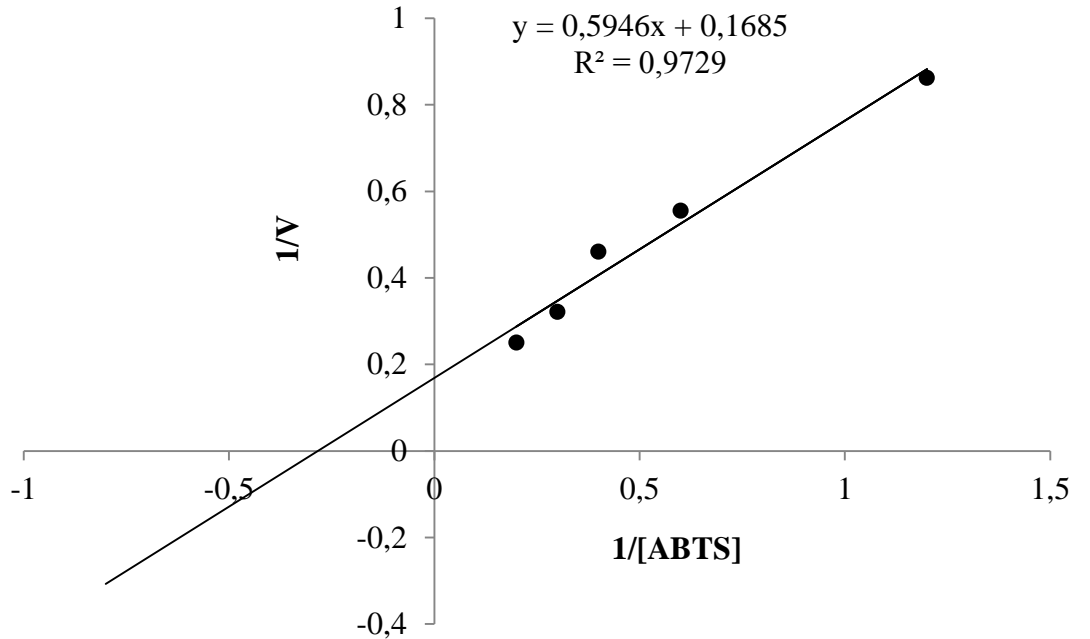
Substratlar	Optimum °C	Aktivite gösterdikleri °C aralığı
ABTS	60	40-80
Pirogallol	60	30-80
4-Metil katekol	60	30-80

#### 4.11. Ekstraselüler Olarak *A. pallidus* (P26)'dan Saflaştırılan Peroksidaz Enziminin $V_{max}$ ve $K_m$ Değerlerinin Sonuçları

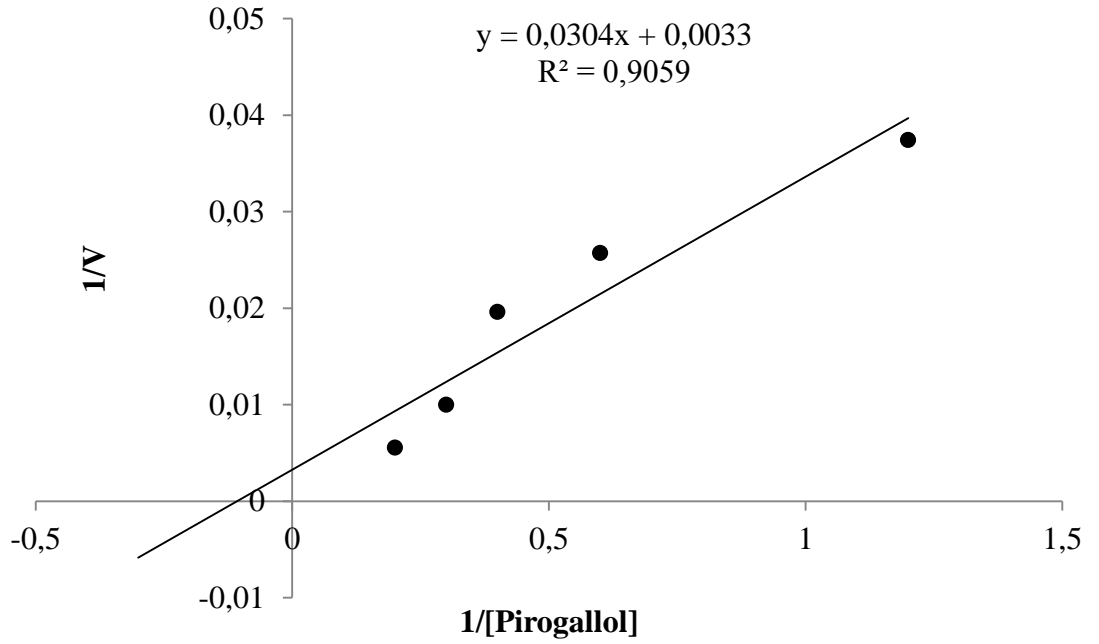
Peroksidaz enziminin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri ile ilgili çalışmalar 22,5 mM'lık  $H_2O_2$  varlığında 5 mM'lık ABTS, pirogallol, hidrokinon ve katekol substratları ile yapılmıştır. Bunun için önce peroksidaz enzimi ile ABTS, pirogallol, hidrokinon ve 4-metil katekol

substratlarının konsantrasyonları sabit tutularak,  $H_2O_2$  için beş farklı substrat konsantrasyonunda optimum aktive ölçümleri yapılmış ve Lineveawer-Burk grafikleri çizilmiştir. Daha sonra peroksidaz enzimi ile  $H_2O_2$  substratının konsantrasyonları sabit tutularak ABTS, pirogallol, hidrokinon ve 4-metil katekol substratları için beş farklı substrat konsantrasyonunda optimum aktive ölçümleri yapılmış ve grafikler çizilerek Şekil 4.10-4.13'de verilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

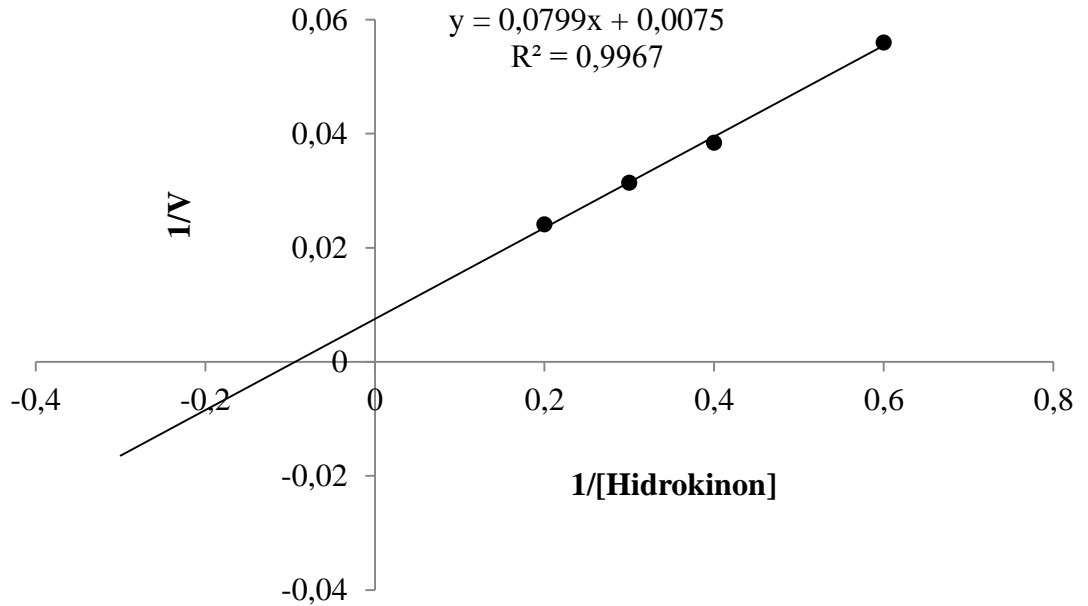
Ayrıca *A. pallidus* (P26) bakterisinden üretilip saflaştırılan enzim çözeltisi için katalaz aktivitesi (CAT) 3.2.1.c'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Enzimin CAT aktivitesi, 0.110 EU/mL olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan POD enziminin guaiakol substratına karşı aktivite göstermediği tespit edilmiştir.



