



GİRESUN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİRESUN YÖRESİNDE YETİŞEN FINDIK MANTARINDAN

(*Lactarius pyragalus*) KATALAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE

KARAKTERİZASYONU

AHMET AHISKALI

OCAK 2017

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİRESUN YÖRESİNDE YETİŞEN FINDIK MANTARINDAN

(*Lactarius pyragalus*) KATALAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE

KARAKTERİZASYONU

AHMET AHISKALI

OCAK 2017

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün Onayı.

Prof. Dr. Başak TAŞELİ

.../.../...

\_\_\_\_\_  
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak KİMYA Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Birsen Şengül OKSAL

\_\_\_\_\_  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

\_\_\_\_\_  
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

\_\_\_\_\_

Doç. Dr. Nurhan GÜMRÜKÇÜOĞLU

\_\_\_\_\_

Yrd. Doç. Dr. Tamer AKKAN

\_\_\_\_\_

## ÖZET

### GİRESUN YÖRESİNDE YETİŞEN FINDIK MANTARINDAN (*Lactarius pyragalus*) KATALAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

AHISKALI, Ahmet

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

OCAK 2017, 76 sayfa

Katalaz, kararlı ve güçlü bir yükseltgen olan hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyerek parçalanmasını sağlar. Katalaz enzimi sadece hidrojen peroksiti katalizleyerek parçalanmasını sağlamakla (detoksifiye etmekle) kalmaz aynı zamanda da fenoller, formik asit, formaldehit ve alkoller içerdiği toksik etkili bileşikler okside etmede görev alır ve yine substrat olarak hidrojen peroksidi kullanır. Katalaz enzimi, ağartıcı, oksitleyici veya sterilizasyon amaçlı kullanılan hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasında, hidrojen peroksit veya glukoz biyosensörlerinin analitiksel amaçlarla ölçülmesinde oldukça yaygın kullanılan bir enzimdir.

Bu çalışmada, Giresun İli ve çevresinde yetişen Fındık Mantarı (*Lactarius pyragalus*)'ndankatalaz enzimi ilk defa saflaştırıldı ve kinetik özellikleri incelendi.

Optimum pH ve sıcaklık değerleri, pH ve sıcaklık stabiliteleri, optimum reaksiyon süresi, optimum reaksiyon süresinin tayini, uygun enzim ve substrat konsantrasyonu belirlendi. Fındık mantarından saflaştırılan katalazın optimum pH'sının 8,0, optimum sıcaklığının 20°C olduğu bulundu.

SDS-PAGE elektroforezi sonucunda saflaştırılan enzimin molekül ağırlığının 12 kDa olduğu bulundu.

*Lactarius pyragalus* katalaz enziminin optimum pH ve sıcaklıkta hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) substratı için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Linewear-Burk yöntemi ile bulunmuştur.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,310 mM ve 62,112 U olarak bulunmuştur.



**Anahtar Kelimeler:** Fındık Mantarı (*Lactarius Pyragalus*), Enzim, Katalaz, Saflaştırma, Karakterizasyon.

## ABSTRACT

### **PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CATALASE ENZYME FROM FIERY MILKCAP MUSHROOMS (*Lactarius pyragalus*) GROWING IN GIRESUN REGION**

AHISKALI, Ahmet

University of Giresun

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Master Seminar

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bahar SÖKMEN

JANUARY 2017, 76 pages

In this seminar, it has mentioned from the enzyme catalase, usage areas of catalase and assay methods of catalase activity.

Catalase allows hydrogen peroxide, a stable and strong oxidizing agent, to be broken down by catalyzing the conversion of water and molecular oxygen. The catalase enzyme not only catalyses the catalytic degradation of hydrogen peroxide (detoxification), but also toxic compounds containing phenols, formic acid, formaldehyde and alcohols act as an oxidizing agent and also use hydrogen peroxide as a substrate. Catalase is an enzyme widely used in hydrogen peroxide or glucose biosensors for analytical purposes in the removal of hydrogen peroxide used for bleaching, oxidizing or sterilizing purposes.

In this study, the catalase enzyme was first purified from hazelnut fungus (*Lactarius pyragalus*) grown in and around Giresun province and its kinetic properties were investigated.

Optimum pH and temperature values, pH and temperature stability, optimum reaction time, optimum reaction time specification, appropriate enzyme and substrate concentration were determined. The optimum pH of catalase purified from bovine mushroom was found to be 8,0 and the optimum temperature to be 20 °C.

The  $K_m$  and  $V_{max}$  values for the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) substrate at the optimum pH and temperature of *Lactarius pyragalus* catalase enzyme were determined by Linewear-Burk method. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values were found to be 0.310 mM and 62.112 U.

The purified enzyme, which showed SDS-PAGE, had a molecular weight of 12 kDa.

In this thesis, the catalase enzyme, the uses of catalase enzyme and the methods of catalase activity determination are mentioned.

**Keywords:** Fiery milkcap Mushroom (*Lactarius pyragalus*), Ezyme, Catalase, purification, Characterization.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim sırasında, tez çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini hiç esirgemeyen danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Bahar SÖKMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalar sırasında yardımlarından dolayı yüksek lisans arkadaşlarım Betül YILMAZOĞLU ve Burçak SARI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmam boyunca hiç sıkılmadan cihaz ve bilgi ihtiyaçlarım konusunda deneyim ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Kimyager Rıdvan İLGÜN'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımda yardımcı olan değerli Hocam Yrd.Doç.Dr. Tamer AKKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Fındık mantarının teşhisini yapan Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ'ye teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili annem Hülya AHISKALI'ya en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Ve zor günlerimde hep yanımda olan bu çalışmam süresince de manevi desteklerini esirgemeyen sevgili nişanlım Aycan BOZALIOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	I
ABSTRACT .....	III
TEŞEKKÜR .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar DİZİNİ .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
RESİMLER DİZİNİ .....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XII
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Enzimin Tanımı ve Yapısı Hakkında Genel Bilgiler .....	3
1.2. Enzimin Yapısı .....	5
1.3. Katalaz Enziminin Tanımı ve Genel Özellikleri .....	6
1.3.1. Katalaz Çift Fonksiyonlu Bir Enzim midir? .....	9
1.3.2. Katalazın Katalitik Mükemmelliği .....	9
1.3.3. Katalaz Neye Benzer ? .....	9
1.4. Katalazın Reaksiyon Mekanizması .....	12
1.5. Biyokimyasal Antioksidan Olarak Katalaz .....	12
1.6. Katalaz Aktivite Ölçüm Yöntemleri .....	13
1.6.1. UV-Spektrofotometrik Yöntem .....	13
1.6.2. Titrimetrik Yöntem .....	14
1.6.3. Diğer Tayin Yöntemleri .....	14
1.7. Katalaz Enziminin Bulunduğu Bitki, Mikroorganizma ve Organeller .....	15
1.8. Katalaz Enziminin Kullanım Alanları .....	16
1.8.1. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'nin uzaklaştırılması amacıyla kullanımı .....	17
1.8.2. Katalazın çeşitli enzimler ile birlikte kullanımı .....	18
1.8.3. Katalazın analitik amaçlı kullanımı .....	19
1.9. Mantarlar Hakkında Genel Bilgiler .....	19
1.9.1. Fındık Mantarı ( <i>Lactarius Pyragalus</i> ) ve Özellikleri .....	21
1.9.2. Fındık Mantarı ( <i>Lactarius Pyragalus</i> )'nın Morfolojik Özellikleri .....	22
1.9.3. Fındık Mantarının Yetiştigi Bölgeler .....	24

1.10. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi .....	24
1.10.1. Mantarlar ve İnsan Sağlığı .....	25
1.11. Katalaz Enziminin Saflaştırılması ile İlgili Önceki Çalışmalar .....	25
1.12. İlgili Literatür Işığı Altında Projenin Yeri .....	28
<b>2. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Materyal .....</b>	<b>31</b>
2.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar .....	31
2.1.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....	31
<b>2.2. Metod .....</b>	<b>32</b>
2.2.1. Fındık Mantarı Ham Ekstresinin Hazırlanması .....	32
2.2.2. Fındık Mantarı ( <i>Lactarius Pyragalus</i> ) Ham Ekstresinde Katalazı Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması .....	32
2.2.3. Fındık Mantarının Ham Ekstresinde Katalazın %60 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi ve Dializ İşlemi .....	33
2.2.4. Dietilaminoetil (DEAE)-Selüloz Kolon Kromatografisi .....	34
2.2.4.1. DEAE-Selülozun Hazırlanması .....	34
2.2.4.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi .....	34
2.2.5. Protein Miktar Tayini .....	34
2.2.6. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini .....	35
2.2.6.1. Deneyin Yapılışı .....	35
2.2.6.2. Bovin Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi .....	35
2.2.7. E <sub>280</sub> /E <sub>260</sub> Yöntemi ile Protein Miktar Tayini .....	36
2.2.8. Katalaz Aktivitesinin Tayini .....	37
2.2.8.1. Sigma Yöntemine Göre Aktivite Tayini .....	37
2.2.8.2. Deneyin Yapılışı .....	37
2.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS- PAGE) .....	38
2.2.9.1. Kullanılan Çözeltiler .....	38
2.2.9.2. Jellerin Hazırlanması .....	38
2.2.9.3. SDS - PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü .....	39

2.2.10. Fındık Mantarından Elde Edilen Katalazın Enzim Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi .....	40
2.2.10.1. Katalaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi .....	40
2.2.10.2. Katalaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi .....	40
2.2.10.3. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması.. .....	41
2.2.10.4. Katalaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi .....	41
2.2.10.5. Enzim Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi .....	41
2.2.10.6. Substrat Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi .....	41
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>43</b>
3.1. Fındık Mantarından Katalazın Saflaştırılması.....	43
3.1.1. Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonu.....	43
3.1.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi .....	43
3.1.3. SDS-PAGE Elektrofrezisi .....	44
3.1.4. Katalaz Aktivitesine pH'nın Etkisi.....	45
3.1.5. Katalaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	46
3.1.6. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması .....	47
3.1.7. Katalaz Enziminin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunma.....	47
3.1.8. Enzim Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi .....	48
3.1.9. Substrat Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi .....	49
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>50</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b> .....	<b>53</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>62</b>

## TABLULAR DİZİNİ

### TABLO

1.1. Hücre İçi Antioksidanlar .....	3
1.2. Membran Antioksidanlar .....	3
1.3. Katalaz Aktivite Ölçüm Yöntemleri .....	15
1.4. Karadeniz Bölgesinde Yetişen Fındık Mantarı ( <i>L. pyragalus</i> ) Türüne ait Bazı Kimyasal Özellikler ve Standart Hataları .....	22
2.1. E <sub>280</sub> /E <sub>260</sub> Warburg Yöntemi ile Protein Miktar Tayininde Kullanılan Faktör Tablosu .....	36
3.1. Fındık Mantarı Katalazının Saflaştırma Basamakları .....	44

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### ŞEKİL

1.1. Enzim Substrat İlişkisi .....	4
1.2. Enzim ile Enzim Olmadan Gerçekleşen Örnek Reaksiyon Profili .....	6
1.3. Katalazın Prostetik Grubu <i>hem b</i> ve <i>hem d</i> 'nin Yapısı .....	10
1.4. Katalazda <i>hem</i> 'in 3 Boyutlu Gösterilişi .....	11
1.5. <i>Escherichia coli</i> Katalazının X-ışını Kristalografisi ile Aydınlatılmış 3 Boyutlu Yapısı .....	11
1.6. Katalazın Etki Mekanizması .....	12
3.1. Fındık Mantarı Ham Ekstresinin %60 Amonyum Sülfat Fraksiyonunun DEAE-Selüloz Klon Kromatografisi Elüsyon Grafiği .....	43
3.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi .....	45
3.3. Katalaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi .....	46
3.4. Katalaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	46
3.5. Zamanın Katalaz Aktivitesine Etkisi .....	47
3.6. Katalazın $K_m$ ve $V_{max}$ Değerleri .....	48
3.7. Enzim Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi .....	48
3.8. Substrat Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi .....	49

## RESİMLER DİZİNİ

RESİM

1.1. Fındık Mantarı (*L. pyragalus*) .....24



## SEMBOLLER DİZİNİ

ATP	: Adenozin trifosfat
BPN	: Bozundurulmuş Peroksinitrit
BSA	: Sığır serum albumini
BLC	: Sığır karaciğer katalazı
CAT	: Katalaz
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribonükleik asit
$K_m$	: $V_{max}$ 'ın yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonu
akb	: Atomik Kütle Birimi
mL	: Mililitre
$\mu$ L	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
PN	: Peroksinitrit
3PG	: 3-fosfogliserat
SOD	: Süperoksit dismutaz
$V_{max}$	: Maksimum hız
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit

## 1. GİRİŞ

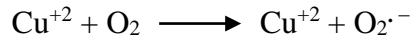
Canlılarda oluşan bütün fizyolojik olaylar; hormon, enzim ve iz elementleri gibi farklı ajanlar tarafından yönetilen indirgenme ve oksidasyon reaksiyonlarının kompleks kombinasyonlarını içerir. Canlılarda bulunan redoks dengesindeki herhangi bir değişiklik, hücrelerin ve dolayısıyla dokuların fonksiyonlarının bozulmasına sebep olur ve bu durum zamanla ölüme sonuçlanabilir. Değişik oksidasyon reaksiyonlarını düzenleyen ve dokularda doğal bir şekilde bulunan antioksidan bileşikler, uzun ömürlü determinantların potansiyel bir sınıfı olarak değerlendirilmektedir. Antioksidan bileşiklerde veya antioksidan telafi (kompensatör) düzenlerde bulunan bazı komponentlerin endojen sentezindeki herhangi bir yetersizlik, farklı hastalıkları meydana getirebilir. Hücrelerde çok sayıda koruma ve savunma mekanizmaları bulunur. Organizmaların kendilerini oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı korumaları için bu savunma mekanizmaları gereklidir. Bu nedenle biyolojik sistemlerde antioksidan savunma mekanizmasının araştırılması ile ilgili çalışmalar son zamanlarda bilim dünyasında önemli yer almaya başlamıştır. Günümüzde en çok araştırılan biyolojik proseslerden biri olan yaşlanma dahil, birçok hastalığın oksidatif hasardan kaynaklandığı tespit edilmiştir (1-3).

Serbest radikaller hücre içi reaksiyonları zedeleyen ve toksik etki gösteren bileşenlerdir. Genellikle toksik etki göstermek üzere hedefleri somatik hücreler veya bağışıklık sistemidir. Dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içerdikleri için, bu elektronlarını paylaşabilmek adına diğer moleküller ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerler (1-3).

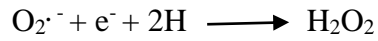
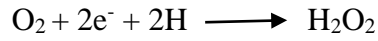
Serbest radikaller hem normal metabolizmanın hem de toksik maddelerin etkileri sonucu yan ürün olarak oluşabilirler. Örneğin radyasyon, sigara dumanı, egzoz gazları, deodorantlar, kimyasal maddeler, insektisit ve peptisit olarak bilinen böcek öldürücüler serbest radikal oluşumuna sebep olmaktadır (1-3). Özellikle oksijen kökenli radikaller insan hayatında çok ciddi sıkıntılar oluşturmaktadır. Canlılarda oluşan ilk ve oksijen kökenli olan temel radikal süperoksit radikalidir. Süperoksit radikali; çok iyi indirgen ve zayıf yükseltgen özellik göstermektedir. Hücresel reaksiyonlar sonucu mitokondri, kloroplast ve periksisomlarda hızlı bir



şekilde oluşmaktadır. Ayrıca indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucu da süperoksit radikalleri oluşabilmektedir.



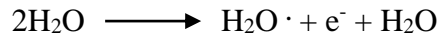
Yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden radikalik özellik taşımayan ancak canlı metabolizmasında oldukça zararlı olan bir diğer madde de hidrojen peroksittir.



Hidrojen peroksit; demir, bakır gibi iyonların varlığında hidroksil radikali oluşumuna neden olduğundan dolayı oksitleyici özellik taşımaktadır.



Canlı metabolizmasında oldukça tehlikeli olan ve uyarılmış su molekülünün hemolitik yıkımı ile oluşan hidroksil radikali son derece reaktif bir radikaldir.



Hidrojen peroksitin iki elektron indirgenmesi ile su, tek elektron indirgenmesi ile ise hidroksil radikali oluşur (1-3).

Serbest radikaller hücre zarında bulunan proteinleri parçalayarak hücre yapısına zarar veren; hücre çoğalmasını ve büyümesini sağlayan nükleik asit'in (DNA'nın) yapısını bozan bileşikler oldukları için nötralize edilmeleri gerekmektedir. Reaktif oksijen yapılarının meydana gelmesini engellemek veya meydana gelen radikallerin canlı biyokimyasal hücrelere etki ederek zarar vermesini önlemek amacı ile vücutta birçok savunma sistemi (mekanizması) gelişmiştir. Antioksidan yapılarına karşı vücutta meydana gelen bu savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri denir (4,5). Antioksidanlar, endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki ana grupta toplanırlar.

Endojen kaynaklı antioksidanlar: Enzim olanlar katalaz, dismutaz, glutatyon peroksidaz; Enzim olmayanlar albumin, E vitamini,  $\beta$ -karoten... vb (6,7).

Eksojen kaynaklı antioksidanlar: Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri (6,7).

**Tablo 1.1.** Hücre içi antioksidanlar (6,7).

Superoksit Dismutaz (Cu, Zn, Mn )	Süperoksit radikalının katalitik olarak uzaklaştırılması
Katalaz	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'nin uzaklaştırılmasında
Glutatyon Peroksidaz	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'nin ve lipid hidroperoksitlerinin uzaklaştırılmasında

**Tablo 1.2.** Membran antioksidanlar (6,7).

Vitamin E	Yağda erir, zincir kırıcı antioksidandır. Plazmadaki lipoprotein lipitlerini de korur.
$\beta$ -Karoten	Yağda erir, radikal temizleyicisidir. Singlet oksijeni ortadan kaldırır.
Koenzim-Q	Temel rolü enerji metabolizmasındadır. Redükte durumda antioksidan olarak görev yapabilir.