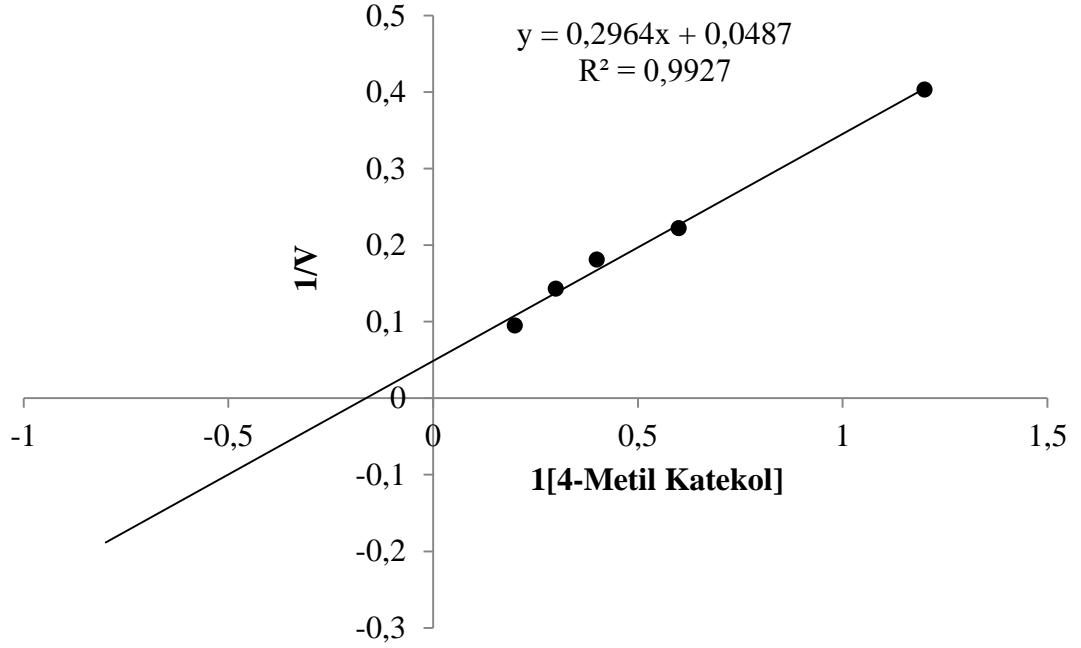
**Şekil 4.10.** *A. pallidus* (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enziminin  $H_2O_2$  substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı ABTS substratı konsantrasyonu ile elde edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği.



**Şekil 4.11.** *A. pallidus* (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enziminin  $H_2O_2$  substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı pirogallol substratı konsantrasyonu ile elde edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği.



**Şekil 4.12.** *A. pallidus* (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enziminin  $H_2O_2$  substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı hidrokinon substratı konsantrasyonu ile elde edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği.



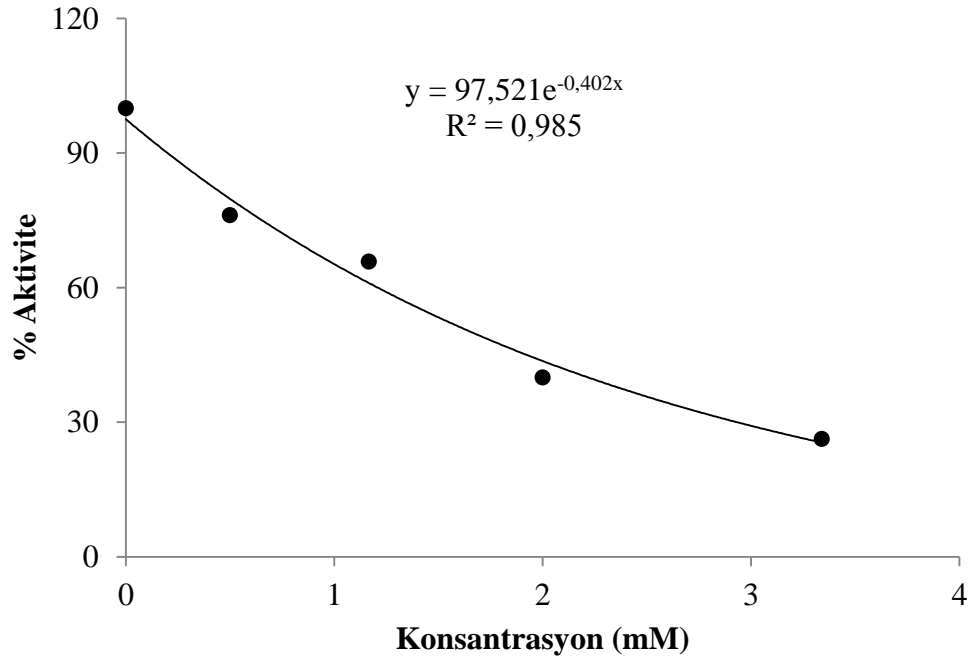
**Şekil 4.13.** *A. pallidus* (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enziminin  $H_2O_2$  substratı konsantrasyonu sabit tutulurken farklı 4- metil katekol substratı konsantrasyonu ile elde edilen  $1/V-1/[S]$  grafiği.

**Çizelge 4.4.** *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzimi için yapılan  $K_m$  ve  $V_{max}$  çalışmasından elde edilen sonuçlar

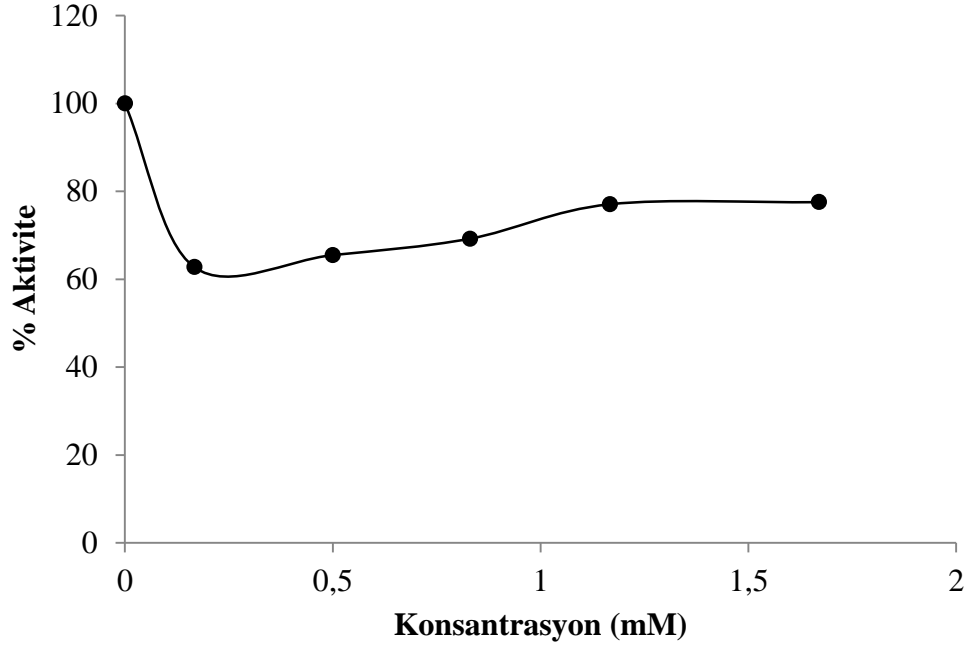
Substratlar	$V_{max}$ (EU/mL.dak)	$K_m$ (mM)
ABTS	5,95	3,53
Pirogallol	333,4	10
Hidrokinon	142,9	11,3
4-Metil katekol	20,83	6,2

**4.12. *A. pallidus* (P26)'dan Ekstraselüler Olarak Saflaştırılan Peroksidaz Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , Sitrik Asit ve Askorbik Asit'in etkisi**

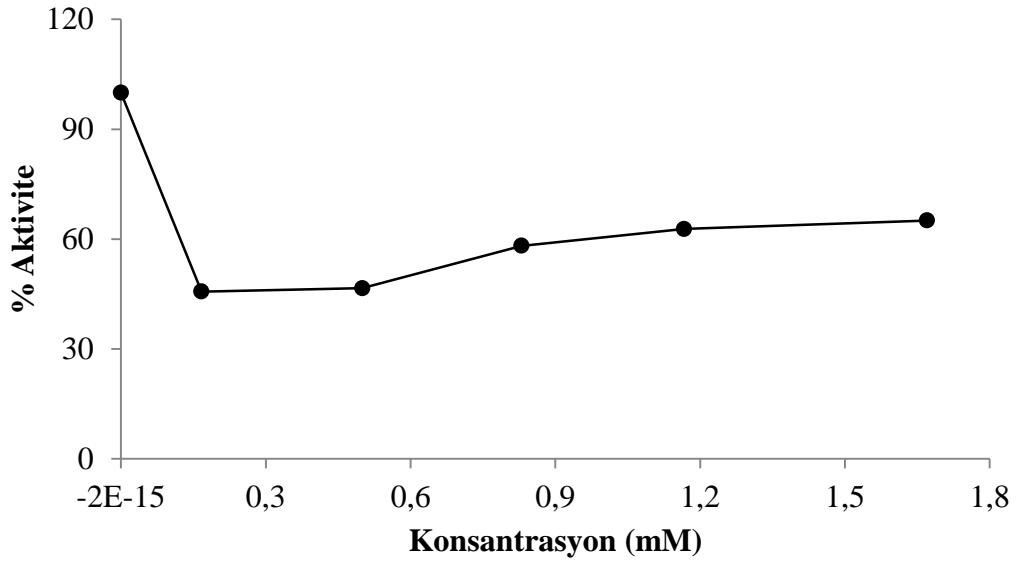
*A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin aktiviteleri üzerine  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , askorbik asit ve EDTA'nın etkileri araştırılmıştır. Çalışmalar sonucu elde edilen inhibisyon etkileri konsantrasyona karşı %Aktivite grafikleri olarak Şekil 4.14-4.25'de gösterilmiştir. İnhibisyon gösterenler için  $I_{50}$  değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.14.**  $\text{HgCl}_2$ 'nin *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

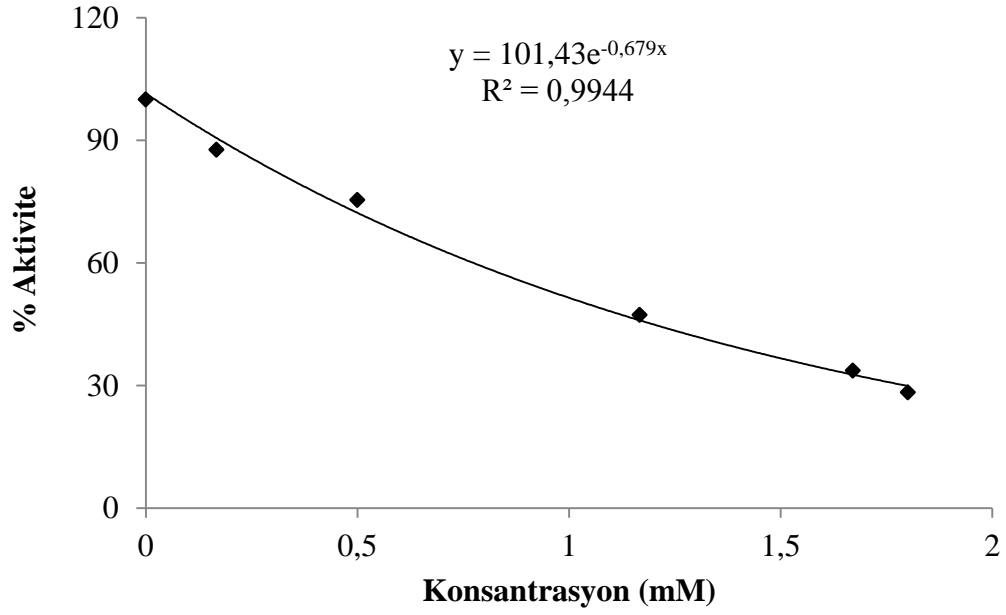


**Şekil 4.15.**  $\text{CuCl}_2$ 'nin *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

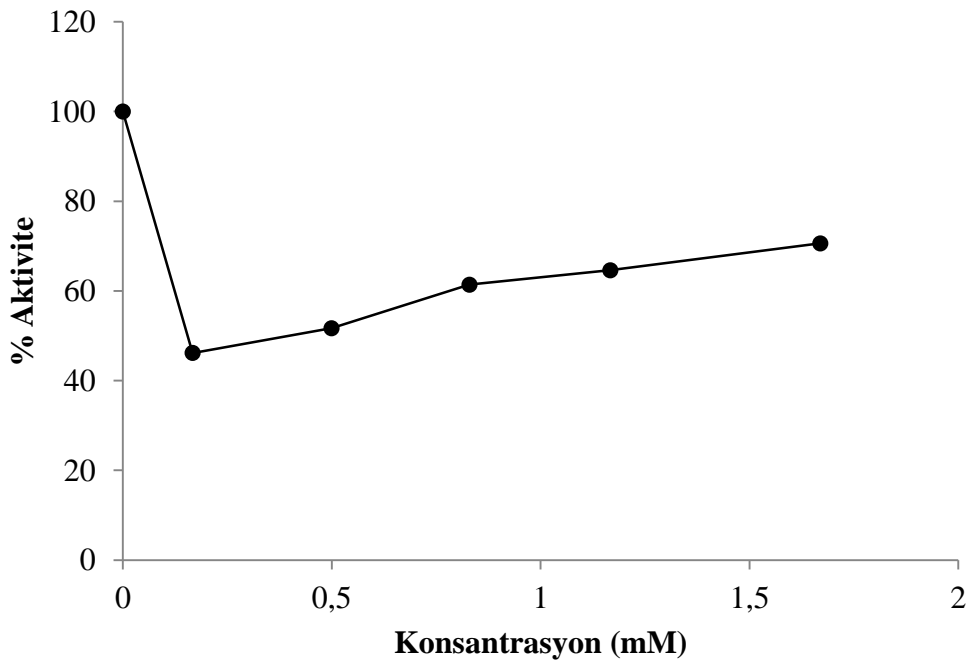


**Şekil 4.16.**  $\text{NiCl}_2$ 'nin *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

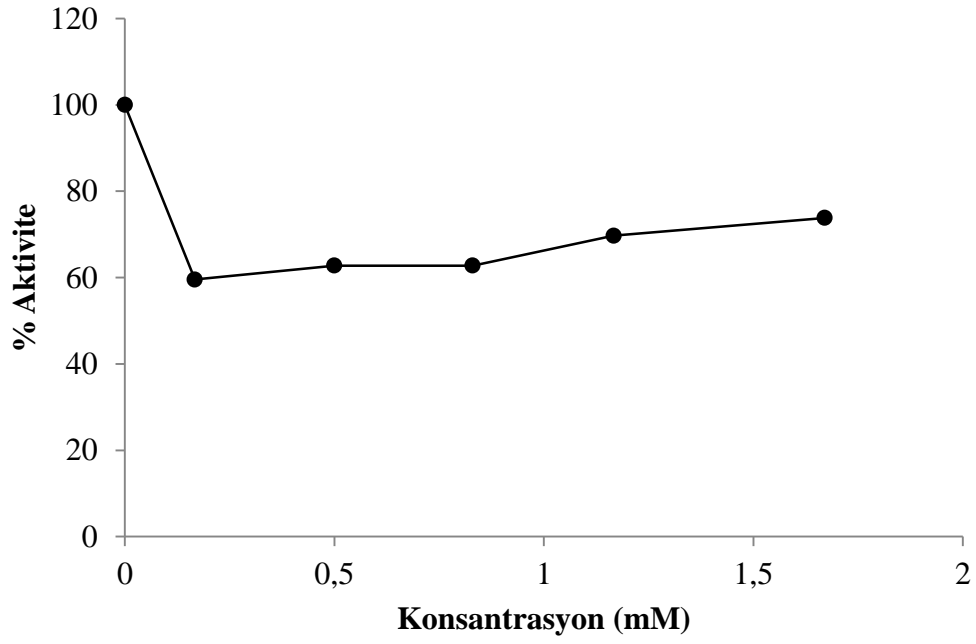




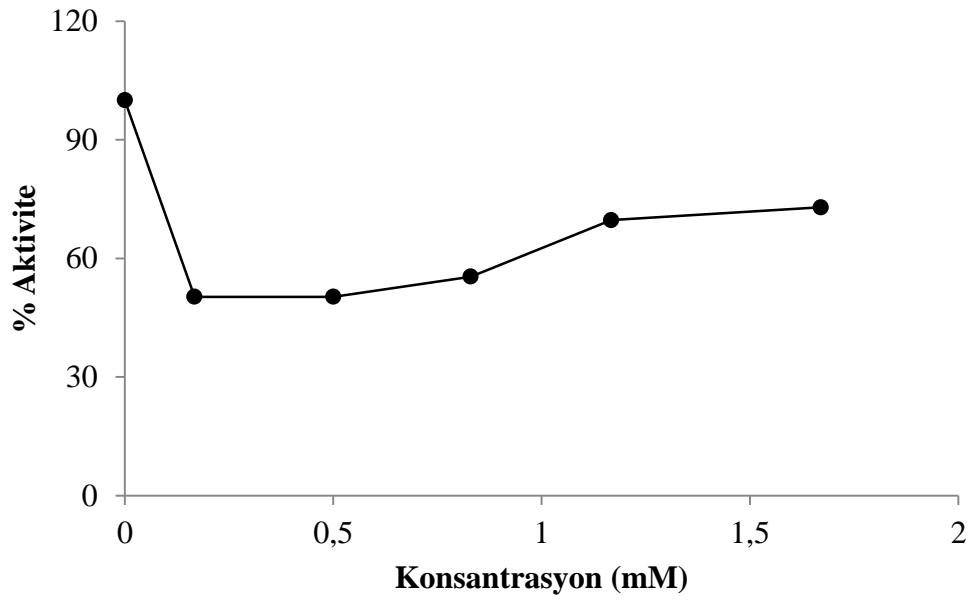
Şekil 4.17. ZnCl<sub>2</sub>'nin *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



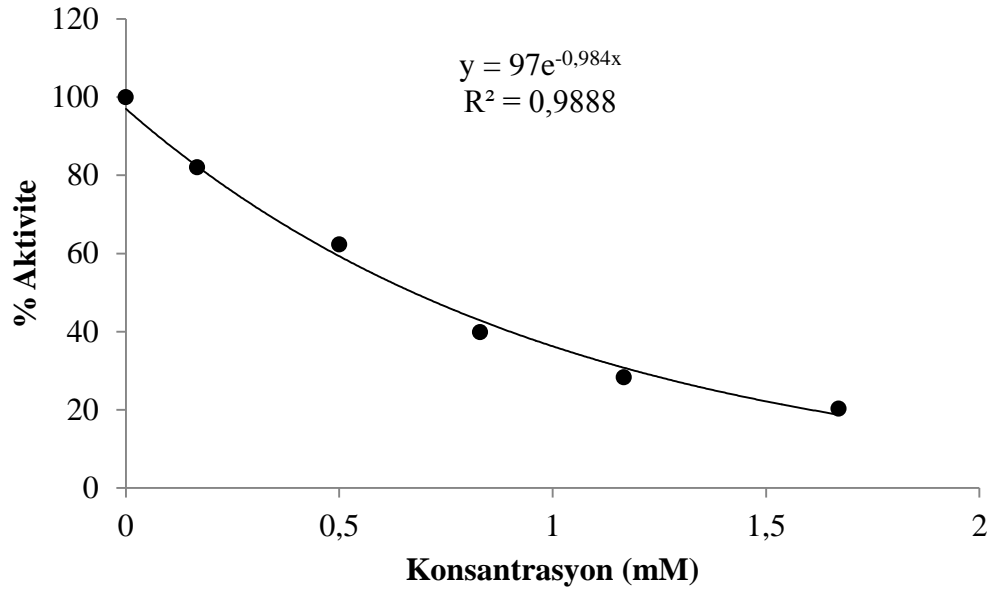
Şekil 4.18. CoCl<sub>2</sub>'nin *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