En önemli antioksidan enzimler:

1. Süperoksit anyonunu hidrojen peroksite dönüştüren süperoksit dismutaz
2. Organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px)
3. Hidrojen peroksiti suya indirgeyen katalaz (CAT)'dır.

### **1.1. Enzimin Tanımı ve Yapısı Hakkında Genel Bilgiler**

Enzimler, canlı hücrelerde meydana gelen ve organizmalardaki bütün reaksiyonların normal şartlarda meydana gelmesine neden olan protein yapısındaki

biyokimyasal katalizörlerdir (8). Bu biyokimyasal katalizörler reaksiyon sırasında fiziksel değişiklikler geçirseler de reaksiyon tamamlandığında, tekrar kendi orijinal hallerine geri dönebilmektedirler. Katalitik ribonükleik asit (RNA) molekülleri (ribozimler) ile katalizlenen bazı reaksiyonlar bilinmekle birlikte enzimlerin hemen hemen tümü protein yapısındaki katalizörlerdir (9).

Enzimler, mol kütlesi  $10^4$ - $10^6$  akb arasında değişiklik gösteren büyük moleküllerdir (10). Enzimler reaksiyon hızını pozitif yönde artıran çok etkili ve spesifik katalizörlerdir. Enzimle katalize edilmiş reaksiyonlar enzimle katalize edilmemiş reaksiyonlardan  $10^3$ - $10^{17}$  defa daha hızlı cereyan eder (11). Canlı organizmalar için bu büyüklükteki reaksiyon hız artışları, canlı hücrelerde var olan normal şartlar altında bile, tepkimelere uygun hızlarda gerçekleşmesine fırsat verdikleri için önemlidir (Örneğin; yaklaşık olarak  $35^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta ve nötral pH'da) (12). Biyokimyasal reaksiyonlarda organizma için gerekli moleküllerin yeterli bir hızla sentezlenmesi enzimlerin bu derece etkin katalizör olması ile mümkündür. Enzimatik reaksiyonlar fizyolojik pH ve canlıların vücut sıcaklığı gibi normal şartlarda meydana gelirler. Enzimler etki ettikleri maddeler olan substratları için oldukça spesifiktirler. Bazı enzimler aynı biyolojik yapıda bir grup substrata etki ederken bazıları da tek molekül türü üzerine etki ederler. Birçok enzim stereospesifite gösterir. Enzimler reaksiyon esnasında fiziksel değişiklikler geçirseler de reaksiyon tamamlandığında, tekrar kendi orijinal hallerine geri dönerler (13).

Enzim tarafından değişikliğe uğratılan maddelere ‘‘substrat’’ denir (14).



Şekil 1.1. Enzim Substrat İlişkisi

Enzimler, birçok gıdanın yapısında çok az bulunmalarına rağmen gıdalarda çok önemli biyokimyasal görevler üstlenirler. Enzimler, gıdaların doğal biyokimyasal yapılarını değiştirebilir ve bazı örneklerde bu değişiklikler kabul edilebilir ama birçok örnekte bu durum istenmez. Bu nedenle istenmeyen durumlarda enzimler inaktive edilirler. Bitkilerin kararması, istenmeyen değişikliklere örnek olarak verilebilir. Arzu edilen değişikliklere örnek olarak ise, fosfataz enzimi pastörizasyon işlemlerinde kullanılması verilebilir. Enzimler, gıda imalatında katkı maddesi olarak da kullanılırlar. Örneğin, rennin enzimi peynir üretimi sırasında sütte koagulan olarak kullanılır (13).

## **1.2. Enzimin Yapısı**

Enzimde proteini oluşturan amino asitlerin sayısı, diziliş sırası ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir ve bu düzen enzimin substrat seçiciliğini sağlar.

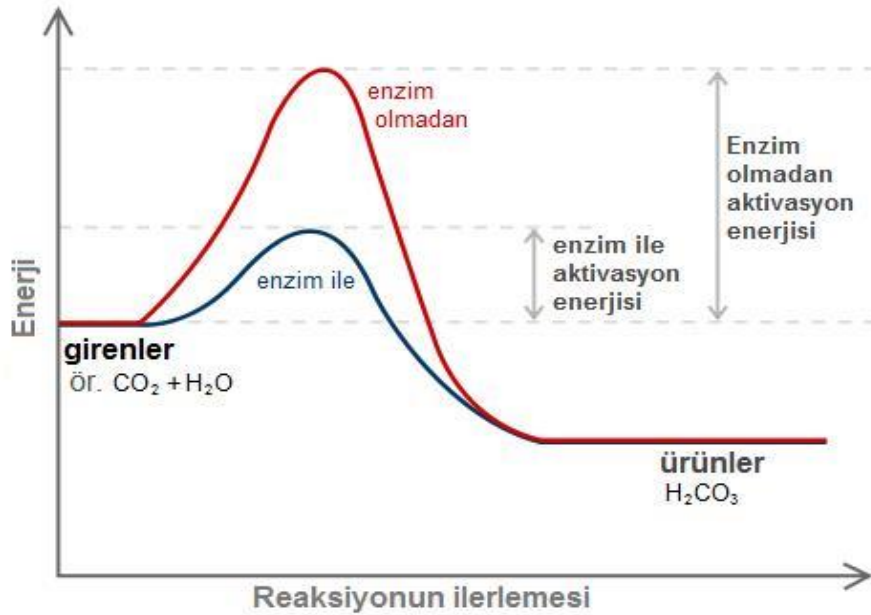
Bazı enzimler sadece proteinden oluşurken, bazıları ise proteinin yanında protein olmayan bir kısma sahiptirler. Bu tip enzimlerde, enzimin protein kısmına “apoenzim”, protein olmayan kısmına “kofaktör” denir (11). Apoenzim, enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar. Apoenzim ısı ile kolayca denatüre olur. Yapıları sadece proteinden ibaret olan enzimlere örnek olarak pepsin, tripsin, üreaz ve diğer hidrolaz sınıfı enzimler gösterilebilir (15).

Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli amino asitlerin meydana getirdiği bir kısım bulunur. Protein zincirinin bu kısmı enzimin katalitik etkisinden sorumlu olup “aktif bölge” olarak tanımlanır. Substrat ve eğer varsa koenzim bu merkeze bağlanır (4). Çoğunlukla asimetrik bir oyuk veya cep şeklinde olan aktif merkezin geometrik yapısı, içerdiği girinti ve çıkıntılar substrat molekülünün şekline ve onun bu bölgeye bağlanmasına uygundur (16).

Enzimlerin katalitik aktiviteleri farklı şekillerde düzenlenebilir. Bir enzimatik reaksiyonun hep aynı hızda meydana gelmesi organizmaya ihtiyacı olan esnekliği

sağlar. Öncelikle hücredeki enzim miktarı sabit olmayıp ihtiyaca göre artar veya azalır. Bu durum enzimlerin sentez ve yıkım hızlarının ayarlanması ile gerçekleşir. Hücrenin ihtiyacı kalmadığı zamanda bir enzimin sentezi sonlanabileceği gibi. İhtiyaç olduğunda yeni bir enzim sentezlenmeye başlayabilir.

Enzimler katalizledikleri reaksiyonlarda denge konumunu ve denge sabitini değiştirmez; sadece dengeye daha çabuk erişilmesini sağlarlar. Reaksiyon hızının artması, kimyasal katalizörlerde olduğu gibi, mekanizmanın değişmesi sonucu aktivasyon enerjisinin küçülmesinden ileri gelir (10, 17).



Şekil 1.2. Enzim ile ve Enzim Olmadan Gerçekleşen Örnek Reaksiyon Profili

### 1.3. Katalaz Enzimin Tanımı ve Genel Özellikleri

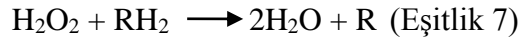
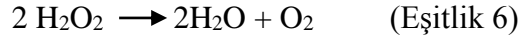
Katalaz ( $H_2O_2$ :  $H_2O_2$  oksidoredüktaz, E.C. 1.11.1.6), hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan bir enzimdir. 19. yüzyılın başlarından itibaren katalaz ile ilgili araştırmalar başlamıştır. Thenard, 1811'de  $H_2O_2$ 'i keşfetmiş ve canlı organizmalarda kendi kendine parçalandığını ifade etmiştir (18). Schönbein ise 1863'de  $H_2O_2$ 'i bir maya ürünü olarak tanımlamıştır. İlk olarak Loew 1901 yılında  $H_2O_2$ 'in katalaz ile kendi kendine parçalandığını bulmuşsa da katalazın aktif merkezinde demir

bulunduğu ve siyanür ile karakteristik olarak inhibisyona uğradığı ancak 22 yıl sonra Warburg tarafından ortaya çıkarılmıştır. Wieland 1927'de katalazın oksidasyon mekanizmasını ortaya çıkararak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in elektron vericisi olduğunu ifade etmiştir. Stern 1936'da katalazın aktif bölgesinde protoporfirin IX aktif grubunun bulunduğunu belirtirken 1 yıl sonra Summer ve Dounca ilk sığır karaciğeri katalazını (BLC) kristal olarak elde etmeyi başarmışlardır. 1947 yılında Chance katalaz ve hidrojen peroksit arasında oluşan birinci kompleksi (Bileşik I) keşfetmiştir. İlk prokaryotik katalaz Herbert ve Pinsent tarafından *Micrococcus luteus*'dan saflaştırılmıştır. 1976 yılında sığır karaciğer katalazı Eventof ve ark. tarafından saflaştırılmış ve 1981 yılında Murthy ve ark. tarafından 2,5 Å çözünürlükte X ışını analizi yapılmıştır. Kirkman and Gaetani 1984 yılında BLC'ye NADPH'ın sıkıca bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Katalaz turnover sayısı oldukça yüksek olan bir enzimdir. Örneğin, *Pichia pastoris* kaynaklı katalazın turnover sayısı  $8,5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ , *Escherichia coli* kaynaklı katalazın  $1,63 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ , keçi akciğeri kaynaklı katalazın  $2,17 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  sığır karaciğer ve eritrosit katalazının turnover sayıları aynı olup  $2,25 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$  olarak bildirilmiştir (19).

Katalaz enzimi yaygın olarak bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi birçok canlı organizmada bulunmaktadır. Biyolojik ve biyokimyasal sistemlerde katalaz antioksidan etkiye sahip bir enzim olup toksik ve yükseltgen etkiye sahip hidrojen peroksidi hücrelerden uzaklaştırmada önemli rol oynar. Katalaz dokuları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve kısmen indirgenmiş oksijen türlerinin toksik hasarlarından korumada görevi üstlenmektedir (20). Antioksidan savunma sistemi, hücreyi serbest radikal veya diğer reaktif moleküllerin oksidatif etkilerinden korur. Katalaz hem grubu içeren bir oksidoredüktazdır. Katalaz enzimi canlı organizmanın eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği ve çeşitli dokularında da bulunan bir enzim olup hücrelerin özellikle peroksizomlarında yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Farelerde katalaz enzimin farklı şekilleri saptanmıştır (21).

Katalaz kararlı ve güçlü bir yükseltgen olan hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyerek parçalanmasını sağlar (Eşitlik 6). Katalaz enzimi sadece hidrojen peroksiti katalizleyerek parçalanmasını sağlamakla (detoksifiye etmekle) kalmaz aynı zamanda da fenoller, formik asit, formaldehit ve

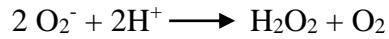
alkolleri içeren toksik etkili bileşikleri okside etmede görev alır ve yine substrat olarak hidrojen peroksidi kullanır (Eşitlik 7). Katalaz enzimi, ağartıcı, oksitleyici veya sterilizasyon amaçlı kullanılan hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasında, hidrojen peroksit veya glukoz biyosensörlerinin analitiksel amaçlarla ölçülmesinde oldukça yaygın kullanılan bir enzimdir (21).



$\text{RH}_2$  bileşiği; fenoller, formik asit, formaldehit ve alkolleri temsil etmektedir. Katalaz tarafından katalizlenen her iki reaksiyon türü de  $\text{H}_2\text{O}_2$  harcamaktadır (22).

Dallanmış ve uzun zincirli yağ asitlerinin beta-oksidasyonundan farklı olarak peroksizomlarda yıkımları sonucu yan ürün olarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşmaktadır. Oluşan peroksidin buzundurulmasında yine katalaz enzimi görev yapmaktadır (22).

Katalazı indirek olarak içeren bir diğer redoks reaksiyonu DNA'nın üretimi ile ilgilidir. Ribonükleotit redüktaz ribonükleotit difosfatların uyuştukları deoksiribonükleotit difosfatlara dönüşümünden sorumludur. Ribonükleotit redüktaz aktivitesi için önemli olan trosil serbest radikaline sahiptir. Bu radikal süperoksit iyonu ( $\text{O}_2^-$ ) salan NAD(P)H: flavin oksidoredüktaz enzimi tarafından üretilir ve bu reaktifliği yüksek radikal süperoksit dismutaz ile  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye dönüştürülür (22).



Oluşan bu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , katalaz için bir substrattır.

Bitkilerde oksijenli solunumla  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretilir. Oksijenli solunum kloroplastta 3-fosfogliserat (3-PG) senteziyle ve glikonatin 3-PG'a peroksizom yoluyla geri dönüşümü ile yürür. Bu proseste NADH ve ATP'deki enerji kullanılarak  $\text{O}_2$  tüketilip  $\text{CO}_2$  açığa çıkarılır. Oksijenli solunum yüksek ışııkta ve yetersiz  $\text{CO}_2$  varlığında bitkileri fotooksidatif hasardan korur (22).

Katalaz birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Enzim organellerde bulunarak hidrojen peroksit seviyelerinin bir regülatörü olarak davranır ve karaciğer peroksizomlarında D-aminoasit oksidaz ve urikaz gibi birkaç hidrojen peroksit üreten enzimle birleşerek spesifik bir peroksidaz gibi rol oynar (22).

### **1.3.1. Katalaz Çift Fonksiyonlu Bir Enzim midir?**

Katalaz her biri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren iki farklı katalitik role sahiptir. Aktif kısımda bulunan prostetik hem grubunda tek bir Fe merkezi içermesi, tek bir aktif bölgenin iki farklı fonksiyona sahip olduğunu iddia eder. Bazı katalazlar peroksidatif reaksiyonlarda bazılarında daha iyidir. Katalazlar, çift aktiviteli katalaz-peroksidaz (HP-I) ve monofonksiyonel katalaz (HP-II) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. HP-II katalazlar yalnızca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin dönüştürülmesini katalizlerken, HP-I katalazlar her iki aktiviteye de sahiptir. HPI katalazların çift fonksiyonlu olmayı nasıl başardıkları hala bir sorudur. HPI katalazlar HPI-A ve HPI-B olmak üzere iki izoenzim şeklinde bulunurlar (22).

### **1.3.2. Katalazın Katalitik Mükemmelliği**

Katalaz sıra dışı bir enzimdir. Katalazın bir enzimin olabileceği en yüksek verimlilik seviyesinde olduğu iddia edilir. Çözeltideki herhangi bir enzim katalizli reaksiyon için hız, enzim ve substrat moleküllerinin birbirleriyle çarpışma sıklığıdır. Bu yayılma kontrollü hız 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> aralığındadır. Katalazın katalitik verimliliği ise (k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>) 4.0x10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>'dir ve oldukça yüksektir. Bilinen enzimler içinde en yüksek dönüştürme sayılarından birine sahiptir (40.000.000 molekül/dakika). Bu yüksek hız H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin detoksifikasyonundaki yeteneğini göstermektedir (22).