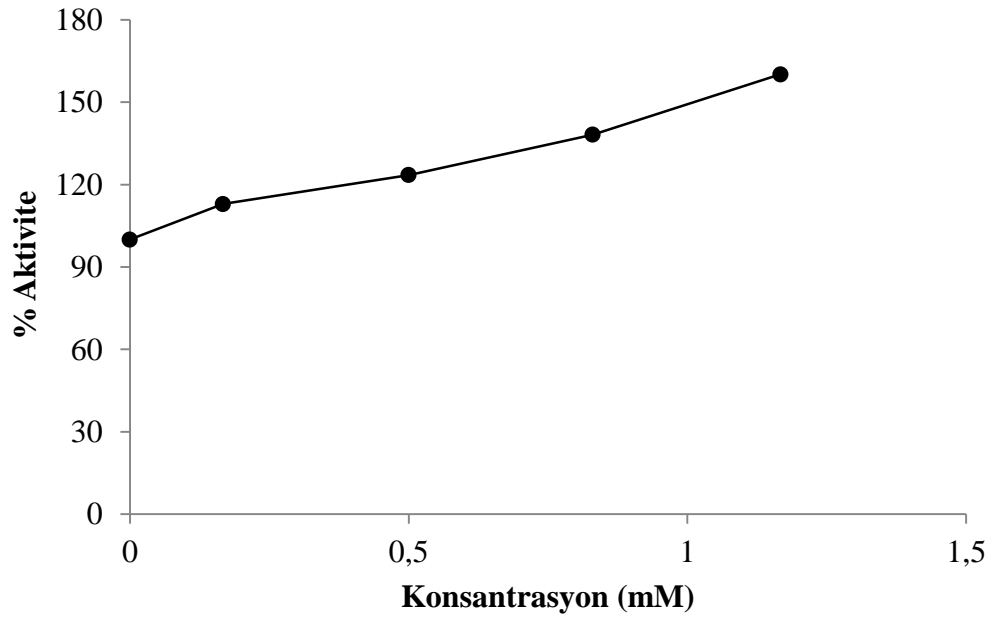
Şekil 4.19.  $\text{CaCl}_2$ 'nin *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



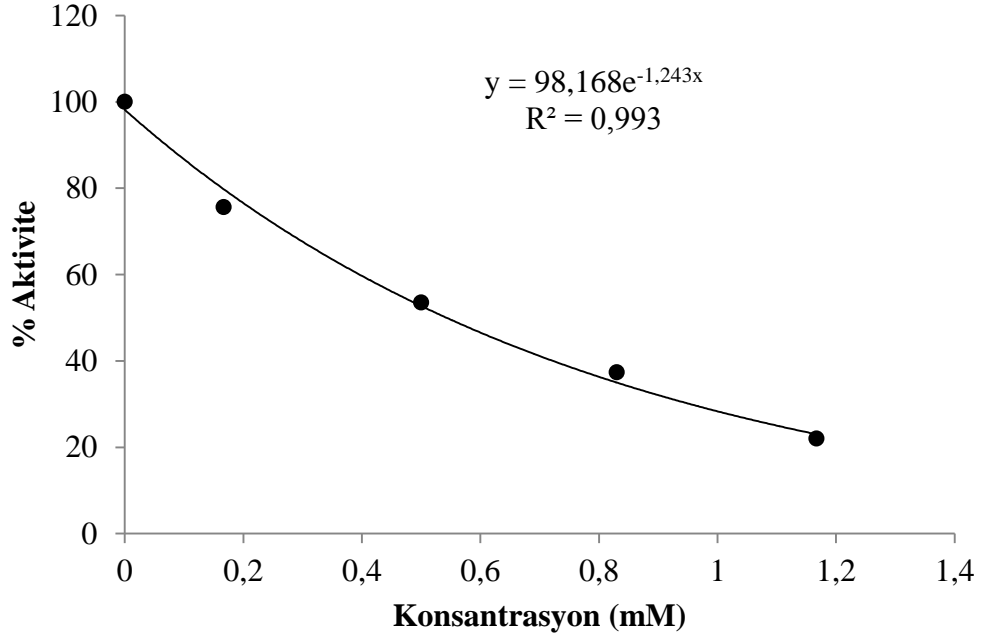
Şekil 4.20.  $\text{MnCl}_2$ 'nin *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



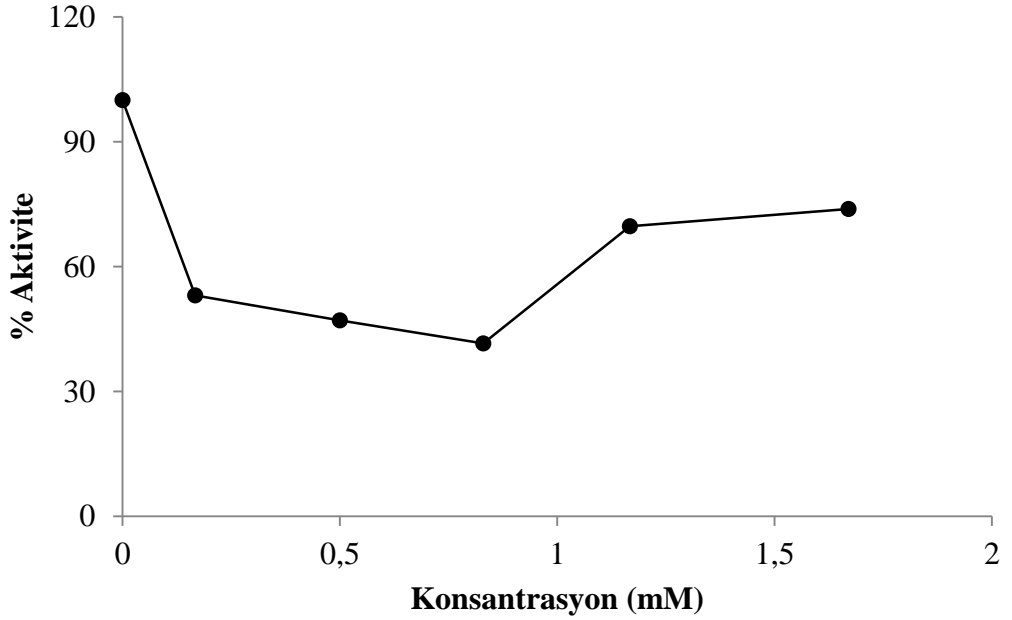
**Şekil 4.21.** FeCl<sub>2</sub>'nin *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



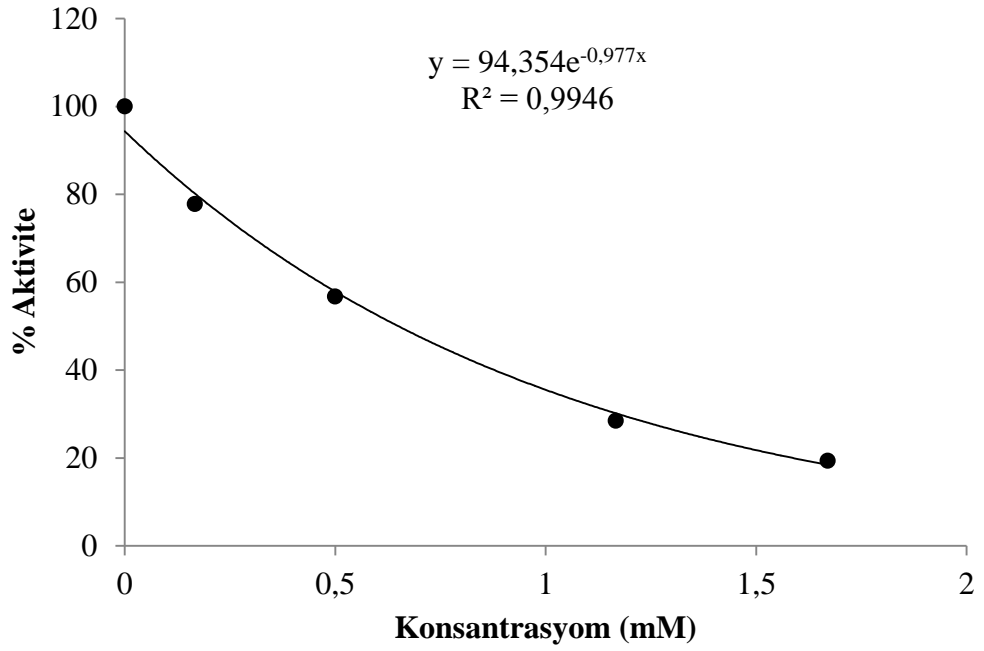
**Şekil 4.22.** KCl'nin *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.23. BaCl<sub>2</sub>'nin *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.24. Askorbik asit'in *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



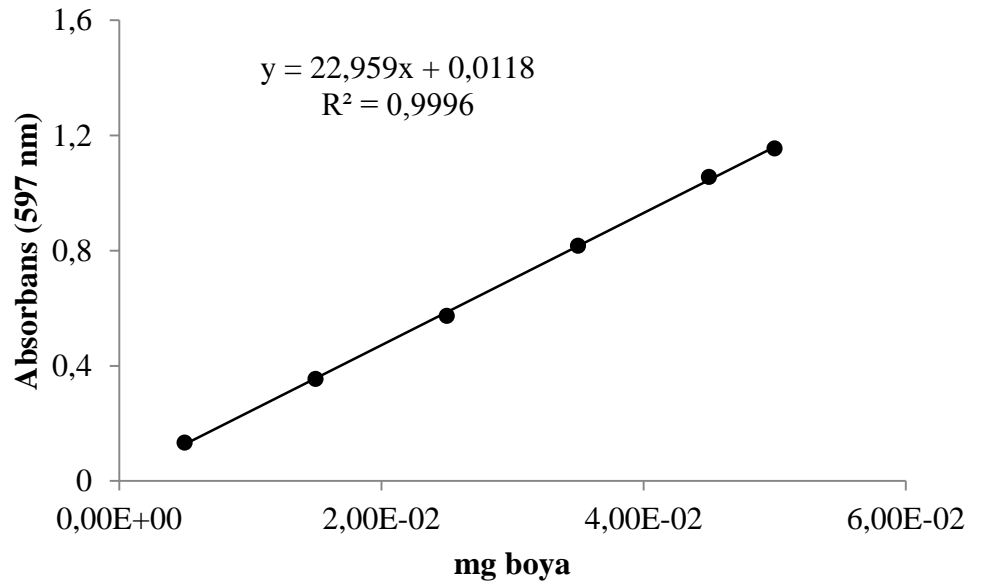
**Şekil 4.25.** EDTA'nın *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

**Çizelge 4.5.** *A. pallidus* (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enzimi bazı metal iyonları ve kimyasallar için  $I_{50}$  (mM) değerleri

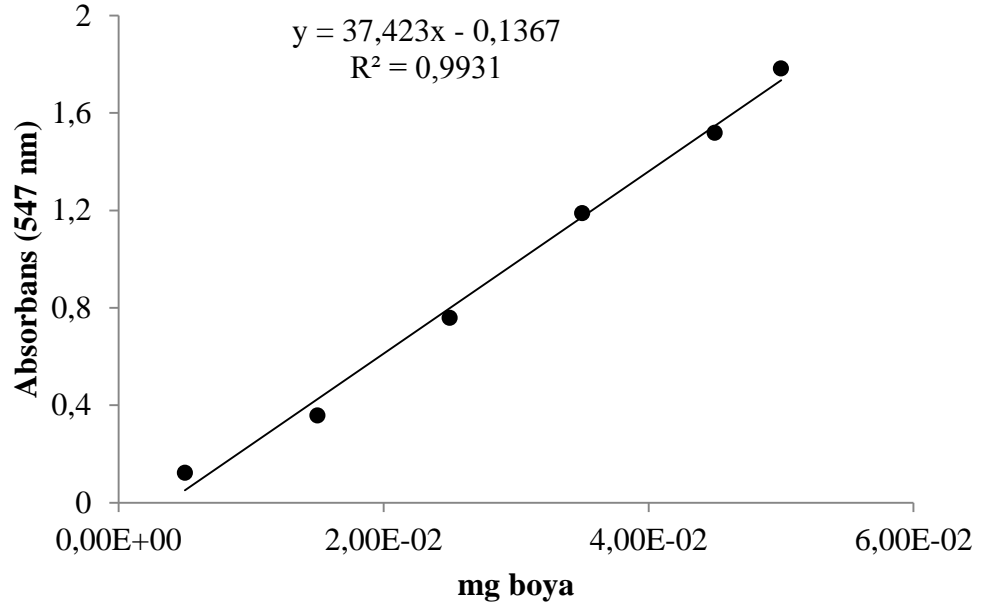
<b>KIMYASALLAR</b>	<b><math>I_{50}</math></b>
HgCl <sub>2</sub>	1.67
ZnCl <sub>2</sub>	1.06
FeCl <sub>2</sub>	0.68
BaCl <sub>2</sub>	0.544
EDTA	0.655

#### 4.13. *A. pallidus* (P26)'dan Ekstraselüler Olarak Saflaştırılan Peroksidaz Enzimi Kullanılarak Bazı Tekstil Boyarlarının Giderimi İle İlgili Sonuçlar

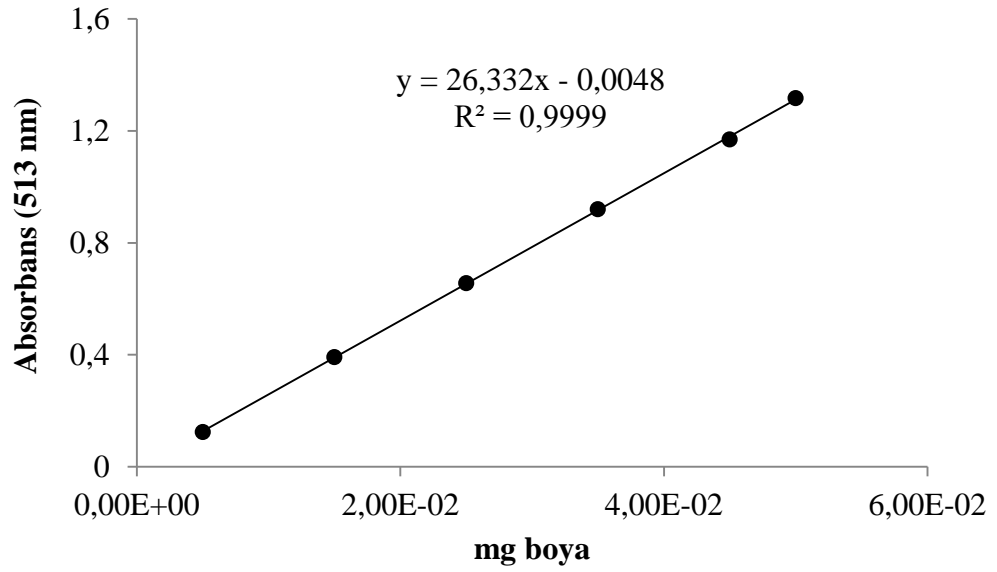
Çözelti ortamındaki Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 tekstil boyarlarının miktarını belirlemek amacıyla standart eğriler hazırlanmış ve Şekil 4.26-29'de gösterilmiştir.



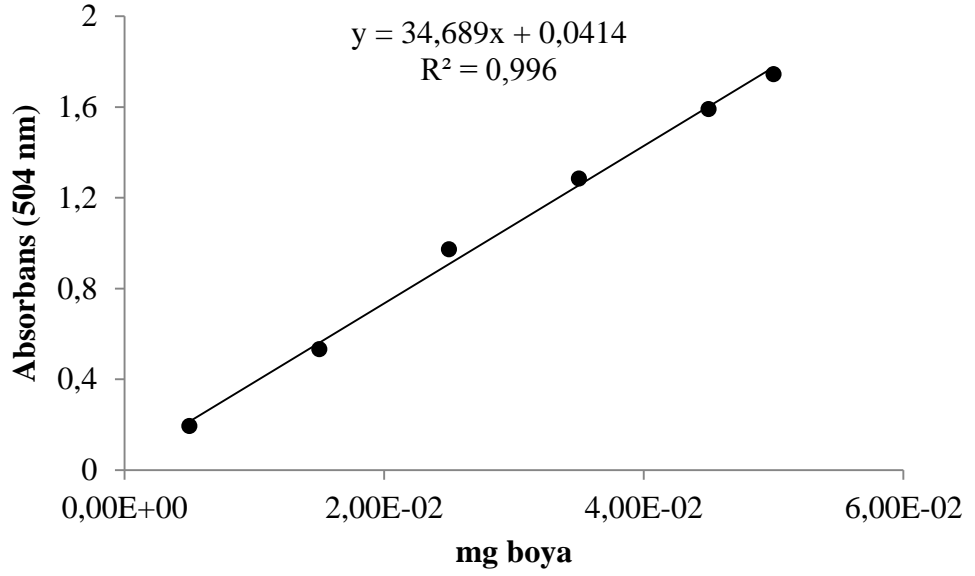
Şekil 4.26. Reaktif Siyah 5 tekstil boyası için hazırlanan standart grafik