### **1.3.3. Katalaz Neye Benzer?**

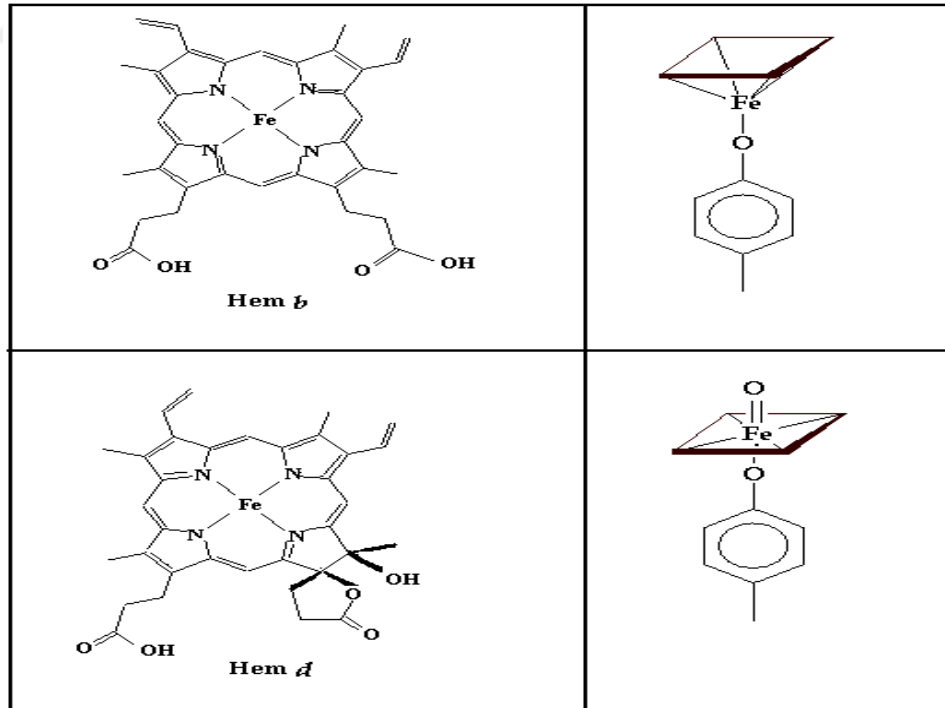
*Hem*, bir prostetik grup olarak bulunur. Her bir katalaz molekülü (Mol ağırlığı 240.000 Da) 4 polipeptit zincirinden oluşan bir tetramer olup her bir tetramer bir adet prostetik *hem* grubu içerir. Her bir zincir 500'den fazla amino asitten oluşmaktadır. Hemoglobinler, sitokromlar, kloroformlar ve legumlardaki azot ile başlayan



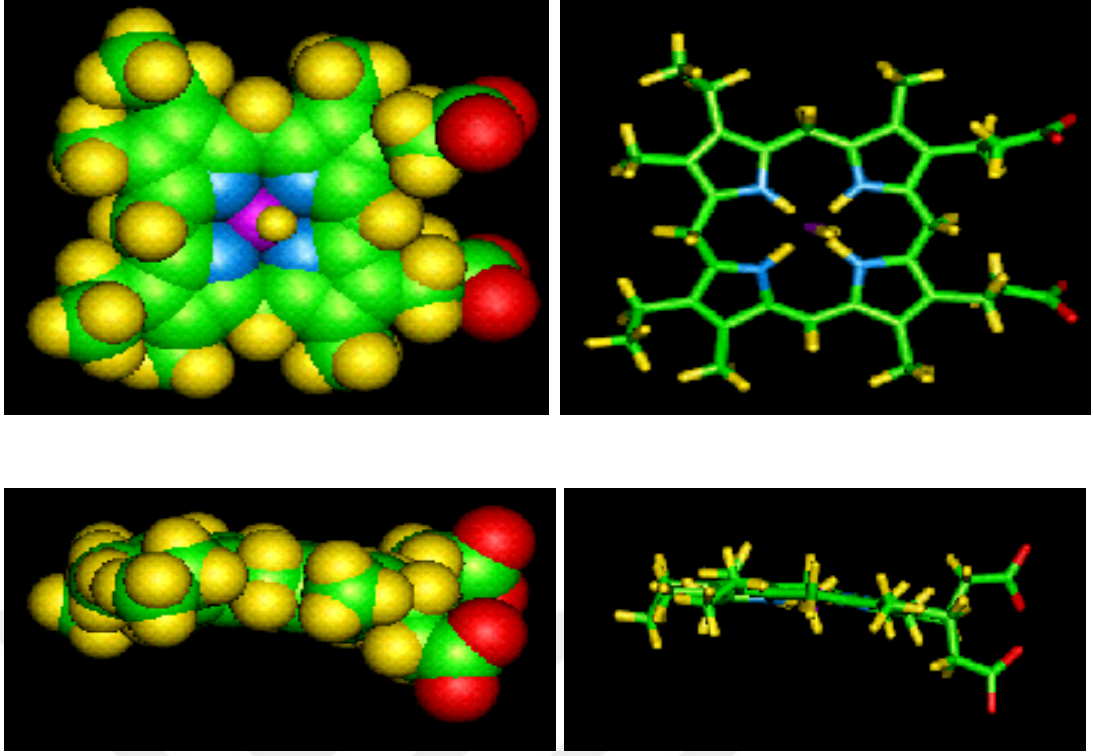
enzimlere benzer olarak bu tetramerlerde 4 porfirin *hem* grubu yerleşmiştir (Şekil 1.3.) (22).

Prostetik grup sıkıca bağlı bazı proteinlerin biyolojik fonksiyonu için gerekli spesifik, polipeptit olmayan bir kısımdır. Hem bir protoporfirin halkası ve bir merkezi Fe atomu içerir. Bir protoporfirin halkası birbirine metenil köprüleriyle bağlı 4 pirol halkasından oluşur. Demir ferro ( $Fe^{+2}$ ) ya da ferrik ( $Fe^{+3}$ ) hallerinde bulunabilir (23).

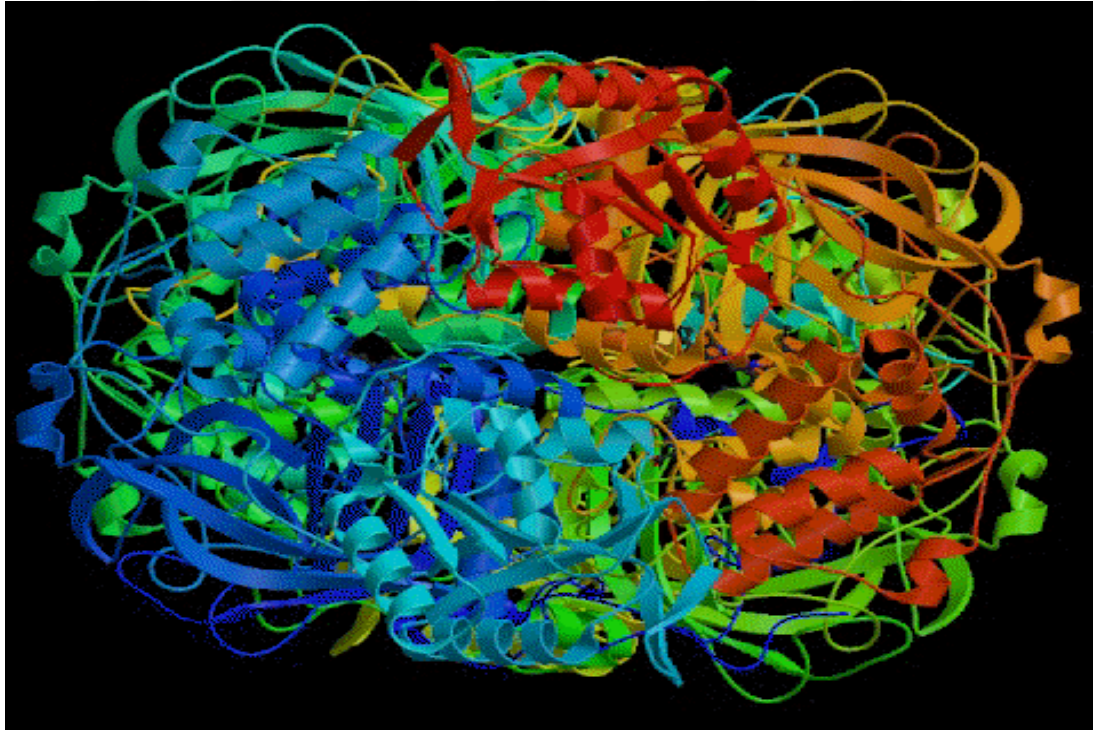
Katalaz aktif bölgesinde *hem* grubu (Protoporfirin IX halkası) içerir. Farklı kaynaklara ait katalaz moleküllerinin çoğu *hem b* prostetik grubunu içerirken, az sayıda mantar ve bakteriyel katalaz *hem d* grubunu içermektedir (Şekil 1.3.). Katalaz enziminin *hem* molekülü ve enzime tirozin amino asit artığı üzerinden bağlantısı Şekil 1.3.'de gösterilmektedir. Sığır karaciğer katalazının molekül kütlesi 240 kDa olup, dört tane alt ünitesi vardır. İzoelektrik noktası (pI) ise 5.4'tür (24).



Şekil 1.3. Katalazın Prostetik Grubu Olan *hem b* ve *hem d*'nin Yapısı



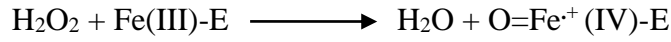
Şekil 1.4. Katalazda *hem*'in 3 Boyutlu Gösterilişi



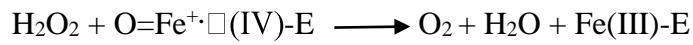
Şekil 1.5. *Escherichia coli* Katalazının X-ışını Kristalografisi ile Aydınlatılmış 3 Boyutlu Yapısı

#### 1.4. Katalazın Reaksiyon Mekanizması

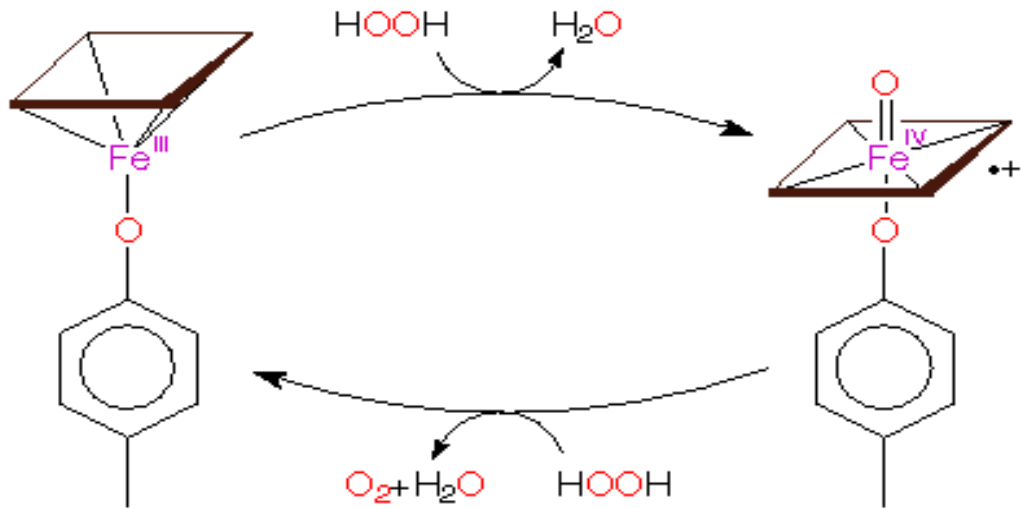
Katalazın reaksiyon mekanizması aşağıda kısaca verilmiştir. Reaksiyon önce bir molekül  $H_2O_2$ 'in indirgendiği, ardından da ikinci bir  $H_2O_2$  molekülünün yükseltgendiği 2 basamak üzerinden yürür (25).



*Porfirin katyon radikali* ( Bileşik I)



Görüldüğü gibi reaksiyonda katalitik aktiviteyi Fe (III) göstermektedir. Anderson ve Dawson 1991 yılında katalaz enziminin reaksiyon mekanizmasının Şekil 1.6.'daki gibi olduğunu öne sürmüşlerdir (25).



Şekil 1.6. Katalazın etki mekanizması

#### 1.5. Biyokimyasal Antioksidan Olarak Katalaz

Biyolojik sistemlerde antioksidanlar, genellikle non-enzimatik, enzimatik ve yardımcı enzimler olarak sınıflandırılabilir. Non-enzimatik antioksidanlardan  $\alpha$ -

tokoferol (vitamin E) yağda çözünen bir antioksidandır. Askorbik asit (vitamin C) glutatyonla birlikte sulu fazda önemli bir antioksidandır (26,27).

Enzimatik antioksidanları inceleyecek olursak; katalaz, glutatyon peroksidaz, superoksit dismutaz ve hemoprotein peroksidazlar gibi hidroperoksidazlar bu gruba girer. Genelde yüksek spesifik hücresel içerik, spesifik organ ve subselüler lokalizasyonlar ile metal içeriğinin spesifik formu özellikle bakır, demir, mangan ve selenyum ile karakterize edilirler. Bu antioksidan sistemler doğada yaygın olarak dağılmışlardır ve biyolojik sistemlerde reaktif oksijen metabolitlerinin verdiği zararı önlemede görev alırlar (26,27).

Katalaz ilk olarak sığır karaciğerinden daha sonra da kandan ve diğer kaynaklardan izole edilmiş önemli antioksidanlardan biridir.

Hücre organellerinde bulunan katalaz spesifik peroksidaz rolünü oynamaktadır.  $H_2O_2$ 'nin  $H_2O$  ve  $O_2$  verecek şekilde parçalanmasını katalize ederken, H donörlerini örneğin metanol, etanol, formik asit ve fenoller 1 mol peroksidi harcayarak katalizler (26).

## **1.6. Katalaz Aktivite Ölçüm Yöntemleri**

Katalaz aktivitesi hem  $H_2O_2$ 'nin bozunması hem  $O_2$ 'nin serbest kalması ile ölçülebilir. Biyolojik materyal için seçilen metot, UV spektrofotometrik metottur. Titrimetrik metotlar karşılaştırmalı sonuçlar için uygundur.

### **1.6.1. UV-Spektrofotometrik Yöntem**

Metodun uygulama alanı biyokimya, klinik biyokimya ve hematolojidir. Ultraviyole alanda, dalga boyu azaldıkça  $H_2O_2$  devamlı olarak absorpsiyonda bir artış gösterir.  $H_2O_2$ 'nin azalışı, 240 nm'de ( $\epsilon_{240} = 400 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ ) izlenir. Deney süresince enzimin inhibe olmasını veya  $O_2$ 'nin açığa çıkmasıyla küvette oluşan baloncukları önlemek için bağıl olarak düşük konsantrasyonlarda (10-20 mM)  $H_2O_2$

kullanılması gerekir. Substrat konsantrasyonu ile bozunma hızı arasında doğrusal bir oran olduğundan dolayı  $H_2O_2$  konsantrasyonu önem taşımaktadır.

Sıcaklık üzerine deney koşullarının bağımlılığı düşük olduğu için ( $Q_{10} < 1,1$ ), ölçümler oda sıcaklığında yürütülebilir. pH aktivite grafiği  $V_0$ 'a bağlı olarak geniş bir pH aralığında (pH 6,8-7,5) olduğundan, ölçümler pH 7,0'da yapılmaktadır (28,29).

### **1.6.2. Titrimetrik Yöntem**

Katalaz aktivitesinin titrasyon ile tayini, yüksek UV absorpsiyon, pigmentasyon veya çökme nedeni ile spektrofotometrik metodun kullanılmasının uygun olmadığı durumlarda kullanılır. Düşük katalaz aktiviteli doku homojenatlarında (örneğin beyin, fibroblastlar ve tümörler) süt, bitki ve bakteri orjinli konsantre ekstraktlar için bu metod uygundur.  $H_2O_2$ 'nin bozunması, karışımda örneğin permanganat ile geri titrasyon yapıldıktan sonra mevcut peroksidin ölçümü prensibine dayanır.

30 sn'den fazla inkübasyon zamanlı titrimetrik metotlar sadece karşılaştırmalı sonuçlar verir. İyi düzeyde eğrilerin çizilmesi, çok sayıda ölçüm alınması ve zamana gereksinim duyar. Perborat kararlı bir substrat olduğundan rutin analizler için uygun olup, enzimin inhibisyonu yavaşlamaktadır.  $H_2O_2$  ve perborat ile elde edilen sonuçlar aynı öneme sahiptir. Pratikte Feinstein (1949) metodu uygun olup, deney koşulları Bonnichsen (1955) prosedürüne uygun olarak düzenlenmiştir (29).

### **1.6.3. Diğer Tayin Yöntemleri**

Yaygın olarak kullanılan katalaz aktivite tayin yöntemleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.3.** Katalaz aktivite ölçüm yöntemleri (29).

Metot	Materyal	Kaynaklar
A.H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uzaklaştırılmasının ölçümü		
a) İyodometrik	Doku, Kan	Bonninhsen ve ark., (1947)
b) Permanganometrik	Doku, kan Doku, kan	Feinstein (1949) Takahara vd. (1960)
2. Spektrofotometrik Yöntem (E <sub>240</sub> )	Doku	Bergmeyer (1955) Werner ve Heider (1963)
3. Fotometrik Yöntem (E <sub>405</sub> -E <sub>415</sub> )		
a) Titanyum sülfat	Doku, kan	Hübl ve Bretschneider (1964)
b) Titanyum tetraklorür	Kan	Pilz ve Johann (1965)
c) Vanadik asit	Doku	Warburg ve Krippahl (1963)
4. Flerometrik Yöntem	Sulu çözeltiler	Perschke ve Broda (1061) Aebi (1963)
a) Scopoletin (Florosansın azalması)		
b) Diasetildiklorofloreksin		Keston ve Brandt (1965)
B.O <sub>2</sub> üretiminin belirlenmesi		Jacop (1964)
1. Polarografi Mikroorganizma		
2. Oksijen Elektrodu	Kan Kan	Ogata (1964) Rorth ve Jensen (1967)
3. Manometrik yöntem		
a) Van Slyke aletleriyle	Kan ve doku	Kirk (1963)
b) Filtre kağıdı ile	Kan ve doku	Gagnon ve ark., (1959)
C. İmmuno çöktürme (anti-katalaz ile)	Kan ve doku	Higashi ve ark., (1961) Ben-Yoseph ve Shapira (1973)
D. Isı üretiminin ölçümü	Kan	Landahl (1953)

### 1.7. Katalaz Enziminin Bulunduğu Bitki, Mikroorganizma ve Organeller

Doğada yaygın bir şekilde bulunan katalaz tüm aerobik organizmalarda, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunur. Katalaz aktivitesi memeli dokularında çok çeşitlilik

gösterir, karaciğer ve böbrekte yüksek, bağ dokularında düşüktür. Bu hücrelerde (mitokondri ve peroksizomlarda) tanecik bağımlı iken eritrositlerde sulu fazda bulunur. İnsan eritrositleri katalaz bakımından oldukça zengindir. Katalaz nadir görülen bir enzim yetersizliğinde homozigotların kırmızı hücrelerinde bulunmaz. Diğer yandan eritrositlerde katalaz ve glutatyon peroksidaz hemoglobin ve diğer SH-proteinleri (enzim, membran, stroma) için koruyucu bir fonksiyona sahiptir. Kırmızı hücrelerde katalaz aktivitesi azaldıkça yükseltgenlerin ( $H_2O_2$ , askorbat, X-ışınları) etkinliği artar (30).

Katalazın en bol bulunduğu organel peroksizomlardır. Peroksizomlar hayvan hücrelerinde yağ asitlerinin oksidasyonunu ve kolesterol ve safra asitlerinin sentezini sağlar. Hidrojen peroksit yağ asidi oksidasyonunun bir yan ürünüdür. Beyaz kan hücreleri  $H_2O_2$ 'yi bakteri öldürmek için üretir. Her iki durumda da katalaz hücreyi  $H_2O_2$ 'nin zararından korur. Bitki hücrelerinde peroksizomlar oksijenli solunumda ve simbiyotik azot bağlamada rol alır (25).