Şekil 4.27. Fuksin tekstil boyası için hazırlanan standart grafik



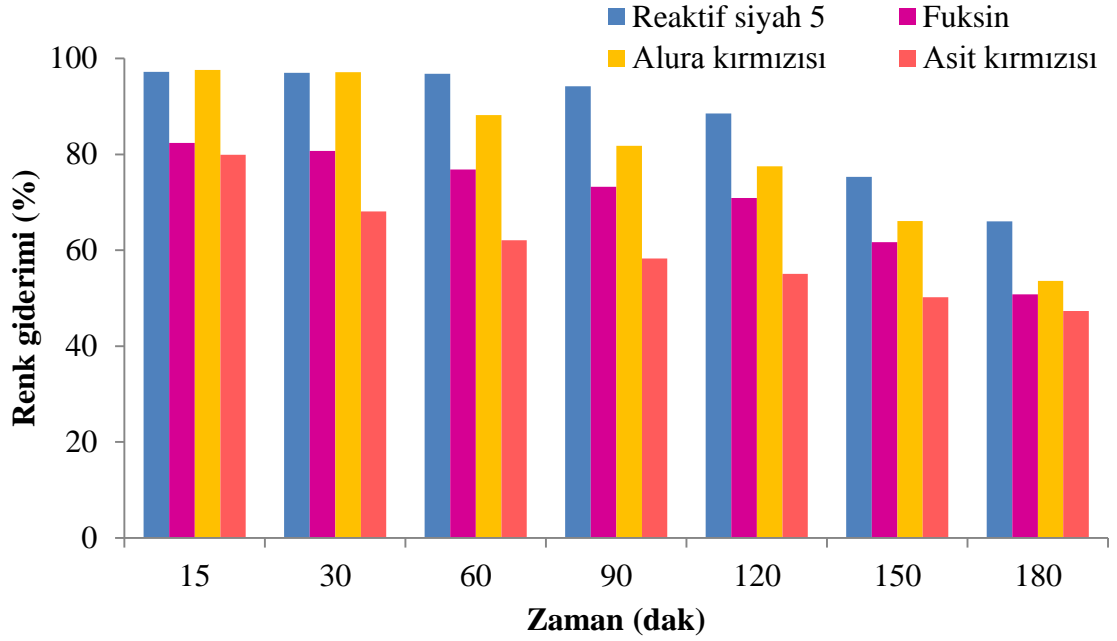
Şekil 4.28. Alura Kırmızısı tekstil boyası için hazırlanan standart grafik



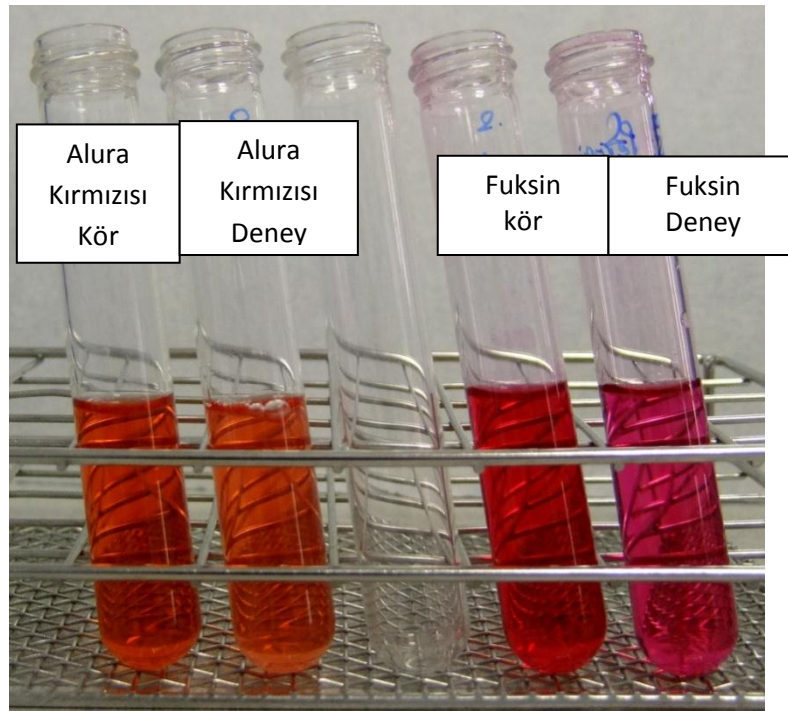
**Şekil 4.29.** Asit Kırmızısı 37 tekstil boyası için hazırlanan standart grafik

*A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilen ve saflaştırılan peroksidaz enziminin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 gibi bazı tekstil boyalarının atık sulardan giderilmesi işlemini nasıl etkilediği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.30, Şekil 32 ve Çizelge 4.6'da verilmiştir.

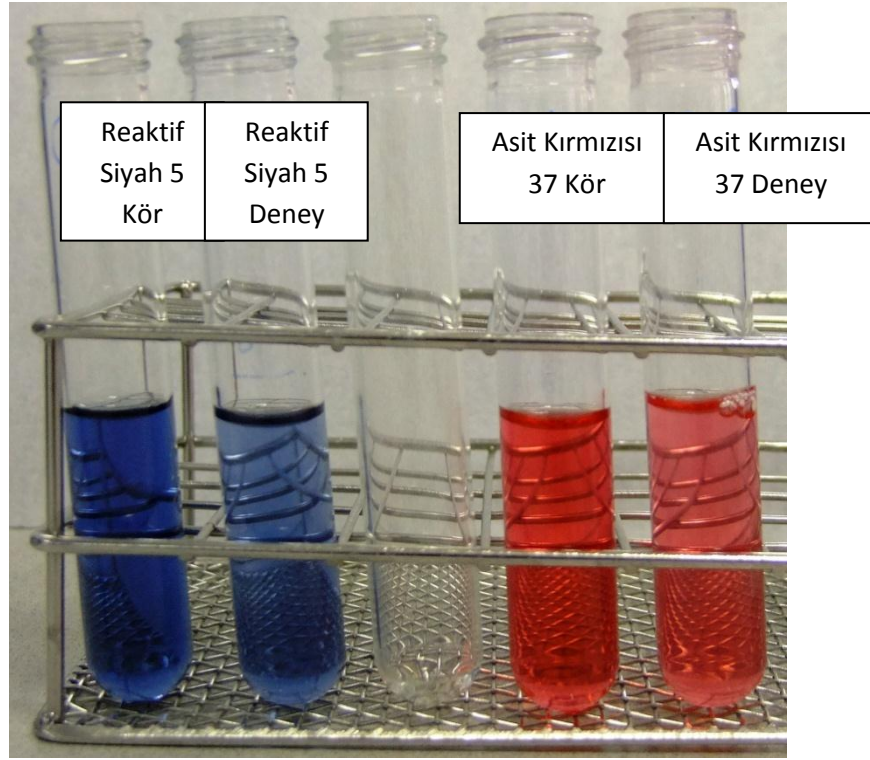




Şekil 4.30. *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enziminin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Acid Red 37 gibi bazı tekstil boyaalarının atık sulardan giderilmesi işlemine etkisi



Şekil 4.31. *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enziminin Allura Kırmızısı ve Fuksin gibi bazı tekstil boyaalarının atık sulardan giderilmesi işleminin fotoğrafı



**Şekil 4.32.** *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enziminin Reaktif Siyah 5 ve Asit Kırmızı 37 gibi bazı tekstil boya larının atık sulardan giderilmesi işleminin fotoğrafı

**Çizelge 4.6.** *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak saflaştırılan peroksidaz enziminin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızı 37 ve Acid Red 37 gibi bazı tekstil boya larının atık sulardan giderilmesi işlemine etkisi

Tekstil Boyaları	0.dak	15.dak	30.dak	60.dak	90.dak	120.dak	150.dak	180.dak
	mg boya	mg boya	mg boya	mg boya	mg boya	mg boya	mg boya	mg boya
Reaktif Siyah 5	50	48,6	48,5	48,4	47,1	44,25	37,65	33
Fuksin	50	41,2	40,35	38,4	36,6	35,45	30,8	25,4
Allura Kırmızı 37	50	48,8	48,55	44,1	40,9	38,75	33,05	26,8
Asit Kırmızı 37	50	39,95	34,05	31,05	29,15	27,55	25,1	23,65

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Erzurum-Pasinler kaplıcasından izole edilen termofilik *Aeribacillus pallidus* (P26) suşunun peroksidaz (POD) enzim üretme potansiyeli araştırılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda test izolatının, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve pirogallol substratlarının indükleyici etkisiyle POD enzimini yüksek aktivitelere ekstrasellüler olarak ürettiği tespit edilmiştir. Elde edilen ekstraktlardan; NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> çöktürmesi, CM-sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sephakril S200 jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak 35,6 verimle yaklaşık olarak 85 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1).

*A. pallidus* (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH 2.0-11.0 aralığında aktivite ölçümleri yapılmıştır. Optimum pH için pH 2.0'den 11.0'e kadar on farklı pH ortamında çalışılmıştır. pH 2.0'den 5.0'e kadar asetat, pH 5.0'dan 8.0'e kadar fosfat ve pH 8.0'dan 9.0'a kadar da Tris / HCl ve pH 10.0'dan 11.0'e kadar karbonat tamponları ile 4-metil katekol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pirogallol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrat çiftleri ile enzimin gösterdiği aktivite spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi optimum pH 4-metil katekol, pirogallol ve ABTS için 7.0 olarak bulunmuştur. Gudelj *et al.* (2001) tarafından *Bacillus sp'*den saflaştırılan peroksidaz enzimi içinde benzer olarak optimum pH 7.0 olarak bulunmuştur. Saf peroksidaz enziminin stabil pH'sına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda enzimin oldukça dayanıklı olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin +4°C'de yapılan stabil pH'ya ilişkin çalışmalarda, dördüncü günde bile pH 6.0'da pirogallol substratı ile enzim aktivitesinin %33,27'ini, pH 7.0'da %67,8'ini ve pH 8.0'de ise %49'unu koruduğu belirlenmiştir.

*A. pallidus* (P26)'den ekstrasellüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesinde 4-metil katekol, pirogallol ve ABTS substratları için optimum pH'da ve 20-90°C aralığında aktiviteler belirlenmiştir. Enzimin her üç substratının da optimum sıcaklık çalışmalarında 30 ile 80°C'ler arasında oldukça aktif olduğu ve maksimum aktiviteyi 60°C'de gösterdiği bulunmuştur. Bulguları destekler

nitelikte, literatürde bazı termofilik bakterilerden saflaştırılan peroksidaz enzimlerinde de benzer olarak 60°C ve üzerindeki sıcaklıklarda maksimum peroksidaz aktivitesi belirlenmiştir (Sangar *et al.* 2012).

Jel filtrasyon kromatografisi ile *A. pallidus* (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enziminin molekül kütlesi 31 kDa olarak bulunmuştur. Bu bulgu, bakterilerden saflaştırılan peroksidazların molekül ağırlıkları ile uyum içerisindedir. *Streptomyces griseus* bakterisinden saflaştırılan peroksidaz enziminin 34 kDa ve 43 kDa alt birimlerinin olduğu belirlenmiştir (Zeiner *et al.* 1988).

Çalışmada kullanılan enzimin bütün substratları için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineaver-Burk grafikleri çizilerek elde edilen denklemlerden hesaplanmıştır (Şekil 4.10-4.13). *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin 25°C ve pH: 7.0'de ABTS substratı için  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 5,95 EU/mL.dak ve 3.53 mM olarak bulunmuştur.  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri enzimin farklı substratları için de belirlenmiştir. Aynı koşullarda  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri pirogallol için sırasıyla 333,4 EU/mL.dak ve 10 mM; hidrokinon için 142,9 EU/mL.dak ve 11,3 mM; 4-metil katekol substratı için 20,83 ve 6,2 mM olarak bulunmuştur. Elde edilen değerlerden enzimin ABTS'ye karşı en yüksek afiniteye sahip olduğu ve en yüksek  $V_{max}$  değerini ise pirogallol substratına karşı gösterdiği tespit edilmiştir. Peroksidaz enziminin doğal substratı olan guaiakolu ise hidroliz etmediği belirlenmiştir. Elde edilen bulguların literatür verileriyle (Poole *et al.* 1986; Apitz and van Pee, 2001) uyum sağladığı, yani saflaştırılan peroksidaz enzim/enzimlerinin guaiakol substratını hidroliz etmediği görülmüştür. Buradan yola çıkarak enzimin katalaz peroksidaz enzim grubuna dahil olduğu sonucuna varılmıştır.

*A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin aktiviteleri üzerine  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $K^+$ ,  $Ba^{2+}$  gibi metal iyonlarının, askorbik asit ve EDTA gibi bazı kimyasalların etkileri araştırılmıştır.  $Hg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ , EDTA'nın enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir.  $K^+$ 'un enzimi aktive

ettiği, diğer metal iyonlarının ise düşük konsantrasyonlarda inhibe ederken, yüksek konsantrasyonlarda enzimin aktivitesini aktivasyon yönünde arttırdığı gözlemlenmiştir.

*A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enzimi; çevre kirliliğine sebep olan Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 gibi bazı tekstil boyaalarının giderilmesinde kullanılmıştır. 180 dak sonunda enzimin Reaktif Siyah 5 boyar maddesini %66 oranında azalttığı belirlenmiştir. Enzimin 180 dak sonunda Fuksin'i %50.8, Allura Kırmızısını %53,6 ve Asit Kırmızısı 37'i ise %47,3 oranında azalttığı bulunmuş ve elde edilen bulguların literatür verileriyle uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir (Si and Cui 2012).

Bu sonuçlar göz önüne alındığında *A. pallidus* (P26)'dan üretilen ve saflaştırılan peroksidaz enzimi için;

1. *A. pallidus* (P26)'dan üretilen ve saflaştırılan peroksidaz enziminin optimum pH'sının 7.0 olduğu tespit edilmiştir.
2. Bu çalışmada saflaştırılan peroksidaz enziminin optimum sıcaklığının, 60°C olduğu bulunmuştur.
3. Üretilip saflaştırılan peroksidaz enziminin molekül ağırlığının 31 kDa olduğu tespit edilmiştir.
4. Saf peroksidaz enzimi için ABTS, pirogallol, hidrokinon ve 4-metil katekol substratları için Vmax değerleri sırasıyla 5,95 EU/mL.dak., 333,4 EU/mL.dak., 142,9 EU/mL.dak. ve 20,83 EU/mL.dak olarak belirlenmiştir. Km değerleri ise ABTS, pirogallol, hidrokinon ve 4-metil katekol substratları için sırasıyla 3,53 mM, 10 mM, 11,3 mM ve 6,2 mM olarak hesaplanmıştır.
5. Enzimin POD aktivitesinin yanı sıra CAT enzim aktivitesine de sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun sonucunda *A. pallidus* (P26) bakterisinden üretilip saflaştırılan POD enziminin peroksidazlardan katalaz-peroksidaz (CP) grubuna dahil olduğu sonucuna varılmıştır.

6. *A. pallidus* (P26)'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan peroksidaz enzimi kullanılarak çevre kirliliğine sebep olan Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 gibi bazı tekstil boyalarının giderilmesinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Enzimin Reaktif Siyah 5, Fuksin, Allura Kırmızısı ve Asit Kırmızısı 37 boyalarının etkisini 3 saat sonunda %66.0, %50.8, %53.6 ve %47.3 oranında azalttığı belirlenmiştir.

Elde edilen bu sonuçlar dikkate alındığında; tekstil alanında kullanılan ve canlılar üzerinde olumsuz etkisi olduğu bilinen sentetik veya yarısentetik boyaların gideriminde, *A. pallidus* (P26)'dan saflaştırılan peroksidaz enziminin yüksek verimlilikle kullanılabileceği gözlemlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Acar, S., 2009. Hasanabdal köyü termal tesislerinden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Adiguzel, A., Inan, K., Sahin, F., Tulin Arasoğlu, T., Gulluce, M., Belduz, A.O., Baris, O., 2011. Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey). *Turk J Biol*, 35, 267-274
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Sahin, F., 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J Microbiol Methods*, 79(3), 321-8.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Al-Qudah, Z., 2000. Adsorption of Dyes Using Shale Oil Ash. *Water Research*, 34 (3): 4295-4303.
- Al-Senaidy, A., İsmail, M., 2011. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 293-298.
- Altıkatoğlu, M., Başaran, Y., Ariöz, C., Kuzu, H., 2009. Thermal stabilization of horseradish peroxidase by covalent conjugation with dextran. *Journal of Engineering and Natural Sciences*. Sigma 27, 216-225.
- Altunkaya, A., Gökmen, V., 2011. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase, Peroxidase and Lipoxygenase from Freshly Cut Lettuce (*L. sativa*). *Food Technol. Biotechnol.* 49 (2), 249–256
- Aptiz, A., Van Pée KH, K., 2001. İsolation and characterization of a thermostable intracellular enzyme with peroxidase activity from *Bacillus sphaericus*. *Arch Microbiol*, 175 175(6), 405-412.
- Armağan, B., Turan, M., S.Çelik, M., Modifiye sepiyolit ve zeolit in tekstil endüstrisi atıksularında adsorbant olarak kullanılması: karşılaştırmalı değerlendirme. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi.
- Bal, T., 2012. Aşkale (Erzurum) manyezit ocaklarından cevher zenginleştirme potansiyeli bulunan bakterilerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Atatürk üniversitesi, Fen Bilimlerin Enstitüsü.
- Başbülbul, G., Bıyık, H., 2010. Termofilik bakteri izolatlarının antibakteriyal aktivite spektrumları ve 16s rRNA dizi analizi ile tanımlanmaları. *Anadolu Doğu Bilimleri Dergisi* 1(1), 1-7.
- Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C., Sola, M., 2012. Redox properties of heme peroxidases. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 500, 21-36
- Bergsten-Torralba, L.R., Nishikawa, M.M., Baptista, D.F., Magalhães, D.P., da Silva, M., 2009. Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 808-817
- Bradford, M.M., 1976. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.