Bakteri gibi prokaryot organizmalar membransız bir çekirdeğe sahiptir ve peroksizomlar gibi membrana bağlı organelleri yoktur. Katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimler hücre duvarının iç ve dış membranları arasında bulunan periplazmik boşlukta bulunurlar. Burada hücre içinde bulunurlarsa toksik etki yapacak olan birçok enzim bulunmaktadır. Burada bulunan katalaz periplazmada taşınan toksik moleküller üzerinde etkili olur ya da bakteri duvarından dışarıya atılarak çevredeki toksik moleküller üzerinde etkili olur. Bakteri tarafından atılan katalaz, bir infeksiyon sırasında zarar görmüş olan beyaz kan hücrelerinden bakterinin korunmasında bir rol oynar (25).

### **1.8. Katalazın Kullanım Alanları**

Günümüzde birçok endüstri kolunda enzim içeren biyolojik sistemler kullanılmaktadır. Katalaz; gıda, süt, tekstil, kağıt gibi ağartma işlemlerinin yapıldığı endüstri alanlarında, hidrojen peroksitin ortamdan uzaklaştırılması için kullanılmaktadır (31). Süt endüstrisinin bazı alanlarında mikroorganizma kontaminasyonunu önlemek amacıyla süte katılmasına izin verilen %0,05-%0,25

oranındaki hidrojen peroksidin, kullanım öncesi giderilmesi büyük önem taşımaktadır. Hidrojen peroksidin bozundurulması ortamdaki uzaklaştırılması yöntemlerinden biri, katalazın kullanıldığı enzimatik metotlardır.

Katalaz esaslı yöntemlerde, hidrojen peroksidin suya ve oksijene dönüştürülerek insan sağlığına verebileceği olumsuz etkiler ortadan kaldırılır (32-35).

Hidrojen peroksidin analizi, tıp dışındaki bilimsel araştırmaların yürütülmesi açısından da büyük önem taşımaktadır. Özellikle akseptör olarak oksijeni kullanan oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin katalizlediği pek çok tepkimede, ürün olarak hidrojen peroksit açığa çıkmaktadır.

Söz konusu enzimlerin katalizlediği tepkimelerde oluşan hidrojen peroksit miktarının çeşitli yöntemlerle belirlenmesiyle, gerçekte tayini istenen maddenin miktarına geçilmektedir. Böylece katalaz biyosensörleriyle, hem bilimsel çalışmalara yardımcı olunmakta, hem de gıda sanayiinden farmakolojiye, biyoteknolojik çalışmalardan çevre analizlerine kadar pek çok alanda hidrojen peroksidin ve ürünlerinin tayinleri yapılabilmektedir (33).

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

### **1.8.1. $H_2O_2$ 'nin Uzaklaştırılması Amacıyla Kullanımı**

Özellikle sıcak bölgelerde sütün sağılmasından sonra işlenmesine kadar geçen sürede veya peynir altı suyunun işlenmek üzere taşınması sırasında mikrobiyal kirleticilerin çoğalmasının engellenmesi için özel soğutma ünitelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Soğutma zincirinin kurulamaması veya soğutma işleminin maliyetinin yüksek olması nedeniyle soğutmaya alternatif olarak Dünya Gıda ve



Tarım Örgütü ve Birleşmiş Milletler Tarım Örgütünün izin verdiği miktarlardaki  $H_2O_2$  (% 0,05-% 0,25) süte eklenmektedir. Ancak, sütün işlenmesinden hemen önce sütteki (veya peynir altı suyundaki)  $H_2O_2$ 'nin toksik etkisinin önlenmesi için katalaz kullanımı önerilmektedir (36,37).

Pamuklu kumaşın  $H_2O_2$  ile ağartılmasından sonra boyama işleminden (özellikle  $O_2$ 'ye duyarlı boyaların kullanımı) hemen önce  $H_2O_2$ 'nin uzaklaştırılmasında yaygın olarak kullanılan yöntem su ile yıkamaktır. Bu amaçla 1 kg dokumanın işlenmesi sırasında yaklaşık 100 L su tüketilmektedir. Klasik yöntemde  $H_2O_2$ 'nin uzaklaştırılması amacıyla  $Na_2S_2O_3$  ve  $Na_2S_2O_4$  kullanılmakta, ancak bu bileşiklerin kullanımı da suda istenmeyen yüksek tuz derişimine neden olmaktadır. Bu yönetime alternatif olarak  $H_2O_2$  içeren yıkama suyundaki  $H_2O_2$ 'nin parçalanması ve yıkama suyunun tekrar sisteme kazandırılması için katalaz aktivitesinden faydalanılabilir (38). Katalazın kullanımı ile enerji tüketiminde % 48, kimyasal tüketiminde % 83, su tüketiminde % 50 ve işlem süresinde % 33 azalma sağlamaktadır (39).

Pet şişelerin ve plastik kapların düşük sıcaklıklarda sterilizasyonu amacıyla kullanılan  $H_2O_2$ 'nin işlem sonrasında uzaklaştırılması amacıyla katalaz kullanılabilir (40).

Kağıt sanayinde kağıdın ağartılmasından sonra kalan  $H_2O_2$ 'nin, reçine ve plastik üretiminde oksitleyici ve köpükleştirici olarak kullanılan  $H_2O_2$ 'nin uzaklaştırılmasında katalaz kullanılabilir (41).

### **1.8.2. Katalazın Çeşitli Enzimler ile Birlikte Kullanımı**

Glikolat oksidaz enzimi ile birlikte glikolik asitten glioksilik asit üretiminde (42), D-amino asit oksidazlarla birlikte D-amino asitlerin  $\alpha$ -keto asitlere dönüştürülmesinde (43), L- $\alpha$ -gliserofosfat oksidaz ile birlikte dihidroksi aseton fosfat sentezinde (44,45), glukoz oksidaz (GOD) enzimi ile birlikte glukonik asit üretiminde ve glukoz veya oksijenin gıdalardan uzaklaştırılmasında (46), piranoz 2-oksidad ile birlikte 2-ketoaloz üretiminde kullanılmaktadır (47).

### **1.8.3. Katalazın Analitik Amaçlı Kullanımı**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin miktarının belirlenmesi amacıyla biyosensörlerde (50,52,54), GOD ile birlikte kan, serum vb. çeşitli örneklerde glukozun belirlenmesi için biyosensörlerde (57,59,62), yaban turpu peroksidazı ile nitrit miktarının belirlenmesi için biyosensörlerde (48), meyve suları gibi çeşitli örneklerde asit miktarının belirlenmesi için biyosensörlerde (49,60), L-glutamat oksidaz ile birlikte  $\gamma$ -amino bütirik asitin belirlenmesi için biyosensörlerde (53) kullanılmaktadır.

### **1.9. Mantarlar Hakkında Genel Bilgiler**

Mantarlar elde edilme şekli ve yüksek besin değerleri ile çok eski tarihlerden bu yana tüketilen önemli bir besin kaynağıdır. Mantarların besin olarak tüketilmesinin yanı sıra kaliteli ve ucuz olması da potansiyel katalaz enzimi kaynağı olarak endüstrinin birçok alanında kullanılmaktadır (65).

Mantarlar çok eski tarihlerden bu yana bilinmekte olup, çok çeşitli alanlarda insanlığa faydalı olmuşlardır. Fakat mantarların hakiki yapıları ve büyüme şekilleri hakkındaki bilgiler, ancak 17. asırda mikroskobun keşfiyle elde edilmeye başlanmıştır. Mantarlar çok eski zamanlardan beri bilinen bir besin olmasına karşın yetiştiriciliğinin ilk kez 16. yüzyılda Fransa'da yapılmaya başlandığı pek çok kaynak tarafından bildirilmektedir. Başlangıçta mevsime bağlı olarak açıkta yetiştirilmeye başlanan mantar 19. yüzyılın başlarında taş ocakları, mağara ve tünel gibi sıcaklık ve nemin oldukça düzenli olduğu kapalı alanlarda ilkel yöntemlerle üretilmiştir. 20. yüzyılın doku kültüründen misel üretiminin gerçekleştirilmesi yeni tekniklerin gelişmesiyle mantar bu amaçla kurulmuş özel işletmelerde yetiştirilmeye başlanmıştır (66,67). Hücre çeperinin bileşimi, hücrenin yaşına ve çevre koşullarına, sıcaklığa, ortamın pH'ına göre farklılık gösterir. Mantarlar mükemmel bir folik asit kaynağıdır. Folik asit yetersizliğinden ileri gelen aneminin tedavisinde mantar içeren diyet etkili olmaktadır. Yapılan araştırmalara göre mantar kandaki seker seviyesini düşürmektedir. Mantarlar üzerinde yapılan denemeler kolesterolü düşürücü özelliği ile kalp ve damar hastalıklarında da diyet olarak kullanılabilirliğini göstermiştir (68). Hücrenin içi protoplazma ile doludur.

Renksiz ve saydam olan stoplazma lipidik granüller ve çubuk şeklinde oluşumlar içerir. Vakuoller hücrenin gaz alışverişini düzenler, hem de stoplazmanın artıklarını barındırır (68). Mantar proteininin hazmolma değeri %72-83 arasındadır. Meyve ve sebzelerle kıyaslandığında, iyi bir lizin, arginin, histidin ve treonin kaynağıdır. İnsan beslenmesi için gerekli tüm amino asitleri içermesine rağmen triptofan seviyesi kısmen düşüktür. Ayrıca mantar brom, mangan, çinko, sodyum, klor, bakır, demir, potasyum, fosfor, kalsiyum, riboflavin, nikotik asit ve folik asit gibi mineral ve vitaminler açısından da zengindir (68).

Mantarlar geleneksel bir ilaç olarak yan etkilerden uzak olması sebebi ile çeşitli hastalıkları önlemek ve iyileştirmek için gerekli bileşiklerin kaynağı olarak önemi gün geçtikçe artmaktadır. Doğal ürünler arasında mantar, kolayca ve bol miktarda elde edilebilmesi ayrıca ucuz olması nedeniyle klinik çalışmalarda en potansiyel aday olarak görülmektedir. Mantar orijinli antibiyotikler günümüzde bakteriyel enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Araştırmalar antifungal karbohidratlar yoluyla mantarın antikanser doğası, özellikle akciğer kanserine etkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Mantarları, çeşitli kabilelerin çok eskiden beri tedavi edici kullanmaları, tıbbi potansiyellerinin önemini ortaya koymuş ve araştırmacıların görüşlerini modern tıbbi potansiyelleri üzerinde yoğunlaştırmalarına sebep olmuştur. Mantarlar herbal tedavinin uygulandığı toplumlarda diğer mantarlarla veya otlarla karıştırılarak onların biyoaktifliğini artırıcı/azaltıcı veya yan etkilerini önleyici olarak kullanılmışlardır (66,69).

Asırlardır insanoğlu için önemli bir gıda kaynağı olarak hizmet eden şapkacı veya makromantarlar, içerdikleri yüksek protein ve vitaminler yanında, düşük yağ içeriği, lif, karbonhidrat ve minerallerden dolayı değerli besinlerdir. Mantarlar kuru ağırlık üzerinden yaklaşık %39,9 karbonhidrat, %17,5 protein ve %2,9 yağ içermektedir. Yenilebilir mantarlarda önemli aminoasitler, mineral maddeler, B kompleks vitaminleri (thiamin, riboflavin, nikotik asit, biotin), C, D ve K vitamini bulunmaktadır. Dünyada özellikle gelişmekte olan ülkeler için önemli bir protein kaynağı olarak görülen mantarlardaki protein içerikleri %16,8–41,0 arasında değişmektedir. Çoğu sebze türünden daha yüksek protein içeriğine sahip olan mantarların protein değeri, kuşkonmaz ve patatesin iki katı, domates ve havuçtakinin

4 katı ve portakaldakinin 6 katıdır. Geleneksel Çin tıbbında uzun yıllardan beri kullanılan mantarlar günümüzde de çoğu ülkede sadece besleyici özelliklerinden dolayı değil, içerdikleri metabolik ürünler nedeniyle üretilmekte ve tıpta kullanılmaktadır. Yenilebilir doğa mantarlarının beslenmemizdeki önemi besinsel ve farmakolojik özelliklerinden dolayı gün geçtikçe artmaktadır. Türkiye büyük bir yenilebilir mantar potansiyeline sahiptir ve önemli bir doğa mantarı ihracatçısı olma konumundadır. Karadeniz bölgesinde de çok sayıda yenilebilir doğa mantarı bulunmakta, yeme kalitesi yüksek olanların büyük bir kısmı da yöre halkı tarafından tanınarak tüketilmektedir. Tüketilen türler arasında özellikle Samsun ve Ordu illerinde *Lactarius pyragalus* (*L. pyragalus*), *Lactarius controversus* (*L. controversus*) ve *Lactarius semisanguiflus* (*L. semisanguiflus*)'un önemli bir yeri bulunmaktadır. Fındık mantarı veya Tirit olarak bilinen *L. pyragalus*, Samsun ve Ordu halkı tarafından çok sevilerek tüketilen bir türdür. Fındık altında, bahar aylarında görülür. Taze ya da salamurası yapılarak değerlendirilmektedir. Giresun, Ordu ve Samsun illerinde tespit edilen birçok *Lactarius* türü bulunmaktadır. Bununla birlikte bölgemizde doğal olarak yetişen ve halk tarafından tüketilen *L. pyragalus*, *L. controversus* ve *L. semisanguiflus* mantarlarının besinsel özellikleri konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır (63).

### **1.9.1. Fındık Mantarı (*L. pyragalus*) ve Özellikleri**

Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde yetişen yenilebilir *L. pyragalus*, *L. controversus* ve *L. semisanguiflus* mantar türlerinin protein ve mineral maddeler yönünden zengin olduğunu ve bölge halkı için yüksek kalitede bir besin kaynağı olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Türkiye gibi gelişmekte olan ülke insanların beslenmesindeki protein ve mineral açığını kapatmada bu mantar türlerinden yararlanılabileceği görülmektedir (63).

Karadeniz Bölgesinde yetişen *L. pyragalus* türünün bazı kimyasal özelliklerine ait ortalamalar ve standart hataları Tablo 1.4'te verilmektedir (63).

**Tablo 1.4.** Karadeniz Bölgesinde Yetişen Fındık Mantarı (*L. pyragalus*) Türüne ait Bazı Kimyasal Özellikler ve Standart Hataları (63)

Özellikler	<i>L. pyragalus</i> (n= 18)
Kuru Madde (%)	68,74 ± 1,36
Kül (%)	8,37 ± 0,44
N (%)	3,97 ± 0,09
Protein (%)	24,84 ± 0,54
K (mg kg <sup>-1</sup> )	31078,84 ± 3028,78
P (mg kg <sup>-1</sup> )	398,09 ± 11,64
Ca (mg kg <sup>-1</sup> )	5598,00 ± 1878,03
Mg (mg kg <sup>-1</sup> )	1335,59 ± 125,83
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	278,53 ± 34,18
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	34,29 ± 1,84
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	21,55 ± 1,43
Na (mg kg <sup>-1</sup> )	1311,41 ± 312,79
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	281,31 ± 42,28

n = Mantar Sayısı

### 1.9.2. Fındık Mantarı (*L. pyragalus*)'un Morfolojik Özellikleri

Bu tür grimsi rengi ve sarı renkli seyrek lamelleriyle diğer *Lactarius* türlerinden farklıdır.

Şapka çapı 5-10 cm, renk gri kahverengi, bazen sarımsıdır, pembemsi mor izler taşır. Önce düz olan şapka sonra hafif huni görünümü alır. Üzerinde eş merkezli daire halinde koyu çizgiler bulunur. Parlak olmayıp ince etlidir. Nemli iken yapışkandır. Sap kısmı 7-15 mm kalınlıkta ve 4-6 cm uzunlukta genelde silindirik yapıda, bazen üst tarafı daha kalıncadır. Sap şapka üstüne göre daha açık renkli ve beyazımsı etlidir. Lameller oldukça açık renkli ve beyazımsı olup diğer kanlıca mantarlarına göre oldukça seyrekler. Bu seyreklik türü tanımlamada en önemli işarettir. Nispeten sapa doğru devam eden lameller daha sonra tarçın ve sarı renge

döner. Spor izi açık hardal sarısı rengindedir. Ağustos ve Kasım Ayları arasında yetişmektedirler. Özellikle şapka ve süt rengi kirli kahverengi türlerinden bazıları zehirli olabilmektedir (64).

### **Bilimsel Sınıflandırma**

Alem	: Fungi
Bölüm	: Basidiomycota
Sınıf	: Homobasidiomycetae
Alt Takım	: Russulales
Familiya	: Russulaceae
Cins	: Lactarius
Tür	: L. pyragalus

**Resim 1.1.** Fındık Mantarı (*L. pyragalus*) (64)



### 1.9.3. Fındık Mantarının (*L. pyragalus*) Yetiştığı Bölgeler

Fındık bahçeleri ve ormandaki yabani fındık ağaçları diplerinde yağışın bol olduğu karadeniz iklim örtüsüne benzer özelliklere sahip yerlerde yetişmektedir (64).

### 1.10. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Katalaz, biyolojik ve biyokimyasal sistemlerde antioksidan etkiye sahip bir enzim olup toksik ve yükseltgen etkiye sahip hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) hücrelerden uzaklaştırmada önemli rol oynar. Katalaz dokuları  $H_2O_2$  ve kısmen indirgenmiş oksijen türlerinin toksik etkilerinden korumada görevlidir. Antioksidan savunma sistemi, hücreyi serbest radikal veya diğer reaktif moleküllerin oksidatif hasarından korur.

Fındık mantarı (*Lactarius pyraglus*), Fr. Basidiomycetae sınıfına bağlı *Russulales* takımından *Russulaceae* familyası içinde yer alan ektomikorizal bir mantardır. Fındık (*Corylus avellana* L.) ağaçları ile ektomikorizal ilişkisi olan *Lactarius pyragalus* türü Karadeniz Bölgesinde “Fındık mantarı” veya “Tirmit” olarak bilinmektedir. Özellikle Samsun, Giresun ve Ordu halkı tarafından çok sevilerek tüketilen ve bölgede pazarlarda satılan bir mantar türüdür. *L. pyragalus* protein ve mineral maddeler yönünden zengin olması yanında, tıbbi olarak da kullanımı olan bir türdür. Taze ya da salamurası yapılarak değerlendirilmektedir. Fındık ağaçları altında, sonbahar aylarında görülmektedir.

Bu çalışmada, Giresun yöresinde yetişen fındık mantarından (*L. pyragalus*) katalaz enzimi ilk kez saflaştırıldı ve bazı kinetik özellikleri incelendi. Fındık mantarı, ham ekstre hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve kolon kromatogafi işlemleri yapılarak saflaştırma yapıldı. Son olarak saflaştırılan katalaz enziminin bazı kinetik özellikleri incelendi. Tüm saflaştırma adımlarında protein miktarı Lowry Yöntemine; katalaz aktivitesi ise Sigma Yöntemine göre tayin edildi.

### 1.10.1. Mantarlar ve İnsan Sağlığı

Mantarların bünyesinde az miktarda şeker ve yağ bulunmaktadır. Bu sebeple diyetik yemekler içerisinde mantarın ayrı bir yeri vardır. 100 g taze mantar yenildiği zaman ancak 20-40 kalori vermektedir. Bu da zayıflamak isteyen kişiler için mantarları ideal bir gıda niteliğine sokmaktadır. Diğer taraftan mantarlar kalp ve damar hastalıkları bulunan kişiler için de tavsiye edilen yiyecektir.

Mantarlarda bulunan protein miktarı tür ve çeşidine göre değişmekle birlikte ortalama olarak 100 g mantarda 3-8 g'dır. Bu proteinlerin ortalama %70'i sindirilebilir niteliktedir. Böylece yenilen 100 g mantarın yaklaşık 2-5 g'ı protein olarak vücuda alınır. Mantarlardan alınan proteinler vücutta depolanmaz, günlük harcanırlar.

Hayvansal gıdalarda ortalama %8-15 arasında protein bulunmaktadır. Bu proteinlerin ortalama %30-40'ı sindirilir; yani yenilen 100 g hayvansal gıdadan alınan protein miktarı yaklaşık 3-8 g kadardır. Bu proteinlerin fazlası vücutta depolanmaya başlayarak amonoasitler biçiminde damar çeperinde birikir. Bu özellikle erkeklerde görülen kalp-damar hastalıklarının nedenlerinden biridir.

Kalp damar hastalıklarına sahip kişiler için hayvansal gıdaların alınması sakıncalıdır. Mantarlardaki protein miktarı hayvansal yiyeceklerdeki protein miktarından biraz az da olsa, vücutta birikme riski olmamasından dolayı tercih nedeni olmalıdır. Bunların yanında, mantarlardaki proteinlerde insanların beslenmesi için gerekli tüm amonoasitler de bulunmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı mantarlar sağlığımız açısından önemli besinlerdir.

### 1.11. Katalaz Enziminin Saflaştırılması ile İlgili Önceki Çalışmalar

Seriner, (2010), hıyardan (*Cucumis sativus*) katalaz enzimini; amonyum sülfat çöktürmesi, dietil aminoetilsellüloz (DEAE) kolon kromatografisi kullanarak safılaştırmış ve katalazın spesifik aktivitesini 393 U/mg protein olarak saptamıştır (74).



Kara, (2008), Sakarya'da yetişen iki farklı kabak çekirdeğinden (*Cucurbita maxima* ve *moschata*) katalaz enzimini saflaştırarak bazı kinetik özelliklerini incelemiştir. Enzim için optimum pH, optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 6,8-7,0 ve 25 °C olarak bulunmuştur. *Cucurbita maxima* için  $K_m = 17,68$  mM,  $V_{max} = 81,300$  EÜ / mL; *Cucurbita moschata* için  $K_m = 20,029$  mM,  $V_{max} = 58,139$  EÜ / mL olarak belirlemiştir (74).

Bozdemir, (2007), keten tohumu (*Linum usitatissimum*) ekstraktında katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelerini incelemiş, spesifik aktivitelerini sırasıyla 15,94 U/mg ve 2,05 U/mg olarak saptamıştır(74).

Demir, (2006), aşotu (*Coriandrum sativum*) Yapraklarından katalaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırmıştır. Katalaz enziminin, spesifik aktivite değeri 89.68 EU/mg protein; enziminin  $K_m$  değeri 7,87 mM,  $V_{max}$  değeri 42,19 EU/mL olarak bulunmuştur (74).

Öztürk ve arkadaşları, (2005), maydanozdan katalaz enzimini; amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-Sephadex A-50 jelinin kullanıldığı iyon değişim kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Enzimin spesifik aktivitesi 1126 EU/mg, optimum pH'ı 7,0 ve optimum sıcaklığı ise 35 °C olarak saptanmıştır (74).

Malgorzata ve arkadaşları, (2005), dondurulmuş soya fasulyesi filizlerindeki antioksidan enzim aktivitelerini incelemişlerdir. 1 °C ye soğutulmuş filizlerdeki CAT ve SOD aktivitelerinin 25°C'deki değerlere kıyasla arttığı gözlenmiştir. Sondaş, (2005), nane (*Menta spicata*) ve pırasa (*Allium porrum L.*) bitkilerinden katalaz enziminin kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı kinetik özelliklerini incelemiştir. Nane bitkisinde optimum pH 6,0; optimum sıcaklık 40 °C,  $V_{max}$  değeri 108,69 EU/ml ve  $K_m$  değeri 1,175 mM olarak, pırasa bitkisinde optimum pH 7,5 , optimum sıcaklık 30 °C,  $V_{max}$  değeri 50 EU/mL ve  $K_m$  değeri 1,172 mM olarak bulunmuştur (74).

Yörük ve arkadaşları, (2005), Van elmasından (*Golden delicious*) katalazı saflaştırmış ve bazı özelliklerini incelemişlerdir. Enzimin spesifik aktivitesi 29.43 U/mg protein; optimum sıcaklığı 50°C ve optimum pH'ı 5,0 olarak bulunmuştur (74).

Köksal, (2003), katalaz enziminin karalahana bitkisinden (*Brassica oleracea L. var. acephala D.C.*) saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı pestisitler ile antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Karalahanadan kısmi olarak saflaştırılan katalaz enziminin optimum pH 7,8 ve optimum sıcaklık 25°C olarak bildirilmiştir.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri 0,0159 M ve 588,2 EU/mL olarak bildirilmiştir (74).

Diğer, (2000), roka (*Eruca sativa*) bitkisinden katalaz enzimini saflaştırmıştır. Katalazı rokadan (*Eruca sativa*) saflaştırmak için sephadex G-25 kolon kromatografisi ve Q-sefaroze kolonu kullanmıştır. Katalazın spesifik aktivitesini 29865 U/mg, optimum pH'ını 7,0-10,0 arasında, optimum sıcaklığını 30°C ve  $K_m$  değerini 62,5 mM olarak belirlemiştir (74).

Mitchell ve arkadaşları (1991), lahana iliklerinden (*Trichoplusia*) katalazı; ethanol kloroform fraksiyonu ve standart kolon kromatografisi yöntemlerini kullanarak saflaştırmışlardır. Enzimin spesifik aktivitesini  $2,2 \cdot 10^5$  U, olarak saptamışlardır (74).

Beaumont ve arkadaşları (1990), katalaz enzimini patates kökünden (*Solanum tuberosum*); AcA-34 ultrajel kolonu ile saflaştırmışlardır. Enzimin spesifik aktivitesini yaklaşık 3000 EU/mg protein olarak saptamışlardır (74).

Havir ve Mchale (1987), katalaz enzimini tütün yapraklarından (*Nicotiano sylvestris*) Sephadex G-25 kolonu kullanarak saflaştırmışlardır Tipik olarak düşük peroksidatif aktiviteye sahip olan CAT-I ve yüksek peroksidatif aktiviteli CAT-III izoenzimlerinin  $K_m$  değerlerini sırasıyla 0,057 M ve 0,054 M olarak saptamışlardır (74).

Hirasawa ve arkadaşları (1987), ıspanaktan (*Spinacea oleracea*) katalaz enzimini saflaştırmışlar ve ıspanak katalazının spektroskopik özelliklerini incelemişlerdir. Yapılan aktivite çalışmaları sonucu enzimin spesifik aktivitesini yaklaşık 25000 EU/mg protein olarak saptamışlardır (74).

### 1.12. İlgili Literatür Işığında Projenin Yeri

Bu çalışmada, katalaz enziminin saflaştırılması amacıyla ağustos-eylül aylarında Giresun yöresinde yetişen Fındık mantarı kullanıldı. Giresun yöresinde yaygın olarak bulunan yenilebilir fındık mantarı besin olarak tüketilmektedir. Bileşiminde fosfor, kalsiyum, demir, B<sub>1</sub>, C vitaminleri, protein, karbonhidrat ve çok az miktarda da yağ bulunur. Kansızlığa ve zihinsel yorgunluğa iyi gelmektedir. Çok düşük kalorili olduğu için de kilo problemi yaratmamaktadır. Kolesterol düşürücü etkisi vardır, bağışıklık sistemini güçlendirici etkiye sahiptir. Antioksidan özelliği sayesinde vücuttaki toksinleri atmada etkilidir. Yapılan literatür araştırmalarına göre katalaz enzimi çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış olup bitki ve mantar olarak az sayıda kaynak kullanılmıştır.

Literatürdeki bu boşluğu doldurmak adına yeni katalaz kaynaklarının araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu boşluktan yola çıkılarak bu çalışmada, Giresun yöresinde yetişen bir mantar türü olan fındık mantarından ilk kez katalaz enziminin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi, böylece literatüre bir katkı sağlanması amaçlanmıştır. Yapılan literatür araştırmalarına göre katalaz enzimi çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış olup bitki ve mantar olarak az sayıda kaynak kullanılmıştır. Literatürdeki bu boşluğu doldurmak adına yeni katalaz kaynaklarının araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu boşluktan yola çıkılarak bu çalışmada, Giresun yöresinde yetişen bir mantar türü olan fındık mantarından ilk kez katalaz enziminin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi, böylece literatüre bir katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Son yıllarda endüstri alanında en önemli gelişmeler, biyolojik sistemlerin kullanıldığı kimyasal reaksiyonlarla ilişkili olmaktadır ve çeşitli reaksiyonlarda kullanılabilecek organizmalara veya saf enzimlere olan talep ve ihtiyaç gittikçe

artmaktadır. Enzim ya da enzim grupları tarafından katalizlenen reaksiyonlar, genel organik reaksiyonlarından çok daha yüksek verimle ve reaksiyon karışımında yüksek saflıkta ürün oluşumu şeklinde meydana gelir. Enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin ortaya konması ile çok çeşitli endüstriyel kullanımları mümkündür. Bu sebeple, bazı özel kimyasal maddelerin üretiminde enzimlere gittikçe daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Enzim katalizli polimerleşme reaksiyonları ile elde edilen polimerler, özel kimyasal maddelerin üretiminde, enzimlerin ne derece spesifik olduğunu göstermektedir. Bazı fenol türevlerinin, polifenollerin, polianilinlerin, katalazlar (95) kullanılarak ılımlı reaksiyon şartları altında yükseltgenme yoluyla polimerleştirildikleri belirtilmiştir.

Yöremizde yetişen yabani makromantar katalazların varlığı, bu türden çalışmaların daha kapsamlı bir şekilde yapılıp, endüstriyel uygulamalar için kullanışlı olabileceği açısından önem arz etmektedir. Bu kaynaklardan Katalazların saflaştırılması ile çeşitli ve yeni bazı polimerlerin veya diğer kimyasal maddelerin sentezi işlemlerinde kullanılabilirliklerinin araştırılması hız kazanacaktır.

Bu çalışmada ekonomik öneme sahip yenilebilir fındık mantarı (*L. pyragalus*) katalaz enziminin elde edilen saf katalaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla aşağıdaki hedefler belirlenmiştir.

Serbest radikaller hücre içi reaksiyonları zedeleyen ve toksik etki gösteren bileşenler olması nedeniyle bu toksit etki gösteren hedeflerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bu nedenle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hücre ve dolayısıyla dokularda meydana getirebileceği zararları ortadan kaldırmak amacıyla endojen kaynaklı katalaz enzimi kullanılmaktadır. Katalaz, bu özelliği ile bir antoksidan görevi üstlenmektedir.

Ayrıca birçok endüstriyel besinlerde oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' in ortamdan uzaklaştırılmak amacıyla kullanılmaktadır.

Canlı organik hücrelerde ve endüstriyel gıdalarda meydana gelen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı toksikleri ortadan kaldırmak adına yöremizde yetişen ve tüketilebilen fındık

mantarı, tüketilmenin yanında bir endüstriyel öneme de sahiptir. Bu kaynaklardan sağlanan özütten katalaz enziminin saflaştırılması ve kapsamlı karakterizasyonu ile bunun sonucunda elde edilen katalaz aktivitesinin inhibisyonu verilerinin, benzer şekilde diğer endüstriyel katalaz kaynaklarına adapte edilmesiyle, hem istenmeyen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı ekonomik kayıplar azaltılmış veya önlenmiş hem de besin değerini kaybetmeksizin ürünlerin raf ömrü arttırılmış olacaktır. Buna göre, yukarıda da ayrıntılı bir şekilde belirtildiği gibi, yapılan bu çalışmayla, yeni enzim kaynakları denenerek endüstrinin ihtiyaç duyduğu yeni ve potansiyel katalazların saflaştırılması ve elde edilen bu enzim için optimum çalışma şartlarının belirlenmesi, bu bilgiler dahilinde, çeşitli alanlarda enzimin kullanılması amacıyla, endüstriyel veya farmakolojik öneme sahip yüksek saflıkta bazı organik bileşiklerin sentezi ve bazı polimerizasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi, gibi farklı uygulamalar için kaynak teşkil edecektir.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik
Destile Su Cihazı	: Nüve-NS-108
Etüv	: Binder
pH Metre	: Butech
UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu UV Mini-1240
Terazi	: Ohaus
Hassas Terazi	: Sartorius, Ohaus
Su Banyosu	: Memmert
Ultrasonikasyon	: Selectra
Otomatik Pipetler	: Brand Pipetleri, Dragon Lab.
Rotary Evaporatör	: Büchi Rotavapor R-200
Elektroforez	: Bio-RAD
Blender	: King
Manyetik Karıştırıcı	: Chiltern Hotplate HS 31
Soğutuculu Santrifuj	: Sigma 3K 30
Vorteks	: Velp Scientifica

#### 2.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fındık mantarından (*L. pyragalus*) katalaz enzimi saflaştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada yenilebilir fındık mantarından 100 g alınarak, 50 mM fosfat tamponu (pH=7,0) ile hazırlanan ham ekstreler kullanıldı. Fosfat tamponunun hazırlanmasında dipotasyum hidrojen fosfat (Merck) ve potasyum dihidrojen fosfat (Merck)'tan yararlanıldı. Yenilebilir fındık mantarından hazırlanan ham ekstrenin amonyum sülfat kesiti için amonyum sülfat (Sigma) ve Sigma marka {D-9527 genişliği 43 mm (1,7"), çapı 27 mm (1,1")} dializ kesesi kullanıldı.

DEAE-selüloz kolon kromatografisinde, kolon dolgu maddesi olarak DEAE-selüloz (Sigma) kullanıldı. Hazırlanan ekstrelerin ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi çıkışında elde edilen fraksiyonların saklanması +4°C'lik buzdolabı ve dondurucusu kullanıldı.

Yenilebilir fındık mantarından elde edilen ham ekstrede, %60'lık amonyum sülfat fraksiyonunda ve DEAE-selüloz kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyonlarda, enzim aktiviteleri tayinlerinde substrat olarak hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck), tampon olarak dipotasyum hidrojen fosfat (Merck) ve potasyum dihidrojen fosfat (Merck)'tan yararlanıldı.

Protein miktar tayininde; Lowry metoduna göre standart olarak sığır serum albumini (Merck), protein miktar tayininde kullanıldı. Folin ayırıcı (Merck), Bakır Sülfat (Sigma 12849), dipotasyum tartarat, sodyum karbonat, sodyum hidroksit kullanıldı.

## **2.2. Metod**

### **2.2.1. Fındık Mantarı Ham Ekstresinin Hazırlanması**

Blender yardımıyla parçalanmış fındık mantarından ham ekstre hazırlamak üzere 100 g tartılıp 500 mL 50 mM fosfat tamponunda (pH= 7,0) +4°C'de manyetik karıştırıcı ile 1 saat karıştırıldıktan sonra, bir gece bekletildi. Ertesi gün homojenizat iki kat bezden süzüldü. 0°C'de 18000 rpm'de, 30 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım alındı. Bu işlemlerin sonucunda Fındık mantarı ham ekstresi elde edildi. Ham ekstrede katalaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

### **2.2.2. Fındık Mantarı (*L. pyragalus*) Ham Ekstresinde Katalazı**

#### **Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması**

Fındık mantarındaki katalazı çöktürecek uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, 25 mL'lik 10 adet behere, 5'er mL fındık

mantarı ham ekstresi konuldu. Birinci behere ortamdaki konsantrasyonu %10 olacak şekilde toz amonyum sülfattan yavaş yavaş ilave edilerek karıştırıldı. Her beherde konsantrasyon %10 arttırılarak, %90'a kadar değişen oranlarda toz amonyum sülfat azar azar ilave edilerek karıştırıldı. Ham ekstreler içindeki amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra 45 dakika daha karıştırıldı ve ağızları kapatılarak +4°C' lik buzdolabında bir gece bekletildi. Ertesi gün, her beherdeki ham ekstre 0°C'de 18000 rpm'de, 30'ar dakika, santrifüje edildi. En uygun konsantrasyonun belirlenmesi için alt ve üst fazlarda protein miktarları ve enzim aktiviteleri tayin edildi.

Elde edilen sonuçlardan fındık mantarı için en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %60 olduğu saptandı.