- Civello, P. M., Martinez, G. A., Chaves, A. R., Anon, M. C. 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*-Duch)s partial-purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2596–2601
- Coşkun, A., 2010. Endüstriyel enzimler üreten yeni *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Çukurova üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Cunha, A., Almeida, A., Coelho, F.J.R.C., Gomes, N. C. M., Oliveira, V., L. Santos, A., 2010. Bacterial Extracellular Enzymatic Activity in Globally Changing Aquatic Ecosystems
- Çiftci, M., Adıgüzel, A., Erat, M., Şahin, F., 2004. *Bacillus* sp. (BA-142) Bakterisinden glukoz 6-Fosfat dehidrogenaz enziminin kısmen saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Dergisi*, 35(3-4), 151-158,
- Daniel RM, Peterson ME, Danson MJ, *et al.*, 2010. "The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity". *Biochem. J.* 425 (2): 353-60.
- Dawkar, V.V, Jadhav, U.U., Telke, A.A., Govindwar, S.P., 2009. Peroxidase from *Bacillus* sp. VUS and its role in the decolorization of textile dyes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14, 361-368
- Deepa, S. S., A Arumughan C., 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry*, 61, 503–511.
- Düzcan, K., 2010. Karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisinden süperoksit dismutaz ve peroksidaz enzimlerinin karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Fodil, D., Jaouadi, B., Badis, A., Nadia, Z., Ferradji, F., Bejar, S., Boutoumi, H., 2012. A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. Strain AH4: Purification and biochemical characterization. *Bioresource Technology* 11, 383-390.
- Fortea, M., Miranda, S., Martinez, A., Sanchez, P., Zafrilla, M., Cacha, A., Delicado, E., 2011. Kinetic characterization and termal inactivation study of red alga peroxidase. *Food chemistry* 127, 1091-1096.
- Friedrich, A. and Antranikian, G. 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62; 2875-2882.
- Friedrich, J., Mohorcic, M., Teodorovic, S., Golob V. 2005. Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths., in press.
- Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A., Forsythe, S., 2003. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *J. Biotechnol.*, 101: 49–56.
- Gudelj, M., Fruhwirth, G., Paar, A., 2001. A catalase-peroxidase from a newly isolated thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. With potential for the treatment of textile bleaching effluents. Digital object identifier (DOI). 10.1007, 5:423-429
- Güven, R., 2011. Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri. *Elektronik mikrobiyoloji dergisi*. pp:1-10
- Halpin, B., Pressey, R., Jen, J., Mondy, N., 1989. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *Journal Food Science*



- 54, 644.
- Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbauer, M., Szewzyk, U., 1998. Transformation of Industrial Dyes by Manganese Peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a Manganese-Independent Reaction. *Appl Environ Microbiol.* August; 64(8): 2788–2793.
- Humaira A., Qayyum, H., 2010. Studies on bitter gourd peroxidase catalyzed removal of p -bromophenol from wastewater Desalination, 262 (1-3), p.267-272  
<http://www.sigma.com.tr> /Peroksidaz, Mart 2008.
- Jaenicke, R., 1991. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.*, 202; 715-728.
- Janusz G, Kucharzyk KH, Pawlik A, Staszczak M, Paszczynski, AJ., 2013. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme Microb Technol.* 10;52(1):1-12
- Jassey, V., Chiapusio, G., Gilbert, D., Toussaint, M., Binet, P., 2012. Phenoloxidase and peroxidase activities in Sphagnum-dominated peatland in a warming climate. *Soil biology & biochemistry* 46, 49-52.
- Jorgensen, S., Vorgias, C. E. and Antranikian, G. 1997. Cloning, sequencing and expression of an extracellular  $\alpha$ - amylase from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus furiosus* in *E. coli* and *B. subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 272; 16335-16342.
- Kanayama, N., Suzuki, T., Kawai, K., 2002. Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. Vol.93, no. 4,405-410.
- Karlson, P., Telefoncu, A. 1998. Tıp ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya, Sermet Mat., Kırıkkale, s.68.
- Khatun, S., Ashraduzzaman, M., Karim, M., Pervin, F., Absar, N., Rosma, A., 2012. Purification and characterization of peroxidase from moringa oleifera L. leaves. *Bioresources* 7(3), 3237-3251.
- Kirk, T., Farrell, R., (1987) “Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin” *Annu Rev Microbiol.*, 41: 465-505.
- Köksal, E., 2007. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) Peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi, Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı.
- Kristensen, B.K., Bloch, H., Rasmussen, S.K. 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiology*, 120, 501.
- Kristjansson, J.K., Stetter, K.O., 1992. Thermophilic bacteria. In: Kristjansson, JK (ed). *Thermophilic bacteria*. London, CRC Press, Inc., Boca Raton. pp 1-18.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage, T4. *Nature (London)*, 227, 680-685.
- Lee, H.C., Klein, B.P. 1990. Classification of green pea peroxidases by preparative isoelectric focusing. *Journal Food Biochemistry*, 14, 137–152.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
- Leuschner, C. and Antranikian, G. 1995. Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11; 95-114.

- Lindstrom, R.F., Ramaley, R.F., Bizzoco, R.L.W., 2002. Invisible Invasion: Potential Contamination of Yellowstone Hot Springs by Human Activity, *Western North American Naturalist*, 62(1), 44-58.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". *Journal of the American Chemical Society* 56 (3): 658–666.
- Loprasert, S., Negoro, S., Okada, H., 1988. Thermostable peroxidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of general microbiology* 134, 1971-1976.
- McLellan, K.M., Robinson, D.S. 1987. Purification and heat stability of Brussels sprout peroxidase isoenzymes. *Food Chemistry*, 23, 305–319.
- Menten, L.; Michaelis, M.I. (1913), "Die Kinetik der Invertinwirkung", *Biochem Z* 49: 333–369
- Mittler, R., Zilinskas, B.A., 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J* 5:397-405.
- Nadaroğlu, H., 2009. Purification and properties of peroxidase from prangos ferulacea (Apiaceae) and investigation by some chemicals, *Asian J Chem.*, 21(7) 5768-5776
- Oliveira, P., Duarte, M., Ponezi, A., Durrant, L., 2009. Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus sp.* *Brazilian journal of microbiology*, ISSN 1517-8382. 40:818-826.
- O'Neill, C., Lopez, A., Esteves, SRR, Hawkes, FR., Hawkes, DL., Wilcox, SJ., 2000. Azo-Dye Degradation in An Anaerobic-Aerobic Treatment System Operating on Simulated Textile Effluents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 ,249-254.
- Öztaş, D., 2007. Tirozinaz enziminin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve fenollerin gideriminde kullanımı. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Poole RK, Baines BS, Appleby CA., 1986. Haemoprotein *b*-590 (*Escherichia coli*), a reducible catalase and peroxidase: evidence for its close relationship to hydroperoxidase I and a 'cytochrome alb' preparation. *J Gen Microbiol* 132:1525–1539
- Rao, B.M., Tanksale, M.A., Ghathe, S.M., and deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (3):597-635.
- Rüdiger, A., Jorgensen, P. C. and Antranikian, G. 1995. Isolation and characterization of a heat stable pullulanase from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61; 567-575.
- Sangar, S., Pal, M., Moon, L., Jolly, R., 2012. A catalase-peroxidase for oxidation of  $\beta$ -lactams to their (R)-sulfoxides. *Bioresource Technology* 115, 102-110.
- Shi F, Yamamoto R, Shimamura S, Hiraga S, Nakayama N, Nakamura T, Yukawa K, Hachinohe M, Matsumoto H, Komatsu S., 2008. Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding. *Phytochemistry* 69:1295-1303

- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53:1305–1319.
- Si, J., Cui, B., 2012. A new fungal peroxidase with alkaline-tolerant, chloride-enhancing activity and dye decolorization capacity. *Journal of molecular catalysis* 2589
- Soares, G.M.B., Ferreir, M.C., Pessoa de Amorim, M.T., 2001. “Decolorization of an Antraquinone-Type Dye Using A Laccase Formulation” , *Bioresource Technology*, 79, 171–17
- Şişecioglu, M., Gülçin, İ., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M., Kaya, H., Özdemir, H., 2010. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish. *Journal of medicinal plants research* vol. 4(12), 1187-1196.
- Thakker, G.D., Evans, C.S. and Rao, K.K., (1992) “Purification and Characterisation Of Laccase From *Monocillium indicum* Saxena” *Applied Microbiol Biotechnology*, 37: 321- 323.
- Thongsook, T., Barrett. D., 2005. Purification and partial characterization of Broccoli peroxidase. *J.agric. food chem.* 53,3206-3214.
- Topçular, C., 2006. Taşıyıcı ve taşıyıcısız sistemlerde immobilize peroksidaz enziminin karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi. Hacettepe, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Triplett, B. A., Mellon, J. E., 1992. Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Science* 81, 147-154.
- Tsou, C.- L. 1988. Folding of the nascent peptid chain into a biologically active protein. *Biochemistry*, 27; 1809-1812.
- Turgut, K., 2009. Sakaraya bölgesinde yetişen deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinden peroksidaz enziminin karakterizasyonu. Yüksek lisan tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Vidossich, P. Alfonso-Prieto, M., Rovira, C., 2012. Catalases versus peroxidases: DFT investigation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation in models systems and implications for heme protein engineering. *J Inorg Biochem.* 117:292-7.
- Vieille, C. and Zeikus, J. G. 1996. Thermozyms; identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *TIBTECH* June, 14; 183-190.
- Voet, D., Voet, J.G., , 2010. *Biochemistry*, Wiley; 4 edition, New York.
- Whitaker, J.R., 1990. New and future uses of enzymes in food processing. *Food Biotechnology*, 4, 669-697.
- Wolfgang, A. 2004. *Enzymes in industry: Production ad applications.* WILEYVCH Verlag GmbH&Co. KgaA, Weinheim.
- Wong, Y., Yu, J., 1999. “Laccase-Catalyzed Decolorization of Synthetic Dyes” , *Wat.Res.*, Elsevier, 33(16), 3512–3520
- [www.mustafaaltinisik.org](http://www.mustafaaltinisik.org). /Enzim, Nisan 2008.
- Zeiner, R., Van Pe’ e, K. H., Lingens, F. J., 1988. *Gen. Microbiol.*, 134, 3141–3149.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1987 yılında İran'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İran'da tamamladı. 2006 yılında Islamic Azad Tonekabon Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı'nda lisans öğrenimine başladı ve 2009 yılında bitirdi. 2010 yılında, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.