### **2.2.3. Fındık Mantarının Ham Ekstresinde Katalazın %60 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi ve Dializ İşlemi**

Fındık mantarı katalazını çöktüren en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %60 olduğu saptandığından, ortam konsantrasyonu %60 olacak şekilde ham ekstreye, katı amonyum sülfat azar azar ilave edildi. +4°C'de manyetik karıştırıcı ile 45 dakika karıştırıldıktan sonra ağız kapatılarak bir gece bekletildi. Ertesi gün 0°C'de 18000 rpm'de, 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Çökelti pH'sı 7,0 olan 0,02 M sodyum fosfat tamponunda çözüldü ve hacmi ölçüldü. Bu çözeltide de katalaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldıktan sonra, amonyum sülfatı uzaklaştırmak amacıyla dializ kesesine (Sigma D-9527 {genişliği 43 mm (1,7"), çapı 27 mm (1,1")}) konuldu. Soğuk dolapta, 0,01 M sodyum fosfat tamponu (pH=7,0) ile çözelti sık sık değiştirilerek ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak, çözeltide sülfat iyonu kalmayınca kadar dializ işlemine devam edildi. Dializ işlemi tamamlanmış olan çözelti, dializ kesesinde çöken kısımları uzaklaştırmak amacıyla, 0°C'de 18000 rpm'de, 30 dakika, santrifüj edildi. Üstteki berrak çözelti alındı ve %60 amonyum sülfat kesiti olarak adlandırıldı. Katalaz aktivitesi ve protein miktarı tayin edildikten sonra uygun hacimlere bölünerek buzdolabının dondurucusunda saklandı.



## **2.2.4. Dietilaminoetil (DEAE)-Selüloz Kolon Kromatografisi**

### **2.2.4.1. DEAE - Selülozun Hazırlanması**

20 g DEAE-selüloz yaklaşık 200 mL 1 mM pH'sı 7,6 olan sodyum fosfat tamponu içinde manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı. Çökmesi beklendi. Üstteki bulanık sıvı atıldı. Üzerine tekrar aynı miktarda tampon ilave edildi. Bu işlem birkaç kez yinelendi. Bir gece oda ısısında bekletildi. Ertesi gün üstteki sıvı döküldü. Tekrar 1 mM tampon konuldu ve 30 dakika karıştırıldı. Bu yöntemle şişirilmiş olan DEAE-selüloz kullanılarak saflaştırma işlemlerine devam edildi.

### **2.2.4.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi**

Yukarıda belirtilen şekilde şişirilmiş olan DEAE-selüloz, 1 cm çapındaki alt ucu ince madde ile kapatılmış alt kısmı musluklu bir cam kolona, kolon yüksekliği 5 cm olacak şekilde dolduruldu ve üç kolon hacmi pH'sı 7,0 olan 0,5 mM sodyum fosfat tamponu geçirilerek dengelendi. Kolona yaklaşık 200 mg/mL protein olarak %60 amonyum sülfat kesiti uygulandı. Kolondan öncelikle 0,5 mM'lık sodyum fosfat tamponu (pH=7,0) geçirildi. Daha sonra kolondan sırasıyla yaklaşık 200 ml 0.5 mM sodyum fosfat tamponunda çözülmüş 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM ve 500 mM NaCl gradienti uygulandı. Fraksiyonlar her tüpte eşit hacim olacak şekilde toplandı (4-5 mL). Tüplerdeki çözeltilerin absorbansları elüe edilen tampona karşı spektrofotometrede, 280 nm'de okunarak elüsyon grafiği çizildi. Ayrıca, elüsyonlardaki katalaz aktivitesi tayin edilerek aktivite değerleri de aynı grafikte gösterildi. Enzimatik aktivite gösteren tüplerdeki çözeltiler bir araya toplandı ve bu çözeltinin katalaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı. Çözelti uygun hacimlere bölünerek, daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

## **2.2.5. Protein Miktar Tayini**

Fındık mantarından katalazın saflaştırılması sırasında, ham ekstre ve %60'lık amonyum sülfat fraksiyonunun elde edilmesi evrelerinde, protein miktarı Lowry

yöntemine (90) göre tayin edildi. DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlardaki protein miktar tayinlerinde ise  $E_{280}/E_{260}$  Warburg yöntemi (73) kullanıldı.

### 2.2.6. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

**Ayıraçlar A ayıracı:** 0.1 N NaOH içinde çözülmüş % 2 sodyum karbonat çözeltisi

**B ayıracı:** % 0.5 bakır (II) sülfatın %1'lik dipotasyum tartarattaki çözeltisi

**Folin ayıracı:** Folin ayıracı 1/3 oranında distile su ile seyreltildi.

**C ayıracı (Alkali bakır çözeltisi):** 50 mL A ayıracına 1 mL B ayıracı ilave edildi.

#### 2.2.6.1. Deneyin Yapılışı

Bir deney tüpüne, protein miktarı tayin edilecek çözümlerden 0,5 mL kondu, üzerine 2,5 mL C ayıracı ilave edilerek iyice karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,25 mL seyreltik Folin ayıracı ilave edildi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Oluşan mavi–mor renkli çözeltinin absorbansı spektrofotometrede, 500 nm’de ayıraç körüne karşı okundu. Okunan bu absorbans değerinin sığır serum albumini ile çizilen standart grafiğe uygulanmasıyla, protein miktarı % mg olarak saptandı.

#### 2.2.6.2. Bovin Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

Bovin serum albuminin distile sudaki % 100 mg’lık çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözümlerden uygun seyreltmeler ile %2 mg, %4 mg, %6 mg, %8 mg, %10 mg, % 20 mg, %30 mg, %40 mg, %50 mg, %60 mg, %70 mg, %80 mg ve %90 mg’lık konsantrasyonlardaki çalışma çözümleri hazırlandı. Elde edilen standart çözümlere Lowry deneyi uygulandı. Deney 10 kez tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak serum albumini regresyon denkleminde standart grafiği çizilerek protein miktarları hesaplandı.

### 2.2.7. E<sub>280</sub>/E<sub>260</sub> Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Kolondan elde edilen elüatların 280 nm'deki absorbansları elüe edildikleri tamponlara karşı spektrofotometrede okundu. E<sub>280</sub>/E<sub>260</sub> oranı hesaplandı ve bu değere uyan faktör tablodan bulundu. Çözeltinin içerdiği protein miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Protein mg/mL} = \text{Faktör} \times E_{280}$$

$$\text{Protein Konsantrasyonu (mg/mL)} = 1,5 \times A_{280} - 0,75 \times A_{260}$$

**Tablo 2.1.** E<sub>280</sub>/E<sub>260</sub> Warburg Yöntemi ile Protein Miktar Tayininde Kullanılan Faktör Tablosu (71).

E <sub>280</sub> /E <sub>260</sub>	% Nükleik asid	Faktör*
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585

0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

\* 1 cm'lik ışık yolu

## **2.2.8. Katalaz Aktivitesinin Tayini**

### **2.2.8.1. Sigma Yöntemine Göre Aktivite Tayini**

Çalışmadaki tüm katalaz aktivitesi tayinleri, Sigma Yöntemine göre yapıldı. Reaktif olarak 50 mM pH=7,0 fosfat tamponu içerisinde çözülmüş 10 mM hidrojen peroksit çözeltisi ve katalaz enzimi içeren ekstraktlar kullanılmıştır. Son olarak katalaz enzimi içeren hidrojen peroksit çözeltisine ilave edilmek üzere reaksiyonu durdurmak amacıyla 1 M hidroklorik asit (HCl) eklenmiştir.

### **2.2.8.2. Deneyin Yapılışı**

UV kuvvetlerinin birine 50 mM pH=7,0 fosfat tamponu içerisinde çözülmüş 10 mM hidrojen peroksit çözeltisinden 5 mL ve üzerine 10 µL enzim çözeltisi, diğer küvete ise yine aynı hidrojen peroksit çözeltisinden 5 mL ve üzerine 10 µL 50 mM pH=7,0 fosfat tamponu konulmuştur. 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılan enzim çözeltisi 2 dakika sonunda 1 M HCl çözeltisinden 1 mL eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Oda sıcaklığında 240 nm de absorbansı okunmuştur. Bu sıcaklıkta absorbansın 0,450'den 0,400'e düşmesi için geçen süre belirlenmiştir.

## 2.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS – PAGE)

### 2.2.9.1. Kullanılan Çözeltiler

**A. 1 M Tris-HCl tamponu pH=8.8:** 2,4228 g (0.1 M) Tris 16 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,8'e ayarlandı. Toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı.

**B. 1 M Tris-HCl tamponu pH=6.8:** 2,4228 g (0.1 M) Tris 16 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=6,8'e ayarlandı. Toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı.

**C. Numune Tamponu:** 0,65 mL 1M Tris-HCl (pH=6,8), 3 mL %10'luk SDS ve 1 mL %87 gliserin, 1 mL %0.1'lik brom timol mavisi karıştırılarak son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. 1 M NaOH azar azar damlatılarak Mavi renk alması sağlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 950 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

**D. Yürütme Tamponu:** 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL saf suda çözüldü, 5 mL %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

**E. Renklendirme Çözeltisi:** 0,66 g Coomassie Brilliant Blue R-250'nin 120 mL metanolde çözünmesi ve bunun üzerine 24 mL saf asetik asid ile 120 mL distile su ilavesiyle hazırlandı.

**F. Renksizleştirme Çözeltisi:** 7,5 hacim asetik asid, 5 hacim metanol ve 87,5 hacim destile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

### 2.2.9.2. Jellerin Hazırlanması

**Ayrırma Jeli:** 5 mL 1 M Tris-HCl (pH=8,8), 4,4 mL %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,203 mL %10'luk SDS, 1-2µL %99,99'luk N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED) ve 3,13 mL distile su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0,266 mL %1,5'lik günlük hazırlanmış amonyum persülfat çözeltisi ilave edildi.

**Yığma Jeli:** 1 M Tris-HCl (pH=6,8)'den 1,24 mL, %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %10'luk SDS'den 0.1 mL, %99,99'lik TEMED'den 1 µL ve distile sudan 5 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak günlük hazırlanmış %1,5'lik amonyum persülfat çözeltisinden 0,2 mL ilave edildi. Yığma jeli ile işlem yaparken distile su miktarı 5 mL çekildi.

### 2.2.9.3. SDS - PAGE İle Enzim Saflığının Kontrolü

Fındık mantarı katalazı DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli %3, ayırma jeli %10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli SDS-PAGE jel elektroforezi, Laemmli tarafından belirtilen (77) yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Ayırma jeli, ince uçlu bir enjektör yardımı ile 0,7 cm çapındaki cam tüplere, üstten 2-3 cm boşluk kalacak şekilde, hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek dolduruldu. Jel yüzeyinin düzgün olması için etanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki etanol mavi bant süzgeç kağıdı kesilerek ayırma jelinin yapısını bozmadan etanol emdirilmiş ve pürüzsüz yüzey elde edildikten sonra polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Yığma jeli polimerleştikten sonra molekül ağırlığı standart çözeltileri ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi sonunda elde edilen enzim çözeltisi toplam hacim 20 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu ile karıştırıldı. Sırasıyla Ham ekstre, DEAE kolon eluatı, ve liyofize edilen DEAE kolon eluatı kuyucuklara yüklemesi yapıldı. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı.

Kuyucuklara yüklendi. 40 mA akım geçirildi. Brom timol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0,5-0,3 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Elektroforez camlarındaki jel dikkatlice çıkarıldı, yığma jeli kesilip atıldı sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli, renklendirme çözeltisine konuldu ve 1,5-2 saat yavaş bir şekilde çalkalandı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. 30

dakikalık aralarla çözelti değiştirildi. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra %7'lik asetik asit içinde saklandı.

Fındık mantarı katalaz enzimi molekül ağırlığı standart proteinlerin molekül ağırlıkları yardımıyla grafikten hesaplandı. Bantların orijine göre  $R_f$  değerleri bulundu. Hesaplanan  $R_f$  değerleri apside, protein bantlarına karşılık gelen molekül ağırlıklarının logaritması da ordinata yazılarak molekül ağırlığı grafiği elde edildi. Aynı şekilde katalazın  $R_f$  değeri hesaplanarak, grafikten molekül ağırlığı tayin edildi.

### **2.2.10. Fındık Mantarından Elde Edilen Katalazın Enzim Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi**

Fındık mantarından elde edilen katalaz aktivitesinde kinetik özellikleri incelemek için DEAE-selüloz kolonundan elde edilen fraksiyonlar belirlenmiştir.

#### **2.2.10.1. Katalaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi**

Fındık mantarından elde edilen katalazın optimum pH'sını belirlemek amacıyla enzimin pH = 4-10 aralığında gösterdiği katalaz aktivitesi ölçüldü. pH=4-5 aralığında asetat tamponu, pH=6-8 aralığında fosfat tamponu, pH=9-10 aralığında glisin-NaOH tamponu, pH=11-12 aralığında ise  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -NaOH tamponu kullanıldı. Belirlenen pH aralıklarında hazırlanan 50 mM'lık tampon çözeltilerde 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözüldürülerek substratlar elde edildi. Bu substratlar üzerinden sigma yöntemine göre aktivite tayinleri yapıldı. Tüm denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Denemeler 3 kez yapılarak ortalamaları alındı. Değişik pH değerlerinde elde edilen katalaz aktivitesi absorbans değerleri ordinata, pH değerleri apside konarak optimum pH eğrisi çizildi.

#### **2.2.10.2 Katalaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi**

Enzim çözeltisinden 3'er mL alınarak 20°C-70°C arasında, sıcaklık her defasında 10°C arttırılarak, su banyosunda 30 dakika süre ile tutuldu. Oda sıcaklığına

getirilen çözeltilerde katalaz aktivitesi tayinleri yapıldı (72). Denemeler 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alındı. Sıcaklık değerleri apsise, elde edilen enzim aktivite değerleri ordinatta olmak üzere optimum sıcaklık eğrisi çizildi. Oda sıcaklığında yapılan denemelerin aktiviteleri 100 kabul edilerek (kontrol) her bir sıcaklık için % aktivite değerleri hesaplandı.

### **2.2.10.3. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması**

Katalaz aktivitesinin uygun reaksiyon süresinin bulunması amacıyla substrat, enzim ve tampon çözeltilerden aktivite tayin yönteminde belirtilen miktarlarda alınarak reaksiyonun 1, 2, 3, 4, 5, 15 ve 20. dakikalarında katalaz aktivitesi tayin edildi (87).

### **2.2.10.4. Katalaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi**

Fındık mantarından saflaştırılan katalaz enziminin sadece hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ilgisinin fazla olduğu saptandığından bu enzimin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri tayin edildi. Bu amaçla 50 mM pH:7,0 fosfat tamponunda çözünmüş H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in 0,00125-0,00025 mM aralığındaki çözeltileri hazırlandı. Deneyler 3 defa tekrarlandı. En küçük kareler yöntemine göre Lineweaver–Burk doğru denkleminde ve grafikten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri hesaplandı.

### **2.2.10.5. Enzim Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi**

Enzim konsantrasyonunun katalaz aktivitesine etkisini incelemek amacıyla enzim çözeltisi, 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL ve 50 µL arasında değişen hacimlerde alınarak yukarıda belirtilen şekilde katalaz aktivitesi tayin edildi (72).

### **2.2.10.6. Substrat Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi**

Substrat konsantrasyonunun katalaz aktivitesine etkisini araştırmak amacıyla 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda çözünmüş H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden 10 µL, 1 mL, 2,5



mL, 5 mL, 7,5 mL ve 10 mL arasında değişen hacimlerde alınarak yukarıda belirtilen şekilde katalaz aktivitesi yöntemine göre tayin edildi (72).



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Fındık Mantarından Katalazın Saflaştırılması

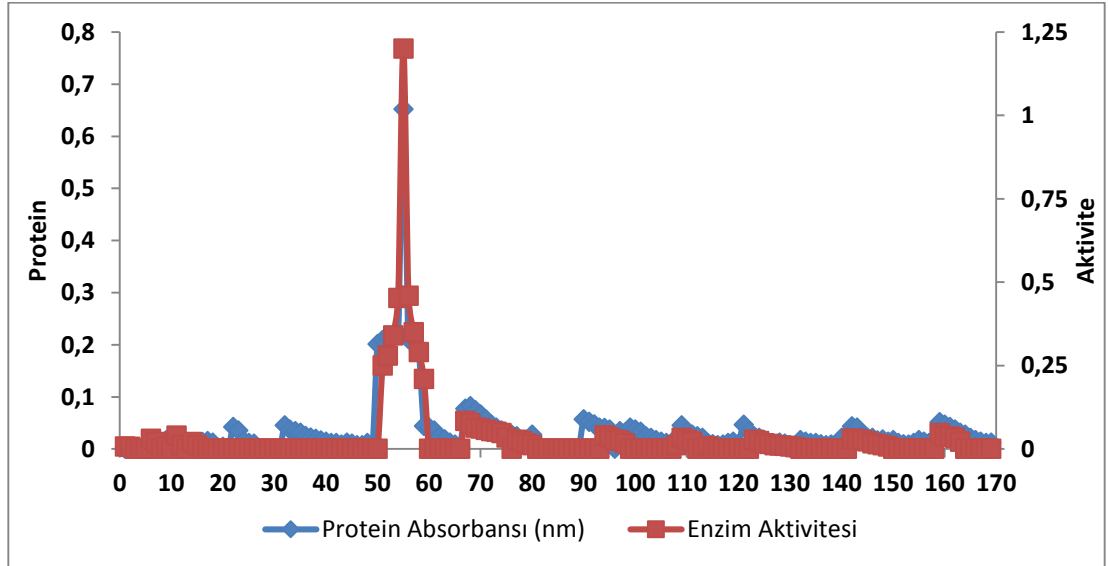
##### 3.1.1. Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonu

Fındık mantarı ham ekstresinde katalazı çöktüren uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %60 olduğu belirlendi.

##### 3.1.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi

Dializatın DEAE-selüloz kolonuna uygulanması sonucunda katalazın 500 mM NaCl/0.5 M sodyum fosfat tamponu ile tek pik şeklinde olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1).

Fındık mantarından Katalazın saflaştırılma evreleri ve bu evrelere ait sonuçlar Tablo 3.1’de gösterildi. Çalışmamızda Fındık mantarı ham ekstresi hazırlama, amonyum sülfat kesiti ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi evrelerinde Katalaz aktivitesi tayin edildi. Fındık mantarından Katalaz enzimi DEAE- selüloz kolon kromatografisi sonucu 29,44 kez saflaştırıldı (Tablo 3.1) .



Şekil 3.1 Fındık Mantarı Ham Ekstresinin % 60 Amonyum Sülfat Fraksiyonunun DEAE-Selüloz kolon kromatografisi Elüsyon Grafiği

Kolon Boyutu: 1.4x10 cm

Kolona uygulanan protein: 200 mg/mL

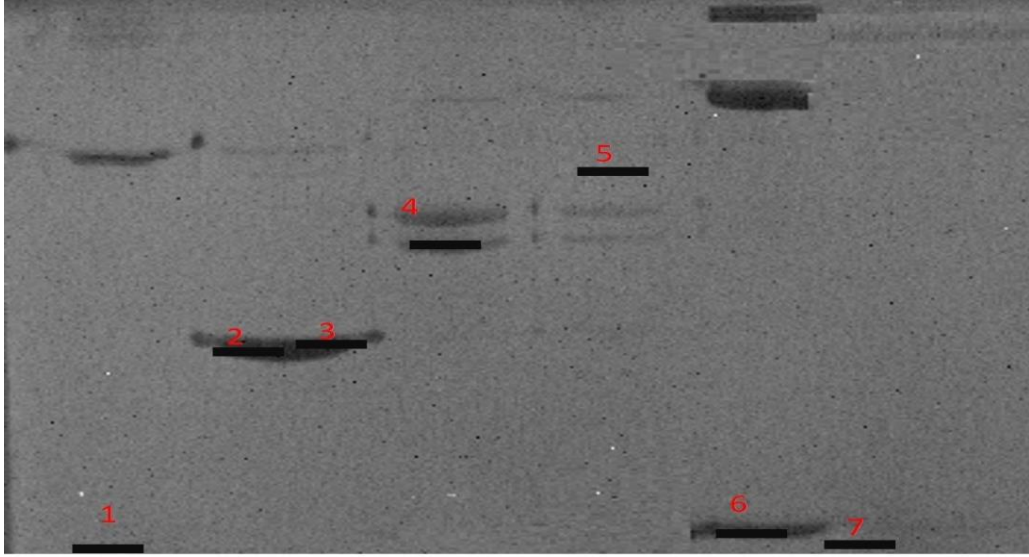
Elüsyon tamponları: pH'sı 7,0 olan 0,5 mM sodyum fosfatta çözülmüş 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM NaCl.

**Tablo 3.1.** Fındık Mantarı Katalazının Saflaştırma Basamakları

İşlem Evreleri	Total Protein (mg)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Oranı
Ham Ekstre	5302	305461	57,61	1
%60 Amonyum Sülfat Kesiti	444	31118	70,17	1,22
Dializat	334	52779	158,21	2,75
DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi	8,16	13838	1696	29,44

### 3.1.3. SDS-PAGE Elektroforezi

Saflaştırılan katalaz enziminin SDS-PAGE uygulanarak tek protein bandı içerdiği saptandı. Molekül ağırlığı tayininde kullanılan standart proteinler ile çizilen eğriden katalaz molekül ağırlığının 12 kDa olduğu saptandı. (Şekil 3.2.).

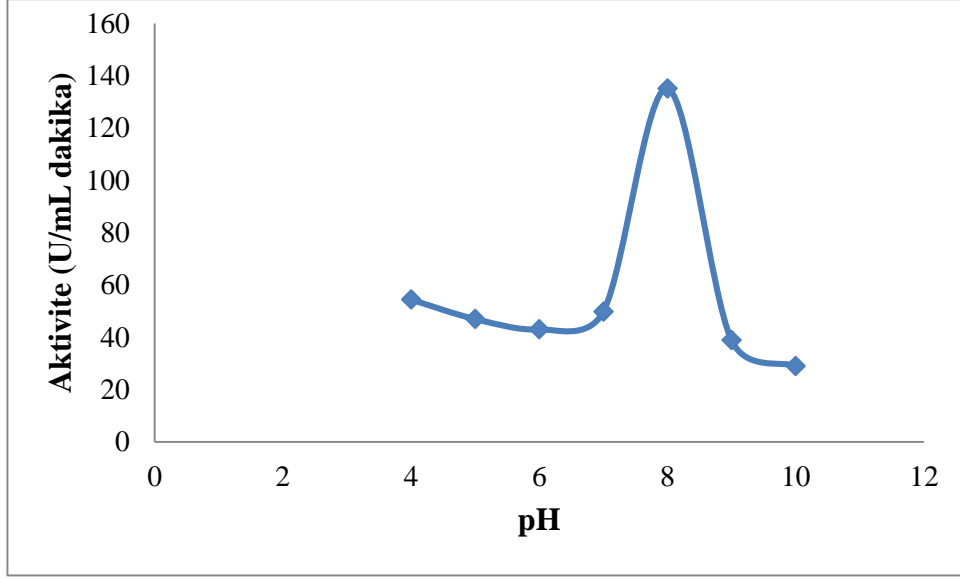


**Şekil 3.2.** SDS-PAGE Jel Elektroforezi

1. Bovine serum albumin (Mr = 14,2 kDa)
2. Karbonik anhidraz (Mr = 29 kDa)
3. Serum albumin (Mr = 45 kDa )
4. Alfa lakta albumin (Mr =132 kDa )
5. Üreaz (Mr = 272 kDa)
6. Ham ekstre ( Mr 23,6 kDa )
7. DEAE-selüloz kolon çıkışlı enzim çözeltisi ( Mr = 12 kDa )

#### **3.1.4. Katalaz Aktivitesine pH'nın Etkisi**

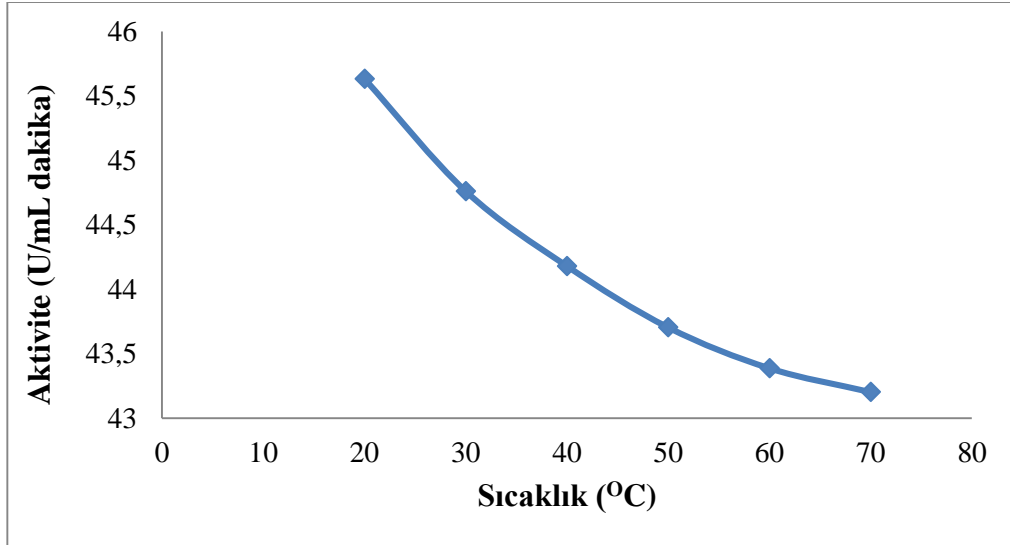
Katalaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerini belirlemek amacı ile değişik 50 mM fosfat tamponunda çözünmüş 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 4,0-10,0 aralığındaki pH değerleri kullanılarak reaksiyon hızları belirlendi. Elde edilen değerlerden yararlanılarak aktiviteler (72) hesaplandı. Böylece katalaz enzimi için optimum pH değeri tespit edildi (Şekil 3.3.).



**Şekil 3.3.** Katalaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

### 3.1.5. Katalaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

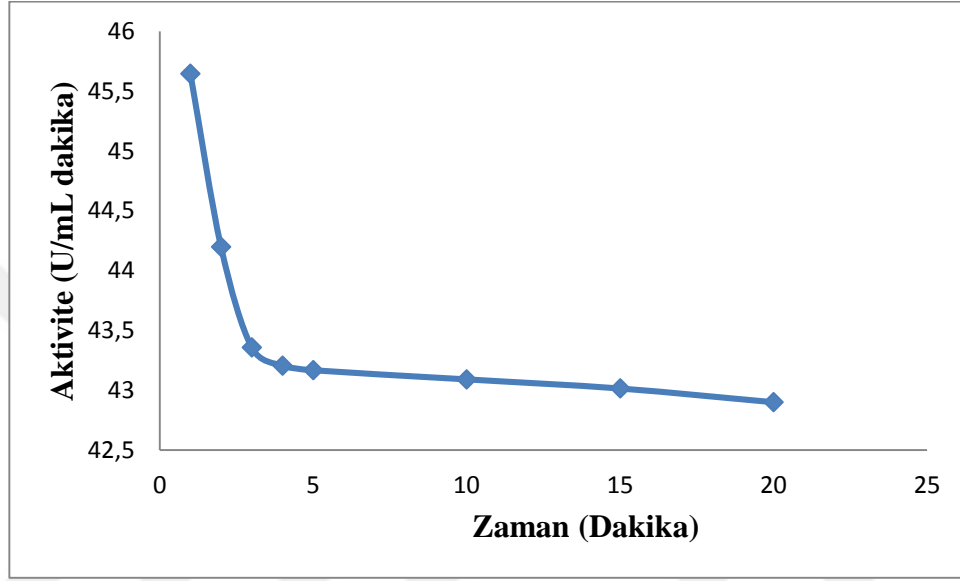
Katalaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi amacıyla  $H_2O_2$  substratı kullanılarak 20, 30, 40, 50, 60, 70°C'deki reaksiyon hızları belirlendi. Elde edilen verilerden yararlanarak aktiviteler (72) hesaplandı. Böylece katalaz enzimi için optimum sıcaklık değeri belirlendi.



**Şekil 3.4.** Katalaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

### 3.1.6. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması

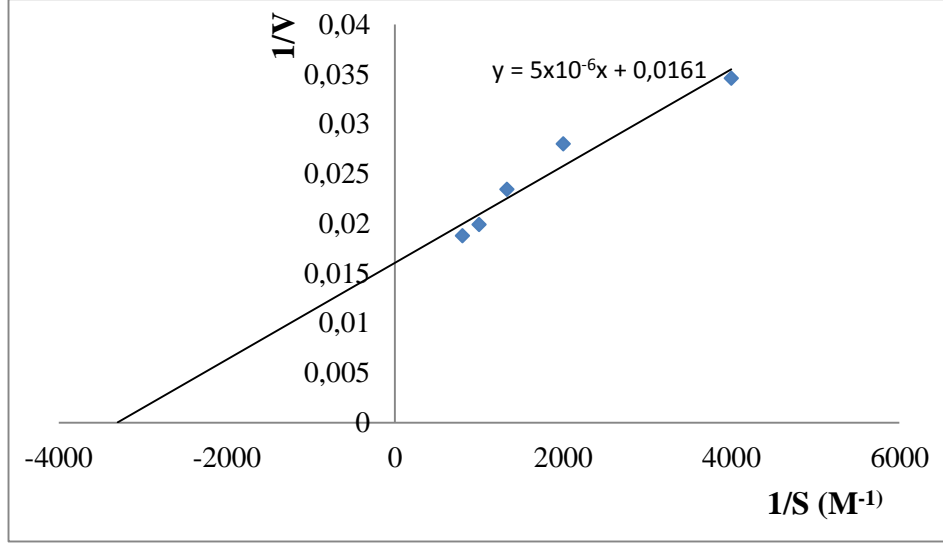
Katalaz aktivitesinin 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 ve 20. dakikalarındaki reaksiyonlar sonucunda aktivitenin zamana bağlı olarak arttığı saptandı. En yüksek aktivitenin 2. dakikada gerçekleşmesi nedeni ile aktivite tayininde 2. dakikada ölçümlerin yapılmasına karar verildi (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Zamanın Katalaz Aktivitesine Etkisi

### 3.1.7. Katalaz Enziminin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

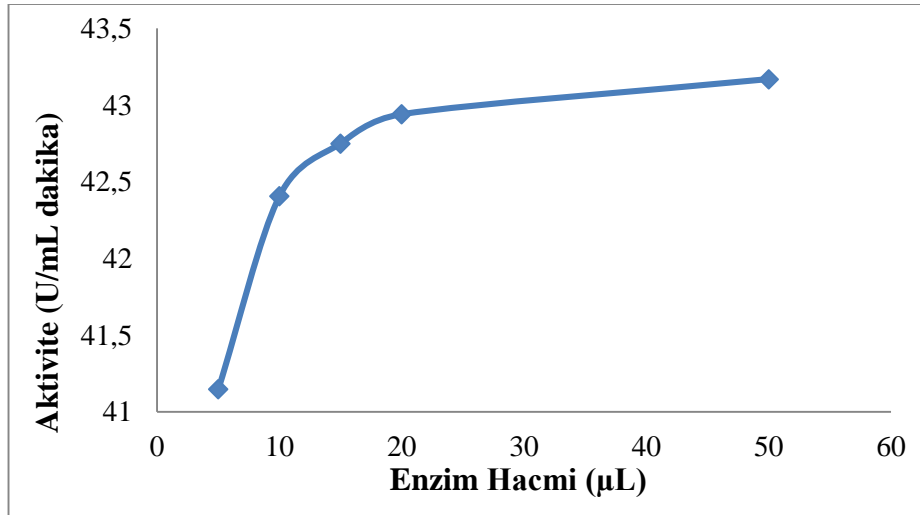
Katalaz enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk denkleminde yararlanılarak hesaplandı. Katalazın  $K_m$  değeri 0,310 mM,  $V_{max}$  değeri 62,112 U olarak belirlendi (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Katalazın  $K_m$  ve  $V_{max}$  Değerleri

### 3.1.8. Enzim Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi

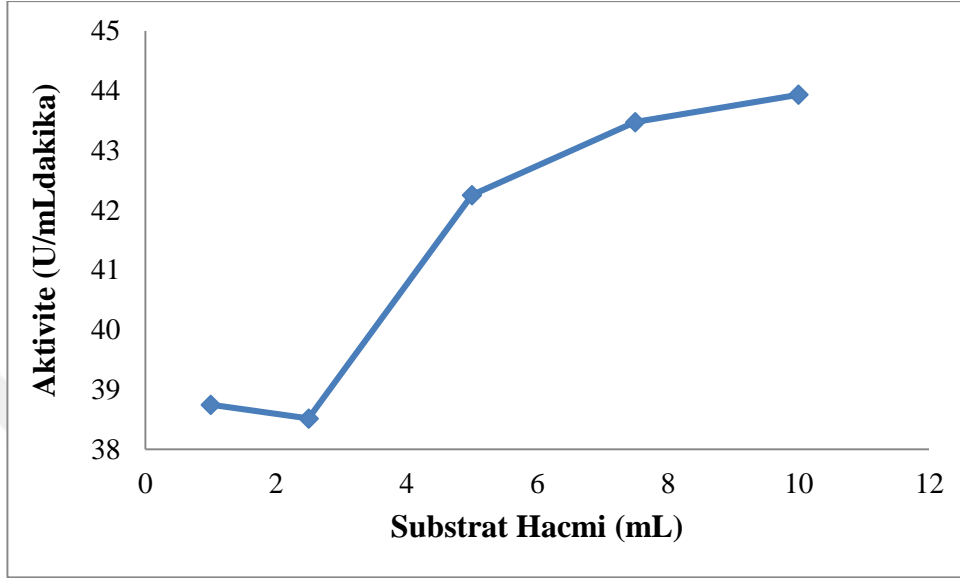
5  $\mu$ L-50  $\mu$ L arasında değişen hacimlerde alınan enzim çözeltileriyle katalaz aktivitesi ölçümleri yapıldı. Enzim hacminin artması ile katalaz aktivitesinin arttığı görüldü. Ancak 20  $\mu$ L enzim hacminde aktivite belli bir değerde dengelendiği yinede enzim hacminin artması ile aktivitenin çok fazla artış göstermediği saptandı (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Enzim Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi

### 3.1.9. Substrat Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi

Farklı miktarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratına karşı katalaz aktivitesi ölçüldü. En yüksek aktivitenin 10 mL substrat ile olduğu bulundu. (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Substrat Konsantrasyonunun Katalaz Aktivitesine Etkisi



#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanım alanlarına sahip olan katalazların, çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırıldığı ve bazı kinetik özelliklerinin incelendiği tespit edilmiştir. Katalazın fındık mantarından saflaştırılması ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, fındık mantarı katalazı ilk kez saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir.

Enzimlerin çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırılmasında, farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlere göre çalışmalarda saflaştırma oranları da değişmektedir. Yapılan çalışmalarda katalaz, hıyardan (*Cucumis sativus*) 14,72 kat (75), aşotu yaprakları (*Coriandrum sativum*)'ndan 64,06 kat (76) saflaştırılmıştır. Bu çalışmada fındık mantarı (*L. pyragalus*)'ndan katalaz enzimi 29,44 kat saflaştırılmıştır.

Literatürde çeşitli kaynaklardan çeşitli saflaştırma metotları kullanılarak yapılan katalazın saflaştırılması ile ilgili çalışmaların sonuçları bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçlarında farklı aktiviteler rapor edilmiştir. Bozdemir (2007), keten tohumu (*Linum usitatissimum*)'ndan saflaştırdığı katalaz enziminin spesifik aktivitesini 15,94 U/mg, olarak saptamıştır. Demir (2006) aşotu (*Coriandrum sativum*) yapraklarından saflaştırdığı katalaz enziminin, spesifik aktivite değeri 89.68 EU/mg protein olarak bulmuştur (74). Fındık mantarı (*L. pyragalus*)'ndan saflaştırılan katalaz enziminin spesifik aktivite değeri 1696 U/mg protein olarak bulundu.

Optimum pH'ı Dinçer (2000), roka (*Eruca sativa*) bitkisinden saflaştırılan katalaz enzimi için 7,0-10,0 aralığı; Köksal (2003) karalahanadan (*Brassica oleracea L. var. Acephala*) kısmi saflaştırılan katalaz için 7,8; Öztürk ve arkadaşları (2005), maydanozdan saflaştırılan katalaz enzimi için 7,0; Sondaş (2005), nane (*Menta spicata*) ve pırasa (*Allium porrum L.*) bitkilerinden kısmi saflaştırılan katalaz için sırasıyla 6,0 ve 7,5; Yörük ve arkadaşları (2005), Van Elması (*Golden delicious*)'ndan saflaştırılan katalaz enzimi için 5,0; Kara (2008), kabak

çekirdeğinden (*Cucurbita moschata*) saflaştırılan katalaz için 7,0 olarak bulunmuşlardır. Çalışmamızda fındık mantarı (*L. pyragalus*)'ndan saflaştırılan katalaz enziminin optimum pH'ı 8,0 olarak bulunmuş olup literatürdeki değerlerle uygunluk içerisindedir.

Akar (2015), cevizden (*Juglans regia*) saflaştırdığı katalaz enziminin optimum sıcaklığını 25 °C; Dinçer (2000), rokadan (*Eruca sativa*) kısmi saflaştırılan katalaz için 30 °C; Köksal (2003), karalahanadan (*Brassica oleracea L. var. acephala*) kısmi saflaştırılan katalaz için 25 °C; Yörük ve arkadaşları (2005) Van Elması'ndan (*Golden Delicious*) saflaştırılan katalaz enzimi için 50 °C; Öztürk ve ark (2005), maydanozdan saflaştırılan katalaz enzimi için 35 °C olarak bulunmuşlardır (74). Çalışmamızda fındık mantarı (*L. pyragalus*)'ndan saflaştırılan katalaz enziminin optimum sıcaklığını 20 °C olarak bulunmuştur.

Belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta Lineweaver-Burk grafiği çizilmiş ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. Fındık mantarı (*L. pyragalus*)'ndan saflaştırılan katalaz enziminin  $K_m$  değeri 0,310 mM;  $V_{max}$  değeri ise 62,112 U olarak bulunmuştur. Sondaş, (2005 nane (*Menta spicata*) ve pırasa (*Allium porrum L.*) bitkilerinden kısmi olarak saflaştırmış olup nane katalazı için,  $V_{max}$  değerini 108,69 EU/mL ve  $K_m$  değerini 1,175 mM; pırasa katalazı için  $V_{max}$  değerini 50 EU/mL ve  $K_m$  değerini 1,172 olarak bulunmuştur. Kara (2008) tarafından yapılan kabak çekirdeğinden (*Cucurbita moschata*) saflaştırdıkları katalaz için  $K_m$  değerini 0,00209 M,  $V_{max}$  değerini ise 58,139 EU/mL olarak rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak fındık mantarı (*L. pyragalus*)'ndan katalaz enzimi ilk kez saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. Buna göre;

- Fındık mantarından katalaz 29,44 kat saflaştırıldı.
- Katalaz enziminin  $H_2O_2$  substratına göre optimum sıcaklık değerinin 20°C, optimum pH değerinin 8,0 olduğu bulundu.
- Katalaz aktivitesi için uygun reaksiyon süresi ise 1 dakika olarak belirlendi.
- Fındık mantarından saflaştırılan katalazın  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, sırasıyla 0,310 mM ve 62,112 U olduğu bulundu.

- Katalaz aktivitesinin uygun enzim konsantrasyonunun 50  $\mu$ L ve substrat konsantrasyonunun 10 mL olduğu belirlendi.
- SDS-PAGE elektroforezi sonucunda saflaştırılan enzimin moleköl ağırlığının 12 kDa olduğu bulundu.

Elde edilen sonuçlardan, Giresun yoresinde yetişen ve besin maddesi olarak oldukça fazla tüketlenen fındık mantarından katalaz enziminin saflaştırılıp çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabileceği kanısına varıldı.



## KAYNAKLAR

1. Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervi B., Williamsn, G. 1997. Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2. *Biochemical Society Transactions*, 25 (4): S559.
2. Jornot, L., Petersen, H., Junod, A.F. 1998. Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage is Independent of Nuclear Calcium but dependent on Redox-Active Ions. *Biochemical Journal*, 335: 85-94.
3. Mills, E.M., Takeda, K., Yu, Z.X., 1998. Nerve Growth Factor Treatment Prevents the Increase in Superoxide Produced by Epidermal Growth Factor in PC12 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (35): 22165-22168.
4. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T., M., 1993. Oxidants, Antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 7915-7922.
5. Müftüoğlu, O., 2003. *Yaşasın Hayat*. Doğan kitapçılık; 113, İstanbul
6. Akkuş, İ., 1995. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. 38 (5): Mimoza yayınları; 1-123.
7. DüNDAR, Y., Aslan, R., 2000. *Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar*. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları; 73:95-101, Afyon.
8. Telefoncu, A., 1997. *Enzimoloji*. pp. 193-243-353-383, Tübitak Yayınları, Aydın.
9. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Menten, G., Ersöz, B., 1993. pp. 73-74, 341-349. *Harper'in Biyokimyası*, Barış Kitabevi, İstanbul.

10. Pamuk, F., 2000. *Biyokimya*, Gazi Kitabevi, Ankara.
11. Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., 2000. *Biyokimya*. pp. 213-247, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
12. Solomons, G.T.W., Fryhle, C.B., Okay G., Yıldırım, Y., 2002. *Organik Kimya*. pp. 975-8431-87-0, Literatür Yayıncılık, İstanbul.
13. Gögüş, F. ve Fadilođlu, S., 2006. *Food Chemistry*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara 975-591-871-x.
14. Güngör, K., 2008. Çađla Badem (*Prunus Dulcis*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. pp. 4. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya.
15. Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A.M., 2006. *Biyokimya*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 975-591-131-6.
16. Yenson, M., 1984. *İnsan Biyokimyası*. İstanbul Üniversitesi, Tıp Anabilim Dalı, Kırklareli.
17. Özata, A. Ve Kutlu, M., 2000. *Enzimoloji Ders Notları*. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir.
18. Zamocky, M., Koller, F., 1999. Understanding the Structure and Function of Catalases: Clues from Molecular Evolution and in vitro Mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72: 19-66.
19. Potapovich, M.V., Eryomin A.N., Artzukevich, I.M., Chernikevich, I.P., Metelitz, D.I., 2001. Isolation, Purification and Characterization of Catalase from the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, 66 (6):646-57.

20. Aydemir, T., Kuru, K. 2003. Purification and Partial Characterization of Catalase from Chicken Erythrocytes and The Effect of Various İnhibitors on Enzyme Activity, *Turkish Journal of Chemistry* 27,1,85-97.
21. Çimen, Ç., Öter Ç., Demir H. ve Savran A., 2005. Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin incelenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, VAN YYÜ *Veteriner Fakültesi Derisi*, 16,1,15-20.
22. Sivrikaya, A., 2007. Katalaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Peroksinitrit Aktivitesinin İncelenmesi. Karadeni Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.
23. Carter, Brannon, Robin L. 2007. <http://crystal.uah.edu/carter/enzyme/catalase.html> Web adresinden 16.01.2015 tarihinde alınmıştır.
24. Vasudevan, P.T., Weiland, R.H., 1994. Studies on the Morphology of Immobilized Catalase. *The Chemical Engineering Journal*, 55:B41-B45.
25. Alptekin, Ö., 2009. Katalazın Eupergit, Florisil ve Cam Desteklere Kovalent olarak İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Dokora Tezi, Adana.
26. Çetin, K., 2000. Tavuk Karaciğerinden Katalaz Enziminin Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
27. Yurdakul, Z., 2005. *Oksijen ve Canlılar*, <http://www.klinikbiyokimya.com/seminer/oksijen/oksijen.htm> Web adresinden 16.01.2015 tarihinde alınmıştır.
28. Afsar, H. ve Demirata, B., 1993. Indirect Spectrophotometric Determination of Hydrogen- Peroxide, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 347, 460.

29. Dinçer, A., 2000. Roka (*Eruca sativa*) Bitkisinden Katalaz Enziminin Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
30. Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*, *Method. Enzymol.*, 105, 121-126.
31. Dhaese, P., 1996. Catalase: an enzyme at with growing industrial potential, *Chimica Oggi*, 14,1-2,19-21.
32. Akertek, E. ve Tarhan, L., 1995. Characterization of Immobilized Catalases and Their Application in Pasteurization of Milk with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 50, 291-303.
33. Akgöl, S. ve Dinçkaya, E., 1999. A Novel Biosensor For Specific Determination of Hydrogen Peroxide: Catalase Enzyme Electrode Based on Dissolved Oxygen Probe, *Talanta*. 48, 363-367.
34. Görenek, G., 1999. Aljinat Kürecikler içinde Katalaz İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi , Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
35. Yıldız, H., 1999. Selüloz Asetat Kürecikler yüzeyinde Katalaz İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
36. Tarhan, L., 1995. Use of Immobilised Catalase to Remove H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Used in the Sterilisation of Milk, *Process Biochemistry*, 30 (7): 623-628.
37. Uhlig, H., 1998. Industrial Enzymes and Their Applications. *John Wiley and Sons*, p: 333, Canada.
38. Paar, A., Costa, S., Tzanov, T., Gudelj, M., Robra, K.H., Cavacopaulo, A., Gubitz, G.M., 2002. Thermo-alkali-Stable Catalases from Newly Isolated

*Bacillus sp.* for the Treatment and Recycling of Textile Bleaching Effluents. *Journal of Biotechnology*, 89: 147-153.

39. Eberhardt, A.M., Pedroni, V., Volpe, M., Ferreira, M.L., 2004. Immobilization of Catalase From *Aspergillus Niger* on Inorganic and Biopolymeric Support for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Decomposition. *Applied Catalysis B: Environmental*, 47: 153-163.
40. Lida, T., Maruyama, D., Fukunaga, K., 2000. Stabilization of Entrapped Catalase Using Photo Crosslinked Resin Gel for Use in Wastewater Containing Hydrogen Peroxide. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 75: 1026-1030.
41. Wiseman, A. 1986. *Handbook of Enzyme Biotechnology and Edit.*, John Wiley and Sons, Chichester, England.
42. Seip.E., Fager, S.K., Gavagan, J.E, Anton, D.L., Cosimo, R.D., 1994. Glyoxylic Acid Production Using Immobilized Glycolate Oxidase and Catalase. *Bioorganic and Medicine Chemistry*, 2 (6): 371-378.
43. Lafuente, R.F., Rodriguez, V., Guisan, J.M., 1998. The Coimmobilization of D-Amino Acid Oxidase and Catalase Enables the Quantitative Transformation of D-Amino Acids (D-Phenylalaline) into  $\alpha$ -Keto Acids (Phenylpyruvic Acid). *Enzyme and Microbial Technology*, 23: 28-33.
44. Kramer, L., Ve Steckhan, E., 1997. Coimmobilization of L- $\alpha$ -glycerophosphate Oxidase with Catalase and It is Application for the Synthesis of Dihydroxyacetone Phosphate, *Tetrahedron*, 53(43):14645-14650.
45. Streitenberger, S.A., Villaverde, M.J., Sánchez-Ferrer, A., Garcia-Carmona, F., 2002. Microencapsulation of *Aerococcus Viridans* with Catalase and its Application for the Synthesis of Dihydroxyacetone Phosphate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 73-76.



46. Godjevargova, T., Dayal, R., Marinov, I., 2004. Simultaneous Covalent Immobilization of Glucose Oxidase and Catalase on to Chemically Modified Acrylonitrile Copolymer Membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 91: 4057-4063.
47. Sukyai, P., Rezi, T., Lorenz, C., Mueangtoom, K., Lorenz, W., Haltrich, D., Ludwig, R., 2008. Comparing Soluble and Coimmobilized Catalysts for 2-ketoaldose Production by Pyranose 2-oxidase and Auxiliary Enzymes. *Journal of Biotechnology*, 135: 281–290.
48. Chen, H., Mousty, C., Chen, L., Cosnier, S., 2008. A New Approach for Nitrite Determination Based on a Hrp/Catalase Biosensor. *Materials Science and Engineering C*, 28: 726–730.
49. Cui, Y., Barford, J.P., Renneberg, R., 2006. A Disposable, Screen- Printed Electrode for The Amperometric Determination of Azide Based on the Immobilization With Catalase or Tyrosinase. *Analytical Sciences*, 22: 1279-1281.
50. Ertaş, N., Timur, S., Akyılmaz, E., Dinçkaya, E., 2004 Specific Determination of Hydrogen Peroxide With a Catalase Biosensor Based an Mercury Thin Film Electrodes. *Turkish Journal of Chemistry*, 24: 95-99.
51. Jiang, B., Zhang, Y., 1993. Immobilization of Catalase on Crosslinked Polymeric Hydrogels. *Effect of Anion on the Activity of Immobilized Enzyme, The European Polymer Journal*, 29(9):1251-1254.
52. Jiang, H.J., Yang, H., Akins, D.L., 2008. Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Catalase Immobilized on a Swnt-Nanocomposite Film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 623:181–186.
53. Liang, J.F., Li, Y.T., Yang, V.C., 2000. Biomedical Application of Immobilized Enzymes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89: 979-990.

54. Modrzejewska, B., Guwy, A.J., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., 2007. Measurement of Hydrogen Peroxide in an Advanced Oxidation Process Using an Automated Biosensor. *Water Research*, 41: 260 – 268.
55. O'brien, K.B., Killoran, S.J., O'neill, R.D., Lowrya, J.P., 2007. Development and Characterization In vitro of a Catalase-Based Biosensor for Hydrogen Peroxide Monitoring. *Biosensors and Bioelectronics* 22: 2994–3000.
56. Prakash, P.A., Yogeswaran, U., Chen, S.M., 2009. Direct Electrochemistry of Catalase at Multiwalled Carbon Nanotubes. Nafion in Presence of Needle Shaped Ddab for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sensor, *Talanta*, 15: 1414-1421.
57. Ramanathan, K., Jönsson, B.R., Danielsson, B., 2001. Sol–Gel Based Thermal Biosensor for Glucose. *Analytica Chimica Acta*. 427 (1): 1–10.
58. Salimi, A., Noorbakhsh, A., Ghadermarz, M., 2005. Direct Electrochemistry And Electrocatalytic Activity of Catalase Incorporated Onto Multiwall Carbon Nanotubes-Modified Glassy Carbon Electrode. *Analytical Biochemistry* 344: 16–24.
59. Santoni, T., Santianni, D., Manzoni, A., Zanardi, S., Mascini, M., 1997. Enzyme Electrode for Glucose Determination in Whole Blood. *Talanta*. 44: 1573-1580.
60. Sezgintürk, M.K., Göktuğ, S., Dinçkaya, E., 2005. A Biosensor Based on Catalase For Determination of Highly Toxic Chemical Azide in Fruit Juices. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 684–688.
61. Varma, S., Mattiasson, B., 2005. Amperometric Biosensor for the Detection of Hydrogen Peroxide Using Catalase Modified Electrodes in Polyacrylamide. *Journal of Biotechnology*, 119:172–180.

62. Gao, X., Yang, W., Pang, P., Liao, S., Cai, Q., Zeng, K., Grimes, C.A., 2007. A Wireless Magnetoelastic Biosensor for Rapid Detection of Glucose Concentrations in Urine Samples. *Sensors and Actuators B*, 128:161–167.
63. Pekşen, A., Kibar, B., Yakupođlu, G. 2007. Yenilebilir Bazı *Lactarius* Türlerinin Morfolojik Özelliklerinin Protein ve Mineral İçeriklerinin Belirlenmesi. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22 (3): 301-305.
64. <http://mantaravciligi.blogspot.com.tr/2016/07/findik-tirmiti-findik-kirmiti-lactarius.html> web adresinden 07.10.2016 tarihinde alınmıştır.
65. Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H, Inlow, J.K. 2006. Comparative Analysis of Polyphenol Oxidase From Plant and Fungal Species. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100: 108-123.
66. Erkel, D. 1992. Dünyada ve Türkiye’de Kültür Mantarcılığının Durumu, Türkiye 4. Yemeklik Mantar Kongresi, 2-4 Kasım, İstanbul, Bildiriler Kitabı, Cilt 1: 2-8.
67. Sesli, E. 1994. Trabzon Yöresinde Yetişen Makromantarlar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
68. Boztok, K. 1990. Mantar Üretim Tekniđi , Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi yayınları, İzmir.
69. Blackwell, W. H. 1998. Paisonous and Medicinal Plant, Prentice Hall, *New Jersey*.
70. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

71. Min-Kyung L. 2007. Inhibitory Effect of Banana Polyphenol Oxidase During Ripening of Banana by Onion Extract and Maillard Reaction Products. *Food Chemistry*, 102: 146–149.
72. Ünal, M.Ü., Şener, A. 2006. Determination of Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Emir Grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Emir). *Journal of Science Food Agriculturel*, 86: 2374-2379.
73. Warburg, O., Christian, W. 1941. Isolierung und Kristallinsation Des Garungsferments Enolase. *Biochemische Zeitschrift*, 310: 384-421.
74. Akar Ç., 2015. Katalaz Enziminin Cevizden (*Juglans Regia*) Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Entitüsü, Adana
75. Seriner R. 2012. Katalaz Eniminin Hıyardan (*Cucismus sativus*) Saflaştırılması, *Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 28: 85-94.
76. Demir H. Aşotu (*Coriandraam sativun*) Yapraklarından Katalaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Araştırılması, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 24-26 Mayıs 2006, Erzurum.
77. Gill, J., Parish, J.H. 1997. Minireview: Lipases-Enzymes at an Interface. *Biochemical Education* 25 (1): 2-5.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında GİRESUN Merkez İlçesi'nde doğdu. İlköğrenimini Yeşil Giresun İlköğretim Okulu'nda, Orta öğrenimini Giresun Lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nü kazandı. 2008 yılında mezun olduğu Yüksek öğreniminden sonra çeşitli gıda fabrikalarında Gıda Mühendisi ve Sorumlu Yönetici olarak çalıştı. 2010 yılında askerlik vazifesini yerine getirdi. Şu anda Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime devam etmektedir.

